

ประสิทธิภาพของพลาสมาเจ็ตความดันบรรยากาศที่อุณหภูมิต่ำ
ในการกำจัดแบคทีเรียชีวภาพของเชื้อเอนเทอโรคอกคัสฟีคาลิส
ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน
The Efficacy of Atmospheric Pressure Cold Plasma Jet
Against *Enterococcus faecalis* Biofilms
at Variable Time Interval

อรณิชา กฤตยาเจริญพงศ์¹, ดนุพงษ์ ชัยอริยะกุล², อาณัติ เดวี², ภูมิศักดิ์ เลาวกุล²
โรงพยาบาลป่าตอง จังหวัดภูเก็ต

ภาควิชาทันตกรรมบูรณะและปริทันตวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Onnicha Krittayajaroenpong¹, Danupong Chairiyakul², Anat Dewi², Phumisak Louwakul²
¹Patong Hospital, Phuket

²Department of Restorative Dentistry and Periodontology, Faculty of Dentistry, Chiang Mai University

ชม. ทันตสาร 2563; 41(1) : 57-68
CM Dent J 2020; 41(1) : 57-68

Received: 25 September, 2019
Revised: 4 November, 2019
Accepted: 11 November, 2019

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาเวลาที่พลาสมาเจ็ตความดันบรรยากาศที่อุณหภูมิต่ำสามารถกำจัดแบคทีเรียชีวภาพของเอนเทอโรคอกคัสฟีคาลิสบนแผ่นเนื้อฟันได้อย่างมีประสิทธิภาพ

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ: นำฟันกรามมนุษย์มาตัดเป็นแผ่นจนได้ขนาด 5x5x1 มิลลิเมตร จำนวน 90 แผ่น ทำให้ปราศจากเชื้อ จากนั้นบ่มเชื้อเอนเทอโรคอกคัสฟีคาลิสลงบนแผ่นเนื้อฟันให้เกิดแบคทีเรียชีวภาพอายุ 7 วัน แบ่งชิ้นตัวอย่างออกเป็นกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง 5 กลุ่ม กลุ่มทดลองที่ 1 ถึง 4 ทดสอบโดยใช้พลาสมาเจ็ตความดัน

Abstract

Objective: To study the time duration in which atmospheric pressure cold plasma is efficient in the elimination of *Enterococcus faecalis* biofilms on dentin slices.

Materials and methods: 90 slices of 5x5x1 mm human molar's dentin were prepared and sterilized. The slices were incubated with *E. faecalis* to form 7-day-old biofilms. Specimens were divided into controls and five experimental groups. Groups 1-4 were subjected to atmospheric

Corresponding Author:

อาณัติ เดวี

อาจารย์, ภาควิชาทันตกรรมบูรณะและปริทันตวิทยา
คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ 50200

Anat Dewi

Lecturer, Department of Restorative Dentistry
and Periodontology, Faculty of Dentistry,
Chiang Mai University Chiang Mai 50200, Thailand.
E-mail: anatdewident@gmail.com

บรรยากาศที่อุณหภูมิต่ำร่วมกับฮีเลียมร้อยละ 98 และ ออกซิเจนร้อยละ 2 ที่ระยะเวลา 30 วินาที 1 นาที 2 นาที และ 5 นาทีตามลำดับ กลุ่มทดลองที่ 5 ทดสอบโดยใช้น้ำยาโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 5 ประเมินการกำจัดแผ่นชีวภาพของเอ็นเทอโรคอกคัสฟีคาลิสด้วยวิธีการย้อมด้วยชุดย้อมเซลล์มีชีวิตชนิดไลฟเฟดแบคไลต์ และศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอลชนิดใช้เลเซอร์ในการสแกน วัดอัตราส่วนความมีชีวิตของเชื้อ และทำการศึกษาลักษณะโครงสร้างของแผ่นชีวภาพที่เปลี่ยนแปลงด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด วิเคราะห์ผลโดยใช้สถิติการจำแนกความแปรปรวนทางเดียวและเปรียบเทียบเชิงซ้อนชนิดทูกีย์ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ผลการศึกษา: อัตราส่วนเซลล์ตายในกลุ่มทดลองที่ 1 ถึง 4 มีค่าเท่ากับ 0.65, 0.61, 0.63 และ 0.78 ตามลำดับ โดยที่กลุ่มทดลองที่ 4 สามารถกำจัดเชื้อได้มากกว่ากลุ่มทดลองที่ 1 ถึง 3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่ยังคงกำจัดเชื้อได้น้อยกว่ากลุ่มทดลองที่ 5 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด แสดงให้เห็นการหลุดของแผ่นชีวภาพของเอ็นเทอโรคอกคัสฟีคาลิสและพบเชื้อบางส่วนถูกทำลาย

สรุป: พลาสมาเจ็ตความดันบรรยากาศที่อุณหภูมิต่ำสามารถกำจัดแผ่นชีวภาพของเอ็นเทอโรคอกคัสฟีคาลิสบนแผ่นเนื้อฟันได้ โดยกลุ่มทดสอบเป็นเวลา 5 นาทีมีประสิทธิภาพสูงสุด อย่างไรก็ตามไม่มีกลุ่มทดลองใดสามารถกำจัดแผ่นชีวภาพได้อย่างสมบูรณ์

คำสำคัญ: พลาสมาเจ็ตความดันบรรยากาศที่อุณหภูมิต่ำ แผ่นชีวภาพ เอ็นเทอโรคอกคัสฟีคาลิส

pressure cold plasma jet with 98% helium gas and 2% oxygen gas for 30 seconds, 1 minute, 2 minutes, and 5 minutes respectively. Group 5 was subjected to 5% sodium hypochlorite. The elimination of *E. faecalis* biofilm was determined by LIVE/DEAD[®] BacLight[™] cell staining under Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM). The proportion of viable bacterial cells were calculated. Changes in biofilm structure were studied under Scanning Electron Microscope (SEM). Results were statistically analyzed using One-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test at a confidence level of 95%.

Results: Dead cell proportion in experimental group 1-4 were 0.65, 0.61, 0.63 and 0.78 respectively. Group 4 showed significantly more elimination of biofilm than group 1-3 ($p < 0.05$). However, group 4 still demonstrated significantly less biofilm elimination than group 5 ($p < 0.05$). Image from SEM showed the disruption of *E. faecalis* biofilm and deformation of some bacteria.

Conclusion: Atmospheric pressure cold plasma jet was able to eliminate *E. faecalis* biofilms on dentin slices. The most effective time duration was 5 minutes. However, none of the experimental groups showed complete biofilm removal.

