ว ทันต จุฬาฯ 2551;31:371-84
CU Dent J. 2008;31:371-84

บทวิทยาการ
Original Article

ฤทธิ์ในการกำจัดเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์ในคลองรากฟันของสารผสมแคลเซียมไฮดรอกไซด์กับคลอร์เฮ็กซิดีน หรือ สแตนนัสฟลูออไรด์ในห้องปฏิบัติการ

ศิริเพ็ญ วนแสงสกุล ท.บ., Ph.D.[1]
เฉลิมขวัญ ภู่วรวรรณ ท.บ., วท.ม.[1]
ทิพาพรรณ เศรษฐศิริสมบัติ ท.บ.[2]
กานต์นภัส ปีติอัครวัชร์ ท.บ.[3]

[1] คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ จ.ปทุมธานี
[2] โรงพยาบาลลานสัก อ.ลานสัก จ.อุทัยธานี
[3] วิทยาลัยการสาธารณสุขสิรินธร จังหวัดชลบุรี อ.เมือง จ.ชลบุรี

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์ของสารผสมแคลเซียมไฮดรอกไซด์กับคลอร์เฮ็กซิดีนหรือสแตนนัสฟลูออไรด์ในห้องปฏิบัติการ

วัสดุและวิธีการ ใช้วิธีการวัดผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราบนวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ และทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าแคนดิดาของสารผสมเมื่อใช้เป็นยาใส่ในคลองรากฟันเป็นเวลา 7 วัน รวมทั้งวัดการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดด่างของสาร

ผลการศึกษา สารผสมแคลเซียมไฮดรอกไซด์ทั้งสามชนิด (น้ำกลั่น คลอร์เฮ็กซิดีน สแตนนัสฟลูออไรด์) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแคนดิดาบนวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อไม่แตกต่างกันและมีคุณสมบัติเป็นด่างแก่ อย่างไรก็ตามสารผสมแคลเซียมไฮดรอกไซด์กับคลอร์เฮ็กซิดีน หรือ สแตนนัสฟลูออไรด์ มีฤทธิ์ในการลดปริมาณแคนดิดาในคลองรากฟันมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

สรุป แคลเซียมไฮดรอกไซด์ผสมคลอร์เฮ็กซิดีน และแคลเซียมไฮดรอกไซด์ผสมสแตนนัสฟลูออไรด์มีฤทธิ์ในการลดปริมาณเชื้อราในคลองรากฟัน

(ว ทันต จุฬาฯ 2551;31:371-84)

คำสำคัญ: *การรักษาคลองรากฟัน; แคนดิดาอัลบิแคนส์; แคลเซียมไฮดรอกไซด์; คลอร์เฮ็กซิดีน; สแตนนัสฟลูออไรด์*

บทนำ

เชื้อจุลชีพเป็นสาเหตุสำคัญในการทำให้เกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อใน (pulp) และเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟัน[1] เชื้อราแคนดิดาเป็นจุลชีพประจำถิ่นที่สามารถพบได้ในช่องปากของผู้ที่ปราศจากโรค โดยแคนดิดาอัลบิแคนส์ *(Candida albicans)* เป็นสปีชีส์ที่พบได้มากที่สุด[2] ตัวเชื้อแคนดิดามีศักยภาพในการก่อโรคหลายอย่าง เช่น ความสามารถในการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ตามสภาพสิ่งแวดล้อม ความสามารถในการยึดเกาะกับเซลล์เยื่อบุผิวและพื้นผิวอื่นๆ ได้แก่ เนื้อฟัน การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศ์อิเล็กตรอนพบว่าเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์สามารถเจริญบนพื้นผิวคลองรากฟันและเจริญเข้าไปในท่อเนื้อฟันในรูปของยีสต์และสายราได้[3] แคนดิดายังสามารถสร้างเอนไซม์หลายชนิดที่มีฤทธิ์ย่อยสลายโปรตีนของมนุษย์ส่งเสริมให้เกิดการรุกรานเนื้อเยื่อ สามารถรวมตัวกันเป็นไบโอฟิล์มซึ่งเป็นโครงสร้างที่ทนทานต่อสภาพแวดล้อมมากขึ้น นอกจากนี้ยังสามารถมีชีวิตอยู่ได้ในสภาพแวดล้อมที่มีค่าความเป็นกรดต่ำและค่าความเป็นด่างสูงได้ดี[4-6] ปัจจัยดังที่กล่าวมาจึงอาจทำให้เชื้อราแคนดิดามีความต้านทานต่อยาที่ใส่ในคลองรากฟัน ซึ่งสอดคล้องกับผลการตรวจพบเชื้อราแคนดิดาได้สูงถึงร้อยละ 22 ในคลองรากฟันที่การรักษาล้มเหลว[7]

ผลสำเร็จในการรักษาการอักเสบของเนื้อเยื่อในและเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟันขึ้นกับกระบวนการกำจัดเชื้อในคลองรากฟันก่อนการอุดคลองรากฟัน ซึ่งได้แก่ การขยายและทำความสะอาดคลองรากฟัน รวมถึงการใส่ยาในคลองรากฟัน[8] ยาที่ใส่ในคลองรากฟันที่นิยมใช้ในปัจจุบัน ได้แก่ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ (calcium hydroxide) เนื่องจากมีคุณสมบัติฆ่าเชื้อจุลชีพ ละลายเนื้อเยื่อ สลายสารไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysac-charide) ลดเอ็กซูเดท (exudate) ยับยั้งการละลายของรากฟันจากการอักเสบ เหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อแข็งปลายราก (apical hard tissue) ได้ ระยะเวลาในการออกฤทธิ์ยาวนาน มีความเป็นพิษน้อย และยังสามารถแพร่กระจายเข้าไปยังท่อเนื้อฟัน (dentinal tubule) ได้[9] อย่างไรก็ตามการศึกษาโดย Ercan และคณะพบว่าเชื้อราแคนดิดามีความต้านทานต่อแคลเซียมไฮดรอกไซด์[10] ในงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีความพยายามที่จะพัฒนาให้แคลเซียมไฮดรอกไซด์มีความสามารถในการกำจัดเชื้อรามากยิ่งขึ้น โดยการผสมแคลเซียมไฮดรอกไซด์เข้ากับสารอื่นๆ เช่น แคลเซียมไฮดรอกไซด์ผสมกลีเซอรีน (glycerine) แคมโฟเรตพาราโมโนคลอโรฟีนอล (camphor-ated paramonochlorophenol) โซเดียมไฮโปคลอไรด์ (sodium hypochloride) หรือ ไอโอดีนโพแทสเซียมไอโอไดด์ (iodine potassium iodide) เป็นต้น ซึ่งการศึกษาหลายชิ้นให้ผลตรงกันว่าแคลเซียมไฮดรอกไซด์ผสมแคมโฟเรตพาราโมโนคลอโรฟีนอล มีฤทธิ์ต้านเชื้อราดีที่สุด[11-13] แต่เนื่องจากแคมโฟเรตพาราโมโนคลอโรฟีนอลมีความเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อสูง สารที่ผสมได้ยังมีความแข็งซึ่งยากต่อการกำจัดให้หมดก่อนการอุดคลองรากฟัน และหากหลงเหลืออยู่ภายในคลองรากฟันอาจก่อให้เกิดการรั่วซึมได้ ทำให้สารผสมชนิดนี้ยังมีข้อด้อยอยู่

ผลของการผสมแคลเซียมไฮดรอกไซด์กับคลอร์เฮ็กซิดีนต่อจุลชีพที่พบในคลองรากฟันได้มีผู้สนใจทำการศึกษากันหลายคณะ เนื่องจากคลอร์เฮ็กซิดีนมีคุณสมบัติฆ่าเชื้อจุลชีพโดยไม่ทำให้เกิดการดื้อยา สามารถสะสมในเนื้อฟันและปล่อยออกมาได้ในภายหลัง ในขณะเดียวกันก็สามารถเข้ากับเนื้อเยื่อได้เป็นอย่างดี[14] ผลการศึกษาคุณสมบัติทางกลโดย Basrani และคณะ[15] พบว่าคลอร์เฮ็กซิดีนเมื่อผสมกับแคลเซียมไฮดรอกไซด์ไม่มีผลต่อค่าความเป็นกรดด่าง ความทึบรังสี และยังช่วยลดมุมผิวสัมผัส (contact angle) และเพิ่มความหนืดของแคลเซียมไฮดรอกไซด์อย่างมีนัยสำคัญซึ่งช่วยให้ยาที่ใส่ในคลองรากฟันไหลแผ่บนเนื้อฟันได้ดี และมีความหนาของยาเพียงพอที่จะคงอยู่ในคลองรากฟันเป็นเวลานาน ผลการศึกษาส่วนใหญ่ออกมาสอดคล้องกันว่าการผสมแคลเซียมไฮดรอกไซด์กับคลอร์เฮ็กซิดีนช่วยให้ฤทธิ์ในการกำจัดเชื้อราของแคลเซียมไฮดรอกไซด์เพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามฤทธิ์ในการกำจัดเชื้อรานี้ด้อยกว่าการใช้คลอร์เฮ็กซิดีนเจลเพียงอย่างเดียว[10,16,17] อาจเนื่องมาจากคลอร์เฮ็กซิดีนจะมีฤทธิ์ต้านเชื้อได้ดีในช่วงความเป็นกรดด่างที่ 5.5-7.0 ดังนั้นการผสมคลอร์เฮ็กซิดีนเข้ากับแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่มีค่าความเป็นด่างสูง จึงไปลดประสิทธิภาพในการทำงานของคลอร์เฮ็กซิดีนลง

