



การศึกษาแคลเซียมคลอไรด์ที่มีผลต่อการต้านฤทธิ์ของเม็ดอนุภาคเงินนาโนที่เคลือบผิว
ด้วยสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงต่อเชื้อแอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซีเทมคอมมิแทนส์



ธนภูมิ ไชยวงศ์

วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาทันตแพทยศาสตร์
ปีการศึกษา 2564
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

การศึกษาแคลเซียมคลอไรด์ที่มีผลต่อการต้านฤทธิ์ของเม็ดอนุภาคเงินนาโนที่เคลือบผิว
ด้วยสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงต่อเชื้อแอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซีเทมคอมิแทนส์



วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาทันตแพทยศาสตร์
ปีการศึกษา 2564
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

วิทยานิพนธ์ เรื่อง "การศึกษาแคลเซียมคลอไรด์ที่มีผลต่อการต้านฤทธิ์ของเม็ดอนุภาคเงินนาโนที่เคลือบผิวด้วยสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงต่อเชื้อแอคริเกร็ดิแบคเตอร์ แอคติโนมัยซีเทมคอมมิแทนส์"

ของ ธนภูมิ ไชยวงศ์

ได้รับการพิจารณาให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาทันตแพทยศาสตร์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร.ตุลย์ ศรีอัมพร)

..... ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.ศิริรัช วัชรานาถ)

..... กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.อิชยา เขี่ยมวัฒนา)

..... กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร.เจษฎา ผลาสุข)

อนุมัติ

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.กรองกาญจน์ ชูทิพย์)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง	การศึกษาแคลเซียมคลอไรด์ที่มีผลต่อการต้านฤทธิ์ของเม็ดอนุภาคเงินนาโนที่เคลือบผิวด้วยสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงต่อเชื้อแบคทีเรียแบคทีเรีย แอคติโนมัยซีเทมคอมมิแทนส์
ผู้วิจัย	ธนภูมิ ไชยวงศ์
ประธานที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันทแพทย์หญิง ดร.ศิริรัช วัชรานาถ
กรรมการที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ทันทแพทย์หญิง ดร.อิชยา เยี่ยมวัฒนา
ประเภทสารนิพนธ์	วิทยานิพนธ์ วท.ม. ทันทแพทยศาสตร์, มหาวิทยาลัยนครสวรรค์, 2564
คำสำคัญ	อนุภาคเงินนาโน, กระเจี๊ยบแดง, แคลเซียมคลอไรด์

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ (Calcium Chloride, CaCl_2) ต่อการขึ้นรูปเม็ดอนุภาคเงินนาโนที่เคลือบผิวด้วยสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงและแคลเซียมคลอไรด์ (SNP-Ro- CaCl_2 bead) รวมถึงศึกษาการปลดปล่อยอนุภาคเงินนาโนจาก SNP-Ro- CaCl_2 bead และประสิทธิภาพในการต้านฤทธิ์แบคทีเรียของ SNP-Ro- CaCl_2 bead

เม็ดอนุภาคเงินนาโนที่เคลือบผิวด้วยสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง สังเคราะห์ได้จากการผสมอนุภาคเงินนาโน กับสารละลายอัลจิเนต (Alginate) จากนั้นนำไปหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 1%, 3% และ 5% w/v เม็ดอนุภาคเงินนาโนที่สังเคราะห์ได้จะถูกนำไปวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ โดยการวัดเส้นผ่าศูนย์กลาง ส่องลักษณะพื้นผิวด้วยการใช้กล้องจุลทรรศน์สามมิติ (Stereoscope) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope, SEM) จากนั้นนำ SNP-Ro- CaCl_2 bead ที่ได้ไปศึกษาการปลดปล่อยอนุภาคเงินนาโนในเวลา 24 ชั่วโมงทดสอบโดยใช้ UV-Vis spectrophotometer และนำไปทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียแบคทีเรีย แอคติโนมัยซีเทมคอมมิแทนส์ (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) ด้วยวิธีดิสก์ ดิฟฟิวชัน (Disk diffusion technique)

ผลการศึกษาพบว่า ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ มีผลต่อการเชื่อมขวางกับอัลจิเนต โดยทำให้เกิดช่องว่างและรูพรุนที่แตกต่างกันภายใน SNP-Ro- CaCl_2 bead จึงส่งผลต่อการควบคุมการปลดปล่อยอนุภาคเงินนาโน องค์ประกอบภายใน SNP-Ro-1% CaCl_2 bead มีรูพรุนมากที่สุด ทำให้มีประสิทธิภาพการปลดปล่อย SNP-Ro ได้เร็วและปริมาณมากที่สุด สอดคล้องกับฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียแบคทีเรีย แอคติโนมัยซีเทมคอมมิแทนส์ ที่เวลา 24 ชั่วโมง SNP-Ro-1% CaCl_2

bead ทำให้เกิดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีเชื้อเจริญมากกว่าเมื่อดอนุภาคเงินนาโนที่มีแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในขณะที่ SNP-Ro-3% CaCl_2 bead พบว่า มีการปลดปล่อยอนุภาคเงินนาโนมากกว่า SNP-Ro-5% CaCl_2 bead แต่เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียแบคทีเรีย แอคติโนไมซีเทมคอมมิแทนส์ เมื่อดอนุภาคเงินนาโนที่มีแคลเซียมคลอไรด์ทั้งสองความเข้มข้นนี้ ทำให้เกิดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีเชื้อเจริญ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) นอกจากนี้ เมื่อทำการทดสอบอายุการใช้งานของ SNP-Ro- CaCl_2 bead ทั้งสามชนิด พบว่า ประสิทธิภาพในการต้านเชื้อจะลดลงเมื่อเวลาผ่านไป 17 วัน ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงถึงศักยภาพในการนำเมื่อดอนุภาคเงินนาโนที่มีแคลเซียมคลอไรด์เป็นส่วนประกอบมาใช้เป็นสารต้านจุลชีพเฉพาะที่ชนิดใหม่สำหรับเสริมการรักษาโรคปริทันต์อักเสบได้



Title	THE STUDY OF CALCIUM CHLORIDE EFFECT ON SILVER NANOPARTICLES CAPPING WITH ROSELLE EXTRACT GRANULE AGAINST AGGREGATIBACTOR ACTINOMYCETEMCOMITANS
Author	THANAPHOOM CHAIWONG
Advisor	Assistant Professor Sirorat Wacharanad
Co-Advisor	Associate Professor Ichaya Yiemwattana
Academic Paper	M.S. Thesis in Master of Sciences in Dentistry (Periodontics) - Type A 2, Naresuan University, 2021
Keywords	Silver nanoparticles, Roselle, Calcium chloride

ABSTRACT

The purpose of this study is to evaluate the effect of calcium chloride on the production of silver nanoparticles capped with Roselle extract and calcium chloride bead (SNP-Ro-CaCl₂ bead), the release of silver nanoparticles (SNP) from SNP-Ro-CaCl₂ bead and the antimicrobial activity of SNP-Ro-CaCl₂ bead.

For SNP-Ro-CaCl₂ beads preparation, silver nanoparticles and alginate gel were mixed, followed by dropping in three different concentrations of calcium chloride (CaCl₂) solution (1, 3 and 5% w/v). The morphological structure of SNP-Ro-CaCl₂ beads was analyzed by Stereoscope and Scanning electron microscope (SEM). The release of SNP was monitored at 24 h using an UV-Vis spectrophotometer. The antimicrobial activity against *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* was tested by disk diffusion technique.

The results showed that the calcium chloride concentration had a different crosslinking effect on the alginate leading to different voids and porosity of the SNP-Ro-CaCl₂ beads. The inner element of SNP-Ro-1% CaCl₂ bead had a highest porosity, resulting in rapid and more release of SNP-Ro. Corresponding to the antibacterial activity against *Aggregatibacters actinomycetemcomitans* at 24h, SNP-

Ro-1% CaCl_2 bead produced the largest inhibition zone diameter with a significant difference ($P < 0.05$) than the other two CaCl_2 concentrations bead. While the SNP-Ro-3% CaCl_2 bead showed better SNP-Ro release efficiency than the SNP-Ro-5% CaCl_2 bead, but the inhibition zone diameters of these two types of beads showed no statistically significant ($P > 0.05$). In addition, in the lifetime testing of all three CaCl_2 concentration beads, antimicrobial efficacy was found to decline after 17 days. The results suggested that the SNP-Ro- CaCl_2 bead has the potential to be developed as an adjunctive locally delivered antimicrobial agent in periodontal therapy.



ประกาศคุณูปการ

การศึกษานี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก แหล่งทุนสำคัญ อันได้แก่ ทุนของ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ผู้วิจัยขอกราบ ขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

การวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาจากหลายท่าน ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผู้ให้ความช่วยเหลือทุกท่านที่กรุณาเสียสละเวลาและให้คำแนะนำเป็นอย่างดี

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาสละเวลาให้คำแนะนำปรึกษา ชี้แนะแนวทาง ตรวจสอบและปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ งานวิจัยมีความถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ด้วยความเอาใจใส่เป็นอย่างดียิ่ง เหนือสิ่งอื่นใดขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา สำหรับความรัก ความอบอุ่น ความปรารถนาดี ให้การอบรมสั่งสอนและสนับสนุนในด้านการศึกษา ตลอดจนเป็นกำลังใจสำคัญที่ทำให้สามารถผ่านพ้นอุปสรรคต่างๆ ไปได้ด้วยดี

สำหรับคุณค่าและประโยชน์อันพึงจะมีจากการวิจัยในครั้งนี้ ผู้วิจัยขอมอบคุณความดีทั้งหมดให้แก่ผู้มีพระคุณ ตลอดจนคณาจารย์จากมหาวิทยาลัยนเรศวรทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทความรู้ ให้แก่ผู้วิจัย

ธนภูมิ ไชยวงศ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
ประกาศคุณูปการ.....	ช
สารบัญ.....	ซ
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ที่มาและความสำคัญของโครงการ.....	1
วัตถุประสงค์ของโครงการ.....	4
สมมุติฐานของโครงการ.....	4
ขอบเขตของโครงการ.....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	1
โรคปริทันต์.....	1
เชื้อแอกกริเกติแบกเทอร์ แอกทีโนไมซีเทมคอมิแทนส์.....	4
ลักษณะโดยทั่วไป.....	4
การเพาะเชื้อแอกกริเกติแบกเทอร์ แอกทีโนไมซีเทมคอมิแทนส์.....	4
ปัจจัยก่อโรค.....	5
การรักษาโรคปริทันต์.....	7
การรักษาโรคปริทันต์แบบไม่ทำศัลยกรรมปริทันต์.....	7

ยาต้านจุลชีพที่ใช้ในการรักษาโรคปริทันต์จำแนกตามวิธีใช้ยา	8
ระบบนำส่งยาเฉพาะที่.....	9
รูปแบบตัวพายาที่ใช้เก็บรักษายา	9
ข้อบ่งชี้ในการใช้ยาต้านจุลชีพด้วยระบบนำส่งยาเฉพาะที่	9
ข้อดีของระบบนำส่งยาต้านจุลชีพเฉพาะที่.....	10
ข้อเสียของระบบนำส่งยาต้านจุลชีพเฉพาะที่.....	10
อนุภาคเงินนาโน.....	12
การสังเคราะห์อนุภาคเงินนาโน	15
สารสกัดกระเจี๊ยบแดง	20
อัลจินต	24
แคลเซียมคลอไรด์	26
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	29
เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา	29
วิธีการทดลอง	30
การวิเคราะห์ข้อมูล	35
แผนภูมิสรุปวิธีการดำเนินการวิจัย.....	36
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากโครงการ.....	37
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	38
1. ผลการสังเคราะห์อนุภาคเงินนาโน (SNP-Ro).....	38
2. ผลการสังเคราะห์เม็ดอนุภาคเงินนาโน (SNP-Ro-CaCl ₂ bead) โดยใช้ความเข้มข้นของ แคลเซียมคลอไรด์ ที่แตกต่างกัน	38

3. ผลการศึกษาการวัดค่าปลดปล่อยอนุภาคเงินนาโนจาก SNP-Ro-CaCl ₂ beads ด้วยเครื่องUV-Vis spectrophotometer	41
3.1 การหากราฟมาตรฐาน (Standard calibration curve) ของสารละลายอนุภาคเงินนาโนที่มีสารเคลือบผิวเป็นสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง (SNP-Ro).....	41
3.2 การหาความเข้มข้นของ SNP-Ro ที่ปลดปล่อยออกจาก SNP-Ro-CaCl ₂ bead เมื่อเวลาผ่านไป	41
4. การศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อแบกทีเรียแกรมลบ แยกทีโนไมซีเทมคอมิแทนส์ของเม็ดอนุภาค เงินนาโนที่มีสารเคลือบผิวเป็นสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง ด้วยวิธีดิสก์ดิฟฟิวชัน	42
5. การศึกษาผลของเม็ดอนุภาคเงินนาโนที่มีสารเคลือบผิวเป็นสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงในการ ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียเมื่อเก็บไว้ในระยะเวลาที่ต่างกัน	44
บทที่ 5 อภิปรายผลการวิจัย	46
สรุปผลการศึกษา.....	49
ข้อเสนอแนะ	49
บรรณานุกรม	51
ประวัติผู้วิจัย	59

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 แสดงปริมาณของสารที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคเงินนาโนอัตราส่วน SNP-Ro 1:0.530



สารบัญภาพ

หน้า

ภาพ 1 แสดงการเปลี่ยนจากภาวะ symbiosis microbiota เป็น dysbiosis microbiota	2
ภาพ 2 แสดงชนิดจุลชีพที่แตกต่างกันในผู้ป่วยสุขภาพดี และผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ	3
ภาพ 3 แสดงลักษณะ colony รูปดาวของเชื้อแอกกริเกทแบกเทอร์ แอกทีโนไมซีเทมคอมมิแทนส์.....	4
ภาพ 4 แสดงลักษณะ fimbriae และ pili ที่ยื่นไปยังแบคทีเรียที่อยู่ใกล้ๆ.....	5
ภาพ 5 แสดงถึงเชื้อแอกกริเกทแบกเทอร์ แอกทีโนไมซีเทมคอมมิแทนส์ สามารถเข้าไปอยู่ภายในเซลล์เจ้าบ้านได้.....	5
ภาพ 6 ซ้ำยมือ แสดงถึงนิวโทรฟิลก่อนสัมผัสกับ ลิวโคที่อกซิน ขวามือ แสดงถึงการสลายของ นิวโทรฟิลภายหลังสัมผัสกับลิวโคที่อกซิน.....	6
ภาพ 7 แสดงตัวอย่างการใช้ยาด้านจุลชีพชนิดแผ่นฟิล์มในร่องลึกปริทันต์	11
ภาพ 8 แสดงการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบของสารสกัดจากชาผู้เอ้อ ด้วยวิธี Agar disk diffusion test (A) E. coli, (B) K. pneumoniae, (C) S. Typhimurium, และ(D) S. Enteritidis.....	12
ภาพ 9 A แสดงรูปร่างของอนุภาคเงินนาโนที่ต่างกัน ด้วยกล้อง Scanning transmission electron microscopy (STEM) B และ C แสดงอนุภาคเงินนาโนรูปร่างสามเหลี่ยมตัด รูปร่างกลม และรูปร่างแท่ง.....	13
ภาพ 10 แสดงการสังเคราะห์อนุภาคนาโนจากล่างสู่บน (Bottom to Up).....	14
ภาพ 11 แสดงการสังเคราะห์อนุภาคนาโนจากบนสู่ล่าง (Top to Bottom)	14
ภาพ 12 แสดงการสังเคราะห์อนุภาคเงินนาโนในวิธีต่างๆ.....	15
ภาพ 13 แสดงการสังเคราะห์อนุภาคเงินนาโนด้วยวิธีทางชีวภาพ.....	16
ภาพ 14 แสดงการเปลี่ยนสีของสารละลายจากสีใสเป็นสีน้ำตาล	17

ภาพ 15 แสดงกราฟจากการวิเคราะห์ด้วย Xray diffractometer	18
ภาพ 16 แสดงกราฟ ภายหลังจากการวิเคราะห์ด้วย UV-vis	18
ภาพ 17 แสดงกราฟภายหลังจากการวิเคราะห์ด้วย Fourier-Transform Infared (FTIR)....	18
ภาพ 18 แสดงการวิเคราะห์อนุภาคเงินนาโนด้วย Electron microscope	19
ภาพ 19 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยวิธี SEM ของอนุภาคเงินนาโนโดยใช้สารสกัดจากกล้วย ลิสง.....	19
ภาพ 20 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ (A) SNP-Ro 1:0.5 และ (B) SNP-Ro 1:2.5 จาก การส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) ที่กำลังขยาย 310Kx	20
ภาพ 21 แสดงส่วนดอกกระเจี๊ยบแดง	20
ภาพ 22 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารสกัดกระเจี๊ยบแดง C ₁₈ H ₁₆ O ₉ น้ำหนักโมเลกุล: 376	21
ภาพ 23 แสดงการวิเคราะห์โดยใช้ Phytochemical ของสารสกัดจากส่วนก้านดอกของ กระเจี๊ยบแดง.....	21
ภาพ 24 แสดงสารละลายไนโตรเจนและกรดอะมิโนที่พบในกระเจี๊ยบแดง	22
ภาพ 25 A แสดงถึงค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคเงินนาโนในอัตราส่วนต่างๆจะอยู่ในช่วง 350- 450 นาโนเมตร B แสดงการเปลี่ยนสีของสารละลายที่มีสีเข้มข้น เมื่อความเข้มข้นของสารสกัด จากกระเจี๊ยบแดงมากขึ้น แสดงถึงการมีอนุภาคเงินนาโนที่มากขึ้น	22
ภาพ 26 แสดงร้อยละการทำลายของเชื้อของอนุภาคเงินนาโนจากสารสกัดจากกระเจี๊ยบ แดงในอัตราส่วนต่างๆ เทียบกับกลุ่มควบคุมบวกคือ 0.12 % chlorhexidine ที่มีการฆ่าเชื้อ ได้ 100 % และกลุ่มควบคุมลบคือ BHI (Brain heart infusion) และ Roselle ที่จะไม่มีการ ฆ่าเชื้อเกิดขึ้น	23
ภาพ 27 แสดงการเกิดโซนยับยั้งของแผ่นฟิล์ม อนุภาคเงินนาโนที่มีสารเคลือบผิวเป็นสาร สกัดจากกระเจี๊ยบแดงในอัตราส่วนต่าง ๆ.....	23
ภาพ 28 แสดงการเชื่อมกันของสายอัลจินต สามแบบคือ GG,MM, และ MG.....	25

ภาพ 29 แสดงค่า Fractional Inhibitory Concentration (FIC) ระหว่างการใช้ อะลูมิเนียมคลอไรด์, ซิงค์คลอไรด์, คอปเปอร์ซัลเฟต และ แคลเซียมคลอไรด์ในการเชื่อมพันธะกับอัลจินเตที่มียาต้านจุลชีพ.....	26
ภาพ 30 แสดงการปลดปล่อยยาเมตฟอร์มินจากอัลจินเตที่ไม่ได้ปรับปรุงโครงสร้าง (C) , การปรับปรุงโครงสร้างอัลจินเตด้วย 0.1% แคลเซียมคลอไรด์ (CA1), 0.05% แคลเซียมคลอไรด์ (CA2), และตัวควบคุมคือ เมตฟอร์มินทางการค้า (MF)	27
ภาพ 31 แสดงการเพิ่มขึ้นของอัตราส่วนการบวมในการปรับปรุงโครงสร้างอัลจินเต (CA1, CA2)	27
ภาพ 32 A แสดงโครงสร้างอัลจินเตที่บรรจุยาเมตฟอร์มินแต่ไม่ได้ปรับปรุงโครงสร้างอัลจินเตด้วยแคลเซียมคลอไรด์ B แสดงการปรับปรุงโครงสร้างอัลจินเตด้วยแคลเซียมคลอไรด์	28
ภาพ 33 แสดงตำแหน่งที่จะวางเม็ดอนุภาคเงินนาโน เม็ดอัลจินเต และคลอเฮกซิดีนชิป ทั้งหมด 5 ตำแหน่ง	34
ภาพ 34 แสดงตำแหน่งที่จะวางเม็ดอนุภาคเงินนาโน และเม็ดอัลจินเตทั้งหมด 4 ตำแหน่ง	34
ภาพ 35 แสดงขั้นตอนการศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อ แอ็กกริเกทีแบกเทอร์ แอ็กที.....	36
ภาพ 36 แสดงกราฟค่าการดูดกลืนแสงของ SNP-Ro ด้วยการใช้ UV-Vis spectrophotometer	38
ภาพ 37 A แสดงลักษณะพื้นผิวของ SNP-Ro-CaCl ₂ bead ที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ ต่างกันเมื่อวิเคราะห์ด้วยกล้อง Stereoscope (กำลังขยาย 0.35X) B แสดงลักษณะของ SNP-Ro-CaCl ₂ bead ที่มีความเข้มข้นของ CaCl ₂ ต่างกัน	39
ภาพ 38 แสดงภาพจากกล้อง Stereoscope (กำลังขยาย 5.75X) เป็นภาพตัดขวางของ SNP-Ro-CaCl ₂ beads ที่สังเคราะห์โดยใช้ความเข้มข้นของ CaCl ₂ ที่ต่างกัน A: SNP-Ro-1% CaCl ₂ bead B: SNP-Ro-3% CaCl ₂ bead และ C: SNP-Ro-5% CaCl ₂ bead	39

ภาพ 39 แสดงภาพจากกล้อง SEM โดย แสดงบริเวณพื้นผิวด้านนอกของ A: SNP-Ro-1% CaCl₂ bead B: SNP-Ro-3% CaCl₂ bead C: SNP-Ro-5% CaCl₂ bead ที่กำลังขยาย 5000X และ D: แสดงภาพตัดขวางของ SNP-Ro-1% CaCl₂ bead ที่กำลังขยาย 30X.....40

ภาพ 40 แสดงภาพจากกล้อง SEM ที่กำลังขยาย 10,000X A: SNP-Ro-1% CaCl₂ bead..40

ภาพ 41 แสดง Standard calibration curve ของ SNP-Ro41

ภาพ 42 แสดงกราฟการปลดปล่อย SNP-Ro จาก SNP-Ro-CaCl₂ beads ในเวลา 24 ชั่วโมง42

ภาพ 43 แสดงกราฟการปลดปล่อย SNP-Ro จาก SNP-Ro-CaCl₂ beads ในเวลา 14 วัน ..42

ภาพ 44 แสดงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีเชื้อเจริญทั้งสามความเข้มข้นเมื่อระยะเวลาผ่านไป43

ภาพ 45 แสดงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีเชื้อเจริญทั้งสามความเข้มข้นเมื่อระยะเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง.....43

ภาพ 46 แสดงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีเชื้อเจริญทั้งสามความเข้มข้นเมื่อเก็บไว้ใน44

ภาพ 47 แสดงขนาดบริเวณที่ไม่มีเชื้อเจริญทั้งสามความเข้มข้นเมื่อเก็บไว้ในวันที่ 10, 17 และ 31 วัน.....45

บทที่ 1

บทนำ

ที่มาและความสำคัญของโครงการ

โรคปริทันต์ (Periodontal disease) เป็นโรคอักเสบชนิดหนึ่งที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรียที่อยู่ในคราบจุลินทรีย์ การอักเสบจะรวมไปถึงการอักเสบของเหงือก เอ็นยึดปริทันต์ (periodontal ligament) เคลือบรากฟัน (cementum) และกระดูกเบ้าฟัน (alveolar bone) โดยการอักเสบที่เกิดเฉพาะบริเวณเนื้อเยื่อเหงือกจะเรียกว่าโรคเหงือกอักเสบ (Gingivitis) ซึ่งมักจะพบได้มากในประชากรทั่วไป หากเชื่อมีความรุนแรงมากขึ้น หรือในประชากรที่มีภูมิคุ้มกันผิดปกติอาจนำไปสู่การทำลายของอวัยวะปริทันต์เพิ่มมากขึ้น จนนำไปสู่การเกิดโรคปริทันต์อักเสบ (Periodontitis) มีการทำลายเหงือกเกิดการสูญเสียของกระดูกเบ้าฟัน ฟันโยก และทำให้เกิดการสูญเสียฟันได้ในที่สุด ในทางระบาดวิทยาโรคปริทันต์เป็นปัญหาที่ทำให้ผู้ป่วยต้องมาพบทันตแพทย์เป็นอันดับที่สามารถลงมาจากโรคฟันผุ และโรคผื่นผื่นอักเสบหรือการมีฟันผุ

โรคปริทันต์เป็นโรคที่มีปัจจัยก่อโรคได้หลากหลาย อาทิเช่น ความรุนแรงของแบคทีเรียในช่องปาก ปัจจัยเฉพาะที่ในช่องปากของผู้ป่วยเอง โรคทางระบบและยาที่ผู้ป่วยรับประทาน การสูบบุหรี่ และปัจจัยทางพันธุกรรม โดยปัจจัยเหล่านี้ล้วนทำให้ผู้ป่วยแต่ละรายมีการตอบสนองต่อโรคได้แตกต่างกัน ถึงแม้จะมีปริมาณแบคทีเรียในคราบจุลินทรีย์ที่ใกล้เคียงกัน ดังนั้น การซักประวัติผู้ป่วยอย่างละเอียด เพื่อหาสาเหตุ และหาปัจจัยเสี่ยงในผู้ป่วยแต่ละรายจึงมีความสำคัญ เพราะจะทำให้ทันตแพทย์สามารถวางแผนการรักษาที่จำเพาะในผู้ป่วยแต่ละรายได้อย่างเหมาะสม และนำไปสู่การรักษาที่มีประสิทธิภาพได้ การรักษาโรคปริทันต์อักเสบในปัจจุบันมี 2 แบบ คือ การรักษาแบบไม่ทำศัลยกรรมปริทันต์ (Non-surgical periodontal treatment) และการรักษาแบบทำศัลยกรรมปริทันต์ (Periodontal surgical treatment) โดยทั่วไปแล้วมักจะทำการรักษาแบบไม่ทำศัลยกรรมปริทันต์เป็นมาตรฐานก่อน คือ การให้ทันตสุขศึกษา การให้การรักษาโดยการขูดหินน้ำลายและเกลารากฟัน และอาจให้ยาต้านจุลชีพเฉพาะที่หรือทางระบบภายหลังจากขูดหินน้ำลายและเกลารากฟัน ซึ่งจะเป็นวิธีการรักษาในขั้นต้น (Initial phase or hygienic phase) เพื่อกำจัดคราบจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคปริทันต์ และป้องกันการกลับมาเป็นใหม่ เมื่อรักษาแบบไม่ทำศัลยกรรมปริทันต์แล้วพบว่าผู้ป่วยยังไม่สามารถทำความสะอาดในบริเวณนั้นได้ หรือรอยโรคยังไม่กลับมาในระดับที่ปกติ จึงจะเข้าสู่กระบวนการรักษาแบบทำศัลยกรรมปริทันต์ในขั้นตอนการรักษาขั้นแก้ไข (Corrective phase) ต่อไป เพื่อแก้ไขหรือกำจัดรอยโรคที่ยังหลงเหลืออยู่ ปัจจัยที่ทำให้การรักษาไม่

