การสร้างรอยผุบนเนื้อฟันมนุษย์จากแบบจำลองด้วยเชื้อก่อโรคในห้องปฏิบัติการ
An *in vitro* microbial model to create caries-like lesions on human dentin

ศุทธินี วิริยะสืบพงศ์[1], **รัชฎา ฉายจิต**[2], **ปรดา เพชรสุก**[3] **และจันทร์ธิดา ภวภูตานนท์ ณ มหาสารคาม**[4]
[1]ภาควิชาทันตกรรมบูรณะ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
โทรศัพท์ 086-6517277 e-mail: suthinee_wi@kkumail.com
[2]ภาควิชาทันตกรรมชุมชน คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น e-mail: rajnoi@kku.ac.th
[3]หน่วยห้องปฏิบัติการวิจัย ฝ่ายวิจัย บัณฑิตศึกษาและวิเทศสัมพันธ์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
e-mail: poraph@kku.ac.th
[4]ภาควิชาทันตกรรมบูรณะ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
โทรศัพท์ 089-8461077 e-mail: chantpa@kku.ac.th

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาแบบจำลองการสร้างรอยผุสำหรับใช้ประโยชน์ในงานวิจัยทางทันตกรรม ด้วยเชื้อก่อโรค 2 สายพันธุ์ คือ *สเตร็ปโตค็อคคัส มิวแทนส์* และ*แลคโตบาซิลลัส อะซิโดฟิลลัส* ให้เจริญเติบโตร่วมกันบนชิ้นเนื้อฟันจำนวน 4 ชิ้น เป็นระยะเวลา 1 3 และ 5 วัน โดยมีชิ้นเนื้อฟันปกติเป็นกลุ่มควบคุม เลี้ยงในอาหารชนิดเหลว De man Rogosa and Sharpe (MRS) ร่วมกับซูโครสร้อยละ 5 บ่มด้วยอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 จากนั้นสังเกตลักษณะไบโอฟิล์ม วัดความลึกของ รอยผุและวิเคราะห์ปริมาณแร่ธาตุ โดยการทดลองจะถูกทำซ้ำ 3 ครั้ง พบความลึกของรอยผุ 51 143 และ 186 ไมโครเมตร ในวันที่ 1 3 และ 5 ตามลำดับ เริ่มพบไบโอฟิล์มได้ตั้งแต่วันแรกของการแช่ในสารละลายแบคทีเรีย โดยจะมีปริมาณมากขึ้นและหนาขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป อัตราส่วนระหว่างแคลเซียมต่อฟอสฟอรัส คือ 1.69 1.30 และ 0.84 ในวันที่ 1 3 และ 5 ตามลำดับ ซึ่งทุกกลุ่มมีค่าน้อยกว่ากลุ่มควบคุม ดังนั้นผลการศึกษาจากแบบจำลองด้วยเชื้อก่อโรคนี้จึงสามารถสร้างรอยผุบนชิ้นเนื้อฟันมนุษย์ได้ และนำไปประยุกต์ใช้ในงานวิจัยทางทันตกรรมต่อไป

คำสำคัญ: รอยผุจำลอง, แบบจำลองด้วยเชื้อก่อโรค, ไบโอฟิล์ม

Abstract

This study aimed to develop a microbial model to create caries-like lesions to be used in dental research. Two common cariogenic bacteria *(S. mutans* and *L. acidophilus)* were co-cultured and grown on four human dentin slices for 1, 3, 5 days and sound dentin slices were used for control. The bacteria were cultured in a sterile De Man Rogosa and Sharpe (MRS) broth with 5 % sucrose, incubated at 37° c in an atmosphere of 5 % CO_2. After the experimental periods, lesion depth, biofilm appearance and mineral content were determined. This experiment was repeated three times. Caries-like lesions depth were found 51, 143 and 186 µm on day 1, 3 and 5, respectively. Biofilm was found on the first day, it was increased by both number and thickness over time. Ca/P ratio was 1.69, 1.30 and 0.84 in day 1, 3 and 5, respectively. Ca/P ratio of all periods were lower when compared with the control group. This microbial model has developed caries-like lesions on dentin and can be used for future research.

Keywords: caries-like lesion, microbial model, biofilm

1. บทนำ

ฟันผุเกิดจากการเสียสมดุลระหว่างการสูญเสียแร่ธาตุ (demineralization) และการคืนกลับแร่ธาตุ (remineralization) ซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรียก่อโรค (cariogenic bacteria) หมักอาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรต (fermentable diet carbohydrate) บนพื้นผิวฟัน (tooth surface) ในระยะเวลาหนึ่ง (time) (Featherstone, J. D. B., 2008) ทำให้เกิดกรดซึ่งเป็นผลจากกระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรตของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ทำให้แร่ธาตุที่เป็นองค์ประกอบหลักของฟัน เช่น แคลเซียม และฟอสฟอรัส ละลายตัว จนทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของสีและลักษณะของผิวเคลือบฟัน เมื่อลุกลามถึงชั้นเนื้อฟันจะมีการแตกสลาย ของคอลลาเจน (collagen degradation) ทำให้ฟันผุเป็นโพรง และเนื้อฟันมีลักษณะอ่อนนิ่ม (Young, D. A.et al., 2015)

การเหนี่ยวนำให้เกิดรอยโรคฟันผุในห้องปฏิบัติการ เป็นแบบจำลองที่ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา และกลไกการดำเนินของรอยโรคฟันผุ (Cavalcanti et al., 2014; Marsh, 1995) แบบจำลองทางเคมีโดยการใช้สารละลายเพื่อทำให้เกิดการสูญเสียแร่ธาตุ ถูกนำมาใช้เพื่อเลียนแบบการเกิดรอยผุ ซึ่งทำได้ง่าย ค่าใช้จ่ายต่ำ ประหยัดเวลา สามารถทำซ้ำได้ และให้ผลการทดลองที่เสถียร (Ferreira et al., 2007; Gomez et al., 2014) แต่ไม่สามารถเลียนแบบด้านจุลชีววิทยาของการสร้างฟันผุ (Yu, O. Y. et al., 2017) และสภาพแวดล้อมที่ซับซ้อนในช่องปากได้ ในขณะที่การเหนี่ยวนำให้เกิดรอยผุด้วยแบบจำลองที่ใช้ไบโอฟิล์มจากเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเป็นแบบจำลองที่เลียนแบบสภาพแวดล้อมในช่องปากได้ดี อีกทั้งยังสามารถจำลองลักษณะฟันผุได้ใกล้เคียงกับเนื้อฟันผุจริง (Arthur et al., 2013; Cavalcanti et al., 2014; Marsh, 1995; Steiner-Oliveira et al., 2007)