Keywords: atmospheric pressure cold plasma jet, biofilms, *Enterococcus faecalis*

บทนำ

จุลชีพเป็นปัจจัยสำคัญก่อให้เกิดการติดเชื้อและการอักเสบภายในคลองรากฟันรวมถึงเนื้อเยื่อบริเวณรอบปลายรากฟัน^(1,2) การหลงเหลือของจุลชีพที่ยังมีชีวิตในระบบคลองรากภายหลังการรักษาคลองรากฟันเป็นปัจจัยที่ก่อให้เกิดความล้มเหลวในภายหลัง⁽³⁾ เอ็นเทอโรคอกคัสฟีคาลิส (*Enterococcus faecalis*; *E. faecalis*) เป็นแบคทีเรียแกรม

บวกที่มีอุบัติการณ์พบในคลองรากฟันที่รักษาล้มเหลวร้อยละ 24 ถึง 77 เนื่องจากความสามารถในการดำรงชีพในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมและมีความสามารถในการสร้างและอาศัยอยู่ในรูปแบบของแผ่นชีวภาพ⁽⁴⁾ ส่งผลให้เชื้อมีความคงทนยิ่งขึ้นจากการมีเมทริกซ์ภายนอกเซลล์ (extracellular polymeric substance) ห่อหุ้มและมีการสื่อสารภายในกลุ่มจุลชีพที่อาศัยอยู่ร่วมกัน⁽⁵⁾

โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (sodium hypochlorite; NaOCl) เป็นน้ำยาล้างคลองรากฟันที่นิยมใช้เป็นมาตรฐานในขั้นตอนการกำจัดเชื้อ เนื่องจากมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อที่ดี รวมถึงมีความสามารถในการกำจัดแผ่นชีวภาพเมื่อใช้ความเข้มข้นที่สูง โดยมีรายงานความสามารถในการกำจัดแผ่นชีวภาพโดยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ที่ความเข้มข้นสูงร้อยละ 6 มีประสิทธิภาพมากกว่าความเข้มข้นต่ำ⁽⁶⁾ อย่างไรก็ตามโซเดียมไฮโปคลอไรต์ มีข้อด้อยหลายประการ ได้แก่ มีกลิ่นฉุน มีฤทธิ์จำกัดในการฆ่าเชื้อบางชนิด เช่น เอ็นเทอโรคอกคัสฟีคาลิส และแคนดิดาอัลบิแคนส์ (*Candida albicans*; *C. albicans*) เป็นต้น นอกจากนี้ก่อให้เกิดการกัดกร่อนและมีความเป็นพิษสูงต่อเนื้อเยื่อโดยพบความรุนแรงแปรผันกับความเข้มข้นของโซเดียมไฮโปคลอไรต์^(7,8) ดังนั้นจึงมีความพยายามในการหาวิธีการทดแทนการใช้โซเดียมไฮโปคลอไรต์ อาทิ การใช้เลเซอร์หลากหลายชนิด เช่น เลเซอร์ชนิดนีโอดีเมียม-แย็ก (Neodymium: YAG laser) เลเซอร์ชนิดเออร์เบียม-แย็ก (Erbium: YAG laser)⁽⁹⁾ และเลเซอร์ไดโอด (diode laser)⁽¹⁰⁾ ซึ่งมีข้อด้อยคือลำแสงมีลักษณะเป็นเส้นตรงอาจไม่สอดคล้องกับลักษณะของคลองรากฟัน อีกทั้งอุปกรณ์มีราคาสูงและการศึกษาพบว่าเลเซอร์มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียไม่เทียบเท่าการใช้โซเดียมไฮโปคลอไรต์ จึงนำมาใช้เป็นเพียงอุปกรณ์เสริมในการกระตุ้นน้ำยาโซเดียมไฮโปคลอไรต์เท่านั้น นอกจากนี้ยังมีการใช้วิธีโฟโตไดนามิก (photodynamic Therapy; PDT) ซึ่งเป็นการใช้แสงกระตุ้นสารไวแสง (photosensitizer) ก่อให้เกิดอนุมูลออกซิเจนที่ว่องไว ใช้ในการกำจัดเชื้อแบคทีเรีย อย่างไรก็ตามยังคงพบว่าประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียด้อยกว่าการใช้โซเดียมไฮโปคลอไรต์^(9,11)

พลาสมา (plasma) เป็นสสารชนิดที่ 4 ได้รับการพัฒนาและเริ่มนิยมนำมาใช้ในทางการแพทย์และทางทันตกรรม พลาสมามีหลากหลายประเภทตามปัจจัยที่แตกต่างกัน เช่น แหล่งพลังงาน อุณหภูมิ แก๊สที่นำมาผสม อาทิ ฮีเลียม ออกซิเจน ไนโตรเจน อาร์กอน และลักษณะของหัว เช่น เจ็ต (jet) พลุ (plume) ดินสอ (pencil) เข็ม (needle) เป็นต้น^(12,13) มีรายงานถึงความสามารถในการฆ่าเชื้อของพลาสมาที่ความดันบรรยากาศ โดยอาศัยกลไกการแตกตัวของแก๊สเมื่อได้รับพลังงานจากกระแสไฟฟ้า เกิดอิเล็กตรอน (electron) ประจุไฟฟ้า (ion) และอนุมูลอิสระ (free radical)

ซึ่งมีความสามารถในการฆ่าเชื้อได้⁽¹⁴⁻¹⁶⁾ ข้อดีของพลาสมาคือ มีความปลอดภัยเนื่องจากไม่มีความร้อน ไม่มีผลทำลายเนื้อเยื่อ ปลอดภัยต่อผู้ใช้งาน ใช้พลังงานน้อย เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และสามารถฆ่าเชื้อเอ็นเทอโรคอกคัสฟีคาลิสได้ทั้งในรูปแบบจุลชีพอิสระและแผ่นชีวภาพ⁽¹⁷⁻¹⁹⁾

จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่า แต่ละการศึกษามีการทดสอบการฆ่าเชื้อด้วยพลาสมาเจ็ตที่ระยะเวลาแตกต่างกันไป ตั้งแต่ 1 ถึง 15 นาที^(17,19-22) มีรายงานการศึกษาการกำจัดแผ่นชีวภาพของเชื้อในรากฟันที่ถูกถอนโดยการฉายพลาสมาที่เวลา 1 นาที มีประสิทธิภาพในการกำจัดแผ่นชีวภาพของเชื้อเอ็นเทอโรคอกคัสฟีคาลิสใกล้เคียงกับการล้างด้วยน้ำยาคลอเฮกซิดีนกลูโคเนต (chlorhexidine gluconate) ความเข้มข้นร้อยละ 2 ร่วมกับการใช้เครื่องอัลตราโซนิคเป็นเวลา 30 วินาที⁽²²⁾ นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่าพลาสมาที่เวลา 15 นาที มีความสามารถในการกำจัดแผ่นชีวภาพของเชื้อเอ็นเทอโรคอกคัสฟีคาลิสในรากฟันถอนมากกว่า 5 และ 10 นาที⁽²¹⁾ โดยการศึกษาส่วนใหญ่พบว่าเมื่อใช้พลาสมาที่เวลานานขึ้นจะเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อ อย่างไรก็ตามการเพิ่มเวลาที่มากขึ้นอาจไม่เหมาะสมกับการใช้งานจริงในทางคลินิก^(20,21,23,24) ดังนั้นการศึกษานี้จึงต้องการศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมที่พลาสมาเจ็ตความดันบรรยากาศที่อุณหภูมิต่ำสามารถกำจัดแผ่นชีวภาพของเชื้อเอ็นเทอโรคอกคัสฟีคาลิสบนแผ่นเนื้อฟันได้อย่างมีประสิทธิภาพ

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมแผ่นเนื้อฟัน

งานวิจัยนี้ผ่านการรับรองโครงการศึกษาวิจัยในมนุษย์จากคณะกรรมการพิทักษ์สวัสดิภาพและป้องกันภัยอันตรายของผู้ถูกวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เอกสารเลขที่ 3/2562 และผ่านการรับรองการอนุมัติให้ดำเนินการวิจัยด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ จากคณะกรรมการความปลอดภัยทางชีวภาพระดับส่วนงานชุดที่ 5 มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (Approval No. CMUIBC0562003)

การศึกษานี้ใช้ฟันกรามมนุษย์จำนวน 90 ซี่ นำมาตัดบริเวณรอยต่อเคลือบฟันกับเคลือบรากฟัน (cemento-enamel junction) ด้วยหัวกรอเร็วชนิดไดมอนด์ดิสก์ (diamond disc: 3M, St. Paul, MN, USA) จากนั้นตัดฟันส่วนตัวฟันจนได้แผ่นเนื้อฟัน (dentin slice) ที่มีลักษณะ

