ผลของสารประกอบซิลเวอร์ชนิดต่าง ๆ ต่อจุลชีพในช่องปาก ความเป็นพิษต่อเซลล์เยื่อบุช่องปากมนุษย์และการหยุดยั้งฟันผุในแบบจำลองฟัน

Effect of Various Silver Compounds on Oral Microbes, Their Cytotoxicity on Human Keratinocytes and Arresting of Carious Lesion in Tooth Model

พัชรี ไชยทอง

Patcharee Chaithong

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพช่องปาก

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

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

Master of Science in Oral Health Sciences

Prince of Songkla University

2562

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ผลของสารประกอบซิลเวอร์ชนิดต่าง ๆ ต่อจุลชีพในช่องปาก ความเป็นพิษต่อเซลล์เยื่อบุช่องปากมนุษย์และการหยุดยั้งฟันผุในแบบจำลองฟัน

Effect of Various Silver Compounds on Oral Microbes, Their Cytotoxicity on Human Keratinocytes and Arresting of Carious Lesion in Tooth Model

พัชรี ไชยทอง

Patcharee Chaithong

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพช่องปาก

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

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

Master of Science in Oral Health Sciences

Prince of Songkla University

2562

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของสารประกอบซิลเวอร์ชนิดต่าง ๆ ต่อจุลชีพในช่องปาก ความเป็นพิษต่อเซลล์เยื่อบุช่องปากมนุษย์และการหยุดยั้งฟันผุในแบบจำลองฟัน

ผู้เขียน นางสาวพัชรี ไชยทอง

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์สุขภาพช่องปาก

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

....

(ศาสตราจารย์ ดร.รวี เถียรไพศาล)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

…………………………………………….

(ผู้ช่วยศาตราจารย์ ดร.เกวลิน ธรรมสิทธิ์บูรณ์)

คณะกรรมการสอบ

……………………………..ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร.สนอง เอกสิทธิ์)

…..………………………..............กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัชรินทร์ พิวัฒน์)

…...………………………............กรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร.รวี เถียรไพศาล)

....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาตราจารย์ ดร.เกวลิน ธรรมสิทธิ์บูรณ์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพช่องปาก

....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ดำรงค์ศักดิ์ ฟ้ารุ่งสาง)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้เป็นผลมาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ..
(ศาสตราจารย์ ดร.รวี เถียรไพศาล)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ..
(นางสาวพัชรี ไชยทอง)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ……………………………..…………..…………

(นางสาวพัชรี ไชยทอง)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของสารประกอบซิลเวอร์ชนิดต่าง ๆ ต่อจุลชีพในช่องปาก ความเป็นพิษต่อเซลล์เยื่อบุช่องปากมนุษย์และการหยุดยั้งฟันผุในแบบจำลองฟัน

ผู้เขียน นางสาวพัชรี ไชยทอง

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์สุขภาพช่องปาก

ปีการศึกษา 2561

บทคัดย่อ

ฟันผุเป็นโรคติดเชื้อในช่องปากที่พบได้บ่อยที่สุดในโลก ดังนั้นจึงมีความพยายามศึกษาสารที่จะนำมาใช้ยับยั้งการเกิดฟันผุ โดยเฉพาะสารประกอบซิลเวอร์ไดเอมีนฟลูออไรด์ ซึ่งเป็นที่นิยมใช้กันในหลาย ๆ ประเทศ แต่มีข้อเสียคือจะทำให้เกิดการเปลี่ยนสีฟันให้กลายเป็นสีดำและยังมีข้อจำกัดการใช้ในประเทศไทย ดังนั้นการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารประกอบซิลเวอร์ 3 ชนิด คือ 1.)ซิลเวอร์ไนเตรท ($AgNO_3$) ความเข้มข้น 6350 ppm 2.)ซิลเวอร์ออกไซด์ ($Ag_2O + NH_4F$) ความเข้มข้น 12700 ppm และ 3.) ซิลเวอร์คอมเพล็กซ์ (Ag complex) ความเข้มข้น 100 ppm ต่อการต้านเชื้อ *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Actinomycosis actinomycetemcomitans*, *Candida albicans* และ *Enterococcus faecalis* ในสภาวะแพลงโทนิกและไบโอฟิล์ม โดยวิธี Agar well diffusion method, การทดสอบค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารประกอบซิลเวอร์ที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MIC และ MBC) และประสิทธิภาพของสารประกอบซิลเวอร์ชนิดต่าง ๆ ต่อการยับยั้งและทำลายไบโอฟิล์มได้ 100% โดยพบว่าพบว่าสาร $Ag_2O + NH_4F$ และ $AgNO_3$ มีความสามารถในการต้านเชื้อทดสอบได้ทั้งห้าชนิด ในขณะที่สาร Ag complex ไม่สามารถต้านเชื้อ *E. faecalis* และ *Actinomycosis actinomycetemcomitans* ในสภาวะแพลงโทนิกและไบโอฟิล์มได้ เมื่อนำสารทดสอบมาศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์เยื่อบุช่องปากมนุษย์ (Keratinocyte cell line: H357) พบว่าสาร $Ag_2O + NH_4F$ และ $AgNO_3$ ทุกความเข้มข้น มีความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับร้อยละ 100 แต่สาร Ag complex ที่ความเข้มข้น 0.0475 และ 0.0023 ppm มีความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับร้อยละ 47.08 และร้อยละ 24.58 ตามลำดับ จากนั้นศึกษาผลของสารทดสอบต่อการยับยั้งฟันผุในแบบจำลองฟันมนุษย์ วัดผลโดยใช้เครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงค่าสัมประสิทธิ์การลดทอนเชิงเส้น (linear attenuation coefficients: LAC) ของแร่ธาตุในเนื้อฟันกรามแท้ จำนวน 40 ซี่ พบว่ากลุ่มควบคุมบวกสามารถยับยั้งการผุได้ร้อยละ 100 ในขณะที่กลุ่มที่ทาสาร $AgNO_3$ ยับยั้งได้ร้อยละ 25, Ag_2O+ NH_4F ยับยั้งได้ร้อยละ 45 และ Ag complex ยับยั้งได้ร้อยละ 15 เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้ทาสารใด ๆ และการศึกษาการเปลี่ยนสีของเนื้อฟันหลังทาสารทดสอบเมื่อเวลาผ่านไป 1, 7 และ 14 วันพบว่าสีจะมีอัตราการเปลี่ยนแปลงมากที่สุดภายใน 7 วันหลังทาสารประกอบซิลเวอร์ โดยสาร $Ag_2O + NH_4F$ มีค่าเฉลี่ย

สะสมการเปลี่ยนสีมากที่สุด รองลงมาคือสาร $AgNO_3$ ซึ่งทั้งสองสารมีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม (No treatment) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนสาร Ag complex นั้นมีค่าเฉลี่ยสะสมการเปลี่ยนสีน้อยที่สุด เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

Thesis Title	Effect of Various Silver Compounds on Oral Microbes, Their Cytotoxicity on Human Keratinocytes and Arresting of Carious Lesion in Tooth Model
Author	Miss Patcharee Chaithong
Major Program	Oral Health Sciences
Academic Year	2018

ABSTRACT

Dental caries is the most common chronic infectious diseases. Scientist attempted to study some substances that will be used to inhibit the progression of dental caries. Silver diamine fluoride which is commonly used in many countries. However, the major disadvantage of Silver diamine fluoride is black stained on tooth surface. This study aimed to evaluate the antibacterial impact of the three silver compounds; 1.) Silver nitrate ($AgNO_3$) 6350 ppm 2.) Silver oxide ($Ag_2O + NH_4F$) 12700 ppm and 3.) Silver complex (Ag complex) 100 ppm, on five oral pathogenic bacterial strains: *Streptococcus mutans, Streptococcus sobrinus, Actinomycosis actinomycetemcomitans, Candida albicans*, and *Enterococcus faecalis* in planktonic and biofilm conditions. The three silver compounds were tested by various methods included: Agar diffusion method, Minimum inhibitory concentrations (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (MBC), Biofilm inhibition, and Biofilm eradication. The result revealed $Ag_2O + NH_4F$ and $AgNO_3$ had an antimicrobial effect to all of tested bacterial strain. While E. faecalis and Actinomycosis actinomycetemcomitans was not affected by Ag complex in planktonic and biofilm conditions. For the cytotoxicity test on humans oral mucosa (Keratinocyte cell line: H357), the results showed $Ag_2O + NH_4F$ and $AgNO_3$ were 100% cells cytotoxicity. Whereas Ag complex at 0.0475 ppm were 47.08% cells cytotoxicity. Effect of the silver compounds in inhibition of human tooth demineralization investigated by MicroCT scanning. The evaluation of linear attenuation coefficients (LAC) from 40 molar teeth showed the percentage of demineralized inhibition were 25%, 45% and 15% of $AgNO_3$, $Ag_2O + NH_4F$, and Ag complex groups, respectively. Moreover, tooth discoloration after applied the silver compounds at 1, 7 and 14 days showed the maximum rate of tooth discoloration occurred at 7 days. $Ag_2O + NH_4F$ had the highest discoloration followed

by $AgNO_3$ and Ag complex. This study indicated that Ag_2O+ NH_4F and $AgNO_3$ might be potential caries arresting agents for the oral cavity given their desirable properties.

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ ด้วยความกรุณาและความช่วยเหลือจากอาจารย์ที่ปรึกษาหลักวิทยานิพนธ์คือ ศาสตราจารย์ ดร.รวี เถียรไพศาล และอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมคือ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เกวลิน ธรรมสิทธิ์บูรณ์ อาจารย์คณะทันตแพทยศาสตร์ ผู้ซึ่งให้คำปรึกษาแนะนำ และให้ความรู้ต่างๆในการทำวิทยานิพนธ์เรื่องนี้ ตลอดจนเสียสละเวลาอันมีค่าตรวจวิทยานิพนธ์อย่างดียิ่ง

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบโครงร่างวิทยานิพนธ์ทุกท่านที่กรุณาให้แนวคิดและข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ เพื่อให้วิทยานิพนธ์มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น และขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย และคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ผู้สนับสนุนทุนอุดหนุนการทำวิจัยครั้งนี้ รวมถึงหน่วยบัณฑิตศึกษา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ทุกท่านที่ให้การช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในทุกๆ เรื่อง

ขอขอบพระคุณนางสาวนันทิยา พาหุมันโต ที่ให้คำแนะนำและความรู้ในการทำวิจัยเกี่ยวกับการปฏิบัติการทางจุลชีววิทยาอย่างสุดความสามารถ รวมถึงนายเขมรัฐ เขมวงศ์ ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับการใช้เครื่องเอกเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาโอษฐวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ทุกท่าน ที่ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือในการทำวิจัยทุกๆ ด้าน

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ เจ้าหน้าที่บุคลากรทุกท่านในสาขาวิชาวิทยาเอ็นโดดอนต์ ภาควิชาทันตกรรมอนุรักษ์ คณะทันตแพทยศาสตร์ ที่ได้ให้คำปรึกษา กำลังใจในการเรียนและการทำวิทยานิพนธ์ตลอดมา

ขอขอบคุณรุ่นพี่ รุ่นน้อง เพื่อนนักศึกษาหลังปริญญา สาขาวิชาวิทยาเอ็นโดดอนต์ ภาควิชาทันตกรรมอนุรักษ์ คณะทันตแพทยศาสตร์ สำหรับกำลังกาย กำลังใจ ความห่วงใยที่มีให้แก่ข้าพเจ้า โดยเฉพาะนางสาวนฤพร ทาไทย และนางสาวนิภาเพ็ญ แก่นพุฒ ที่คอยอยู่เคียงข้าง สนับสนุน ให้ความช่วยเหลือ ทั้งเรื่องการศึกษา และเรื่องอื่นๆ ตลอดมา

สุดท้ายนี้ มารดาและบิดาของข้าพเจ้า ที่มอบความรัก ความห่วงใย และกำลังใจแก่ข้าพเจ้าเสมอมา คุณงามความดีที่เกิดจากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ขอมอบแด่บุพการีและคณาจารย์ทุกท่านที่เป็นผู้ประสิทธิ์ประสาทวิชาแก่ข้าพเจ้า

พัชรี ไชยทอง

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(5)
ABSTRACT	(7)
กิตติกรรมประกาศ	(9)
สารบัญ	(10)
รายการตาราง	(11)
รายการรูปภาพ	(12)
บทที่ 1 บทนำ	
บทนำต้นเรื่อง	1
การทบทวนวรรณกรรม	3
วัตถุประสงค์การวิจัย	14
สมมุติฐานการศึกษา	14
บทที่ 2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินงาน	
วัสดุ	15
อุปกรณ์	16
วิธีการดำเนินงาน	17
บทที่ 3 ผลการวิจัย	31
บทที่ 4 บทวิจารณ์	40
บทที่ 5 บทสรุป และข้อเสนอแนะ	46
เอกสารอ้างอิง	48
ภาคผนวก	56

รายการตาราง

ตารางที่ **หน้า**

ตารางที่		หน้า
1	วิวัฒนาการการนำสารประกอบซิลเวอร์มาใช้ในงานทันตกรรม	4
2	ผลิตภัณฑ์ซิลเวอร์ไดเอมีนฟลูออไรด์ที่มีจำหน่ายในประเทศต่าง ๆ	6
3	สารประกอบซิลเวอร์ชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในการศึกษา	17
4	สายพันธุ์ของเชื้อจุลชีพ, อาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะที่เหมาะสมของเชื้อแต่ละชนิด	18
5	การแบ่งกลุ่มการทดสอบผลของสารประกอบซิลเวอร์ชนิดต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการเกิดฟันผุในแบบจำลอง	25
6	แสดงค่าเฉลี่ยของโซนการยับยั้งของสารต่อเชื้อที่ใช้ทดสอบ	32
7	ฤทธิ์ของสารประกอบซิลเวอร์ชนิดต่าง ๆ ในการยับยั้งเชื้อทดสอบด้วยค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MBC)	32
8	ความเข้มข้นของสารประกอบซิลเวอร์ที่สามารถยับยั้งการสร้างและทำลายไบโอฟิล์มได้ 100 %	34
9	เปรียบเทียบปริมาณแร่ธาตุเฉลี่ยของชิ้นเนื้อฟันก่อนทำให้เกิดรอยโรคฟันผุ หลังทำให้เกิดรอยโรคฟันผุ และภายหลังการทาสารทดสอบ	37
10	ค่าเฉลี่ยสีที่เปลี่ยนแปลงเมื่อเวลาผ่านไป 1, 7 และ 14 วันภายหลังจากการทาสารทดสอบ $AgNO_3$, AgO_2+ NH_4F และ Ag complex เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม	39
11	ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ของสาร Ag complex ที่ระยะเวลา 15 นาที ถึง 24 ชั่วโมง	65
12	แสดงค่าการเปลี่ยนแปลงของสี	66

รายการภาพประกอบ

รูปที่		หน้า
1	(A) เครื่องมือนับเซลล์เม็ดเลือด หรือ Hemocytometer, (B) ตำแหน่งที่ทำการนับเซลล์	23
2	การใช้เครื่องตัดฟันเพื่อเตรียมชิ้นงาน	24
3	(A) แสดงการเตรียมชิ้นงานก่อนฝังลงบนแบบพลาสติก, (B) ชิ้นงานที่พร้อมทำการทดสอบ	24
4	เครื่องเอกเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร	26
5	(A,B) แสดงการจับยึดชิ้นงานกับแท่งพลาสติกทรงกระบอกของเครื่องเอกเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร	26
6	ระยะที่กำหนดการวิเคราะห์ข้อมูล (A) กลุ่มควบคุมภายใน, (B) กลุ่มทดลอง	27
7	(A) slice ทั้งหมดที่เครื่องเอกเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตรได้ทำการแสกน (B) แสดงตำแหน่งการสุ่มวัดค่า LAC ในแต่ละ slice	27
8	แนวการตัดชิ้นงานเพื่อนำมาใช้ทดสอบการวัดสี	28
9	ความเป็นพิษต่อเซลล์ Keratinocyte H357 ของสาร Ag complex เป็นเวลา 15 นาที	35
10	ปริมาณแร่ธาตุเฉลี่ยของชิ้นเนื้อฟันก่อน, หลังทำให้เกิดรอยโรคฟันผุ และภายหลังการทาสารทดสอบ	37
11	การเปลี่ยนแปลงของเนื้อฟันหลังทาสารทดสอบ 7 วัน (A) control, (B) $AgNO_3$, (C) AgO_2+ NH_4F, (D) Ag complex	38
12	ร้อยละของค่าเฉลี่ยและค่าความคลาดเคลื่อนของสาร Ag complex ในการยับยั้งการสร้าง biofilm ต่อเชื้อ (A) *C. albicans*, (B) *S. mutans*, (C) *S. sobrinus,* (D) *E. faecalis* และ (E) *A. a* ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	60
13	ร้อยละของค่าเฉลี่ยและค่าความคลาดเคลื่อนของสาร $AgNO_3$ ในการยับยั้งการสร้าง biofilm ต่อเชื้อ (A) *C. albicans*, (B) *S. mutans*, (C) *S. sobrinus,* (D) *E. faecalis* และ (E) *A. a* ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	61

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
14	ร้อยละของค่าเฉลี่ยและค่าความคลาดเคลื่อนของสาร AgO_2+ NH_4Fในการยับยั้งการสร้าง biofilm ต่อเชื้อ (A) *C. albicans*, (B) *S. mutans*, (C) *S. sobrinus,* (D) *E. faecalis* และ (E) *A. a* ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	62
15	แสดงร้อยละของค่าเฉลี่ยและค่าความคลาดเคลื่อนของสาร Ag complex ในการทำลาย biofilm ต่อเชื้อ (A) *C. albicans*, (B) *S. mutans*, (C) *S. sobrinus,* (D) *E. faecalis* และ (E) *A. a* ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	63
16	แสดงร้อยละของค่าเฉลี่ยและค่าความคลาดเคลื่อนของสาร $AgNO_3$ ในการทำลาย biofilm ต่อเชื้อ (A) *C. albicans*, (B) *S. mutans*, (C) *S. sobrinus,* (D) *E. faecalis* และ (E) *A. a* ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	64
17	ร้อยละของค่าเฉลี่ยและค่าความคลาดเคลื่อนของสาร AgO_2+ NH_4F ในการทำลาย biofilm ต่อเชื้อ (A) *C. albicans*, (B) *S. mutans*, (C) *S. sobrinus,* (D) *E. faecalis* และ (E) *A. a* ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	65

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง (Introduction)

ช่องปากของมนุษย์ประกอบไปด้วยอวัยวะต่าง ๆ ฟัน, ลิ้น, เหงือก, กระพุ้งแก้ม, เพดานอ่อนและเพดานแข็ง เป็นต้น ซึ่งอวัยวะเหล่านี้มีพื้นผิวที่แตกต่างกันและมักจะถูกปกคลุมด้วยเชื้อแบคทีเรีย หรือไบโอฟิล์ม (biofilm) มีการศึกษาพบว่าในช่องปากมนุษย์มีแบคทีเรียประมาณ 500 ชนิด เชื้อบางตัวมีความสามารถในการก่อให้เกิดโรค ซึ่งส่วนใหญ่มักจะเป็นโรคฟันผุ และ โรคปริทันต์อักเสบ [1–3]

โรคฟันผุเป็นโรคติดเชื้อที่เกิดจากแบคทีเรีย มีสาเหตุมาจากหลาย ๆ ปัจจัยร่วมกัน ได้แก่ 1) เชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดกรด (cariogenic bacteria) 2) อาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต (fermentable carbohydrate) 3) ปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่ ฟันและสภาพในช่องปาก และ 4) ระยะเวลา เมื่อปัจจัยเกิดขึ้นพร้อมกันจะส่งผลให้เกิดการละลายแร่ธาตุ (demineralization) และทำลายโครงสร้างของฟัน แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดฟันผุในระยะเริ่มแรก คือกลุ่มของ มิวแทนส์ สเตร็ป-โตค็อกไซ (mutans streptococci) โดยสายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคฟันผุในคน คือ สเตร็ปโต-ค็อกคัส มิวแทนส์ (*Streptococcus mutans*) และ สเตร็ปโตค็อกคัส ซอร์บรินัส (*Streptococcus sobrinus*)[4,5]

โรคปริทันต์อักเสบ (periodontal disease) คือโรคที่เกิดกับเนื้อเยื่อหรืออวัยวะรอบตัวฟันและรากฟัน สาเหตุเกิดมาจากการสะสมของคราบจุลินทรีย์ (plaque) โดยส่วนใหญ่โรคปริทันต์มักจะเกิดจากแบคทีเรียแกรมลบ ชนิดที่ ไม่ต้องการออกซิเจน (anaerobic gram negative bacteria) เช่น พอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส *(Porphyromonas gingivalis)* แอกกรีเกติแบคเตอร์ แอคติโนไมซีเตมโคมิแทนส์ *(Aggregatibacter actinomycetemcomitans)* แทนเนอเรลลา ฟอร์สิเธีย *(Tannerella forsythia)* และแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นเกลียว (spirochete) เช่น ทรีโพนีมา เด็นทิโคลา *(Treponema denticola)* เป็นต้น โดยแบคทีเรียเหล่านี้จะปลดปล่อยสารพิษต่าง ๆ ออกมาทำให้เนื้อเยื่อบริเวณนั้นตอบสนองต่อการอักเสบ หากยังไม่มีการรักษาที่ถูกต้อง สุดท้ายจะมีการสูญเสียอวัยวะปริทันต์ ทำให้ฟันโยก และสูญเสียฟันไปในที่สุด[6,7]

นอกจากนี้เชื้อจุลชีพอื่น ๆ เช่น เชื้อรา ก็สามารถเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในช่องปากได้เช่นกัน โดยเฉพาะโรคติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจากยีสต์ ในสกุล *Candida* ซึ่งมีหลายสปีชีส์ สายพันธุ์ที่เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการติดเชื้อได้บ่อย คือ *C. albicans* โดยพบได้มากในผู้ป่วยที่มี

ระดับภูมิคุ้มกันต่ำ[8], ผู้ป่วยที่ได้รับยาปฏิชีวนะติดต่อกันเป็นเวลานาน, ผู้ที่มีความจำเป็นต้องใช้ยากลุ่ม corticosteroids เหล่านี้เป็นปัจจัยที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อในร่างกายได้[9,10] นอกจากนี้ *C. albicans* สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อซ้ำ (secondary infection) และติดเชื้อในระยะยาว (persistent infection) ภายในคลองรากฟันของผู้ป่วย อีกทั้งยังมีรายงานว่าเชื้อรากลุ่มนี้สามารถทนต่อแคลเซียมไฮดรอกไซด์ (calcium hydroxide: $Ca(OH)_2$) ซึ่งเป็นยามาตรฐานที่ใส่ในคลองรากฟัน (intracanal medication)[11,12]

การติดเชื้อซ้ำหรือการติดเชื้อระยะยาวในคลองรากฟันนอกจากเชื้อ *C. albicans* แล้ว ยังมีแบคทีเรียสำคัญอีกชนิดหนึ่งซึ่งมักเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดความล้มเหลวในการรักษาคลองรากฟันคือ *Enterococcus faecalis*[13] เนื่องจากสามารถทนอยู่ในสภาวะที่มีความเป็นด่างและมีระบบการนำโปรตอนเข้าสู่เซลล์ทำให้คงระบบความเป็นกรดด่างภายในเซลล์ได้ ซึ่งจะส่งผลให้เซลล์อยู่ในสภาวะสมดุล[14,15]

จากรายงานที่ผ่านมาพบว่าโลหะเงินมีความสามารถในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย, เชื้อไวรัส และเชื้อรา[16] เมื่อเปรียบเทียบกับโลหะตัวอื่น ๆ พบว่าซิลเวอร์มีความเป็นพิษต่อเชื้อจุลชีพมากที่สุด[17] โดยประจุบวกของซิลเวอร์สามารถฆ่าเชื้อจุลชีพก่อโรคได้ที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 50 ppm กลไกสำคัญที่ทำให้ซิลเวอร์มีผลต่อเชื้อจุลชีพคือ 1. ปฏิกิริยาระหว่างซิลเวอร์อิออนกับ DNA ทำให้ DNA ของแบคทีเรียถูกทำลาย 2. ซิลเวอร์อิออนสามารถทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียได้ และ 3. ซิลเวอร์อิออนสามารถยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งอิเล็กตรอนภายในเซลล์ของแบคทีเรีย นอกจากนี้ซิลเวอร์ยังมีความเป็นพิษต่อเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมในระดับต่ำ อีกทั้งจุดเด่นของซิลเวอร์คือไม่ทำให้เชื้อจุลชีพเกิดการดื้อยา ดังนั้นจึงมีการประยุกต์นำสารประกอบซิลเวอร์มาใช้ทั้งในงานด้านการแพทย์และทันตกรรม[18,19] เช่น ซิลเวอร์ไนเตรท (silver nitrate: $AgNO_3$) ถูกนำมาใช้เป็นยาหยอดตาเพื่อป้องกันการติดเชื้อ และ ซิลเวอร์ซัลฟาไดเอซีน (silver sulphadiazine: SSD/ AgSD) ใช้เป็นยาป้องกันการติดเชื้อของผิวหนังที่ถูกไฟไหม้ และแผลเรื้อรัง[20,21]