เชื้อ*สเตร็ปโตค็อคคัส มิวแทนส์* และเชื้อ*แลคโตบาซิลลัส อะซิโดฟิลลัส* มีความสำคัญในการก่อให้เกิดโรคฟันผุ โดย*สเตร็ปโตค็อคคัส มิวแทนส์* เป็นเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแรกที่เข้ามายึดเกาะบนพื้นผิวเนื้อฟัน และทำให้เกิดการดำเนินของรอยโรคฟันผุ (Kleinberg, I., 2002, p. 108-125) สภาพแวดล้อมที่เป็นกรดจากกระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรตของเชื้อ*สเตร็ปโตค็อคคัส มิวแทนส์* จะเหมาะกับการเจริญเติบโตและการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อกลุ่ม*แลคโตบาซิลลัส* (Wen, Z. T. et al., 2010, p. 111) หลายการศึกษาจึงเลือกใช้แบบจำลองด้วยเชื้อก่อโรค 2 สายพันธุ์ เนื่องจากทำให้เกิดการสร้างไบโอฟิล์มที่เกาะแน่น และสามารถศึกษาระบบนิเวศ (ecosystems) ของเชื้อที่ซับซ้อนมากกว่าได้ (Chu, C. H., 2000)

ในปัจจุบันได้มีการใช้แบบจำลองรอยโรคฟันผุด้วยเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในห้องปฏิบัติการมากขึ้น แต่ยังมีข้อสงสัยในเรื่องความสัมพันธ์ของระยะเวลาที่ใช้กับลักษณะของไบโอฟิล์ม ความลึกของรอยโรคที่เกิดขึ้น รวมถึงปริมาณแร่ธาตุของเนื้อฟันผุ เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อฟันปกติ จึงเป็นที่มาของการศึกษานี้ ซึ่งมีวัตถุประสงค์ในการสร้างรอยผุจำลองให้ใกล้เคียงกับรอยผุในช่องปาก และนำไปใช้ในงานวิจัยทางทันตกรรมอื่น ๆ ต่อไปในอนาคตได้

2. วัตถุประสงค์การวิจัย

ศึกษาลักษณะไบโอฟิล์ม ความลึกของรอยผุ และองค์ประกอบแร่ธาตุบริเวณพื้นผิวเนื้อฟันผุ จากแบบจำลองด้วยเชื้อก่อโรคในห้องปฏิบัติการในระยะเวลาที่แตกต่างกัน

3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเตรียมชิ้นฟันตัวอย่าง

3.1.1 การเตรียมชิ้นฟัน

ใช้ฟันกรามแท้ซี่ที่ 3 ของมนุษย์ที่ถูกถอน จำนวน 12 ซี่ โดยไม่มีพยาธิสภาพใด ๆ เก็บในสารละลายไทมอล ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 นำฟันมายึดกับท่อโพลีไวนิลคลอไรด์ด้วยเรซินชนิดบ่มด้วยตัวเอง จากนั้นใช้เครื่องตัดฟันตัดด้านบดเคี้ยวของฟันในตำแหน่ง 1/3 ในส่วนกลางฟัน จนได้ชิ้นฟันหนา 2 มม. นำชิ้นฟันที่ได้มาเคลือบด้วยน้ำยาทาเล็บเพียงครึ่งหนึ่งเพื่อใช้เป็นการควบคุมภายใน (internal control) ของแต่ละชิ้น แล้วนำไปอบก๊าซเอธิลีนออกไซด์ เป็นเวลา 16 ชม. เพื่อทำให้ปลอดเชื้อ

การศึกษานี้ผ่านการขอยกเว้นการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์มหาวิทยาลัยขอนแก่น หมายเลขสำคัญประจำโครงการ คือ HE622115

3.1.2 การเตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรียสำหรับการเหนี่ยวนำให้เกิดรอยผุ (Mei, M. L. et al., 2013; Shu, M., 2000; Nunpan, S. et al., 2017)

3.1.2.1 นำเชื้อ*สเตร็ปโตค็อคคัส มิวแทนส์* (ATCC 25175) ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นำมาอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นำไปเลี้ยงต่อในอาหารวุ้นสำหรับเลี้ยงเชื้อชนิด brain heart infusion (BHI) ในตู้อบที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชม.

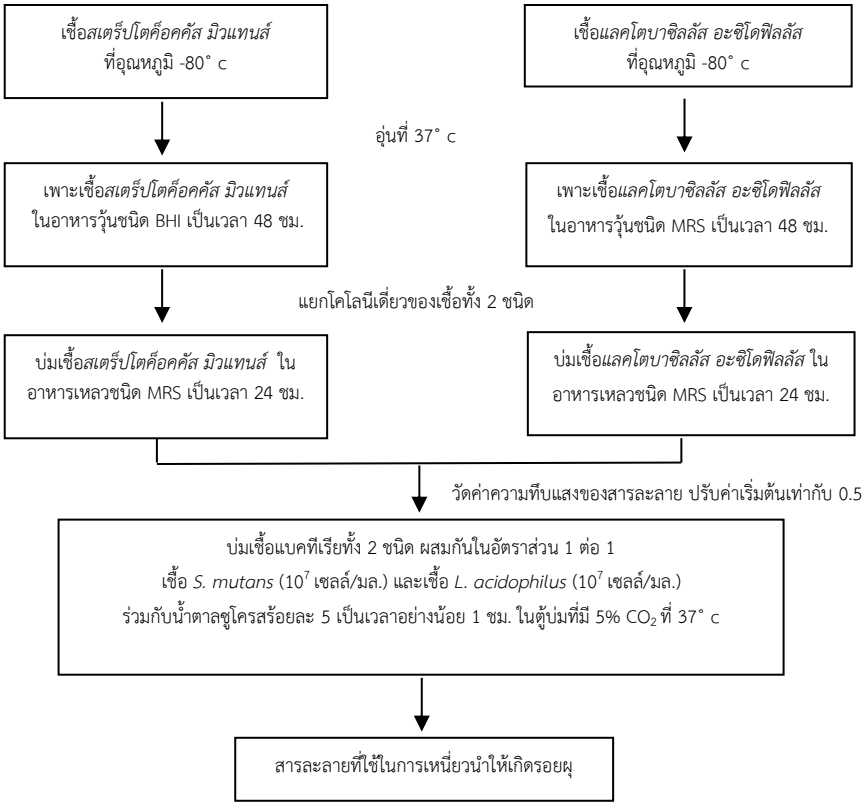
3.1.2.2 นำเชื้อ*แลคโตบาซิลลัส อะซิโดฟิลลัส* (ATCC 4356) ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นำมาอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นำไปเลี้ยงต่อในอาหารวุ้นสำหรับเลี้ยงเชื้อชนิด MRS ในตู้อบที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชม.