เมื่อไม่นานมานี้มีรายงานถึงประสิทธิภาพของสแตนนัสฟลูออไรด์ (stannous fluoride) ในการกำจัดเชื้อราได้ดี[18] โดยพบว่า น้ำยาบ้วนปากเอมีน/สแตนนัสฟลูออไรด์ (amine/stannous fluoride) 250 พีพีเอ็ม (ppm) สามารถกำจัดเชื้อแคนดิดาอัลบิแคนส์ได้ถึงร้อยละ 90 ใน 5 นาที ซึ่งกลไกในการกำจัดเชื้อราอาจเกิดจากที่สแตนนัสฟลูออไรด์ไปมีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อรา[19] แต่เนื่องจากสแตนนัสฟลูออไรด์ที่มีใช้กันในท้องตลาดมักอยู่ในรูปแบบของของเหลว จึงยังไม่เหมาะที่จะใช้เป็นยาใส่ในคลองรากฟัน การผสมแคลเซียมไฮดรอกไซด์

เข้ากับสแตนนัสฟลูออไรด์เจล อาจได้สารผสมที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อราและยังคงอยู่ในรูปแบบที่เหมาะสมที่จะใช้เป็นยาใส่ในคลองรากฟันได้

การศึกษาที่ผ่านมายังไม่มีการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อราแคนดิดาในคลองรากฟันมนุษย์ของสารผสมแคลเซียมไฮดรอกไซด์กับสแตนนัสฟลูออไรด์และสารผสมแคลเซียมไฮดรอกไซด์กับคลอร์เฮ็กซิดีน ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีจุดมุ่งหมายที่จะประเมินประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์ในห้องปฏิบัติการของสารผสมแคลเซียมไฮดรอกไซด์กับสแตนนัสฟลูออไรด์ หรือคลอร์เฮ็กซิดีนในคลองรากฟันมนุษย์ด้วยวิธีการวัดผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราบนวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ (agar-diffusion test) และการทดสอบประสิทธิภาพของสารผสมเมื่อใช้เป็นยาใส่ในคลองรากฟัน รวมถึงการวัดค่าความเป็นกรดด่างของสารผสมเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานก่อนจะนำมาประยุกต์ใช้ทางคลินิกต่อไป

วัสดุและวิธีการ

เชื้อจุลชีพ

เชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์ที่ใช้ในการทดลองคือเชื้อราสายพันธุ์ DMST 21424

การเพาะเลี้ยงเชื้อรา

ก่อนนำเชื้อรามาทำการทดลอง เชื้อราที่แช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จะถูกนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อเอสดีบี (Sabouraud dextrose broth, SDB, Laboratories Britania, Buenos Aries, Argentina) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้วิธีการแกว่งอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเร็วประมาณ 130 รอบ/นาทีอย่างต่อเนื่องในตู้บ่มสั่น (incubator shaker, New Brunswick Scientific Inc, UK) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนเชื้อราที่เพาะเลี้ยงได้ด้วยเครื่องฮีโมซัยโตมิเตอร์ (haemocytometer) และปรับความเข้มข้นของเชื้อราให้ได้ 1×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

การเตรียมชิ้นงานคลองรากฟัน

ตัวอย่างคลองรากฟันที่ใช้ในการศึกษานี้ใช้คลองรากฟันของฟันตัดแท้ซี่กลางบน จำนวนฟันที่ใช้ทั้งหมดคือ 70 ซี่ โดยใช้กลุ่มละ 10 ตัวอย่าง การเก็บฟันตัดแท้ซี่กลางบนโดยการแช่ฟันที่ถูกถอนที่มีรากฟันสมบูรณ์ในโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) ความเข้มข้นร้อยละ 5.25 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และใช้คีมจับเนื้อเยื่อ (tissue forceps) กำจัดส่วนของเนื้อเยื่ออ่อนที่ยังคงติดอยู่บนฟันออก จากนั้นล้างและเก็บไว้ในสารละลายคลอรามีนที (chloramine T solution) ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 เพื่อทำลายเชื้อจุลชีพ จนกระทั่งนำมาใช้ในการเตรียมชิ้นงาน

การเตรียมชิ้นงานเพื่อการทดลอง โดยฝังรากฟันทั้งหมดตามแนวแกนฟัน (long axis) ลงในเรซิน อะคริลิกใสชนิดบ่มตัวได้เอง (self-cured clear acrylic resin) ที่เทลงบนแม่แบบรูปสี่เหลี่ยมทรงกระบอกกว้าง 10 มิลลิเมตร และยาว 10 มิลลิเมตร จากนั้นนำฟันในเรซิน อะคริลิกใสไปตัดบริเวณตัวฟันและปลายรากฟันออกด้วยเครื่องตัดฟันชนิดความเร็วต่ำ (low speed cutting machine; Isomet®1000) ให้ได้ชิ้นงานของรากฟันในส่วนกลางราก (middle third) หนา 5 มิลลิเมตร ขยายคลองรากฟันในแต่ละชิ้นงานให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากันที่ 1.6 มิลลิเมตร โดยใช้เครื่องกรอเร็วชนิดมีน้ำ (high speed aerotor) และใช้หัวกรอกลมกากเพชร (round diamond bur) เบอร์ ISO 025 จากนั้นกำจัดชั้นสเมียร์ (smear layers) ในชิ้นงานที่ได้ขยายคลองรากฟันแล้วด้วยการแช่ในสารละลายอีดีทีเอ (EDTA) ความเข้มข้นร้อยละ 17 นาน 3 นาที แล้วนำไปอบในเครื่องนึ่งอัดไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสนาน 20 นาทีเพื่อทำให้ปราศจากเชื้อ

การเตรียมชิ้นงานให้มีสภาวะเหมาะกับการเจริญของเชื้อราในท่อเนื้อฟัน ทำโดยการแช่ชิ้นงานในอาหารเลี้ยงเชื้อราเอสดีบี ปริมาตร 2 มิลลิลิตรซึ่งอยู่ในแต่ละหลุมของถาดเลี้ยงเซลล์ที่มี 24 หลุม (24 multiwell tissue culture plate, Corning Incorporated, NY, USA) นำเข้าตู้บ่มเพาะเลี้ยง (incubator) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 7 วัน ทั้งนี้อาหารเลี้ยงเชื้อของบางชิ้นงานจะถูกนำไปเพาะเชื้อบนวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อรา (Sabouraud dextrose agar, SDA, Laboratories Britania, Buenos Aries, Argentina) เพื่อยืนยันผลการทำให้ปราศจากเชื้อด้วย

การเพาะเลี้ยงเชื้อราในคลองรากฟัน

ใส่เชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์ที่เพาะเลี้ยงไว้จำนวน 2×10^6 เซลล์ (200 ไมโครลิตร) ลงในแต่ละหลุมที่ใส่ชิ้นงานไว้ ทำการเพาะเชื้อเป็นระยะเวลา 14 วัน โดยเปลี่ยนอาหาร

เลี้ยงเชื้อเอสดีบีใหม่ทุก 7 วัน เชื้อราแคนดิดาที่ไม่เกาะกลุ่ม (colonize) และแทรกซึม (penetrate) ในคลองรากฟันจะถูกล้างออกด้วยน้ำเกลือ (normal saline) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร 3 ครั้ง ก่อนที่จะใส่ยาในคลองรากฟันของชิ้นงานตามกลุ่มทดลองที่แบ่งไว้