ในงานด้านทันตกรรมนั้นเริ่มมีการนำสารประกอบซิลเวอร์มาใช้ครั้งแรกในปี 1960[22] โดยพบว่า ซิลเวอร์ไนเตรท สามารถลดอุบัติการณ์ของฟันผุในฟันน้ำนมได้ ต่อมามีการนำซิลเวอร์ไนเตรท มาใช้เป็นสารป้องกันและยับยั้ง (arrest) การเกิดฟันผุในฟันกรามแท้[23,24] ในปี 1980 ได้นำฟลูออไรด์มารวมกับซิลเวอร์เพื่อเป็นสารต่อต้านฟันผุ อย่างไรก็ตามสารประกอบซิลเวอร์ฟลูออไรด์เพื่อนำไปใช้ทางคลินิกแล้วพบข้อเสียคือ เกิดการติดสีเป็นสีดำบริเวณรอยโรคฟันผุ ซึ่งส่งผลต่อความสวยงาม[24] อย่างไรก็ตามสารประกอบซิลเวอร์ฟลูออไรด์ที่ยังคงใช้กันอยู่ในปัจจุบัน คือ ซิลเวอร์ไดเอมีนฟลูออไรด์ (Silver diamine fluoride: SDF)[25] และมีข้อจำกัดในการนำมาใช้ในประเทศไทย

การทบทวนวรรณกรรม (Review of Literatures)

สารประกอบซิลเวอร์ (Silver compound)

นับตั้งแต่ปี 1800 มีการนำซิลเวอร์ (silver: Ag) มาใช้ในงานด้านการแพทย์และ ทันตกรรมจุดประสงค์เพื่อให้เป็นสารต้านฟันผุ และฆ่าเชื้อแบคทีเรีย[22] ก่อนการค้นพบยาปฏิชีวนะ สารประกอบซิลเวอร์เริ่มมีความนิยมมากขึ้น โดยพยายามนำมาใช้ในรักษาโรคบาดทะยัก, โรคติดเชื้อในตาของเด็กทารกแรกเกิดที่มีมารดาเป็นโรคหนองใน[26] ต่อมาในปี 1930 มีการค้นพบยาเพนิซิลิน และยาปฏิชีวนะ[27] ซึ่งมีกระบวนการผลิตที่ง่ายกว่าและมีประสิทธิภาพในการรักษาอาการติดเชื้อได้ดีกว่าสารประกอบซิลเวอร์ ดังนั้น จึงเป็นผลให้การศึกษาเกี่ยวกับซิลเวอร์น้อยลงในช่วงระยะเวลานั้น แต่อย่างไรก็ตาม สารประกอบซิลเวอร์ได้รับความสนใจอีกครั้งในปี 1970 เนื่องมาจากมีการค้นพบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถต้านทานประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อของยาปฏิชีวนะหรือเกิดการดื้อยาได้ ดังนั้น ปัจจุบันจึงหันกลับมาศึกษาเกี่ยวกับซิลเวอร์อีกครั้ง เนื่องมาจากซิลเวอร์มีขอบเขตการออกฤทธิ์ที่กว้าง (broad spectrum), มีความเป็นพิษต่ำและที่สำคัญคือ ไม่ทำให้เชื้อเกิดการดื้อยา การนำซิลเวอร์มาใช้ทางทันตกรรมมีวิวัฒนาการตาม ตารางที่ 1 [28]

ตารางที่ 1 วิวัฒนาการการนำสารประกอบซิลเวอร์มาใช้ในงานทันตกรรม

ช่วงเวลา (ปี)	ประเภทของสารประกอบซิลเวอร์ที่นำมาใช้
ตั้งแต่ 1900	นำ $AgNO_3$ มาใช้ในการจัดการรอยโรคฟันผุ
1917	คิดค้นและนำ Howe’s solution ($AgNH_3NO_3$) มาใช้จนถึงปี 1950
1970s–1990s	นำ AgF เพียงตัวเดียว และใช้ AgF ร่วมกันกับ SnF_2 ในการศึกษาทางคลินิกที่ประเทศออสเตรเลีย
1970s	พัฒนาสาร SDF จากสภาเภสัชกรรมกลางของกระทรวงสุขภาพและสวัสดิการของประเทศญี่ปุ่น
1990s	SDF ถูกแนะนำให้ใช้ในผู้ป่วยเด็กที่ประเทศบราซิล
2000s	มีการศึกษาสาร SDF แบบ Randomized controlled clinical trials และการนำมาใช้ในทางทันตกรรมป้องกันอื่นๆ
2000s	มีการเติมสารประกอบซิลเวอร์ในวัสดุบูรณะ

ซิลเวอร์ไนเตรท (Silver nitrate: $AgNO_3$)

ในปี 1891 ได้มีศึกษาและนำสารประกอบซิลเวอร์ คือ ซิลเวอร์ไนเตรทมาใช้เป็นครั้งแรก โดย Sttebins สังเกตเห็นว่าเนื้อฟันบางส่วนที่ติดสีดำในฟันที่ได้รับการบูรณะด้วยอมัลกัม (amalgam) จะไม่เกิดการผุต่อ ดังนั้นเขาจึงนำเศษวัสดุอมัลกัมมาผสมกับกรดไนตริก (nitric acid) และทาลงบนรอยโรคฟันผุในเด็กเล็ก และพบว่าสามารถหยุดการดำเนินของโรคได้[29,30] ต่อมาในปี 1917 Howe ได้เติมสาร แอมโมเนียม ลงไปในซิลเวอร์ไนเตรท เกิดเป็นสารละลาย แอมโมนิคอลซิลเวอร์ไนทเตรท (ammoniacal silver nitrate solution: $[Ag(NH_3)_2]NO_3$) หรือ Howe's solution และนำมาใช้ในงานรักษาคลองรากฟันเพื่อทำให้คลองรากฟันปราศจากเชื้อเป็นครั้งแรก จากนั้นจึงนำมาใช้เป็นสารป้องกันการเกิดฟันผุบนเคลือบฟันและเนื้อฟัน[31] Howe's solution ใช้มาจนถึงช่วงปี 1960 เนื่องมาจากมีการศึกษาสงสัยว่าอาจส่งผลต่อเนื้อเยื่อในโพรงประสาทฟัน[32] หรือมีการคิดค้นผลิตภัณฑ์ใหม่ ๆ ขึ้นมาใช้และส่วนหนึ่งอาจมาจากประชาชนสามารถเข้าถึงการรักษาทางด้านทันตกรรมได้มากขึ้น จึงมีการใช้ซิลเวอร์ไนเตรทน้อยลงจนเลิกใช้ไปในที่สุด[30]

ซิลเวอร์ฟลูออไรด์ (Silver fluoride: AgF)

สารประกอบซิลเวอร์ที่ได้รับความนิยมต่อมาคือ ซิลเวอร์ฟลูออไรด์ เนื่องจากพบว่าสารละลายซิลเวอร์ฟลูออไรด์ไม่มีความเสถียร ดังนั้นเมื่อทาซิลเวอร์ฟลูออไรด์บนฟันผุจึงต้องทาสแตนนัส ฟลูออไรด์ (stannous fluoride: SnF) ทับลงไปด้วย เพื่อเป็นสารรีดิว (reducing agent) ผลคือ สามารถป้องกันและยับยั้งการเกิดฟันผุได้ [33] แต่เพื่อความสะดวกในการใช้งาน ปัจจุบันจึงนิยมใช้ซิลเวอร์ไดเอมีนฟลูออไรด์มาจัดการรอยโรคฟันผุมากกว่า

ซิลเวอร์ไดเอมีน ฟลูออไรด์ (Silver diamine fluoride: SDF)

ในปี ค.ศ.1969 Yoshida จากโรงเรียนทันตแพทย์ มหาวิทยาลัยโอซาก้า ได้พัฒนาสาร SDF ขึ้นมาเนื่องมาจากตระหนักถึงประโยชน์ของซิลเวอร์และฟลูออไรด์ [24] โดยสารจะมีลักษณะเป็นสารละลายไม่มีสี มีค่าพีเอชที่ 9-10 [34] และมีความเสถียรกว่าสารละลายซิลเวอร์ฟลูออไรด์ กล่าวคือ สามารถเก็บได้โดยมีความเข้มข้นที่คงตัว ในปี 1970 สาร SDF ได้รับการรับรองจากสภาเภสัชกรรมกลางของกระทรวงสุขภาพและสวัสดิการของประเทศญี่ปุ่นว่าสามารถใช้เป็นสารยับยั้งอาการเสียวฟัน (dentin sterilizing agent)[35] และสามารถทาพื้นโพรงฟันก่อนอุดฟันได้ หลังจากนั้นจึงมีการใช้ SDF โดยทั่วไปในสถานีอนามัยของญี่ปุ่น[28]

สำหรับ SDF ถูกนำมาใช้เพื่อยับยั้งการเกิดฟันผุของเด็กเล็กในประเทศต่าง ๆ หลายประเทศ[36] โดยแต่ละประเทศได้ใช้ความเข้มข้นที่แตกต่างกันไป ซึ่งซิลเวอร์ฟลูออไรด์ 38% นั้นจะมี

ความเข้มข้นของของซิลเวอร์ที่ 25,500 และฟลูออไรด์ที่ 44,800 ppm[33,37] ผลิตภัณฑ์ซิลเวอร์ไดเอมีนฟลูออไรด์ที่ จำหน่ายในท้องตลาดในปัจจุบันพบว่ามีหลายยี่ห้อและหลายความเข้มข้น[24,38] ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงผลิตภัณฑ์ซิลเวอร์ไดเอมีนฟลูออไรด์ที่จำหน่ายในประเทศต่าง ๆ

ชื่อผลิตภัณฑ์	**ผู้ผลิต/ตัวแทนนำเข้า**	**ความเข้มข้นฟลูออไรด์(%)**	**ประเทศ**
Cariostatic®	Inodon Labratorio	10%	บราซิล
Cariestop®	Biodinâmica Quimica e Farmaceutica Ltda	12%	บราซิล
Cariestop®	Biodinâmica Quimica e Farmaceutica Ltda	38%	บราซิล
Bioride®	Dentsply Industria e Comercio Ltda	30%	บราซิล
Saforide®	J.Morita; Toyo Seiyaku Kasei Ltd.	38%	ญี่ปุ่น
FluoroplatV	Laboratorios Naf	38%	อาร์เจนติน่า

กลไกการออกฤทธิ์ (Mechanism of action)

โรคฟันผุ เป็นโรคที่มีความซับซ้อนมีความเกี่ยวข้องกับการบริโภค, แบคทีเรียเมตาบอลิซึม, การละลายแร่ธาตุ (demineralization) และการเสื่อมสภาพของสารอินทรีย์ โดยเมื่อแร่ธาตุบนพื้นผิวของฟันถูกละลายออกมา สารประกอบอินทรีย์โดยเฉพาะคอลลาเจนจะเผยผึ่งต่อสิ่งแวดล้อม จากนั้นจะถูกทำลายโดยแบคทีเรียโปรตีเอส (bacterial proteases) ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้รอยโรคฟันผุมีขนาดใหญ่ขึ้น[39] แต่เมื่อทำการทาสาร SDF ลงบนรอบโรคฟันผุ ซิลเวอร์อิออนและฟลูออไรด์อิออนสามารถแพร่เข้าสู่ชั้นเคลือบฟันได้ลึกประมาณ 25 ไมโครเมตร และ 50-200 ไมโครเมตรในชั้นเนื้อฟัน[36,40] จากนั้นจะเกิดชั้นของซิลเวอร์และโปรตีนที่จับกันและทำให้บริเวณนั้นทนทานต่อการละลายจากกรดและเอนไซม์จากแบคทีเรีย[33,41] บทบาทและกลไกการออกฤทธิ์ของสารประกอบซิลเวอร์ยังไม่ทราบแน่ชัด จากการศึกษาในห้องปฏิบัติการพบว่ากลไกการออกฤทธิ์อาจมีสองแบบ คือกลไกการออกฤทธิ์ต่อฟันจากฟลูออไรด์อิออน และกลไกการฆ่าเชื้อแบคทีเรียจากซิลเวอร์อิออน[42]

กลไกการออกฤทธิ์ต่อฟัน

ซิลเวอร์ไดเอมีนฟลูออไรด์ มีสูตรทางเคมีคือ ($Ag(NH_3)_2F$) ทำปฏิกิริยากับผลึกแร่ธาตุในฟัน คือไฮดรอกซีอะพาไทท์ ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) เกิดเป็นแคลเซียมฟลูออไรด์ (CaF_2) และซิลเวอร์ฟอสเฟต (Ag_3PO_4) ซึ่งมีผลทำให้เกิดการป้องกัน และทำให้รอยผุที่นิ่มมีความความแข็งขึ้น ซึ่งสมการปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นแสดงตามสมการต่อไปนี้[43]

$$(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2) + (Ag(NH_3)_2F) \dashrightarrow CaF_2 + Ag_3PO_4 + NH_4OH$$

โดยแคลเซียมฟลูออไรด์ที่เกิดขึ้นจะเป็นแหล่งเก็บฟลูออไรด์ไว้ และเป็นสารตั้งต้นในปฏิกิริยาปรับเปลี่ยนไฮดรอกซีอะพาไทท์ ให้เป็นฟลูออโรอะพาไทท์ ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีความต้านทานต่อภาวะเป็นกรด

กลไกการออกฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรีย

สารซิลเวอร์ฟอสเฟตที่เกิดจากปฏิกิริยาข้างต้นจะทำปฏิกิริยากับโปรตีนเกิดเป็น ซิลเวอร์โปรตีนและตกตะกอนอยู่ในรอยโรค จากนั้นจะแตกตัวให้ซิลเวอร์อิออน ซึ่งมีฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียผ่านสามกระบวนการหลัก คือ

1. ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ (breaking membranes) โดยกระบวนการแรกนั้นซิลเวอร์อิออนจะจับกับหมู่ไดซัลไฟด์ (disulphide) ของโปรตีนในชั้นบนเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เซลล์แบคทีเรียสูญเสียหน้าที่ในการแลกเปลี่ยนสาร ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถมีชีวิตได้[44]
2. ทำให้โปรตีนของแบคทีเรียเสียสภาพ (denaturing proteins) ซิลเวอร์อิออนจะจับกับ หมู่ไท-ออล (thiol,-SH) ของอะมิโนแอซิดชนิดซิสทีน (cystine) ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการทำงานของเอนไซม์ เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ไม่สามารถเกิดกระบวนการเมตาบอลิซึมได้[33,45]
3. ยับยั้งการแบ่งตัวของดีเอ็นเอ (inhibiting DNA replication) โดยซิลเวอร์อิออนจะสามารถจับกับส่วนประกอบหลักในดีเอ็นเอ คือ อะมิโนแอซิดชนิดกัวนิน (guanine) ส่งผลให้แบคทีเรียไม่สามารถถ่ายทอดแบบพันธุกรรมได้ รวมถึงมีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนส (matrix metalloproteinase, MMPs) และชักนำให้เกิดการจับตัวเป็นก้อนของสายน้ำตาลเด็กซ์แทรน ทำให้เชื้อ *S. mutans* ไม่สามารถทำให้เกิดฟันผุได้[28]

มีการศึกษาพบว่า SDF ให้ผลหยุดยั้งฟันผุได้ดีกว่าฟลูออไรดวานิช[46] และให้ผลที่ดีกว่าหรือเท่ากับการใช้วัสดุกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ (Glass ionomer cement: GIC)[47,48] นอกจากนี้ยังมีการนำมาใช้ในผู้สูงอายุที่มีแนวโน้มการเกิดฟันผุบริเวณรากฟันอีกด้วย[49]

ปริมาณสูงสุดของยาและขอบเขตปลอดภัย (Maximum dose and Safety margin)

ขอบเขตความปลอดภัยของการใช้ยาเป็นเรื่องที่สำคัญ องค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (FDA) ได้หาปริมาณของ SDF ที่ทำให้เกิดพิษอย่างเฉียบพลันผ่านทางการกินและใต้ผิวหนัง ศึกษาโดยการทำให้หนูทั้งเพศผู้และเพศเมียตายจากการรับสารผ่านทางการกินและใต้ผิวหนังเป็นจำนวนร้อยละ 50 (Letal dose: LD50) ของจำนวนตั้งต้น ผลคือ ค่าเฉลี่ย LD50 ผ่านทางปากเท่ากับ 520 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และผ่านทางใต้ผิวหนัง เท่ากับ 380 มิลลิกรัม/กิโลกรัม สำหรับสาร SDF เพียงหนึ่งหยดมีปริมาณเท่ากับ 25 ไมโครลิตร มีส่วนประกอบของไดเอมีนฟลูออไรด์ 9.5 มิลลิกรัม สามารถใช้ทาฟันผุได้ 5 ซี่ สมมติว่าใช้ในเด็กเล็กที่มีฟันผุและมีน้ำหนักตัว 10 กิโลกรัม เด็กจะได้รับสาร 0.95 มิลลิกรัม/กิโลกรัม คิดหาขอบเขตความปลอดภัยโดยใช้ค่า LD50 ที่น้อยที่สุด คือ LD50 ที่ได้รับสารผ่านใต้ผิวหนัง มีค่าเท่ากับ 380 มิลลิกรัม/กิโลกรัม พบว่ามีปริมาณ SDF ที่เด็กได้รับน้อยกว่าปริมาณสูงสุดที่จะเกินขอบเขตความปลอดภัยถึงเท่า 400 เท่า(36,50)

ข้อบ่งใช้สาร SDF(36)

1. ผู้ป่วยมีความเสี่ยงต่อการเกิดฟันผุในระดับสูงมาก เช่น ผู้ป่วยที่มีปัญหาน้ำลายน้อย เช่น ผลกระทบจากการรักษาโรคมะเร็ง, ผู้ป่วยในกลุ่มอาการโจเกรน (Sjogren syndrome), ผู้สูงอายุ หรือในเด็กที่เป็นโรคฟันผุรุนแรง (Severe Early Childhood Caries)
2. ผู้ป่วยที่มีความซับซ้อนในการรักษาเนื่องมากจากพฤติกรรมหรือข้อจำกัดทางการแพทย์
3. ผู้ป่วยที่มีรอยโรคฟันผุที่ไม่สามารถรักษาให้เสร็จได้ภายในครั้งเดียว
4. รอยโรคฟันผุยากต่อการรักษา เช่น การเกิดรอยโรคบริเวณขอบของครอบฟัน, ฟันผุบริเวณง่ามรากฟัน
5. ผู้ป่วยไม่สามารถเข้าถึงการรักษาทางทันตกรรมแบบปกติ เช่น ผู้ป่วยที่อยู่อาศัยในที่ห่างไกล

การใช้ในฟันน้ำนม

ฟันที่เหมาะสมในการใช้ SDF ควรจะเป็นฟันน้ำนมที่ผุแบบลุกลาม (active caries) และ ไม่ทะลุโพรงประสาทฟัน สามารถใช้ทาได้ทุกด้านรวมทั้งหลุมและร่องฟันของฟันหลัง ในกรณีใช้กับฟันที่ผุข้างบนเล็กแต่ข้างใต้เป็นรอยโรคขนาดใหญ่การทา SDF จะได้ประสิทธิภาพลดลง

การใช้ในฟันแท้

ในฟันกรามแท้ที่เริ่มมีการละลายแร่ธาตุให้เห็นเป็นจุดสีขาว (white spot lesion) และเป็นฟันที่ขึ้นใหม่ ไม่สามารถทำการเคลือบหลุมร่องฟันได้ เนื่องจากกันน้ำลายไม่ได้หรือเด็กไม่ร่วมมือ สามารถพิจารณาใช้ SDF แทนได้ แต่หากมีฟันผุขนาดเล็กและเด็กไม่ให้ความร่วมมือ อาจทา SDF เพื่อยับยั้งการเกิดฟันผุไปก่อนแล้วนัดผู้ป่วยมาอุดฟันบริเวณนั้นใหม่ภายหลัง

เชื้อจุลชีพที่พบได้ในช่องปาก

Streptococcus mutans* และ *Streptococcus sobrinus

โรคฟันผุเป็นโรคติดเชื้อเรื้อรังที่พบมากที่สุดในโลก[43] เกิดจากการทำลายโครงสร้างของฟันจากกรดที่ผลิตได้จากแบคทีเรียซึ่งย่อยอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต [4] แบคทีเรียสำคัญที่ทำให้เกิดโรคฟันผุคือ เชื้อกลุ่ม มิวแทนส์สเตร็ปโตคอคไซน์ (mutans streptococci) โดยเฉพาะ *Streptococcus mutans* และ *Streptococcus sobrinus* ที่อยู่ในไบโอฟิล์ม โดยเชื้อเหล่านี้จะผลิตกรดออกมาหลังจากย่อยอาหารในกลุ่มคาร์โบไฮเดรต กรดที่เกิดขึ้นจะทำให้ค่าพีเอชบริเวณนั้นต่ำลงกว่าค่าวิกฤต เป็นผลให้เกิดการละลายแร่ธาตุออกมาจากโครงสร้างฟัน เมื่อเกิดการละลายแร่ธาตุเราจะสามารถสังเกตเห็นได้ที่เนื้อเยื่อแข็งบนตัวฟัน (dental hard tissue)[39] ซึ่งกระบวนการของโรคเกิดในระยะแรก ๆ จะไม่สามารถสังเกตได้ทาง คลินิกและทางภาพรังสี รอยโรคสามารถเกิดได้ทั้งบนตัวฟัน (coronal caries) บริเวณผิวเรียบ (smooth surface) และหลุมร่องฟัน (pit and fissure) รวมทั้งบริเวณรากฟัน (root caries) ของทั้งในชุดฟันแท้และฟันน้ำนม โรคฟันผุสามารถเกิดได้บนชั้นเคลือบฟัน (enamel) และชั้นเคลือบรากฟัน (cementum) และชั้นเนื้อฟัน[5]

ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับว่า โรคฟันผุเป็นกระบวนการซึ่งมีการเปลี่ยนแปลง โดยผลสุดท้ายไม่จำเป็นต้องเกิดรูผุเสมอไป โดยโรคฟันผุเป็นผลมาจากการเสียสมดุลระหว่างแร่ธาตุภายในฟันกับไบโอฟิล์มของแบคทีเรียในช่องปาก[51] ฟันแต่ละซี่จะมีการสูญเสียและคืนแร่ธาตุเกิดขึ้นตลอดเวลา ผลลัพธ์ที่มีการสูญเสียแร่ธาตุเป็นตัวกำหนดว่ารอยโรคกำลังลุกลาม ในช่วงเวลาเป็นเดือนหรือปี การสูญเสียแร่ธาตุนี้จะมาถึงจุดที่ผิวนอกอ่อนแอและเกิดเป็นโพรงในที่สุด แม้รอยโรคจะลุกลามต่อไปจนสามารถตรวจพบทางคลินิกหากมีปัจจัยที่เหมาะสมก็จะสามารถหยุดยั้งได้และอยู่อย่างเสถียรในปากหลายๆ ปี บริเวณรอยโรคที่หยุดยั้ง แล้วนี้จะต้านทานต่อการผุได้ดีกว่าเคลือบฟันปกติ[21]

Actinomycosis actinomycetemcomitans

มีความเชื่อว่าเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมลบ *Actinomycosis actinomycetemcomitans* เป็นสาเหตุของการเกิดโรคปริทันต์ Localized juvenile periodontitis (LJP) หรือโรคปริทันต์ชนิดรุนแรงที่พบในเด็ก[52–54] อาการคือไม่พบการอักเสบของเหงือกที่รุนแรง, มีคราบจุลินทรีย์และหินปูนน้อย แต่มีการละลายของกระดูกรอบรากฟันอย่างรวดเร็วและรุนแรงในฟันกรามแท้ซี่ที่หนึ่งและฟันหน้าแท้[55] โดยอัตราการละลายของกระดูกรอบรากฟันจะเร็วกว่าโรคปริทันต์ในผู้ใหญ่ 3-4 เท่า[56] นอกจากนี้โรค LJP ยังมีรายงานว่าอาจเกิดจากความผิดปกติของนิวโทรฟิล (Neutrophi) หรือเกิดจากการถ่ายทอดทางพันธุกรรม[57] การรักษาได้แก่ การขูดหินปูน, เกลารากฟัน, การดูแลอนามัยช่องปากที่ดี, การใช้คลอเฮกซิดีน (chlorhexidine)ในรูปแบบของน้ำยาบ้วนปาก ร่วมกับการใช้ยาปฏิชีวนะจำพวก Metronidazole[58,59]

โดยปกติโรคปริทันต์อักเสบเป็นโรคติดเชื้อเรื้อรังที่มีอุบัติการณ์การเกิดสูงและอาจส่งผลต่อประชากรมากกว่า 90% ทั่วโลก[60] โดยอวัยวะที่เกี่ยวข้องและได้รับผลกระทบเมื่อเกิดโรค คือ เหงือก, เนื้อเยื่อปริทันต์ (periodontal tissue), เอ็นยึดรากฟัน (periodontal ligament), เคลือบรากฟัน (cementum) และกระดูกเบ้าฟัน (alveolar bone)[61] โรคปริทันต์สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท หนึ่งคือ โรคเหงือกอักเสบ (Gingivitis) เป็นรูปแบบของโรคปริทันต์ที่เกิดไม่รุนแรง มีสาเหตุมาจากไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย (Dental plaque) ซึ่งสะสมอยู่บนพื้นผิวของฟันใกล้กับเหงือก โดยแบคทีเรียในไบโอฟิล์มจะปล่อยสารพิษออกมาทำให้เนื้อเยื่อบริเวณนั้นตอบสนองต่อการอักเสบ แต่จะไม่ส่งผลต่ออวัยวะปริทันต์อื่นนอกจากเหงือกเท่านั้น สองคือ โรคปริทันต์อักเสบ (Periodontitis) คือโรคปริทันต์ที่มีความรุนแรงเพิ่มขึ้น ส่งผลให้เกิดการสูญเสียเนื้อเยื่อปริทันต์และกระดูกรอบรากฟัน เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการสูญเสียฟันในผู้ใหญ่[62,63] สาเหตุของโรคปริทันต์เกิดจากกลุ่มเชื้อจุลชีพในช่องปากที่อยู่ร่วมกันเกิดเป็น ไบโอฟิล์ม (Dental Biofilm) ซึ่งประกอบไปด้วย 3 ขั้นตอน คือ 1. การก่อตัวของเพลลิเคิล (pellicle) 2. การเกาะกลุ่มของแบคทีเรียชนิดใช้ออกซิเจนเพื่อการเจริญเติบโต ได้แก่ สเตรปโตคอคคัส แซงกวิส (Streptococcus sanguis), สเตรปโตคอคคัส ไมติส (Streptococcus mitis) และแอกทีโนไมซีส (Actinomyces) 3. การเกาะกลุ่มของแบคทีเรียชนิดไม่ใช้ออกซิเจน ได้ แก่กลุ่ม พี อินเตอร์มีเดีย (P.intermedia), แคปโนไซโตฟากา (Capnocytophaga spp.), เอฟนิวคลีเอตัม (F.nucleatum), พีจินจิวาลิส (P.gingivalis)[60]