หน้าตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 5x5 มิลลิเมตร ทหนา 1 มิลลิเมตร ด้วยเครื่องตัดฟัน (IsoMet[®] 1000: Buehler, Lake Bluff, IL, USA) ชัดแต่งผิวแผ่นฟันให้เรียบโดยใช้กระดาษทรายน้ำที่มีความหยาบเบอร์ 800 และ 1000 ตามลำดับ ทำแผ่นเนื้อฟันให้ปราศจากเชื้อด้วยการแช่น้ำยาโซเดียมไฮโปคลอไรต์ ความเข้มข้นร้อยละ 5 (RCI labscan Limited, Pathumthani, Thailand) ตามด้วยการแช่น้ำยาเอทิลีนไดเอมีนเทตระอะซีติก (ethylenediaminetetraacetic acid: Smear Clear[™], Kerr, Orange, GA, USA) ความเข้มข้นร้อยละ 17 จากนั้นสะเทินฤทธิ์ของโซเดียมไฮโปคลอไรต์ด้วยการแช่ในน้ำยาโซเดียมไทโอซัลเฟต (sodium thiosulfate: RCI labscan Limited, Bangkok, Thailand) ความเข้มข้นร้อยละ 5 ในอ่างอัลตราโซนิคแล้วนำเข้าเครื่องปลอดเชื้อระบบไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

การเตรียมเชื้อและแผ่นชีวภาพ

นำเชื้อเอ็นเทอโรคอกคัสฟีคาลิสสายพันธุ์เอทีซีซี 29212 (ATCC 29212) จากอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ ทำการขีดเชื้อในจานเพาะเชื้อวันปีเฮสไอ (BHI agar: HiMedia, HiMedia Laboratories, Mumbai, India) บ่มในตู้บ่มเชื้อ (incubator: Memmert BE-200, Memmert GmbH, Schwabach, Germany) ในสภาวะมีออกซิเจน อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อจากวันเลี้ยงเชื้อ มาบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวปีเฮสไอ (BHI broth: HiMedia, HiMedia Laboratories, Mumbai, India) ที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อในตู้บ่มเชื้อ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนได้เชื้อที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 McFarland ที่มีปริมาณเชื้อ 1×10^8 หน่วยก่อรูปโคโลนีต่อมิลลิลิตร (colony forming unit per milliliter; CFU/ml) นำเชื้อและอาหารเหลวปริมาตร 5 มิลลิลิตรใส่ลงในหลุม (well plate: Corning Incorporated, Corning, NY, USA) ซึ่งแต่ละช่องบรรจุแผ่นเนื้อฟัน บ่มในตู้บ่มเชื้อในสภาวะที่มีออกซิเจน อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลววันเว้นวันเพื่อให้เกิดการสร้างแผ่นชีวภาพ ยืนยันการเกิดแผ่นชีวภาพด้วยการนำแผ่นเนื้อฟันจำนวน 2 แผ่นโดยวิธีการสุ่มอย่างง่ายมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด

อุปกรณ์กำเนิดพลาสมาเจ็ตความดันบรรยากาศที่อุณหภูมิต่ำ

ไบโอพลาสมาความดันบรรยากาศที่อุณหภูมิต่ำ (BIO-PLASMA Cell Modulation: PhotoBioCare Co. Ltd, Nonthaburi, Thailand) ผลิตโดยภาควิชาวิศวกรรมชีวการแพทย์ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ใช้การผสมผสานระบบเครื่องผลิตกระแสไฟฟ้าที่มีแรงดันและความถี่สูงเพื่อผลิตพลาสมาความดันบรรยากาศที่อุณหภูมิต่ำ หัวพลาสมาที่ใช้เป็นแบบพลาสมาเจ็ตความดันบรรยากาศ (atmospheric pressure non-thermal plasma jet) มีหลอดทั้งสแตนเลสขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร ยาว 1.2 เซนติเมตร เป็นตัวนำไฟฟ้า (electrode) และใช้ปลอกเข็มเอทิลีนเทตระฟลูออโรเอทิลีน (ethylene tetrafluoro ethylene needle: Terumo Surflo[®], Tokyo, Japan) ยาว 1.7 เซนติเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 มิลลิเมตร ทำหน้าที่เป็นแผ่นฉนวนไฟฟ้าคู่ขนาน (dielectric barrier) แก๊สที่ใช้ในการศึกษานี้คือ ฮีเลียม (Helium; He) ร้อยละ 98 และออกซิเจน (oxygen; O₂) ร้อยละ 2 (He/(2%)O₂) ปรับให้มีอัตราการไหลของแก๊ส (flow rate) 0.5 ลิตรต่อนาที เมื่อวัดโดยเครื่องวัดอัตราการไหล (flow meter: Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA) แล้วพบว่าสามารถผลิตพลาสมาความดันบรรยากาศที่อุณหภูมิต่ำได้กำลังช่วงประมาณ 0.075-0.2 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตร

การทดสอบผลการฆ่าเชื้อของพลาสมาเจ็ตความดันบรรยากาศที่อุณหภูมิต่ำ

แบ่งแผ่นเนื้อฟันที่มีแผ่นชีวภาพของเชื้อเอ็นเทอโรคอกคัสฟีคาลิสออกเป็นกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองอย่างสุ่ม ดังตารางที่ 1

นำแผ่นเนื้อฟันที่มีแผ่นชีวภาพอายุ 7 วัน ล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน (Phosphate-buffered saline; PBS: Merck, Darmstadt, Germany) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำไปทำการทดสอบตามกลุ่มดังนี้

กลุ่มควบคุมลบ: แช่แผ่นเนื้อฟันในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที

กลุ่มควบคุม: ทำการฉายพลาสมาเจ็ตความดันบรรยากาศที่อุณหภูมิต่ำ ปรับค่าความถี่ 10 กิโลเฮิร์ตซ์ และอัตราพัลส์ (pulse repetition rate) 100 เฮิร์ตซ์ ให้มีอัตรา

ตารางที่ 1 จำนวนแผ่นเนื้อฟันในแต่ละกลุ่มที่ใช้ทดสอบ

Table 1 Number of dentin slices in each experimental group

กลุ่ม	การทดสอบ			จำนวนแผ่นเนื้อฟัน (แผ่น)	
	วิธีการ	รายละเอียด	เวลา	CLSM	SEM
ควบคุมลบ	แช่	PBS	5 นาที	6	3
ควบคุม	ปล่อยซีเลียม/ออกซิเจน เปิดเครื่องพลาสมาเจ็ต	ปล่อยแก๊ส	30 วินาที	6	3
			1 นาที	6	3
			2 นาที	6	3
			5 นาที	6	3
ทดลองที่ 1 ทดลองที่ 2 ทดลองที่ 3 ทดลองที่ 4	ปล่อยซีเลียม/ออกซิเจน เปิดเครื่องพลาสมาเจ็ต	ปล่อยแก๊ส	30 วินาที	6	3
			1 นาที	6	3
			2 นาที	6	3
			5 นาที	6	3
ทดลองที่ 5	แช่	5% NaOCl	5 นาที	6	3

การไหลของแก๊สรวมที่ 0.5 ลิตรต่อนาที โดยให้ปลายปลอกซีเมนต์เคลือบผิวของฟลูออโรเอทิลีนอยู่บริเวณกลางแผ่นเนื้อฟัน ห่างจากแผ่นเนื้อฟัน 2 มิลลิเมตร เปิดแก๊สซีเลียมร้อยละ 98 และออกซิเจนร้อยละ 2 โดยไม่เปิดสวิตช์เครื่องกำเนิดพลาสมาเจ็ตความดันบรรยากาศที่อุณหภูมิต่ำเป็นเวลา 30 วินาที 1 นาที 2 นาที และ 5 นาที ตามกลุ่มต่าง ๆ