การทดสอบผลการเพาะเลี้ยงเชื้อราในคลองรากฟัน

ชิ้นงานคลองรากฟันที่ผ่านการเพาะเชื้อแล้วจำนวน 2 ชิ้น ถูกแบ่งตามแนวยาว (longitudinal) โดยใช้สิ่วแบ่งฟันออก แช่ชิ้นงานที่แบ่งแล้วในสารละลายกลูตารอลดีไฮด์ (glutaraldehyde) ในน้ำเกลือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer saline, PBS) ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ล้างตัวอย่างด้วยน้ำเกลือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที จากนั้นแช่ตัวอย่างในแอลกอฮอล์ความเข้มข้นต่างๆ ขั้นตอนละ 20 นาที โดยเรียงตามลำดับคือ ความเข้มข้นร้อยละ 30 50 70 80 90 95 และ 100 เพื่อขจัดน้ำออกจากตัวอย่าง (dehydration) ทำตัวอย่างให้แห้งที่จุดวิกฤตด้วยเครื่องคริติคัลพอยท์ดรายเออร์ (critical point dryer, Samdri, German) เมื่อตัวอย่างแห้งแล้ว นำตัวอย่างมายึดติดบนแท่นรองรับตัวอย่างด้วยยาทาเล็บ โดยให้ด้านที่ต้องการศึกษาอยู่ด้านบน นำตัวอย่างนี้ไปฉาบผิวตัวอย่าง (coating) ด้วยทอง แล้วไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope, JEOL, Japan) การติดเชื้อในคลองรากฟันตรวจสอบโดยส่องดูการเจริญของบลาสโตสปอร์ (blastospore) ของเชื้อราที่ผิวของคลองรากฟัน

การวัดผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

การทดสอบประสิทธิภาพของสารผสมในการยับยั้งแคนดิดาในเบื้องต้นใช้การวัดผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราบนวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยการเกลี่ยเชื้อราแคนดิดาจำนวน 10^7 เซลล์ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงบนวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อรา โดยใช้แท่งแก้วรูปตัวแอลเกลี่ยให้ทั่ว ปล่อยให้แห้ง เจาะวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้หลอดแก้วกลมปลอดเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร โดยในแต่ละจานเลี้ยงเชื้อจะมี 4 หลุม ในแต่ละหลุมจะมีตัวยาที่ต้องการทดสอบปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยในแต่ละจานจะใส่ตัวยา 1 ชนิด นำวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีตัวยาอยู่บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 48 168 ชั่วโมงในตู้บ่มเพาะเลี้ยง (Memmert, Becthai Co., LTD, Thailand) ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อราประเมินจากเส้นผ่านศูนย์กลางของวงกลมบริเวณที่ไม่มีการเจริญของเชื้อราบนวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อในเวลา 24 48 และ 168 ชั่วโมง โดยแต่ละบริเวณนั้นจะทำการวัดสองตำแหน่งที่ตั้งฉากกันและมีผู้วัดสองคนแล้วหาค่าเฉลี่ย ทำการทดลองซ้ำจำนวน 3 ครั้ง

สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราบนวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อได้แก่ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ (ผลิตภัณฑ์คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) สแตนนัสฟลูออไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.4 (Gel-Kam®) คลอร์เฮ็กซิดีนไดกลูโคเนต (chlorhexidine digluconate) ความเข้มข้นร้อยละ 2 (ผลิตภัณฑ์คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) และใช้คีโตโคนาโซลครีม (ketoconazole cream, Nizoral cream, Janssen-Cilag LTD, Thailand) เป็นกลุ่มควบคุมบวก การแบ่งกลุ่มการทดลองแบ่งออกเป็น 7 กลุ่มดังนี้

กลุ่ม A1: แคลเซียมไฮดรอกไซด์ผสมน้ำกลั่น (1 กรัม ต่อ 1 มิลลิลิตร)

กลุ่ม B1: แคลเซียมไฮดรอกไซด์ผสมคลอร์เฮ็กซิดีน (1 กรัม ต่อ 1 มิลลิลิตร)

กลุ่ม C1: แคลเซียมไฮดรอกไซด์ผสมสแตนนัสฟลูออไรด์เจล (1 กรัม ต่อ 1 มิลลิลิตร)

กลุ่ม D1: คลอร์เฮ็กซิดีนไดกลูโคเนต อย่างเดียว

กลุ่ม E1: สแตนนัสฟลูออไรด์เจล อย่างเดียว

กลุ่ม F1: คีโตโคนาโซลครีม

กลุ่ม G1: ไม่ใส่ยา

การทดสอบประสิทธิภาพของสารผสมในการกำจัดเชื้อราในคลองรากฟัน

คลองรากฟันที่ติดเชื้อราแคนดิดา (*Candida*-infected root canal) ถูกนำออกจากอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อเอสดีบี ห่อชิ้นงานแต่ละชิ้นด้วยกระดาษฟอยล์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นใส่ยาแต่ละชนิดตามกลุ่มการทดลองปริมาตร 100 ไมโครลิตรในแต่ละคลองรากฟัน ปิดส่วนบนของชิ้นงานด้วยกระดาษฟอยล์ที่ห่อไว้ บ่มเพาะเชื้อในตู้บ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน กลุ่มทดสอบประสิทธิภาพของสารผสมในการกำจัดเชื้อราในคลองรากฟันแบ่งออกเป็น 7 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ชิ้นงาน ดังนี้

กลุ่ม A2: แคลเซียมไฮดรอกไซด์ผสมน้ำกลั่น (1 กรัม ต่อ 1 มิลลิลิตร) ใส่ในคลองรากฟันที่ติดเชื้อราแคนดิดา

กลุ่ม B2: แคลเซียมไฮดรอกไซด์ผสมคลอร์เฮ็กซิดีนไดกลูโคเนต (1 กรัม ต่อ 1 มิลลิลิตร) ใส่ในคลองรากฟันที่ติดเชื้อราแคนดิดา

กลุ่ม C2: แคลเซียมไฮดรอกไซด์ผสมสแตนนัสฟลูออไรด์เจล (1 กรัม ต่อ 1 มิลลิลิตร) ใส่ในคลองรากฟันที่ติดเชื้อราแคนดิดา

กลุ่ม D2: คลอร์เฮ็กซิดีนไดกลูโคเนต ใส่ในคลองรากฟันที่ติดเชื้อราแคนดิดา

กลุ่ม E2: สแตนนัสฟลูออไรด์เจล ใส่ในคลองรากฟันที่ติดเชื้อราแคนดิดา

กลุ่ม F2: คลองรากฟันที่ติดเชื้อราแคนดิดาที่ไม่มียาในคลองรากฟัน

กลุ่ม G2: คลองรากฟันที่ปราศจากเชื้อรา

นำชิ้นงานออกจากตู้บ่มเพาะเลี้ยง และนำกระดาษฟอยล์ที่หุ้มฟันออก ล้างยาในคลองรากฟันออกด้วยน้ำเกลือปริมาตร 10 มิลลิลิตร ซับให้แห้งด้วยกระดาษซับคลองรากฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นกรอเอาเนื้อฟันในคลองรากฟัน โดยใช้หัวกรอซ้ำรูปร่างกลมก้านยาวขนาด ISO 023 กรอขยายคลองรากฟันตลอดความยาว 5 มิลลิเมตรของชิ้นงาน โดยกรอให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.3 มิลลิเมตร และให้ผงเนื้อฟันตกลงในหลุมของถาดที่มีอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อเอสดีบี ปริมาตร 200 ไมโครลิตรอยู่ จากนั้นดูดเอาผงเนื้อฟันในหลุมใส่ในหลอดทดลองและล้างหลุมด้วยอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อเอสดีบี ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ซ้ำอีก 3 ครั้ง นำหลอดทดลองไปปั่น (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 2000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 5 นาทีให้ผงเนื้อฟันตกตะกอน เทส่วนน้ำทิ้ง ทำให้ส่วนผงเนื้อฟันกระจายตัวในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อเอสดีบี ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร ด้วยการสั่นบนเครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer) แล้วจึงทำการเจือจางแบบลำดับขั้น (serial dilution) 2 และ 20 เท่า ดูดผงเนื้อฟันในสารละลายเจือจางปริมาตร 200 ไมโครลิตรใส่ลงบนวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อเกลี่ยให้ทั่ว โดยเพาะเลี้ยงเชื้อราจากผงเนื้อฟันจำนวน 2 ถาด (duplicate plate) ในแต่ละความเข้มข้นของผงเนื้อฟัน นำวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อไปเข้าตู้บ่มเพาะเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนคอโลนีของเชื้อราแคนดิดา อัลบิแคนส์ ที่เจริญบนวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วคำนวนเป็นคอโลนีฟอร์มิงยูนิต (colony forming unit, CFU) ต่อมิลลิลิตร