Candida albicans

เชื้อ *Candida albicans* เป็นเชื้อ ประจำถิ่น (normal flora) ที่พบได้ตามอวัยวะ ต่าง ๆ ของร่างกายสามารถก่อให้เกิดโรคได้ถ้ามีการเสียสมดุลระหว่างเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นและเชื้อ *Candida albicans* โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่มีระดับภูมิคุ้มกันต่ำ[8], ผู้ป่วยที่ได้รับยาปฏิชีวนะติดต่อกันเป็นเวลานาน และผู้ที่มีความจำเป็นต้องใช้ยาคอร์ติโคสเตียรอยด์ (corticosteroids) ปัจจัยเหล่านี้จะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อในร่างกายได้[9,10] อาการที่พบได้บ่อย คือ มีฝ้าขาวคล้ายนมข้นสามารถขูดออกได้ เมื่อขูดออกไปจะพบว่าเนื้อเยื่อข้างใต้มีการอักเสบเป็นสีแดง[64] ผู้ป่วยอาจจะมีอาการเจ็บปากหรือคอและรับประทานอาหารได้น้อย นอกจากนี้พบว่า *C. albicans* สามารถแทรกลึกลงไปในท่อเนื้อฟัน[65,66] มีความสามารถต้านต่อยามาตรฐานที่ใส่คลองรากฟันอย่างแคลเซียมไฮดรอกไซด์ได้[67] ดังนั้น จึงมีความเป็นไปได้ว่าเชื้อ *C. albicans* น่าจะมีความสัมพันธ์กับการเกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟัน เป็นเหตุให้การรักษาคลองรากฟันไม่ประสบผลสำเร็จ[12,67]

Enterococcus faecalis

เชื้อ *Enterococcus* species เป็นเชื้อที่สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobes)[68] ปกติแล้วจัดเป็นเชื้อประจำถิ่น แต่สิ่งที่น่าสนใจในทางทันตกรรมคือ มีการศึกษาพบว่าเชื้อชนิดนี้อาจเป็นสาเหตุที่ทำให้การรักษาคลองรากฟันไม่ประสบผลสำเร็จ กล่าวคือ ยังคงมีรอยโรคหลงเหลืออยู่[69,70] ในปัจจุบันยังคงไม่ทราบถึงกระบวนการที่แน่ชัด แต่สันนิษฐานว่า เชื้อ *E. Faecalis* มีความสามารถเจริญเติบโตภายในคลองรากฟันที่ได้รับการรักษาแล้วเนื่องมาจากเชื้ออยู่รอดได้สภาวะที่ขาดอาหารเป็นเวลานาน[15] อีกทั้งยังบุกรุกเข้าไปในท่อเนื้อฟัน[71] และสร้างไบโอฟิล์ม ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายไม่สามารถทำลายเชื้อได้[72] สุดท้ายคือ สามารถทนต่อภาวะเป็นด่างสูงทำให้ยามาตรฐานที่ใส่ในคลองรากฟันคือ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ไม่สามารถกำจัดเชื้อได้[14]

การศึกษาแบบจำลองการเกิดฟันผุ

การใช้แบบจำลองการเกิดฟันผุ (caries model) สามารถศึกษากระบวนการเกิดฟันผุและตอบคำถามเกี่ยวกับงานวิจัยต่าง ๆ ได้เช่น ผลกระทบของอาหารต่อโรคฟันผุ หรือ ผลของฟลูออไรด์ต่อโรคฟันผุ โดยประโยชน์ของการใช้แบบจำลองคือ นักวิจัยสามารถหาความสัมพันธ์ของสิ่งที่ศึกษาต่อการเกิดฟันผุได้โดยไม่ต้องทำให้เกิดฟันผุจริงในคน[73] การทำแบบจำลองการเกิดฟันผุสามารถทำได้หลายวิธี ทั้งในห้องปฏิบัติการ (in vitro)[74–76], ในสัตว์ทดลอง (in vivo)[77] และ

ภายนอกร่างกายมนุษย์ (ex vivo)[78] โดยมีหลักการคล้ายกัน คือ สร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียบนชิ้นเนื้อฟัน หรือเคลือบฟันที่ใช้ทดสอบเพื่อทำให้เกิดรอยผุ แล้วใช้รอยผุที่ได้นั้นมาทำการศึกษาต่อไป

เครื่องมือที่ใช้ทดสอบการเปลี่ยนแปลงแร่ธาตุของฟันในห้องปฏิบัติการ การศึกษาถึงประสิทธิภาพของสารในการป้องกัน ยับยั้งหรือส่งเสริมการคืนแร่ธาตุสู่ผิวเคลือบฟันหรือเนื้อฟัน สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การวัดความแข็งผิว การวัดการเปลี่ยนแปลงขนาดของรอยโรค และการวัดการเปลี่ยนแปลงความหนาแน่นแร่ธาตุของรอยโรค เป็นต้น การวัดความแข็งผิวสามารถวัดได้ด้วยเครื่องวัดความแข็งผิวแบบกดระดับจุลภาค (microindentation measurement) และเครื่องวัดความแข็งผิวแบบกดระดับนาโน (nanoindentation measurement) การวัดการเปลี่ยนแปลงขนาดของรอยโรค สามารถวัดได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์โพลาไรซ์ และการวัดการเปลี่ยนแปลงความหนาแน่นแร่ธาตุของรอยโรค สามารถวัดได้ด้วย เครื่องทรานเวิร์สไมโครเรดิโอกราฟ วิธีการเหล่านี้ประหยัดค่าใช้จ่าย, ใช้งานง่ายและวัดค่าได้รวดเร็ว แต่จำเป็นต้องมีการทำลายชิ้นฟันตัวอย่าง การตัดชิ้นฟันตัวอย่างที่มีรอยโรคอยู่อาจทำให้รอยโรคนั้นหายไประหว่างการเตรียมชิ้นฟันตัวอย่าง และการใช้ชิ้นฟันตัวอย่างต่างชิ้นกันอาจมีรอยโรคต่างตำแหน่งทำให้ไม่สามารถแสดงถึงการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นบนชิ้นฟันตัวอย่างได้อย่างแท้จริงรวมทั้งไม่สามารถติดตามการดำเนินของรอยโรคได้อย่างต่อเนื่อง

ปัจจุบันมีการดัดแปลงเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตรที่ใช้ในทางการแพทย์เพื่อนำมาใช้ในงานวิจัยทางทันตกรรม เครื่องมือนี้สามารถให้ภาพชิ้นงานเป็นสามมิติและศึกษาความหนาแน่นแร่ธาตุของฟันได้ โดยไม่จำเป็นต้องทำลายชิ้นงาน[79] ทำให้สามารถศึกษาติดตามการเปลี่ยนแปลงแร่ธาตุในระยะยาวในชิ้นงานเดิมได้ อีกทั้งเมื่อทดลองเปรียบเทียบกับเครื่องมือชนิดอื่นพบว่า เครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตรให้ผลไม่แตกต่างกับเครื่องมือที่ใช้ศึกษาเกี่ยวกับการสูญเสียและคืนแร่ธาตุของฟัน เช่น ทรานส์เวิร์สไมโครเรดิโอกราฟ,โพลาไรซ์ไลท์ไมโครสโคป [80] และการตรวจทางจุลกายวิภาค[81] ดังนั้น การวิจัยในครั้งนี้จึงเลือกใช้เครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตรในการศึกษาปริมาณแร่ธาตุบนชิ้นเนื้อฟันในห้องปฏิบัติการ

การวัดสีฟัน

สีฟันอ้างอิงจากทฤษฎีสีของMunsell หรือระบบสีของMunsell (The Munsell Colors System) ซึ่งเป็นทฤษฎีสีที่ได้รับการยอมรับกันอย่างกว้างขวาง และถูกนำใช้ศึกษาอ้างอิง เป็นจำนวนมาก โดยผู้คิดค้นทฤษฎีนี้คือ อัลเบิร์ต เฮนรี่ มันเซล (Albert Henry Munsell) จิตรกรชาวอเมริกัน ในปี ค.ศ. 1898 โดยได้มีการออกแบบผังของสีเป็นลักษณะรูปทรงกลม หรือผังที่มีการแผ่

ของสีออกจากศูนย์กลาง กำหนดชื่อ และตำแหน่งของสีที่ผสมกันอย่างหลากหลายนี้ออกเป็นตัวอักษรและตัวเลข ซึ่งมีการจำแนกสีของวัตถุออกเป็น 3 ส่วน ดังนี้

ก. (Hue) คือ คุณสมบัติที่ระบุว่า เป็นสีใดสีหนึ่ง และมีความแตกต่างจากสีอื่น โดยสีนั้นเป็นสีประเภท Chromatic Color เช่น สีแดง สีเขียว สีเหลือง

ข. ค่าความสว่างของสี (Value) คือคุณสมบัติของค่าน้ำหนักอ่อน แก่ ของสีประเภท Achromatic Color คือสีดำ สีเทา สีขาว โดยมีค่าน้ำหนักเริ่มจาก 1 คือ น้ำหนักของสีดำ จนถึงค่า 9 เป็นค่าน้ำหนักของสีขาว และระหว่างสีดำกับสีขาวแบ่งเป็นน้ำหนักของสีเทา สีดำ สีขาว และสีเทานี้เรียกว่าสีกลาง (Neutral)

ค. ค่าความเข้มอ่อนของสี (Chroma) คือ คุณสมบัติของสี (Hue) ที่ถูกผสมกับสีกลาง (Neutral)ในระดับใดระดับหนึ่ง (0 -9) ทำให้ค่า Chroma ของสีนั้นอ่อนลง (Weak) และไล่น้ำหนักจนกระทั่งสีนั้นมีค่าความจัดของสีสูง (High Chroma) จากหลักการดังกล่าวได้นำมาดัดแปลงเพื่อทำ การวัดสีโดยค่า CIE lab color spaceได้แก่ L* a* b* ในเวลาต่อมา โดยในระบบสี L* a* b* นี้

L* หมายถึง ความสว่าง

a* หมายถึง เป็นค่าสัมประสิทธิ์สีซึ่งจะบอกค่าความเป็นสีแดง-เขียว

+a* หมายถึงอยู่ในทิศของสีแดง

-a* หมายถึง อยู่ในทิศของสีเขียว

b* หมายถึง เป็นค่าสัมประสิทธิ์สีซึ่งจะบอกค่าความเป็นสีเหลือง-น้ำเงิน

+b* หมายถึง อยู่ในทิศของสีเหลือง

-b* หมายถึง อยู่ในทิศของสีน้ำเงิน

การวัดสีฟัน สามารถทำได้ 2 วิธี[82]

1. การวัดสีฟันด้วยสายตา (visual color determination) เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากที่สุด เนื่องจากมีข้อดีคือ สะดวก รวดเร็วและประหยัด แต่ยังมีข้อจำกัดหลายประการที่ส่งผลต่อความเที่ยงตรงในการวัดสีเช่น ความสว่างของแสงภายในห้องที่ทำการวัดสี ความเมื่อยล้าทางสายตาของผู้วัดสี ประสบการณ์ของผู้วัดสี เป็นต้น ซึ่งปัจจัยเหล่านี้มีผลต่อความถูกต้องในการวัด
2. การวัดสีฟันด้วยเครื่องวัดสี (instruments colordetermination) เป็นการวัดสีฟันด้วยเครื่องวัดซึ่งจะมีการวัดสีออกมาในรูป L* a* b วิธีนี้มีข้อดีคือ สามารถวัดสีได้ถูกต้องแม่นยำ บอกความแตกต่างของปริมาณสีได้ชัดเจน แต่มีข้อจำกัดคือสามารถวัดสีได้ดีที่สุดในพื้นผิวที่เรียบ เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) เป็นเครื่องมือที่สามารถวัดความเข้มของแสง

ในช่วงความยาวคลื่นแคบ ๆ ได้อย่างต่อเนื่องตามต้องการและใช้ตัวไวต่อแสงที่มีประสิทธิภาพสูง สามารถวัดปริมาณแสงได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ[83]

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาความสามารถในการต้านเชื้อจุลชีพของสารประกอบซิลเวอร์ชนิดต่าง ๆ ในสภาวะแพลงโทนิกและไบโอฟิล์ม
2. ศึกษาผลความเป็นพิษของสารประกอบซิลเวอร์ชนิดต่าง ๆ ต่อเซลล์เยื่อบุช่องปากมนุษย์
3. ศึกษาผลของสารประกอบซิลเวอร์ชนิดต่าง ๆ ต่อการยับยั้งฟันผุในแบบจำลองฟัน
4. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสีเนื้อฟันหลังทาสารทดสอบ

สมมติฐานการศึกษา

1. สารประกอบซิลเวอร์ชนิดต่าง ๆ มีคุณสมบัติในการต้านจุลชีพ การกำจัดและทำลายไบโอฟิล์มและความเป็นพิษต่อเซลล์เยื่อบุช่องปาก ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
2. สารประกอบซิลเวอร์ชนิดต่าง ๆ มีความสามารถในการหยุดยั้งการเกิดฟันผุในแบบจำลองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
3. สารประกอบซิลเวอร์ชนิดต่าง ๆ ทำให้เนื้อฟันเปลี่ยนสีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินงาน

วัสดุ

1. น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (DW; Distilled Water)
2. น้ำเกลือปราศจากเชื้อ (NSS; Normal saline solution)
3. สารละลายไทมอล (thymol) ความเข้มข้น 0.1 % (ฝ่ายเภสัชกรรม คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์)
4. อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเบรน ฮาร์ต อินฟิวชัน Brain heart infusion (BHI): Becton, Dickinson & Co, Sparks, MD 37 กรัมต่อ 1 ลิตร
5. อาหารเลี้ยงเชื้อ Brain heart infusion agar (BHI agar): Becton, Dickinson & Co, Sparks, MD 52 กรัมต่อ 1 ลิตร
6. อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดผสมเลือด Blood agar base (BA): RCI Labscan Asia Co., Ltd 40 กรัมต่อ 1 ลิตร
7. อาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud dextrose broth (SDB): Laboratories Conda S.A. 30 กรัมต่อ 1 ลิตร
8. อาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud dextrose agar (SDA): Laboratories Conda S.A. 65 กรัมต่อ 1 ลิตร
9. อาหารสำหรับเซลล์เยื่อบุช่องปากมนุษย์ (GIBCO BRL Products, Invitrogen Co., USA)
10. candle jar
11. ภาชนะสำหรับใส่สารทดสอบและอาหารเลี้ยงเชื้อ: petri plate (dish), glass bottles, beaker, flasks (Pyrex, USA)
12. ฟันกรามแท้ซี่ที่สาม ที่ถอนจากมนุษย์
13. เรซินอะคริลิกชนิดบ่มเอง (self-curing acrylic resin: Triplex® Cold; IvoclarVivadent AG, FL-9494 Schaan, Liechtenstein)
14. ท่อพีวีซีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.8 เซนติเมตร
15. ขี้ผึ้งตามขอบ (Periphery wax) ปราศจากเชื้อ
16. 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. เครื่องขัดผิววัสดุ (Buehler Metaserve™,Buehler Ltd., USA)
3. เครื่องล้างความถี่สูง (Ultrasonic bath cleaner)
4. หม้อนึ่งควบคุมความดันไอน้ำ (Autoclave: Tomy, Tokyo, Japan)
5. ตู้อบความร้อนสูง (Hot air oven: Memmert, Germany)
6. ตู้บ่มเพาะเชื้อขนาด 400 ลิตร (Binder; Scientific promotion Co., Ltd, USA)
7. เครื่องกรอฟันชนิดความเร็วช้า
8. เครื่องชั่ง Digital ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Digital electronic analytical balance รุ่น Sartorius A 200S/ A200S: Scientific promotion Co., LTD, USA)
9. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Microlitre centrifuge รุ่น Bench top centrifuge MIKRO 200, Andres Hettich GmbH & Co.KG (Hettich), Germany)
10. เครื่องวัดดัชนีการหักเหแสง (UV Spectrophotometer รุ่น The Thermo Scientific Multiskan GO microplate spectrophotometer: Thermo Fisher Scientific Inc, USA)
11. Waterbath (รุ่น WNE 45 SC, Memert, UK)
12. เครื่องเขย่าสาร (Vortex: New York, USA)
13. จานเลี้ยงเชื้อ (petri plate)
14. บีกเกอร์ (Beaker)
15. 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)
20. เครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร (MicroCT 35: Scanco Medical, Switzerland)
21. เครื่องวัดสี (spectrophotometer: รุ่น ColorQuest XE: Hunter Associates Laboratory Inc, USA)

1. สารประกอบซิลเวอร์ชนิดต่าง ๆ

สารประกอบซิลเวอร์ชนิดต่าง ๆ ประกอบไปด้วย สารซิลเวอร์คอมเพล็กซ์ (Ag-complex), ซิลเวอร์ไนเตรท ($AgNO_3$) และซิลเวอร์ออกไซด์ (Ag_2O+ NH_4F) ได้รับการสังเคราะห์จากภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 แสดงสารประกอบซิลเวอร์ชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในการศึกษา

สาร	ปริมาณความเข้มข้นของซิลเวอร์
Ag complex	100 ppm
$AgNO_3$	6,350 ppm
$Ag_2O + NH_4F$	12,700 ppm

2. สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ศึกษา

จากการศึกษาครั้งนี้ได้คัดเลือกตัวแทนของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก, เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ และ เชื้อรา โดยสายพันธุ์ของเชื้อจุลชีพ, อาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะที่เหมาะสมของเชื้อแต่ละชนิดดังรายละเอียดในตารางที่ 4

2.1 การเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ

การเพาะเลี้ยงเชื้อที่ต้องการศึกษาโดยการนำเชื้อออกจากตู้เก็บ -80 °C นำมาเพาะเลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งภายใต้สภาวะอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม (ตารางที่ 4) จากนั้นใช้ loop แตะเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยว จำนวน 3-5 โคโลนี นำมาใส่ในขวดที่ปราศจากเชื้อ ขนาด 20 มิลลิลิตร ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อภายใต้อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมกับเชื้อนั้นๆ จากนั้นปรับปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการให้ได้เชื้อเท่ากับ 10^8 CFU/ml โดยเทียบความขุ่นกับ McFarland No. 0.5 ในส่วนเชื้อราจะถูกปรับปริมาณเชื้อให้ได้เชื้อเท่ากับ 10^3 CFU/ml

ตารางที่ 4 สายพันธุ์ของเชื้อจุลชีพ, อาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะที่เหมาะสมของเชื้อแต่ละชนิด

เชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา	อาหารเลี้ยงเชื้อ	สภาวะเพาะเลี้ยง
แบคทีเรียแกรมบวก *S. mutans* ATCC 25175 *S. sorbrinus* ATCC 33478 *E. faecalis* ATCC 19433	Brain heart infusion broth (BHI) Blood agar (BA)	Aerobic incubator 37°C, 24-48 ชั่วโมง
แบคทีเรียแกรมลบ *A. actinomymycetemcomitans* ATCC 33384	Brain heart infusion broth Blood agar	Anaerobic incubator ($80\%\ N_2$, $10\%\ CO_2$, $10\%\ H_2$) 37°C, 24-48 ชั่วโมง
เชื้อรา *Candida albicans* ATCC 90028	Sabouraud Dextrose broth (SDB) Sabouraud Dextrose agar (SDA)	Aerobic incubator 37°C, 24-48 ชั่วโมง

3. ความสามารถในการต้านเชื้อจุลชีพของสารประกอบซิลเวอร์ชนิดต่างๆ

3.1 การทดสอบเชื้อในสภาวะที่เชื้ออยู่อย่างอิสระในสารละลาย (Planktonic cells)

3.1.1 การทดสอบการต้านเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราของสารประกอบซิลเวอร์ด้วยวิธี agar-well diffusion

การทดสอบนี้ใช้หลักการแพร่ของสารที่ใช้ศึกษาที่เติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งที่เจาะไว้ โดยสารจะซึมไปในวุ้นแผ่เป็นรัศมีโดยรอบจากจุดที่เติมสารในหลุมไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วทั้งความหนาของอาหาร โดยระยะทางที่สารแพร่ออกไปนี้ความเข้มข้นของสารก็จะลดลงทำให้เกิดความแตกต่างของความเข้มข้นของสารในเนื้ออาหารเลี้ยงเชื้อ เชื้อที่โดนยับยั้งก็จะไม่มีการเจริญเติบโตเกิดเป็นโซนใส (inhibition zone) ส่วนเชื้อที่สัมผัสกับสารที่ความเข้มข้นที่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้ก็จะเพิ่มจำนวนขึ้นจนเห็นเป็นขอบของโซนใส[84]

การทดสอบ: เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อราที่มีวุ้นเป็นส่วนผสม และปราศจากเชื้อปริมาตร 20 มิลลิลิตรนำไปต้ม จากนั้นรอให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิประมาณ 50 °C

เติมเชื้อที่ต้องการทดสอบตามข้อ 2.1 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว ผสมให้เข้ากันแล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวลงในจานเลี้ยงเชื้อที่มีวงแหวนโลหะขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตรวางอยู่ รอจนอาหารเลี้ยงเชื้อเย็นและแข็งตัว ถอดวงแหวนโลหะออก จะปรากฏหลุมสำหรับเติมสารที่ต้องการทดสอบ (silver compounds) เติมสารดังกล่าวข้างต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อผสมอยู่ หลุมละ 90 ไมโครลิตร บ่มเชื้อด้วยสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเชื้อที่ใช้ทดสอบนั้น ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ หากพบวงใสรอบหลุมของสาร (inhibition zone) ที่ทดสอบ แสดงว่าสารนั้นมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อราที่ใช้ทดสอบ วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสด้วยไม้บรรทัด (Vernier caliper)

3.1.2 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารประกอบซิลเวอร์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา

ค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ หรือค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) ของสารประกอบซิลเวอร์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราสามารถทดสอบได้ด้วยวิธี broth micro dilution assay ตามวิธีมาตรฐานของ CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)

การทดสอบ: เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อราแบบเหลว เติม 100 ไมโครลิตร ลงในถาดพลาสติกเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม (round-bottomed 96-well polystyrene microtiter plate) และเติมสารประกอบซิลเวอร์ที่ต้องการทดสอบ 100 ไมโครลิตร ทำการเจือจาง (two fold dilution) จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1:2, 1:4, 1:8, ... ลดลงไปตามลำดับ จากนั้นเติมเชื้อที่ต้องการทดสอบซึ่งได้กล่าวไปแล้วในข้อ 2.1 ลงในหลุมสารละลายที่เตรียมไว้แล้ว หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มเชื้อด้วยสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเชื้อที่ใช้ทดสอบนั้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หากพบการขุ่นแสดงว่ามีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อรา หลุมที่ใสแสดงว่าไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อรา ซึ่งความเข้มข้นของหลุมแรกที่ไม่มีการขุ่น หรือระดับความเข้มข้นที่ต่ำที่สุด จะรายงานเป็นค่า MIC ของสารประกอบซิลเวอร์ต่อเชื้อที่ใช้ทดสอบ

3.1.3 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารประกอบซิลเวอร์ที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อรา หรือค่า Minimum Bactericidal Concentration (MBC), Minimum Fungicidal Concentration (MFC) ตามวิธีมาตรฐานของ CLSI

การทดสอบ: ทำการทดสอบโดยการนำสารประกอบซิลเวอร์ในแต่ละหลุมของ microplate ในข้อ 3.1.2 ไปเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมวุ้น บ่มเชื้อด้วยสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเชื้อที่ใช้ทดสอบนั้น

*** ในการทดสอบตามข้อ 3.1.2 และ 3.1.3 ต้องมีหลุม positive control (หลุมที่มีเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อ) และ negative control (หลุมที่ไม่มีการเติมเชื้อ) ทำการทดสอบ 3 ครั้ง หลุมแรกที่ไม่พบโคโลนีเชื้อขึ้นรายงานเป็นค่า MBC ของสารประกอบซิลเวอร์ต่อเชื้อที่ใช้ทดสอบ

3.2 การทดสอบเชื้อในสภาวะที่เชื้อมีการยึดเกาะกลุ่มกันบนพื้นผิว (Biofilm)

3.2.1 การทดสอบของสารประกอบซิลเวอร์ในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราในสภาวะไบโอฟิล์ม

การทดสอบ: ทำการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย หรือเชื้อราแบบเหลวที่มีการเติม 1% mucin เติม 100 ไมโครลิตร ลงในถาดพลาสติกเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม แบบก้นแบน (flat-bottomed 96-well polystyrene microtiter plate) และเติมสารประกอบสารซิลเวอร์ ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อที่ดีในการทดลองขั้นต้น ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำการเจือจาง (two fold dilution) จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1:2, 1:4, 1:8, ... ลดลงไปตามลำดับ จากนั้นเติมเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบปรับความขุ่นที่ $OD_{600\ nm}$ เท่ากับ 0.15 (ประมาณ 10^6 CFU/ml) ลงในหลุมสารละลายที่เตรียมไว้แล้ว หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มเชื้อด้วยสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเชื้อที่ใช้ทดสอบนั้น เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วค่อย ๆ เทสารละลายทิ้ง จากนั้นล้างด้วยสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ ที่มี pH 7.0 จำนวน 2 ครั้ง ทำการนับโคโลนีของเชื้อในแต่ละหลุมโดยเจือจางครั้งละ 10 เท่า ด้วยวิธี 10 fold serial dilution ใช้ปิเปตดูดแต่ละความเข้มข้นที่ได้จำนวน 10 µl. ไปบ่มเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี dot plate ความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ ลงบนจานเพาะเชื้อ Blood agar base ในกรณีที่เป็นเชื้อแบคทีเรีย และ Sabouraud dextrose agar ในกรณีที่เป็นเชื้อรา จากนั้นบ่มเชื้อด้วยสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเชื้อที่ใช้ทดสอบนั้น เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการแปลผล โดยหากเชื้อขึ้นจะทำการนับจำนวนโคโลนีของเชื้อ และหากไม่มีเชื้อขึ้นจะถือว่าสารสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้ คำนวณความสามารถในการยับยั้งไบโอฟิล์ม โดยใช้สูตรดังนี้

$$\%\text{Inhibition} = [1 - (\log \text{CFU/ml of tested group} \div \log \text{CFU/ml of non-treated control}) \times 100\%]$$

โดยความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้ 50% และ 90% รายงานเป็นค่า $MBIC_{50}$ and $MBIC_{90}$ (minimum biofilm inhibition concentration) ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง

3.2.2 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารประกอบสารซิลเวอร์ ในการทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา

การทดสอบ: สร้างแบบจำลองไบโอฟิล์ม (biofilm model) ของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา (ตารางที่ 4)ในถาดพลาสติกเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุมแบบก้นแบน ซึ่งในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อดังกล่าวต้องใช้เชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบปรับความขุ่นที่ $OD_{600\ nm}$ เท่ากับ 0.15 (ประมาณ 10^6 CFU/ml) เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่มีการเติม 1% mucin จากนั้นนำไปบ่มที่สภาวะที่เหมาะสมของเชื้อแต่ละชนิด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงค่อย ๆ เทสารละลายและเชื้อในสภาวะแพลงโทนิกที่ไม่สามารถสร้างไบโอฟิล์มในการยึดเกาะกับผนังของ microtiter plate ได้ทิ้ง ทำการล้างเซลล์ที่หลุดออกจากไบโอฟิล์มด้วยสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ 2 ครั้ง จากนั้นเติมสารประกอบซิลเวอร์ 200 ไมโครลิตรลงในหลุม วัดค่าความสามารถในการทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อด้วยวิธี 10 fold serial dilution ดังกล่าวข้างต้น นำมาเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเติมสารประกอบซิลเวอร์ คำนวณความสามารถในการทำลายไบโอฟิล์ม โดยใช้สูตรดังนี้

%Eradication = [1- (log CFU/ml of tested group ÷ log CFU/ml of non-treated control) × 100%]

โดยความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถทำลายไบโอฟิล์มได้ 50% และ 90% รายงานเป็นค่า $MBEC_{50}$ และ $MBEC_{90}$ (minimum biofilm eradication concentration) ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง

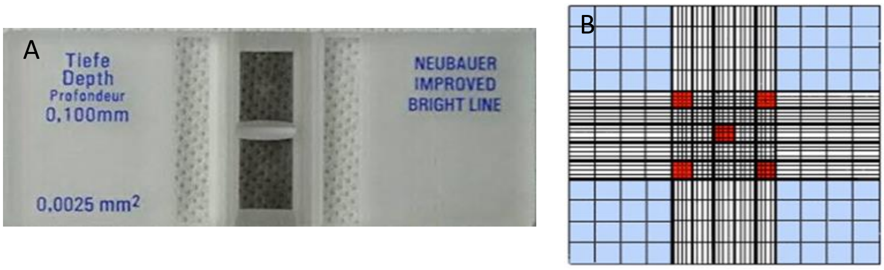
4. ความเป็นพิษของสารประกอบซิลเวอร์ชนิดต่างๆ ต่อเซลล์เยื่อบุช่องปากมนุษย์

การทดสอบ: ทำการเลี้ยงเซลล์เยื่อบุช่องปากมนุษย์ (Keratinocyte cell line H357 ได้รับจาก Spcight PM, School of Clinical Dentistry, University of Sheffield) โดยเลี้ยงในอาหาร keratinocyte growth medium (KGM) ซึ่งประกอบด้วย ดีเอ็มอีเอ็ม (DMEM, dulbecco's modified eagle medium) ที่มีส่วนผสมของ Ham F12, ซีรั่มลูกวัว 10% (10% of fetal bovine serum) และยาปฏิชีวนะ 1% เพาะเลี้ยงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 ตารางเซนติเมตร ทำการบ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C ความชื้นสัมพัทธ์ 95% คาร์บอนไดออกไซด์ 5% เมื่อเซลล์มีปริมาณร้อยละ 80-90 ของภาชนะ H375 ทำการ subculture โดยดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออก แล้วล้างเซลล์ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 มิลลิลิตร ทำซ้ำ 2 หลังจากนั้นเติม trypsinizing solution จำนวน 1 มิลลิลิตร และทำการบ่มในตู้ 10-13 นาที เมื่อครบเวลาให้เติม KGM ในภาชนะเลี้ยงปริมาณ 5 มิลลิลิตร นำเซลล์ที่ได้ข้างต้นใส่หลอดขนาด 15 มิลลิลิตร ปั่นด้วยความเร็ว 1000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาทีแล้วดูดเอาส่วนเหลวด้านบนทิ้ง เซลล์จะถูกแบ่งออกเป็นสองส่วน โดยส่วนที่หนึ่งจะนำมาลงใน

ภาชนะเลี้ยงเซลล์อันใหม่เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ ส่วนที่สองจะนำมาใช้ในการทดสอบ โดยการ seed เซลล์ 100 ไมโครลิตรในถาดพลาสติกเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุมแบบก้นแบน จำนวน 1×10^4 เซลล์ต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 2 วัน หรือจนกว่าเซลล์จะมีปริมาณร้อยละ 80-90 ของภาชนะ จากนั้นเติมสารที่ต้องการศึกษาลงในหลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร ใช้เซลล์ที่ไม่ใส่สารทดสอบเป็นชุดควบคุม บ่มที่อุณหภูมิ 37°C , คาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 15, 30, 45, 60 นาที6, 12 และ 24 ชั่วโมง วัดปริมาณเซลล์ที่ยังมีชีวิตด้วยวิธี Membrane impermeable dyes: Tryphan blue staining นับจำนวนเซลล์โดยเครื่องมือนับเซลล์เม็ดเลือด หรือ Hemocytometer โดย 1 หลุมของเซลล์ทดสอบจะใส่ในช่องของ Hemocytometer ทั้งสองด้าน ถือเป็นการนับ 2 ซ้ำ โดยเซลล์ที่ยังมีชีวิต จะเห็นเป็นสีใสหรือส้ม ส่วนเซลล์ที่ตายจะเห็นเป็นสีฟ้า คำนวณปริมาณเซลล์ที่ตายโดยใช้สูตรดังนี้

Live cell count = ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ทั้งห้าตำแหน่ง $\times 10^4$

% cell cytotoxicity = [1- (Live cell count tested group ÷ Live cell count control group) × 100]



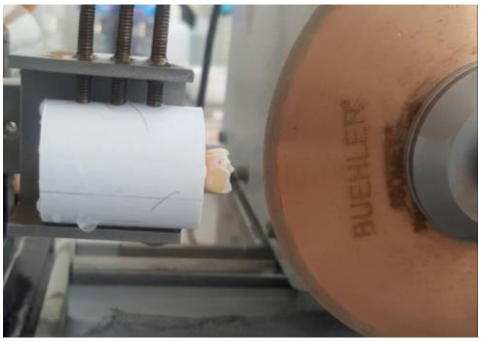
รูปที่ 1 แสดง (A) เครื่องมือนับเซลล์เม็ดเลือด หรือ Hemocytometer, (B) ตำแหน่งที่ทำการนับเซลล์

5. ผลของสารประกอบซิลเวอร์ชนิดต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการเกิดฟันผุในแบบจำลอง (caries model)

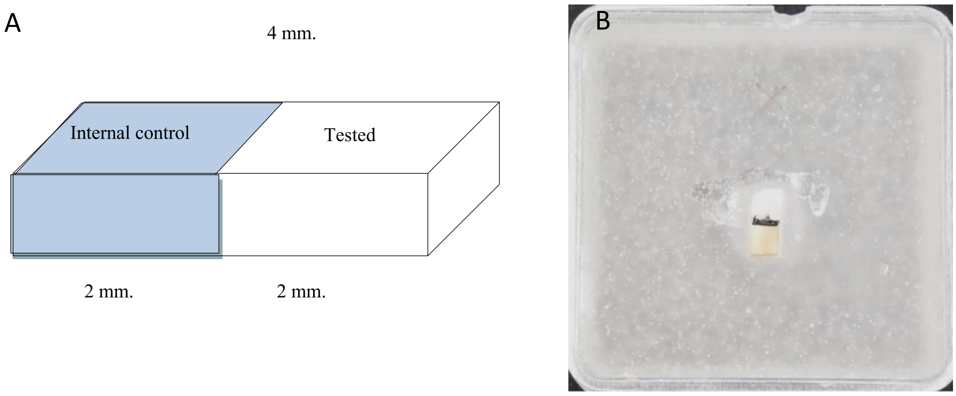
5.1 การเตรียมชิ้นเนื้อฟันตัวอย่าง

ทำการเก็บฟันกรามซี่ที่สามซึ่งถูกถอนจากความจำเป็นเนื่องจากเป็นฟันที่ไม่มีคู่สบ (non-occluded tooth) มาทำความสะอาดโดยใช้เครื่องมือขูดเนื้อเยื่อปริทันต์รอบรากฟันออก ร่วมกับการใช้เครื่องอัลตร้าโซนิค (ultrasonic) เพื่อกำจัดสิ่งสกปรกออกจากฟัน จากนั้นตัดชิ้นเนื้อฟัน 40 ชิ้น ขนาด 2×2×4 ตารางมิลลิเมตรโดยใช้เครื่อง Isomet 4000 แล้วใช้กล้องขยาย (stereomicroscope) ×10 เท่า ตรวจชิ้นเนื้อฟันเพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีรอยร้าว, รอยผุ หรือลักษณะที่ผิดปกติ หลังจากนั้นขัดพื้นผิวของชิ้นเนื้อฟันด้วยกระดาษทรายความละเอียดสูงภายใต้น้ำเพื่อให้พื้นผิวมีความเรียบสม่ำเสมอ(85) หลังจากนั้นใช้น้ำยาทาเล็บแบบทนกรด เคลือบครึ่งหนึ่งของชิ้นเนื้อฟันมีจุดประสงค์

เพื่อใช้เป็นชุดควบคุมภายในของแต่ละชิ้นงาน (internal control)[76,86] ทำการฝังชิ้นเนื้อฟันทดสอบด้วยอะคริลิกบนแบบพลาสติกขนาด 4×4×0.5 เซนติเมตร โดยให้มีการโผล่ขึ้นมาเฉพาะผิวด้านบนของชิ้นเนื้อฟันเท่านั้น จากนั้นนำชิ้นงานที่เตรียมได้ในรูปที่ 3(B) ไปวัดปริมาณแร่ธาตุเริ่มต้นด้วยเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร (micro computed tomography) รุ่น microCT35 เป็นค่าเริ่มต้นก่อนทำการทดลอง (Base line) วิเคราะห์ผลโดยใช้ค่า linear attenuation coefficients (LAC) โดยภายใน 1 ชิ้นงานประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่เป็น internal control ซึ่งเคลือบไว้ด้วยน้ำยาทาเล็บชนิดทนกรด และส่วนที่สองคือส่วนที่จะใช้ทดสอบ แสดงดังรูปที่ 3(A) จากนั้นนำชิ้นงานแตะละชิ้นไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยแก๊สเพื่อพร้อมทำการทดลองต่อไป



รูปที่ 2 แสดงการใช้เครื่องตัดฟันเพื่อเตรียมชิ้นงาน



รูปที่ 3 (A) แสดงการเตรียมชิ้นงานก่อนฝังลงบนแบบพลาสติก, (B) ชิ้นงานที่พร้อมทำการทดสอบ

5.2 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียสำหรับการทดสอบ และการเตรียมรอยฟันผุ

ทำการเพาะเลี้ยง *S. mutans* ATCC 25175 บน Blood agar plates ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 วัน ในสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจน จากนั้นใช้ loop นำเชื้อ 3-4 colony มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว Basal medium ที่มีการเติมกลูโคส 5% (BMG) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงในสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจน จากนั้นปรับเชื้อให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland no.3 ซึ่งมีปริมาณเชื้อเท่ากับ 10^9 เซลล์/มิลลิลิตร ใส่ในขวดปราศจากเชื้อปริมาณ 4 มิลลิลิตร แล้ววางชิ้นเนื้อฟันตามลงไปโดยให้ด้านที่มีการฝังชิ้นเนื้อฟันลงไปอยู่ด้านบน เพื่อให้สัมผัสกับเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจนเป็นเวลาทั้งหมด 7 วัน โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุกๆ 2 วัน เมื่อครบกำหนด 7 วัน นำชิ้นงานไปกำจัดส่วนของ biofilm ของเชื้อบนพื้นผิวด้วยเครื่อง ultrasonic เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปวัดปริมาณแร่ธาตุด้วยเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตรอีกครั้ง เพื่อดูการสูญเสียแร่ธาตุบนพื้นผิวของชิ้นงาน (pre-test) แล้วนำชิ้นงานมาแบ่งกลุ่มทดลองดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 การแบ่งกลุ่มการทดสอบผลของสารประกอบซิลเวอร์ชนิดต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการเกิดฟันผุในแบบจำลอง

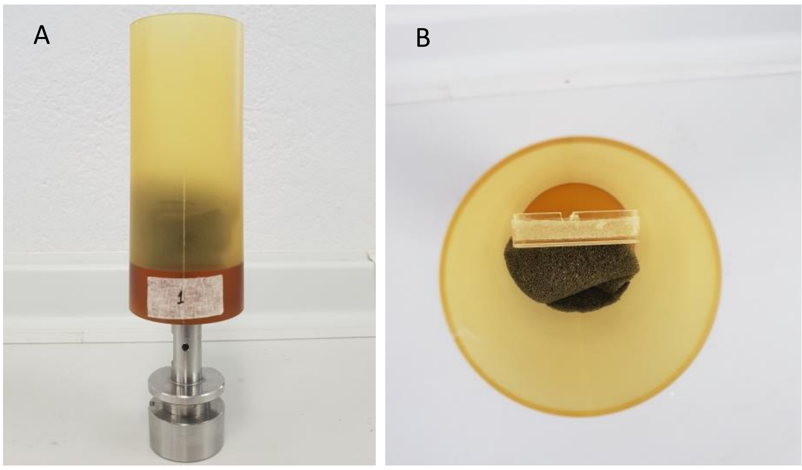
กลุ่มที่	สารทดสอบ	จำนวนชิ้นงาน
1	$AgNO_3$	8
2	$AgO_2 + NH_4F$	8
3	Ag complex	8
4	Nail vanish	8
5	No treatment	8

เมื่อแบ่งกลุ่มการทดลองแล้ว นำชิ้นงานไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยแก๊สอีกครั้ง จากนั้นทาสารทดสอบแต่ละกลุ่มด้วย gravimetric micro-brush โดยทาสารทดสอบชิ้นละ 5 วินาที[85] ในบริเวณที่กำหนด นำชิ้นงานที่ทาสารทดสอบเสร็จแล้วไปแช่ในสารละลายเชื้อ *S. mutans* อีกครั้ง โดยปรับให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland no.3 บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจนเป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดเวลานำชิ้นงานไปกำจัดส่วนของ biofilm ด้วยวิธีการที่ได้กล่าวมาแล้ว จากนั้น วัดปริมาณแร่ธาตุหลังทดลองด้วยเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตรเพื่อดูประสิทธิภาพในการยับยั้งรอยผุของสารทดสอบ (post-test)

5.3 การวิเคราะห์ผลด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์ระดับไมโคร (MicroCT)

นำชิ้นฟันที่ยึดติดกับแบบพลาสติกไปใส่ในแท่นจับพลาสติกทรงกระบอกของเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 37 มิลลิเมตร เมื่อจัดแบบพลาสติกที่มีฟันฝังอยู่ ให้ได้ตำแหน่งที่มั่นคงแล้ว ยึดชิ้นงานด้วยฟองน้ำให้แน่น แล้วนำเข้าเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร

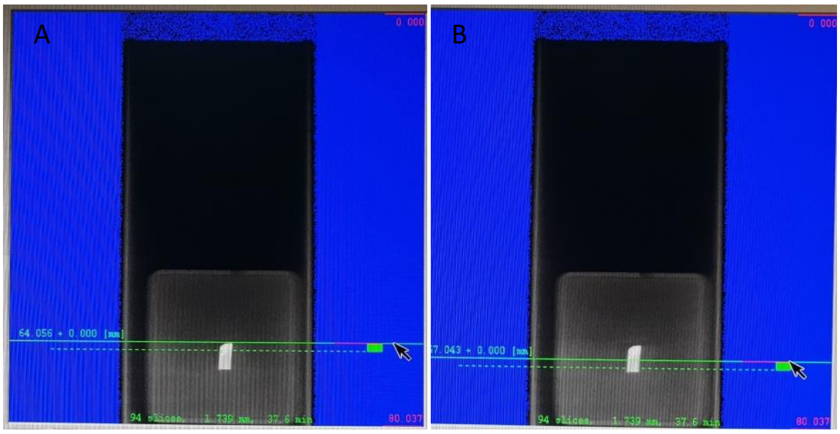
รูปที่ 4 แสดงเครื่องเอกเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร



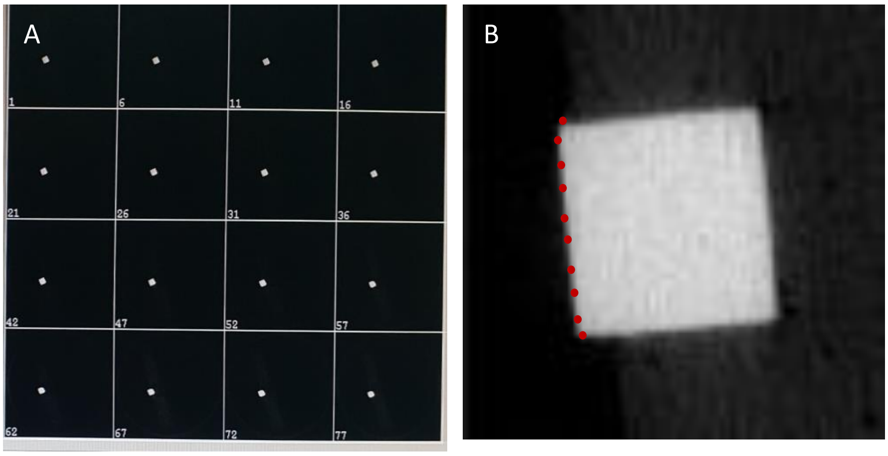
รูปที่ 5 (A,B) แสดงการจับยึดชิ้นงานกับแท่งพลาสติกทรงกระบอกของเครื่องเอกเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร

เครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร ได้รับการตั้งค่าเทียบกับไฮดรอกซีอะพาไทต์ บริสุทธิ์ 1200 มิลลิกรัมไฮดรอกซีอะพาไทต์ต่อลูกบาศก์เซนติเมตร เลือกการตั้งค่าสำหรับการทดลองชิ้นฟันตัวอย่าง ให้รังสีเอกซเรย์มีค่า 70 kVp 114 μA มีขนาดของ voxel เท่ากับ

18.5 μm กำหนดระยะการวิเคราะห์ข้อมูล เริ่มจากขอบบนสุดลงมาให้ได้จำนวน 94 slice (Internal control) และจากขอบล่างสุดขึ้นไปอีก 94 slice (Tested) ดังรูปที่ 5 ใช้เวลาวิเคราะห์ด้านละ 37.6 นาที โดยการวิเคราะห์ชิ้นงาน 1 ชิ้นซึ่งมี 2 ด้านใช้เวลาทั้งสิ้น 64.12 นาที เมื่อเสร็จสิ้นการสแกนจึงเลือกโปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูล โดยเลือกโปรแกรมการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์การลดทอนเชิงเส้น หรือค่า LAC เพื่อวิเคราะห์ปริมาณแร่ธาตุบนผิวชิ้นฟันตัวอย่าง โดยจะทำการสุ่มวัดจำนวน 10 slice แต่ละ slice อ่านผลที่ 10 ตำแหน่งโดยแต่ละตำแหน่งจะอยู่บนพื้นผิวของชิ้นเนื้อฟัน แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย ดังรูปที่ 6



รูปที่ 6 ระยะที่กำหนดการวิเคราะห์ข้อมูล (A) กลุ่มควบคุมภายใน, (B) กลุ่มทดลอง

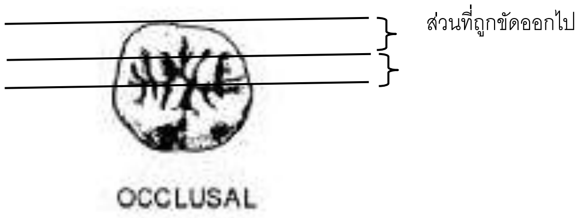


รูปที่ 7 (A) แสดง slice ทั้งหมดที่เครื่องเอกเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตรได้ทำการแสกน (B) แสดงตำแหน่งการสุ่มวัดค่า LAC ในแต่ละ slice

6. การเปลี่ยนสีของเนื้อฟันหลังทาสารทดสอบเมื่อเวลาผ่านไป

6.1 การเตรียมฟันตัวอย่าง

ทำการเก็บฟันกรามซี่ที่สามซึ่งถูกถอนจากความจำเป็นเนื่องจากเป็นฟันที่ไม่มีคู่สบ (non-occluded tooth) มาทำความสะอาดโดยใช้เครื่องมือขูดเนื้อเยื่อปริทันต์รอบรากฟันออก ร่วมกับการใช้เครื่องอัลตร้าโซนิค (ultrasonic) เพื่อกำจัดสิ่งสกปรกออกจากฟัน จากนั้นใช้กระดาษทรายที่มีความหยาบ 600 ร่วมกับเครื่องขัดผิววัสดุ (grinder polisher) ยี่ห้อ Buehler Metaserve™ กำจัดส่วนของเคลือบฟันด้านแก้ม (Buccal surface) ก่อนถึงกึ่งกลางตัวฟัน 3 มิลลิเมตร ออกไป พิจารณาให้โครงสร้างฟันที่เหลือด้านแก้ม เป็นส่วนของเนื้อฟันทั้งหมด จากนั้นเมื่อได้ชิ้นฟันแล้วจะเก็บฟันไว้ในความชื้นสัมพัทธ์ 100% ตลอดการทดลอง



รูปที่ 8 แนวการตัดชิ้นงานเพื่อนำมาใช้ทดสอบการวัดสี

6.2 วิธีการทดสอบ

นำชิ้นฟันที่เตรียมไว้ข้างต้นจำนวน 40 ซี่ แบ่งกลุ่มการทดลองดังตารางที่ 1 ทำการวัดสีฟันเริ่มต้นก่อนการทาสารทดสอบโดยใช้เครื่องวัดเฉดสีแบบตั้งโต๊ะ spectrophotometer เพื่อเป็นค่าพื้นฐาน จากนั้นทาสารทดสอบบริเวณที่ได้กำจัดส่วนเคลือบฟันออกไปให้ทั่วทั้งซี่ฟัน วัดเฉดสีด้วยเครื่อง spectrophotometer เมื่อครบกำหนดเวลา 1, 7 และ 14 วัน

การวิเคราะห์ทางสถิติ

1. การทดสอบความไวในการต้านเชื้อในสภาวะ planktonic cell ด้วยวิธี Agar well diffusion และ Broth microdilution

- ใช้สถิติเชิงพรรณนา โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และใช้สถิติ Kruskul-Wallis test ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ p value < 0.05 และหากพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จะทำการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มการศึกษาโดยใช้ Mann-Whitney U test

2. การทดสอบประสิทธิภาพของสาร ต่อการกำจัดเชื้อในสภาวะ biofilm โดยเปรียบเทียบปริมาณการกำจัดเชื้อของสาร (% inhibition, % eradication) ในรูปแบบ biofilm

- ใช้สถิติ Kruskul-Wallis test ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ p value < 0.05 และหากพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จะทำการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มการศึกษาโดยใช้ Mann-Whitney U test

3. การศึกษาความเป็นพิษของสารประกอบซิลเวอร์ชนิดต่าง ๆ ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์

- โดยใช้สถิติ Kruskul-Wallis test ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ p value <0.05 และถ้าหากพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติให้ทดสอบเปรียบเทียบคู่ความแตกต่างโดยใช้ Mann-Whitney U test

4. การศึกษาผลของสารประกอบซิลเวอร์ชนิดต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการเกิดฟันผุในแบบจำลอง

- เนื่องจากข้อมูลมีการแจกแจงแบบปกติ วิเคราะห์โดยใช้สถิต One-way ANOVA และถ้าหากพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติให้ทดสอบเปรียบเทียบคู่ความแตกต่างโดยใช้ multiple comparison by Tukey test
- ใช้สถิติ Paired Samples T-test การวิเคราะห์เปรียบเทียบข้อมูล ก่อนและหลังการทาสารทดสอบ