กลุ่มทดลองที่ 1-4: ทำการฉายพลาสมาเจ็ตความดันบรรยากาศที่อุณหภูมิต่ำ ปรับค่าความถี่ 10 กิโลเฮิร์ตซ์ และอัตราพัลส์ 100 เฮิร์ตซ์ ให้มีอัตราการไหลของแก๊สรวมที่ 0.5 ลิตรต่อนาที โดยให้ปลายปลอกซีเมนต์เคลือบผิวของฟลูออโรเอทิลีนอยู่บริเวณกลางแผ่นเนื้อฟัน ห่างจากแผ่นเนื้อฟัน 2 มิลลิเมตร ฉายพลาสมาเจ็ตความดันบรรยากาศที่อุณหภูมิต่ำร่วมกับแก๊สซีเลียมร้อยละ 98 และออกซิเจนร้อยละ 2 เป็นเวลา 30 วินาที 1 นาที 2 นาที และ 5 นาที ตามกลุ่มทดลอง

กลุ่มทดลองที่ 5: แช่แผ่นเนื้อฟันในโซเดียมไฮโปคลอไรต์ ความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 5 มิลลิตร เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นสะเทินฤทธิ์โซเดียมไฮโปคลอไรต์ โดยทำการแช่แผ่นฟันด้วยโซเดียมไทโอซัลเฟตร้อยละ 5 ปริมาตร 5 มิลลิตร เป็นเวลา 5 นาที ล้างแผ่นเนื้อฟันด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาไลน์ปริมาตร 5 มิลลิตร

การประเมินผลการฆ่าเชื้อของพลาสมาเจ็ตความดันบรรยากาศ

การวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอลชนิดใช้เลเซอร์ในการสแกน (confocal laser scanning microscope: CLSM)

หลังการทำทดสอบนำแผ่นเนื้อฟันย้อมด้วยชุดย้อมเซลล์มีชีวิตชนิดไลฟ์เดดแบคไลต์ (LIVE/DEAD[®] BacLight™ Bacterial Viability Kit: Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) ประกอบด้วยสารละลายซัยโทนาเยน (SYTO-9) ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 20 นาที ตามด้วยสารละลายโพรพิเดียมไอโอดด์ (Propidium Iodide) ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 1 นาที ตามคำแนะนำของบริษัท จากนั้นล้างแผ่นฟันด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาไลน์ปริมาตร 5 มิลลิตร

นำแผ่นเนื้อฟันไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอลชนิดใช้เลเซอร์ในการสแกน (confocal laser scanning microscope: Nikon Digital Eclipse C1 plus, Tokyo, Japan) ที่กำลังขยาย 20 เท่า โดยเซลล์ที่มีชีวิตจะแสดงสีเขียว ในขณะที่เซลล์ที่ไม่มีชีวิตจะแสดงสีแดงหรือสีเหลือง บันทึกภาพโดยการซูม 3 ตำแหน่งต่อแผ่นเนื้อฟัน 1 ชิ้น นำภาพที่ได้มาคำนวณสัดส่วนพื้นที่ของเซลล์ที่ติดสีแดงเทียบกับพื้นที่ของเซลล์ที่ติดสีทั้งหมดในตำแหน่งนั้น ๆ ด้วยโปรแกรมอิมเมจเจ (ImageJ 1.52: National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) จากนั้นวิเคราะห์ความ

แตกต่างกันระหว่างกลุ่มการทดลองในการกำจัดแผ่นชีวภาพของเชื้อเอ็นเทอโรคอกคัสพีคาลิสที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้สถิติการจำแนกความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) และเปรียบเทียบเชิงซ้อนชนิดทูกีย์ (Tukey multiple comparison test) ด้วยโปรแกรมเอสพีเอสเอสเวอร์ชัน 17.0 (SPSS software, SPSS Inc, Chicago, IL, USA)

การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (scanning electron microscope: SEM)

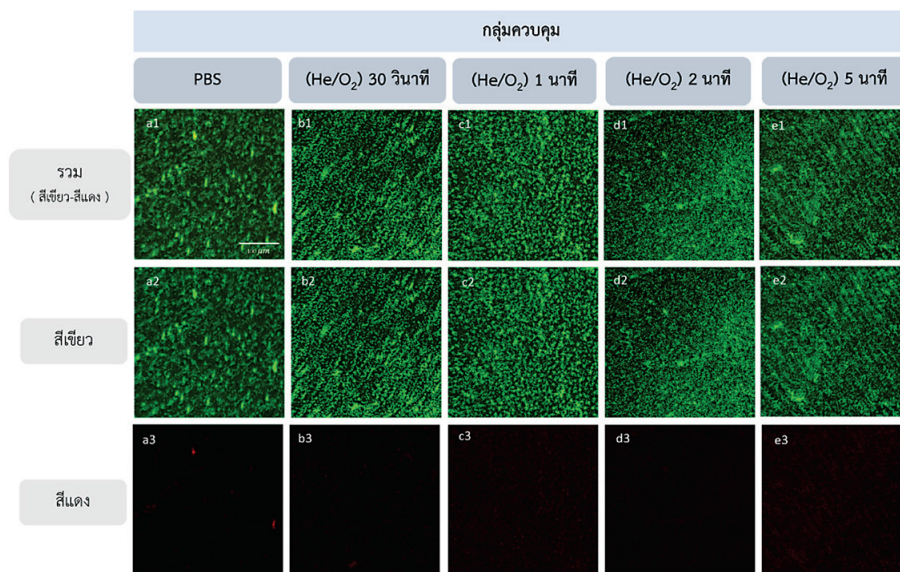
นำแผ่นเนื้อฟันจริงรูปด้วยสารละลายกลูทาราลดีไฮด์ (glutaraldehyde: Merck, Darmstadt, Germany) ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 เป็นเวลา 45 นาที ล้างแผ่นฟันด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์เป็นเวลา 10 นาที ทำ 3 ครั้ง จากนั้นกำจัดน้ำด้วยเอทานอล (ethanol) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 50, 70, 85, 95 และ 100 ตามลำดับ โดยใช้เวลา 10-20 นาทีในแต่ละความเข้มข้น ทำตัวอย่างให้แห้ง (critical point drying; CPD) ฉาบผิวด้วยทอง (gold sputtering) นำไปศึกษาความเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (JSM 6610LV; JEOL Ltd., Tokyo, Japan) บันทึกภาพโดยการซูม 3 ตำแหน่งต่อ 1 ตัวอย่าง ที่กำลังขยาย 3,000 และ 10,000 เท่า ตามลำดับ

ผลการศึกษา

ผลการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอลชนิดใช้เลเซอร์ในการสแกน

ภายหลังการทดสอบ เมื่อนำแผ่นเนื้อฟันที่มีแผ่นชีวภาพของเชื้อเอ็นเทอโรคอกคัสพีคาลิสอายุ 7 วัน ย้อมสีทดสอบความมีชีวิต พบว่ากลุ่มควบคุมในทุกกลุ่มมีการแสดงสีเขียวของสารละลายย้อมสีโทนายน์โดยทั่วแผ่นเนื้อฟัน (รูปที่ 1 a1-e3) ในกลุ่มทดลองที่ 1 ถึง 4 เมื่อผ่านการทดสอบด้วยพลาสมาเจ็ตความดันบรรยากาศที่อุณหภูมิต่ำกว่าร่วมกับฮีเลียมร้อยละ 98 และออกซิเจนร้อยละ 2 ที่เวลา 30 วินาที 1 นาที 2 นาที และ 5 นาที พบว่า มีเซลล์ที่ติดสีแดงหรือเหลือง ซึ่งแสดงถึงเซลล์ที่ไม่มีชีวิตมากขึ้นตามลำดับ รวมถึงมีความหนาแน่นของแผ่นชีวภาพบนแผ่นเนื้อฟันลดลง (รูปที่ 2 f1-k3) ในขณะที่กลุ่มทดลองที่ 5 ทดสอบด้วยการแช่โซเดียมไฮโปคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 5 เป็นเวลา 5 นาที สามารถกำจัดเชื้อและแผ่นชีวภาพได้ (รูปที่ 2 m1-m3)