การวัดค่าความเป็นกรดด่าง

คุณสมบัติทางเคมีของสารผสมที่ทำการทดสอบอาจมีผลต่อประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อราได้ ดังนั้นค่าความเป็นกรดด่างของสารผสมจึงถูกประเมินในขั้นต่อมา การวัดค่าความเป็นกรดด่างของสารเคมีที่อยู่ในหลุมของจานเลี้ยงเซลล์ที่มี 24 หลุม แบ่งเป็น 5 กลุ่มคือ สแตนนัสฟลูออไรด์เจล ปริมาตร 2 มิลลิลิตร คลอร์เฮ็กซิดีนไดกลูโคเนตปริมาตร 2 มิลลิลิตร และสารผสมระหว่างแคลเซียมไฮดรอกไซด์ (1 กรัม) ผสมกับน้ำกลั่น หรือ คลอร์เฮ็กซิดีนไดกลูโคเนต หรือ สแตนนัสฟลูออไรด์เจล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร วัดค่าความเป็นกรดด่างของสารผสมและสารเคมีทั้ง 5 กลุ่มด้วยเครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (ISFET pH meter mini Lab, IQ Scientific Instruments Inc., USA) ทันทีภายหลังผสม แล้วเก็บสารผสมให้อยู่ในสภาวะเดียวกับการทดลองเบื้องต้นทั้งสองการทดลองคือ การบ่มในตู้บ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นวัดค่าความเป็นกรดด่างของสารผสมที่ 2 4 6 24 48 144 และ 168 ชั่วโมง โดยแต่ละกลุ่มของสารเคมีจะทำซ้ำ 2 ตัวอย่างในแต่ละการทดลอง และทำซ้ำ 2 การทดลอง

การวิเคราะห์ข้อมูล

ความกว้างของบริเวณที่เชื้อถูกยับยั้งบนวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อในเวลาต่างๆ กัน และผลจากการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดด่างของสารเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น ใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบสองทาง (Two-way ANOVA analysis) โดยใช้โปรแกรมกราฟแพดปริซึม (GraphPad Prism)

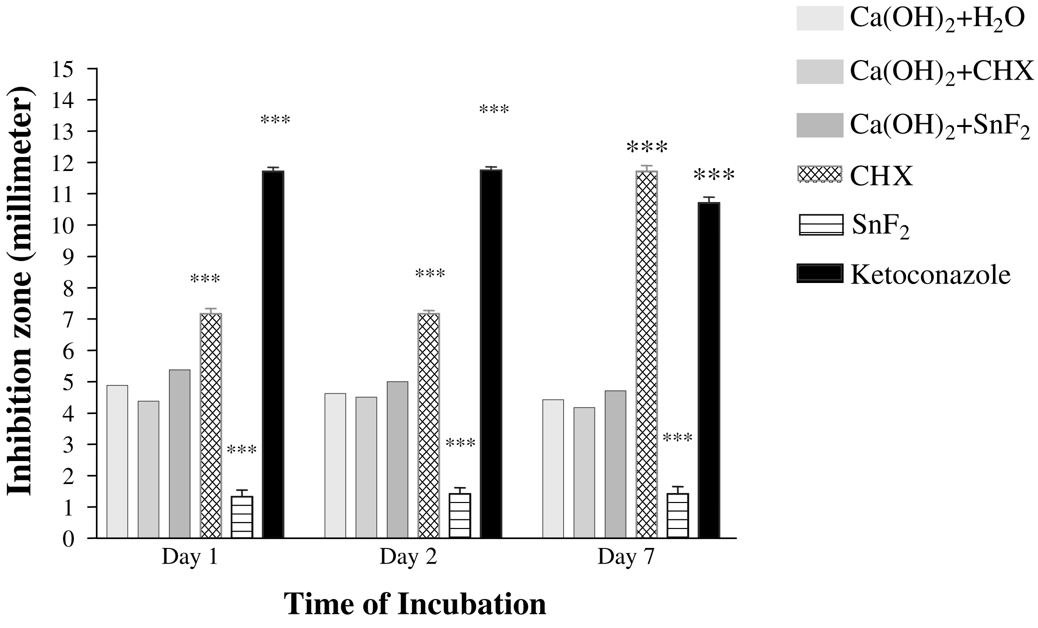
ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อราในคลองรากฟันแสดงค่าเป็นลอกการิทึมฐานสิบของคอโลนีเชื้อแคนดิดาที่เหลืออยู่ในคลองรากฟัน (log_{10} CFU) และใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-way ANOVA) เพื่อทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ย (mean) ของลอกการิทึมฐานสิบของคอโลนีฟอร์มมิงยูนิตต่อมิลลิเมตร (CFU/ml) โดยใช้โปรแกรมกราฟแพดปริซึม และใช้การทดสอบทูคีส์ (Tukey's multiple comparisons test) เพื่อหาความแตกต่างของข้อมูลในแต่ละคู่หลังจากพบว่าการทดสอบทุกกลุ่มข้อมูลมีความแตกต่างทางสถิติ

ผลการศึกษา

การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราบนวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ

รูปที่ 1 แสดงประสิทธิภาพของยาในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์บนวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อในเวลาต่าง ๆ พบว่า ยาในทุกกลุ่มทดสอบมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์ได้ โดยประสิทธิภาพดังกล่าวของสารผสมแคลเซียมไฮดรอกไซด์ทั้งสามชนิดไม่แตกต่างกันทางสถิติ ทั้งนี้เมื่อไม่คำนึงถึงกลุ่มคีโตโคนาโซล กลุ่มยาทดลองที่มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรามากที่สุดคือ กลุ่มคลอร์เฮ็กซิดีนไดกลูโคเนตอย่างเดียว และต่ำสุดคือกลุ่มสแตนนัสฟลูออไรด์อย่างเดียว การผสมแคลเซียมไฮดรอกไซด์ด้วยคลอร์เฮ็กซิดีนไดกลูคลอเนตทำให้ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราของคลอร์เฮ็กซิดีนไดกลูคลอเนตลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) แต่การผสมแคลเซียมไฮดรอกไซด์ด้วยสแตนนัสฟลูออไรด์ ทำให้ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราของสแตนนัสฟลูออไรด์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราของยาแต่ละชนิดในเวลาที่ต่างกัน พบว่าเมื่อบ่มเพาะเชื้อนาน 7 วัน ประสิทธิภาพของคลอร์เฮ็กซิดีนไดกลูโคเนตในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแคนดิดาเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$) แต่เวลาในการบ่มเพาะเชื้อไม่มีผลต่อประสิทธิภาพของยาในกลุ่มอื่น ๆ



รูปที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ยขอบเขตการยับยั้งเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์บนวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อของสารต่าง ๆ ในช่วงเวลา 1 2 และ 7 วัน เออเรอร์บาร์ (error bar) ในแต่ละแท่งแทนค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) จากค่าเฉลี่ยสามการทดลองซ้ำ จำนวนทั้งสิ้น 9 ตัวอย่างในแต่ละกลุ่มทดลอง (*** แสดงความแตกต่างทางสถิติ $p < 0.001$ เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดลองในช่วงเวลาเดียวกัน $Ca(OH)_2$ = แคลเซียมไฮดรอกไซด์ H_2O = น้ำกลั่น CHX = คลอร์เฮ็กซิดีน และ SnF_2 = สแตนนัสฟลูออไรด์)

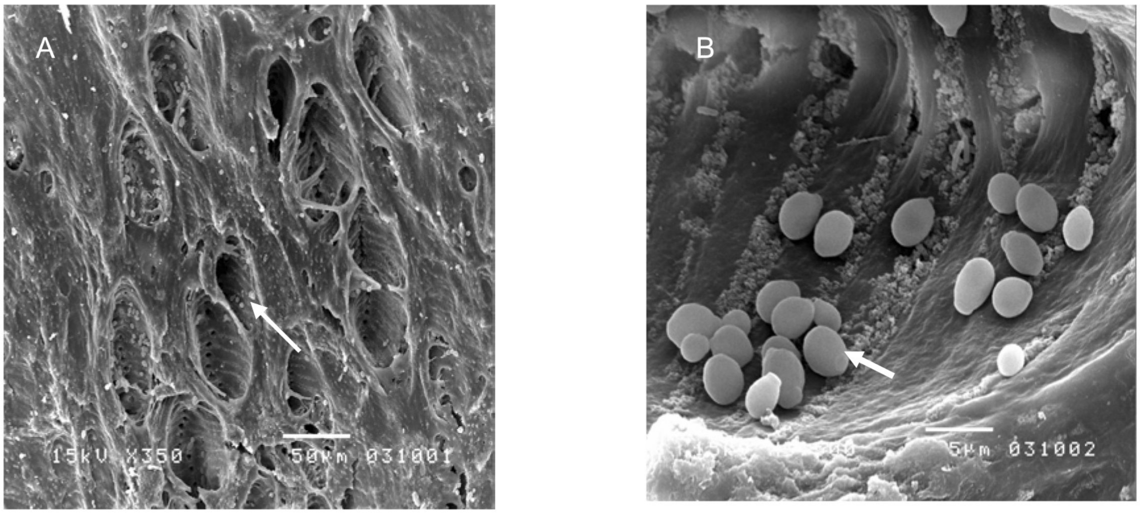
Fig.1 Means of *Candida albicans* inhibition zone on Sabouraud dextrose agar inhibited by drugs during 1, 2 and 7 days. Error bars represent standard deviation from the triplicate experiments, 9 samples each group. (*** shows statistical difference at $p < 0.001$ compared between groups each day, $Ca(OH)_2$ = calcium hydroxide, H_2O = distilled water, CHX = chlorhexidine, SnF_2 = stannous fluoride)