5. **การเปลี่ยนสีของเนื้อฟันหลังทาสารทดสอบเมื่อเวลาผ่านไป**

- 1. วิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยของสีฟัน เนื่องจากข้อมูลมีการแจกแจงไม่ปกติ ใช้สถิติ Kruskul-Wallis test ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ p value <0.05 และถ้าหากพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติให้ทดสอบเปรียบเทียบคู่ความแตกต่างโดยใช้ Mann-Whitney U test

บทที่ 3

ผลการดำเนินงานวิจัย

การทดสอบที่ 1: Agar well diffusion method

การทดสอบความสามารถของสารประกอบซิลเวอร์ชนิดต่างๆ ได้แก่ $AgNO_3$, Ag_2O+ NH_4F และ Ag complex ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคในช่องปาก 5 ชนิด ได้แก่ *C. albicans, S. mutans, S. sobrinus, E. faecalis* และ*A. actinomycetemcomitans* ด้วยวิธี Agar well diffusion พบว่าสารทดสอบทั้งสามชนิด มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบทั้งห้าชนิด โดยมีโซนยับยั้งตั้งแต่ 0.9 – 34.75 มิลลิเมตร (ตารางที่ 1) ขึ้นอยู่กับชนิดของสารประกอบซิลเวอร์และเชื้อทดสอบ ซึ่งจากการศึกษาพบว่า Ag_2O+ NH_4F ให้ค่าเฉลี่ยของโซนยับยั้งต่อเชื้อก่อโรคทั้งห้าชนิดสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับ $AgNO_3$ และ Ag complex ($p < 0.05$) และพบว่าเชื้อ *A. actinomycetemcomitans, S. mutans* และ *S. sobrinus* มีแนวโน้มว่ามีความไวต่อสารประกอบซิลเวอร์มากกว่าเชื้อ *C. albicans, E. faecalis* ดังตารางที่ 1

การทดสอบที่ 2: การทดสอบค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารประกอบซิลเวอร์ที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimum Bactericidal Concentration (MBC), Minimum Fungicidal Concentration (MFC))

จากผลการศึกษาข้างต้น จึงนำสารประกอบซิลเวอร์ดังกล่าวมาหาความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อก่อโรคในช่องปาก จากการทดลองพบว่าสาร $AgNO_3$, Ag_2O+ NH_4F และ Ag complex ตั้งแต่ความเข้มข้นที่ 12.4 ถึง 793.8 ppm, 24.8 ถึง 1587.5 ppm และ 25.0 ถึง 100 ppm ตามลำดับมีความสามารถในการฆ่าเชื้อ (ตารางที่ 2) สารประกอบ $AgNO_3$ ใช้ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการฆ่าเชื้อก่อโรคทั้งห้าชนิดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับสาร Ag_2O+ NH_4F และ Ag complex ($p < 0.05$) และนอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *E. faecalis* และ *A. actinomycetemcomitans* ต้องใช้ความเข้มข้นของสารประกอบซิลเวอร์ทั้งสามชนิดในปริมาณที่สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับความสามารถในการใช้ฆ่าเชื้อตัวอื่น ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 6 แสดงค่าเฉลี่ยของโซนการยับยั้งของสารต่อเชื้อที่ใช้ทดสอบ

ชนิดของสาร	ความเข้มข้น (ppm)	ขนาดเฉลี่ยของโซนการยับยั้ง (มิลลิเมตร)				
		C. albicans	*E. faecalis*	*S. mutans*	*S. sobrinus*	*A. actinomycetemcomitans*
$AgNO_3$	6350	16.3 ± 1.3	11.6 ± 1.0	23.9 ± 1.5	25.0 ± 0.8	25.9 ± 1.1
Ag_2O+ NH_4F	12700	20.8 ± 1.1*	12.1 ± 0.6	33.5 ± 1.4*	34.75 ± 0.6*	30.4 ± 1.1*
Ag complex	100	5.6 ± 1.5	0.9 ± 0.0	7.95 ± 0.7	10.8 ± 1.1	8.6 ± 0.9

* มีค่าโซนการยับยั้งสูงที่สุดที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับร้อยละ 99 ($p < 0.001$) เมื่อเทียบในสดมภ์เดียวกัน

ตารางที่ 7 ฤทธิ์ของสารประกอบซิลเวอร์ชนิดต่าง ๆ ในการยับยั้งเชื้อทดสอบด้วยค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MBC)

ชนิดของสาร	ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ: MBC(ppm)				
	C. albicans	*E. faecalis*	*S. mutans*	*S. sobrinus*	*A. actinomycetemcomitans*
$AgNO_3$	12.4 ± 0.0*	793.8 ± 0.0*	12.4 ± 0.0*	12.4 ± 0.0*	24.8 ± 0.0*
Ag_2O+ NH_4F	24.8 ± 0.0	1587.5 ± 0.0	24.8 ± 0.0	24.8 ± 0.0	49.6 ± 0.0
Ag complex	25.0 ± 0.0	N/A	25.0 ± 0.0	2 5.0 ± 0.0	N/A

* มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับร้อยละ 99 ($p < 0.001$) เมื่อเทียบในสดมภ์เดียวกัน

การทดสอบที่ 3: ประสิทธิภาพของสารประกอบซิลเวอร์ชนิดต่าง ๆ ต่อการยับยั้งและทำลายไบโอฟิล์มได้ 100%

จากการศึกษาพบว่าสารประกอบซิลเวอร์ทั้งสามชนิดมีความสามารถในการยับยั้งการสร้างและทำลายไบโอฟิล์มได้แตกต่างกัน โดยพบว่า $AgNO_3$และ Ag_2O+ NH_4F มีประสิทธิภาพต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *C. albicans, S. mutans, S. sobrinus, E. faecalis* และ *A. actinomycetemcomitans* ได้ ในขณะที่ Ag complex ไม่สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *E. faecalis* และ *A. actinomycetemcomitans* ได้ (ตารางที่ 3 และภาคผนวก 2) พบว่า $AgNO_3$ มีความสามารถในการยับยั้งการสร้างและทำลายไบโอฟิล์มได้ดีที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับสารประกอบซิลเวอร์ตัวอื่น และจากผลการศึกษาพบว่าความสามารถของการยับยั้งการสร้างและการทำลายไบโอฟิล์มของสารประกอบซิลเวอร์จะดีขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารซิลเวอร์เพิ่มขึ้น

ความไวของเชื้อต่อสารประกอบซิลเวอร์สามารถแบ่งเชื้อออกเป็นสองกลุ่มได้แก่ เชื้อที่มีความไวมาก ประกอบไปด้วย *C. albicans, S. mutans* และ *S. sobrinus* และเชื้อที่มีความไวน้อยประกอบไปด้วย *E. faecalis* และ *A. actinomycetemcomitans* เชื้อที่มีความไวมากพบว่าใช้ความเข้มข้นของสารประกอบซิลเวอร์ในการยับยั้งการสร้างและการทำลายไบโอฟิล์มต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่มีความไวน้อย และนอกจากนี้ยังพบว่าสารประกอบ Ag complex ไม่สามารถยับยั้งการสร้างและการทำลายไบโอฟิล์มในเชื้อกลุ่มที่มีความไวน้อยได้

ตารางที่ 8 ความเข้มข้นของสารประกอบซิลเวอร์ที่สามารถยับยั้งการสร้างและทำลายไบโอฟิล์มได้ 100 %

เชื้อจุลชีพ	$AgNO_3$		Ag_2O+ NH_4F		Ag complex	
	Inhibition	Eradication	Inhibition	Eradication	Inhibition	Eradication
C. albicans	12.4 ± 0.0	99.2 ± 0.0	24.80 ± 0.0	793.8 ± 0.0	25.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
S. mutans	12.4 ± 0.0	99.2 ± 0.0	24.80 ± 0.0	198.4 ± 0.0	25.0 ± 0.0	50.0 ± 0.0
S. sobrinus	12.4 ± 0.0	99.2 ± 0.0	24.80 ± 0.0	198.4 ± 0.	25.0 ± 0.0	50.0 ± 0.0
E. faecalis	793.8 ± 0.0*	3175.0 ± 0.0*	1587.5 ± 0.0*	6350 ± 0.0*	>100 ± 0.0	>100 ± 0.0
A. actinomycetemcomitans	24.8 ± 0.0**	369.8 ± 0.0**	49.6± 0.0**	793.8 ± 0.0	>100 ± 0.0	>100 ± 0.0

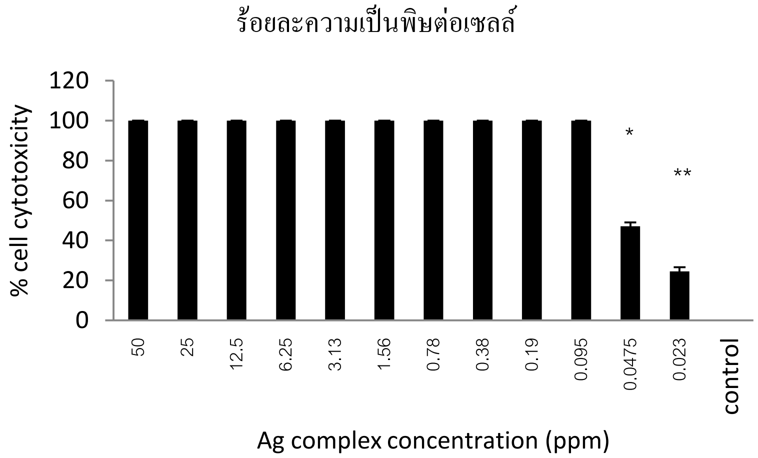
* *E. faecalis* มีความแตกต่างที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับร้อยละ 99 ($p < 0.001$) เมื่อเทียบในสดมภ์เดียวกัน

** *A. actinomycetemcomitans* มีความแตกต่างที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับร้อยละ 99 ($p < 0.001$) เมื่อเทียบในสดมภ์เดียวกัน

การทดสอบที่ 4: ความเป็นพิษของสารประกอบซิลเวอร์ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์เยื่อบุช่องปากมนุษย์ (Keratinocyte cell line H357)

การศึกษาความเป็นพิษของสารประกอบซิลเวอร์ชนิดต่าง ๆ ต่อเซลล์เยื่อบุช่องปากมนุษย์ (Keratinocyte cell line H357) ที่เวลาต่างๆ ได้แก่ 15, 30, 45, 60 นาที และ12, 24 ชั่วโมง พบว่าสารประกอบซิลเวอร์ทั้ง 3 ชนิดเป็นพิษต่อเซลล์ทดสอบ และพบว่าเป็นพิษต่อเซลล์ทดสอบมากกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญอย่างสถิติ ($p < 0.05$) ในทุกช่วงเวลาและทุกความเข้มข้นของสารประกอบซิลเวอร์สาร $AgNO_3$, Ag_2O+ NH_4F และ Ag complex ความเข้มข้นตั้งแต่ 6.2 ถึง 3,175 ppm, 12.4 ถึง 6750 ppm และ 0.95 ถึง 50 ppm ตามลำดับ มีความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 100% ทุกช่วงเวลาที่ใช้ทดสอบ แต่ที่ความเข้มข้น 0.0475 และ 0.023 ppm ของ Ag complex มีความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับร้อยละ 47.08และร้อยละ 24.58 ตามลำดับ เมื่อทดสอบที่ 15 นาที ดังแสดงในรูปที่ 7

เมื่อพิจารณาจากสาร Ag complex พบว่าในช่วงเวลาเดียวกันที่ระดับความเข้มข้นของสารที่สูงขึ้น พบความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับสูงขึ้น ถึงแม้ว่าความเข้มข้นของสารเท่ากันแต่ระยะเวลาที่สัมผัสกับเซลล์นานขึ้นพบว่าความเป็นพิษต่อเซลล์ก็จะสูงขึ้น



รูปที่ 9 ความเป็นพิษต่อเซลล์ Keratinocyte H357 ของสาร Ag complex เป็นเวลา 15 นาที

การทดสอบที่ 5 การหยุดยั้งฟันผุในแบบจำลองฟัน

พบว่าค่าเฉลี่ยปริมาณแร่ธาตุบนชิ้นเนื้อฟันตัวอย่างก่อนการสร้างรอยโรคฟันผุและภายหลังการสร้างรอยโรคฟันผุในแต่ละกลุ่ม ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่พบว่าค่าเฉลี่ยปริมาณแร่ธาตุบนชิ้นเนื้อฟันภายหลังการสร้างรอยโรคฟันผุมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับก่อนการสร้างรอยโรคฟันผุ ($p<0.001$)

เมื่อทาสารทดสอบทั้งสามชนิดลงบนชิ้นเนื้อฟันกลุ่มทดลองแล้วนำชิ้นเนื้อฟันตัวอย่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม ไปแช่ในเชื้อ *S. mutans* ที่ผ่านการปรับให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland no.3 เป็นเวลา 7 วันอีกครั้ง และนำมาเปรียบเทียบระหว่าง pre-test และ post-test พบว่า กลุ่มควบคุมบวกที่เคลือบชิ้นงานด้วยน้ำยาทาเล็บชนิดทนกรด สามารถยับยั้งการผุได้ร้อยละ 100 ในขณะที่กลุ่มที่ทาสาร $AgNO_3$ ยับยั้งได้ร้อยละ 25, Ag_2O+ NH_4F ยับยั้งได้ร้อยละ 45 และ Ag complex ยับยั้งได้ร้อยละ 15

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณแร่ธาตุบนชิ้นเนื้อฟันระหว่าง pre-test และ post-test โดยใช้สถิติ Paired T-test พบว่ากลุ่มที่ทาสารทดสอบ Ag_2O+ NH_4F มีปริมาณแร่ธาตุเพิ่มขึ้นจาก pre-test อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.001$) ในขณะที่กลุ่มที่ทาสาร Ag complex และกลุ่มควบคุมลบ มีปริมาณแร่ธาตุบนชิ้นเนื้อฟันลดลงจาก pre-test อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.001$) ส่วนในกลุ่มเคลือบชิ้นงานด้วยน้ำยาทาเล็บชนิดทนกรดและกลุ่มที่ทาสาร $AgNO_3$ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบปริมาณแร่ธาตุเฉลี่ยของชิ้นเนื้อฟันก่อนทำให้เกิดรอยโรคฟันผุ หลังทำให้เกิดรอยโรคฟันผุ และภายหลังการทาสารทดสอบ

กลุ่มทดลอง	**ปริมาณแร่ธาตุ (cm^{-1})**		
(n = 8)	**Base line**	**Pre-test**	**Post-test**
$AgNO_3$	3.1±0.2	2.5±0.4*	2.5±0.3*
Ag_2O+ NH_4F	3.2±0.3	2.4±0.3*	2.9±0.3*,**
Ag complex	3.2±0.3	2.5±0.3*	2.3±0.3*,**
Nail vanish	3.1±0.1	3.1±0.2	3.1±0.3
No treatment	3.3±0.4	2.5±0.5*	2.0±0.3*,**

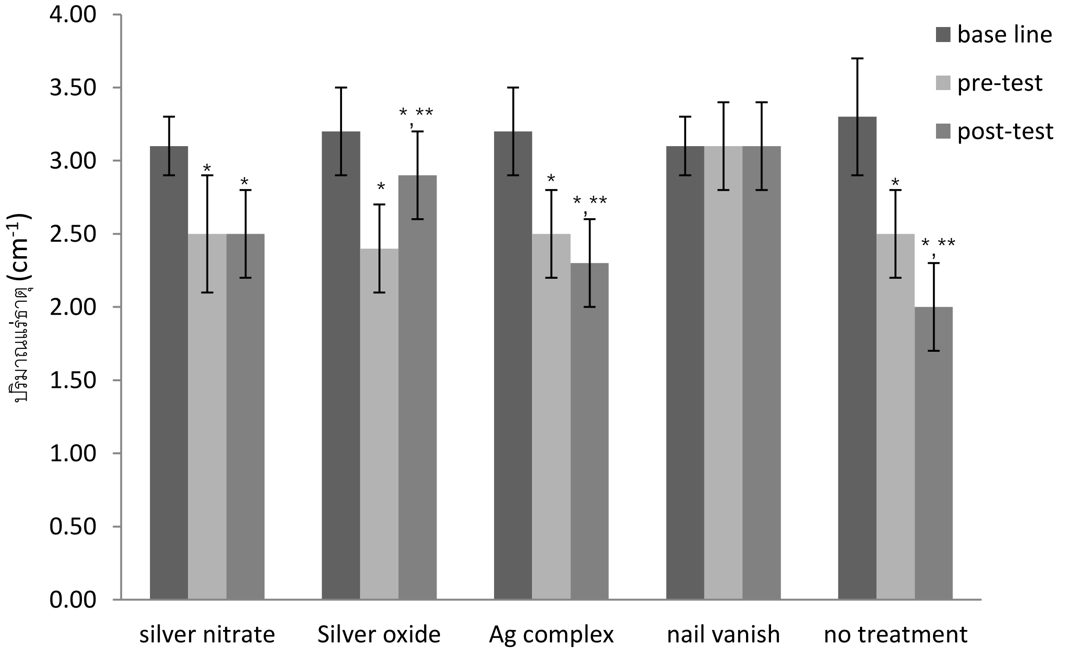
Base line: ปริมาณแร่ธาตุที่สะสมในเนื้อฟันก่อนการทดลอง

Pre-test: ปริมาณแร่ธาตุที่สะสมในเนื้อฟันหลังจากผ่านกระบวนการเลียนแบบรอยผุ

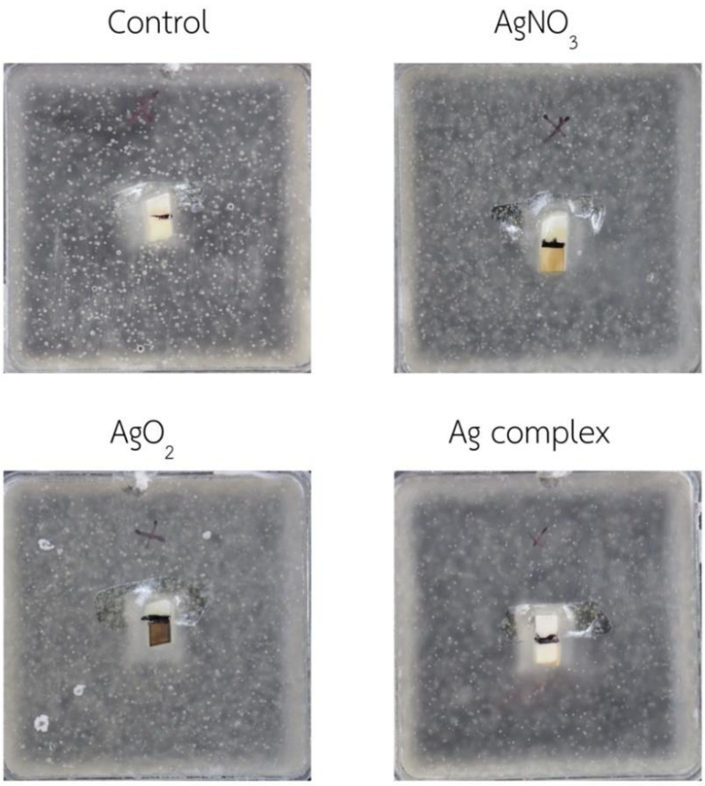
Post-test: ปริมาณแร่ธาตุที่สะสมในเนื้อฟันหลังจากทาสารทดสอบทั้งสามกลุ่ม

* มีความแตกต่างกับ Base line อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

** มีความแตกต่างกับ Pre-test อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 10 ปริมาณแร่ธาตุเฉลี่ยของชิ้นเนื้อฟันก่อน, หลังทำให้เกิดรอยโรคฟันผุ และภายหลังการทาสารทดสอบ



รูปที่ 11 การเปลี่ยนแปลงของเนื้อฟันหลังทาสารทดสอบ 7 วัน (A) control, (B) $AgNO_3$, (C) Ag_2O+ NH_4F, (D) Ag complex

การทดลองที่7 การวัดสีของฟันที่เปลี่ยนแปลงเมื่อเวลาผ่านไปภายหลังจากทาสารทดสอบ

เมื่อนำค่า L*, a*, b* ของฟันภายหลังจากการทาสารประกอบซิลเวอร์ชนิดต่าง ๆ คือ $AgNO_3$, Ag_2O+ NH_4F และ Ag complex เป็นเวลา 1, 7 และ 14 วันมาคำนวณ เทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ทาสารใด ๆ พบว่ามีค่าเฉลี่ยการเปลี่ยนแปลงของสีฟันภายหลังการทาสารทดสอบดังตารางที่ 5 โดยฟันที่ทาสาร Ag_2O+ NH_4F มีค่าเฉลี่ยการเปลี่ยนแปลงของสีมากที่สุด และฟันในกลุ่มที่แช่น้ำกลั่น (No treatment) มีค่าเฉลี่ยการเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด

จากการเปรียบเทียบภายในกลุ่มสารทดสอบ พบว่าฟันในกลุ่มที่ทาสาร Ag_2O+ NH_4F มีค่าเฉลี่ยสะสมการเปลี่ยนแปลงของสีฟันมากที่สุด รองลงมาคือ $AgNO_3$ และน้อยที่สุดคือ Ag complex เมื่อทำการทดสอบทางสถิติเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่าฟันที่ทาสาร Ag_2O+ NH_4F และ $AgNO_3$ มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่ค่าเฉลี่ยสะสมการเปลี่ยนสีของฟันที่ทาสาร Ag complex เทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

เมื่อพิจารณาอัตราการเปลี่ยนแปลงของสีฟันพบว่า มีอัตราการเปลี่ยนสีมากที่สุดหลังจากทาสารเป็นเวลา 7 วัน และยังคงมีการเปลี่ยนสีไปเรื่อย ๆ เมื่อเวลาผ่านไป แต่ในอัตราที่ช้าลง ดังแสดงในรูปที่ 4

ตารางที่ 10 แสดงค่าเฉลี่ยสีที่เปลี่ยนแปลงเมื่อเวลาผ่านไป 1, 7 และ 14 วันภายหลังจากการทาสารทดสอบ $AgNO_3$, Ag_2O+ NH_4F และ Ag complex เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

กลุ่มทดลอง	**n**	**ค่าเฉลี่ยสีที่เปลี่ยนแปลงไป (ΔE)**		
		T1	**T7**	**T14**
$AgNO_3$	8	17.12 ± 5.05	21.24 ± 6.32	18.79 ± 7.50
Ag_2O+ NH_4F	8	19.04 ± 1.13*	24.36 ± 4.67*	22.56 ± 3.85*
Ag complex	8	3.83 ± 1.43	6.66 ± 1.71	5.43 ± 3.10
No treatment	8	2.44 ± 0.29	2.42 ± 0.29	2.62 ± 1.03

* มีค่าเฉลี่ยการเปลี่ยนสีมากที่สุดที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับร้อยละ 99 ($p < 0.001$) เมื่อเทียบในสดมภ์เดียวกัน

บทที่ 4

บทวิจารณ์

ในงานด้านทันตกรรมนั้นได้พัฒนาสารต่าง ๆ ขึ้นมาเพื่อช่วยหยุดยั้ง ป้องกัน และรักษาการเกิดรอยโรคฟันผุ หนึ่งในนั้นคือ สารประกอบซิลเวอร์ จากหลายๆ การศึกษาพบว่า นิยมใช้คือ สารประกอบซิลเวอร์ไดเอมีนฟลูออไรด์ (Silver diamine fluoride: SDF) ซึ่งมีประสิทธิภาพในการหยุดยั้งฟันผุ และชักนำให้มีการคืนกลับของแร่ธาตุได้[25] อย่างไรก็ตาม สารประกอบซิลเวอร์ไดเอมีนฟลูออไรด์ ยังคงไม่มีการนำเข้ามาจำหน่ายอย่างถูกต้องในประเทศไทย ดังนั้น จึงเป็นที่มาของการศึกษานี้ ที่จะทดสอบผลของสารประกอบซิลเวอร์ชนิดต่างๆ สามชนิดคือ $AgNO_3$, Ag_2O+ NH_4F และ Ag complex ที่คิดค้นโดยภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ต่อจุลชีพในช่องปาก, พิษต่อเซลล์เยื่อบุช่องปากคนและการหยุดยั้งฟันผุในแบบจำลองฟัน

จากการศึกษาความสามารถในการต้านเชื้อจุลชีพในช่องปากทั้งห้าชนิด คือ *C. albicans, S. mutans, S. sobrinus, E. faecalis* และ *A. a* ของสารประกอบซิลเวอร์ชนิดต่างๆ โดยวิธี Agar well diffusion พบว่าสารประกอบที่ใช้ทดสอบทั้งสามชนิดให้โซนการยับยั้งขึ้นกับความเข้มข้นของซิลเวอร์ โดยสารประกอบ Ag_2O+ NH_4F ความเข้มข้น 12700 ppm (1.27%) จะให้ค่าเฉลี่ยโซนยับยั้งสูงสุด รองลงมาคือ $AgNO_3$ ความเข้มข้น 6350 ppm (0.635%) และน้อยที่สุดคือ Ag complex ความเข้มข้น 100 ppm (0.001%) จากผลการศึกษาพบว่าค่าเฉลี่ยของโซนยับยั้งจะขึ้นกับความเข้มข้นของสารที่ใช้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Scarpelli และคณะในปี 2017 พบว่าสารประกอบซิลเวอร์ที่ความเข้มข้นสูงกว่า จะให้โซนยับยั้งที่กว้างกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อทดสอบชนิดเดียวกัน[87] แต่ทั้งนี้ยังมีปัจจัยความสามารถในการซึมผ่านของสารเข้าสู่อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง ที่มีผลต่อการให้โซนการยับยั้งดังนั้นวิธี Agar well diffusion สามารถบอกได้เพียงว่าเชื้อจุลชีพ มีความไวต่อสารที่ใช้ทดสอบหรือไม่

สำหรับการทดสอบหาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารประกอบซิลเวอร์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา (Minimal Inhibitory Concentration: MIC) ด้วยวิธี broth micro dilution นั้นไม่สามารถทำได้ เนื่องจากสาร Ag_2O+ NH_4F และ $AgNO_3$,มีการตกตะกอนเป็นสีน้ำตาลจนถึงสีดำ ทำให้ระบุความแตกต่างระหว่างตะกอนของเชื้อกับตะกอนของสารไม่ได้ แต่ยังสามารถทดสอบหาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารประกอบซิลเวอร์ที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา หรือค่า Minimum Bactericidal Concentration (MBC), Minimum Fungicidal Concentration (MFC) ได้ เนื่องจากใช้วิธีการดูโคโลนีของเชื้อที่สามารถเจริญเติบโตได้

หลังจากสัมผัสสาร จากการศึกษาพบว่าสามารถหาค่า MBC และ MFC ของสารประกอบ $AgNO_3$ และ Ag_2O+ NH_4F ต่อเชื้อทดสอบได้ทุกชนิด ยกเว้นสาร Ag complex ที่ไม่สามารถหาค่า MBC ต่อเชื้อ *E. faecalis* และ *A. actinomycetemcomitans* นอกจากนี้ยังพบว่าสารประกอบ $AgNO_3$ สามารถฆ่าเชื้อทดสอบทุกชนิดได้โดยใช้ความเข้มข้นน้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารตัวอื่น ๆ และใช้ความเข้มข้นในการฆ่าเชื้อน้อยกว่าสารประกอบ Ag_2O+ NH_4F เป็น 2 เท่า จากการศึกษาของ Peng และคณะ ในปี 2012 พบว่ากลไกการออกฤทธิ์ของสารประกอบซิลเวอร์ต่อการฆ่าเชื้อจุลชีพนั้นขึ้นอยู่กับการแตกตัวให้ซิลเวอร์อิออน(28)ของสาร ดังนั้นสาร $AgNO_3$ ที่ความเข้มข้น 6350 ppm เมื่อสัมผัสกับอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวอาจมีการแตกตัวให้ซิลเวอร์อิออนออกมามากกว่าสาร Ag_2O+ NH_4F และ Ag complex จึงทำให้ค่า MBC ที่ทดสอบได้ น้อยกว่าสารตัวอื่น

เชื้อจุลชีพที่เจริญเติบโตบนผิวเคลือบฟัน หรือบริเวณร่องเหงือกเป็นสาเหตุในการก่อโรคติดเชื้อในช่องปากที่สำคัญ ซึ่งส่วนใหญ่เชื้อจุลชีพเหล่านี้มักจะอยู่ร่วมกันในรูปแบบของไบโอฟิล์ม ดังนั้นนอกจากการศึกษาคุณสมบัติในการต้านเชื้อในรูปแบบ planktonic แล้ว จำเป็นต้องศึกษาในรูปแบบขอบ biofilm เพิ่มเติมด้วย เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่เป็น planktonic เชื้อที่อยู่ในรูปแบบของ biofilm จะสามารถอยู่รอดในสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้ดีและทนต่อสารต้านเชื้อได้มากกว่า 10 – 1,000 เท่า(88) จึงเป็นที่มาในการศึกษาครั้งนี้

การทดสอบประสิทธิภาพในการต้าน biofilm ของการศึกษานี้ไม่สามารถใช้วิธี MTT assay ซึ่งเป็น metabolic assay ได้ เนื่องจากสารทดสอบ $AgNO_3$ และ Ag_2O+ NH_4F มีการตะกอนเป็นสีน้ำตาลจนถึงดำ เป็นเหตุให้รบกวนการดูดกลืนแสงของเครื่อง micro plate reader ทำให้การวัดความมีชีวิตของเชื้อจุลชีพที่อยู่ในรูปแบบของ biofilm มีความคลาดเคลื่อนออกไป ดังนั้นจึงเปลี่ยนวิธีการอ่านผลการทดลองจากการใช้ MTT assay มาเป็นการนับจำนวนโคโลนีของเชื้อด้วยการทำ 10 fold serial dilution ของเชื้อจุลชีพ ซึ่งมีข้อดีคือ สามารถทำได้สะดวกในห้องทดลอง ไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์และสารเคมีที่มีความซับซ้อนและราคาแพง สามารถระบุได้ว่าเชื้อมีการปนเปื้อนหรือไม่ และสามารถดูปริมาณเชื้อที่ถูกยับยั้งเมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารทดสอบ ซึ่งในปัจจุบันยังมีหลาย ๆ การศึกษาที่ยังกล่าวถึงและใช้วิธีนี้อยู่โดยเฉพาะการศึกษาที่ต้องการทราบจำนวนเซลล์หรือจำนวนเชื้อที่สนใจ(89)

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการสร้างและทำลายไบโอฟิล์มได้ 100 % ของสารประกอบซิลเวอร์ทั้งสามชนิด พบว่าสารทดสอบทุกชนิดสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อทดสอบได้ แต่ในการทดสอบการทำลายไบโอฟิล์ม ของเชื้อ *E. faecalis* และ *A. actinomycetemcomitans* พบว่าสาร Ag complex นั้นไม่สามารถหาค่าได้เนื่องจากความเข้มข้นของสารที่เตรียมมาไม่มากเพียงพอ แต่เมื่อดูแนวโน้มจากเชื้อและสารทดสอบตัวอื่น สามารถบอกได้ว่า

ความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มนั้นน้อยกว่าความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อทดสอบ โดยกลไกการออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อโดยเฉพาะเชื้อที่อยู่ในสภาวะไบโอฟิล์มของสารประกอบซิลเวอร์นั้นขึ้นกับความสามารถในการ แตกตัวให้ Ag^{+} โดยอิออนของซิลเวอร์จะจับกับเซลล์และส่วนของ Extracellular Polymeric Substance (EPS) ที่สร้างจากเชื้อจุลชีพขณะก่อตัวขึ้นเป็นไบโอฟิล์ม จากนั้น Ag^{+} จะเข้าไปขัดขวางแรงที่ใช้จับกันของโมเลกุลที่อยู่ในไบโอฟิล์มทำให้ไบโอฟิล์มเกิดการแตกตัวและถูกทำลายในที่สุด[(90)]

การหาค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มีวิธีการหลายแบบ เช่น Enzyme leakage assays, Membrane impermeable dyes, Amine-reactive dyes (used in live:dead cell assays) และ Dye combination live:dead cell assays ในการศึกษานี้เลือกใช้วิธีการหาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เพื่อคำนวณหาค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี Membrane impermeable dyes: Tryphan blue staining ซึ่งเป็นการทดสอบการรั่วของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยเมื่อเซลล์ตาย เยื่อหุ้มเซลล์จะเสียคุณสมบัติการเป็นเยื่อเลือกผ่านทำให้สารต่างๆ ผ่านเข้าออกเซลล์ได้โดยสะดวก ดังนั้นสีของ trypan blue จะเข้าไปย้อมเซลล์ที่ตายแล้วให้ติดสีฟ้า ส่วนเซลล์ที่ยังมีชีวิตจะไม่ติดสี เมื่อมอง Hemocytometer ผ่านกล้องจุลทรรศน์เห็นเป็นสีเทาจางๆ หรือสีปกติของเซลล์ชนิดนั้นๆ[(91)] ข้อดีของวิธีนี้คือ สามารถทำได้ง่าย ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือหรือสารเคมีที่มีความซับซ้อน เหมาะกับการอ่านผลการทดสอบสารที่มีสีหรือมีการตกตะกอนของสารซึ่งทำให้การอ่านผลด้วย MTT assay เกิดความคลาดเคลื่อน

ผลการศึกษาความเป็นพิษของสารประกอบซิลเวอร์ ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์เยื่อบุช่องปากมนุษย์ H357 พบว่าสารประกอบซิลเวอร์ทุกชนิด มีความเป็นพิษต่อเซลล์ เมื่อเวลาผ่านไปเพียง 30 นาที cell viability ลดลงเกิน 10% แต่พบการอยู่รอดของเซลล์เกือบถึง 50% ในสาร Ag complex ที่ความเข้มข้น 0.0475 และ 0.023 ppm ที่เวลา 15 นาที ในขณะที่สาร Ag_2O+ NH_4F และ $AgNO_3$ ยังคงมี cell viability ลดลงเกิน 10% เช่นเดิม ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Reise และคณะในปี 2016 ที่ทำการศึกษาความเป็นพิษของสารต่อเซลล์ gingival fibroblast โดยเปรียบเทียบระหว่าง $AgNo_3$ และ Ag carbohydrate complex พบว่าสาร Ag complex 3 มีความเป็นพิษน้อยกว่า $AgNO_3$ 10 เท่า และ Ag carbohydrate complex free ligan 1 นั้นไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์เลย[(19)]

การวิเคราะห์ผลแบบสามมิติด้วยเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร หรือไมโครซีที (MicroCT) เป็นเทคนิคในการศึกษาเนื้อเยื่อแข็งที่นิยมใช้ในการศึกษาทางด้านทันตกรรม โดยข้อดีของการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ คือ ไม่จำเป็นต้องทำลายชิ้นงานทดสอบ และลดการสูญเสียเนื้อเยื่อบางส่วนไประหว่างการตัดชิ้นงานเมื่อนำไปวิเคราะห์ผล อีกทั้งยังสามารถสังเกตการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างและองค์ประกอบภายในชิ้นงานเดียวกันได้อย่างต่อเนื่อง ความหนาของ

สไลด์ (slice thickness) มีความคงที่[79] สามารถให้ผลการทดสอบในรูปสามมิติและแสดงปริมาณออกมาเป็นตัวเลขได้ ประการสุดท้ายคือ สามารถคำนวณค่าสัมประสิทธิ์การลดทอนเชิงเส้น (linear attenuation coefficients: LAC) ของแร่ธาตุในเนื้อเยื่อได้อย่างแม่นยำ แต่อย่างไรก็ตามการประมวลผลข้อมูลจำนวนมากจะทำให้กระบวนการทั้งหมดเป็นเรื่องที่ยากและเสียเวลา[80,92,93] อีกทั้งจำเป็นต้องออกแบบการจับยึดชิ้นงานเพื่อให้วิเคราะห์ผลได้ในตำแหน่งเดิมทุกครั้ง

ในการศึกษานี้ใช้ค่าสัมประสิทธิ์การลดทอนเชิงเส้น (LAC) ในการหาปริมาณแร่ธาตุบนชิ้นเนื้อฟันโดยค่า LAC นั้นได้มาจากความเข้มของลำรังสีซึ่งมีพลังงานลดลงเมื่อผ่านวัสดุที่ใช้ทดสอบ ค่า LAC น้อยแสดงถึงวัสดุที่ใช้ทดสอบมีลักษณะโปร่งใส (transparent) ยอมให้ลำรังสีผ่านได้ง่าย แต่เมื่อค่า LAC เพิ่มขึ้นหมายถึงวัสดุทดสอบมีระดับลักษณะทึบเพิ่มขึ้น[80] ตามปกติเนื้อฟันจะมีสารอินทรีย์โดยเฉพาะคอลลาเจนเป็นส่วนประกอบประมาณ 35% โดยน้ำหนัก โดยคอลลาเจนในเนื้อฟันจะทำให้มีการลดทอนค่าสัมประสิทธิ์เชิงเส้นของรังสีลงประมาณ 5% เมื่อใช้พลังงานรังสี 25 กิโลอิเล็กตรอน แต่ค่าดังกล่าวสามารถแปรผันได้ตามสัดส่วนความหนาแน่นของแร่ธาตุในชิ้นเนื้อฟันนั้น ๆ เนื่องจากฟันแต่ละซี่ แต่ละช่วงอายุ มีการสะสมปริมาณแร่ธาตุที่แตกต่างกัน [94] จากผลการศึกษาพบว่าค่า LAC เฉลี่ยของชิ้นเนื้อฟันก่อนทำการทดสอบอยู่ในช่วง 3.1 ± 0.1 ถึง 3.3 ± 0.4 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการศึกษาของ Zhi และคณะในปี 2013 ที่ทำการทดสอบหาค่า LAC ของเนื้อฟันก่อนทดสอบได้ 3.58 ± 0.12 [95] การจำลองการเกิดรอยผุ หรือกระบวนการละลายแร่ธาตุ (demineralization) สามารถทำได้หลายวิธี บางการศึกษาใช้กรดอนินทรีย์เพื่อทำให้เกิดการละลายแร่ธาตุ จำลองการเกิดรอยโรคฟันผุ[33,95] แต่ในการศึกษานี้จำลองการเกิดรอยผุโดยแช่ชิ้นเนื้อฟันทดสอบในสารละลายเชื้อ *Streptococcus mutans* ซึ่งรอยโรคฟันผุจะเกิดจากกรดของเชื้อจุลชีพซึ่งเป็นกรดอินทรีย์ ทำให้รอยโรคมีลักษณะใกล้เคียงกับการเกิดฟันผุภายในช่องปาก เหมือนกับการศึกษาของ Knight และคณะในปี 2005 และปี 2007 ที่จำลองการเกิดฟันผุโดยใช้เชื้อ *Streptococcus mutans* ในการทดลองเช่นกัน[75,95]

เมื่อพิจารณาค่า LAC ก่อนทาสารทดสอบ (pre-test) เปรียบเทียบกับหลังจากทาสารทดสอบ (post-test) พบว่าสาร Ag complex และ $AgNO_3$ ไม่สามารถส่งเสริมการคืนกลับแร่ธาตุในรอยโรคฟันผุบนชิ้นเนื้อฟันได้ โดยสาร Ag complex นั้นยังพบว่ามีการละลายแร่ธาตุของชิ้นเนื้อฟันทดสอบหลังทาสารอยู่อย่างต่อเนื่อง แต่ในอัตราที่น้อยกว่ากลุ่มควบคุม (No treatment) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่สาร $AgNO_3$ นั้นถึงแม้ว่าไม่สามารถทำให้เกิดการคืนกลับของแร่ธาตุ แต่สามารถยับยั้งไม่เกิดการละลายแร่ธาตุออกจากเนื้อฟันได้ ใกล้เคียงกับการศึกษาของ Duffin ปี 2012 ซึ่งศึกษาการทา $AgNO_3$ บนรอยโรคฟันผุที่ไม่ทะลุโพรงประสาทฟันในเด็ก 5000 คน พบว่าสาร $AgNO_3$ สามารถยับยั้งรอยฟันผุไม่ให้ลุกลามเพิ่มขึ้นได้เกือบทั้งหมด โดยใช้ความ

เข้มข้นของสาร $AgNO_3$ ที่ 25%[30] แต่การศึกษานี้ใช้ความเข้มข้นที่ 0.63% ซึ่งน้อยกว่าเกือบสี่สิบเท่า แต่ยังสามารถยับยั้งการละลายแร่ธาตุของชิ้นเนื้อฟันในห้องปฏิบัติการได้

การทดสอบการยับยั้งฟันผุของสารประกอบซิลเวอร์ในการศึกษานี้ไม่ได้จำลองให้เกิดการคืนกลับของแร่ธาตุจากสิ่งแวดล้อมรอบตัวฟันเหมือนกับในช่องปากจริง ซึ่งภายในช่องปากจริงจะมีแร่ธาตุจากน้ำลาย ฟลูออไรด์จากยาสีฟัน หรือสารอื่น ๆ มาช่วยให้มีการคืนกลับของแร่ธาตุ ดังนั้นความแตกต่างของค่า LAC หลังทดสอบ (post-test) ของแต่ละกลุ่ม จึงเกิดจากปฏิกิริยาของสารกับรอยผุบนเนื้อฟัน โดยในกลุ่มที่ได้รับการทาสาร Ag_2O+ NH_4F ซึ่งมีฟลูออไรด์เป็นส่วนประกอบ จึงมีการคืนกลับแร่ธาตุได้มากกว่า ทำให้ค่า LAC ที่วัดได้หลังทดสอบ (post-test) มีค่าเพิ่มขึ้นมากกว่า ก่อนทดสอบ (pre-test) แตกต่างจากกลุ่มทดสอบAg complex, $AgNO_3$ และกลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

การเกิดปฏิกิริยาของสารประกอบซิลเวอร์กับรอยโรคฟันผุ สามารถเทียบเคียงกับสมการที่ได้จากการทาสารSDF คือ $Ag(NH_3)_2F + Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 \rightarrow Ag_3PO_4 + CaF_2 + NH_3(H_2O)$ ซึ่งการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า CaF_2 ที่เกิดขึ้นจะเป็นแหล่งที่เก็บฟลูออไรด์ และเป็นสารตั้งต้นในปฏิกิริยาปรับเปลี่ยนไฮดรอกซีอะพาไทท์ให้เป็นฟลูออโรอะพาไทท์ ซึ่งเป็นสารประกอบที่สามารถทนต่อสภาวะที่เป็นกรดได้ดี[4,97,98] จากการศึกษา Mei และคณะในปี 2013ได้อธิบายว่าเมื่อสาร $AgNO_3$ ทำปฏิกิริยากับไฮดรอกซี่อะพาไทต์จะเกิดแคลเซียมไดไนเตรต ($Ca(NO_3)_2$ ซึ่งสามารถละลายน้ำได้ ทำให้เนื้อฟันสูญเสียแคลเซียมมากขึ้น[99] ดังนั้นจากการศึกษาของ Duffin ในปี 2012 และZhao และคณะในปี 2017 จึงได้แนะนำภายหลังการทา $AgNO_3$ ให้ทาโซเดียมฟลูออไรด์(NaF) ตามมา เพื่อให้ฟลูออไรด์ไปจับกับแคลเซียมเกิดเป็น CaF_2 เหมือนในสมการที่เกิดหลังการทาสาร SDF ซึ่งจะเป็นแหล่งเก็บสะสมและปล่อยฟลูออไรด์ให้เนื้อฟัน[30,100]

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสีฟันหลังทาสารทดสอบเมื่อเวลาผ่านไป 1, 7 และ 14 วันพบว่า เนื้อฟันในกลุ่ม Ag_2O+ NH_4F และ $AgNO_3$ มีการเปลี่ยนสีไปเป็นสีดำเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า แต่สาร Ag complex พบว่าไม่มีการเปลี่ยนสีเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (No treatment) สอดคล้องกับการใช้เครื่อง Spectrophotometer วัดค่าเฉลี่ยสะสมการเปลี่ยนสีของเนื้อฟันพบว่าสาร Ag_2O+ NH_4F และ $AgNO_3$ ทำให้เนื้อฟันเปลี่ยนสีได้มากที่สุด มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่สาร Ag complex นั้นไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยสารที่ทำให้เนื้อฟันเปลี่ยนเป็นสีดำคือ Ag_3PO_4 ที่ได้จากสมการ $Ag(NH_3)2F + Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 \rightarrow Ag_3PO_4 + CaF_2 + NH_3(H_2O)$ โดย Ag_3PO_4 ที่เกิดขึ้นจะไม่สามารถละลายน้ำได้จึงตกตะกอนลงบนผิวฟัน โดยสีของ Ag_3PO_4 จะเป็นสีเหลืองในระยะแรกและจะเปลี่ยนเป็นสีดำเมื่อโดนแสง และสามารถทำปฏิกิริยากับออกซิเจนในอากาศเกิดเป็นปฏิกิริยา

ออกซิเดชั่น ดังนั้นบริเวณที่ทาสารประกอบซิลเวอร์จึงมีสีดำ[24] สันนิษฐานได้ว่าสาร Ag_2O+ NH_4F และ $AgNO_3$ ทำปฏิกิริยากับเนื้อฟันและรอยโรคฟันผุ ทำให้เกิดสาร Ag_3PO_4 ได้ ในขณะที่สาร Ag complex อาจมีสมการทางเคมีที่แตกต่างออกไปคือไม่เกิดสาร Ag_3PO_4 เนื้อฟันหลังทาสารจึงไม่เปลี่ยนเป็นสีดำ หรือในอีกแง่หนึ่งคือความเข้มข้นของซิลเวอร์ในสาร Ag complex (100 ppm) มีความแตกต่างจากสาร Ag_2O+ NH_4F (12700 ppm) และ $AgNO_3$ (6350 ppm) หลายเท่า ดังนั้นปริมาณ Ag_3PO_4 ที่เกิดขึ้นจึงมีน้อยจนไม่เห็นการเปลี่ยนแปลงของสีบนเนื้อฟันทั้งการมองด้วยตาเปล่าและภายใต้การวัดโดยใช้เครื่อง Spectrophotometer

บทที่ 5

บทสรุป และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

ภายใต้ข้อจำกัดของการศึกษา สรุปผลได้ว่า

1. ความสามารถในการต้านเชื้อจุลชีพของสารประกอบซิลเวอร์ชนิดต่าง ๆ ต่อเชื้อจุลชีพในช่องปากในสภาวะแพลงโทนิกและไบโอฟิล์มพบว่าสาร Ag_2O + NH_4F และ $AgNO_3$ มีความสามารถในการต้านเชื้อทดสอบได้ทั้งห้าชนิด ในขณะที่สาร Ag complex ไม่สามารถฆ่าเชื้อจุลชีพในสภาวะแพงโทนิก ไม่สามารถยับยั้งและทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อ *E. faecalis* และ *Actinomycosis actinomycetemcomitans* ได้
2. ผลความเป็นพิษของสารประกอบซิลเวอร์ชนิดต่าง ๆ ต่อเซลล์เยื่อบุช่องปากมนุษย์ (Keratinocyte cell line: H357) พบว่าสาร Ag_2O + NH_4F และ $AgNO_3$ ทุกความเข้มข้น มีความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับร้อยละ 100 แต่สาร Ag complex ที่ความเข้มข้น 0.0475 และ 0.023ppm มีความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับร้อยละ 47.08 และร้อยละ 24.58 ตามลำดับ
3. ผลของสารประกอบซิลเวอร์ชนิดต่าง ๆ ต่อการยับยั้งฟันผุในแบบจำลองฟัน พบว่าสาร Ag_2O+ NH_4F สามารถหยุดยั้งฟันผุร่วมกับเหนี่ยวนำให้เกิดการคืนกลับแร่ธาตุได้ ส่วนสาร $AgNO_3$ สามารถหยุดยั้งฟันผุแต่ไม่สามารถส่งเสริมการคืนกลับแร่ธาตุ ในขณะที่สาร Ag complex สามารถหยุดยั้งการลุกลามของรอยผุได้น้อย แต่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม (No treatment) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)
4. การเปลี่ยนสีของเนื้อฟันหลังทาสารทดสอบเมื่อเวลาผ่านไป 1,7 และ 14 วันพบว่าสีจะมีอัตราการเปลี่ยนแปลงมากที่สุดภายใน 7 วันหลังทาสารประกอบซิลเวอร์ โดยสาร Ag_2O+ NH_4F มีค่าเฉลี่ยสะสมการเปลี่ยนสีมากที่สุด รองลงมาคือสาร $AgNO_3$ ซึ่งทั้งสองสารมีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม (No treatment) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนสาร Ag complex นั้นมีค่าเฉลี่ยสะสมการเปลี่ยนสีน้อยที่สุด เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p< 0.05$)

ข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้เป็นการศึกษาในห้องปฏิบัติการเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารประกอบซิลเวอร์ ชนิดต่าง ๆ เพื่อนำมาใช้ทดแทนสารซิลเวอร์ไดเอมีนฟลูออไรด์ ซึ่งสารประกอบซิลเวอร์ชนิดต่าง ๆ ที่นำมาศึกษานั้นสามารถผลิตและสังเคราะห์ได้ภายในประเทศ ผลจากการศึกษาที่น่าสนใจคือ สาร Ag_2O+ NH_4F และ $AgNO_3$ สามารถหยุดยั้งฟันผุในแบบจำลองฟันได้ ซึ่งมีประโยชน์เนื่องจากความเข้มข้นของ $AgNO_3$ที่ใช้โดยทั่วไปมีความเข้มข้นที่ 25% แต่ในการทดลองใช้ที่ 0.635% ส่วนสาร Ag complex นั้นยังไม่ทราบสมการการเกิดปฏิกิริยาที่แน่ชัด แต่จุดเด่นสำคัญของสารคือ ไม่ทำให้เนื้อฟันเกิดการเปลี่ยนสี แต่สามารถหยุดยั้งการลุกลามของรอยโรคฟันผุในแบบจำลองฟันได้น้อยกว่าสาร $AgNO_3$ และ Ag_2O+ NH_4F ซึ่งถ้าหากปฏิกิริยาของสารไม่ทำให้เนื้อฟันเกิดการเปลี่ยนสีได้จริง อาจจะต้องเพิ่มความเข้มข้นของสารให้มากขึ้นเพื่อทำให้เกิดการหยุดยั้งฟันผุ จากปริมาณซิลเวอร์ที่เพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้การศึกษาความเป็นพิษของสารต่อเซลล์เยื่อบุภายในช่องปาก H357 นั้นเป็นการทดสอบโดยให้สารสัมผัสกับเซลล์โดยตรง ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ได้มากกว่าสภาวะความเป็นจริง แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้สามารถนำองค์ความรู้มาเป็นพื้นฐานในการศึกษาเพื่อพัฒนามาใช้ในผู้ป่วยจริงได้ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. ***J Clin Microbiol***. 2005 Nov 1; 43(11): 5721–32.
2. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner ACR, Yu W-H, et al. The Human Oral Microbiome. ***J Bacteriol***. 2010 Oct 1; 192(19): 5002–17.
3. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. ***J Bacteriol***. 2001 Jun; 183(12): 3770–83.
4. Featherstone J. Dental caries: a dynamic disease process. ***Aust Dent J***. 2008 Sep; 53(3): 286–91.
5. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. ***The Lancet***. 2007 Jan; 369(9555): 51–9.
6. Loesche WJ. Microbiology of Dental Decay and Periodontal Disease. In: Baron S, editor. ***Medical Microbiology*** [Internet]. 4th ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996 [cited 2017 Feb 26].
7. Dzink JL, Socransky SS, Haffajee AD. The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. ***J Clin Periodontol***. 1988 May; 15(5): 316–23.
8. Sweet SP. Selection and pathogenicity of Candida albicans in HIV infection. ***Oral Dis***. 1997 May; 3 Suppl 1: S88-95.
9. Marsh P, Martin M. Oral microbiology. 5th ed. Edinburgh ; New York: ***Elsevier***; 2009. 222 p.
10. Williams D, Lewis M. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. ***J Oral Microbiol***. 2011 Jan;3(1): 5771.
11. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. ***Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod***. 1998 Jan; 85(1): 86–93.
12. 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.