เมื่อเปรียบเทียบในกลุ่มทดลองที่ 1 ถึง 3 (ตารางที่ 2) พบว่า การทดสอบที่เวลา 30 วินาที 1 นาทีและ 2 นาที มีประสิทธิภาพในการกำจัดแผ่นชีวภาพของเชื้อเอ็นเทอโรคอกคัสพีคาลิสไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) แต่ทั้ง 3 กลุ่มข้างต้นกำจัดเชื้อได้น้อยกว่ากลุ่ม

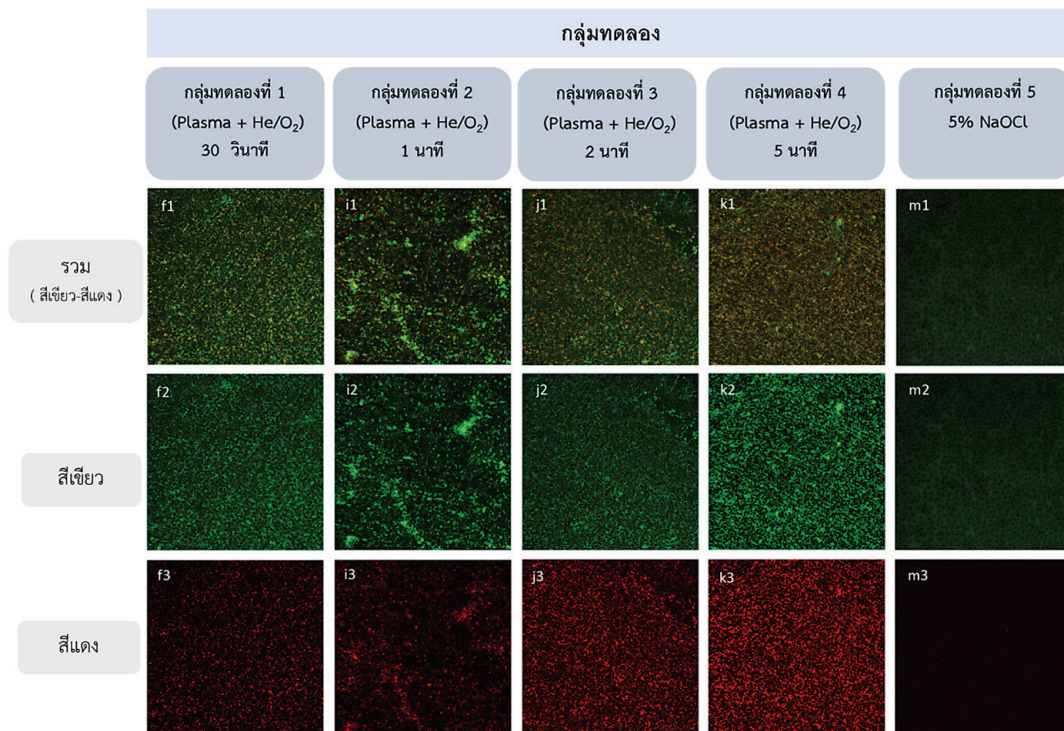


รูปที่ 1 ภาพตัวอย่างจากกล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอลชนิดใช้เลเซอร์ในการสแกนในกลุ่มควบคุมที่กำลังขยาย 20 เท่า
Figure 1 Selected CLSM images from the control group with 20x magnification

ทดลองที่ 4 ซึ่งทดสอบเป็นเวลา 5 นาทีและกลุ่มทดลองที่ 5 ที่ทดสอบด้วยการแช่โซเดียมไฮโปคลอไรต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) อย่างไรก็ตามกลุ่มทดลองที่ 4 มีประสิทธิภาพกำจัดแผ่นชีวภาพของเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัส-ฟีคาลิสได้น้อยกว่ากลุ่มทดลองที่ 5 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ผลการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด

กลุ่มควบคุมพบเชื้อมีรูปร่างสมบูรณ์ปกคลุมอย่างหนาแน่นอยู่ในลักษณะแผ่นชีวภาพทั่วแผ่นเนื้อฟัน (รูปที่ 3 a1,a2,g1-j2) ในกลุ่มทดลองที่ 1 ถึง 4 พบว่าความหนาแน่นของเชื้อบนแผ่นเนื้อฟันลดลงตามลำดับ (รูปที่ 3 b1-f2) โดยที่



รูปที่ 2 ภาพตัวอย่างจากกล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอลชนิดใช้ในเลเซอร์ในการสแกนในกลุ่มทดลองที่กำลังขยาย 20 เท่า

Figure 2 Selected CLSM images from the experimental groups with 20x magnification