ผลการประเมินการติดเชื้อในคลองรากฟัน

หลังจากเพาะเชื้อราในคลองรากฟัน 14 วัน นำชิ้นงานไปตรวจสอบการเจริญของบลาสโตสปอร์ของเชื้อราที่ผิวของคลองรากฟันด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าที่ผิวคลองรากฟันมีบลาสโตสปอร์ของเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์เกาะกลุ่มกันอยู่ดังแสดงในรูปที่ 2A โดยบางตำแหน่งสามารถตรวจพบการเจริญเข้าไปในท่อเนื้อฟันของบลาสโตสปอร์ได้เมื่อใช้กำลังขยายที่ 1500 เท่าดังรูป 2B

การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราในคลองรากฟันเมื่อใส่ยาในคลองรากฟัน

หลังจากใส่ยาในคลองรากฟันเป็นเวลา 7 วัน พบว่า กลุ่มที่ใส่แคลเซียมไฮดรอกไซด์ผสมกับคลอร์เฮ็กซิดีนไดกลูโคเนต กลุ่มที่ใส่แคลเซียมไฮดรอกไซด์ผสมกับสแตนนัสฟลูออไรด์ และกลุ่มใส่สแตนนัสฟลูออไรด์อย่างเดียวมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์ในคลองรากฟันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มไม่ใส่ยา ($p < 0.01$) ส่วน



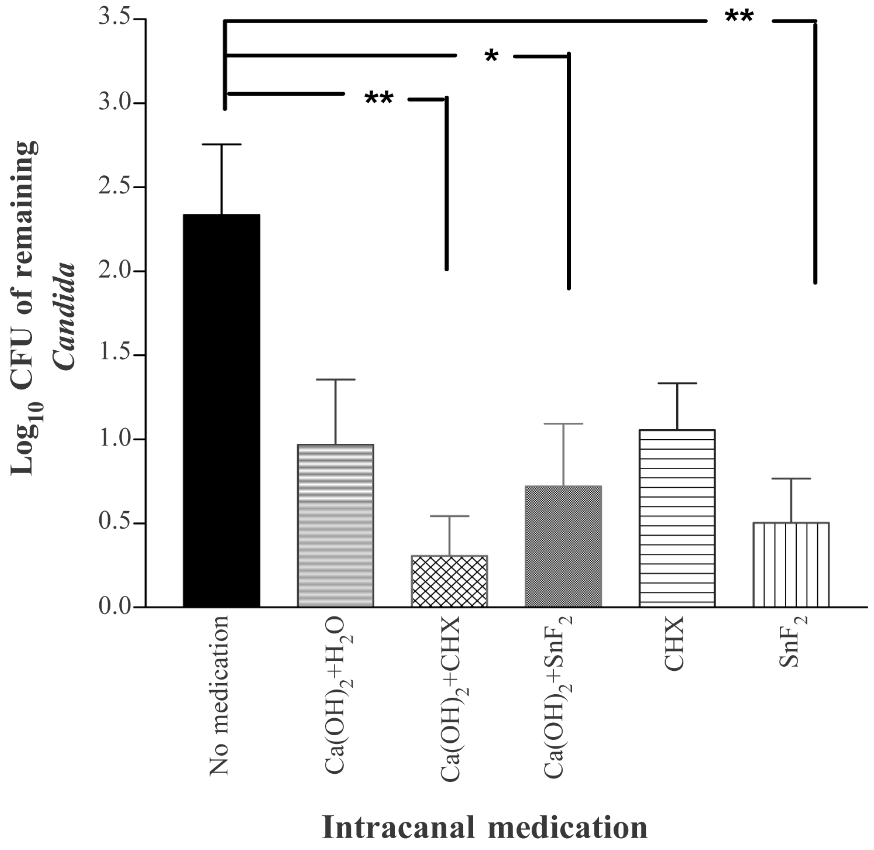
รูปที่ 2 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงการเจริญของเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์ในคลองรากฟัน รูป A แสดงบลาสโตสปอร์ของเชื้อรา (ศรชี้) ที่ผิวคลองรากฟันกำลังขยาย 350 เท่า และ รูป B แสดงบลาสโตสปอร์ (ศรชี้) ที่เกาะกลุ่มอยู่ในท่อเนื้อฟันในอีกบริเวณหนึ่งที่กำลังขยาย 1500 เท่า

Fig. 2 Scanning electron micrographs of *Candida albicans* cells growing in root canal. A, shows blastospores (arrow) on the surface of root canal (original magnification x350). B, from the different area shows blastospores (arrow) colonizing in the dentinal tubules (original magnification x1500).

กลุ่มที่ใส่แคลเซียมไฮดรอกไซด์ผสมกับน้ำกลั่นและกลุ่มใส่คลอร์เฮ็กซิดีนไดกลูโคเนตอย่างเดียวให้ผลในการฆ่าเชื้อราในคลองรากฟันไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ใส่ยา (รูปที่ 3)

การวัดค่าความเป็นกรดด่าง

แคลเซียมไฮดรอกไซด์เมื่อผสมกับน้ำกลั่น หรือคลอร์เฮ็กซิดีนไดกลูโคเนต หรือสแตนนัสฟลูออไรด์ จะมีค่าความเป็นกรดด่างประมาณ 12.5-13 โดยค่าความเป็นกรดด่างของแคลเซียมไฮดรอกไซด์ผสมคลอร์เฮ็กซิดีน และของแคลเซียมไฮดรอกไซด์ผสมสแตนนัสฟลูออไรด์มีค่าสูงกว่าของแคลเซียมไฮดรอกไซด์ผสมน้ำกลั่นอย่างมีนัยสำคัญเฉพาะที่ช่วงเวลา 48 ชั่วโมง ($p < 0.01$) ดังแสดงในรูปที่ 4 ส่วนคลอร์เฮ็กซิดีนไดกลูโคเนตมีคุณสมบัติเป็นด่าง มีค่าความเป็นกรดด่างประมาณ 8 เมื่อแรกผสม โดยค่าความเป็นกรดด่างจะมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อวัดที่ 2 ชั่วโมง ($p < 0.01$) หลังจากนั้นค่าความเป็นกรดด่างจะไม่เปลี่ยนแปลงจนกระทั่งเมื่อเวลาผ่านไป 6 และ 7 วัน ค่าความเป็นกรดด่างของคลอร์เฮ็กซิดีนจึงลดลงมาอยู่