3.1.2.3 นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อทั้งสองชนิดมาแยกใส่หลอดเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อชนิด MRS ปริมาณหลอดละ 5 มล. แล้วนำเข้าตู้อบเลี้ยงเชื้อที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม.

3.1.2.4 นำเชื้อแต่ละชนิดที่อยู่ในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อมาวัดค่าความทึบแสงของสารละลาย (optical density) ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer; BECKMAN COULTER®, U.S.A.) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เพื่อใช้ในการนับปริมาณเชื้อที่ต้องการ สายพันธุ์ละ 10^7 เซลล์/มิลลิลิตร เทียบเท่ากับค่าความทึบแสงของสารละลาย 0.5

3.1.2.5 นำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดที่ทราบปริมาณเชื้อที่แน่นอน มาผสมด้วยกันในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ร่วมกับน้ำตาลซูโครสร้อยละ 5 และเลี้ยงในตู้อบที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชม. จะได้สารละลายที่ใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดรอยโรคฟันผุโดยเชื้อ*สเตร็ปโตค็อคคัส มิวแทนส์* และเชื้อ*แลคโตบาซิลลัส อะซิโดฟิลลัส* ในห้องปฏิบัติการ ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างประมาณ 5.2 (รูปที่ 1)

3.1.2.6 แบ่งสารละลายเชื้อแบคทีเรียใส่ถาดหลุมขนาด 12 หลุม (12 well-plate) ปริมาณหลุมละ 1 มล. เพื่อใช้สำหรับแช่ชิ้นฟันทั้ง 3 กลุ่มการทดลอง



รูปที่ 1 ขั้นตอนการเตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรีย

3.2 การเหนี่ยวนำให้เกิดรอยผุจำลอง

นำชิ้นฟันที่ได้จากข้อ 3.1.1 มาแบ่งเป็น 4 กลุ่ม (กลุ่มละ 1 ชิ้น) ได้แก่

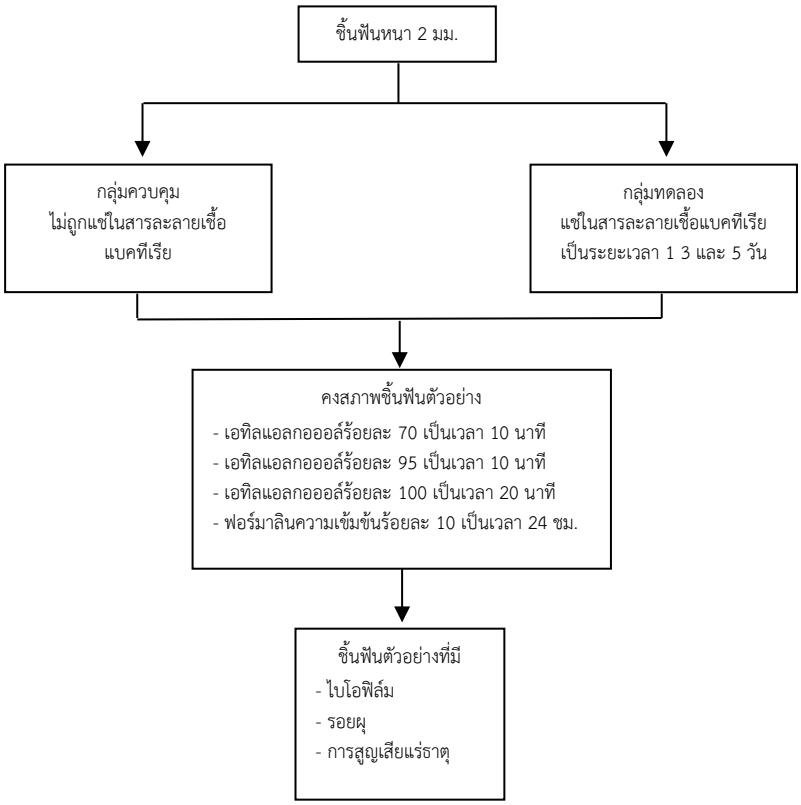
กลุ่มที่ 1 แช่ชิ้นฟันในสารละลายเชื้อแบคทีเรียร่วมกับน้ำตาลซูโครสร้อยละ 5 ในถาดหลุมปริมาณ 1 มล. บ่มในตู้อบที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน วัดค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยเครื่องวัดค่ากรด-ด่าง (pH-meter ; LAQUATWIN pH-33, HORIBA, Japan) โดยหยดสารละลายเชื้อแบคทีเรียปริมาณ 100 ไมโครลิตรลงบนเครื่อง แล้วบันทึกค่าจากตัวเลขดิจิตอลที่แสดง

กลุ่มที่ 2 แช่ชิ้นฟันในสารละลายเชื้อแบคทีเรียร่วมกับน้ำตาลซูโครสร้อยละ 5 ในถาดหลุมปริมาณ 1 มล. บ่มในตู้อบที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน โดยวัดค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยเครื่องวัดค่ากรด-ด่าง เช่นเดียวกับกลุ่มที่ 1 ก่อนเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุกวัน

กลุ่มที่ 3 แช่ชิ้นฟันในสารละลายเชื้อแบคทีเรียร่วมกับน้ำตาลซูโครสร้อยละ 5 ในถาดหลุมปริมาณ 1 มล. บ่มในตู้อบที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน โดยวัดค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยเครื่องวัดค่ากรด-ด่าง เช่นเดียวกับกลุ่มที่ 1 ก่อนเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุกวัน

กลุ่มที่ 4 ชิ้นฟันที่ไม่ได้แช่ในสารละลายเชื้อแบคทีเรียเป็นกลุ่มควบคุม

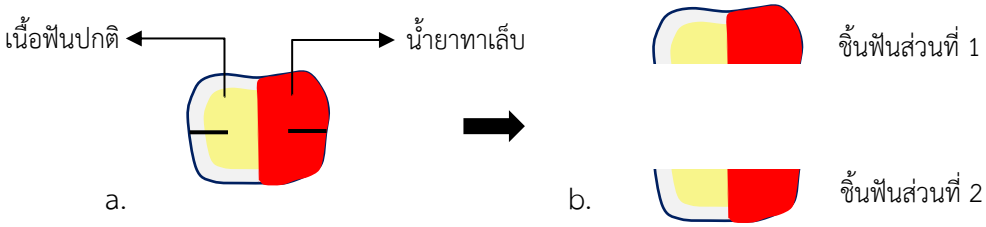
นำชิ้นฟันตัวอย่างทุกกลุ่มที่ได้มาทำให้แห้งด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 70 เป็นเวลา 10 นาที เอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 เป็นเวลา 10 นาที และเอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 100 เป็นเวลา 20 นาที ตามลำดับ จากนั้นคงสภาพชิ้นฟันตัวอย่างในฟอร์มาลินความเข้มข้นร้อยละ 10 เป็นเวลา 24 ชม. เพื่อให้ไบโอฟิล์มมีลักษณะคงตัวก่อนนำไปทดสอบ (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 ขั้นตอนการเหนี่ยวนำให้เกิดรอยโรคฟันผุ

3.3 การวัดผล

นำชิ้นฟันตัวอย่างมาตอกแบ่งตามรอยบากในแนวขวางกับส่วนที่ทาน้ำยาทาเล็บ ออกเป็น 2 ส่วน จากนั้นนำไปแยกทดสอบดังนี้ (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 การเตรียมชิ้นฟันตัวอย่างสำหรับการทดสอบ (a.) ชิ้นฟันตัวอย่าง; (b.) ชิ้นฟันตัวอย่างที่ถูกตัดแบ่งครึ่ง

3.3.1 การศึกษาลักษณะของไบโอฟิล์ม (biofilm appearance)

นำชิ้นฟันตัวอย่างส่วนที่ 1 ของทุกกลุ่มการทดลองมาเคลือบด้วยทอง และส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscopy ; Hitachi S3000N, Osaka, Japan) ที่กำลังขยาย 500 และ 4000 เท่า ในตำแหน่งพื้นผิวด้านบนของชิ้นงานเพื่อดูลักษณะของไบโอฟิล์มจากด้านหน้าตัดของเนื้อฟัน

3.3.2 การศึกษาความลึกของรอยโรคฟันผุ (depth of caries-like lesion)

นำชิ้นฟันตัวอย่างจากข้อ 3.3.1 มาปรับแกนกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราดให้ส่องในตำแหน่งหน้าตัดของรอยแบ่งฟัน เพื่อวัดความลึกของรอยโรคด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 200 เท่า โดยตำแหน่งที่วัดต้องห่างจากรอยที่ถูกแบ่งด้วยน้ำยาทาเล็บประมาณ 150 ไมโครเมตร จำนวน 1 จุด โดยเทียบกับเนื้อฟันปกติที่ถูกเคลือบด้วยน้ำยาทาเล็บ ร่วมกับการใช้โปรแกรมอิมเมจเจ (Image J ; National Institutes of health, U.S.A.) โดยการลากเส้นระยะที่ทราบแน่ชัดจากภาพถ่ายนำมาคำนวนด้วยโปรแกรมอัตโนมัติเปรียบเทียบกับระยะที่ต้องการทราบในภาพเดียวกัน เพื่อประเมินความลึกของรอยโรค

3.3.3 การศึกษาองค์ประกอบของแร่ธาตุของรอยโรคฟันผุ (mineral content)

นำชิ้นฟันส่วนที่ 2 ที่ถูกแบ่งไว้มาหาปริมาณร้อยละโดยน้ำหนักของแคลเซียมและฟอสฟอรัส ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราดร่วมกับเครื่องวิเคราะห์ธาตุ (scanning electron microscopy & energy dispersive X-ray spectroscopy; SEM-EDS) บนพื้นผิวของเนื้อฟันผุ ที่กำลังขยาย 100 เท่า โดยวัด 3 ตำแหน่ง แต่ละตำแหน่งห่างกัน 1000 ไมโครเมตร แล้วนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ย

จากนั้นจึงนำค่าร้อยละโดยน้ำหนักของแคลเซียมและฟอสฟอรัส มาประเมินอัตราส่วนระหว่างแคลเซียมต่อฟอสฟอรัส

การทดลองทั้งหมดนี้จะทำซ้ำทั้งหมด 3 รอบ เพื่อยืนยันผล

3.4 การแปลผล

ใช้สถิติเชิงพรรณนา อธิบายลักษณะของไบโอฟิล์ม ความลึกของรอยโรคฟันผุ ปริมาณและอัตราส่วนของแร่ธาตุที่พบจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราดร่วมกับเครื่องวิเคราะห์ธาตุ ทั้ง 4 กลุ่มการทดลอง

