

ประสิทธิภาพการกำจัดแผ่นชีวภาพของราแคนดิดาอัลบิแคนส์ ด้วยพลาสมาแบบนอน-เทอร์มอลที่ความดันบรรยากาศ

Efficiency of Non-thermal Atmospheric Pressure Plasma on Killing *Candida albicans* Biofilm

พัลลภ สุวรรณอำไพ¹, จินตนา อธิติเดชารณ², เพ็ญพิชชา วนจันทร์รักษา³, ประดุง สวนพุด⁴
โรงพยาบาลเขาฉกรรจ์ จังหวัดสระแก้ว

²ภาควิชาทันตกรรมครอบครัวและชุมชน คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
³ศูนย์วิจัยทางทันตแพทยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

⁴มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ จังหวัดแพร่

Panlop Suwanampai¹, Chintana Itthidecharon², Phenphichar Wanachantararak³, Pradoong Suanpoof⁴

¹Khaochakan hospital, Sa Kaeo

²Department of Family and Community Dentistry, Faculty of Dentistry, Chiang Mai University

³Dentistry Research Center, Faculty of Dentistry, Chiang Mai University

⁴Maejo University Phrae Campus, Phrae

ชม. ทันตสาร 2562; 40(3) : 113-123

CM Dent J 2019; 40(3) : 113-123

Received: 22 February, 2019

Revised: 13 June, 2019

Accepted: 18 June, 2019

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของพลาสมาแบบนอน-เทอร์มอลที่ความดันบรรยากาศในการกำจัดแผ่นชีวภาพของราแคนดิดาอัลบิแคนส์

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ: เป็นการศึกษาในห้องปฏิบัติการ ราแคนดิดาอัลบิแคนส์สายพันธุ์ ATCC 10231 และสายพันธุ์คลินิก 2 สายพันธุ์ แบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ 2, 3, 4 และ 5 เป็นกลุ่มทดลองที่นำจุลชีพไปสัมผัสพลาสมา เป็นเวลา 2, 5, 8 และ 10 นาที ตามลำดับ เพื่อหาระยะเวลาที่น้อยที่สุดที่สามารถกำจัดได้อย่างมีประสิทธิภาพ วัดการเจริญเติบโตของจุลชีพโดยวิธีนับจำนวนโคโลนีที่ปรากฏ และวิธีเอ็มทีที

Abstract

Objectives: To investigate the efficacy of non-thermal atmospheric pressure plasma on killing *Candida albicans* biofilm.

Methods: *Candida albicans* (ATCC 10231 and 2 clinical strains) divided into 5 groups. The untreated culture was designated as control group. The rest groups were treated by non-thermal atmospheric pressure plasma for 2, 5, 8 and 10 minutes were designated as test groups 1, 2, 3 and 4 respectively. To investigate the least exposure time on killing yeast cells, the quantity of yeast cells was

Corresponding Author:

จินตนา อธิติเดชารณ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์, ภาควิชาทันตกรรมครอบครัวและชุมชน
คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 50200

Chintana Itthidecharon

Assistant Professor; Department of Family
and Community Dentistry, Faculty of Dentistry,
Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand
E-mail: chintana.itt@cmu.ac.th

จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพของพลาสมาแบบนอน-เทอร์มอลที่ความดันบรรยากาศ ในการกำจัดแผ่นชีวภาพของราแคนดิดาอัลบิแคนส์ทั้ง 3 สายพันธุ์ บนแผ่นเรซินอะคริลิก

ผลการศึกษา: การทดสอบพบว่าปริมาณราแคนดิดาอัลบิแคนส์สายพันธุ์ ATCC 10231 และสายพันธุ์คลินิกในกลุ่มทดลองลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) หลังสัมผัสกับพลาสมาแบบนอน-เทอร์มอลที่ความดันบรรยากาศเป็นเวลา 8 นาที โดยพลาสมาสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของราสายพันธุ์ ATCC 10231 และสายพันธุ์คลินิกได้ร้อยละ 92.30, 88.35 และ 88.92 ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ปริมาณจุลชีพโดยวิธีนับจำนวนโคโลนี แต่ยับยั้งได้เพียงร้อยละ 26-51 เมื่อวิเคราะห์โดยวิธีเอ็มทีที นอกจากนี้พลาสมาแบบนอน-เทอร์มอลที่ความดันบรรยากาศมีประสิทธิภาพในการกำจัดหรือต้านแผ่นชีวภาพของกลุ่มทดลองของราทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อแผ่นชีวภาพราแคนดิดาอัลบิแคนส์บนแผ่นเรซินอะคริลิกได้สัมผัสกับพลาสมาเป็นเวลา 8 นาที