13. Rocas I, Siqueirajr J, Santos K. Association of Enterococcus faecalis With Different Forms of Periradicular Diseases. ***J Endod***. 2004 May; 30(5): 315–20.
14. 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.
15. 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.
16. Clement JL, Jarrett PS. Antibacterial Silver. ***Met-Based Drugs***. 1994; 1(5–6): 467–82.
17. 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.
18. The MIC and MBC of Silver Nanoparticles against Enterococcus faecalis - A Facultative Anaerobe. ***J Nanomedicine Nanotechnol*** [Internet]. 2015
19. Reise M, Gottschaldt M, Matz C, Völpel A, Jandt KD, Schubert US, et al. Antibacterial effect of silver (I) carbohydrate complexes on oral pathogenic key species in vitro. ***BMC Oral Health*** [Internet]. 2016 Dec [cited 2017 Feb 26]; 16(1).
20. Atiyeh BS, Costagliola M, Hayek SN, Dibo SA. Effect of silver on burn wound infection control and healing: Review of the literature. ***Burns***. 2007 Mar; 33(2): 139–48.
21. Kalinowska-Lis U, Felczak A, Chęcińska L, Szabłowska-Gadomska I, Patyna E, Małecki M, et al. Antibacterial Activity and Cytotoxicity of Silver(I) Complexes of Pyridine and (Benz)Imidazole Derivatives. X-ray Crystal Structure of [Ag (2,6-di(CH_2OH)py)$_2$]NO_3. ***Molecules***. 2016 Jan 28; 21(2): 87.
22. Alexander JW. History of the medical use of silver. ***Surg Infect***. 2009 Jun; 10(3): 289–92.
23. Zander HA, Burrill DY. The Penetration of Silver Nitrate Solution into Dentin. ***J Dent Res***. 1943 Apr 1; 22(2): 85–9.
24. Rosenblatt A, Stamford TCM, Niederman R. Silver Diamine Fluoride: A Caries "Silver-Fluoride Bullet." ***J Dent Res***. 2009 Feb 1; 88(2): 116–25.
25. Crystal YO, Niederman R. Silver Diamine Fluoride Treatment Considerations in Children's Caries Management. ***Pediatr Dent***. 2016 Nov 15; 38(7): 466–71.
26. Chen JY. Prophylaxis of ophthalmia neonatorum: comparison of silver nitrate, tetracycline, erythromycin and no prophylaxis. ***Pediatr Infect Dis J***. 1992 Dec; 11(12): 1026–30.

27. Aminov RI. A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future. ***Front Microbiol*** [Internet]. 2010 [cited 2017 Mar 12]; 1.

28. 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.

29. Klein U, Kanellis MJ, Drake D. Effects of four anticaries agents on lesion depth progression in an in vitro caries model. ***Pediatr Dent***. 1999 Jun; 21(3): 176–80.

30. Duffin S. Back to the future: the medical management of caries introduction. ***J Calif Dent Assoc***. 2012 Nov; 40(11): 852–8.

31. Rabinowitch BZ. Ammoniacal silver nitrate: a study of its value in operative dentistry today. ***J Dent Child***. 1951; 18(2): 22–30.

32. Englander HR, James VE, Massler M. Histologic effects of silver nitrate of human dentin and pulp. ***J Am Dent Assoc***. 1958 Nov; 57(5): 621–30.

33. Mei ML, Li QL, Chu CH, Yiu CKY, Lo ECM. The inhibitory effects of silver diamine fluoride at different concentrations on matrix metalloproteinases. ***Dent Mater***. 2012 Aug; 28(8): 903–8.

34. Mei ML, Chu CH, Lo ECM, Samaranayake LP. Fluoride and silver concentrations of silver diammine fluoride solutions for dental use. ***Int J Paediatr Dent***. 2013 Jul; 23(4): 279–85.

35. Seltzer S. Effective Duration of Some Agents Used for Dentin Sterilization. ***J Dent Res***. 1942 Apr 1; 21(2): 115–23.

36. Horst JA, Ellenikiotis H, Milgrom PL. UCSF Protocol for Caries Arrest Using Silver Diamine Fluoride: Rationale, Indications and Consent. ***J Calif Dent Assoc***. 2016 Jan; 44(1): 16–28.

37. Chu CH, Lo ECM. Promoting caries arrest in children with silver diamine fluoride: a review. ***Oral Health Prev Dent***. 2008; 6(4): 315–21.

38. Mei ML, Lo EC-M, Chu C-H. Clinical Use of Silver Diamine Fluoride in Dental Treatment. ***Compend Contin Educ Dent Jamesburg NJ***. 2016 Feb; 37(2): 93–98.

39. Featherstone JDB. The continuum of dental caries--evidence for a dynamic disease process. ***J Dent Res***. 2004; 83 Spec No C: C39-42.

40. Chu CH, Lo ECM. Microhardness of dentine in primary teeth after topical fluoride applications. ***J Dent***. 2008 Jun; 36(6): 387–91.

41. Hamama H, Yiu C, Burrow M. Effect of silver diamine fluoride and potassium iodide on residual bacteria in dentinal tubules. ***Aust Dent J***. 2015 Mar; 60(1): 80–7.

42. Yamaga R, Nishino M, Yoshida S, Yokomizo I. Diammine silver fluoride and its clinical application. ***J Osaka Univ Dent Sch***. 1972 Sep; 12: 1–20.

43. HT Fung M. Arresting Early Childhood Caries with Silver Diamine Fluoride-A Literature Review. ***J Oral Hyg Health*** [Internet]. 2013 [cited 2017 Mar 5]; 01(03).

44. 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.

45. Youravong N, Carlen A, Teanpaisan R, Dahlén G. Metal-ion susceptibility of oral bacterial species. ***Lett Appl Microbiol.*** 2011 Sep; 53(3): 324–8.

46. Chu CH, Lo ECM, Lin HC. Effectiveness of Silver Diamine Fluoride and Sodium Fluoride Varnish in Arresting Dentin Caries in Chinese Pre-school Children. ***J Dent Res***. 2002 Nov; 81(11): 767–70.

47. Zhi QH, Lo ECM, Lin HC. Randomized clinical trial on effectiveness of silver diamine fluoride and glass ionomer in arresting dentine caries in preschool children. ***J Dent***. 2012 Nov; 40(11): 962–7.

48. dos Santos VE, de Vasconcelos FMN, Ribeiro AG, Rosenblatt A. Paradigm shift in the effective treatment of caries in schoolchildren at risk: Paradigm shift for treatment of caries. ***Int Dent J***. 2012 Feb; 62(1): 47–51.

49. Zhang W, McGrath C, Lo ECM, Li JY. Silver Diamine Fluoride and Education to Prevent and Arrest Root Caries among Community-Dwelling Elders. ***Caries Res***. 2013; 47(4): 284–90.

50. Vasquez E, Zegarra G, Chirinos E, Castillo JL, Taves DR, Watson GE, et al. Short term serum pharmacokinetics of diammine silver fluoride after oral application. ***BMC Oral Health*** . 2004 Jan 1; 15(1): 4–12.

52. Zambon JJ. Actinobacillus actinomycetemcomitans in human periodontal disease. ***J Clin Periodontol***. 1985 Jan; 12(1): 1–20.

53. Mandell RL, Socransky SS. A Selective Medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and the Incidence of the Organism in Juvenile Periodontitis. ***J Periodontol***. 1981 Oct; 52(10): 593–8.
54. Shahabuddin N. Trends in Susceptibility to Aggressive Periodontal Disease. ***Int J Dent Oral Health*** [Internet]. 2016 [cited 2017 Mar 12]; 2(4).
55. Welbury R, Duggal MS, Hosey MT, editors. ***Paediatric dentistry***. 3rd ed. Oxford ; New York: Oxford University Press; 2005. 443 p. (Oxford medical publications).
56. Slots J. The predominant cultivable organisms in juvenile periodontitis. ***Scand J Dent Res***. 1976 Jan; 84(1): 1–10.
57. Albandar JM, Rams TE. Risk factors for periodontitis in children and young persons. ***Periodontal***. 2002; 29: 207–22.
58. Rams TE, Keyes PH, Wright WE. Treatment of juvenile periodontitis with microbiologically modulated periodontal therapy (Keyes technique). ***Pediatr Dent***. 1985 Dec; 7(4): 259–70.
59. de Graaff J, Winkelhoff AJ, Goene RJ. The role of Actinobacillus actinomycetemcomitans in periodontal disease. ***Infection***. 1989 Jul; 17(4): 269–71.
60. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. ***The Lancet***. 2005 Nov; 366(9499): 1809–20.
61. Lovegrove JM. Dental plaque revisited: bacteria associated with periodontal disease. ***J N Z Soc Periodontol***. 2004; (87): 7–21.
62. Page RC, Engel LD, Narayanan AS, Clagett JA. Chronic inflammatory gingival and periodontal disease. ***JAMA***. 1978 Aug 11; 240(6): 545–50.
63. Brook I. Microbiology and management of periodontal infections. ***Gen Dent***. 2003 Oct; 51(5): 424–8.
64. Rossie K, Guggenheimer J. Oral candidiasis: clinical manifestations, diagnosis, and treatment. ***Pract Periodontics Aesthetic Dent PPAD***. 1997 Aug; 9(6): 635–641; quiz 642.
65. 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.
66. Waltimo T, Orstavik D, Siren E, Haapasalo M. In Vitro Yeast Infection of Human Dentin. ***J Endod***. 2000 Apr; 26(4): 207–9.

67. 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.
68. รวี เถียรไพศาล, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, ภาควิชาโอษฐวิทยา. แบคทีเรียและโรคติดเชื้อที่พบบ่อยในช่องปาก = Bacteria and common infectious diseases in the oral cavity. สงขลา: ภาควิชาโอษฐวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์; 2009.
69. Love RM. Enterococcus faecalis--a mechanism for its role in endodontic failure. ***Int Endod J***. 2001 Jul; 34(5): 399–405.
70. 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.
71. Schäfer E, Bössmann K. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine and two calcium hydroxide formulations against Enterococcus faecalis. ***J Endod***. 2005 Jan; 31(1): 53–6.
72. Distel J, Hatton J, Gillespie M. Biofilm Formation in Medicated Root Canals. ***J Endod***. 2002 Oct; 28(10): 689–93.
73. Zero DT. In Situ Caries Models. ***Adv Dent Res***. 1995 Nov; 9(3): 214–30.
74. Clarkson BH, Wefel JS, Miller I. A Model for Producing Caries-like Lesions in Enamel and Dentin Using Oral Bacteria in vitro. ***J Dent Res***. 1984 Oct 1; 63(10): 1186–9.
75. Knight GM, McIntyre JM, Craig GG, Mulyani null, Zilm PS, Gully NJ. An in vitro model to measure the effect of a silver fluoride and potassium iodide treatment on the permeability of demineralized dentine to Streptococcus mutans. ***Aust Dent J***. 2005 Dec; 50(4): 242–5.
76. Mei M, Li Q, Chu C-H, Lo EC-M, Samaranayake L. Antibacterial effects of silver diamine fluoride on multi-species cariogenic biofilm on caries. ***Ann Clin Microbiol Antimicrob***. 2013; 12(1): 4.
77. Thylstrup A, Bruun C, Holmen L. In Vivo Caries Models-Mechanisms for Caries Initiation and Arrestment. ***Adv Dent Res***. 1994 Jul; 8(2): 144–57.
78. Altenburger MJ, Schirrmeister JF, Lussi A, Klasser M, Hellwig E. *In situ* fluoride retention and remineralization of incipient carious lesions after the application of different concentrations of fluoride. ***Eur J Oral Sci***. 2009 Feb; 117(1):58–63.
79. Swain MV, Xue J. State of the Art of Micro-CT Applications in Dental Research. ***Int J Oral Sci***. 2009 Dec; 1(4): 177–88.

80. Lo ECM, Zhi QH, Itthagarun A. Comparing two quantitative methods for studying remineralization of artificial caries. ***J Dent***. 2010 Apr; 38(4): 352–9.
81. Soviero VM, Leal SC, Silva RC, Azevedo RB. Validity of MicroCT for in vitro detection of proximal carious lesions in primary molars. ***J Dent***. 2012 Jan; 40(1): 35–40.
82. van der Burgt TP, ten Bosch JJ, Borsboom PCF, Kortsmit WJPM. A comparison of new and conventional methods for quantification of tooth color. ***J Prosthet Dent***. 1990 Feb; 63(2): 155–62.
83. Tung FF, Goldstein GR, Jang S, Hittelman E. The repeatability of an intraoral dental colorimeter. ***J Prosthet Dent***. 2002 Dec; 88(6): 585–90.
84. Bonev B, Hooper J, Parisot J. Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method. ***J Antimicrob Chemother***. 2008 Mar 13; 61(6): 1295–301.
85. Mei M-L, Chu C-H, Low K-H, Che C-M, Lo E-C-M. Caries arresting effect of silver diamine fluoride on dentine carious lesion with S. mutans and L. acidophilus dual-species cariogenic biofilm. ***Med Oral Patol Oral Cirugia Bucal***. 2013 Nov 1; 18(6): e824-831.
86. Chu CH, Mei L, Seneviratne CJ, Lo ECM. Effects of silver diamine fluoride on dentine carious lesions induced by Streptococcus mutans and Actinomyces naeslundii biofilms. ***Int J Paediatr Dent***. 2012 Jan; 22(1): 2–10.
87. Scarpelli BB, Punhagui MF, Hoeppner MG, Almeida RSC de, Juliani FA, Guiraldo RD, et al. In Vitro Evaluation of the Remineralizing Potential and Antimicrobial Activity of a Cariostatic Agent with Silver Nanoparticles. ***Braz Dent J***. 2017 Dec; 28(6): 738–43.
88. Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG, Read RR. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. ***Can J Vet Res Rev Can Rech Veterinaire***. 2002 Apr; 66(2): 86–92.
89. Thomas P, Sekhar AC, Upreti R, Mujawar MM, Pasha SS. Optimization of single plate-serial dilution spotting (SP-SDS) with sample anchoring as an assured method for bacterial and yeast cfu enumeration and single colony isolation from diverse samples. ***Biotechnol Rep***. 2015 Dec; 8: 45–55.
90. Flemming H-C, Neu TR, Wozniak DJ. The EPS Matrix: The "House of Biofilm Cells." ***J Bacteriol***. 2007 Nov 15; 189(22): 7945–7.

91. Hackenberg S, Scherzed A, Kessler M, Hummel S, Technau A, Froelich K, et al. Silver nanoparticles: Evaluation of DNA damage, toxicity and functional impairment in human mesenchymal stem cells. ***Toxicol Lett***. 2011 Feb 25; 201(1): 27–33.

92. Engelke K, Graeff W, Meiss L, Hahn M, Delling G. High spatial resolution imaging of bone mineral using computed microtomography. Comparison with microradiography and undecalcified histologic sections. ***Invest Radiol***. 1993 Apr; 28(4): 341–9.

93. Efeoglu N, Wood D, Efeoglu C. Microcomputerised tomography evaluation of 10% carbamide peroxide applied to enamel. ***J Dent***. 2005 Aug; 33(7): 561–7.

94. Kinney JH, Marshall GW, Marshall SJ. Three-dimensional mapping of mineral densities in carious dentin: theory and method. ***Scanning Microsc***. 1994; 8(2): 197-204; discussion 204-205.

95. Zhi Q, Lo E, Kwok A. An *in vitro* study of silver and fluoride ions on remineralization of demineralized enamel and dentine. ***Aust Dent J***. 2013 Mar; 58(1): 50–6.

96. Knight GM, McIntyre JM, Craig GG, Mulyani null, Zilm PS, Gully NJ. Differences between normal and demineralized dentine pretreated with silver fluoride and potassium iodide after an in vitro challenge by Streptococcus mutans. ***Aust Dent J***. 2007 Mar; 52(1): 16–21.

97. González-Cabezas C. The Chemistry of Caries: Remineralization and Demineralization Events with Direct Clinical Relevance. ***Dent Clin North Am***. 2010 Jul; 54(3): 469–78.

98. Lou YL, Botelho MG, Darvell BW. Reaction of silver diamine fluoride with hydroxyapatite and protein. ***J Dent***. 2011 Sep; 39(9): 612–8.

99. Mei ML, Ito L, Cao Y, Li QL, Lo ECM, Chu CH. Inhibitory effect of silver diamine fluoride on dentine demineralisation and collagen degradation. ***J Dent***. 2013 Sep; 41(9): 809–17.

100. Zhao IS, Gao SS, Hiraishi N, Burrow MF, Duangthip D, Mei ML, et al. Mechanisms of silver diamine fluoride on arresting caries: a literature review. ***Int Dent J***. 2018 Apr; 68(2): 67–76.

ภาคผนวก

ภาคผนวก

ภาคผนวก 1

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. Saboraud's dextrose agar (SDA; KEMMAR)

ส่วนประกอบต่อลิตร

Dextrose	40	กรัม
Casein	10	กรัม
Agar	15	กรัม

วิธีเตรียม (สำหรับ Sabouard's dextrose agar commercial product)

a. ชั่งอาหารตามฉลากข้างบรรจุภัณฑ์ เติมน้ำกลั่นลงไปตามปริมาตรที่ต้องเตรียม จากนั้นปรับ pH ประมาณ 5.6 $\pm$ 0.2
b. นำเข้า autoclave ที่ 121°C ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที
c. รอให้เย็นที่ 45-50°C เทลงจากอาหารเลี้ยงเชื้อ รอให้อาหารแข็งตัวเก็บในตู้เย็น

** ควรทดสอบคุณภาพของอาหารว่าไม่มีการปนเปื้อนก่อนการใช้งาน

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

ส่วนประกอบต่อลิตร

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

สารเพิ่มเติม

Agar (Difo)	15	กรัม
Yeast Extract (Bacto)	5.0	กรัม

วิธีเตรียม (สำหรับ Brain Heart Infusion Agar commercial product)

a. ชั่งอาหารตามฉลากข้างบรรจุภัณฑ์และเติมวุ้นลงไปตามสัดส่วนที่กำหนด เติมน้ำกลั่นลงไปตามปริมาตรที่ต้องเตรียม จากนั้นปรับ pH ประมาณ 7.4 ± 0.2
b. นำเข้า autoclave ที่ 121°C ที่ความดัน 45 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที
c. รอให้เย็นที่ 45-50°C เทลงจากอาหารเลี้ยงเชื้อ รอให้อาหารแข็งตัวเก็บในตู้เย็น

** ควรทดสอบคุณภาพของอาหารว่าไม่มีการปนเปื้อนก่อนการใช้งาน

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

ส่วนประกอบต่อลิตร

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

วิธีเตรียม (สำหรับ Brain Heart Infusion Broth commercial product)

a. ชั่งอาหารตามฉลากข้างบรรจุภัณฑ์ เติมน้ำกลั่นลงไปตามปริมาตรที่ต้องเตรียม จากนั้นปรับ pH ประมาณ 7.4 ± 0.2
b. นำเข้า autoclave ที่ 121°C ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที
c. รอให้เย็นตัวลงแล้วเก็บในตู้เย็น

** ควรทดสอบคุณภาพของอาหารว่าไม่มีการปนเปื้อนก่อนการใช้งาน

4. Blood agar (BA)

ส่วนประกอบต่อลิตร

Heart Infusion	10	กรัม
Meat Peptone	10	กรัม
Sodium Chloride	5.0	กรัม
Agar	15	กรัม

วิธีเตรียม (สำหรับ Blood agar base commercial product)

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

** ควรทดสอบคุณภาพของอาหารว่าไม่มีการปนเปื้อนก่อนการใช้งาน

5. Saboraud's dextrose broth (SDB; Difco)

ส่วนประกอบต่อลิตร

Dextrose	40	กรัม
Casein	10	กรัม
Animal tissue	15	กรัม

วิธีเตรียม (สำหรับ Sabouard's dextrose broth commercial product)

a. ชั่งอาหารตามฉลากข้างบรรจุภัณฑ์ เติมน้ำกลั่นลงไปตามปริมาตรที่ต้องเตรียม จากนั้นปรับ pH ประมาณ 5.6 ± 0.2
b. นำเข้า autoclave ที่ 121°C ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที
c. รอให้อาหารเย็นตัวลงแล้วเก็บในตู้เย็น

** ควรทดสอบคุณภาพของอาหารว่าไม่มีการปนเปื้อนก่อนการใช้งาน

6. Phosphate buffer saline (PBS); pH 7.0

ส่วนประกอบ

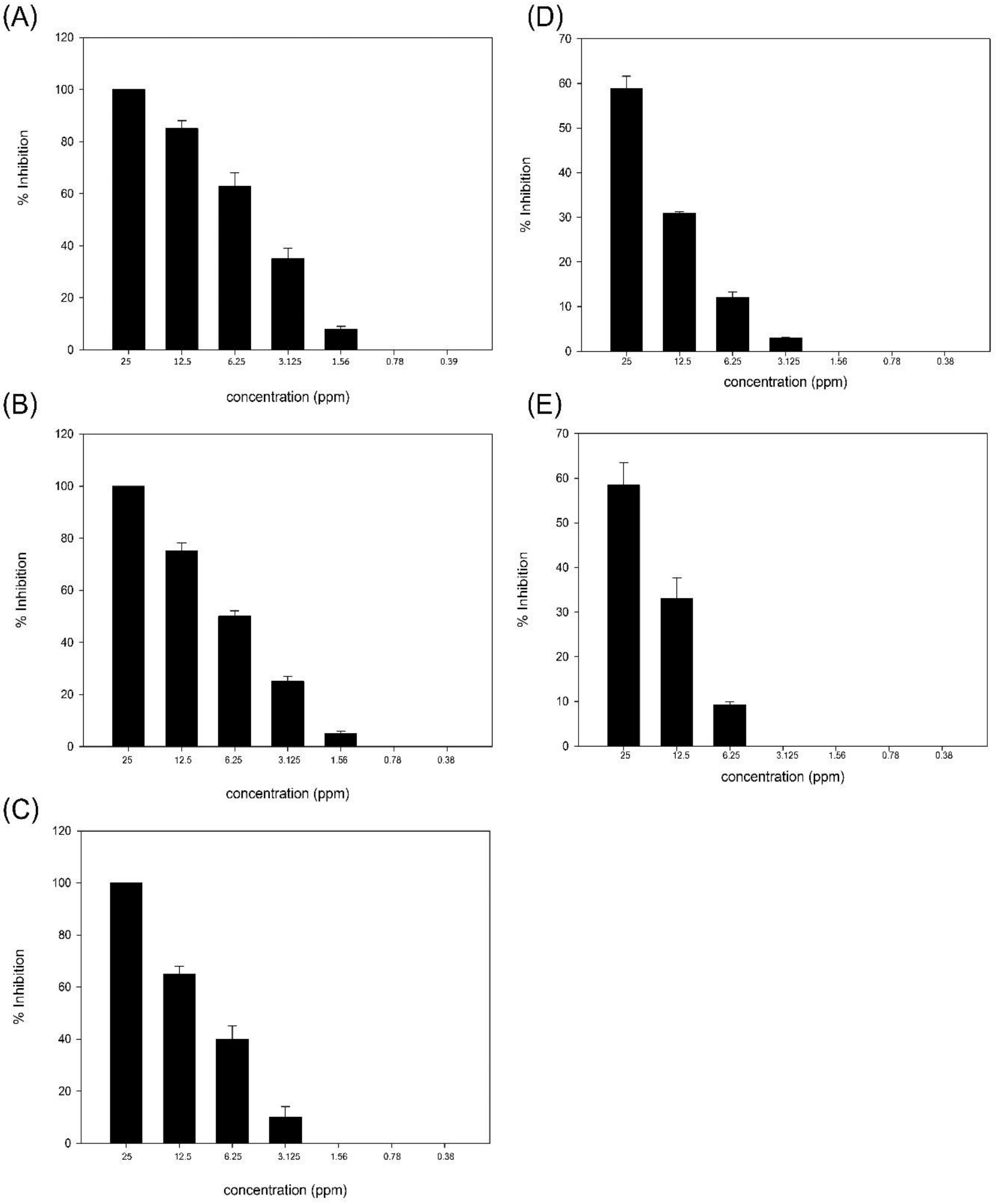
Sodium chloride	6	กรัม
Ortho-phosphoacetic acid	5	กรัม