สำเร็จ หรือมีการกลับมาเป็นซ้ำของโรค ส่วนหนึ่งมักมาจากการที่ไม่สามารถกำจัดสาเหตุของโรค คือ แบคทีเรียที่อยู่ในคราบจุลินทรีย์ออกได้หมด เช่น ในบริเวณที่เครื่องมือไม่สามารถเข้าไปทำการเกลารากฟันได้อย่างมีประสิทธิภาพ บริเวณที่มีร่องลึกปริทันต์ที่ลึกมาก (Deep pocket depth) มีความวิการของง่ามรากฟัน (Furcation involvement) หรือในบริเวณที่ผู้ป่วยไม่สามารถเข้าไปทำความสะอาดได้ เช่นในฟันกรามซี่ในสุด ฟันมีการซ้อนเก เป็นต้น นอกจากนี้มีการศึกษาพบว่าความรุนแรงและพฤติกรรมของจุลชีพบางชนิดก็ยากที่จะกำจัดออกไปได้ เนื่องจากจุลชีพเหล่านี้มักจะอาศัยในบริเวณที่มีร่องลึกปริทันต์ที่ลึกมาก และเชื้อโรคเหล่านี้จะมีปัจจัยก่อโรค (Virulence factors) ที่รุนแรง เช่น เชื้อพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิวัลลิส (*Porphyromonas gingivalis*) และ แอกริเกทิแบกเทอเรีย แอทิโนไมซีเทมคอมมิแทนส์ (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans: Aa*) (1-3) ที่จะสามารถแทรกเข้าไปอยู่ในเนื้อเยื่อของเซลล์เจ้าบ้าน และมีความสามารถในการหลบหลีกภูมิคุ้มกันของร่างกายได้ จึงทำให้ยากที่จะกำจัดออกไปได้ ดังนั้น จึงมีความพยายามในการเพิ่มประสิทธิภาพของการรักษาให้มากขึ้นหลังจากขูดหินน้ำลายและเกลารากฟัน เช่น การใส่ยาต้านจุลชีพเฉพาะที่ในตำแหน่งที่ต้องการให้ยาออกฤทธิ์ได้โดยตรง ซึ่งจะช่วยให้ได้ปริมาณความเข้มข้นของยาในร่องลึกปริทันต์สูงกว่าการใส่ยาต้านจุลชีพทางระบบ และทำให้ใช้ปริมาณยาน้อยลง จึงสามารถลดอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยาได้ เช่น การดื้อยา หรือ การแพ้ยา แต่อาจมีข้อเสีย คือ การคงความเข้มข้นของยาให้นานพอที่จะฆ่าจุลชีพ และยาต้องสั่งมาจากต่างประเทศทำให้มีราคาแพง จึงได้มีการคิดค้นการนำสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลชีพมาใช้ในการเป็นยาต้านจุลชีพเฉพาะที่มากขึ้น (4, 5)

การค้นพบนาโนเทคโนโลยีนั้นนำมาสู่งานวิจัยสมัยใหม่ในปัจจุบัน โดยจะเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ การจัดการ การผสมของอนุภาคที่มีขนาดเล็กตั้งแต่ 1 ถึง 100 นาโนเมตร ซึ่งจะมีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทั้งทางเคมี ทางกายภาพ และทางชีวภาพ ปัจจุบันได้มีการคิดค้นวิธีการปรับปรุงรูปร่างสัณฐาน ขนาด และการกระจายตัวของอนุภาคนาโนมากขึ้น นำมาสู่การประยุกต์ใช้อนุภาคนาโนในรูปแบบใหม่ๆ เช่น ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อุตสาหกรรมเคมีอิเล็กทรอนิกส์ อุตสาหกรรมอาหารและยา รวมถึงใช้ในการรักษาทางการแพทย์ได้เช่นกัน (6) โดยเฉพาะอนุภาคเงินนาโน มีคุณสมบัติที่มีความจำเพาะมาก เช่น มีเสถียรภาพทางเคมีที่ดี มีการนำความร้อน การนำไฟฟ้า และการมีขนาดเล็กที่นอกจากจะทำให้มีพื้นที่ผิวเพิ่มมากขึ้นแล้ว ขนาดที่เล็กยังแทรกเข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียได้ดี ช่วยต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส และเชื้อราได้ (6) การสังเคราะห์อนุภาคเงินนาโนมีวิธีสังเคราะห์ได้ 2 วิธี คือ การสังเคราะห์โดยเริ่มจากการรวมกลุ่มของอะตอมขนาดเล็กจนมีการสร้างนิวคลีไอใหม่ และเติบโตจนกลายเป็นอนุภาคขนาดนาโน ซึ่งจะเป็นการสังเคราะห์แบบใช้วิธีทางเคมี และทางชีวภาพ ส่วนอีกวิธีหนึ่งคือ จะเป็นการสังเคราะห์อนุภาคเงินนาโนแบบทางกายภาพ โดยจะสลายวัสดุขนาดใหญ่จากที่มีลักษณะเป็นก้อน ให้มีขนาดเป็นอนุภาคที่เล็กลงหลายๆ

ขึ้น ซึ่งวิธีทางเคมีและวิธีทางกายภาพจะนิยมใช้สารเคมีในการสังเคราะห์ทำให้เกิดพิษทางชีวภาพ ปัจจุบันจึงให้ความสนใจศึกษากระบวนการสังเคราะห์อนุภาคเงินนาโนด้วยสารสกัดจากธรรมชาติ เช่น สารสกัดจากพืช แทนการใช้สารเคมีมากขึ้น เพื่อลดความเป็นพิษทางชีวภาพ เนื่องจากสารเคลือบผิวที่ได้จากการสกัดจากพืชมีประจุเป็นลบ จึงสามารถจับกับประจุบวกของอนุภาคเงินและป้องกันการตกตะกอนของอนุภาคเงินนาโนได้ นอกจากนี้ สารสกัดจากพืชยังทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์ (Reducing agent) ช่วยสังเคราะห์อนุภาคเงินนาโนได้อีกด้วย

กระเจี๊ยบแดง (*Hibiscus sabdariffa* L.) เป็นพืชสมุนไพรที่มีการศึกษาว่าสามารถนำมาใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคเงินนาโนได้ (7) โดยพบว่ากระเจี๊ยบแดงเกือบทุกส่วนถูกนำมาใช้รักษาทางการแพทย์แบบดั้งเดิมในหลายๆประเทศ เช่น ตัวใบสามารถนำมาทานได้ ช่วยในการขับปัสสาวะ ช่วยขับถ่ายหรือใช้เป็นยาระบาย ช่วยย่อยอาหาร ด้านทานการติดเชื้อมีส่วนทำให้รู้สึกสบายหรือใช้เป็นยานอนหลับได้ และช่วยในการห้ามเลือด กระเจี๊ยบแดงจะมีสารที่มีสีเรียกว่าแอนโทไซยานินส์ (Anthocyanins) ซึ่งจะมีส่วนของสารประกอบฟีนอล (Phenolic compound) ในปริมาณสูง เช่น ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) กรดฟีนอลิก (Phenolic acids) โดยสารประกอบฟีนอลเป็นสารที่จะพบตามธรรมชาติในพืชหลายชนิด เป็นสารที่ดีต่อสุขภาพ มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ (8-10) ด้วยประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของทั้งอนุภาคเงินนาโน และสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง จึงได้มีการศึกษาฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของอนุภาคเงินนาโนที่มีสารเคลือบผิวเป็นสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงต่อเชื้อแบคทีเรียแบคทีเรีย แอคติโนไมซีเทมคอมมิแทนส์ มีการศึกษาพบว่าอนุภาคเงินนาโนชนิดนี้สามารถต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียแบคทีเรีย แอคติโนไมซีเทมคอมมิแทนส์ ได้ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง (7) ผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการนำอนุภาคเงินนาโนที่มีสารเคลือบผิวเป็นสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงมาพัฒนาเป็นยาต้านจุลชีพเฉพาะที่ในการรักษาโรคปริทันต์ โดยการวิจัยก่อนหน้านี้ได้นำอนุภาคเงินนาโนที่มีสารเคลือบผิวเป็นสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงมาขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มโดยใช้อัลจินตและศึกษาผลการต้านต่อเชื้อแบคทีเรียแบคทีเรีย แอคติโนไมซีเทมคอมมิแทนส์ ซึ่งผลการวิจัยพบว่าสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียแบคทีเรีย แอคติโนไมซีเทมคอมมิแทนส์ ได้หมดภายในเวลา 180 นาที แผ่นฟิล์มนี้เมื่อสัมผัสอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีการสลายตัวอย่างรวดเร็วภายใน 24 ชั่วโมง ซึ่งคุณสมบัติของสารต้านจุลชีพเฉพาะที่ที่ดีควรมีระยะเวลาในการปล่อยสารออกมาฆ่าเชื้อจุลชีพที่ยาวนานเพียงพอ หรือสามารถควบคุมการปลดปล่อยได้ตามรูปแบบที่เหมาะสม ดังนั้นผู้วิจัยจึงต้องการเพิ่มการคงตัวของแผ่นฟิล์มอนุภาคเงินนาโนด้วยการใช้สารที่มีคุณสมบัติช่วยในการขึ้นรูปแผ่นฟิล์มที่มีประสิทธิภาพที่ดีมากขึ้น เช่น แคลเซียมคลอไรด์ (Calcium chloride) โดยแคลเซียมคลอไรด์ถูกนำมาใช้ในการเชื่อมพันธะของอัลจินตซึ่งถูกใช้อย่างแพร่หลายในกลุ่มการขนส่งยาเฉพาะที่ (Local drug delivery) มีหลายการศึกษาพบว่า แคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) จะมีความจำเพาะต่อการจัดเรียงตัวในอัลจินต โดยการจับกับประจุบวกของ guluronate ทำให้เกิดการเชื่อมกันของ

สายโพลีเมอร์ได้ดีมากขึ้นจึงมีความคงตัวมากขึ้น (Improvement polymer stability) (11-13) ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงสนใจจะนำสารแคลเซียมคลอไรด์มาใช้ในการพัฒนาการขึ้นรูปของอนุภาคนาโนที่มีสารเคลือบผิวเป็นสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง ช่วยทำให้มีโครงสร้างที่ดีมากขึ้นและช่วยควบคุมการปลดปล่อยให้ยาวนานมากขึ้น

วัตถุประสงค์ของโครงการ

- 1) ศึกษาความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ ที่มีผลต่อการขึ้นรูปอนุภาคนาโนที่มีสารเคลือบผิวเป็นสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง
- 2) ศึกษาความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่มีผลต่อการปลดปล่อยอนุภาคนาโนที่มีสารเคลือบผิวเป็นสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง
- 3) ศึกษาความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่มีผลต่อการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ-แอคติโนไมซีเทมคอมมิแทนส์ของอนุภาคนาโนที่มีสารเคลือบผิวเป็นสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง

สมมุติฐานของโครงการ

ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่มากขึ้นจะสามารถเพิ่มระยะเวลาในการปลดปล่อยอนุภาคนาโนในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ-แอคติโนไมซีเทมคอมมิแทนส์ ได้

ขอบเขตของโครงการ

- ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

- | | |
|------------------|---|
| 1. ประชากร | 1.1 เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ-แอคติโนไมซีเทมคอมมิแทนส์ |
| 2. กลุ่มตัวอย่าง | 2.1 เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ-แอคติโนไมซีเทมคอมมิแทนส์ สายพันธุ์ ATCC29523 |

- ตัวแปรที่ศึกษา

1. ตัวแปรต้น ได้แก่ แคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1, 3 และ 5 %w/v
2. ตัวแปรตาม ได้แก่ ปริมาณของอนุภาคนาโนที่ปลดปล่อยออกมาในระยะเวลาต่างๆ และ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone)

- สถานที่จัดทำโครงการ

ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา1 คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธนเรศวร

- ระยะเวลาในการศึกษา

มีนาคม 2564 – ธันวาคม 2564

บทที่ 2

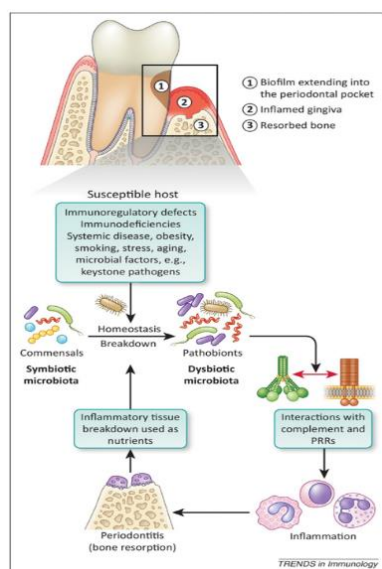
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคปริทันต์

โรคปริทันต์เป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบของอวัยวะปริทันต์ได้แก่ เหงือก เอ็นยึดปริทันต์ เคลือบรากฟัน และกระดูกเขี้ยวฟัน การอักเสบของเนื้อเยื่อเหงือกอย่างเดียวจะเรียกว่า โรคเหงือกอักเสบซึ่งพบได้มากในประชากรทั่วไป หากเชื้อรุนแรงมากขึ้น หรือในประชากรที่มีภูมิคุ้มกันผิดปกติ อาจนำไปสู่การทำลายของอวัยวะปริทันต์เพิ่มมากขึ้น มีการทำลายเหงือก เอ็นยึดปริทันต์ เคลือบรากฟัน มีการสูญเสียของกระดูกเขี้ยวฟัน ฟันโยก นำไปสู่โรคปริทันต์อักเสบได้ (14) กลไกการเกิดโรคปริทันต์เกิดเมื่อมีเชื้อโรคเข้ามาในร่างกายโดยจะมีการหลั่งสารที่มีปัจจัยก่อโรค (Virulence factors) ออกมา โดยเชื้อแต่ละชนิดก็จะมีปัจจัยก่อโรคที่มีความรุนแรงแตกต่างกัน เมื่อร่างกายตรวจพบว่ามีเชื้อโรคเข้ามาก็จะเกิดการกระตุ้นแมโครฟาจ (Macrophage) ให้มีการหลั่งไซโตไคน์ (Cytokine) ไปกระตุ้นให้มีการเคลื่อนของนิวโทรฟิล (Neutrophils) เข้ามาบริเวณที่มีเชื้อ ซึ่งนิวโทรฟิลจะเป็นเซลล์ภูมิคุ้มกันตัวแรกที่เข้ามาเพื่อกำจัดเชื้อ โดยนิวโทรฟิลที่เข้ามากำจัดเชื้อจะเข้ามาภายในเวลาไม่กี่ชั่วโมงภายหลังจากมีเชื้อเข้ามา และจะพบมากที่สุดเมื่อผ่านไป 24 ชั่วโมง นิวโทรฟิลจะทำหน้าที่คือ

1. Pattern recognition receptor (PRR)
2. ฟาโกไซโทซิส (Phagocytosis)
3. Oxidative attack (ROS, RNS) และ Non oxidative attack
4. การสร้าง NETs (15, 16) จากนั้นเมื่อกำจัดเชื้อจนถึงขีดจำกัดแล้ว นิวโทรฟิลก็จะเกิดการทำลายตัวเองด้วยวิธี การขจัดตัวเอง (Apoptosis) แล้วแมโครฟาจก็จะเข้ามาเก็บกินนิวโทรฟิลที่ตาย รวมถึงช่วยกำจัดเชื้อโดยวิธีฟาโกไซโทซิส นอกจากนั้นแมโครฟาจยังทำหน้าที่เป็น Antigen presenting cells (APC) เช่นเดียวกับ เด็นไดรติกเซลล์ (Dendritic cell) และ บีลิมโฟไซต์ (B-lymphocyte) ในการนำชิ้นส่วนบางส่วนของเชื้อแสดงออกบนผิวเซลล์ผ่าน MHC- class II ไปกระตุ้นเซลล์ภูมิคุ้มกันในระดับที่สูงขึ้น จำเพาะกับเชื้อมากขึ้น คือ CD4 T-cell ให้มีการหลั่ง ไซโตไคน์ออกมาเพื่อช่วยกำจัดเชื้อที่ยังเหลืออยู่ (17)

หากร่างกายไม่สามารถกำจัดเชื้อโรคออกได้หมด หรือการที่เชื้อก่อโรคที่รุนแรงมีปริมาณมากๆ ก็จะมีการสร้างผลิตภัณฑ์ที่เอื้อให้สิ่งแวดล้อมมีการเปลี่ยนแปลงไป จากภาวะ Symbiosis microbiota คือภาวะที่เชื้อในร่างกายอยู่ในสภาวะสมดุลไม่ก่อให้เกิดโรค เข้าสู่ภาวะ Dysbiosis microbiota คือภาวะที่ไม่สมดุลของเชื้อ มีเชื้อก่อโรคเพิ่มมากขึ้นนำไปสู่การลุกลามของโรค แสดงดังภาพที่ 1 ปัจจัยสำคัญที่มีส่วนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของภาวะดังกล่าวนั้นก็คือการมี Keystone pathogen ได้แก่ เชื้อพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालิส ซึ่งเป็นเชื้อที่มีความรุนแรง ถึงแม้จะมีปริมาณน้อยก็

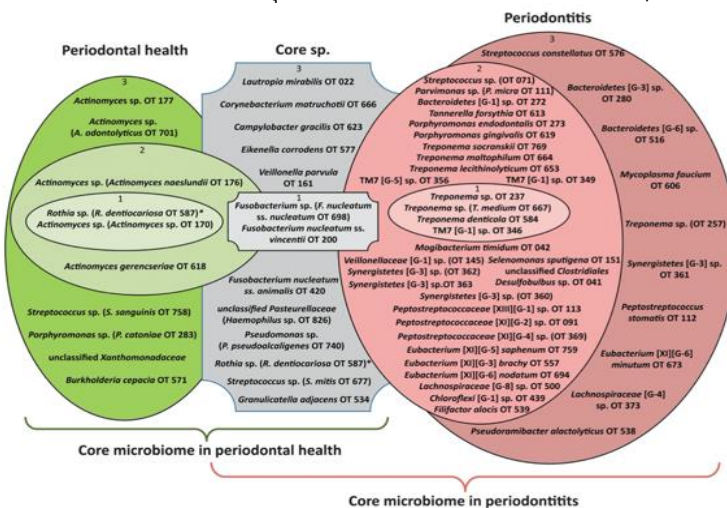


ภาพ 1 แสดงการเปลี่ยนจากภาวะ symbiosis microbiota เป็น dysbiosis microbiota (18)

สามารถทำให้เกิดโรคได้ ตามทฤษฎี Polymicrobial synergy dysbiosis หรือ PSD model (19) ดังนั้นจึงทำให้เชื้อก่อโรคที่มีอยู่เดิมมีการเติบโตมากขึ้น เกิดความไม่สมดุลของจุลชีพบริเวณนั้น มีการกระตุ้นสารอักเสบ อาทิเช่น IL-1, TNF และ IL-17 ซึ่งเป็นไซโตไคน์ ที่จะไปกระตุ้นให้เกิดการอักเสบ เกิดการหลั่งสารทำลายเนื้อเยื่อและกระดูกได้ เช่น ROS และ MMP ในการทำลายเหงือก และ RANK ที่จะไปจับกับ RANK-L กระตุ้นการทำลายกระดูกได้ ดังนั้น ภาวะ Dysbiosis microbiota จึงเป็นการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญที่จะทำให้สิ่งแวดล้อมมีการเปลี่ยนแปลงไปเอื้อให้ร่างกายมีการอักเสบเพิ่มขึ้น มีจุลชีพก่อโรคมมากขึ้น จนนำไปสู่การทำลายอวัยวะปริทันต์ได้ (14, 17-19)

จุลชีพที่อยู่ได้เหงือกในผู้ป่วยสุขภาพดี และผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบจะมีความแตกต่างกัน แสดงดังภาพที่ 2 โดยในผู้ป่วยที่มีสุขภาพช่องปากดี (Periodontal health) มักพบจุลชีพกลุ่มแอกติโนมัยเซส สปีชีส์ (*Actinomyces spp.*), สเตรปโตคอคคัส สปีชีส์ (*Streptococcus spp.*) และแคปโนไซโทฟากา สปีชีส์ (*Capnocytophaga spp.*) เป็นต้น จุลชีพเหล่านี้อยู่ร่วมกับคนได้โดยไม่ทำให้เกิดโรค ส่วนในกลุ่ม Core species จะเจอได้ทั้งคนที่ เป็นโรคและไม่เป็นโรค ในสัดส่วนที่เท่าๆ กัน เช่น ฟิวโซแบคทีเรียม สปีชีส์ (*Fusobacterium spp.*) ซึ่งจะเป็น bridging species คือ เป็นตัวเชื่อมของจุลชีพที่เกิดก่อนและหลังของการเกิด biofilm และสุดท้ายคือ เชื้อกลุ่มที่พบมากในกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ (Periodontitis) พบน้อยในกลุ่มผู้ป่วยสุขภาพดี ได้แก่ ทรีโพนีมา สปีชีส์ (*Treponema spp.*), พอร์ไฟโรโมนัส สปีชีส์ (*Porphyromonas spp.*), แทนเนอเรลลา ฟอริไซเทีย (*Tannerella forsythia*) และพรีโวเทลลา สปีชีส์ (*Prevotella spp.*) เป็นต้น เรียกกลุ่มเหล่านี้ว่า Pathobionts คือ เชื้อก่อโรค หากมีปริมาณน้อยจะไม่ทำให้เกิดโรค เมื่อมีปริมาณมากขึ้นร่วมกับสิ่งแวดล้อม

นั้นมีการเปลี่ยนแปลงไป เช่น มีการอักเสบ เชื่อเหล่านี้จะอาศัยผลิตภัณฑ์จากบริเวณที่มีการอักเสบในการเจริญเติบโต ทำให้ในบริเวณนั้นจะพบจุลชีพเหล่านี้ได้มากขึ้น(Inflammophilic) (19-21)



ภาพ 2 แสดงชนิดจุลชีพที่แตกต่างกันในผู้ป่วยสุขภาพดี และผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ

(20)

จุลชีพที่อยู่ใต้เหงือก สามารถการต้านทานต่อภูมิคุ้มกันของร่างกายได้ เนื่องจากการทำความสะอาดตามปกติไม่สามารถเข้าไปทำความสะอาดได้ การใช้ยาบ้วนปากที่ผสมยาปฏิชีวนะ และภูมิคุ้มกันร่างกายที่มาจากน้ำลายที่อยู่ในช่องปากก็จะไม่สามารถเข้าไปถึงบริเวณนี้ได้ ทำให้ภูมิคุ้มกันที่จะมาทำลายได้มีเพียงน้ำเหลืองเหงือก (Gingival crevicular fluid : GCF) เท่านั้น ดังนั้นการกำจัดจุลชีพที่อยู่ใต้เหงือกจึงมีความสำคัญ นั่นคือการรักษาด้วยวิธีขูดหินน้ำลายและเกลารากฟัน อาจร่วมกับการใช้ยาต้านจุลชีพเฉพาะที่ในบริเวณที่ลึกมากๆ และผู้ป่วยไม่สามารถเข้าไปทำความสะอาดได้ (22)

เชื้อแบคทีเรียที่ปัจจุบันพบว่าเป็นเชื้อก่อโรคปริทันต์ที่สำคัญ (Key periodontal pathogen) ได้แก่ เชื้อพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิวัลิส, แทนเนอเรลลา ฟอร์ไซเทียร์ และ แอกริกเกทิแบกเทอร์ แอกริโนไมซีเทมคอมมิแทนส์หนึ่งในนี้คือ เชื้อพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิวัลิส ปัจจุบันพบว่าเป็นเชื้อที่เป็น Keystone pathogen คือ เป็นเชื้อที่แม้จะมีปริมาณไม่มากแต่สามารถทำให้เกิดโรคได้ โดยพบว่าเป็นสาเหตุทำให้เกิดการทำลายอวัยวะปริทันต์ จนนำไปสู่การเป็นโรคปริทันต์ได้ เนื่องจากเชื้อชนิดนี้จะไปทำให้เชื้อก่อโรคตัวอื่นๆ สามารถเจริญเติบโตได้มากขึ้น (18, 19) โดยเชื้อแต่ละชนิดก็จะมีปัจจัยก่อโรคที่แตกต่างกัน ซึ่งหน้าที่ของปัจจัยก่อโรคนั้นก็คือ ทำให้เชื้อสามารถสร้างโคโลนีที่สมบูรณ์ได้ เชื้อสามารถทำการลู่เข้าไปยังเซลล์เจ้าบ้าน (Host cell) ได้ เพื่อหลบหลีกภูมิคุ้มกันของร่างกายที่หลั่งออกมา และสุดท้ายคือสามารถปล่อยสารออกมาทำลายเซลล์เจ้าบ้านได้ มีการศึกษาพบว่าสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปเช่น อุณหภูมิ ความเข้มข้นของธาตุเหล็กแมกนีเซียม และการอักเสบในบริเวณนั้นจะมีผลต่อการสร้างปัจจัยก่อโรคได้ (23)

การติดเชื้อของโรคปริทันต์ เกี่ยวข้องกับจุลชีพบางชนิดในคราบจุลินทรีย์ โดยโรคเหงือกอักเสบ มักจะพบจุลชีพรูปร่างกลมหรือแท่ง อาศัยออกซิเจน ดัดสีแกรมบวกหรือลบไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ส่วนในโรคปริทันต์อักเสบ มักจะพบจุลชีพชนิดรูปร่างเกลียวหรือแท่ง ไม่อาศัยออกซิเจนหรือปรับตัวได้กับออกซิเจน ดัดสีแกรมลบ บางสายพันธุ์เคลื่อนที่ได้ (24) จากการศึกษาของ Socransky และคณะ ได้แบ่งชนิดของแบคทีเรียออกเป็น 6 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มสีเหลือง กลุ่มสีม่วง กลุ่มสีน้ำเงิน กลุ่มสีเขียว กลุ่มสีส้ม และกลุ่มสีแดง โดยใน 4 กลุ่มแรก จะเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่เป็นช่วงต้นของการสร้างแผ่นชีวภาพ (Biofilm) ไม่ทำให้เกิดโรค หรือบางสายพันธุ์ยังมีประโยชน์ในการยับยั้งการเจริญจุลชีพอื่นๆ ได้อีกด้วย ส่วนในกลุ่มสีส้ม ได้แก่ ฟิวโซแบคทีเรียม สปีชีส์ จะเป็นตัวเชื่อมต่อระหว่างจุลชีพกลุ่มที่เข้ามาก่อน และจุลชีพที่เข้ามาภายหลัง ซึ่งมักจะเป็นจุลชีพกลุ่มสีแดง (Red complex) ได้แก่ พอร์ไฟโรโมนัส จิงจิवालิส, แทนเนอเรลลา ฟอร์ไซเทียร์ และ ทรีโพนีมา-เด้นทีโคลา ซึ่งเป็นจุลชีพที่มีจะพบใกล้กับเยื่อบุผิวร่องลึกปริทันต์ ในบริเวณที่มีการลุกลามของโรคปริทันต์อักเสบ (25, 26)

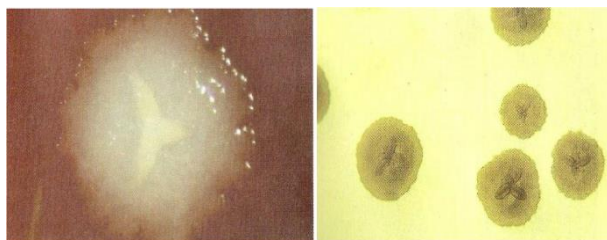
เชื้อแอกกริเทกิแบกเทอร์ แอกทีโนไมซีเทมคอมมิแทนส์

ลักษณะโดยทั่วไป

เป็นแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์ที่สำคัญ โดยสัมพันธ์กับโรคปริทันต์อักเสบชนิดที่มีการลุกลามแบบรุนแรง เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีลักษณะรูปร่างเป็นแท่งสั้นๆ ปลายมน (Coccobacillus) ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ไม่มีแคปซูลห่อหุ้ม (27)