ตารางที่ 2 อัตราส่วนเซลล์ไม่มีชีวิต (ค่าเบี่ยงเบน) ในแต่ละกลุ่มการทดลอง

Table 2 Proportion of dead cells (standard deviation) in each experimental group

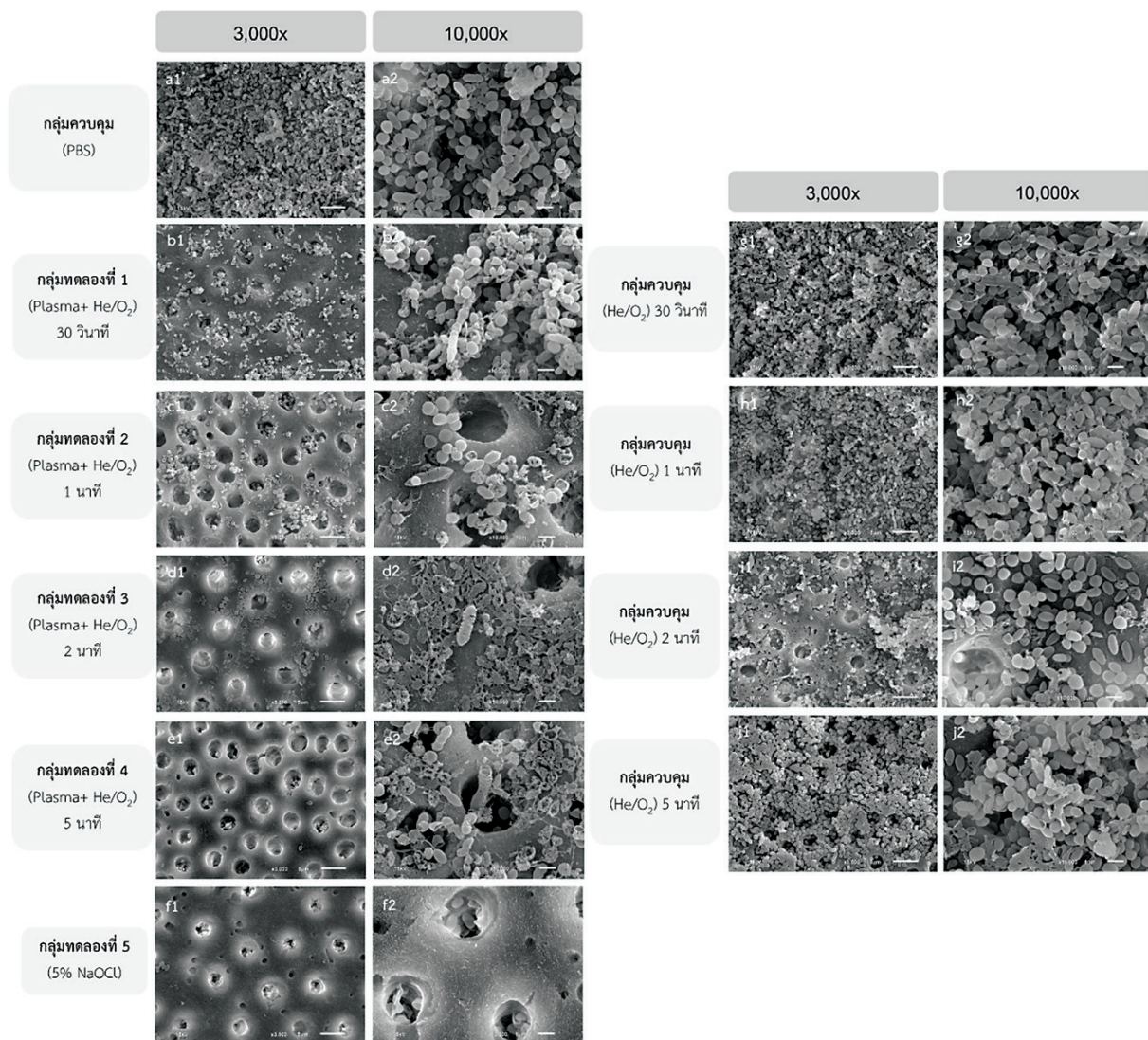
Experimental groups		n	Proportion of dead cells (Standard deviation)
1	Plasma jet; He/O 30 seconds	6	0.65 (0.12) ^a
2	Plasma jet; He/O 1 minute	6	0.61 (0.11) ^a
3	Plasma jet; He/O 2 minute	6	0.63 (0.14) ^a
4	Plasma jet; He/O 5 minute	6	0.78 (0.07) ^b
5	NaOCl	6	0.95 (0.04) ^c

^{a-c} Values with the different letters are statistically significant different ($p < 0.05$)

กำลังขยาย 10,000 เท่าพบลักษณะเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง เช่น การฉีกขาดของผนังเซลล์ มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างโดยมีความยาวเพิ่มขึ้น (รูปที่ 3 b2,c2,d2,e2) นอกจากนี้กลุ่มทดลองที่ 3 และ 4 พบปริมาณเซลล์ที่ผนังเซลล์ฉีกขาดและแตกเป็นเศษเซลล์มากกว่ากลุ่มทดลองที่ 1 และ 2 ในขณะที่กลุ่มทดลองที่ 5 พบว่าพื้นที่ส่วนใหญ่ ปราศจากเชื้อบนแผ่นเนื้อฟัน พบเชื้อเพียงในบริเวณต่อเนื้อฟันบางส่วน (รูปที่ 3 f1,f2)

บทวิจารณ์

เอ็นเทอโรคอคคัสพีคาลิสเป็นแบคทีเรียแกรมบวกสามารถก่อโรคหลายระบบในร่างกาย พบอุบัติการณ์สูงในคลองรากฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาคลองรากฟัน เนื่องจากสามารถสร้างและอาศัยอยู่ในรูปแบบแผ่นชีวภาพ ทำให้มีเมทริกซ์ภายนอกเซลล์ห่อหุ้มช่วยให้มีชีวิตรอดได้ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ปริมาณอาหาร สภาวะการมีออกซิเจนจำกัด ภาวะกรด-ด่างสูง หรืออุณหภูมิสูง และมีการ



รูปที่ 3 ภาพตัวอย่างจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่กำลังขยาย 3,000 เท่าและ 10,000 เท่า
Figure 3 Selected SEM images from the control and experimental groups with 3000x and 10000x magnifications

สื่อสารภายในแผ่นชีวภาพที่เรียกว่าควอรัมเซนซิง (quorum sensing) ทำให้มีศักยภาพในการยึดเกาะกับพื้นผิวเพิ่มขึ้นและต้านทานต่อสารต้านจุลชีพต่างๆ⁽²⁵⁾ นอกจากนี้แผ่นชีวภาพที่มีอายุมากขึ้นจะมีการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพของเซลล์ มีการยึดเกาะกันแน่นขึ้น ส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมภายในแผ่นชีวภาพทำให้ต้านทานต่อการกำจัดด้วยน้ำยาล้างคลองรากฟัน ไม่ว่าจะเป็นไฮโปคลอไรต์หรือคลอโรออกซิเจนไดออกไซด์โดยเฉพาะที่ความเข้มข้นต่ำ^(6,26,27)

ในการใช้งานพลาสมาบรรยากาศที่อุณหภูมิต่ำเพื่อกำจัดเชื้อแบคทีเรีย ปฏิกริยาของพลาสมาจะก่อให้เกิดประจุบวกประจุลบ อนุภาคนิวตรอน อะตอมที่อยู่ในภาวะเร้า (excited atom) และรังสีอัลตราไวโอเล็ต (ultraviolet radiation; UV) โดยจากการศึกษาของ Deng และคณะ⁽²⁸⁾ พบว่าเมื่อใช้ฮีเลียมร้อยละ 98 ร่วมกับออกซิเจนร้อยละ 2 เป็นแก๊สทำงาน (working gas) จะเกิดอนุพันธ์ออกซิเจนที่ว่องไว (reactive oxygen species; ROS) อาทิ อะตอมของออกซิเจน (O) ออกซิเจนโมเลกุลเดี่ยว (1O_2) อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ (O_2^-) และโอโซน (O_3) โดยฮีเลียมและออกซิเจนที่อัตราส่วนนี้สามารถกำจัดเชื้อแบคทีเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพที่สุด นอกจากนี้ในภาวะที่มีความชื้น สามารถเกิดอนุมูลไฮดรอกซิล (OH^-) และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ได้เช่นกัน⁽²⁹⁾ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้ฮีเลียมร้อยละ 98 ร่วมกับออกซิเจนร้อยละ 2 เป็นแก๊สทำงาน โดยคาดว่าผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ที่เกิดขึ้นคืออนุพันธ์ออกซิเจนที่ว่องไว ซึ่งอาจเกิดอนุมูลไฮดรอกซิลและไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ร่วมด้วยเนื่องจากแผ่นเนื้อฟันอยู่ในสภาวะชื้นจากการล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ก่อนทำการทดสอบ

ผลการศึกษานี้พบว่าแผ่นเนื้อฟันที่มีแผ่นชีวภาพของเชื้อเอ็นเทอโรคอกคัสพีคาลิสอายุ 7 วัน ยังคงเหลืออยู่ในทุกกลุ่มตัวอย่างที่มีการฉายพลาสมาเจ็ตความดันบรรยากาศ นอกจากนี้ยังพบมีการหลุดของแผ่นชีวภาพออกจากแผ่นเนื้อฟัน คาดว่าเป็นผลจากอนุพันธ์ออกซิเจนที่ว่องไวที่เกิดจากพลาสมา ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเยื่อหุ้มเซลล์ ทำลายองค์ประกอบเซลล์ ลดอัตราเมตาบอลิซึมของเซลล์ ทำลายเมทริกซ์ภายนอกเซลล์โดยอนุพันธ์ออกซิเจนที่ว่องไวจะทำลายสารพันธุกรรมที่อยู่นอกโครโมโซม (extrachromosomal DNA) และพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเมทริกซ์ภายนอกเซลล์ได้^(30,31) นอกจากนี้