วิธีเตรียม

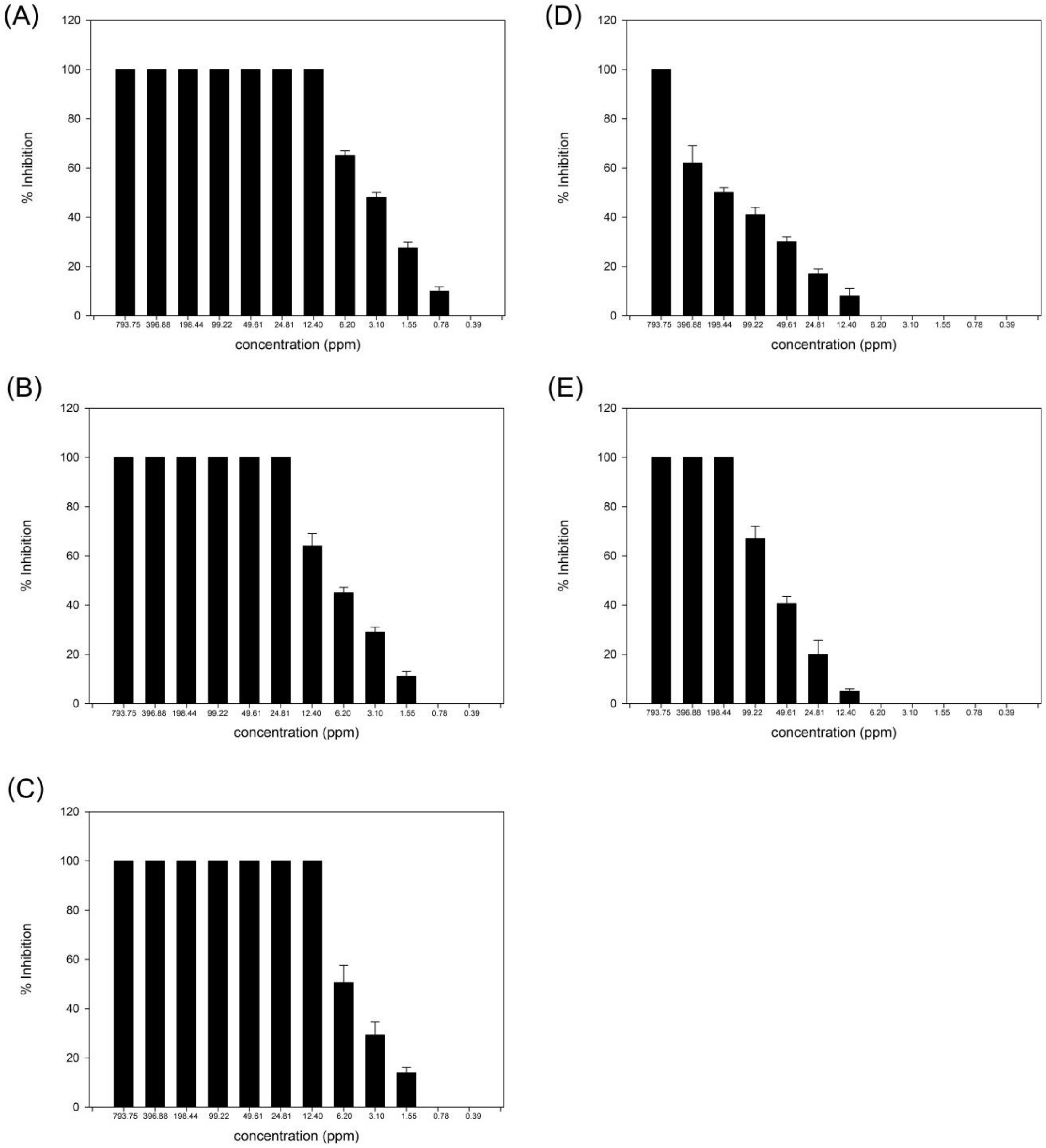
a. ชั่งสารเคมีตามปริมาตรข้างต้น เติมน้ำกลั่น 750 มิลลิลิตร ปรับ pH ด้วย NaOH หรือ HCl ให้ได้ 7.0
b. นำเข้า autoclave ที่ 121°C ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที รอให้เย็นลงแล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง

ภาคผนวก 2

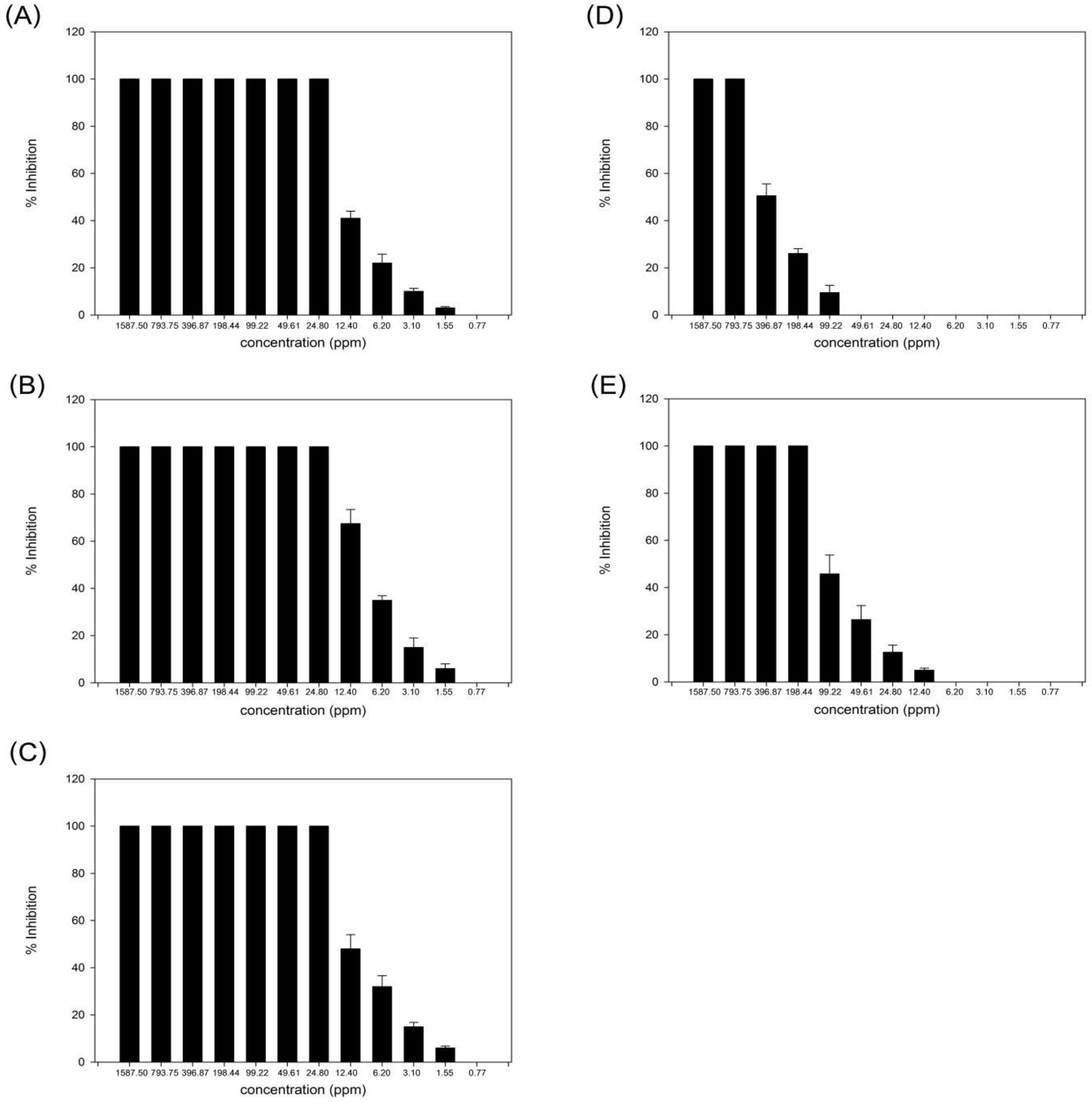
ข้อมูลผลการศึกษา



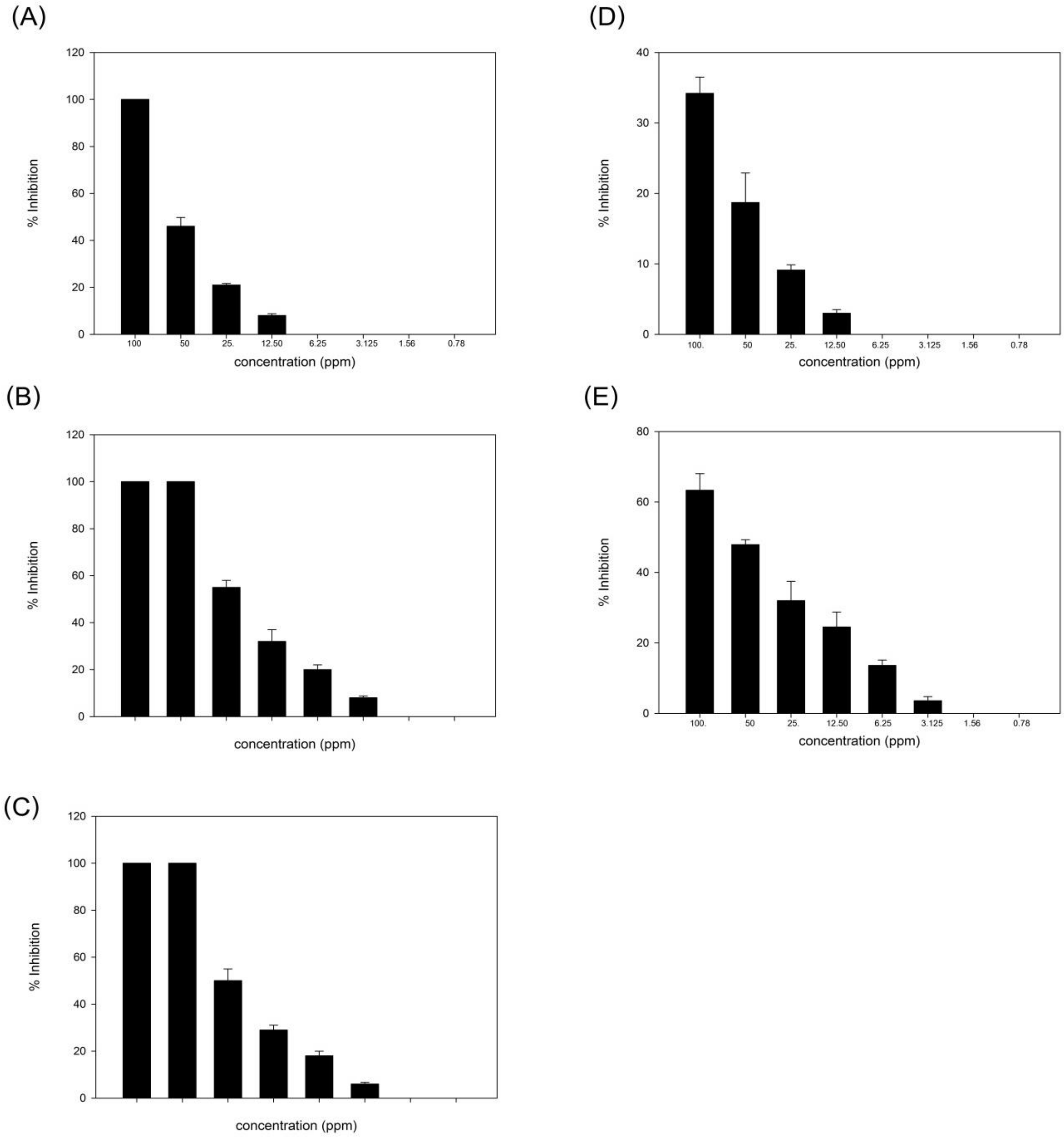
รูปที่ 12 แสดงร้อยละของค่าเฉลี่ยและค่าความคลาดเคลื่อนของสาร silver complex ในการยับยั้งการสร้าง biofilm ต่อเชื้อ (A) *C. albicans*, (B) *S. mutans*, (C) *S. sobrinus,* (D) *E. faecalis* และ (E) *A. a* ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ



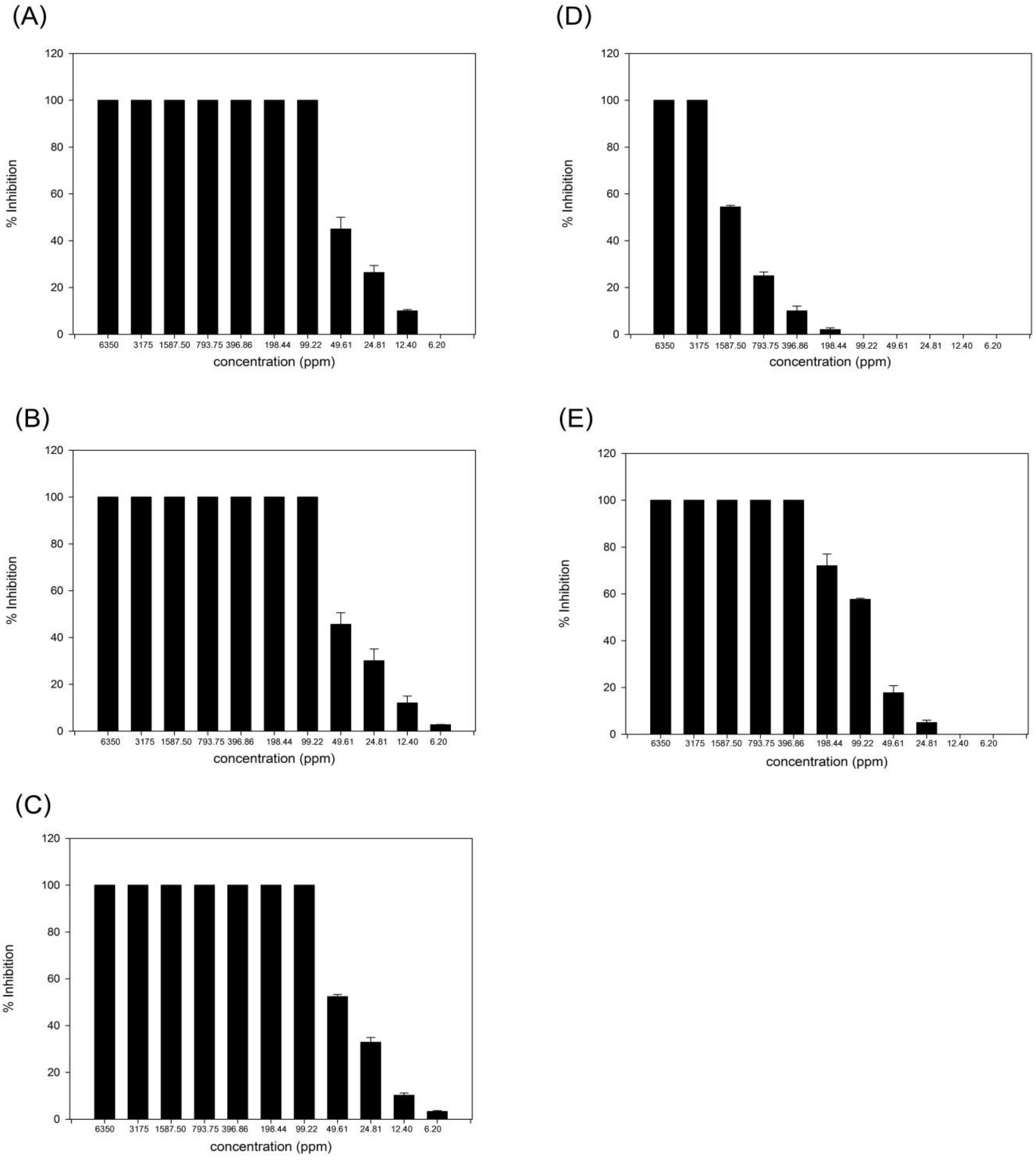
รูปที่ 13 แสดงร้อยละของค่าเฉลี่ยและค่าความคลาดเคลื่อนของสาร $AgNO_3$ ในการยับยั้งการสร้าง biofilm ต่อเชื้อ (A) *C. albicans*, (B) *S. mutans*, (C) *S. sobrinus,* (D) *E. faecalis* และ (E) *A. a* ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ



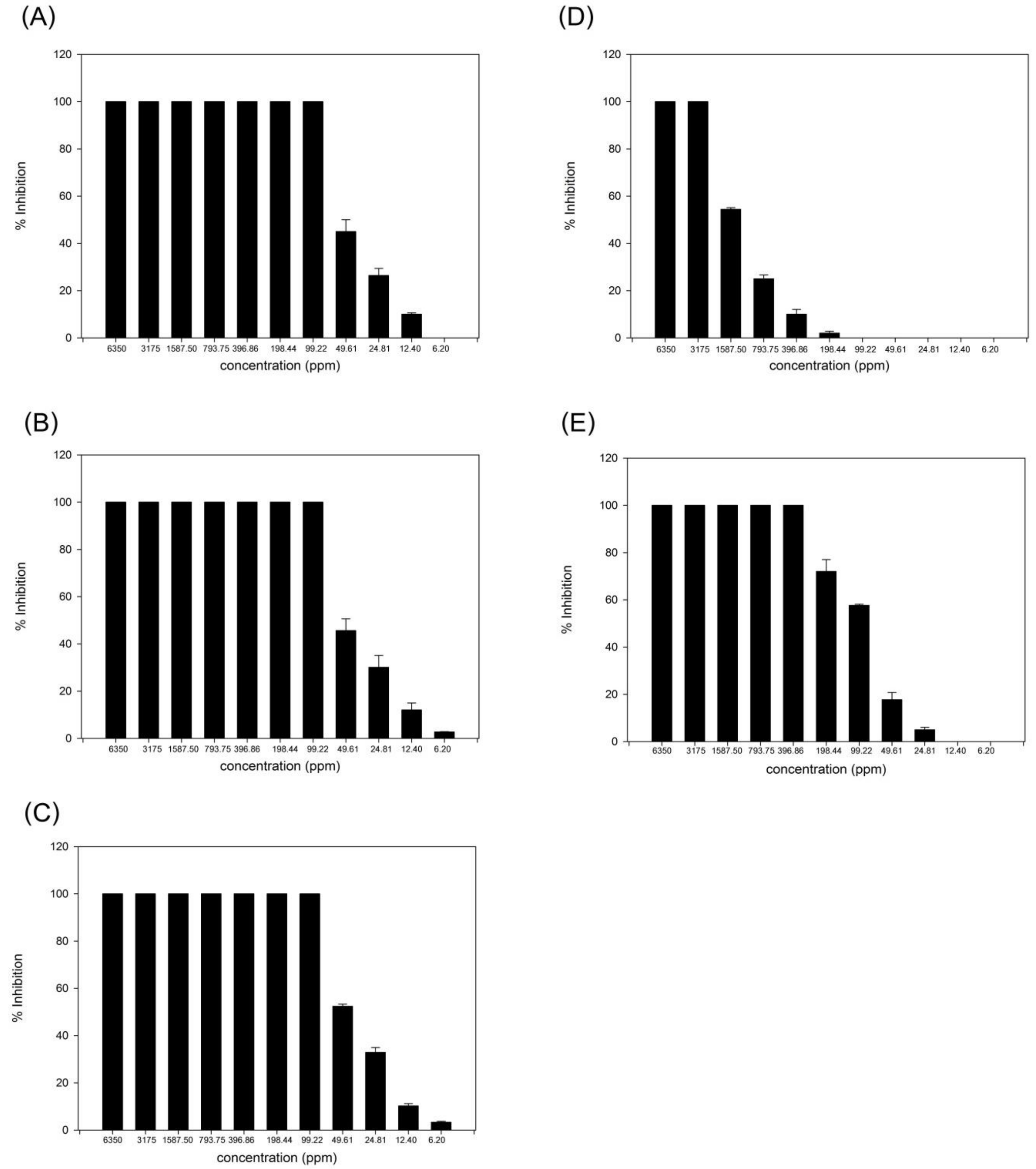
รูปที่ 14 แสดงร้อยละของค่าเฉลี่ยและค่าความคลาดเคลื่อนของสาร AgO_2 ในการยับยั้งการสร้าง biofilm ต่อเชื้อ (A) *C. albicans*, (B) *S. mutans*, (C) *S. sobrinus,* (D) *E. faecalis* และ (E) *A. a* ที่ความ



รูปที่ 15 แสดงร้อยละของค่าเฉลี่ยและค่าความคลาดเคลื่อนของสาร Ag complex ในการทำลาย biofilm ต่อเชื้อ (A) *C. albicans*, (B) *S. mutans*, (C) *S. sobrinus,* (D) *E. faecalis* และ (E) *A. a* ที่ความเข้มข้น



รูปที่ 16 แสดงร้อยละของค่าเฉลี่ยและค่าความคลาดเคลื่อนของสาร $AgNO_3$ ในการทำลาย biofilm ต่อเชื้อ (A) *C. albicans*, (B) *S. mutans*, (C) *S. sobrinus,* (D) *E. faecalis* และ (E) *A. a* ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ



รูปที่ 17 แสดงร้อยละของค่าเฉลี่ยและค่าความคลาดเคลื่อนของสาร AgO_2 ในการทำลาย biofilm ต่อเชื้อ (A) *C. albicans*, (B) *S. mutans*, (C) *S. sobrinus,* (D) *E. faecalis* และ (E) *A. a* ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ตารางที่ 12 แสดงค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ของสาร Ag complex ที่ระยะเวลา 15 นาที ถึง 24 ชั่วโมง

Ag complex	ความเป็นพิษต่อเซลล์ (ร้อยละ)					
(ความเข้มข้น)	24 ชั่วโมง	12 ชั่วโมง	1 ชั่วโมง	45 นาที	30 นาที	15 นาที
50.00	100	100	100	100	100	100
25.00	100	100	100	100	100	100
12.50	100	100	100	100	100	100
6.25	100	100	100	100	100	100
3.13	100	100	100	100	100	100
1.56	100	100	100	100	100	100
0.78	100	100	100	100	100	100
0.38	100	100	100	100	100	100
0.19	100	100	100	100	100	100
0.10	100	100	100	100	100	100
0.05	100	100	100	100	100	47.08
0.02	100	100	100	100	100	24.58

.

ตารางที่ 17 แสดงค่าการเปลี่ยนแปลงของสี

กลุ่มทดลอง (n = 5)	Coordinate	T0	T1	T7	T14
Ag complex	L*	1.46 ± 0.80	81.42	77.99	76.67
	a*	-1.62 ± 0.37	-1.41	-1.77	-1.555
	b*	13.35 ± 3.55	12.75	13.03	14.0575
$AgNO_3$	L*	60.55 ± 4.38	60.42	52.70	51.07
	a*	-2.21 ± 1.06	5.68	6.44	5.97
	b*	13.67 ± 3.18	25.22	19.56	20.66
AgO_2	L*	60.11 ± 3.47	56.22	52.70	44.83
	a*	-2.02 ± 0.12	5.98	9.23	5.97
	b*	11.80 ± 1.05	18.64	32.70	20.66
No treatment	L*	60.16 ± 0.27	61.49	56.20	55.49
	a*	-3.70 ± 0.31	-3.14	-3.56	-2.01
	b*	13.27 ± 0.81	13.05	13.61	13.18

T0: สีเนื้อฟันเริ่มต้นหลังจากขัดเคลือบฟันออก, T2: สีเนื้อฟันหลังจากทาสารผ่านไป 1 วัน, T7: สีเนื้อฟันหลังจากทาสารผ่านไป 2 วัน, T14: สีเนื้อฟันหลังจากทาสารผ่านไป 14 วัน, L* คือค่าความสว่างในแกนสีดำ (0) ถึง สีขาว (100), a* แกนแนวสี แดง (+a*) ถึงสีเขียว (−a*), และ b* แกนแนวสีเหลือง (+b*) ถึงสีน้ำเงิน (−b*)

RESEARCH ETHICS COMMITTEE (REC)
BUILDING 1 6TH FLOOR ROOM 604
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	:	Effect of Various Silver Compound on Oral Microbes, their Cytotoxicity on Human Keratinocytes and Arresting of Carious Lesion in Tooth Model
REC Project No.	:	EC6106-23-P-LR
Principal Investigator	:	Prof. Dr.Rawee Teanpaisan
Affiliation	:	Department of Stomatology, Faculty of Dentistry, PSU
Co-Principal Investigator	:	Asst.Prof.Dr.Kawalin Thammasitboon / Miss Patcharee Chaithang

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 3.2.2 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)

(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 นางสาวพัชรี ไชยทอง

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5810820019

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
ทันตแพทยศาสตรบัณฑิต	มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ	2556

ทุนการศึกษา

1. ทุนอุดหนุนวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ประจำปีงบประมาณ 2560
2. ทุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์/โครงการวิจัยสำหรับนักศึกษาหลังปริญญาจากเงินกองทุนวิจัย
3. ทุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์/โครงการวิจัย/โครงงานพิเศษสำหรับนักศึกษาหลังปริญญาจากเงินรายได้คณะทันตแพทยศาสตร์

ตำแหน่งและสถานที่ทำงาน

ทันตแพทย์ปฏิบัติการ กลุ่มงานทันตกรรม โรงพยาบาลชุมพรเขตรอุดมศักดิ์ อำเภอเมืองฯ จังหวัดชุมพร

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

พัชรี ไชยทอง, รวี เถียรไพศาล, เกวลิน ธรรมสิทธิ์บูรณ์ ผลของสารประกอบซิลเวอร์ชนิดต่าง ๆ ต่อการหยุดยั้งฟันผุในแบบจำลองฟัน นำเสนอแบบโปสเตอร์ ในงานประชุมวิชาการและนำเสนอผลงานวิจัยระดับนานาชาติ ครั้งที่ 14 เรื่อง “วิถีนวัตกรรมเพื่อการพัฒนางานวิจัยสู่เศรษฐกิจชุมชนไทยให้ยั่งยืน” วันที่ 27-28 เมษายน 2562 มหาวิทยาลัยเวสเทิร์น อำเภอลำลูกกา จังหวัดปทุมธานี