การเพาะเชื้อแอกกริเทกิแบกเทอร์ แอกทีโนไมซีเทมคอมมิแทนส์

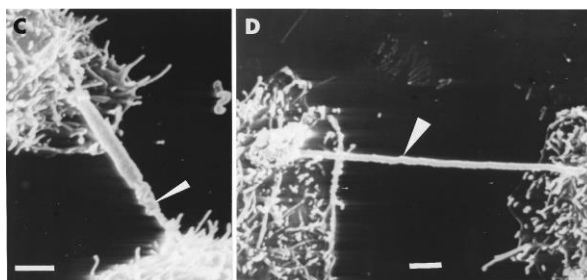
การเพาะเชื้อสามารถทำได้ในวุ้นเหลว (Agar) เช่น blood agar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจน โคลินีส่วนมากจะปรากฏให้เห็นหลัง 24 ชั่วโมง ลักษณะโคโลนีจะมีผิวขรุขระ มีลักษณะคล้ายดาว (star-shaped) ดังภาพที่ 3 การเพาะเลี้ยงง่ายกว่า พอร์ไฟโรโมนัส-จิงจิवालิส และ แทนเนอเรลลา ฟอร์ไซเทียร์



ภาพ 3 แสดงลักษณะ colony รูปดาวของเชื้อแอกกริเทกิแบกเทอร์ แอกทีโนไมซีเทมคอมมิแทนส์

ปัจจัยก่อโรค (Virulence factors)

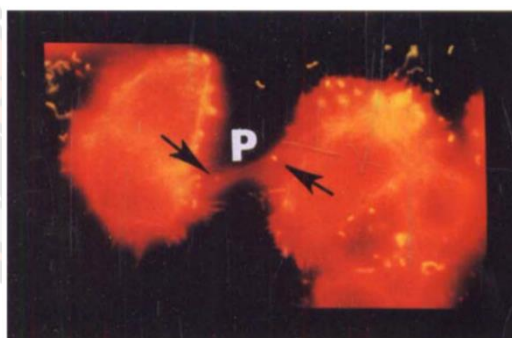
1. Fimbrial adhesins ร่วมกับมีลักษณะเป็น pili ยื่นไปยึดกับแบคทีเรียที่อยู่ใกล้ๆ ได้ แสดงในภาพที่ 4 (1)



ภาพ 4 แสดงลักษณะ fimbriae และ pili ที่ยื่นไปยังแบคทีเรียที่อยู่ใกล้ๆ

(3)

2. Non-fimbrial adhesins ลักษณะ 3 ชนิด autotransporter adhesins ได้แก่ Aae, ApiA, Extracellular matrix protein adhesin A และ Polysaccharide อื่นๆ จึงทำให้เชื้อแอกกริเกทิแบกเทอร์ แอกทีโนไมซีเทมคอมิแทนส์สามารถเข้าไปในเซลล์ของเจ้าบ้าน (Host cell) ได้ ดังภาพที่ 5 เพื่อหลบเลี่ยงภูมิคุ้มกันของร่างกายที่จะมาทำลาย คล้ายกับเชื้อพอไฟโรโมแนส จึงฉวยโอกาสแต่เข้าไปได้น้อยกว่า (1, 3)



ภาพ 5 แสดงถึงเชื้อแอกกริเกทิแบกเทอร์ แอกทีโนไมซีเทมคอมิแทนส์ สามารถเข้าไปอยู่ภายในเซลล์เจ้าบ้านได้

(29)

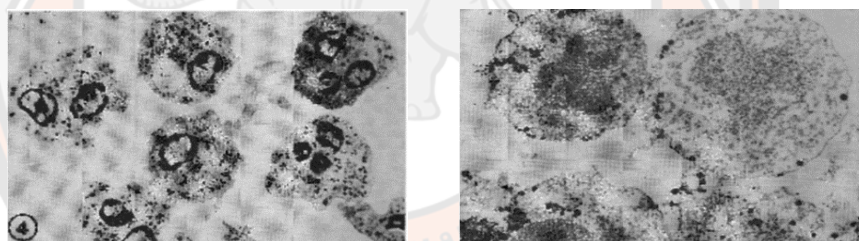
3. เชื้อแอกกริเกทิแบกเทอร์ แอกทีโนไมซีเทมคอมิแทนส์ จะสามารถสร้างลิวก์ท็อกซิน (Leukotoxin) ออกมาทำลายเซลล์เจ้าบ้านได้ (2)

ซึ่งปัจจุบันได้มีการค้นพบลงไปถึงระดับโมเลกุลมากขึ้น โดยได้ค้นพบ สายพันธุ์ JP2 ซึ่ง DNA มีการหายไปของเบสแพร์ที่ 530 ในโปรโมเตอร์ ของ leukotoxin operon ที่ 28

ทำให้โปรตีนที่ผลิตออกมามีการเปลี่ยนแปลงไป เกิดการสร้างลิโคที่อกซิน ที่สูงมากกว่า เซื้อ แอกริกเททิแบกเทอร์ แอทีโนไมซีเทมคอมิแทนส์ สายพันธุ์อื่นๆ

ลิโคที่อกซินจะจับกับรีเซปเตอร์ Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) ซึ่งจะพบแต่ในระบบเลือดเท่านั้น โดยการทำงานของ ลิโคที่อกซิน นั้น สามารถที่จะสลายนิวโทรฟิลได้ ซึ่งนิวโทรฟิลปกติที่อยู่ในเลือด เมื่อถูกย่อยแล้ว องค์ประกอบด้านในของนิวโทรฟิล ก็จะออกมาสู่ด้านนอกเจอกับ ลิโคที่อกซิน ทำให้อวัยวะเซลล์ไซโทพลาสซึม (Cytoplasmic organelle) รวมถึงนิวเคลียสสลายไปได้ แสดงดังภาพที่ 6

ความสำคัญของนิวโทรฟิลจะเป็นเซลล์ภูมิคุ้มกันชนิดแรก ที่จะเข้ามากำจัดเชื้อเมื่อมีเชื้อเข้ามาในร่างกาย เมื่อนิวโทรฟิลไม่สามารถทำงานได้ จะมีการกระตุ้นให้ร่างกายพยายามที่จะสร้างนิวโทรฟิลออกมามากขึ้นเพื่อกำจัดเชื้อ นิวโทรฟิลที่สร้างออกมาจำนวนมากผิดปกติ จะมีการสร้าง Neutrophil extracellular traps (NETs) ที่มีลักษณะเป็นร่างแหออกมามากขึ้นและจะมีการสร้าง Reactive oxygen species (ROS) ซึ่งจะมีผลให้เนื้อเยื่อบริเวณนั้นเกิดความเครียดที่เพิ่มขึ้น ทำให้มีการสลายของเนื้อเยื่อบริเวณนั้น ในทางคลินิกอาจส่งผลให้เกิดการอักเสบแบบเฉียบพลัน และมีการสร้างหนองขึ้นมาได้ (30)



ภาพ 6 ซ้ายมือ แสดงถึงนิวโทรฟิลก่อนสัมผัสกับ ลิโคที่อกซิน ขวามือ แสดงถึงการสลายของนิวโทรฟิลภายหลังสัมผัสกับลิโคที่อกซิน

(29)

นอกจากนั้นแล้ว ลิโคที่อกซินยังไปกระตุ้นให้มีการสร้างและหลั่ง MMP-8 ซึ่งเป็นสารก่ออักเสบ (Pro-inflammatory mediator) ที่สำคัญในการทำลายเนื้อเยื่อแข็งอก ส่วนผลกระทบอื่นๆ ของ ลิโคที่อกซิน คือ จะไปทำให้ ทีลิมโฟไซต์ (T-lymphocyte) และ NK cell ตายได้ ส่วนผลต่อบีลิมโฟไซต์ ยังไม่แน่ชัด นอกจากนั้นก็อาจมีผลกระทบต่อการแบ่งตัวของ ที ลิมโฟไซต์ จำพวก Th1/Th2/Th17 ได้ นอกจากนี้ ลิโคที่อกซินยังไปเพิ่มการสลายตัวของโมโนไซต์ ซึ่งพอมีการสลาย จะไปกระตุ้นการเพิ่มปริมาณ caspase-1 ซึ่งจะไปกระตุ้นการผลิตไซโตไคน์ก่ออักเสบ ได้แก่ IL-1 β และ IL-18 เมื่อมีการหลั่งสารก่ออักเสบมากขึ้น จะเพิ่มความรุนแรงเกิดการอักเสบ จนมีการทำลายอวัยวะปริทัศน์ตามมาได้ (2)

การรักษาโรคปริทันต์ (Non-surgical treatment) ได้แก่

การรักษาโรคปริทันต์อักเสบในปัจจุบันมี 2 แบบ คือ การรักษาแบบไม่ทำศัลยกรรมปริทันต์ (Non-surgical treatment) และการรักษาแบบทำศัลยกรรมปริทันต์ (Surgical periodontal treatment) โดยทั่วไปแล้วมักจะทำการรักษาแบบไม่ทำศัลยกรรมปริทันต์เป็นมาตรฐานก่อน ซึ่งจะ เป็นวิธีการรักษาในขั้นต้น (Initial phase or hygienic phase) เพื่อกำจัดสาเหตุของโรคปริทันต์ นั่น ก็คือ แบคทีเรียบนแผ่นคราบจุลินทรีย์ และป้องกันการกลับมาเป็นใหม่ เมื่อรักษาแบบไม่ทำศัลยกรรม ปริทันต์แล้วพบว่า ผู้ป่วยยังไม่สามารถทำความสะอาดในบริเวณนั้นได้ หรือรอยโรคยังไม่กลับมาใน ระดับที่ปกติ เช่น มีร่องลึกปริทันต์ที่ลึกมาก มีความวิการของง่ามรากฟัน (Furcation involvement) ในบริเวณที่ผู้ป่วยไม่สามารถทำความสะอาดได้ เป็นต้น จึงจะเข้าสู่กระบวนการรักษาแบบ ทำศัลยกรรมปริทันต์ เพื่อแก้ไข หรือกำจัดรอยโรคที่ยังหลงเหลืออยู่ ในขั้นตอนการรักษาขั้นแก้ไข (Corrective phase) เช่น Resective และ Regenerative Periodontal surgery

การรักษาโรคปริทันต์แบบไม่ทำศัลยกรรมปริทันต์

1. การให้คำแนะนำการดูแลสุขภาพ เช่น การสอนแปรงฟัน ใช้ไหมขัดฟัน และอุปกรณ์เสริม ต่างๆ
2. การขูดหินน้ำลายและเกลารากฟัน เพื่อกำจัดสาเหตุ และปัจจัยเสริมของการเกิดโรคปริทันต์ ได้แก่ แบคทีเรียในแผ่นคราบจุลินทรีย์ และหินน้ำลาย
3. การต้านการติดเชื้อ (Anti-infection periodontal therapy) ด้วยการใช้สารต้านจุลชีพ (Chemical method) เพื่อลดหรือกำจัดคราบจุลินทรีย์ ในบริเวณเนื้อเหงือก และได้เหงือก ส่งเสริมให้การควบคุมแบคทีเรียมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น นอกเหนือจากการขูดหินน้ำลาย และเกลารากฟัน

ในผู้ป่วยที่มีร่องลึกปริทันต์ที่ลึกมาก จะมีข้อจำกัดในการใช้เครื่องมือไปทำความสะอาดใน บริเวณนั้น มีการศึกษาพบว่าขนของแปรงสีฟันจะเข้าไปในร่องเหงือกได้ประมาณ 0.9 มิลลิเมตร (31) นอกจากนั้นการใช้ไหมขัดฟันและแปรงซอกฟันจะเข้าไปทำความสะอาดในบริเวณฟันหลังได้ยาก ทำ ให้ผู้ป่วยจึงไม่ได้ใช้เครื่องมือไปทำความสะอาดซอกฟันอย่างสม่ำเสมอ (32, 33) ส่วนการขูดหินน้ำลาย และเกลารากฟันที่เป็นวิธีทางกล (Mechanical method) ที่สำคัญและเป็นวิธีมาตรฐานก็มีข้อจำกัด ในการเข้าไปทำความสะอาดบริเวณรากฟันบางตำแหน่ง จึงไม่สามารถกำจัดจุลชีพก่อโรคได้หมด (34, 35) และมีรายงานว่า การรักษาทางปริทันต์ตามปกติ คือการขูดหินน้ำลายและเกลารากฟัน พบว่าเชื้อ แอกริเกทิบาแกเทอร์ แอคติโนไมซีเทมคอบิแทนส์ กลุ่มที่มี สายพันธุ์ JP2 จะมีการตอบสนองต่อการ รักษาน้อยกว่า สายพันธุ์ non-JP2 ดังนั้นการรักษาปกติอาจไม่สามารถกำจัดเชื้อ แอกริเกทิบาแก- เทอร์ แอคติโนไมซีเทมคอบิแทนส์ ออกได้ จำเป็นต้องมีการรักษาที่จำเพาะต่อเชื้อมากขึ้น (2, 36)

ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงมีการนำสารต้านจุลชีพเข้ามาจึงเสริมการรักษาโรคปริทันต์ให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

ยาต้านจุลชีพที่ใช้ในการรักษาโรคปริทันต์จำแนกตามวิธีใช้ยา (Route of administration) ได้แก่

1. ยาต้านจุลชีพทางระบบ ชนิดกลุ่มยารับประทาน เช่น methronidazole, tetracycline และ amoxycillin เป็นต้น (37-39)
2. ยาต้านจุลชีพเฉพาะที่ เช่น น้ำยาบ้วนปาก ยาสีฟัน การฉีดล้างเนื้อเหงือกและใต้เหงือก และระบบนำส่งยาเฉพาะที่ในร่องลึกปริทันต์

ข้อดีของยาต้านจุลชีพเฉพาะที่ คือ นำไปใช้ในตำแหน่งที่ต้องการให้ยาออกฤทธิ์ได้โดยตรง ทำให้ปริมาณความเข้มข้นของยาในร่องลึกปริทันต์สูงกว่าการใช้ยาต้านจุลชีพทางระบบ ใช้ปริมาณยาน้อยลง และลดอาการไม่พึงประสงค์ของการใช้ยา เช่น การดื้อยา หรือ การแพ้ยาได้ (5)

ข้อเสียของยาต้านจุลชีพเฉพาะที่ คือ การคงความเข้มข้นให้นานพอที่จะยับยั้งการเจริญเติบโตหรือฆ่าจุลชีพ ระยะเวลาที่นานพอจะออกฤทธิ์ต่อจุลชีพ มักพบปัญหาในการนำไปใช้บริเวณง่ามรากฟัน (40) การใช้เวลานานหากมีการทำหลายๆตำแหน่งอาจนำมาซึ่งการติดเชื้อซ้ำได้ และมีราคาสูงจากการนำเข้าจากต่างประเทศ ทำให้มีการวิจัยเพื่อค้นหาสารสกัดจากสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบได้เช่นกัน ยกตัวอย่างเช่น การใช้สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง (7) ใบชา (41, 42)

รูปแบบยาต้านจุลชีพเฉพาะที่ แบ่งเป็น 7 ชนิด (4)

1. น้ำยาบ้วนปาก (Mouth rinses)
2. เจล (Gels)
3. ยาสีฟัน (Dentifrices)
4. วาณิช (Varnishes)
5. อุปกรณ์ฉีดล้าง (Irrigators)
6. สเปรย์ (Sprays)
7. ระบบนำส่งยาเฉพาะที่ (Local drug delivery system)

ระบบนำส่งยาเฉพาะที่ (Local drug delivery system)

การใช้ยาต้านจุลชีพเพื่อกำจัดจุลชีพในร่องลึกปริทันต์ สารที่เลือกใช้ต้องเข้าถึงและคงอยู่ในรอยโรคอย่างน้อย 7-10 วัน ในความเข้มข้นอย่างน้อย 100 เท่าของค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ยับยั้งการเจริญเติบโตในแผ่นชีวภาพ (43) ดังนั้นยาต้านจุลชีพเฉพาะที่แบบอื่น ๆ จึงมีข้อจำกัด เช่น น้ำยาบ้วนปากไม่สามารถลงไปร่องลึกปริทันต์ได้ การฉีดล้างก็มีช่วงเวลาออกฤทธิ์ที่สั้น และจะถูกล้างออกไปอย่างรวดเร็ว ดังนั้นการใช้ยาต้านจุลชีพเฉพาะที่ได้เหงือกด้วยระบบที่มีการคงอยู่ของตัวยยาทำให้ยามีความเข้มข้นสม่ำเสมอ และปล่อยยาอย่างช้าๆออกมาในร่องลึกปริทันต์ได้เป็นเวลานาน ไม่ถูกชะล้างไปกับน้ำเหลืองเหงือก จึงเป็นวิธีที่ช่วยเสริมประสิทธิภาพการซูดหินน้ำลายและเกลารากฟันได้ดี (4)

ระบบนำส่งยาเฉพาะที่มี 2 ชนิด

1. ตัวยาที่มีการคงตัวของยา ทำให้ยาถูกปล่อยออกมาในร่องลึกปริทันต์ในเวลาอย่างน้อยกว่า 24 ชั่วโมง (sustained release devices)
2. ตัวยาที่มีการคงตัวของยา ทำให้ยาถูกปล่อยออกมาในร่องลึกปริทันต์ได้นานกว่า 24 ชั่วโมง (controlled release devices)

รูปแบบตัวยาที่ใช้เก็บรักษายา ได้แก่

1. สารละลาย (Solutions)
2. ครีမ် (Paste)
3. เส้นใยที่มีลักษณะกลวง (Hollow fiber)
4. แถบอะคริลิก (Acrylic strip)
5. เส้นใยโมโนลิทิก (Monolithic fiber)
6. เซลลูโลสที่ย่อยสลายได้ (Resorbable cellulose)
7. คอลลาเจน (Collagen)
8. เจลที่ย่อยสลายได้ (Biodegradable gel) (4)

ข้อบ่งชี้ในการใช้ยาต้านจุลชีพด้วยระบบนำส่งยาเฉพาะที่

1. ใช้ร่วมกับการซูดหินน้ำลายและเกลารากฟันในตำแหน่งที่เข้าถึงยาก เช่น ร่องลึกปริทันต์ที่ลึกมากๆ
2. บริเวณร่องลึกปริทันต์ที่ลึกตั้งแต่ 5 มิลลิเมตรขึ้นไป ที่ยังมีการอักเสบอยู่ หรือมีการอักเสบซ้ำภายหลังรักษาแบบมาตรฐาน (ซูดหินน้ำลาย เกลารากฟัน และการดูแลอนามัยช่องปาก)
3. ในผู้ป่วยฝีปริทันต์ (periodontal abscess) หลังรักษาด้วยการเจาะระบายหนองและเกลารากฟัน

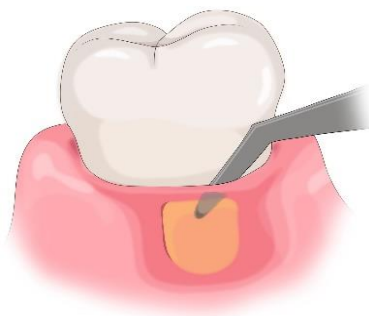
- ใช้ในการรักษาแบบประคับประคองในผู้ป่วยที่ไม่สามารถรักษาด้วยการทำศัลยกรรมปริทันต์ (4, 44)

ข้อดีของระบบนำส่งยาต้านจุลชีพเฉพาะที่

- ปริมาณยาที่ใส่เข้าไปมีความเข้มข้นที่สูงกว่ายาที่ใช้ทางระบบ โดยปริมาณของยาที่ให้มักทำให้มีความเข้มข้นยาในร่องเหงือกมากกว่า 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งความเข้มข้นของยาต้านจุลชีพระดับนี้สามารถฆ่าจุลชีพส่วนใหญ่ที่ต้านทานต่อการใช้ยาทางระบบได้
- ตัวยาคงอยู่ได้นานเพียงพอที่จะออกฤทธิ์ ยับยั้งการเจริญเติบโตหรือฆ่าจุลชีพตามคุณสมบัติของยาที่ใช้
- สามารถใส่ยาในบริเวณที่ต้องการฆ่าจุลชีพได้โดยตรง และตัวยາสามารถเข้าสู่จุดที่ลึกของร่องปริทันต์ได้
- สามารถรักษาความเข้มข้นของยาในร่องลึกปริทันต์ได้เป็นเวลานาน โดยนำไปรวมกับระบบส่งยาที่สามารถปล่อยตัวยาออกมาอย่างช้าๆ และสม่ำเสมอสู่ร่องลึกปริทันต์
- ลดผลข้างเคียงของยาที่อาจเกิดขึ้นเมื่อใช้ทางระบบ เช่น การระคายเคืองระบบทางเดินอาหาร และลดผลกระทบต่อจุลชีพประจำถิ่นในส่วนอื่นๆ ของร่างกาย (4, 45)

ข้อเสียของระบบนำส่งยาต้านจุลชีพเฉพาะที่

- ต้องใช้ตัวยาที่ทำให้ความเข้มข้นของยาคงที่ ในบริเวณที่ต้องการให้ยาออกฤทธิ์ในเวลาที่นานเพียงพอ
- เอนไซม์บางชนิดในช่องปากสามารถเผาผลาญยา ก่อนที่จะทำปฏิกิริยาในการยับยั้งเชื้อได้ เช่น เอนไซม์เปปติเดส (Peptidase) และเอนไซม์เอสเทอเรส (Esterase)
- การใส่ยาในบริเวณส่วนลึกของร่องปริทันต์ ง่ายยากทำได้ยากและใช้เวลานานมากในกรณีต้องการใส่หลายๆตำแหน่ง
- ออกฤทธิ์เฉพาะที่ ดังนั้นจึงไม่มีผลในตำแหน่งอื่นๆ ในช่องปาก เช่น ลิ้น ทอนซิล และเยื่อเมือกในปากซึ่งอาจมีเชื้อจุลชีพก่อโรคหลงเหลืออยู่ ทำให้เสี่ยงต่อการติดเชื้อซ้ำในบริเวณที่รักษาไปแล้ว
- มีราคาแพงกว่ายาต้านจุลชีพทางระบบ (4, 45)



ภาพ 7 แสดงตัวอย่างการใช้ยาต้านจุลชีพชนิดแผ่นฟิล์มในร่องลึกปริทันต์

(4)

ปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์ที่วางขายในท้องตลาดที่นำมาใช้เป็นสารเคมีบำบัดเฉพาะที่ในร่องลึก-ปริทันต์มีหลายรูปแบบ ได้แก่ tetracyclin fiber (Actisite[®]), Chlorhexidine chip (Periochip[®]), Doxycycline polymer (Atridox[®]), Metronidazole gel (Elyzol[®]), Minocyclin gel (Dentomycin, Periocline[®]), เจลฟ้าทะลายโจร, และเจลสารสกัดจากเปลือกมังคุด เป็นต้น(4) วิธีการใช้ยาต้านจุลชีพเฉพาะที่ใส่ลงในร่องลึกปริทันต์ ดังภาพที่ 7

การใช้ยาต้านจุลชีพเพื่อการรักษาโรคติดเชื้อมี 2 ปัจจัยสำคัญที่ต้องคำนึง

1. ความไวของเชื้อและระดับยาในร่างกาย คือ กระบวนการดูดซึม การกระจายตัว และการกำจัดออกนอกร่างกาย
2. อันตรายหรือฤทธิ์อันไม่พึงประสงค์ของยาที่มีต่อร่างกาย

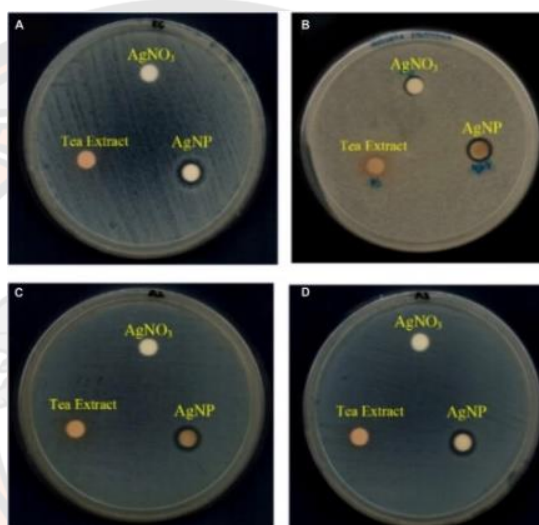
ค่า MIC คือ ค่าความเข้มข้นของยาในระดับต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเป็นค่าที่นิยมใช้บ่งบอกถึงความไวของเชื้อที่มีต่อยาและเป็นค่าที่ใช้ประกอบการพิจารณาถึงขนาดของยาต้านจุลชีพแต่ละชนิด ซึ่งส่วนใหญ่มักใช้การทดลองเพื่อหาประสิทธิภาพของยาต้านจุลชีพใหม่ ส่วนค่า MBC คือ ค่าความเข้มข้นของยาในระดับต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้

1. การทดสอบการเจือจาง (Dilution test) : การหาความเข้มข้นต่ำสุดของยา Minimum inhibition concentration (MIC) เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลชีพ หาได้จากการเจือจางสารละลายหรือยาให้มีความเข้มข้นต่างกันใส่ลงไปในหลอดที่มีเชื้อที่กำลังเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (ในหลอดทดลอง) ข้อดีคือ การได้ผลลัพธ์เชิงปริมาณที่สามารถนำไปเผยแพร่ได้ เช่น ค่า MIC ข้อเสียคือ เป็นวิธีที่มีการเตรียมสารละลายในระดับแมโครไดลูชัน (Macrodilution) ดังนั้น อาจเกิดความผิดพลาดในการเตรียมสารละลายยาปฏิชีวนะ หรือปริมาณน้ำยาได้ และนอกจากนี้วิธีนี้ต้องใช้ห้องทดลองที่มีขนาดใหญ่ในการทดลองมากกว่า เนื่องจากจำนวนจะมีการใช้ตัวอย่างที่มากกว่า (46)

2. การทดสอบแบบอาการ์ ดิสก์ ดิฟฟิวชัน (Agar disk diffusion test) : ทดสอบโดยการวางแผ่นกระดาษกรองมาตรฐานที่อิมมิดีด้วยสารละลายยาขนาดต่างๆ วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ผสมเชื้อที่ต้องการทดสอบ ทำการบ่มเพาะเชื้อ ซึ่งเป็นการตรวจฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลชีพของยาเบื้องต้น ซึ่ง

บอกผลในเชิงคุณภาพว่าเชื้อมีความไวต่อการทดสอบหรือไม่ โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางจากบริเวณโซนใสของการยับยั้ง (clear zone inhibition) ข้อดีของวิธีนี้ คือ ง่าย ประหยัด และสามารถตรวจตัวอย่างได้คราวละจำนวนมาก ข้อเสียคือ ขาดกลไกหรือการทดสอบที่เป็นอัตโนมัติ (46)

มีการศึกษาที่ได้ศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคเงินนาโนและนำไปทดสอบกับประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อจุลชีพโดยใช้วิธี Agar disk diffusion test โดยใช้สารสกัดจากชาผู้เอ๋อไปยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งจากการทดลองพบว่า จะเห็นเป็นลักษณะของโซนใสยับยั้งในทุกๆ งานเพาะเชื้อ แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อของอนุภาคเงินนาโนที่สามารถฆ่าหรือยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้



ภาพ 8 แสดงการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบของสารสกัดจากชาผู้เอ๋อ ด้วยวิธี Agar disk diffusion test (A) *E. coli*, (B) *K. pneumoniae*, (C) *S. Typhimurium*, และ(D) *S. Enteritidis*

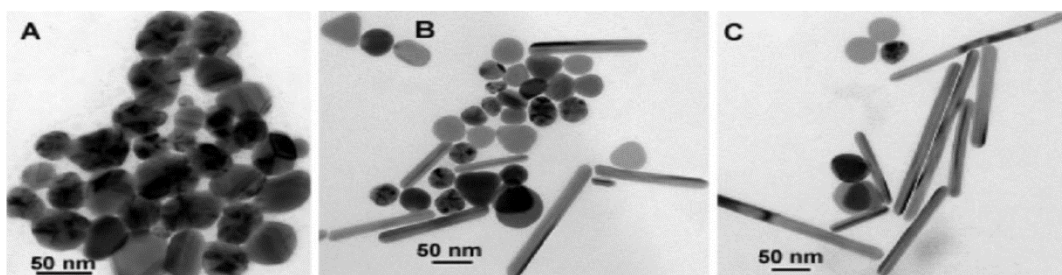
(41)