ยังอาจมีผลต่อองค์ประกอบภายในควอรัมเซนซิง ไม่ว่าจะเป็นเจลาติเนส (gelatinase) และเซรีนโปรตีเอส (serine protease) ซึ่งเป็นส่วนสำคัญช่วยในการพัฒนาการยึดติดของแผ่นชีวภาพและควบคุมการแตกของเซลล์⁽³²⁾ นอกจากนี้อนุภาคมีประจุเหล่านี้เมื่อสะสมอยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียจะเกิดแรงไฟฟ้าสถิตย์ อาจนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงรูปร่างและเกิดเซลล์แตกได้⁽³⁰⁾ ในช่วงเวลาที่ผ่านมามีหลายการศึกษาที่พบว่าพลาสมาเจ็ตสามารถทำลายแผ่นชีวภาพของเชื้อเอ็นเทอโรคอกคัสพีคาลิสได้เช่นเดียวกัน^(17,21,33,34)

จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นพลาสมาเจ็ตความดันบรรยากาศที่เวลา 5 นาทีมีประสิทธิภาพในการกำจัดแผ่นชีวภาพของเชื้อเอ็นเทอโรคอกคัสพีคาลิสบนแผ่นเนื้อฟันเหนือกว่าที่เวลา 30 วินาที 1 นาที และ 2 นาที ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Du และคณะ⁽²¹⁾ และ Pei และคณะ⁽³⁵⁾ ที่มีการใช้พลาสมาร่วมกับฮีเลียมและออกซิเจนในการทดสอบกำจัดแผ่นชีวภาพของเอ็นเทอโรคอกคัสพีคาลิสอายุ 7 วันบนแผ่นกระจกปิดสไลด์ (cover slip) ประเมินผลด้วยกล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอลชนิดใช้เลเซอร์ในการสแกน พบว่าที่เวลา 5 นาทีพลาสมาสามารถกำจัดเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาด้วยไฮโปคลอไรต์ พบว่าพลาสมาเจ็ตความดันบรรยากาศที่เวลา 5 นาทีมีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อดีกว่าไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 5 ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Jiang และคณะ⁽¹⁷⁾ ที่ทดสอบพลาสมาเจ็ตความดันบรรยากาศที่เวลา 5 นาทีบนแผ่นไฮดรอกซีอะพาไทต์ (hydroxyapatite disc) พบว่าสามารถกำจัดแผ่นชีวภาพของเอ็นเทอโรคอกคัสพีคาลิสที่มีอายุ 6 วันได้มากกว่าไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 5.25 อาจเนื่องมาจากการศึกษาดังกล่าวมีการวัดผลการทดสอบด้วยการเพาะเชื้อ ซึ่งเชื้อเอ็นเทอโรคอกคัสพีคาลิสสามารถเข้าสู่สภาวะจำศีล (viable but non-culturable cells; VBNC) เมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม จุลชีพ จะหยุดการเจริญเติบโตชั่วคราว ไม่สามารถสร้างโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ แต่ยังคงมีปัจจัยก่อโรครออยู่ เมื่อเข้าสู่สภาวะจำศีลมีการเปลี่ยนแปลงการเผาผลาญน้ำตาลและคาร์โบไฮเดรต มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างพื้นฐาน โดยขยายขนาดใหญ่ขึ้น ไฮโทพลาซึม หดตัว แต่เยื่อหุ้มเซลล์จะยังคงอยู่ในสภาพเดิม ทำให้มีรูปร่างผิดปกติ แม้ความสามารถในการยึดติดลดลงและไม่สามารถเข้าไปในท่อเนื้อฟันได้ แต่ยังคง

สามารถจับกับคอลลาเจนชนิดที่ 1 (collagen type I) และเนื้อฟันได้⁽³⁶⁾ นอกจากนี้ภาวะความไม่สมดุลระหว่างอนุโมลิสระที่เกิดจากการใช้พลาสมาเจ็ดความดันบรรยากาศที่อุณหภูมิต่ำสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะจำศีลได้เช่นเดียวกัน⁽³⁰⁾

ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดแสดงให้เห็นถึงเซลล์ที่มีรูปร่างผิดปกติและมีการขยายขนาด (รูปที่ 3 b2,c2,d2,e2) หลังการทดสอบพลาสมาเจ็ดความดันบรรยากาศที่ทุกช่วงเวลา อาจเป็นไปได้ว่าเอ็นเทอโรคอกคัสพีคาลิสเข้าสู่สภาวะจำศีล อย่างไรก็ตามการใช้ชุดย้อมเซลล์มีชีวิตชนิดไลฟ์เดคแบคไลด์ ซึ่งประกอบไปด้วยสารละลายซัยโทนายน์ที่สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปเกาะติดสารพันธุกรรมของจุลชีพและสารละลายโทรฟิเดียมไอโอดิดที่มีสีแดงนั้นจะไม่สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ที่สมบูรณ์ได้ จึงติดเฉพาะสารพันธุกรรมของเซลล์ตายที่มีการฉีกขาดของเยื่อหุ้มเซลล์ ดังนั้นเซลล์ที่มีชีวิตจะติดสีเขียวของสารละลายซัยโทนายน์ ส่วนเซลล์ที่ตายจึงสามารถติดสีได้ทั้ง 2 สี อาจทำให้เห็นเป็นสีส้มหรือเหลือง อย่างไรก็ตามจุลชีพที่อยู่ในภาวะจำศีลเยื่อหุ้มเซลล์จะไม่มีการฉีกขาดเนื่องจากยังมีชีวิตจึงสามารถติดสีเขียวได้แม้มีรูปร่างที่ผิดปกติ ดังนั้นการทดสอบโดยการใช้ชุดย้อมเซลล์มีชีวิตร่วมกับกล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอลชนิดใช้เลเซอร์ ในการสแกนในการทดลองนี้สามารถให้ผลการทดสอบที่เที่ยงตรงกว่าวิธีการเพาะเชื้อ สอดคล้องกับการศึกษาในไบโอฟิล์มที่พบว่าในภาวะจำศีล การใช้การใช้ชุดย้อมเซลล์มีชีวิตสามารถทดสอบความมีชีวิตของจุลชีพได้แม่นยำว่าการเพาะเชื้อ^(37,38)

บทสรุป

ภายใต้ข้อจำกัดของงานวิจัยนี้ พลาสมาเจ็ดความดันบรรยากาศที่อุณหภูมิต่ำสามารถกำจัดแผ่นชีวภาพของเชื้อเอ็นเทอโรคอกคัสพีคาลิสบนแผ่นเนื้อฟันได้ โดยมีประสิทธิภาพดีที่สุดที่เวลา 5 นาที อย่างไรก็ตามเทคโนโลยีนี้ไม่สามารถกำจัดแผ่นชีวภาพได้อย่างสมบูรณ์ ในทางคลินิกสามารถพัฒนาโครงสร้างของอุปกรณ์ให้มีขนาดเหมาะสมเพื่อนำไปใช้เป็นอุปกรณ์เสริมในการกำจัดเชื้อเพิ่มเติมจากขั้นตอนมาตรฐาน อย่างไรก็ตามพลาสมาเจ็ดความดันบรรยากาศที่อุณหภูมิต่ำมีความปลอดภัยในการใช้งานจึงอาจมีการศึกษาต่อไปเพื่อพัฒนาให้มีประสิทธิภาพเหมาะสมสำหรับเป็นอุปกรณ์หลักในการกำจัดเชื้อในงานรักษาคอลงรากฟัน

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับทุนสนับสนุนจากคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ขอขอบคุณ ดร.เพ็ญพิชชาวนจันทร์รักษ์ ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับแนวทางการดำเนินการทดลอง รวมถึงอำนวยความสะดวกและให้ความช่วยเหลือในศูนย์วิจัย ขอขอบคุณศูนย์วิจัยทางทันตแพทยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ที่สนับสนุนเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965; 20: 340-349.
2. Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. *J Endod* 1992; 18(9): 427-430.
3. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 85(1): 86-93.
4. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod* 2006; 32(2): 93-98.
5. Neelakantan P, Romero M, Vera J, et al. Biofilms in endodontics-current status and future directions. *Int J Mol Sci* 2017; 18: 8.
6. Clegg MS, Vertucci FJ, Walker C, Belanger M, Britto LR. The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms in vitro. *J Endod* 2006; 32(5): 434-437.