4. ผลการวิจัย

4.1 ลักษณะของไบโอฟิล์ม

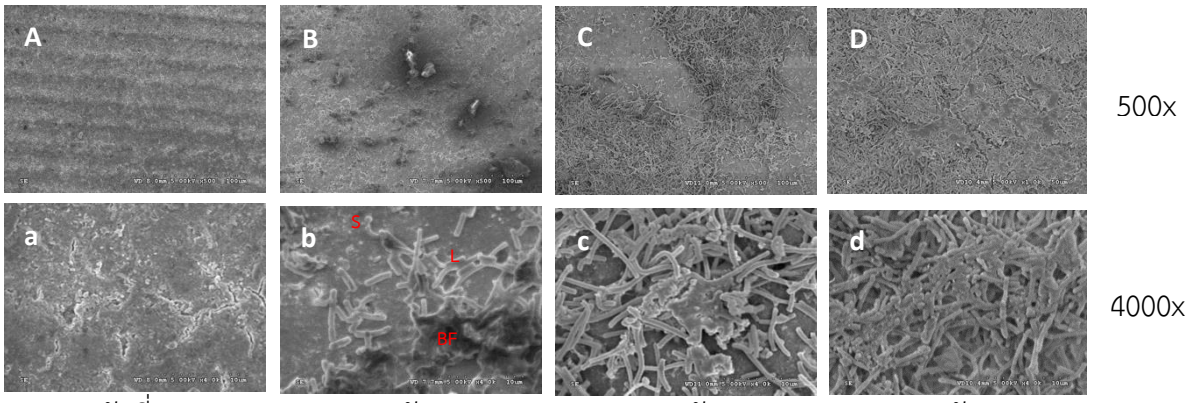
จากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด ที่กำลังขยาย 500 และ 4000 เท่า พบลักษณะดังต่อไปนี้

วันที่ 0 (กลุ่มควบคุม) พบพื้นผิวเนื้อฟันมีลักษณะค่อนข้างเรียบ มีแผ่นชั้นสเมียร์ (smear layer) ปกคลุมท่อเนื้อฟัน (dentinal tubule) โดยทั่วไป และไม่พบเชื้อแบคทีเรีย (รูป 4A, 4a)

วันที่ 1 พื้นผิวเนื้อฟันพบเชื้อแบคทีเรียทั้ง*สเตร็ปโตค็อคคัส มิวแทนส์* ลักษณะทรงกลมต่อกันเป็นสาย หรืออยู่เดี่ยว ๆ บนพื้นผิวเนื้อฟัน และ*แลคโตบาซิลลัส อะซิโดฟิลลัส* ลักษณะเป็นแท่งยาวเกาะกันเป็นกลุ่มโดยทั่วไป ที่ถูกปกคลุมด้วยแผ่นไบโอฟิล์มด้านบนกระจัดกระจายโดยทั่วไป (รูป 4B, 4b)

วันที่ 3 พื้นผิวเนื้อฟันพบเชื้อแบคทีเรีย*สเตร็ปโตค็อคคัส มิวแทนส์* เกาะเรียงตัวกันเป็นสาย และมีเชื้อ*แลคโตบาซิลลัส อะซิโดฟิลลัส* ซ้อนทับอยู่ โดยมีแผ่นไบโอฟิล์มอยู่ชั้นบนสุดกระจายทั่วไปเพิ่มขึ้นและหนาขึ้นโดยยังสามารถมองเห็นพื้นผิวของเนื้อฟันได้ในบางบริเวณ (รูป 4C, 4c)

วันที่ 5 พบเชื้อแบคทีเรีย*แลคโตบาซิลลัส อะซิโดฟิลลัส* เกาะกลุ่มซ้อนทับกันอย่างหนาแน่น และมีแผ่นไบโอฟิล์มปกคลุมอยู่ด้านบนเชื่อมต่อกันเต็มพื้นผิวของเนื้อฟัน จนไม่สามารถมองเห็นพื้นผิวเนื้อฟันได้ (รูป 4D, 4d)

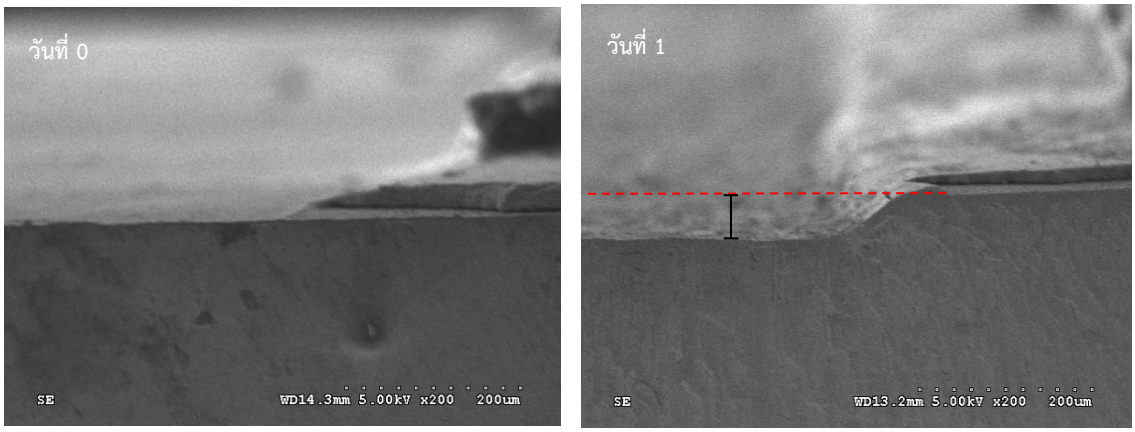


วันที่ 0 1 วัน 3 วัน 5 วัน

รูปที่ 4 ลักษณะไบโอฟิล์มบนชิ้นฟันตัวอย่างจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด ที่กำลังขยาย 500 และ 4000 เท่า (A,a) เนื้อฟันปกติ ; (B,b) แช่ในสารละลายเชื้อแบคทีเรีย 1 วัน [(S) *S. mutans*; (L) *L. acidophilus*; (BF) biofilm]; (C,c) แช่ในสารละลายเชื้อแบคทีเรีย 3 วัน; (D,d) แช่ในสารละลายเชื้อแบคทีเรีย 5 วัน

4.2 ความลึกของรอยโรคฟันผุ

ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (รูปที่ 5) พบพื้นผิวของเนื้อฟันที่ถูกแช่ในสารละลายแบคทีเรียร่วมกับซูโครส เป็นเวลา 1 3 และ 5 วัน มีเนื้อฟันหายไป 51 143 และ 186 ไมโครเมตร ตามลำดับ เมื่อเทียบกับเนื้อฟันปกติที่ทาน้ำยาทาเล็บ (ตารางที่ 1) ค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายแบคทีเรียร่วมกับซูโครส ตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 5 อยู่ในช่วง 3.74-4.02