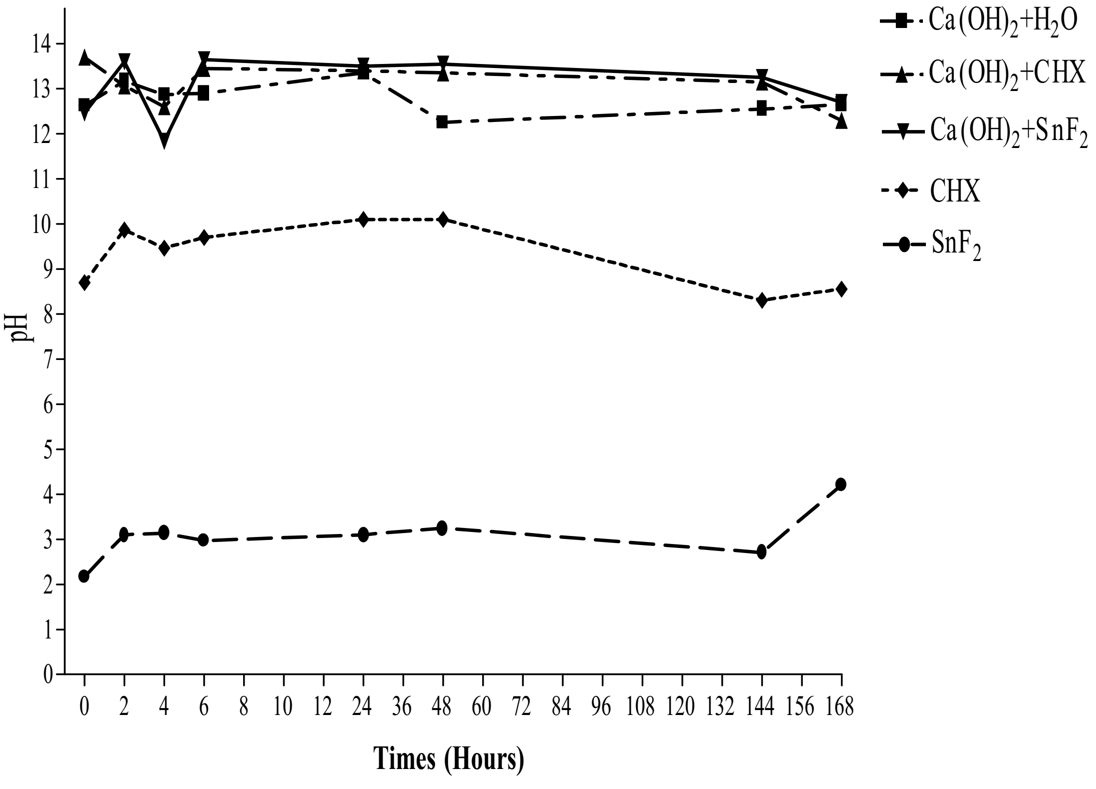
รูปที่ 3 แสดงค่าเฉลี่ยลอกการิทึมฐานสิบของจำนวนคอโลนีเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์ที่เหลืออยู่ในคลองรากฟันหลังจากใส่ยาชนิดต่างๆ เป็นเวลา 7 วัน เออเรอร์บาร์ในแต่ละแท่งแทนค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากค่าเฉลี่ย 7 ตัวอย่างในแต่ละกลุ่มทดลอง (* แสดงความแตกต่างทางสถิติ $p < 0.05$ และ ** แสดงความแตกต่างทางสถิติ $p < 0.01$ $Ca(OH)_2$ = แคลเซียมไฮดรอกไซด์ H_2O = น้ำกลั่น CHX = คลอร์เฮ็กซิดีน และ SnF_2 = สแตนนัสฟลูออไรด์)

Fig. 3 Means of log 10 CFU of *Candida albicans* remaining in the root canal after 7 days intracanal medication. Error bars represent standard deviation from 7 samples each group. (* shows statistical difference at $p < 0.05$, ** shows statistical difference at $p < 0.01$, $Ca(OH)_2$ = calcium hydroxide, H_2O = distilled water, CHX = chlorhexidine, SnF_2 = stannous fluoride)

ใกล้เคียงกับค่าความเป็นกรดด่างเมื่อแรกผสม ส่วนสแตนนัสฟลูออไรด์มีคุณสมบัติเป็นกรดแก่โดยค่าความเป็นกรดด่างของสแตนนัสฟลูออไรด์ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อบ่มนานขึ้นและมีค่าความเป็นกรดด่างประมาณ 2-3

วิจารณ์

การเพิ่มประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อราแคนดิดาของแคลเซียมไฮดรอกไซด์ด้วยการผสมกับสารอื่น ๆ ได้ทำการศึกษามาก่อนหน้านี้โดย Waltimo และคณะ[16] ซึ่งพบว่า การผสมแคลเซียมไฮดรอกไซด์กับไอโอดีนโพแทสเซียมไอโอไดด์เพื่อเป็นยาใส่ในคลองรากฟันไม่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อราของแคลเซียมไฮดรอกไซด์ได้ ส่วนฤทธิ์ในการกำจัดเชื้อราของสารผสมระหว่างแคลเซียมไฮดรอกไซด์กับโซเดียม ไฮโปคลอไรท์ดีกว่าของแคลเซียมไฮดรอกไซด์ผสมน้ำ และให้ผลใกล้เคียงกับการใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์เพียงอย่างเดียว แต่การใช้งานต้องมีความระมัดระวังเนื่องจากความมีพิษของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ในการศึกษานี้ใช้ สแตนนัสฟลูออไรด์เจล หรือคลอร์เฮ็กซิดีนผสมกับแคลเซียมไฮดรอกไซด์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์ทั้งบนวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อและในคลองรากฟันมนุษย์ การทดสอบประสิทธิภาพของการใส่ยาในคลองรากฟันมนุษย์ได้ดัดแปลงจากวิธีการทดลองของ Haapasalo และ Orstavik[20] โดยการใช้ฟันตัดบนซี่กลางของมนุษย์แทนฟันวัว เพื่อควบคุมลักษณะและขนาดของท่อเนื้อฟันให้ใกล้เคียงกับความเป็นจริง ทั้งนี้คลองรากฟันของฟันวัวมีขนาดใหญ่กว่าของมนุษย์มาก ยาที่ใส่ในคลองรากฟันให้เต็มจึงต้องมีปริมาตรมากกว่าด้วย เพื่อให้ยาสัมผัสกับท่อเนื้อฟันทั้งหมด การประเมินความสามารถในการฆ่าเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์ของยาที่ใส่ลงในคลองรากฟันใช้การตรวจนับคอโลนีของเชื้อราที่เหลืออยู่ใน



รูปที่ 4 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดด่างของสารและสารผสมเมื่อบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ($Ca(OH)_2$= แคลเซียมไฮดรอกไซด์ H_2O = น้ำกลั่น CHX = คลอร์เฮ็กซิดีน และ SnF_2 = สแตนนัสฟลูออไรด์)

Fig. 4 pH values of chemical agents incubated at 37°C. ($Ca(OH)_2$ = calcium hydroxide, H_2O = distilled water, CHX = chlorhexidine, SnF_2 = stannous fluoride)

คลองรากฟันที่เจริญบนวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อแทนการวัดค่าความขุ่น (optical density) ของสารละลายที่ได้จากการกรอเนื้อฟัน วิธีนี้สามารถประเมินความมีชีวิตของเชื้อราที่เหลืออยู่และหลีกเลี่ยงผลของผงเนื้อฟันที่อาจบดบังปริมาณเชื้อราที่เหลืออยู่ไม่มาก ซึ่งอาจทำให้ค่าความขุ่นที่ได้ไม่สัมพันธ์กับจำนวนเซลล์ที่เหลืออยู่จริง

การทดสอบประสิทธิภาพของยาและสารเคมีในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราบนวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นการทดสอบฤทธิ์ของยาในห้องปฏิบัติการที่ค่อนข้างง่ายและรวดเร็ว จึงมักใช้เป็นวิธีคัดกรองเบื้องต้นถึงศักยภาพของยาในการทำลายเชื้อ แต่การแปลผลต้องมีความระมัดระวังและรอบคอบ ทั้งนี้เนื่องจากความกว้างของบริเวณที่เชื้อถูกยับยั้งอาจเป็นผลจากความสามารถในการละลาย (solubility) และการแพร่ (diffusibility) ของสารไปในวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยนอกเหนือจากความเป็นพิษของยาเอง ผลการทดลองนี้ที่พบว่าความกว้างของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ที่เกิดรอบหลุมที่ใส่สแตนนัสฟลูออไรด์มีค่าน้อยสุด ในขณะที่คลอร์เฮ็กซิดีนให้ขอบเขตในการยับยั้งเชื้อมากที่สุด การแปลผลที่ได้ต้องพิจารณาหลายปัจจัยร่วมกัน โดยขอบเขตการยับยั้งเชื้อที่กว้างกว่าอาจเป็นผลจากความเป็นพิษของตัวยาเองหรืออาจเกิดร่วมกับความสามารถในการแพร่ไปในวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อของตัวยาด้วย ซึ่งคลอร์เฮ็กซิดีนในรูปแบบสารเหลวสามารถแพร่ได้ดีกว่าสแตนนัสฟลูออไรด์ที่อยู่ในรูปแบบเจล อย่างไรก็ตามเมื่อผสมสารทั้งสองตัวกับแคลเซียมไฮดรอกไซด์ พบว่าของผสมแคลเซียมไฮดรอกไซด์ทั้งหมดอยู่ในรูปของครีมข้น ทำให้มีข้อจำกัดในการแพร่ของสารไปในวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ และพบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราแคนดิดาไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ฤทธิ์ของสารผสมแคลเซียมไฮดรอกไซด์และสแตนนัสฟลูออไรด์ในการยับยั้งเชื้อราแคนดิดาบนวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับสแตนนัสฟลูออไรด์ที่พบในการศึกษานี้แตกต่างจากการทดสอบฤทธิ์ของสารผสมแคลเซียมไฮดรอกไซด์ และสแตนนัสฟลูออไรด์ในการยับยั้งเชื้อเอ็นเตอโรค็อกคัสแฟคัลลิส *(Enterococcus faecalis)* บนวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ศึกษาโดย Mickel และคณะ[21] ซึ่งพบว่าสแตนนัสฟลูออไรด์ ผสมแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ให้ขอบเขตการยับยั้งเชื้อเอ็นเตอโรค็อกคัสแฟคัลลิสได้น้อยกว่ากลุ่มสแตนนัสฟลูออไรด์ละลายน้ำและกลุ่มแคลเซียม-ไฮดรอกไซด์ละลายน้ำ ผลการวิจัยที่ต่างกันอาจมีสาเหตุจากความแตกต่างของเชื้อจุลชีพ รูปแบบและความเข้มข้นที่ต่างกันของสแตนนัสฟลูออไรด์