อนุภาคเงินนาโน (Silver nanoparticles)

นาโนเทคโนโลยีเป็นการค้นพบและนำมาสู่งานวิจัยสมัยใหม่ในปัจจุบัน โดยจะเกี่ยวข้องกับ การสังเคราะห์ การจัดการ การผสมของอนุภาคที่มีขนาดเล็กตั้งแต่ 1 ถึง 100 นาโนเมตร ซึ่งจะมีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทั้งทางเคมี ทางกายภาพ และทางชีวภาพ ปัจจุบันได้มีการคิดค้นวิธีการ ปรับปรุงรูปร่างสัณฐาน ขนาด และการกระจายตัวของอนุภาคนาโนมากขึ้น นำมาสู่การประยุกต์ใช้ อนุภาคนาโนในรูปแบบใหม่ๆ รวมทั้งใช้ในทางการแพทย์ (6)

อนุภาคโลหะนาโน (Metal nanoparticles) โดยเฉพาะอนุภาคเงินนาโนมีคุณสมบัติที่มีความจำเพาะมาก เช่น มีเสถียรภาพทางเคมีที่ดี มีการนำความร้อน การนำไฟฟ้า และมีขนาดเล็ก ซึ่งทำให้มีพื้นที่ผิวเพิ่มมากขึ้น และแทรกเข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลชีพได้ดี จึงช่วยต้านทานต่อเชื้อ

แบคทีเรีย ไวรัส และเชื้อราได้ คุณสมบัติในการต้านทานจุลชีพของอนุภาคเงินนาโนจะขึ้นอยู่กับขนาดอนุภาค และภาวะสิ่งแวดล้อมบริเวณนั้นๆ เช่น ขนาด ภาวะกรดต่าง(pH) และ ความแข็งแรงของไอออน (ionic strength) (6) นอกจากนี้ขนาดแล้วมีการศึกษาพบว่ารูปร่างของอนุภาคเงินนาโนที่ต่างกัน ดังแสดงในภาพที่ 9 จะมีประสิทธิภาพในการต้านทานต่อเชื้อจุลชีพได้ต่างกัน (47-49) และสุดท้ายคุณสมบัติในการต้านจุลชีพของอนุภาคเงินนาโน ขึ้นอยู่กับสารเคลือบผิว (Capping agents) (6)



ภาพ 9 A แสดงรูปร่างของอนุภาคเงินนาโนที่ต่างกัน ด้วยกล้อง Scanning transmission electron microscopy (STEM) B และ C แสดงอนุภาคเงินนาโนรูปร่างสามเหลี่ยมตัด รูปร่างกลม และรูปร่างแท่ง (49)

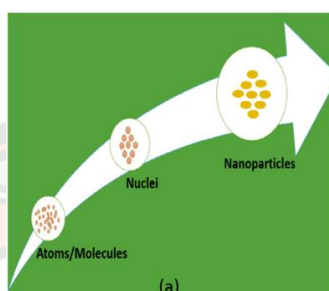
ปัจจุบันมีการนำนวัตกรรมเกี่ยวกับอนุภาคเงินนาโนซึ่งเป็นอนุภาคที่มีคุณสมบัติเหมือนโลหะเงินแต่มีขนาดเล็กเป็นนาโนเมตรมาประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ชีวภาพมากขึ้น เนื่องจากคุณสมบัติในการต้านเชื้อจุลชีพ โดยมีการเสนอกลไกการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียคือ อนุภาคเงินนาโนมีพื้นที่ผิวมากซึ่งสามารถไปสัมผัสกับจุลชีพได้ง่าย มีการศึกษาพบว่าประสิทธิภาพของอนุภาคเงินนาโนจะเกิดมากขึ้นเมื่อมีการสัมผัสอนุภาคเงินนาโนจะไปจับกับเยื่อหุ้มเซลล์และทำให้สามารถทะลุเข้าไปภายในเซลล์แบคทีเรียได้ โดยบนเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียจะมีส่วนประกอบที่เป็นโปรตีนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ (Sulfur containing proteins) อนุภาคเงินนาโนจะทำปฏิกิริยากับโปรตีนชนิดนี้ และสามารถทะลุเข้าไปภายในเซลล์แบคทีเรียได้ เมื่ออนุภาคเงินนาโนเข้าไปในแบคทีเรียจะทำให้มีการเปลี่ยนแปลงการส่งสัญญาณภายในเซลล์และไม่สามารถควบคุมการผ่านเข้าออกของสารได้ ซึ่งทำให้แบคทีเรียตายในที่สุด (47, 50, 51) อีกกลไกหนึ่งคือ อนุภาคเงินนาโนจะทำลายเซลล์ด้วยการทำปฏิกิริยากับสารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอ (deoxyribonucleic acid; DNA) ทำให้การแปลรหัสผิดพลาดส่งผลให้เซลล์ไม่สามารถแบ่งตัวได้เพราะไม่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้ (52) ที่แย่ที่สุดจะทำให้แบคทีเรียตายได้ ร่วมกับการที่อนุภาคเงินนาโนจะมีการปล่อยอนุภาคเงินออกมาภายในเซลล์แบคทีเรียซึ่งจะไปทำลายของเชื้อแบคทีเรียได้ จากกลไกข้างต้นทำให้อนุภาคเงินนาโนเป็นอนุภาคที่มี

ประสิทธิภาพสูงและปลอดภัยในการกำจัดเชื้อจุลชีพ เพราะสามารถออกฤทธิ์ได้เร็ว และไม่เป็นพิษต่อเซลล์สัตว์ และยังไม่เคยมีรายงานว่าก่อให้เกิดอาการแพ้อีกด้วย

การสังเคราะห์อนุภาคเงินนาโน

หากแบ่งตามลำดับการเกิดของสารจะแบ่งได้เป็น 2 ลักษณะคือ (6)

1. จากล่างสู่บน (Bottom to Up)

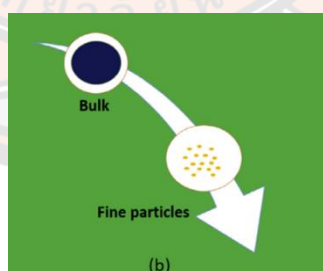


ภาพ 10 แสดงการสังเคราะห์อนุภาคนาโนจากล่างสู่บน (Bottom to Up)

(6)

วิธีนี้จะเป็นการสังเคราะห์อนุภาคเงินนาโนของการสังเคราะห์แบบใช้วิธีทางเคมี และทางชีวภาพ โดยจะสังเคราะห์เริ่มจากการรวมกลุ่มของอะตอมขนาดเล็ก จนมีการสร้างนิวคลีไอใหม่ และเติบโตจนกลายเป็นอนุภาคนาโน ดังภาพที่ 10

2. จากบนสู่ล่าง (Top to Bottom)



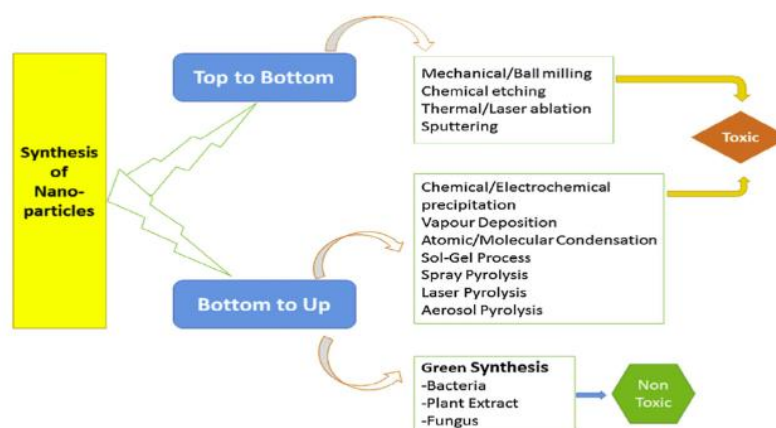
ภาพ 11 แสดงการสังเคราะห์อนุภาคนาโนจากบนสู่ล่าง (Top to Bottom)

(6)

วิธีนี้จะเป็นการสังเคราะห์อนุภาคเงินนาโนแบบทางกายภาพ โดยจะสลายวัสดุขนาดใหญ่จากที่มีลักษณะเป็นก้อน ให้มีขนาดเป็นอนุภาคที่เล็กลงหลายๆอัน ดังภาพที่ 10 เช่นการทำด้วยวิธี grinding, milling, sputtering และ thermal/laser ablation

การสังเคราะห์อนุภาคเงินนาโนสามารถแบ่ง ออกกว้างๆ เป็น 3 วิธีการ ได้แก่ (6)

1. วิธีการทางกายภาพ (Physical methods)
2. วิธีการทางเคมี (Chemical methods)
3. วิธีการทางชีวภาพ (Bio-base methods)



ภาพ 12 แสดงการสังเคราะห์อนุภาคเงินนาโนในวิธีต่างๆ
(6)

1. วิธีการทางกายภาพ (Physical Methods)

เป็นวิธีที่อาศัยกระบวนการที่สำคัญ 2 กระบวนการที่จะทำให้ได้อนุภาคเงินนาโน คือ Evaporation condensation และ Laser ablation

วิธีการสังเคราะห์อนุภาคเงินนาโนแบบ Evaporation-condensation จะอาศัยแรงดันบรรยากาศโดยต้องทำในเตาหลอม (Tube furnace) ซึ่งมีขนาดใหญ่ ใช้พื้นที่ในการทำงานมาก ใช้พลังงานไฟฟ้าและเวลามากในการทำให้เตาหลอมทำงาน และควบคุมอุณหภูมิ (53)

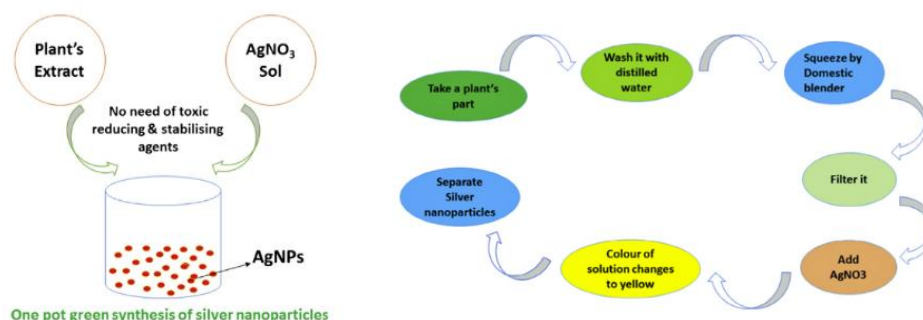
วิธีการสังเคราะห์อนุภาคเงินนาโนโดยใช้ Laser ablation กับ metallic bulk material ในสารละลาย เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆ แล้ว มีข้อได้เปรียบ คือ จะไม่มีสารเคมีอื่นๆ เจือปนเลย ดังนั้นหากต้องการที่จะเตรียมอนุภาคเงินนาโนโดยไม่ต้องทำให้มีสิ่งเจือปน และมีความบริสุทธิ์ควรใช้วิธีนี้ สามารถทำได้โดยใช้ Laser ชนิด Femtosecond laser pulses ที่ความยาวคลื่น 800 นาโนเมตร ยิ่งเข้าไปใน Metallic bulk material ในสารละลาย (54)

2. วิธีการทางเคมี (Chemical methods)

คือการทำ Chemical reduction จาก Reducing agents โดยสารที่นิยมใช้เป็น Reducing agents ได้แก่ Sodium citrate, Ascorbate, Sodium borohydride (NaBH_4) และ Elemental hydrogen ซึ่งนำมา Reduce Ag^+ ทั้งใน Aqueous และ Non-aqueous solution ทำให้เงินไอออน (Ag^+) กลายเป็นเงิน (Ag) ที่มีประจุเป็นกลาง (Ag^0) หลังจากนั้นจะมีการรวมกลุ่มกัน (Agglomeration) เป็นกลุ่มก้อน (Cluster) ขึ้น แต่การรวมกลุ่มก้อนนี้ เป็นกระบวนการที่ไม่ต้องการให้

เกิดขึ้นเนื่องจากเราต้องการอนุภาคเงินนาโน ดังนั้น จึงต้อง ใส่สารที่สามารถดูดซับหรือไปจับกับผิว และป้องกันการรวมกลุ่มกันของอนุภาคเงินนาโน สารที่ใช้เป็น Protective agents ที่ถูกรายงานว่า มีประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดการรวมกลุ่ม ได้แก่ Polyvinyl alcohol, Polyvinylpyrrolidone, Polyethylene glycol, Polymethacrylic acid, และ Polymethylmethacrylate (6)

3. วิธีการทางชีวภาพ (Bio-base methods)



ภาพ 13 แสดงการสังเคราะห์อนุภาคเงินนาโนด้วยวิธีทางชีวภาพ

(6)

วิธีทางชีวภาพมีข้อได้เปรียบกว่าวิธีทางเคมีและวิธีทางกายภาพ คือเป็นวิธีที่ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ค่าใช้จ่ายไม่สูงมาก และยังสามารถนำมาใช้ในการผลิตในระดับที่ใหญ่ขึ้นได้ อีกทั้งยังไม่ต้องใช้อุณหภูมิ แรงดันที่สูง ไม่จำเป็นต้องใช้พลังงานมาก รวมถึงไม่มีสารเคมีที่เป็นพิษในการสังเคราะห์เหมือนกับสองวิธีแรกที่ได้กล่าวไป กระบวนการสังเคราะห์อนุภาคเงินนาโนส่วนใหญ่ในปัจจุบันนั้นใช้สารเคมีในการสกัด แต่เนื่องจากสารเคมีเหล่านี้มีความเป็นพิษส่งผลให้เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต สิ่งแวดล้อม และส่งผลให้มีต้นทุนในการผลิตสูงขึ้น อีกทั้งยังพบว่าสารเคมีที่เป็นพิษบางชนิดมีโอกาสนับเป็นพื้นที่บริเวณพื้นผิวของอนุภาคเงินนาโน ทำให้ไม่เหมาะที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในงานด้านชีวการแพทย์ (55) ปัจจุบันนักวิจัยให้ความสนใจการสังเคราะห์อนุภาคเงินนาโนด้วยวิธีทางชีวภาพมากขึ้น เนื่องจากสามารถลดการใช้สารเคมีที่เป็นพิษและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม แต่จะมีข้อด้อยคือจะให้อนุภาคเงินนาโนน้อยกว่าวิธีอื่นๆ (54)

โดยการสังเคราะห์อนุภาคเงินนาโนด้วยวิธีทางชีวภาพ สามารถใช้แบคทีเรีย เชื้อรา ยีสต์ และสารสกัดจากพืชต่างๆ เช่นสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง (7) สารสกัดจากใบชา (41, 42) สารสกัดถั่วลิสง (56) สารสกัดหัวหอมใหญ่ (57) สารสกัดจากใบแป๊ะก๊วย ใบพลอน เป็นต้น มาช่วยในการสังเคราะห์ เนื่องจากสารสกัดจากพืชสามารถเป็นได้ทั้งตัวรีดิวซิง หรือสารที่ทำหน้าที่ให้อิเล็กตรอน (58) และทำหน้าที่เป็นสารเคลือบผิว (capping agent) โดยสารสกัดจากพืชมีประจุทางไฟฟ้าเป็นลบ จึงสามารถจับกับประจุบวกของอนุภาคเงินและป้องกันการตกตะกอนของอนุภาคเงินนาโน ทำให้มี

ต้นทุนในการผลิตต่ำ นอกจากนี้ ยังมีขั้นตอนในการผลิตที่ไม่ยุ่งยากเมื่อเปรียบเทียบกับ การสังเคราะห์ จากเชื้อจุลินทรีย์ เป็นต้น (59)

จากงานวิจัยของ Yuet Ying Loo และคณะ ในปี 2012 (42) ได้ทดลองใช้ชาผู้เอ้อ (Pu-erh) หรือ *Camellia sinensis* เป็นตัวรีดิวซิง และเป็นสารเคลือบผิว ซึ่งมีคุณสมบัติมากมาย เช่น เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ลดคลอเรสเตอรอล ลดความดันโลหิตในผู้ป่วยโรคความดัน ป้องกันโรคหัวใจ และสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของเชื้อเจ้าบ้าน (Normal flora) ในระบบ ชักถ่ายได้ จากการทดลองพบว่า การสังเคราะห์อนุภาคเงินนาโน โดยสารสกัดจากชาผู้เอ้อ สามารถ นำมาใช้ในการผลิตอนุภาคเงินนาโนได้ง่ายโดยสามารถที่จะทำได้อุณหภูมิห้อง และเป็นการทดลอง โดยปราศจากการใช้สารเคมีในการเป็นตัวรีดิวซิง เพื่อลดการตกตะกอนของธาตุเงิน ซึ่งโดยปกติตัวรีดิวซิง มักจะใช้สารเคมีจำพวก Sodium borohydrite ซึ่งจะเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม และเมื่อนำไปทดลองหา การฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ชนิดแกรมลบ เช่น *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. Typhimurium* และ *S. Enteritidis* พบว่าสามารถฆ่าเชื้อกลุ่มนี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (41)

การสังเคราะห์อนุภาคเงินนาโนโดยมีตัวรีดิวซิงจากธรรมชาติทำให้ได้ผลึกคริสตัลที่มีปริมาณสูง เช่นเดียวกับกับวิธีอื่นๆ โดยสามารถนำมาวิเคราะห์อนุภาคเงินนาโนด้วยวิธีต่างๆ ดังนี้

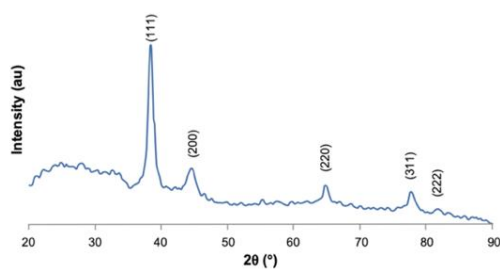
1. การเปลี่ยนสีของสารละลายจาก สีใสเป็นสีเหลืองหรือน้ำตาลเข้ม แสดงถึงการมีผลึกคริสตัล ของอนุภาคเงินนาโนเกิดขึ้น



ภาพ 14 แสดงการเปลี่ยนสีของสารละลายจากสีใสเป็นสีน้ำตาล

(41)

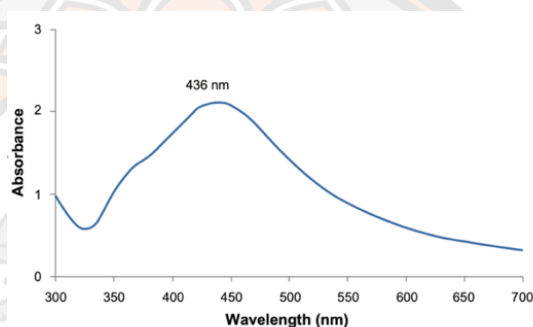
1. XRD หรือ Xray diffractometer โดยจะเป็นการนำมาหาค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของ ผลึกคริสตัล โดยนำครึ่งหนึ่งของความกว้างของจุดสูงสุดที่ต่างกัน 5 จุด ตามภาพที่ 15 มาหาค่าเฉลี่ย จะพบว่าค่าเฉลี่ยของผลึกคริสตัลได้เท่ากับ 342 นาโนเมตร และไม่พบจุดสูงที่ ตำแหน่งอื่นๆ ซึ่งแสดงถึงการมีเฉพาะธาตุเงิน



ภาพ 15 แสดงกราฟจากการวิเคราะห์ด้วย Xray diffractometer

(41)

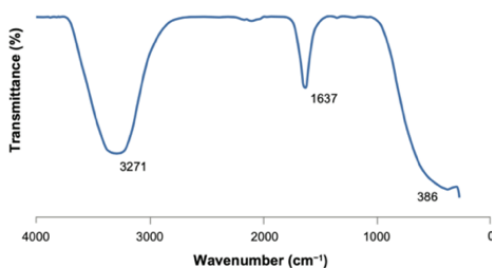
2. UV-vis ใช้วิเคราะห์การดูดกลืนแสง พบว่า มีการดูดกลืนแสงที่ 436 นาโนเมตร ซึ่งเป็นช่วงการดูดกลืนแสงของอนุภาคเงินนาโน และไม่พบจุดสูงที่ตำแหน่งอื่นๆ ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นว่าการทดลองมีการสังเคราะห์ได้อนุภาคเงินนาโนเพียงอย่างเดียว



ภาพ 16 แสดงกราฟ ภายหลังจากการวิเคราะห์ด้วย UV-vis

(41)

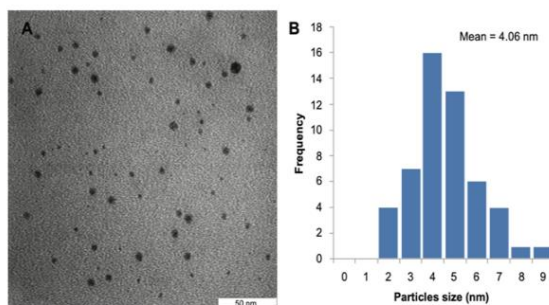
3. ใช้ Fourier-Transform Infrared (FTIR) ซึ่งจะใช้ดู biomolecules ที่มักจะเกิดขึ้นในการเกิดปฏิกิริยา capping และ reducing agents ตำแหน่ง 3271 cm^{-1} หมายถึงการมี NH และ OH ซึ่งแสดงถึงการเชื่อมกันของโปรตีน ตำแหน่ง 1637 cm^{-1} หมายถึงการมี C=O ใน amine I group ซึ่งเป็นตัวบอกว่าถึงการมีเสถียรภาพของอนุภาคเงินนาโน และตำแหน่ง 386 cm^{-1} หมายถึงการมีธาตุเงินเกิดขึ้น



ภาพ 17 แสดงกราฟภายหลังจากการวิเคราะห์ด้วย Fourier-Transform Infrared (FTIR)

(41)

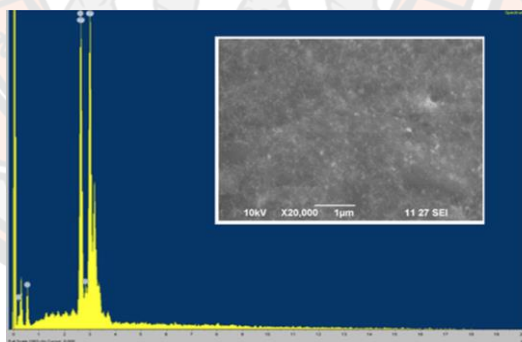
4. ใช้ Electron microscope ในการดูขนาด รูปร่าง และลักษณะของผลึกอนุภาคเงินนาโน โดยรูป A แสดงให้เห็นเป็นลักษณะทรงกลม และรูป B แสดง Histogram ค่าเฉลี่ยการกระจายของผลึกอนุภาคเงินนาโน ซึ่งมีขนาดเฉลี่ยที่ 4.06 นาโนเมตร ใกล้เคียงกับเมื่อใช้วิธี Xray diffractometer



ภาพ 18 แสดงการวิเคราะห์อนุภาคเงินนาโนด้วย Electron microscope

(41)

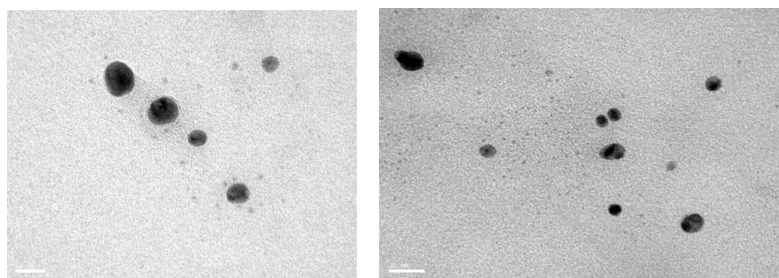
นอกจากนี้ มีการศึกษาโดยใช้พืชชนิดอื่น ๆ อีก ซึ่งเป็นสารสกัดจากธรรมชาติที่สามารถสังเคราะห์อนุภาคเงินนาโนได้ เช่น สารสกัดจากถั่วลิสง *Arachis hypogaea* (Ground Nut) ได้ค่าเฉลี่ยขนาดประมาณ 15-50 นาโนเมตร ตามภาพที่ 19 ซึ่งเมื่อนำมาทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ก็สามารถนำมาใช้ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ (56)



ภาพ 19 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยวิธี SEM ของอนุภาคเงินนาโนโดยใช้สารสกัดจากถั่วลิสง

(56)

การใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) วิเคราะห์ลักษณะและขนาดของอนุภาคเงินนาโน จากการทดลองของ Wacharanad และคณะ ได้ใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) ในการตรวจสอบลักษณะของอนุภาคเงินนาโนที่เคลือบผิวด้วยกระเจียวแดง (SNP-Ro) ที่อัตราส่วน 1:0.5 และ 1:2.5 พบว่า ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ SNP-Ro มีรูปทรงกลม โดยจะพบลักษณะที่เป็นทั้งรูปทรงกลมเดี่ยวกระจายห่างกัน และเกาะเป็นกลุ่ม วัดขนาดได้เท่ากับ 14.43 ± 3.71 นาโนเมตร และ 9.06 ± 3.32 นาโนเมตร ตามลำดับ (7) แสดงดังภาพที่ 20



ภาพ 20 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ (A) SNP-Ro 1:0.5 และ (B) SNP-Ro 1:2.5 จาก การส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) ที่กำลังขยาย 310Kx

(7)

สารสกัดกระเจี๊ยบแดง

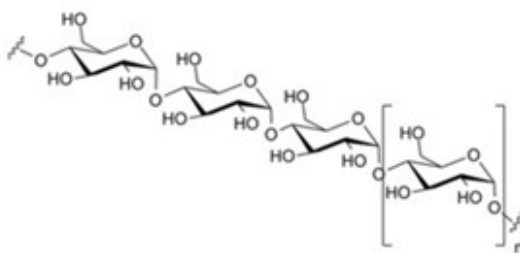


ภาพ 21 แสดงส่วนดอกกระเจี๊ยบแดง

(<http://www.thipmongkol555.com/ส่วนประกอบที่สำคัญ/กระเจี๊ยบแดง/>)

กระเจี๊ยบแดง (*H. sabdariffa*) เป็นสมุนไพรที่หาได้ทั่วไป มีประโยชน์หลายด้าน มีการพบว่า มีการใช้พืชชนิดนี้ในทางการแพทย์ดั้งเดิม ทั้งในประเทศแอฟริกัน อินเดีย แมกซิโก บราซิล และ อิหร่าน ตัวใบสามารถนำมาทานได้ช่วยในการขับปัสสาวะ ช่วยขับถ่ายหรือใช้เป็นยาระบาย ช่วยย่อยอาหาร ด้านทานการติดเชื้อ ช่วยทำให้รู้สึกสบายหรือใช้เป็นยานอนหลับได้ และช่วยห้ามเลือด ก้านดอกถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคความดันโลหิตสูง โรคตับ ใช้เป็นยาขับปัสสาวะ ช่วยระบบย่อยอาหาร และใช้เป็นยานอนหลับ ส่วนของดอกกระเจี๊ยบแสดงดังภาพที่ 21 ส่วนเมล็ดจะค่อนข้างพบการนำมาใช้น้อยในทางการแพทย์ดั้งเดิม เมื่อเทียบกับส่วนอื่นๆ โดยส่วนเมล็ดมักจะนำมาเผา และรับประทาน เพื่อช่วยในด้านการเพิ่มกำลัง ลดความอ่อนเพลีย และช่วยขับปัสสาวะได้ (9, 60)

กระเจี๊ยบแดงมีโครงสร้างทางเคมีแสดงดังภาพที่ 22 จะมีสารสีที่เรียกว่า แอนโทไซยานินส์ (Anthocyanins) ซึ่งมีส่วนของสารประกอบฟีนอล (Phenolic compound) ในปริมาณสูง เช่น ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) กรดฟีนอลิก (Phenolic acids) โดยสารประกอบฟีนอลเป็นสารที่จะพบตามธรรมชาติในพืชหลายๆ ชนิดมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ (8-10)



ภาพ 22 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารสกัดกระเจี๊ยบแดง $C_{18}H_{16}O_9$ น้หนักโมเลกุล: 376

Phytochemicals	80% methanol extract (v/v)
Alkaloids	+
Phenolic compounds	+
Flavonoids	+
Tannins	-
Saponins	+
Anthraquinones	-

+: Present, -: Absent, *H. sabdariffa*: *Hibiscus sabdariffa*

ภาพ 23 แสดงการวิเคราะห์โดยใช้ Phytochemical ของสารสกัดจากส่วนก้านดอกของกระเจี๊ยบแดง (10)

เมื่อสกัดโดยใช้ตัวทำละลายจะพบว่ากระเจี๊ยบแดง จะมีสารละลายไนโตรเจน และกรดอะมิโนที่สูง แสดงดังภาพที่ 24 ทั้งสองตัวเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของโปรตีนซึ่งเป็นสารอาหารที่จำเป็นของมนุษย์ นอกจากนี้กระเจี๊ยบแดงสามารถเป็นอิมัลซิไฟเออร์ที่มีประสิทธิภาพ มีคุณสมบัติในการสร้างโฟม (Foam formation) ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการทำให้โปรตีนมีความยืดหยุ่น จึงมีสินค้าบางชนิดมีการเติมสารนี้เข้าไปเพื่อใช้ทดแทนโปรตีนอัลบูมินจากไข่ และเคซีนที่มีราคาแพง เพื่อเพิ่มคุณค่าทางอาหารให้มากขึ้นได้ (60, 61)

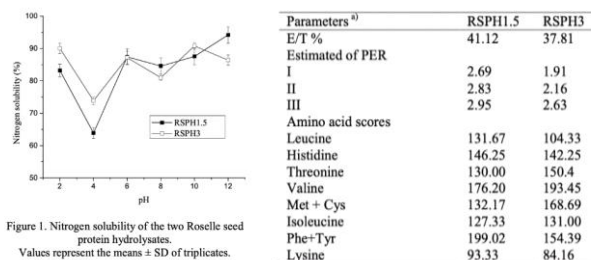
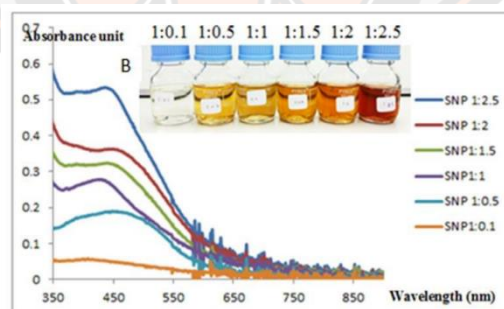


Figure 1. Nitrogen solubility of the two Roselle seed protein hydrolysates. Values represent the means \pm SD of triplicates.