รูปที่ 5 ตัวอย่างการวัดความลึกของรอยผุด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราดร่วมกับโปรแกรมอิมเมจเจ ที่กำลังขยาย 200 เท่า ภายหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดรอยผุเป็นเวลา 1 วัน เทียบกับกลุ่มควบคุม

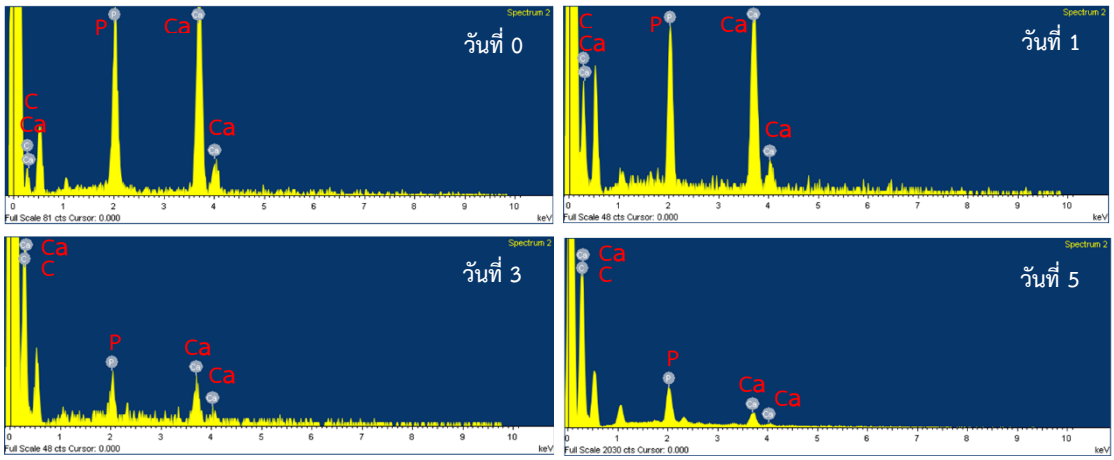
ตารางที่ 1 ความลึกของรอยผุจำลอง (ไมโครเมตร) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 200 เท่า

ระยะเวลา (Time periods)	ความลึก (μm) (Depth)
วันที่ 0 (ควบคุม)	0
วันที่ 1	51
วันที่ 3	143
วันที่ 5	186

4.3 องค์ประกอบของแร่ธาตุของรอยโรคฟันผุ

วิเคราะห์องค์ประกอบแร่ธาตุแคลเซียมและฟอสฟอรัสจากเครื่องวิเคราะห์ธาตุร่วมกับกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (รูปที่ 6) พบว่าร้อยละโดยน้ำหนักของแคลเซียมและฟอสฟอรัสมีแนวโน้มลดลงเมื่อแช่ในสารละลายแบคทีเรียร่วมกับซูโครสเป็นเวลานานขึ้น

นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราส่วนระหว่างแคลเซียมต่อฟอสฟอรัสลดลง ภายหลังการแช่ชิ้นเนื้อฟันในสารละลายแบคทีเรียร่วมกับซูโครสเป็นระยะเวลานานขึ้น คือ 1.69 1.30 และ 0.84 ในวันที่ 1 3 และ 5 ตามลำดับ ซึ่งทุกกลุ่มการทดลองมีค่าน้อยกว่ากลุ่มควบคุมที่มีค่า 1.92 ดังแสดงในตารางที่ 2



รูปที่ 6 การวิเคราะห์ปริมาณแร่ธาตุแคลเซียม ฟอสฟอรัส และ
คาร์บอนจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราดร่วมกับเครื่องวิเคราะห์ธาตุ ที่กำลังขยาย 100 เท่า

ตารางที่ 2 ร้อยละโดยน้ำหนักของแคลเซียม ฟอสฟอรัส และอัตราส่วนระหว่างแคลเซียมต่อฟอสฟอรัส ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราดร่วมกับเครื่องวิเคราะห์ธาตุ ที่กำลังขยาย 100 เท่า

ระยะเวลา (Time periods)	แคลเซียม (Calcium) (Wt%)	ฟอสฟอรัส (Phosphorus) (Wt%)	อัตราส่วนแคลเซียมต่อฟอสฟอรัส (Ca/P)
วันที่ 0	13.40	6.98	1.92
วันที่ 1	8.36	4.94	1.69
วันที่ 3	3.16	2.43	1.30
วันที่ 5	3.69	4.37	0.84

5. อภิปรายผลการวิจัย

จากผลการทดลองพบว่า เชื้อ*สเตร็ปโตค็อคคัส มิวแทนส์* และเชื้อ*แลคโตบาซิลลัส อะซิโดฟิลลัส* เมื่อนำมาเลี้ยงร่วมกันในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด MRS ร่วมกับน้ำตาลซูโครสร้อยละ 5 ในระยะเวลาที่แตกต่างกัน ทำให้เกิดไบโอฟิล์ม รอยผุ และการสูญเสียแร่ธาตุแคลเซียมและฟอสฟอรัสตั้งแต่วันแรกของการเหนี่ยวนำให้เกิดรอยโรค

แบบจำลองเนื้อฟันผุโดยการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในห้องปฏิบัติการ เป็นวิธีที่สามารถสร้างแบบจำลองภายใต้สภาวะที่ปลอดเชื้อได้ สะดวกในการทดสอบชิ้นฟันตัวอย่าง และคล้ายกับสภาพแวดล้อมในช่องปาก (Bowden, G H. W., 1979, p. 135-216) โดยประโยชน์สำคัญของแบบจำลองเนื้อฟันผุในห้องปฏิบัติการนี้คือ ค่าใช้จ่ายต่ำ สามารถควบคุมการปนเปื้อนได้โดยการสังเกตจากลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 24 ชม. แต่มีข้อด้อยคือ ไม่สามารถเลียนแบบสภาวะต่าง ๆ ที่มีความหลากหลายและซับซ้อนภายในช่องปากได้ เช่น การมีน้ำลาย โปรตีน และเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ และไม่มีช่วงเวลาในการคืนกลับแร่ธาตุ ซึ่งปัจจัยทั้งหมดนี้อาจส่งผลต่อการดำเนินของรอยโรคฟันผุได้ (Fontana, M. et al., 1996, p. 112-118)