กลไกการต้านจุลชีพของแคลเซียมไฮดรอกไซด์เป็นการฆ่าเชื้อแบบไม่จำเพาะ โดยความเป็นด่างจะทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ โครงสร้างโปรตีน และกดการทำงานของเอนไซม์ของเชื้อจุลชีพ ทำให้เชื้อจุลชีพส่วนใหญ่ถูกทำลายไปได้ และมีเชื้อจุลชีพจำนวนน้อยที่จะสามารถอยู่รอดได้ในค่าความเป็นด่างที่สูงกว่า 12.5[9] ผลการวัดค่าความเป็นกรดด่างของสารในการวิจัยนี้พบว่าค่าความเป็นกรดด่างของสารเคมีทั้ง 5 กลุ่มมีความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราบนวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยสารเคมีที่เป็นด่างจะมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อราได้ดีกว่า เช่น คลอร์เฮ็กซิดีน และสารผสมแคลเซียมไฮดรอกไซด์ทั้งสามชนิด ส่วนสแตนนัสฟลูออไรด์มีความเป็นกรดมากและมีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อแคนดิดาอัลบิแคนส์ได้ต่ำกว่าสารอื่น ๆ ผลการทดลองนี้ยังสอดคล้องกับรายงานของ Myc และคณะ[22] ที่แสดงว่าสารที่มีคุณสมบัติเป็นกรดสามารถฆ่าเชื้อราแคนดิดาได้ด้อยกว่าสารที่มีคุณสมบัติเป็นด่าง

การศึกษาฤทธิ์การฆ่าเชื้อราของสารผสมแคลเซียมไฮ-ดรอกไซด์ที่ใช้เป็นยาใส่ในคลองรากฟันพบว่า สแตนนัสฟลูออไรด์ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ผสมกับคลอร์เฮ็กซิดีน แคลเซียมไฮดรอกไซด์ผสมกับสแตนนัสฟลูออไรด์สามารถกำจัดเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์ในคลองรากฟันได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ใส่ยา ส่วนกลุ่มแคลเซียมไฮดรอกไซด์ผสมน้ำกลั่นมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อราไม่แตกต่างทางสถิติกับกลุ่มควบคุม การด้อยประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อราของแคลเซียมไฮดรอกไซด์ผสมน้ำกลั่นให้ผลที่สอดคล้องกับการศึกษาของงานวิจัยหลายฉบับ[4,7,12,16,23]

กลไกในการกำจัดเชื้อราแคนดิดาของสารผสมแคลเซียมไฮดรอกไซด์กับสแตนนัสฟลูออไรด์อาจเกี่ยวข้องกับความเป็นกรดสูงของสแตนนัสฟลูออไรด์ซึ่งจะจับตัวได้ดีกับแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่เป็นด่างสูง จากการศึกษาโดยการผสมไทเทเนียมเตตระฟลูออไรด์ (TiF_4) กับแคลเซียมไฮดรอกไซด์ พบว่าไทเทเนียมเตตระฟลูออไรด์เกิดการแตกตัวให้ฟลูออไรด์อิออนและจับกับแคลเซียมอิออนอยู่ในรูปของแคลเซียมฟลูออไรด์ซึ่งสามารถสะสมในเนื้อฟัน และสามารถปล่อยออกมาได้ในภายหลัง เป็นการเพิ่มระยะการคงอยู่ของฤทธิ์ยา ซึ่งฟลูออไรด์นี้สามารถทำลายผนังเซลล์ของเชื้อรา เกิดการรั่วของสารภายในเซลล์[24] นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าอิออนที่แตกตัวจากสแตนนัสฟลูออไรด์จะจับตัวกับกลุ่มฟอสเฟตของกรดไลโปเท-โคอิค (lipoteichoic acid) ที่เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย ทำให้เกิดการขัดขวางการเสถียรของเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane

stability) และเมตาบอลิซึมของแบคทีเรีย[25] ฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อราของสแตนนัสฟลูออไรด์เมื่อผสมกับแคลเซียมไฮดรอกไซด์จึงอาจเกี่ยวข้องกับทั้งกลไกที่ทำให้เกิดการจับตัวของอิออนที่แตกตัวเกิดเป็นแคลเซียมฟลูออไรด์ในท่อเนื้อฟัน และกลไกการจับตัวของฟลูออไรด์อิออนกับโปรตีนกลุ่มฟอสเฟตของกรดไลโปเทโคอิคที่เยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อราทำให้เกิดการทำลายเชื้อราได้

งานวิจัยหลายเรื่องแสดงให้เห็นว่าคลอร์เฮ็กซิดีนเป็นสารที่มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียเทียบเท่ากับโซเดียมไฮโปคลอไรท์ไม่ว่าจะใช้ในรูปแบบที่เป็นยาใส่ในคลองรากฟันหรือเป็นน้ำยาล้างคลองรากฟัน[26,27] และยังมีประสิทธิภาพในการทำลายจุลชีพที่ดื้อต่อแคลเซียมไฮดรอกไซด์[28] ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของคลอร์เฮ็กซิดีนยังคงอยู่ได้นานบนพื้นผิวท่อเนื้อฟันหลังจากใส่ในคลองรากฟันนานกว่า 7 วัน[28-30] ในการวิจัยนี้ก็แสดงให้เห็นว่าสารผสมแคลเซียมไฮดรอกไซด์กับคลอร์เฮ็กซิดีนไดกลูโคเนตมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์ในคลองรากฟันมนุษย์ ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยของ Waltimo และคณะ[16] ประสิทธิภาพการต้านจุลชีพของยาที่ใส่ในคลองรากฟันต้องอาศัยทั้งการสัมผัสกับเนื้อเยื่อและการแพร่เข้าไปในเซลล์ ดังนั้นสารเคมีที่จะใช้เป็นยาใส่ในคลองรากฟันจึงควรเป็นสารที่สามารถนำเข้าไปในคลองรากฟันได้ง่ายเพื่อให้เกิดการสัมผัสกับเนื้อเยื่อที่เหมาะสม ดังนั้นคุณสมบัติเชิงกล (physical property) ของยาที่ใส่จึงอาจมีผลอย่างมากต่อประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อของยาในคลองรากฟัน การทดลองโดย Basrani และคณะ พบว่าการผสมคลอร์เฮ็กซิดีนทำให้มุมสัมผัสลดลงแต่เพิ่มความหนืดของแคลเซียมไฮดรอกไซด์[15] ผลการทดลองที่ผ่านมาทำให้มีการแนะนำว่าคลอร์เฮ็กซิดีนสามารถใช้เป็นสารผสมกับแคลเซียมไฮดรอกไซด์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการต้านจุลชีพสายพันธุ์ที่ดื้อต่อแคลเซียมไฮดรอกไซด์ได้[15,30,31]

งานวิจัยนี้เป็นการทดลองในห้องปฏิบัติการที่เลือกใช้เชื้อราเพียงชนิดเดียวสำหรับศึกษาฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อราของสารผสมแคลเซียมไฮดรอกไซด์ แต่ในคลองรากฟันนั้นสามารถพบเชื้อได้หลายชนิด ดังนั้นควรมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมโดยทดสอบกับจุลชีพชนิดอื่นด้วย

แม้ว่าผลจากงานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่าการผสมแคลเซียมไฮดรอกไซด์ด้วยสแตนนัสฟลูออไรด์มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์ในคลองรากฟัน แต่ของผสมระหว่างแคลเซียมไฮดรอกไซด์และสแตนนัสฟลูออไรด์เจลมีลักษณะค่อนข้างเหนียว ซึ่งการนำใส่เข้าในคลองรากฟันและการกำจัดออกจากคลองรากฟันทำได้ไม่ง่ายนัก ปัญหานี้อาจน้อยลงหากใช้สแตนนัสฟลูออไรด์ที่มีลักษณะเป็นของเหลวมาผสมแทน อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับคุณสมบัติเชิงกล (physical property) และทางเคมีของสารผสม เช่น มุมสัมผัส ความหนืด รวมทั้งความเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อปลายรากฟันของสารผสมก่อนที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในทางคลินิก

สรุป

การศึกษานี้ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของสาร 5 กลุ่มในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์ในคลองรากฟัน ได้แก่ คลอร์เฮ็กซิดีน สแตนนัสฟลูออไรด์ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ผสมน้ำกลั่น แคลเซียมไฮดรอกไซด์ผสมคลอร์เฮ็กซิดีน และ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ผสมสแตนนัสฟลูออไรด์ ถึงแม้ว่าการผสมแคลเซียมไฮดรอกไซด์ด้วยน้ำกลั่นหรือคลอร์เฮ็กซิดีน หรือสแตนนัสฟลูออไรด์จะทำให้ขอบเขตการยับยั้งเชื้อราบนวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับค่าความเป็นกรดด่างของสารผสมที่มีความเป็นด่างสูง แต่แคลเซียมไฮดรอกไซด์ผสมคลอร์เฮ็กซิดีน และแคลเซียมไฮดรอกไซด์ผสมสแตนนัสฟลูออไรด์มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณเชื้อราในคลองรากฟันได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มไม่ใส่ยา ในขณะที่แคลเซียมไฮดรอกไซด์ผสมน้ำกลั่นให้ผลไม่แตกต่างทางสถิติจากกลุ่มควบคุม

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์สำหรับเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์ สายพันธุ์ DMST 21424 คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่อำนวยความสะดวกในการปฏิบัติงานที่ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ศูนย์ทันตวัสดุศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์-มหาวิทยาลัยที่เอื้อเฟื้อเครื่องมือในการตัดฟัน และศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์-มหาวิทยาลัยที่อำนวยความสะดวกในการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด

เอกสารอ้างอิง

1. Kakehashi S, Stanley HP, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposure of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. Oral Surg. 1965;20:340-9.
2. Baumgartner JC, Watts CM, Xia T. Occurrence of *Candida albicans* in infections of endodontic origin. J Endod. 2000;26:695-8.
3. Waltimo T, Siren EK, Torkko H, Olsen I, Haapasalo MP. Fungi in therapy-resistant apical periodontitis. Int Endod J. 1997;30:96-101.
4. Siqueira JFJ, Rocas IN. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2004;97:85-94.
5. Sen BH, Safavi KE, Spangberg LSW. Colonization of *Candida albicans* on cleaned human dental hard tissues. Arch Oral Biol. 1997;42:513-20.
6. Waltimo TM, Orstavik D, Sirén EK, Haapasalo MP. *In vitro* yeast infection of human dentin. J Endod. 2000;26:207-9.
7. Nair PN, Sjogren U, Krey G, Kahnberg KE, Sundqvist G. Intracanal bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesion: a long-term light and electron microscopic follow-up study. J Endod. 1990;16:580-8.
8. Sjögren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. Int Endod J. 1997;30:297-306.
9. Athanassiadis B, Abbott PV, Walsh LJ. The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontics. Aust Dent J. 2007;52:S64-82.
10. Ercan E, Dalli M, Dülgergil CT. *In vitro* assessment of the effectiveness of chlorhexidine gel and calcium hydroxide paste with chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2006;102:e27-31.
11. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Magalhães FA, de Uzeda M. Antifungal effects of endodontic medicaments. Aust Endod J. 2001;27:112-4.
12. Ferguson JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Effectiveness of intracanal irrigants and medications against the yeast *Candida albicans*. J Endod. 2002;28:68-71.
13. Valera M, Rego M, Cardoso JA. Effect of sodium hypochlorite and five intracanal medications on *Candida albicans* in root canals. J Endod. 2001; 27:401-3.
14. Basrani B, Lemonie C. Chlorhexidine gluconate. Aust Endod J. 2005;31:48-52.
15. Basrani B, Ghanem A, Tjaderhane L. Physical and chemical properties of chlorhexidine and calcium hydroxide-containing medication. J Endod. 2004; 30:413-7.
16. Waltimo T, Orstavik D, Siren E, Haapasalo M. *In vitro* susceptibility of *Candida albicans* to four disinfectants and their combinations. Int Endod J. 1999;32:421-9.
17. Ballal V, Kundabala M, Acharya S, Ballal M. Antimicrobial action of calcium hydroxide, chlorhexidine and their combination on endodontic pathogens. Aust Dent J. 2007;52:118-21.
18. Meurman JH, Kari K, Waltimo T, Kotiranta A, Inkeri J, Samaranayake LP. *In vitro* antifungal effect of amine fluoride-stannous fluoride combination on oral *Candida* species. Oral Dis. 2006;12:45-50.
19. McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. Clin Microbiol Rev. 1999;12:147-9.
20. Haapasalo M, Orstavik D. *In vitro* infection and disinfection of dentinal tubules. J Dent Res. 1987; 66:375-9.
21. Mickel AK, Sharma P, Chogle S. Effectiveness of stannous fluoride and calcium hydroxide aganist *Enterococcus faecalis*. J Endod. 2003;29(4):259-60.
22. Myc A, Vanhecke T, Landers JJ, Hamouda T, Baker JRJ. The fungicidal activity of novel nanoemulsion

(X8W60PC) against clinically important yeast and filamentous fungi. Mycopathologia. 2002;155: 195-201.

23. Waltimo T, Orstavik D, Siren EK, Haapasalo P. Susceptibility of oral *Candida* species to calcium hydroxide *in vitro*. Int Endod J. 1999;32:94-8.

24. Mustafa A. The effect of calcium chelating or binging agents on *Candida albicans*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2005;100: 626-30.

25. Hughes AH, Hancock IC, Baddily J. The functions of teichoic acids in cation control in bacterial membranes. Biochem J. 1973;132:89-93.

26. Basrani B, Robinson C. Evaluation of the cleansing and disinfecting of the root canal with different irrigations, part I. Rev Asoc Odontol Argent. 1998; 86:584-90.

27. Siqueira J, Batista M, Fraga R, de Uzeda M. Antibacterial effects of endodontic irrigations on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultive bacteria. J Endod. 1998;24:414-6.

28. White RR, Hays GL, Janer LR. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. J Endod. 1997;23:229-31.

29. Komorowski R, Grad H, Wu XY, Friedman S. Antimicrobial substantivity of chlorhixidine-treated bovine root dentine. J Endod. 2000;26:315-7.

30. Basrani B, Santos JM, Tjäderhane L, Grad H, Gorduysus O, Huang J, *et al.* Substantive antimicrobial activity in chlorhexidine-teated human root dentine. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2002;94:240-5.

31. Almyroudi A, Mackenzie D, McHugh S, Saunders WP. The effectiveness of varoius disinfectants used as endodontic intracanal medications: an *in vitro* study. J Endod. 2002;28:163-7.

In vitro effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine or stannous fluoride in reducing *Candida albicans* in human root canal

Siripen Wanasaengsakul D.D.S., Ph.D.[1]
Chalermkwan Puworawan D.D.S., M.Sc.[1]
Tipapun Setsirisombat D.D.S.[2]
Karnnapat Peetiakarawach D.D.S.[3]

[1]Faculty of Dentistry, Thammasat University, Pathumtanee
[2]Lan Sak Hospital, Lan Sak, Utaitani
[3]Sirindhorn College of Public Health Chonburi, Muang, Chonburi

Abstract

Objective To evaluate the effectiveness of calcium hydroxide combined with chlorhexidine or stannous fluoride in disinfecting the *Candida albicans* infected human root canal *in vitro.*

Material and Methods Antifungal effect of reagents was examined by using agar-diffusion test and counting colony forming unit of *C. albicans* existed in the root canal after 7 days intracanal medication. Acid-base changing of chemical agents was also examined.

Results Three types of calcium hydroxide pastes could inhibit the growth of *Candida* on Sabouraud dextrose agar, although the statistical differences among them were not found. The pH of calcium hydroxide pastes were all more than 12. Calcium hydroxide combined with chlorhexidine or stannous fluoride could significantly reduce colony forming unit in *Candida* infected human root canal, whereas conventional calcium hydroxide were unable to do so.

Conclusion Calcium hydroxide combined with chlorhexidine or stannous fluoride could reduce the colony forming unit of *C. albicans* within human root canal.

(CU Dent J. 2008;31:371-84)

Key words*: calcium hydroxide; Candida albicans; chlorhexidine; root canal treatment; stannous fluoride*