ภาพ 24 แสดงสารละลายไนโตรเจนและกรดอะมิโนที่พบในกระเจี๊ยบแดง

(60)

จากการศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงพบว่า สารสกัดจากก้านดอกกระเจี๊ยบแดงมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ เอชเชอริเรีย โคลิ (*Escherichia coli*) สแต็บฟีลคอคคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*) (8) อะซิเนโตแบคเตอร์ เบาแมนนิโอ (*Acinetobacter baumannii*) (9) มีการศึกษาที่ใช้สารสกัดด้วยน้ำ (Aqueous extract) พบว่า สามารถต้านเชื้อฟอร์โฟโรโมแนส แอรูจินินซาได้ (10) ด้วยประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของทั้งอนุภาคเงินนาโนและสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงที่มีประสิทธิภาพ จึงได้มีการศึกษาฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของอนุภาคเงินนาโนที่มีสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง ต่อเชื้อ แอ็กกริเกทิแบกเทอร์ แอกทีโนไมซีเทมคอมิแทนส์ โดยจากการทดลองได้ใช้อัตราส่วนความเข้มข้นของสารละลายซิลเวอร์ไนเตรตต่อความเข้มข้นของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงที่แตกต่างกัน 6 ความเข้มข้นจากน้อยไปมาก คือ 1:0.1, 1:0.5, 1:1, 1:1.5, 1:2 และ 1:2.5 หลังจากสังเคราะห์แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงพบว่าอยู่ในช่วง 350-450 นาโนเมตร และมีสีตั้งแต่สีเหลืองจนถึงสีน้ำตาล แสดงในภาพที่ 25 เมื่อทดสอบการยับยั้งเชื้อ แอ็กกริเกทิแบกเทอร์ แอกทีโนไมซีเทมคอมิแทนส์ ด้วยวิธีการหำรอยละการทำลายของเชื้อ ผลออกมาคือ สามารถฆ่าเชื้อได้ร้อยละ 99.70-99.99 ภายในเวลา 24 ชั่วโมง แสดงดังภาพที่ 26 แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในอัตราส่วนของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงที่เพิ่มมากขึ้น (7)



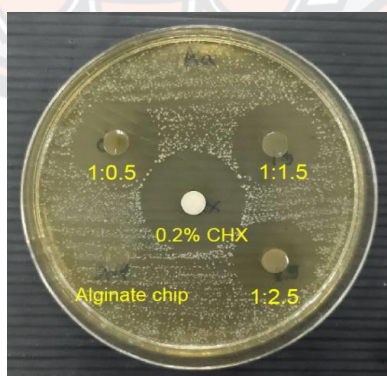
ภาพ 25 A แสดงถึงค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคเงินนาโนในอัตราส่วนต่างๆจะอยู่ในช่วง 350-450 นาโนเมตร B แสดงการเปลี่ยนสีของสารละลายที่มีสีเข้มข้น เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงมากขึ้น แสดงถึงการมีอนุภาคเงินนาโนที่มากขึ้น

(7)

samples	Percent of reduction (mean \pm SD)
SNP-RO1:0.1	99.99 \pm 0.01
SNP-RO1:0.5	99.98 \pm 0.03
SNP-RO1:1	99.99 \pm 0.00
SNP-RO1:1.5	99.99 \pm 0.01
SNP-RO1:2	99.99 \pm 0.03
SNP-RO1:2.5	99.70 \pm 0.88
0.12%CHX	100 \pm 0.00
BHI	-
Roselle	-

ภาพ 26 แสดงร้อยละการทำลายของเชื้อของอนุภาคเงินนาโนจากสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงในอัตราส่วนต่างๆ เทียบกับกลุ่มควบคุมบวกคือ 0.12 % chlorhexidine ที่มีการฆ่าเชื้อได้ 100 % และกลุ่มควบคุมลบคือ BHI (Brain heart infusion) และ Roselle ที่จะไม่มีการฆ่าเชื้อเกิดขึ้น (7)

จากงานวิจัยขั้นต้นจะพบว่าอนุภาคเงินนาโนที่มีสารเคลือบผิวเป็นสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงจะสามารถปล่อยสารมาฆ่าเชื้อแอกทริเกติแบคทีเรีย แอกทีโนไมซีเทมคอมมิแทนส์ ภายใน 24 ชั่วโมง และได้มีการศึกษาฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของอนุภาคเงินนาโนในรูปแบบอื่นๆ เช่น ใช้การขึ้นรูปของอัลจินตในลักษณะของแผ่นฟิล์มอนุภาคเงินนาโนที่มีสารเคลือบผิวเป็นสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงต่อเชื้อแอกทริเกติแบคทีเรีย แอกทีโนไมซีเทมคอมมิแทนส์ โดยได้ใช้อัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นของสารละลายซิลเวอร์ไนเตรตต่อความเข้มข้นของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงที่แตกต่างกัน คือ 1:0.5, 1:1.5 และ 1:2.5 ทดสอบการยับยั้งเชื้อ แอกทริเกติแบคทีเรีย แอกทีโนไมซีเทมคอมมิแทนส์ ด้วยวิธีดิสดิฟฟิวชัน และวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้ง (inhibition zone) พบว่า แผ่นฟิล์มอนุภาคเงินนาโนที่มีสารเคลือบผิวเป็นสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงทุกอัตราส่วนมีโซนใสเกิดขึ้นมีขนาดใกล้เคียงกัน ดังแสดงในภาพที่ 27 (62)



ภาพ 27 แสดงการเกิดโซนยับยั้งของแผ่นฟิล์ม อนุภาคเงินนาโนที่มีสารเคลือบผิวเป็นสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงในอัตราส่วนต่าง ๆ

(62)

จากการศึกษาข้างต้นพบว่าแผ่นฟิล์มอนุภาคเงินนาโนที่มีสารเคลือบผิวเป็นสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงทั้งสามอัตราส่วน มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อเกิดแบคทีเรีย แอคติโนมัยซีเทมคอมมิแทนส์ได้ในเวลาที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \geq 0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่า แผ่นฟิล์มอนุภาคเงินนาโนมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อเกิดแบคทีเรีย แอคติโนมัยซีเทมคอมมิแทนส์ ได้แตกต่างกับแผ่นฟิล์มอัลจินตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตั้งแต่เวลา 90 นาทีเป็นต้นไป (62)

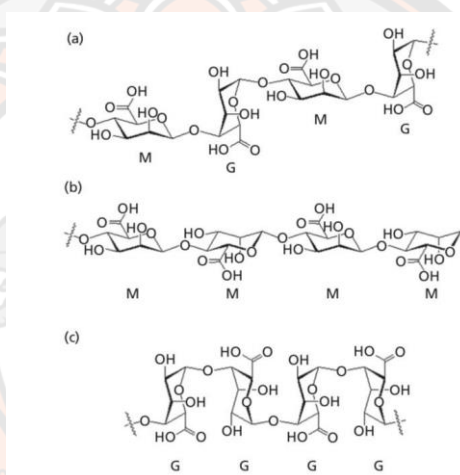
อัลจินต

อัลจินต เป็นการประกอบของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวสองโมเลกุลขึ้นไป หรือเรียกว่าโพลีแซคคาไรด์ที่ละลายน้ำ (Water-soluble polysaccharide) ซึ่งจะได้มาจากธรรมชาติ (Natural ionic polysaccharides) มักจะถูกใช้ในการเติมเข้าไปในอาหาร ใช้เป็นส่วนประกอบในเจล และใช้เป็นตัวควบคุมการขนส่งยา (Delivery of drug) โพลีเมอร์ชนิดนี้มีข้อดีคือ ไม่เป็นพิษ เข้าได้ดีกับเนื้อเยื่อ (Biocompatible) ไม่ระคายเคือง ไม่ก่อให้เกิดการบวม น้ำสามารถยึดเกาะได้ดี (Mucoadhesive properties) และสามารถก่อเจลได้ (Gelation) โดยการใช้สารเชื่อมพันธะแบบต่างๆ ในทางเภสัชศาสตร์อัลจินตสามารถใช้เพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตยา ให้ตัวยามีการปล่อยออกมาได้ยาวนานมากขึ้นได้ ช่วยลดความถี่ในการใช้ยา ลดผลข้างเคียงที่จะเกิดขึ้นกับยา และเพิ่มความพึงพอใจให้กับผู้ป่วยได้ ข้อเสียที่สำคัญของวิธีนี้ คือมีประสิทธิภาพการห่อหุ้มของยาชนิดละลายน้ำได้น้อย ให้ผลผลิตต่ำ และมีสารตกค้างของตัวทำละลายอินทรีย์เหลืออยู่ (12) สามารถพบอัลจินตได้ในสาหร่ายสีน้ำตาล เช่น *Laminaria hyperborean*, *Ascophyllum nodosum* และ *Macrocystis pyrifera* อัลจินตยังสามารถพบได้ในสาหร่ายสีแดง (*Corallinaceae*) (13) และ ในผลผลิตของแบคทีเรียบางชนิด เช่น อะโซโตแบคทีเรีย (*Azotobacter*) และ ซูโดโมนาส แบคทีเรีย (*Pseudomonas bacteria*) (11, 12)

อัลจินตมีรายงานว่าสามารถทำให้เกิดผลดีทางชีวภาพได้หลายประการ เช่น ลดคลอเรสเตอรอล ยับยั้งโรคความดันโลหิตสูง โรคเบาหวาน โรคอ้วน โรคมะเร็ง โรคตับ ยับยั้งจุลชีพต่างๆ รวมถึงสามารถใช้ต้านการแข็งตัวของเลือดได้ การสลายโพลีเมอร์ (Depolymerized) ของโซเดียมอัลจินตสามารถลดคลอเรสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ในกระแสเลือดได้ ช่วยลดน้ำหนัก และลดน้ำตาลในกระแสเลือดได้ โพลีแซคคาไรด์อัลจินต ซึ่งสร้างจาก *Laminaria japonica* สามารถลดความดันโลหิตในการทดลองของหนูได้ ส่วนการต้านการแข็งตัวของเลือด (Haemostatic effect) เกิดจากซิงค์ และแคลเซียมอัลจินต เป็นต้น (13)

อัลจินตจะประกอบด้วยการเชื่อมกันของ α -D-mannuronate (M) และ β -L-guluronate (G) ซึ่งจะมีอัตราส่วนที่ต่างกันของ M/G และมีการจัดเรียงของสายที่ต่างกันในแต่ละสาย

ของโพลีแซคคาไรด์ขึ้นอยู่กับสิ่งแวดล้อม ระยะของการเจริญเติบโตของพืชชนิดนั้นๆ ในการผลิต อัลจิเนตออกมา อัลจิเนตจากสาหร่ายทะเล จะมีประจุบวกได้หลากหลายที่พบได้ในน้ำทะเล เช่น Mg^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} และ Na^+ ส่วนอัลจิเนตของแบคทีเรียจะมีองค์ประกอบที่แปลกไปคือ สามารถมี mannuronate เป็นองค์ประกอบได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ โดยปกติส่วนของ M-block จะเป็นการต่อสายให้ยาวขึ้น ส่วน G-block จะทำให้สายเกิดการโค้งงอ โดยโมเลกุลของโลหะไอออน เช่น แคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) จะเชื่อมพันธะกับอัลจิเนตตรงรอยต่อระหว่าง GG-GG, MG-GG, และ MG-MG แสดงดังภาพที่ 28 ซึ่งความแข็งแรงของเจลอัลจิเนต (Alginate gel strength) จะขึ้นกับความยาวของ G-Block ที่เพิ่มขึ้น 5-15 โมโนเมอร์ และความยืดหยุ่นของเจลอัลจิเนต (Flexibility of crosslinked alginate gel) จะขึ้นกับการเพิ่มขึ้นใน MG block > MM block > GG block (11, 13)



ภาพ 28 แสดงการเชื่อมกันของสายอัลจิเนต สามแบบคือ GG,MM, และ MG

(13)

การขึ้นรูปอัลจิเนตในลักษณะของแผ่นฟิล์มอนุภาคเงินนาโนที่มีสารเคลือบผิวเป็นสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง จะสามารถปล่อยสารฆ่าเชื้อ แอวกิริเกตินแบคเตอร์ แอคติโนมายซีเทมคอมมิแทนส์ได้ในระยะเวลาสั้นตั้งแต่ 90 นาทีไปจนถึง 180 นาที และจากการศึกษาอนุภาคเงินนาโนจากสารสกัดจากชาผู้เอ้อ จะมีระยะเวลาในการออกฤทธิ์ที่สั้น โดยสารสกัดจากชาผู้เอ้อ สามารถยับยั้งเชื้อ *Salmonella Typhimurium* ได้ในเวลา 60 นาที และยับยั้งเชื้อ *E.coli*, *Klebsiella pneumonia*, และ *Salmonella Enteritidis* ได้ในเวลา 120 นาที (41) หากจะนำมาใช้เป็นยาต้านจุลชีพเฉพาะที่เพื่อใช้ใส่ในร่องลึกปริทันต์ที่ลึกมากๆ ของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเพื่อหวังผลเพิ่มประสิทธิภาพของการรักษาทางปริทันต์ภายหลังจากขูดหินน้ำลายและเกลารากฟัน จำเป็นต้องเพิ่มระยะเวลาในการปล่อยสารออกฆ่าเชื้อจุลชีพให้นานมากขึ้น โดยเพิ่มการคงตัวของแผ่นฟิล์มอนุภาคเงินนาโนด้วยการใช้สารที่มีคุณสมบัติช่วยในการขึ้นรูปแผ่นฟิล์มที่มีประสิทธิภาพที่ดีมากขึ้น เช่น แคลเซียมคลอไรด์ (Calcium chloride)

แคลเซียมคลอไรด์

แคลเซียมโอออนปกติจะใช้เป็นตัวในการเชื่อมพันธะของอัลจินเต เกิดเป็นแคลเซียมอัลจินเต ซึ่งมักจะใช้ในการปิดแผลป้องกันการติดเชื้อ มีศึกษาพบว่า มีฤทธิ์ในการต้านจุลชีพที่ค่อนข้างน้อย ต่างกับการใช้การเชื่อมพันธะด้วยตัวอื่นๆ เช่น อะลูมิเนียม คลอไรด์ (Aluminium chloride) คอปเปอร์ซัลเฟต (Copper sulphate) และซิงค์คลอไรด์ (Zinc chloride) แสดงดังภาพที่ 29 สามารถเข้าได้ดีกับยาต้านจุลชีพ และมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อได้ดีกว่า นอกจากนี้ในการศึกษาพบว่า แคลเซียมอัลจินเต ที่ใช้ร่วมกับ ยาเจนตาไมซิน จะมีฤทธิ์ต้านกันในการฆ่าเชื้อ สแต็บฟีโลคอคคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*) จึงทำให้ออกฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อจุลชีพได้ลดลง แต่ก็พบว่านอกจากยาเจนตาไมซิน แคลเซียมอัลจินเตจะไม่มีการต้านฤทธิ์กัน (antagonist) กับยาต้านจุลชีพตัวอื่นๆ (63)

Antimicrobial	Cross-linking agent															
	aluminium chloride				zinc chloride				copper sulphate				calcium chloride			
	<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. aureus</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. aureus</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. aureus</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. aureus</i>	
FIC	effect	FIC	effect	FIC	effect	FIC	effect	FIC	effect	FIC	effect	FIC	effect	FIC	effect	
Cetrimide	0.74	NI	1.34	NI	0.80	NI	1.38	NI	0.53	NI	1.49	NI	3.16	NI	3.38	NI
Chlorhexidine diacetate	0.62	NI	1.79	NI	1.19	NI	2.15	NI	1.19	NI	2.37	NI	3.38	NI	2.66	NI
Chloroxylenol	1.44	NI	1.54	NI	2.19	NI	2.74	NI	2.66	NI	1.59	NI	2.66	NI	2.33	NI
Ciprofloxacin hydrochloride	1.19	NI	1.08	NI	1.39	NI	2.45	NI	2.33	NI	2.66	NI	3.38	NI	3.57	NI
Erythromycin lactobionate	0.53	NI	1.79	NI	2.59	NI	2.62	NI	1.19	NI	2.84	NI	1.99	NI	3.57	NI
Gentamicin sulphate	1.54	NI	2.18	NI	1.81	NI	1.10	NI	2.18	NI	1.54	NI	3.16	NI	4.57	ANT
Proflavine hemisulphate	1.49	NI	1.79	NI	1.89	NI	2.27	NI	2.91	NI	2.37	NI	3.38	NI	2.66	NI
Sulfadiazine (sodium salt)	1.10	NI	1.34	NI	0.56	NI	2.63	NI	1.05	NI	3.92	NI	0.87	NI	2.39	NI
Tetracycline	1.19	NI	2.18	NI	1.55	NI	1.34	NI	1.89	NI	0.62	NI	3.38	NI	3.57	NI

NI, no interaction; ANT, antagonism.

ภาพ 29 แสดงค่า Fractional Inhibitory Concentration (FIC) ระหว่างการใช้ อะลูมิเนียมคลอไรด์, ซิงค์คลอไรด์, คอปเปอร์ซัลเฟต และ แคลเซียมคลอไรด์ในการเชื่อมพันธะกับอัลจินเตที่มียาต้านจุลชีพ

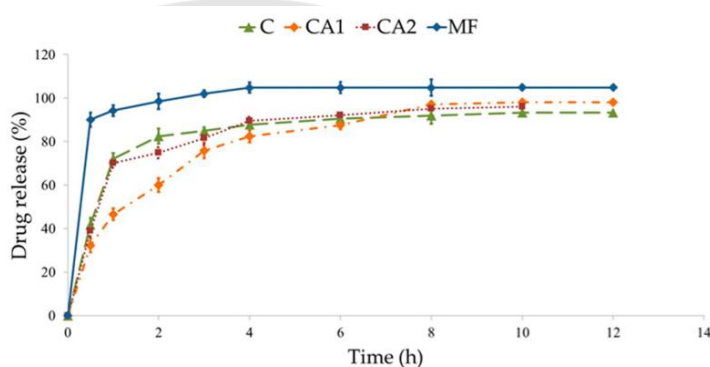
FIC น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.50 แสดงถึงการเสริมฤทธิ์กัน (Synergistic)

FIC มากกว่า 0.50 แต่น้อยกว่า 4.00 แสดงถึงการไม่มีปฏิกริยากัน

FIC มากกว่า 4.00 แสดงถึงการต้านฤทธิ์กัน (Antagonistic) (63)

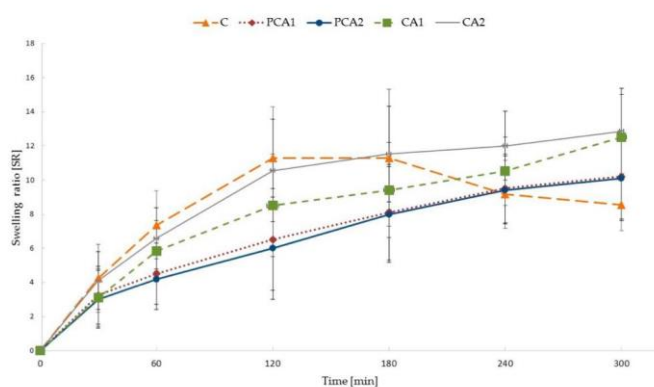
ถึงแม้จะมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่น้อย แต่ก็พบว่าแคลเซียมคลอไรด์ถูกนำมาใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพในการคงตัวของแผ่นฟิล์มอัลจินเตให้คงอยู่ได้นานมากขึ้น และมีการปล่อยยาออกมาได้นานมากขึ้นได้ ดังนั้น แคลเซียมคลอไรด์จึงมักจะถูกใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตยาอย่างแพร่หลาย มีการศึกษาการปรับปรุงประสิทธิภาพการปลดปล่อยของยาเมตฟอร์มิน (metformin) ในรูปแบบของอัลจินเต โดยใช้แคลเซียมคลอไรด์ พบว่าเมื่อมีการปรับปรุงโครงสร้างของอัลจินเตด้วยการใช้ 0.1% แคลเซียมคลอไรด์ จะสามารถช่วยเพิ่มระยะเวลาในการปล่อยยาเมตฟอร์มิน ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งจะสามารถปล่อยได้ตั้งแต่ 2 ชั่วโมงแรกและคงอยู่จนถึง 12 ชั่วโมง ส่วนการปรับปรุงโครงสร้างของอัลจินเตด้วยการใช้ 0.05% แคลเซียมคลอไรด์ จะเทียบเท่ากับ การไม่ปรับปรุงโครงสร้างของอัลจินเต ดังแสดงในภาพที่ 30 การใช้แคลเซียมคลอไรด์ช่วยเพิ่มมีประสิทธิภาพการ

ปลดปล่อยยาได้นานมากขึ้น เนื่องมาจากเมื่ออัลจินเตเมื่อถูกความชื้นจะมีการบวมเกิดขึ้น (swelling ability) เกิดเป็นเจล (gel) ซึ่งภาวะนี้จะทำให้ลดการดูดซึมของน้ำเข้ามายังอัลจินเต จึงทำให้ยาเมต-ฟอร์มินที่เป็นยาที่ละลายน้ำได้ละลายออกไปได้ลดลง ทำให้ยามีการปลดปล่อยได้นานมากขึ้น ซึ่งในกลุ่มที่มีการปรับปรุงโครงสร้างของอัลจินเตด้วยแคลเซียมคลอไรด์จะมี อัตราส่วนการบวม (swelling ratio) ที่ค่อนข้างสูงทั้งสองความเข้มข้น (0.1% และ 0.05%) แสดงในภาพที่ 31 นอกจากนั้นแล้ว แคลเซียมไอออนที่เพิ่มมากขึ้นจะทำให้อัลจินเตมีประจุเป็นบวก จึงสามารถไปยึดเกาะกับเยื่อเมือก (mucoadhesiveness) ที่จะมีประจุเป็นลบได้มากขึ้น จึงทำให้ยาคงอยู่ได้นานมากขึ้นได้ (12)



ภาพ 30 แสดงการปลดปล่อยยาเมตฟอร์มินจากอัลจินเตที่ไม่ได้ปรับปรุงโครงสร้าง (C) ,การปรับปรุงโครงสร้างอัลจินเตด้วย 0.1% แคลเซียมคลอไรด์ (CA1), 0.05% แคลเซียมคลอไรด์ (CA2), และตัวควบคุมคือ เมตฟอร์มินทางการค้า (MF)

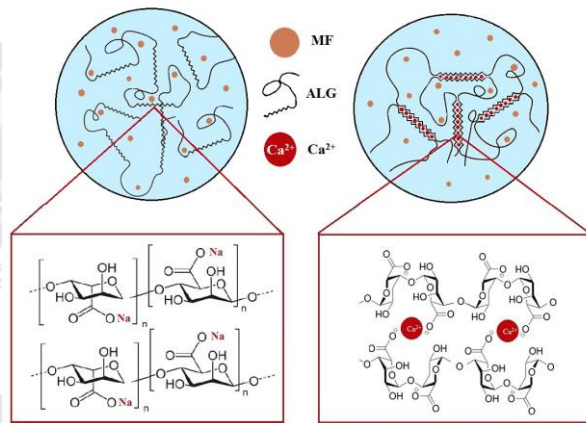
(12)



ภาพ 31 แสดงการเพิ่มขึ้นของอัตราส่วนการบวมในการปรับปรุงโครงสร้างอัลจินเต (CA1, CA2)

(12)

นอกจากนั้นแคลเซียมคลอไรด์ยังมีประสิทธิภาพในการทำให้อัลจินเตสามารถคงอยู่ได้นานมากขึ้น จึงมีการใช้แคลเซียมคลอไรด์อย่างแพร่หลายในการเชื่อมกันของอัลจินเต ดังแสดงในภาพที่ 32 ซึ่งอัลจินเตมักถูกนำมาใช้เป็นตัวพายาสำหรัยยาต้านจุลชีพเฉพาะที่มีหลายๆการศึกษาพบว่า แคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) จะมีความจำเพาะในการจัดเรียงตัวในอัลจินเต โดยการจับกับประจุบวกของ guluronate ในลักษณะคล้ายกับไข่ในกล่องลัง (Like eggs in a cardboard egg box) ช่วยเพิ่มความสัมพันธ์ด้านข้างทำให้เกิดการเชื่อมกันของสายโพลีเมอร์ตีมากขึ้น และทำให้โพลีเมอร์หรืออัลจินเตมีความคงตัวมากขึ้น (stability) อัลจินเตก็จะสามารถสลายตัวช้าลง ทำให้สามารถคงตัวยาอยู่ได้นานมากขึ้น เพิ่มระยะเวลาในการปลดปล่อยยาได้ (11-13)