กระบวนการก่อโรคในการทดลองนี้เกิดจากเชื้อ*สเตร็ปโตค็อคคัส มิวแทนส์* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแรกที่เข้ามายึดเกาะบนพื้นผิวเนื้อฟัน และทำให้เกิดการดำเนินของรอยโรคฟันผุ (Kleinberg, I., 2002, p. 108-125) โดยสภาพแวดล้อมที่เป็นกรดจากกระบวนการหมักน้ำตาลของเชื้อจะเหมาะกับการเจริญเติบโตและการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อกลุ่ม*แลคโตบาซิลลัส* (Wen, Z. T. et al., 2010, p. 111) เชื้อ*แลคโตบาซิลลัส อะซิโดฟิลลัส* พบมากทั้งบริเวณรอยผุที่พื้นผิวและรอยผุระดับลึกในฟันธรรมชาติ (Hahn, C. L., 1991, p. 147-153) แต่ไม่สามารถสร้างเป็นแผ่นคราบจุลินทรีย์ได้ด้วยตัวเอง จะต้องอาศัย extracellular polysaccharide จากเชื้อกลุ่มอื่น โดยเฉพาะกลุ่ม*สเตร็ปโตค็อคคัส* เพื่อสร้างโคโลนี ฉะนั้นเชื้อ*สเตร็ปโตค็อคคัส มิวแทนส์* และเชื้อ*แลคโตบาซิลลัส อะซิโดฟิลลัส* จึงเป็นเชื้อก่อโรคฟันผุที่พบได้บ่อย และมีความสัมพันธ์กับเนื้อฟันผุ (Chu, C. H., 2000, p. 142-148) โดยแบบจำลองเชื้อแบบ 2 สายพันธุ์ จะสร้างไบโอฟิล์มที่มีความมั่นคงแข็งแรง เกิดปฏิกิริยาระหว่างกัน และมีความซับซ้อนของระบบมากกว่าเชื้อก่อโรคเพียงสายพันธุ์เดียว

จากการศึกษาของ Mei, M. L. และคณะ ในปี 2013 เลี้ยงเชื้อ*สเตร็ปโตค็อคคัส มิวแทนส์* และเชื้อ*แลคโตบาซิลลัส อะซิโดฟิลลัส* ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด basal medium supplemented (BMG medium) ร่วมกับน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 5 ในสภาวะปราศจากออกซิเจน เป็นระยะเวลา 3 วัน เกิดรอยผุที่มีความลึกประมาณ 80 ไมโครเมตร การศึกษาของ Chu, C. H. และคณะ ในปี 2012 เลี้ยงเชื้อ*สเตร็ปโตค็อคคัส มิวแทนส์* และเชื้อ*แอคติโมมัยสีท* ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด basal medium supplemented ร่วมกับน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 5 ในสภาวะปราศจากออกซิเจน เป็นระยะเวลา 7 วัน เกิดรอยผุที่มีความลึกประมาณ 150 ไมโครเมตร เช่นเดียวกับการศึกษานี้ที่พบความลึกของรอยผุภายหลังการแช่ชิ้นฟันในสารละลาย MRS ที่มีเชื้อ*สเตร็ปโตค็อคคัส มิวแทนส์* และเชื้อ*แลคโตบาซิลลัส อะซิโดฟิลลัส* ร่วมกับน้ำตาลซูโครสร้อยละ 5 เป็นระยะเวลา 3 วัน มีค่าประมาณ 143 ไมโครเมตร โดยความลึกของรอยผุในการศึกษานี้มีค่ามากกว่าการศึกษาก่อนหน้า อาจเนื่องมาจากการใช้เชื้อแบคทีเรีย ประเภทของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะการบ่มเชื้อที่แตกต่างกัน ทำให้เชื้อมีอัตราการเจริญเติบโตไม่เท่ากัน และนำไปสู่ความสามารถในการก่อโรคที่ต่างกันได้

จากผลการศึกษาร้อยละโดยน้ำหนักของแคลเซียมและฟอสฟอรัสพบว่า มีค่าลดลงเมื่อแช่ชิ้นฟันตัวอย่างในสารละลายเชื้อแบคทีเรียเป็นระยะเวลานานขึ้น เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดเกิดกระบวนการหมักน้ำตาลซูโครส และได้ผลผลิตเป็นกรดอินทรีย์ เช่น กรดอะซิติก (acetic acid) ไปย่อยสลายเนื้อฟัน ทำให้เกิดการสูญเสียแร่ธาตุต่าง ๆ ตามมา ปริมาณแร่ธาตุแคลเซียมและฟอสฟอรัสซึ่งจัดเป็นองค์ประกอบหลักของ

ฟันจึงมีค่าลดลงเมื่อมีการสูญเสียแร่ธาตุจากการกัดกร่อนมากขึ้น (Chu, C. H. et al., 2012, p. 2-10) แต่ชิ้นฟันตัวอย่างที่แช่ในสารละลายเชื้อแบคทีเรียเป็นระยะเวลา 5 วัน พบว่ามีค่าร้อยละโดยน้ำหนักของแคลเซียมและฟอสฟอรัสสูงกว่าชิ้นที่แช่เป็นระยะเวลา 3 วัน อาจมาจากปริมาณและความหนาของชั้นไบโอฟิล์มที่ปกคลุมพื้นผิวเนื้อฟันในวันที่ 5 จำนวนมาก ทำให้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราดร่วมกับเครื่องวิเคราะห์ธาตุแปลผลคลาดเคลื่อนได้

ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับผลการศึกษาที่ผ่านมาคือ การสร้างรอยผุโดยใช้แบบจำลองด้วยเชื้อก่อโรคในห้องปฏิบัติการสามารถสร้างไบโอฟิล์ม รอยผุ และทำให้เกิดการสูญเสียแร่ธาตุที่เป็นองค์ประกอบหลักของฟันในระยะเวลาต่าง ๆ ได้ แต่ยังมีข้อจำกัด เช่น จำนวนชิ้นฟันในการทดสอบ และการตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพของรอยผุ ซึ่งควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคต การนำไปใช้ประโยชน์จะขึ้นอยู่กับประเภท และลักษณะของการทดลอง โดยอาจนำไปศึกษาวิธีการปรับสภาพพื้นผิวรอยผุให้เอื้อต่อการบูรณะด้วยวัสดุชนิดต่าง ๆ ต่อไป