7. American Association of Endodontists. Winter 2011 Endodontics: colleagues for excellence newsletter: root canal irrigants and disinfectants. Available from: <https://f3f142zs0k2w1kg84k5p9i1o-wpengine.netdna-ssl.com/specialty/wp-content/uploads/sites/2/2017/07/rootcanalirrigantsdisinfectants.pdf>
8. Abraham S, Raj J, Venugopal M. Endodontic irrigants: a comprehensive review. *J Pharm Sci Res* 2015; 7(1): 5-9.
9. Meire MA, Coenye T, Nelis HJ, de Moor RJ. Evaluation of Nd:YAG and Er:YAG irradiation, antibacterial photodynamic therapy and sodium hypochlorite treatment on *Enterococcus faecalis* biofilms. *Int Endod J* 2012; 45(5): 482-491.
10. Dai S, Xiao G, Dong N, Liu F, He S, Guo Q. Bactericidal effect of a diode laser on *Enterococcus faecalis* in human primary teeth an *In Vitro* study. *BMC oral health* 2018; 18(1): 154.
11. Janani M, Jafari F, Samiei M, et al. Evaluation of antibacterial efficacy of photodynamic therapy vs. 2.5% NaOCl against *E. faecalis*-infected root canals using real-time PCR technique. *J Clin Exp Dent* 2017; 9(4): 539-544.
12. Laroussi M, Akan T. Arc-free atmospheric pressure cold plasma jets: a review. *Plasma Process Polym* 2007; 4(9): 777-788.
13. Sarkar A, Pal D, Sarkar S. Cold atmospheric plasma-future of dentistry. *J Dent Med Sci* 2018; 17(8): 15-20.
14. Danil D, Gregory F, Gary F, Alexander F. Physical and biological mechanisms of direct plasma interaction with living tissue. *New J Phys* 2009; 11(11): 1-27.
15. Yaopromsiri C, Yu LD, Sarapirom S, Thopan P, Boonyawan D. Effect of cold atmospheric pressure He-plasma jet on DNA change and mutation. *Nucl Instrum Methods Phys Res B* 2015; 365: 399-403.
16. Laroussi M. Sterilization of contaminated matter with an atmospheric pressure plasma. *IEEE Trans Plasma Sci* 1996; 24(3): 1188-1191.
17. Jiang C, Schaudinn C, Jaramillo DE, Webster P, Costerton JW. *In Vitro* Antimicrobial effect of a cold plasma jet against *Enterococcus faecalis* biofilms. *ISRN dentistry* 2012;2012:295736.
18. Li Y, Sun K, Ye G, et al. Evaluation of cold plasma treatment and safety in disinfecting 3-week root canal *Enterococcus faecalis* biofilm *in vitro*. *J Endod* 2015; 41(8): 1325-1330.
19. Jiang C, Chen MT, Gorur A, et al. Nanosecond pulsed plasma dental probe. *Plasma Process Polym* 2009; 6(8): 479-483.
20. Cao Y, Yang P, Lu X, et al. Efficacy of atmospheric pressure plasma as an antibacterial agent against *Enterococcus Faecalis in vitro*. *Plasma Sci Technol* 2011; 13(1): 93-98.
21. Du T, Ma J, Yang P, Xiong Z, Lu X, Cao Y. Evaluation of antibacterial effects by atmospheric pressure nonequilibrium plasmas against *Enterococcus faecalis* biofilms *in vitro*. *J Endod* 2012; 38(4): 545-549.
22. Herbst SR, Hertel M, Ballout H, et al. Bactericidal efficacy of cold plasma at different depths of infected root canals *in vitro*. *Open Dent J* 2015; 9: 486-491.
23. Lu X, Ye T, Cao Y, et al. The roles of the various plasma agents in the inactivation of bacteria. *J Appl Phys* 2008; 104(5): 053309.

24. Lu X, Cao Y, Yang P, et al. An RC plasma device for sterilization of root canal of teeth. *IEEE Plasma Sci* 2009; 37(5): 668-673.
25. Jhahharia K, Parolia A, Shetty KV, Mehta LK. Biofilm in endodontics: a review. *J Int Soc Prev Commun Dent* 2015; 5(1): 1-12.
26. Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL. Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. *J Endod* 2006; 32(6): 527-531.
27. Forough RM, Rezagholizadeh Y, Narimani MR, et al. Antibacterial effect of different concentrations of sodium hypochlorite on *Enterococcus faecalis* biofilms in root canals. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects* 2017; 11(4): 215-221.
28. Deng G, Jin Q, Yin S, Zheng C, Liu Z, Yan K. Experimental study on bacteria disinfection using a pulsed cold plasma jet with helium/oxygen mixed gas. *Plasma Sci Technol* 2018; 20(11): 1-8.
29. Scholtz V, Pazlarova J, Souskova H, Khun J, Julak J. Nonthermal plasma-a tool for decontamination and disinfection. *Biotechnol Adv* 2015; 33(6): 1108-1119.
30. Gilmore BF, Flynn PB, O'Brien S, Hickok N, Freeman T, Bourke P. Cold plasmas for biofilm control: opportunities and challenges. *Trends Biotechnol* 2018; 36(6): 627-638.
31. Bourke P, Ziuzina D, Han L, Cullen PJ, Gilmore BF. Microbiological interactions with cold plasma. *J Appl Microbiol* 2017 ;123(2): 308-324.
32. Ali L, Goraya MU, Arafat Y, Ajmal M, Chen JL, Yu D. Molecular mechanism of quorum-sensing in *Enterococcus faecalis*: its role in virulence and therapeutic approaches. *Int J Mol Sci* 2017; 18: 5.
33. Ureyen KB, Kececi AD, Guldas HE, et al. Efficacy of endodontic applications of ozone and low-temperature atmospheric pressure plasma on root canals infected with *Enterococcus faecalis*. *Lett Appl Microbiol* 2014; 58(1): 8-15.
34. Armand A, Khani M, Asnaashari M, AliAhmadi A, Shokri B. Comparison study of root canal disinfection by cold plasma jet and photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2019; 26: 327-333.
35. Pei X, Lu X, Liu J, et al. Inactivation of a 25.5 μm *Enterococcus faecalis* biofilm by a room-temperature, battery-operated, handheld air plasma jet. *J Phys D: Appl Phys* 2012; 45(16): 165205.
36. E J, Jiang YT, Yan PF, Liang JP. Biological changes of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state. *Genet Mol Res* 2015; 14(4): 14790-14801.
37. Rosen E, Tsesis I, Elbahary S, Storzi N, Kolodkin-Gal I. Eradication of *Enterococcus faecalis* biofilms on human dentin. *Front Microbiol* 2016; 7: 2055.
38. Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M. Bacterial viability in starved and revitalized biofilms: comparison of viability staining and direct culture. *J Endod* 2010; 36(11): 1820-1823.