ภาพ 32 A แสดงโครงสร้างอัลจินเตที่บรรจุยาเมทฟอร์มินแต่ไม่ได้ปรับปรุงโครงสร้างอัลจินเตด้วยแคลเซียมคลอไรด์ B แสดงการปรับปรุงโครงสร้างอัลจินเตด้วยแคลเซียมคลอไรด์

(12)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา

1. สารละลายซิลเวอร์ไนเตรท (AgNO_3) จากบริษัท แกมมาโก้ (ประเทศไทย) จำกัด
2. สารสกัดกระเจี๊ยบแดง (ผง) จากบริษัท Shaanxi Sunrun Bio-tech.Co.,Ltd
3. ผงอัลจินเตสกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาล ยี่ห้อ Sigma-Aldrich®
4. calcium chloride dehydrate จากบริษัท Ajax Finechem Pty Ltd
5. น้ำเกลือ (Normal saline)
6. อาหารเลี้ยงเชื้อ Brain-Heart Infusion Broth
7. อาหารเลี้ยงเชื้อ Brain-Heart Infusion Agar
8. งานเพาะเชื้อพลาสติกปราศจากเชื้อ
9. หลอด micro centrifuge tube ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร
10. หลอด centrifuge tube ปริมาตร 15 มิลลิลิตร
11. แฝงแก้วเกลี่ยเชื้อ (spreader)
12. micropipette
13. หัวงูเย็บเชื้อ (transfer loop)
14. ตู้อบลมความร้อน (hot air oven)
15. เครื่องระเหยภายใต้สุญญากาศ (rotary vacuum evaporator)
16. ตู้แช่อุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียส (-20°C freezer)
17. ตู้เพาะเลี้ยงเชื้อ (incubator)
18. เครื่องวัดความเข้มของแสง (spectrophotometer)
19. เครื่องชั่งสาร (balance)
20. กระบอกยา (syringe)
21. เต้าอบไมโครเวฟ ขนาดกำลังไฟสูงสุด 800 วัตต์
22. เครื่องนึ่งความดันไอ (autoclave)
23. ขวดรูปชมพู่ขนาดเล็ก (small erlenmeyer flask)
24. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายในไมโครเพลท (Microplatereader) ยี่ห้อ Bio-Rad รุ่น xMark Microplate Absorbance Spectrophotometer

25. กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ (Inverted microscope) ยี่ห้อ Olympus รุ่น IX70)

26. เครื่อง scanning electron microscope (SEM)

วิธีการทดลอง

1. การสังเคราะห์อนุภาคเงินนาโนที่มีสารเคลือบผิวเป็นสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงด้วยวิธี Microwave-assisted Synthesis

- เตรียมสารละลาย AgNO_3 ให้มีความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ เพื่อใช้เป็น stock concentration สารละลายนี้ควรเก็บไว้ในที่มืด

- เตรียมสารละลายสารสกัดกระเจี๊ยบแดงให้มีความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ เพื่อเป็น stock concentration

- ผสมสารละลายเพื่อสังเคราะห์อนุภาคเงินนาโนโดยให้อัตราส่วน SNP 1:0.5 ดังตารางที่ 1

- คนให้เข้ากันด้วย magnetic stirrer แล้วปิดปากภาชนะอย่างหลวม แล้วนำไปเข้าเครื่องไมโครเวฟ กำลังไฟ 500 วัตต์ เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จนสารละลายที่ผ่านการให้ความร้อนนั้นเปลี่ยนเป็นสีเหลือง และจะยิ่งเข้มข้นเมื่อเวลาผ่านไปนานขึ้น จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปทดสอบค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้เครื่อง UV-vis Spectrophotometer

ตาราง 1 แสดงปริมาณของสารที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคเงินนาโนอัตราส่วน SNP-Ro 1:0.5

อัตราส่วน	AgNO_3 (มิลลิลิตร)	สารสกัดกระเจี๊ยบ (มิลลิลิตร)	Distilled water (มิลลิลิตร)
1:0.5	5	2.5	42.5

2. การสร้างเม็ดอนุภาคเงินนาโนที่มีสารเคลือบผิวเป็นสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง (SNP-Ro- CaCl_2 bead)

- เตรียมสารละลายอัลจินเตความเข้มข้น 10% w/v ปริมาณ 100 มิลลิลิตร โดยใช้ผงอัลจินต 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ผสมสารละลายโดยใช้ stirrer จนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

- ใส่ส่วนผสมต่างๆ ลงในบีกเกอร์ ดังนี้
 - สารละลายอัลจินต 10% w/v 8 มิลลิลิตร
 - สารละลายอนุภาคเงินนาโน 10 มิลลิลิตร
 - น้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร
- ใส่ส่วนผสมในบีกเกอร์สำหรับเม็ดอัลจินตที่ใช้สำหรับเป็นกลุ่มควบคุม ดังนี้
 - สารละลายอัลจินต 10% w/v 8 มิลลิลิตร
 - น้ำกลั่น 12 มิลลิลิตร
- เตรียมสารละลายcalcium chloride ในบีกเกอร์ โดยให้ความเข้มข้น 1, 3, 5 %w/v
- ใช้กระบอกฉีดยาดูดสารละลายที่ผสมอัลจินตและอนุภาคเงินนาโน (SNP-Ro 1:0.5) หยดลงในสารละลาย calcium chloride 1%w/v หยดละ 0.1 มิลลิลิตร จะมีการสร้าง SNP-Ro-CaCl₂ bead เกิดขึ้น ทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นนำ SNP-Ro-CaCl₂ bead ออกมาล้างด้วย น้ำกลั่น (deionized water) แล้วนำเข้าตู้อบ 45 องศาเซลเซียส 15 นาที
 - จากนั้นทำการสร้าง SNP-Ro-CaCl₂ bead อีกครั้งโดยเปลี่ยนเป็นหยดสารละลายผสมอัลจินตและอนุภาคเงินนาโน (SNP-Ro 1:0.5) หยดลงในสารละลาย calcium chloride 3 และ 5 %w/v ตามลำดับ
 - สร้างกลุ่มควบคุม(Alginate bead) โดยหยดสารละลายอัลจินต หยดลงในสารละลาย calcium chloride 1, 3 และ 5 %w/v ตามลำดับโดยทำตามขั้นตอนข้างต้น
 - นำ SNP-Ro-CaCl₂ bead ทุกแบบมาวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง และนำไปวิเคราะห์พื้นผิว โดย เครื่อง SEM

3.การวัดค่าการปลดปล่อยอนุภาคเงินนาโนจาก SNP-Ro-CaCl₂ bead โดยการใช้เครื่อง UV-vis spectrophotometer

3.1 การหากราฟมาตรฐาน (Standard calibration curve) ของสารละลายอนุภาคเงินนาโนที่มีสารเคลือบผิวเป็นสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง(SNP-Ro)

- เตรียม SNP-Ro 1:0.5 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 170, 85, 42.5, 21.25, 10.63, 5.31 และ 2.65 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร นำแต่ละความเข้มข้นมาบรรจุลงใน cuvette 2 มิลลิลิตร แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร
 - นำค่าความเข้มข้นของ SNP-Ro และ ค่าการดูดกลืนแสง มากำหนดจุดในกราฟ โดยให้ค่าความเข้มข้นของ SNP-Ro เป็นแกน x และ ค่าการดูดกลืนแสง เป็นแกน y

- สร้างแนวเส้นตรงจากจุดที่กำหนดจุดลงในกราฟ แล้วกำหนดให้แสดงสมการเส้นตรง จะได้สมการเส้นตรงที่เป็นตัวแทนของ Standard calibration curve ของ SNP-Ro ออกมา ดังสมการที่ 1

$$y = ax + c \dots\dots\dots 1$$

โดย y = ค่าการดูดกลืนแสง

x = ค่าความเข้มข้นของ SNP-Ro

a = Extinction coefficient (ϵ)

c = ค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้นเมื่อไม่มีสาร SNP-Ro

จากการทดลองนี้จะทำให้เราหาค่า Extinction coefficient ของ SNP-Ro ได้และจะนำไปใช้ในการคำนวณค่าความเข้มข้นของ SNP-Ro ที่ปลดปล่อยออกจาก SNP-Ro-CaCl₂ bead ต่อไป

3.2 การหาความเข้มข้นของ SNP-Ro ที่ปลดปล่อยออกจาก SNP-Ro-CaCl₂ bead

- นำน้ำกลั่นมาใส่ใน cuvette 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำ SNP-Ro-CaCl₂ bead ที่หยดใส่สารละลาย calcium chloride 1% w/v (SNP-Ro-1% CaCl₂ bead) มาใส่ใน cuvette แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่เวลา 1, 3, 5, 15, 30, 60, 120, 180, 240 นาที, 24, 48, 72, 168 และ 336 ชั่วโมง ด้วยเครื่อง UV-vis spectrophotometer

- นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ในแต่ละเวลาที่วัด มาคำนวณในสมการที่หาได้จาก standard curve จะได้ค่าความเข้มข้นของ SNP-Ro ที่ปลดปล่อยออกมา แล้วนำค่าความเข้มข้นของ SNP-Ro ที่ปลดปล่อยออกมา และเวลา มากำหนดจุดลงในกราฟ

- เปลี่ยนเป็น SNP-Ro-3% CaCl₂ bead, SNP-Ro-5% CaCl₂ bead และ alginate bead โดยทำการทดลองการปลดปล่อยตามวิธีการข้างต้น

4. การเตรียมเชื้อ แอกริเกทแบคทีเรีย แอคติโนไมซีเทมคอมมิแทนส์

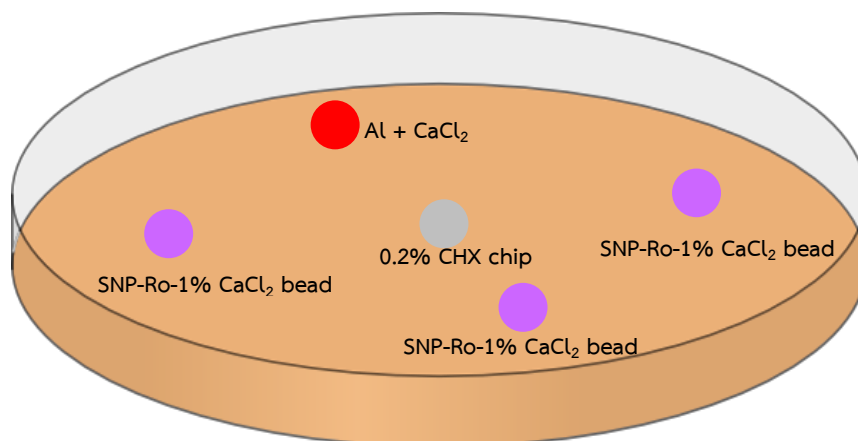
นำเชื้อ แอกริเกทแบคทีเรีย แอคติโนไมซีเทมคอมมิแทนส์ ที่แช่แข็งไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส มาเลี้ยงในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อชนิด Brain heart infusion เพื่อให้เชื้อ active โดยต้องทิ้งไว้ประมาณ 24 ชั่วโมง หลังจากที่ได้เชื้อเจริญในอาหารเหลวแล้ว เราจะใช้ห่วงเชื้อ (inoculating loop) นำเชื้อนั้นมาทำการลากเส้น (cross streak) บนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อชนิด Brain heart infusion เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ สำหรับการใช้งาน นำห่วงเชื้อมาเชื้อโคโลนีของเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยวบนอาหารแข็งมา 1-2 โคโลนี นำไปใส่ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อชนิด Brain- heart infusion ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำมาบ่มในตู้เพาะเลี้ยงในสภาวะคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปรับให้มีความขุ่นของเชื้อโดยใช้เครื่องวัดค่าการ

ดูดกลืนแสงของสารละลาย (Spectrophotometer) ให้มีค่าความขุ่นเท่ากับความขุ่นมาตรฐานแมคฟาร์แลนด์ เบอร์ 0.5 (McFarland no.0.5) ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร และค่าดูดกลืนแสง 0.08-0.13 เพื่อให้มีเชื้ออยู่ระหว่าง $1-2 \times 10^8$ โคโลนีฟอร์มมิ่งยูนิตต่อมิลลิลิตร (CFU/ml) เตรียมไว้สำหรับนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

5. การศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ แอคติโนไมซีเทมคอมมิแทนส์ของเม็ดอนุภาคเงินนาโนที่มีสารเคลือบผิวเป็นสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง ด้วยวิธีดิสก์ ดิฟฟิวชัน (Disk diffusion technique)

การทดสอบแบบดิสก์ ดิฟฟิวชันเป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากในห้องปฏิบัติการ เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว สามารถให้ผลที่แน่นอนและถูกต้อง การทดสอบวิธีนี้ใช้หลักการแพร่ของสารบนแผ่นฟิล์มในปริมาณทดสอบที่กำหนดไว้ และวัดผลการยับยั้งจุลชีพได้จากขนาดของโซนใส (clear zone) ของกลุ่มทดลองคือ เม็ดอนุภาคเงินนาโนที่มีสารเคลือบผิวเป็นสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง 3 แบบ คือ SNP-Ro-1% CaCl_2 bead, SNP-Ro-3% CaCl_2 bead และ SNP-Ro-5% CaCl_2 bead กลุ่มควบคุมลบคือ Alginate bead และกลุ่มควบคุมบวกคือ 0.2% คลอเฮกซิดีน ชิป (Chlorhexidine chip) เตรียมเชื้อ แอคติโนไมซีเทมคอมมิแทนส์ บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Brain heart infusion โดยใช้ไม้พันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จุ่มเชื้อ แอคติโนไมซีเทมคอมมิแทนส์ ซึ่งได้ทำการเจือจางเชื้อที่เตรียมไว้ $1-2 \times 10^8$ โคโลนีฟอร์มมิ่งยูนิตต่อมิลลิลิตร ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ $1-2 \times 10^6$ โคโลนีฟอร์มมิ่งยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยทำการดูดเชื้อที่ได้จากการบ่ม 10 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวชนิด Brain-Heart infusion ปริมาตร 990 ไมโครลิตร นำเชื้อที่เจือจางมาป้ายบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง

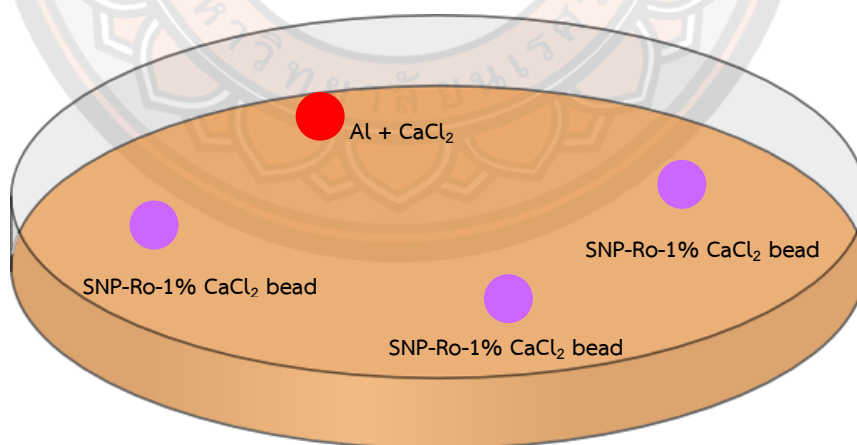
ใช้คิมคิป SNP-Ro- CaCl_2 bead ที่ละความเข้มข้นจำนวน 3 ชั้น ตามด้วย alginate bead และ chlorhexidine chip ที่ไม่มีอนุภาคเงินนาโนลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อในตำแหน่งที่กำหนดไว้แล้ว กดเบาๆ นำจานเพาะเชื้อไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงในสภาวะคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการทดลองแบบเดียวกันโดยเปลี่ยนเป็นความเข้มข้นอื่น อ่านผลทดลองโดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีเชื้อเจริญ (Inhibition zone/Clear zone) โดยวัดหน่วยเป็นมิลลิเมตร ที่เวลา 15, 30, 60, 120, 180, 240 นาทีและ 24, 48, 72, 168 ชั่วโมง และ 336 ชั่วโมง และวิเคราะห์ผลการทดลอง



ภาพ 33 แสดงตำแหน่งที่จะวางเม็ดอนุภาคเงินนาโน เม็ดอัลจินต และคลอเฮกซิดีนชิป ทั้งหมด 5 ตำแหน่ง

6. การศึกษาผลของเม็ดอนุภาคเงินนาโนที่มีสารเคลือบผิวเป็นสารสกัดจากกระเจียบแดงในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียเมื่อเก็บไว้ในระยะเวลาที่ต่างกัน

การทดลองนี้เป็นการทดสอบประสิทธิภาพของ SNP-Ro-CaCl₂ bead เมื่อเก็บไว้ในเวลาที่ต่างกันเพื่อหาวันหมดอายุของ SNP-Ro-CaCl₂ bead โดยจะใช้วิธีดิสก์ ดิฟฟิวชัน จะทำการเก็บ SNP-Ro-CaCl₂ bead ไว้เป็นระยะเวลา 1, 3, 10, 17, 24 และ 31 วัน แล้วเอาแต่ละเวลามาทำการทดสอบด้วยวิธี ดิสก์ ดิฟฟิวชัน ตามข้อ 5 แต่จะไม่ได้ทำการใส่ 0.2% คลอเฮกซิดีนชิป แล้ววัดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีเชื้อเจริญ ดังแสดงในภาพที่ 34



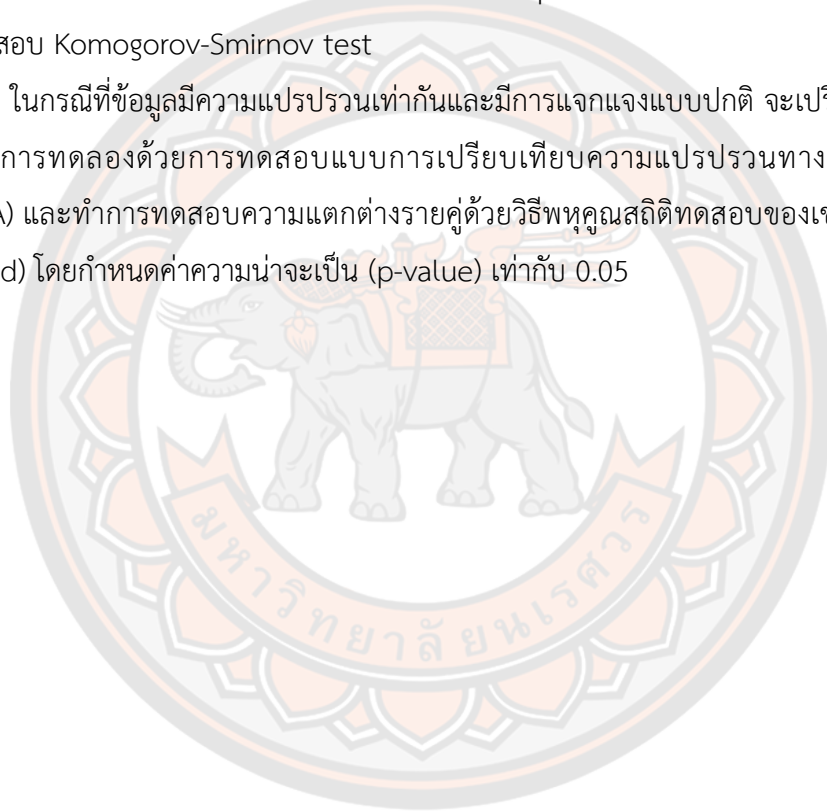
ภาพ 34 แสดงตำแหน่งที่จะวางเม็ดอนุภาคเงินนาโน และเม็ดอัลจินตทั้งหมด 4 ตำแหน่ง

การวิเคราะห์ข้อมูล

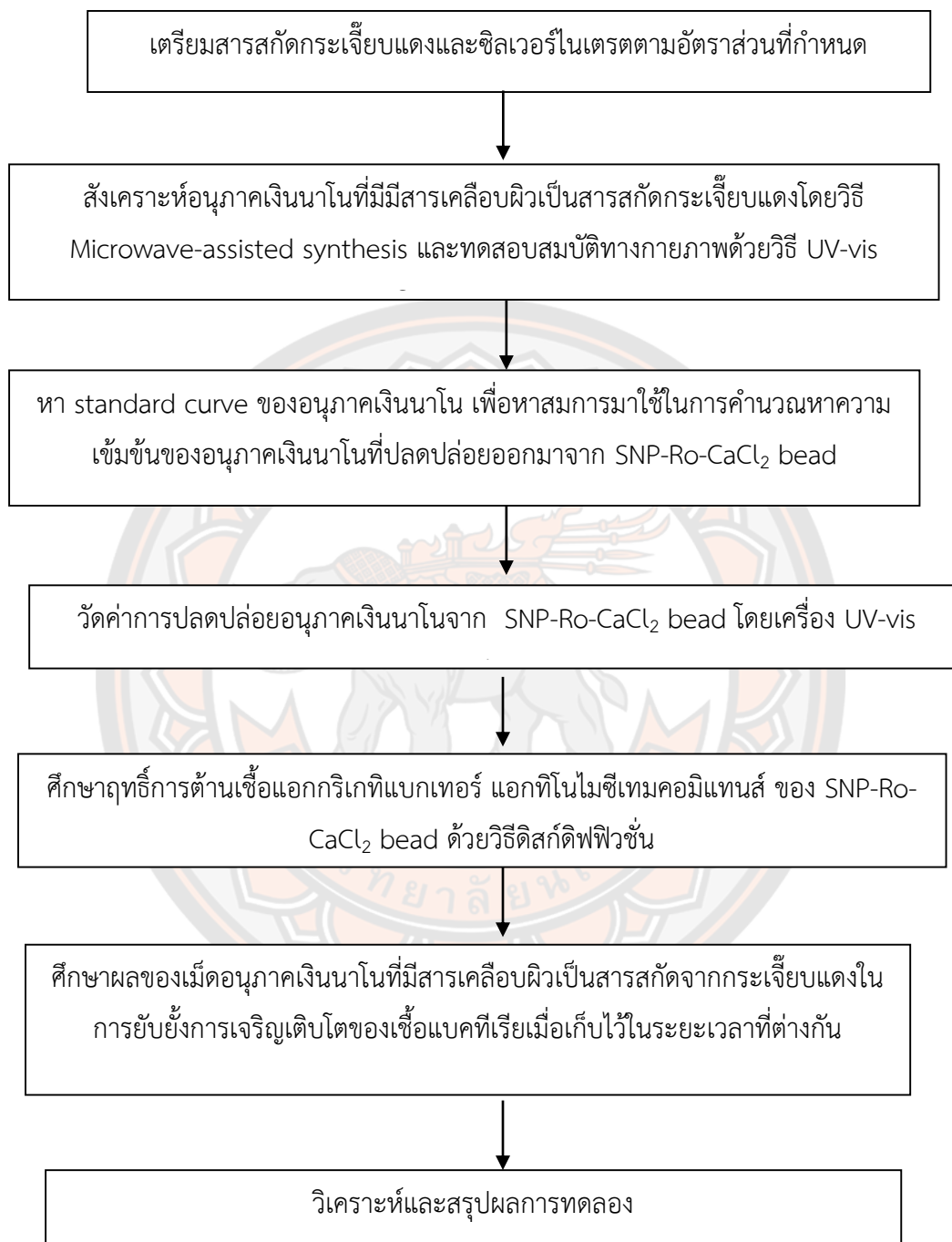
สถิติที่ใช้ในงานวิจัย

การเปรียบเทียบขนาดของการเกิดโซนใสจากชั้นตอนติสก์ ดิฟฟิวชั่น ระหว่างกลุ่มทดลองคือ SNP-Ro-CaCl₂ bead และกลุ่มควบคุม Alginate bead ที่ไม่มีอนุภาคเงินนาโน จะใช้ค่าสถิติเชิงอนุมานมาใช้ในการอธิบายและสรุปผลการทดลอง โดยนำค่าผลการทดลองที่ได้จากการทำการทดลองทั้ง 3 ครั้ง มาหาค่าเฉลี่ย (Mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation) เพื่อวัดแนวโน้มเข้าสู่ส่วนกลาง ทดสอบการกระจาย (measures of dispersion) และการแจกแจงของข้อมูลโดยใช้การทดสอบ Komogorov-Smirnov test

ในกรณีที่ข้อมูลมีความแปรปรวนเท่ากันและมีการแจกแจงแบบปกติ จะเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของผลการทดลองด้วยการทดสอบแบบการเปรียบเทียบความแปรปรวนทางเดียว (One way ANOVA) และทำการทดสอบความแตกต่างรายคู่ด้วยวิธีพหุคูณสถิติทดสอบของเชฟเฟ้ (Scheffe's method) โดยกำหนดค่าความน่าจะเป็น (p-value) เท่ากับ 0.05



แผนภูมิสรุปวิธีการดำเนินการวิจัย



ภาพ 35 แสดงขั้นตอนการศึกษาพฤติกรรมการต้านเชื้อ แบคทีเรียแบกเทอร์ แอกทีโนไมซีเทมคอมมิแทนส์ ของ SNP-Ro-CaCl₂ bead

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากโครงการ

1. สามารถสังเคราะห์ SNP-Ro-CaCl₂ bead โดยใช้อัลจิเนตและแคลเซียมคลอไรด์ ในการขึ้นรูปเป็นเม็ด bead ได้
2. ทราบความเข้มข้นของอนุภาคเงินนาโนที่ปลดปล่อยออกจาก SNP-Ro-CaCl₂ bead ที่เวลาต่างๆได้
3. ทราบฤทธิ์ต้านเชื้อ แอกริเกทิแบกเทอร์ แอททีโนไมซีเทมคอมมิแทนส์ของ SNP-Ro-CaCl₂ bead
4. ทราบอายุการใช้งานของ SNP-Ro-CaCl₂ bead เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาวิจัยที่จะนำไปสู่การพัฒนาผลิตภัณฑ์ในการรักษาโรคปริทันต์

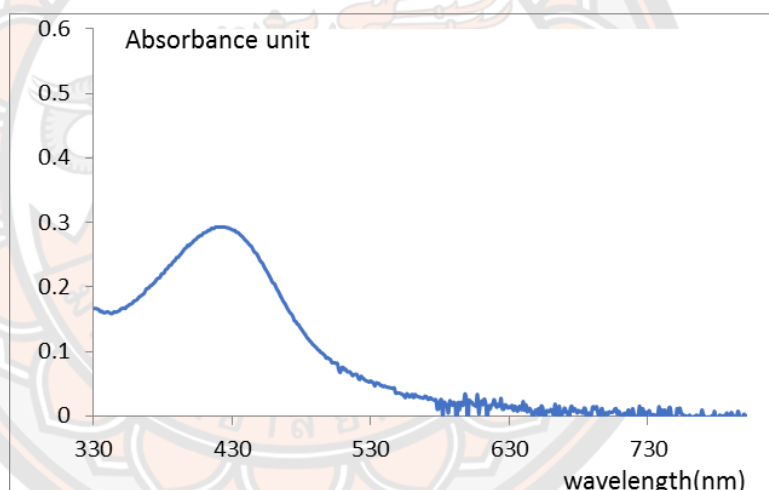


บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. ผลการสังเคราะห์อนุภาคเงินนาโน (SNP-Ro)

สารละลายอนุภาคเงินนาโนถูกสังเคราะห์โดยใช้ซิลเวอร์ไนเตรต และมีสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงเป็นทั้ง capping agent และ reducing agent ด้วยวิธี Microwave assisted synthesis สารละลายที่ได้เปลี่ยนจากสีใสเป็นสีเหลือง และหลังจากเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer พบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 400-420 นาโนเมตร ดังแสดงในภาพที่ 36 ซึ่งเป็นช่วงการดูดกลืนแสงเฉพาะของอนุภาคเงินนาโน