6. สรุปผลการวิจัย

การศึกษาในครั้งนี้พบว่า การแช่ชิ้นฟันในสารละลายเชื้อแบคทีเรีย*สเตร็ปโตค็อคคัส มิวแทนส์* และ*แลคโตบาซิลลัส อะซิโดฟิลลัส* ร่วมกับน้ำตาลซูโครสภายในระยะเวลา 1, 3 และ 5 วัน สามารถทำให้เกิดไบโอฟิล์ม การสูญเสียแร่ธาตุ และกลายเป็นรอยผุจำลองได้เมื่อพิจารณาจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราดร่วมกับเครื่องวิเคราะห์ธาตุ และสามารถใช้แบบจำลองด้วยเชื้อก่อโรคในห้องปฏิบัติการนี้เพื่อสร้างรอยผุประยุกต์ใช้ในงานวิจัยทางทันตกรรมต่อไป

7. ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาครั้งต่อไปควรเพิ่มขนาดของกลุ่มตัวอย่างเพื่อให้สามารถนำข้อมูลไปคำนวนทางสถิติและเปรียบเทียบกับการศึกษาที่ผ่านมาได้ชัดเจนยิ่งขึ้น นอกจากนี้ควรเพิ่มวิธีการทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพของชิ้นฟันตัวอย่างภายหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดรอยผุ เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ครอบคลุมและสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลายยิ่งขึ้น

8. กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น และคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่สนับสนุนงบประมาณในการทำวิจัย และห้องปฏิบัติการการวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัย

9. เอกสารอ้างอิง

Arthur, R. A., Waeiss, R. A., Hara, A. T., Lippert, F., Eckert, G. J., Zero, D.T. (2013). A defined-multispecies microbial model for studying enamel caries development. *Caries Res 47:(318–324).*

Bowden, G. H. W., Ellwood, D. C., Hamilton, I. R. (1979). Microbial ecology of the oral cavity. *Adv Microb Ecol*.; 3:(135-216).

Cavalcanti, Y. W., Bertolini, M. M., da Silva, W. J., Del-Bel-Cury, A. A., Tenuta, L. M., Cury, J. A. (2014). A three-species biofilm model for the evaluation of enamel and dentin demineralization. *Biofouling* 30:(579–588).

Chu, C. H. (2000). Treatment of early childhood caries: a review and case report. *Gen Dent*.;48:(142-8).

Chu, C. H., Mei, L., Seneviratne, C. J., Lo, E. C., Samaranayake, L. P. (2012). Effects of silver diamine fluoride on dentine carious lesions induced by Streptococcus mutans and Actinomyces naeslundii biofilms. *Int J Paediatr Dent*; 22:(2-10).

Featherstone, J. D. B. (2008). Dental caries: a dynamic disease process. *Australian Dental Journal* 53:(286-291).

Ferreira, R. I., Haiter-Neto, F., Tabchoury, C. P., B_oscolo, F. N. (2007). In vitro induction of enamel subsurface demineralization for evaluation of diagnostic imaging methods. *J App Oral Sci* 15:(392–398).

Fontana, M., Dunipace, A. J., Gregory, R. L., Noblitt, T. W., Li, Y., Park, K. K., Stookey, G. K. (1996). An *in vitro* microbial model for studying secondary caries formation. *Caries Res*.; 30:(112-8).

Gomez, J., Pretty, I. A., Santarpia, R. P. III., Cantore, B., Rege, A., Petrou, I., Ellwood, R. P. (2014). Quantitative light-induced fluorescence to measure enamel remineralization in vitro. *Caries Res* 48:(223–227).

Hahn, C. L., Falkler, W. A., Minah, G. E. (1991). Microbiological studies of carious dentine from human teeth with irreversible pulpitis. *Arch Oral Biol*.;36:(147-53).

Kleinberg, I. (2002). A mixed-bacteria ecological approach to understanding the role of the oral bacteria in dental caries causation: an alternative to Streptococcus mutans and the specific-plaque hypothesis. *Crit Rev Oral Biol Med*.;13:(108-25).

Marsh, P. D. (1995). The role of microbiology in models of dental caries. *Adv Dent Res* 9: (244–254). discussion 2552269.

Mei, M. L., Chu, C. H., Low, K. H., Che, C. M., Lo, E. C. (2013). Caries arresting effect of silver diamine fluoride on dentine carious lesion with S. mutans and L. acidophilus dual-species cariogenic biofilm. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 18: e8(24-31).

Nunpan, S., Suwannachart, C., & Wayakanon, K. (2017). The Inhibition of Dental Caries Pathogen by Using Prebiotic and Probiotic Combination, *JDAT DFCT Supplement* Issue VOL.67(31-38).

Shu, M., al e. (2000). Development of multi-species consortia biofilms of oral bacteria as an enamel and root caries model system. *Arch Oral Biol*. 45:(27-40).

Steiner-Oliveira, C., Maciel, F. A., Rodrigues, L. K. A., Napimoga, M. H., Pimenta, L. A. F., H€ofling, J. F., Gonc¸alves, R. B. (2007). An in vitro microbial model for producing caries-like lesions on enamel. *Braz J Oral Sci* 6:(1392–1396).

Wen, Z. T., Yates, D., Ahn, S. J., Burne, R. A. (2010). Biofilm formation and virulence expression by Streptococcus mutans are altered when grown in dual-species model. *BMC microbiology*;10(111).

Young, D. A., Zeller, G. G., Hart, T. C. (2015). The American Dental Association Caries Classification System for Clinical Practice. *J Am Dent Assoc* 146(2):79-86.

Yu, O. Y., Zhao, I. S., Mei, M. L., Lo, E. C. M., Chu, C. H. (2017). A Review of the Common Models Used in Mechanistic Studies on Demineralization-Remineralization for Cariology Research. *Dent J*, 5, 20.