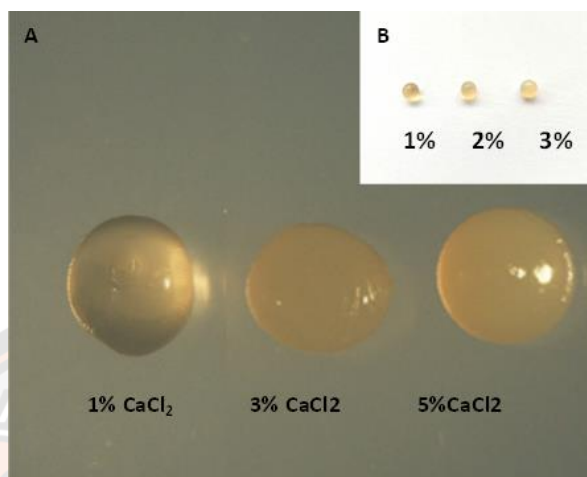


ภาพ 36 แสดงกราฟค่าการดูดกลืนแสงของ SNP-Ro ด้วยการใช้อยู่ UV-Vis spectrophotometer

2. ผลการสังเคราะห์เม็ดอนุภาคเงินนาโน (SNP-Ro-CaCl₂ bead) โดยใช้ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ ที่แตกต่างกัน

เมื่อทำการหยดสารผสมระหว่างอัลจินตและอนุภาคเงินนาโนลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 1, 3 และ 5% w/v จะได้ SNP-Ro-CaCl₂ bead ที่มีลักษณะเป็นเม็ดเจลทรงกลม มีสีเหลืองดังแสดงในภาพที่ 37B และมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยของ SNP-Ro-1% CaCl₂ bead, SNP-Ro-3% CaCl₂ bead และ SNP-Ro-5% CaCl₂ bead คือ 3.83 ± 0.02 , 3.83 ± 0.12 และ 3.84 ± 0.09 mm. ตามลำดับ เมื่อนำ SNP-Ro-CaCl₂ bead ไปวิเคราะห์ด้วยกล้อง Stereoscope พบว่าเมื่อขึ้นรูป SNP-Ro-CaCl₂ bead ด้วยการใช้อยู่แคลเซียมคลอไรด์ เชื่อมขวางกับ

สารละลายอัลจินต จะมีลักษณะพื้นผิวที่เรียบ มีสีเหลือง ซึ่งความทึบแสงของ SNP-Ro-CaCl₂ bead จะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ ดังแสดงในภาพที่ 37A



ภาพ 37 A แสดงลักษณะพื้นผิวของ SNP-Ro-CaCl₂ bead ที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ ต่างกันเมื่อวิเคราะห์ด้วยกล้อง Stereoscope (กำลังขยาย 0.35X) B แสดงลักษณะของ SNP-Ro-CaCl₂ bead ที่มีความเข้มข้นของ CaCl₂ ต่างกัน

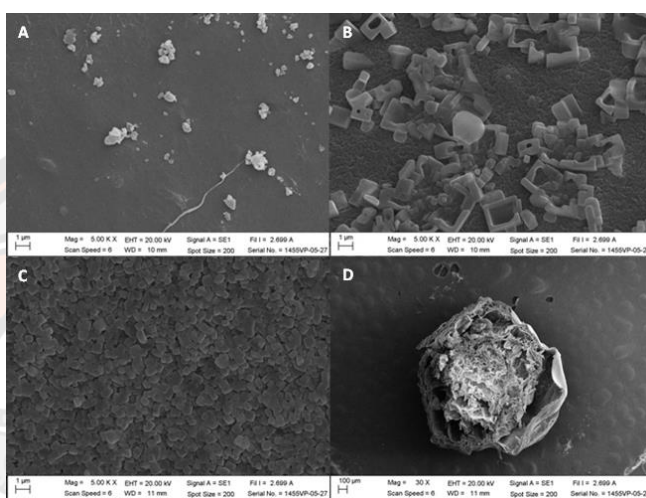
เมื่อทำการผ่าครึ่ง SNP-Ro-CaCl₂ bead และส่องด้วยกล้อง Stereoscope พบว่า SNP-Ro-1% CaCl₂ bead จะพบลักษณะของความทึบแสงที่บริเวณขอบมากกว่าส่วนตรงกลางที่ยังคงมีความใสอยู่ แตกต่างกับ SNP-Ro-3% CaCl₂ bead และ SNP-Ro-5% CaCl₂ bead ที่มีความทึบแสงมากกว่าและบริเวณที่ทึบแสงขยายไปถึงตรงกลางด้วย ซึ่งแสดงถึงการเชื่อมขวางของแคลเซียมคลอไรด์ กับอัลจินต ที่มากกว่า SNP-Ro-1% CaCl₂ bead ดังแสดงในภาพที่ 38



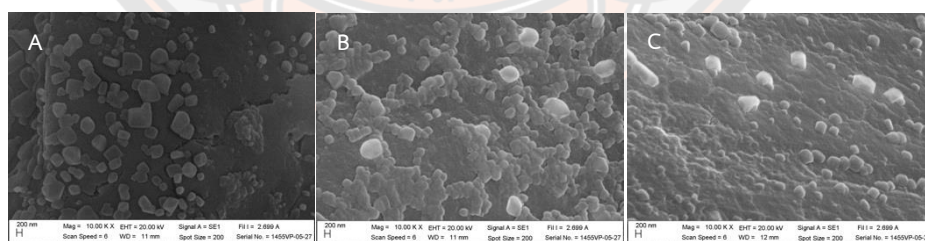
ภาพ 38 แสดงภาพจากกล้อง Stereoscope (กำลังขยาย 5.75X) เป็นภาพตัดขวางของ SNP-Ro-CaCl₂ beads ที่สังเคราะห์โดยใช้ความเข้มข้นของ CaCl₂ ที่ต่างกัน A: SNP-Ro-1% CaCl₂ bead B: SNP-Ro-3% CaCl₂ bead และ C: SNP-Ro-5% CaCl₂ bead

สอดคล้องกับการวิเคราะห์พื้นผิวด้านนอกของ SNP-Ro-CaCl₂ bead ภายใต้อุปกรณ์ SEM ที่พบว่า พื้นผิวของ SNP-Ro-1% CaCl₂ bead จะพบลักษณะของแคลเซียมคลอไรด์ ที่มีความหนาแน่นน้อยกว่า SNP-Ro-3% CaCl₂ bead และจะพบความหนาแน่นของแคลเซียมคลอไรด์ มาก

ที่สูงสุดในพื้นผิว SNP-Ro-5% CaCl_2 bead ดังแสดงในภาพที่ 39 และเมื่อวิเคราะห์ภาพตัดขวางของ SNP-Ro-1% CaCl_2 bead จะแสดงถึงลักษณะของการเชื่อมขวางของแคลเซียมคลอไรด์ กับ อัลจิเนต ที่ผสมกับอนุภาคเงินนาโนทำให้เกิดลักษณะที่เป็นรูพรุนโดยทั่วไป แสดงดังภาพ 39D และที่ กำลังขยายของ SEM 10,000X สามารถมองเห็นลักษณะของอนุภาคเงินนาโน ภายในเม็ดอนุภาคเงินนาโนทั้ง 1%, 3% และ 5% ดังแสดงในภาพที่ 40



ภาพ 39 แสดงภาพจากกล้อง SEM โดย แสดงบริเวณพื้นผิวด้านนอกของ A: SNP-Ro-1% CaCl_2 bead B: SNP-Ro-3% CaCl_2 bead C: SNP-Ro-5% CaCl_2 bead ที่กำลังขยาย 5000X และ D: แสดงภาพตัดขวางของ SNP-Ro-1% CaCl_2 bead ที่กำลังขยาย 30X



ภาพ 40 แสดงภาพจากกล้อง SEM ที่กำลังขยาย 10,000X A: SNP-Ro-1% CaCl_2 bead B: SNP-Ro-3% CaCl_2 bead C: SNP-Ro-5% CaCl_2 bead

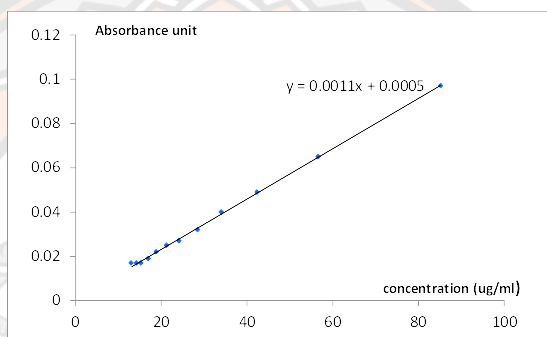
3. ผลการศึกษาการวัดค่าปลดปล่อยอนุภาคเงินนาโนจาก SNP-Ro-CaCl₂ beads ด้วยเครื่องUV-Vis spectrophotometer

3.1 การหากราฟมาตรฐาน (Standard calibration curve) ของสารละลายอนุภาคเงินนาโนที่มีสารเคลือบผิวเป็นสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง (SNP-Ro)

Standard calibration curve ของสารละลาย SNP-Ro แสดงดังภาพที่ 41 จากกราฟนี้จะได้สมการเส้นตรงที่เป็นตัวแทนของ Standard calibration curve ของ SNP-Ro คือ

$$y = 0.0011x + 0.0005 \dots\dots\dots 2$$

ซึ่งสมการนี้จะถูกนำไปใช้ในการหาความเข้มข้นของ SNP-Ro ที่จะปลดปล่อยออกมาจาก SNP-Ro-CaCl₂ bead เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมงต่อไป

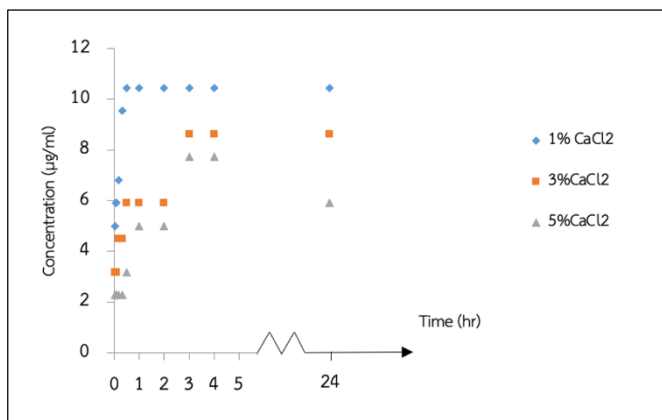


ภาพ 41 แสดง Standard calibration curve ของ SNP-Ro

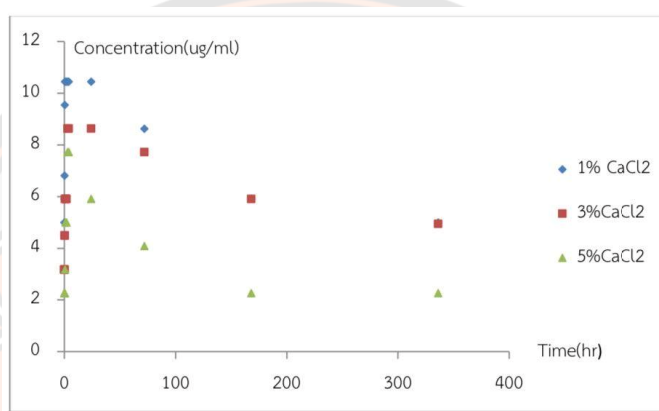
3.2 การหาความเข้มข้นของ SNP-Ro ที่ปลดปล่อยออกจาก SNP-Ro-CaCl₂ bead เมื่อเวลาผ่านไป

ความเข้มข้นของ SNP-Ro ที่ปลดปล่อยออกจาก SNP-Ro-CaCl₂ bead ที่เวลา 1, 3, 5, 15, 30, 60, 120, 180, 240 นาที, 24, 48, 72, 168 และ 336 ชั่วโมง แสดงดังภาพที่ 42 และ 43 พบว่า SNP-Ro-1% CaCl₂ bead จะมีการปลดปล่อย SNP-Ro ออกมาได้มากกว่า และเร็วกว่า SNP-Ro-CaCl₂ bead ชนิดอื่น โดยการปลดปล่อย SNP-Ro จะเริ่มคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1-3 ในขณะที่ SNP-Ro-3% CaCl₂ bead ตอนเริ่มต้นจะมีการปลดปล่อยออกมได้น้อยกว่า และช้ากว่า หลังจากนั้นจะพบว่าเริ่มมีการคงที่ของการปลดปล่อย SNP-Ro ที่ชั่วโมงที่ 5 เป็นต้นไป ซึ่งจะพบว่า SNP-Ro-5% CaCl₂ bead จะปลดปล่อย SNP-Ro ได้น้อยที่สุดและใช้เวลานาน ดังนั้นยิ่งความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ เพิ่มมากขึ้นจะมีการปลดปล่อย SNP-Ro ในปริมาณที่น้อยและใช้เวลานานกว่า

และเมื่อติดตามไป 336 ชั่วโมง หรือ 14 วัน ดังแสดงดังภาพที่ 43 จะพบว่าจะมีการปลดปล่อย SNP-Ro ออกมได้น้อยลงเมื่อเทียบกับ 24 ชั่วโมง โดย SNP-Ro-1% CaCl₂ bead จะมีการปลดปล่อย SNP-Ro มากสุดรองลงมาคือ SNP-Ro-3% CaCl₂ bead และ SNP-Ro-5% CaCl₂ bead



ภาพ 42 แสดงกราฟการปลดปล่อย SNP-Ro จาก SNP-Ro-CaCl₂ beads ในเวลา 24 ชั่วโมง



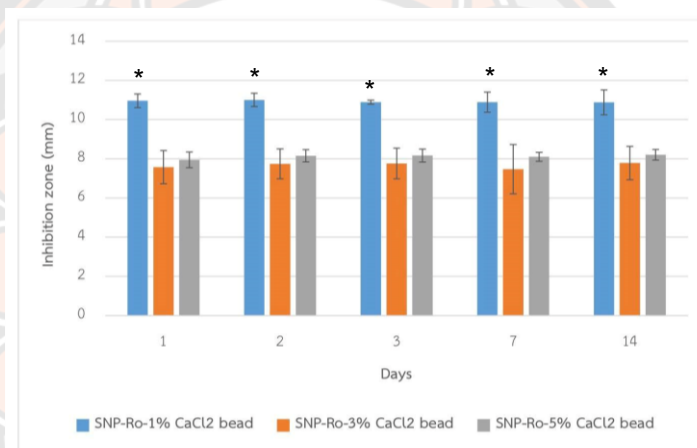
ภาพ 43 แสดงกราฟการปลดปล่อย SNP-Ro จาก SNP-Ro-CaCl₂ beads ในเวลา 14 วัน

4. การศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียทีแบกเทอร์ แอททีโนไมซีเทมคอมมิแทนส์ของเม็ดอนุภาคเงินนาโนที่มีสารเคลือบผิวเป็นสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง ด้วยวิธีดิสก์ ดิฟฟิวชัน

ผลการทดลองวัดจากขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีเชื้อเจริญโดยวัดหน่วยเป็น มิลลิเมตร ที่เวลา 15, 30, 60, 120, 180, 240 นาทีและ 24, 48, 72, 168 ชั่วโมง และ 336 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 44 และ 45 เนื่องจากข้อจำกัดเรื่องเวลาในการเพาะเชื้อจึงไม่สามารถวัดขนาดของบริเวณที่ไม่มีเชื้อเจริญ ที่เวลาน้อยกว่า 24 ชั่วโมงได้ ผลที่วัดจึงทำการวัดผลที่เวลา 1, 2, 3, 7 และ 14 วัน

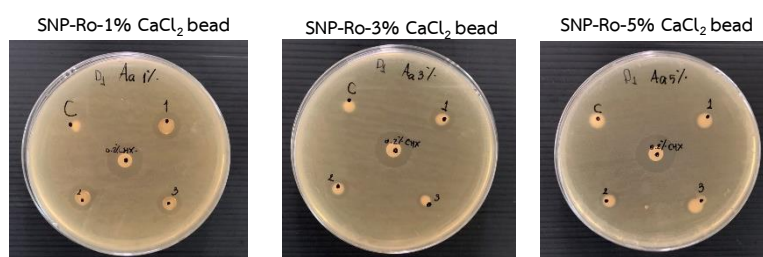
พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 1 วัน ขนาดของบริเวณที่ไม่มีเชื้อเจริญ ของ SNP-Ro-1% CaCl₂ bead มีขนาดใหญ่ที่สุดคือ 10.96 ± 0.35 มิลลิเมตร เมื่อเปรียบเทียบทางสถิติภายในกลุ่ม พบว่าขนาดของบริเวณที่ไม่มีเชื้อเจริญจะไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \geq 0.05$) เมื่อเวลาผ่านไป 14 วัน เมื่อทำการเปรียบเทียบทางสถิติระหว่างกลุ่มพบว่า SNP-Ro-1% CaCl₂ bead มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีเชื้อเจริญมากที่สุด แตกต่างกับ SNP-Ro-3% CaCl₂ bead และ SNP-Ro-5% CaCl₂ bead อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) สำหรับขนาดของบริเวณที่ไม่มีเชื้อเจริญในวันที่ 1 ของ SNP-Ro-3% CaCl₂ bead และ SNP-Ro-5% CaCl₂ bead มีขนาด 7.57 ± 0.85

มิลลิเมตร และ 7.95 ± 0.40 มิลลิเมตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบทางสถิติระหว่างกลุ่ม พบว่า ทั้งสองกลุ่มมีขนาดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \geq 0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 44 และ 45 และเมื่อเวลาผ่านไป 14 วัน ทำการเปรียบเทียบทางสถิติภายในกลุ่ม พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \geq 0.05$) เมื่อเทียบกับวันแรก เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมลบคือ alginate bead ซึ่งไม่พบบริเวณที่ไม่มีเชื้อเจริญเลย และเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมบวกโดยเทียบกับ 0.2% คลอเฮกซิดีนชิป (Chlorhexidine chip) ในปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร พบบริเวณที่ไม่มีเชื้อเจริญประมาณ 15.44 ± 0.12 ถึง 16.07 ± 0.03 มิลลิเมตร จึงสามารถสรุปได้ว่า SNP-Ro-CaCl₂ bead ทั้ง 3 ชนิดจะสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียแบคทีเรีย แอททีโนไมซีเทมคอมมิแทนส์ อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุดใน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเมื่อเวลาผ่านไป 14 วันผลจะไม่แตกต่างกัน โดยพบว่า SNP-Ro-1% CaCl₂ bead สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียแบคทีเรีย แอททีโนไมซีเทมคอมมิแทนส์ ได้ดีที่สุด



ภาพ 44 แสดงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีเชื้อเจริญทั้งสามความเข้มข้นเมื่อระยะเวลาผ่านไป

* แสดงความต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับความเข้มข้นอื่นในช่วงเวลาเดียวกัน

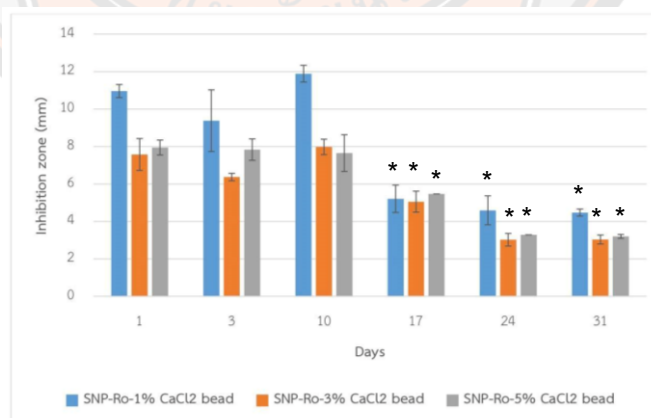


ภาพ 45 แสดงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีเชื้อเจริญทั้งสามความเข้มข้นเมื่อระยะเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง

5. การศึกษาผลของเม็ดอนุภาคเงินนาโนที่มีสารเคลือบผิวเป็นสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียเมื่อเก็บไว้ในระยะเวลาที่ต่างกัน

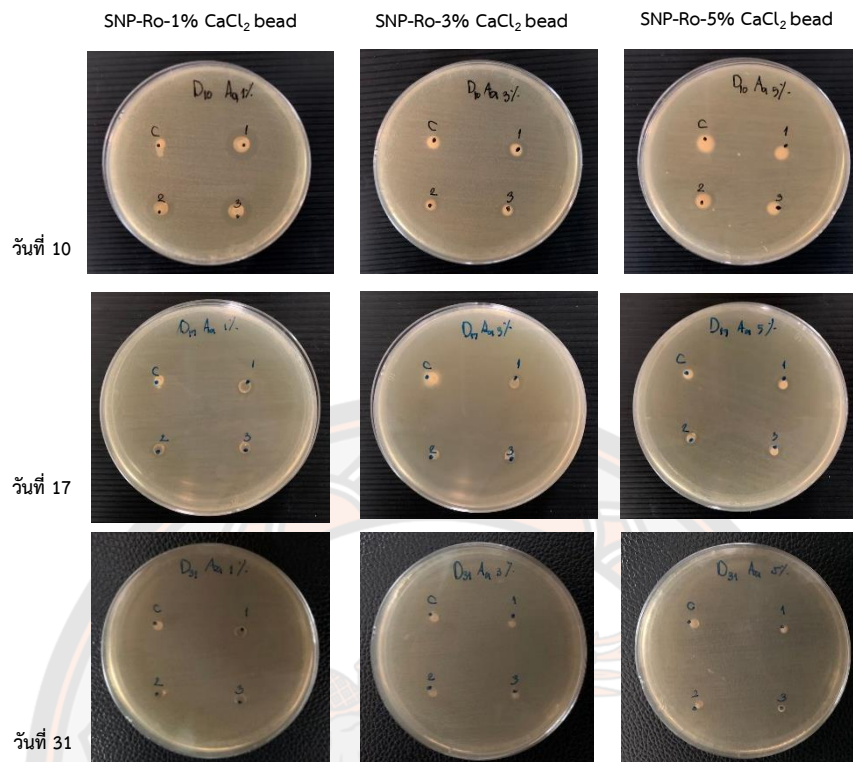
การทดลองนี้เป็นการทดสอบประสิทธิภาพของ SNP-Ro-CaCl₂ bead เมื่อเก็บไว้ในเวลาที่ต่างกัน เพื่อหาวันหมดอายุของ SNP-Ro-CaCl₂ bead โดยจะใช้วิธีดิสก์ ดิฟฟิวชัน จะทำการเก็บ SNP-Ro-CaCl₂ bead ไว้เป็นระยะเวลา 1, 3, 10, 17, 24 และ 31 วัน แล้วเอาแต่ละเวลามาทำการทดสอบด้วยวิธี ดิสก์ ดิฟฟิวชัน แล้ววัดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีเชื้อเจริญ ดังแสดงในภาพที่ 46 และ 47

ผลการทดลอง เมื่อทำการทดสอบทางสถิติพบว่า SNP-Ro-1% CaCl₂ bead วันที่ 1, 3 และ 10 มีเส้นผ่าศูนย์กลางมากที่สุด ต่างกับวันที่ 17 เป็นต้นไปโดยจะแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียแบกเทอร์ แอกทีโนไมซีเทมคอมมิแทนส์ จะลดลงประมาณครึ่งหนึ่ง โดยขนาดของบริเวณที่ไม่มีเชื้อเจริญของ SNP-Ro-1% CaCl₂ bead จากวันแรกได้ 10.96 ± 0.35 มิลลิเมตร ผ่านไป 17 วัน ลดลงเป็น 5.21 ± 0.73 มิลลิเมตร และมีขนาดลดลงอีกเล็กน้อยเมื่อเวลาผ่านไป 1 เดือน โดยขนาดของบริเวณที่ไม่มีเชื้อเจริญจะมีขนาดเพียง 4.47 ± 0.19 มิลลิเมตร ซึ่งตั้งแต่วันที่ 17 เป็นต้นไปขนาดของบริเวณที่ไม่มีเชื้อเจริญไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \geq 0.05$) ผลการทดลองไปในทางเดียวกันกับ SNP-Ro-3% CaCl₂ bead วันแรกได้ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีเชื้อเจริญ คือ 7.57 ± 0.86 มิลลิเมตร ในวันที่ 17 ลดลงเป็น 5.05 ± 0.56 มิลลิเมตร และผ่านไป 1 เดือนได้ขนาด 3.04 ± 0.24 มิลลิเมตร สุดท้ายคือ SNP-Ro-5% CaCl₂ bead จากวันแรกได้ 7.95 ± 0.40 มิลลิเมตร วันที่ 17 ลดลงเหลือ 5.47 ± 0.00 มิลลิเมตร และวัดขนาดเมื่อผ่านไป 1 เดือน ได้ 3.20 ± 0.10 มิลลิเมตร



ภาพ 46 แสดงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีเชื้อเจริญทั้งสามความเข้มข้นเมื่อเก็บไว้ในระยะเวลาที่แตกต่างกัน

*แสดงความต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ของแต่ละความเข้มข้นเทียบกับเวลาช่วงต้น (1-10 วัน)



ภาพ 47 แสดงขนาดบริเวณที่ไม่มีเชื้อเจริญทั้งสามความเข้มข้นเมื่อเก็บไว้ในวันที่ 10, 17 และ 31 วัน

บทที่ 5

อภิปรายผลการวิจัย

SNP-Ro-CaCl₂ bead ที่สังเคราะห์ขึ้นมาโดยการเชื่อมขวางของแคลเซียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ กับอัลจิเนตมีลักษณะเป็นเม็ดเจลทรงกลมผิวเรียบซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Lee และคณะ (64) พบว่ามีหลายปัจจัยที่ส่งผลต่อขนาดและรูปร่างของเม็ดอัลจิเนต ซึ่งความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ เป็นหนึ่งในปัจจัยที่ส่งผลต่อเม็ดอัลจิเนตได้ โดยเม็ดอัลจิเนตที่นำมาปรับปรุงโครงสร้างด้วยแคลเซียมคลอไรด์ (Ca-Alg bead) จะมีรูปร่างกลมมากขึ้น เป็นเนื้อเดียวกันมากขึ้น ตามความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ ที่เพิ่มมากขึ้น เนื่องจากความเข้มข้นของแคลเซียมไอออน ที่เพิ่มมากขึ้นจะทำให้เกิดการจับกันของโครงร่างของสายโพลีเมอร์ของอัลจิเนตได้แน่นมากขึ้นส่งผลให้ Ca-Alg bead มีขนาดเล็กลง อย่างไรก็ตาม ขนาดของเม็ดอัลจิเนตจะไม่เล็กลงอีกเมื่อความเข้มข้นของแคลเซียมไอออน ถึงระดับที่เพียงพอต่อการเข้าไปเชื่อมขวางในช่อง G-Block ทั้งหมดของสายโพลีเมอร์ของอัลจิเนต ผลดังกล่าวต่างจากการศึกษาในที่พบว่า ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ SNP-Ro-CaCl₂ bead ทั้งสามความเข้มข้นมีขนาดไม่ต่างกัน ผลที่แตกต่างกันนี้สามารถอธิบายได้โดยอ้างอิงจากการศึกษาของ Lotfipour และคณะ (65) พบว่า ความเข้มข้นของอัลจิเนตส่งผลต่อขนาดของเม็ดอัลจิเนตมากกว่าความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ ดังนั้นในการทดลองนี้ใช้ความเข้มข้นของอัลจิเนตเท่ากันเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ จึงส่งผลต่อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ SNP-Ro-CaCl₂ bead ไม่มากนัก เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Szekalska และคณะ (12) จะพบว่าเมื่อปรับปรุงโครงสร้างอัลจิเนตด้วย 0.1% และ 0.05% แคลเซียมคลอไรด์ จะพบว่ามีขนาดของอัลจิเนตไม่แตกต่างกัน

ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ มีผลต่อการเชื่อมขวางกับอัลจิเนต โดยสังเกตได้จากภาพที่วิเคราะห์ด้วย Stereoscope ที่บริเวณผิวนอกและภาพตัดขวางของ SNP-Ro-CaCl₂ bead พบว่ามีพื้นผิวเรียบ (66, 67) โดย SNP-Ro-1% CaCl₂ bead จะมีความโปร่งแสงและใสมากกว่า พื้นที่ที่มีการเชื่อมขวางเกิดน้อยกว่า สำหรับ SNP-Ro-3% CaCl₂ bead และ SNP-Ro-5% CaCl₂ bead ที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ มากขึ้นจะมีความทึบแสงมากกว่าและมีพื้นที่ในการเชื่อมขวางมากกว่า ผลที่ได้เป็นไปในแนวทางเดียวกับการศึกษาของ Quong และคณะ (68) , Puguang และคณะ (69) ที่พบว่า การสร้างเม็ดเจล แบบ External gelation เหมือนวิธีที่ใช้ในงานวิจัยนี้ จะมีการไล่ระดับของความเข้มข้นของของแคลเซียมไอออน และ อัลจิเนต โดยบริเวณผิวจะพบความเข้มข้นได้สูงกว่าบริเวณแกนกลาง ทำให้บริเวณผิวจะมีความหนาแน่นของโครงสร้างมากกว่าแกนกลาง จึงมี

ลักษณะโครงสร้างแบบไม่เป็นเนื้อเดียวกัน (Non-homogeneous) และจากการศึกษานี้พบว่า บริเวณที่มีลักษณะใส เกิดจากแคลเซียมไอออน ที่อยู่ภายในอยู่กันแบบหลวมๆ และโครงสร้างภายในมีรูพรุนขนาดใหญ่ ดังนั้นเมื่อใช้แคลเซียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้นน้อยจึงมีการเกิดโครงสร้างที่หนาแน่นได้น้อย เห็นเป็นลักษณะพื้นผิวใสได้มากกว่าการใช้แคลเซียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้นมาก ต่างจากการสร้างแบบ Internal gelation ที่แทบจะไม่มี ความเข้มข้นของสารอยู่ภายในโครงสร้างจึงมีลักษณะโครงสร้างแบบเป็นอันหนึ่งอันเดียวกัน (Homogeneous) มากกว่า

ผลเกิดขึ้นในแนวทางเดียวกันกับการวิเคราะห์พื้นผิวด้วย SEM พบว่า มีความหนาแน่นของแคลเซียมคลอไรด์ บริเวณผิวน้อยกว่าใน SNP-Ro-1% CaCl_2 bead และพบว่ามีความหนาแน่นมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ มากขึ้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Swioklo และคณะ (70) พบว่าเมื่อความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ เพิ่มมากขึ้นจะสังเกตเห็นผลึกของแคลเซียม ซึ่งบ่งบอกถึงการตกตะกอนของเกลือแคลเซียมในระหว่างการทำให้แห้งก่อนที่จะนำมาส่องภายใต้กล้อง SEM

นอกจากนี้เมื่อพิจารณาการปลดปล่อย SNP-Ro จาก SNP-Ro- CaCl_2 bead นั้นพบว่า SNP-Ro-1% CaCl_2 bead สามารถปลดปล่อย SNP-Ro ออกมาได้เร็วและปริมาณมาก และเมื่อความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ เพิ่มมากขึ้น เวลาที่ปลดปล่อยจะช้าลงและปลดปล่อยออกมาได้ในปริมาณที่น้อยกว่า สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Szekalska และคณะ (12) พบว่า การปรับปรุงโครงสร้างของอัลจินตด้วยการใช้ 0.1% แคลเซียมคลอไรด์ สามารถช่วยเพิ่มระยะเวลาในการปล่อยยาเมตฟอร์มินได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสามารถปล่อยได้ตั้งแต่ 2 ชั่วโมงแรกและคงอยู่จนถึง 12 ชั่วโมง ส่วนการปรับปรุงโครงสร้างของอัลจินตด้วยการใช้ 0.05% แคลเซียมคลอไรด์ จะเทียบเท่ากับการไม่ปรับปรุงโครงสร้างของอัลจินตเลยจึงทำให้จะมีการปลดปล่อยยาที่เร็ว ผลดังกล่าวเกิดจากการเชื่อมขวางที่เกิดขึ้นมากกว่าใน โครงสร้างที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ ที่มากขึ้น ซึ่งการเชื่อมขวางนี้จะเป็นเสมือนประตูที่คอยควบคุมการปลดปล่อยยา ถ้าการเชื่อมขวางเกิดขึ้นได้น้อยจะทำให้ประตูมีรูพรุนมากกว่าทำให้ง่ายต่อการปลดปล่อยยาและใช้เวลาน้อย ผลที่ได้นี้เป็นไปในแนวทางเดียวกันกับการศึกษาของ Russo และคณะ (11) Wong และคณะ (13) ที่พบว่าแคลเซียมไอออน จะมีความจำเพาะในการจัดเรียงตัวในอัลจินต โดยการจับกับประจุบวกของ guluronate ในลักษณะคล้ายกับการเรียงไข่ในกล่องกระดาษ (Like eggs in a cardboard egg box) ซึ่งช่วยเพิ่มความสัมพันธ์ด้านข้างทำให้เกิดการเชื่อมกันของสายโพลีเมอร์ตีมากขึ้น และทำให้โพลีเมอร์หรืออัลจินตมีความคงตัวมากขึ้น (Stability) อัลจินตจะสลายตัวช้าลง ทำให้สามารถคงตัวอยู่ได้นานมากขึ้น เพิ่มระยะเวลาในการปลดปล่อยยาได้

จากการศึกษานี้พบว่า ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ ที่แตกต่างกัน มีผลต่อการเชื่อมขวางกับอัลจินต ที่ต่างกัน ทำให้เกิดลักษณะของช่องว่างและรูพรุนที่แตกต่างกันของ SNP-Ro- CaCl_2

bead แสดงว่าการปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ จะส่งผลต่อการควบคุมการปลดปล่อย SNP-Ro ดังนั้นสำหรับการปลดปล่อยยาหรือสารเคมีที่ใช้รักษานั้น จะเลือกใช้ลักษณะการเชื่อมขวางของแคลเซียมคลอไรด์ กับอัลจินต ตามวัตถุประสงค์ของการรักษานั้นๆ ถ้าต้องการปลดปล่อยยาช้าๆ ในเวลานานๆ ควรจะเลือกใช้แคลเซียมคลอไรด์ ที่มีความเข้มข้นมาก แต่ถ้าตำแหน่งที่ต้องการรักษานั้น ต้องการให้มีการปลดปล่อยยาแบบรวดเร็วในเวลาสั้น ควรเลือกใช้แคลเซียมคลอไรด์ ที่มีความเข้มข้นน้อย

ในการศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย สามารถทำได้หลายวิธีอาทิเช่น ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นอาหารเหลว (Broth agar) โดยนำ SNP-Ro ลงไปในอาหารเหลวที่มีเชื้ออยู่ ทำการศึกษาโดยการนำมาเกลี่ยบนอาหารแข็ง แล้วนับจำนวนจุลชีพที่สามารถโตได้ (7) อีกวิธีหนึ่งคือ วิธีดิสก์ ดิฟฟิวชัน โดยวาง SNP-Ro ที่ขึ้นรูปบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นอาหารแข็ง ผลจะดูจากการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีเชื้อเจริญ (41) ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้วิธีดิสก์ ดิฟฟิวชัน โดยขึ้นรูปอนุภาคเงินนาโนในรูปแบบของ SNP-Ro-CaCl₂ bead โดยสอดคล้องกับงานวิจัยของ Loo และคณะ ที่ได้มีการศึกษาการนำ SNP ที่สกัดจากชาฝูเอ้อ มาทดสอบด้วยวิธีดิสก์ ดิฟฟิวชัน ในเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้ มีเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีเชื้อเจริญ 15-20 mm (41) ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยพบว่า SNP-Ro-CaCl₂ bead สามารถยับยั้งเชื้อ แอกริเกทิแบกเทอร์ แอกทิโนไมซีเทมคอมมิแทนส์ได้ มีเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีเชื้อเจริญ 7.57 ± 0.86 ถึง 10.96 ± 0.35 มิลลิเมตร ขนาดที่ต่างกันจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ โดยเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีเชื้อเจริญจะลดลงเมื่อใช้ SNP-Ro-CaCl₂ bead ที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับผลการศึกษากการปลดปล่อย SNP-Ro จาก SNP-Ro-CaCl₂ bead นั้นพบว่า SNP-Ro-1% CaCl₂ bead สามารถปลดปล่อย SNP-Ro ออกมาได้เร็วและปริมาณมาก ซึ่งเมื่อความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์เพิ่มมากขึ้น เวลาที่ปลดปล่อยจะช้าลงและปลดปล่อยออกมาได้ในปริมาณที่น้อยกว่า สอดคล้องกับ SNP-Ro-3% CaCl₂ bead และ SNP-Ro-5% CaCl₂ bead จะมีเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีเชื้อเจริญน้อยกว่า แต่ทั้งสองความเข้มข้นมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ต่างจากผลการทดสอบการปลดปล่อย SNP-Ro ในเวลา 14 วัน พบว่า SNP-Ro-3% CaCl₂ bead จะมีการปลดปล่อย SNP-Ro ได้มากกว่า SNP-Ro-5% CaCl₂ bead เกิดจากการที่เมื่อวาง SNP-Ro-CaCl₂ bead บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง จะมีเฉพาะบริเวณที่สัมผัสกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่จะสามารถปลดปล่อย SNP-Ro ออกมาได้ ต่างจากการทดสอบการปลดปล่อย SNP-Ro ที่จะมีการนำ SNP-Ro-CaCl₂ bead ใส่ลงในสารละลายจึงทำให้สามารถปลดปล่อย SNP-Ro ออกมาได้ทั้งพื้นผิวของ SNP-Ro-CaCl₂ bead

สำหรับกลไกฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของ SNP-Ro เกิดจาก SNP-Ro จะไปจับกับโปรตีนที่มีซัลเฟอร์บนเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อจุลชีพ ทำให้โครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนไปเกิดเป็นรูขนาดเล็ก และสูญเสียความสามารถในการควบคุมการผ่านเข้าออกของสาร และทำให้เซลล์ตายในที่สุด (47, 50, 51) อีกทฤษฎีคือ SNP-Ro จะเข้าไปทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรหัสพันธุกรรมของเชื้อจุลชีพ ทำให้ไม่สามารถแบ่งตัว และสังเคราะห์พันธุกรรมได้ จึงทำให้จุลชีพตายในที่สุด (52)

ในแนวทางสำหรับประสิทธิภาพของ SNP-Ro-CaCl₂ bead เมื่อเก็บไว้ในระยะเวลาต่างกัน โดยพบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 17 วัน จะมีประสิทธิภาพลดลงครั้งหนึ่ง ดังนั้นในจุดนี้ควรจะมีการพัฒนาเรื่องการเก็บรักษาเพื่อคงประสิทธิภาพ เพื่อให้มีอายุการใช้งานได้นานขึ้น หรือ พิจารณาขั้นตอนในการสังเคราะห์ให้มีความชื้นของ SNP-Ro-CaCl₂ bead ลดลง หรือไม่มีเลย จะช่วยเพิ่มระยะเวลาในการใช้งานให้นานขึ้นได้

สรุปผลการศึกษา

ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่แตกต่างกัน มีผลต่อการเชื่อมขวางกับอัลจินต ที่ต่างกัน ทำให้เกิดช่องว่างและรูพรุนที่แตกต่างกันของ SNP-Ro-CaCl₂ bead ส่งผลต่อการควบคุมการปลดปล่อย SNP-Ro โดย SNP-Ro-1% CaCl₂ bead องค์กรประกอบภายในจะมีรูพรุนมาก ทำให้มีประสิทธิภาพการปลดปล่อย SNP-Ro ได้เร็วและปริมาณมาก สอดคล้องกับฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของแบคทีเรีย แอคติโนไมซีเทมคอบิแทนส์ ใน 24 ชั่วโมง จะมีเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีเชื้อเจริญมากกว่า ความเข้มข้นอื่นๆ ในขณะที่ SNP-Ro-3% CaCl₂ bead จะมีการปลดปล่อย SNP-Ro มากกว่า SNP-Ro-5% CaCl₂ bead แต่ทั้งสองความเข้มข้นเมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของแบคทีเรีย แอคติโนไมซีเทมคอบิแทนส์ จะมีเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีเชื้อเจริญ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนั้นเมื่อทำการทดสอบอายุการใช้งานของ SNP-Ro-CaCl₂ bead ทั้งสามความเข้มข้น พบว่าเมื่อทิ้งไว้ในเวลานานขึ้น ประสิทธิภาพในการต้านเชื้อจะลดลงเมื่อเวลาผ่านไป 17 วัน ซึ่งในจุดนี้ถือเป็นโอกาสในการพัฒนางานวิจัยต่อไปเพื่อให้ได้ SNP-Ro-CaCl₂ bead ที่มีประสิทธิภาพดี มีอายุการใช้งานได้นานมากขึ้นต่อไป

ข้อเสนอแนะ

1. การทดลองนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นในการนำ SNP-Ro ที่สังเคราะห์ด้วยวิธี green synthesis มาขึ้นรูปเป็น SNP-Ro-CaCl₂ bead โดยมีการปรับปรุงคุณสมบัติด้วย CaCl₂ ที่ความเข้มข้นต่างกัน ซึ่งพิจารณาโดยเน้นศึกษาผลของความเข้มข้น CaCl₂ ต่อการปลดปล่อย SNP-Ro ในการทดลองต่อไปควร

พิจารณาถึงปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการเชื่อมขวางด้วย เช่น ความเข้มข้นของอัลจินต และเวลาในการเชื่อมขวาง เป็นต้น

2. ในขั้นตอนต่อไปควรมีการนำ SNP-Ro-CaCl₂ bead ไปทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแบคทีเรียแอคติโนมัยซีเทมคอบิแทนส์ ต่อหน่วยเวลา (Time kill essay)
3. ควรมีการนำ SNP-Ro-CaCl₂ bead ไปทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคทางปริทันต์ชนิดอื่นๆ
4. ควรมีการนำ SNP-Ro-CaCl₂ bead ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ร่างกาย เช่น เซลล์เยื่อบุผิว (Epithelium cell) และ เซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Fibroblast cell)



บรรณานุกรม

1. Pizarro-Cerdá J, Cossart P. Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell*. 2006;124(4):715-27.
2. Tsai C-C, Ho Y-P, Chou Y-S, Ho K-Y, Wu Y-M, Lin Y-C. Aggregatibacter (*Actinobacillus*) actinomycetemcomitans leukotoxin and human periodontitis–A historic review with emphasis on JP2. *The Kaohsiung journal of medical sciences*. 2018;34(4):186-93.
3. Meyer DH, Lippmann JE, Fives-Taylor PM. Invasion of epithelial cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: a dynamic, multistep process. *Infection and immunity*. 1996;64(8):2988-97.
4. เขียมวัฒนา อ. ปรีทัศน์บำบัดด้านการติดเชื้อ. *พิษณุโลก: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยนเรศวร*; 2561.
5. Etienne D. Locally delivered antimicrobials for the treatment of chronic periodontitis. *Oral diseases*. 2003;9 (Suppl1):45-50.
6. Ahmed S, Ahmad M, Swami BL, Ikram S. A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: a green expertise. *Journal of advanced research*. 2016;7(1):17-28.
7. Wacharanad S, Taya T, Phrai-in N. The Study of Antimicrobial Activity on Aggregatibacter actinomycetemcomitans of AgNPs Capping with Roselle. *Journal of International Dental & Medical Research*. 2019;12(3):912-16.
8. Higginbotham KL, Burris KP, Zivanovic S, Davidson PM, Stewart Jr CN. Antimicrobial activity of Hibiscus sabdariffa aqueous extracts against Escherichia coli O157: H7 and Staphylococcus aureus in a microbiological medium and milk of various fat concentrations. *Journal of Food Protection*. 2014;77(2):262-8.
9. Abdallah EM. Antibacterial efficiency of the Sudanese Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.), a famous beverage from Sudanese folk medicine. *Journal of intercultural ethnopharmacology*. 2016;5(2):186-90.
10. Sulaiman FA, Kazeem MO, Waheed AM, Temowo SO, Azeez IO, Zubair FI, et al. Antimicrobial and toxic potential of aqueous extracts of *Allium sativum*, *Hibiscus*

sabdariffa and Zingiber officinale in Wistar rats. *Journal of Taibah University for Science*. 2014;8(4):315-22.

11. Russo R, Malinconico M, Santagata G. Effect of cross-linking with calcium ions on the physical properties of alginate films. *Biomacromolecules*. 2007;8(10):3193-7.
12. Szekalska M, Sosnowska K, Czajkowska-Kośnik A, Winnicka K. Calcium chloride modified alginate microparticles formulated by the spray drying process: A strategy to prolong the release of freely soluble drugs. *Materials*. 2018;11(9):1522.
13. Wong TW. Alginate graft copolymers and alginate-co-excipient physical mixture in oral drug delivery. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2011;63(12):1497-512.
14. Pan W, Wang Q, Chen Q. The cytokine network involved in the host immune response to periodontitis. *International journal of oral science*. 2019;11(3):1-13.
15. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nature Reviews Immunology*. 2018;18(2):134.
16. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby JI. *Kuby immunology*. 2000.
17. Sima C, Glogauer M. Macrophage subsets and osteoimmunology: tuning of the immunological recognition and effector systems that maintain alveolar bone. *Periodontology 2000*. 2013;63(1):80-101.
18. Hajishengallis G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends in immunology*. 2014;35(1):3-11.
19. Lamont RJ, Hajishengallis G. Polymicrobial synergy and dysbiosis in inflammatory disease. *Trends in molecular medicine*. 2015;21(3):172-83.
20. Abusleme L, Dupuy AK, Dutzan N, Silva N, Burtleson JA, Strausbaugh LD, et al. The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *The ISME journal*. 2013;7(5):1016-25.
21. Diaz PI, Hoare A, Hong B-Y. Subgingival microbiome shifts and community dynamics in periodontal diseases. *Journal of the California Dental Association*. 2016;44(7):421-35.
22. Darveau RP, Tanner A, Page RC. The microbial challenge in periodontitis. *Periodontology 2000*. 1997;14(1):12-32.
23. Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal

- disease: current concepts. *Journal of periodontology*. 1992;63:322-31.
24. Socransky SS, Haffajee AD. Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. *Periodontology* 2000. 1994;5(1):7-25.
 25. Socransky SS. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol* 2000. 2002;28:12-55.
 26. Socransky S, Haffajee A, Cugini M, Smith C, Kent Jr R. Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of clinical periodontology*. 1998;25(2):134-44.
 27. Tan KS, Song KP, Ong G. Cytolethal distending toxin of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: occurrence and association with periodontal disease. *Journal of periodontal research*. 2002;37(4):268-72.
 28. Mythireyi D, Krishnababa M. *Aggregatibacter Actinomycetem comitans*, an Aggressive Oral Bacteria-A Review. *International Journal of Health Sciences & Research*. 2012;105:32-7.
 29. Fives-Taylor PM, Meyer DH, Mintz KP, Brissette C. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Periodontology* 2000. 1999;20(1):136-67.
 30. Cooper PR, Palmer LJ, Chapple IL. Neutrophil extracellular traps as a new paradigm in innate immunity: friend or foe? *Periodontology* 2000. 2013;63(1):165-97.
 31. Waerhaug J. Effect of toothbrushing on subgingival plaque formation. *Journal of periodontology*. 1981;52(1):30-4.
 32. Chen M-S, Rubinson L. Preventive dental behavior in families: a national survey. *The Journal of the American Dental Association*. 1982;105(1):43-6.
 33. Jamjoom HM. Preventive oral health knowledge and practice in Jeddah, Saudi Arabia. *Journal of King Abdulaziz University-Medical Sciences*. 2001;9:17-25.
 34. Jepsen S, Deschner J, Braun A, Schwarz F, Eberhard J. Calculus removal and the prevention of its formation. *Periodontology* 2000. 2011;55(1):167-88.
 35. Haffajee A, Cugini M, Dibart S, Smith C, Kent Jr R, Socransky S. The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. *Journal of clinical periodontology*. 1997;24(5):324-34.
 36. Mattout P, Moskow BS, Fourel J. Repair potential in localized juvenile periodontitis. A case in point. *Journal of Periodontology*. 1990;61(10):653-60.

37. Loesche W, Syed S, Morrison E, Laughon B, Grossman N. Treatment of periodontal infections due to anaerobic bacteria with short-term treatment with metronidazole. *Journal of Clinical Periodontology*. 1981;8(1):29-44.
38. Papli R, Lewis JM. Refractory chronic periodontitis: effect of oral tetracycline hydrochloride and root planing. *Australian Dental Journal*. 1989;34(1):60-8.
39. Slots J, Research S, Committee T. Systemic antibiotics in periodontics. *Journal of periodontology*. 2004;75(11):1553.
40. Mombelli A, Cionca N, Almaghlouth AA. Does adjunctive antimicrobial therapy reduce the perceived need for periodontal surgery? *Periodontology* 2000. 2011;55(1):205-16.
41. Loo YY, Rukayadi Y, Nor-Khaizura M-A-R, Kuan CH, Chieng BW, Nishibuchi M, et al. In vitro antimicrobial activity of green synthesized silver nanoparticles against selected gram-negative foodborne pathogens. *Frontiers in microbiology*. 2018;9:1555.
42. Loo YY, Chieng BW, Nishibuchi M, Radu S. Synthesis of silver nanoparticles by using tea leaf extract from *Camellia sinensis*. *International journal of nanomedicine*. 2012;7:4263.
43. Slot D, Van der Weijden F. Group A. Initiator paper. Plaque control: home remedies practiced in developing countries. *Journal of the International Academy of Periodontology*. 2015;17(Suppl1):4.
44. Arunachalam R, Rajeev V, Vedam V, Ganapathy S, Dhanavel J. Periocutics in the management of Periodontal Disease. *Journal of Young Pharmacists*. 2017;9(1).
45. Joshi D, Garg T, Goyal AK, Rath G. Advanced drug delivery approaches against periodontitis. *Drug delivery*. 2016;23(2):363-77.
46. Reller LB, Weinstein M, Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical infectious diseases*. 2009;49(11):1749-55.
47. Rai M, Yadav A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology advances*. 2009;27(1):76-83.
48. Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramírez JT, et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*. 2005;16(10):2346.

49. Pal S, Tak YK, Song JM. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*. 2007;73(6):1712-20.
50. Carlson C, Hussain SM, Schrand AM, K. Braydich-Stolle L, Hess KL, Jones RL, et al. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *The journal of physical chemistry B*. 2008;112(43):13608-19.
51. Schacht V, Neumann L, Sandhi S, Chen L, Henning T, Klar P, et al. Effects of silver nanoparticles on microbial growth dynamics. *Journal of applied microbiology*. 2013;114(1):25-35.
52. Elechiguerra JL, Burt JL, Morones JR, Camacho-Bragado A, Gao X, Lara HH, et al. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *Journal of nanobiotechnology*. 2005;3(1):1-10.
53. Naveed S, Qamar F, Khan M. Synthesis of Silver Nano Particles by Using Chemical Method. *American Journal of Chemistry and Applications*. 2015;2(6):148.
54. Malik MA, Wani MY, Hashim MA. Microemulsion method: A novel route to synthesize organic and inorganic nanomaterials: 1st Nano Update. *Arabian journal of Chemistry*. 2012;5(4):397-417.
55. Shankar SS, Rai A, Ahmad A, Sastry M. Rapid synthesis of Au, Ag, and bimetallic Au core–Ag shell nanoparticles using Neem (*Azadirachta indica*) leaf broth. *Journal of colloid and interface science*. 2004;275(2):496-502.
56. Sankaranarayanan A, Munivel G, Karunakaran G, Kadaikunnan S, Alharbi NS, Khaled JM, et al. Green synthesis of silver nanoparticles using *Arachis hypogaea* (ground nut) root extract for antibacterial and clinical applications. *Journal of Cluster Science*. 2017;28(3):995-1008.
57. Sharma P, Pant S, Rai S, Yadav RB, Sharma S, Dave V. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles by *Allium cepa* L. to produce silver nano-coated fabric and their antimicrobial evaluation. *Applied organometallic chemistry*. 2018;32(3):e4146.
58. Pronk M, Wijnhoven SW, Bleeker E, Heugens EH, Peijnenburg WJ, Luttik R, et al. Nanomaterials under REACH. Nanosilver as a case study. RIVM rapport 601780003. 2009.

59. Begum NA, Mondal S, Basu S, Laskar RA, Mandal D. Biogenic synthesis of Au and Ag nanoparticles using aqueous solutions of Black Tea leaf extracts. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*. 2009;71(1):113-8.
60. Tounkara F, Sodio B, Chamba MV, Le G-W, Shi Y-H. Nutritional and functional properties of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) seed protein hydrolysates. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 2014:409-17.
61. El-Adawy TA, Khalil AH. Characteristics of roselle seeds as a new source of protein and lipid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1994;42(9):1896-900.
62. Sirorat Wacharanad PT, Panchaya Yiemwattana, Penpitcha Paoprajak, , Pimchanok Ngamsangiam MV, Ichaya Yiemwattana. Antimicrobial Activity of Roselle-capped Silver Nanochip on *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *European journal of dentistry*. 2021:(in press).
63. Goh CH, Heng PWS, Huang EPE, Li BKH, Chan LW. Interactions of antimicrobial compounds with cross-linking agents of alginate dressings. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2008;62(1):105-8.
64. Lee BB, Ravindra P, Chan ES. Size and shape of calcium alginate beads produced by extrusion dripping. *Chemical Engineering & Technology*. 2013;36(10):1627-42.
65. Lotfipour F, Mirzaeei S, Maghsoodi M. Evaluation of the effect of CaCl₂ and alginate concentrations and hardening time on the characteristics of *Lactobacillus acidophilus* loaded alginate beads using response surface analysis. *Advanced pharmaceutical bulletin*. 2012;2(1):71.
66. Velings NM, Mestdagh MM. Physico-chemical properties of alginate gel beads. *Polymer Gels and Networks*. 1995;3(3):311-30.
67. Ouwerx C, Velings N, Mestdagh M, Axelos MA. Physico-chemical properties and rheology of alginate gel beads formed with various divalent cations. *Polymer Gels and Networks*. 1998;6(5):393-408.
68. Quong D, Neufeld R, Skjåk-Bræk G, Poncelet D. External versus internal source of calcium during the gelation of alginate beads for DNA encapsulation. *Biotechnology and Bioengineering*. 1998;57(4):438-46.

69. Puguang JMC, Yu X, Kim H. Characterization of structure, physico-chemical properties and diffusion behavior of Ca-Alginate gel beads prepared by different gelation methods. *Journal of colloid and interface science*. 2014;432:109-16.
70. Swioklo S, Ding P, Pacek AW, Cannon CJ. Process parameters for the high-scale production of alginate-encapsulated stem cells for storage and distribution throughout the cell therapy supply chain. *Process Biochemistry*. 2017;59:289-96.



ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-นามสกุล ธนภูมิ ไชยวงศ์
วัน เดือน ปี เกิด 11 ธันวาคม 2535
ที่อยู่ปัจจุบัน 467/4 ถ.แม่ตำภูมินทร์ ซ.10 ต.แม่ตำ อ.เมือง จ.พะเยา 56000
ที่ทำงานปัจจุบัน โรงพยาบาลปง จ.พะเยา
 สำนักงานสาธารณสุขจ.พะเยา
ประสบการณ์การทำงาน ทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