สรุป: พลาสมาแบบนอน-เทอร์มอลที่ความดันบรรยากาศมีประสิทธิภาพในการกำจัดหรือต้านแผ่นชีวภาพของราแคนดิดาอัลบิแคนส์บนแผ่นเรซินอะคริลิกได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อแผ่นชีวภาพนั้นได้สัมผัสกับพลาสมาเป็นเวลาไม่ต่ำกว่า 8 นาที

คำสำคัญ: พลาสมาแบบนอน-เทอร์มอลที่ความดันบรรยากาศ แผ่นชีวภาพ แคนดิดาอัลบิแคนส์

examined by colony counting and MTT assays. In addition, biofilm of all strains of *Candida albicans* was formed individually on acrylic resin before exposed to non-thermal atmospheric pressure plasma. Viability of the biofilms was investigated by colony counting method.

Results: *Candida albicans* cultures of ATCC 10231 and 2 clinical strains were significantly reduced after exposed to non-thermal atmospheric pressure plasma for 8 minutes. ($p < 0.05$) By colony counting, the growth of the reference and clinical strains were inhibited by 92.30, 88.35 and 88.92% respectively. Contradictorily, by MTT assay method, the plasma exposure reduced the growth of *Candida albicans* cells by 26-51% approximately. Additionally, non-thermal atmospheric pressure plasma exposure for 8 minutes reduced *Candida albicans* biofilms formed on acrylic resin greatly ($p < 0.05$).

Conclusion: Non-thermal atmospheric pressure plasma exposure for 8 minutes have demonstrated efficiency in killing *Candida albicans* biofilms established on acrylic resin.

Keywords: non-thermal atmospheric pressure plasma, biofilm, *Candida albicans*

บทนำ

ในปี พ.ศ.2564 ประเทศไทยจะเข้าสู่ “สังคมสูงอายุอย่างสมบูรณ์” (complete aged society) เมื่อมีประชากรผู้สูงอายุร้อยละ 20 ของประชากรทั้งหมด⁽¹⁾ อุบัติการณ์เกิดโรคปากอักเสบเหตุฟันเทียม (denture stomatitis) มีความสัมพันธ์กับกลุ่มผู้ป่วยที่มีอายุเพิ่มขึ้นที่ใส่ฟันเทียมถอดได้ ความชุกของการเกิดปากอักเสบเหตุฟันเทียมพบได้ตั้งแต่ร้อยละ 15 ถึงร้อยละ 70⁽²⁾ การศึกษาในประเทศไทยจากกลุ่มตัวอย่างอายุ 60 ปีขึ้นไป พบว่ามีความชุกของปากอักเสบเหตุฟันเทียมในผู้ใส่ฟันเทียมบางส่วนถอดได้และฟันเทียมทั้งปาก ร้อยละ 16.6 และร้อยละ 10.5 ตามลำดับ⁽³⁾

ปากอักเสบเหตุฟันเทียมเป็นรอยโรคสีแดงขอบเขตชัดเจนบริเวณเยื่อเมือกช่องปากบริเวณที่สัมผัสกับฐานฟันเทียมถอดได้ มีสาเหตุหลักจากการมีอนามัยฟันเทียมที่ไม่ดี เกิดการสะสมของแผ่นชีวภาพบนพื้นผิวฟันเทียมเอื้อต่อการเกาะติดของเชื้อราโดยเฉพาะราแคนดิดาอัลบิแคนส์ (*Candida albicans*)^(2,4) วิธีการป้องกันปากอักเสบเหตุฟันเทียมวิธีหนึ่งได้แก่ การดูแลอนามัยฟันเทียม^(2,5) ซึ่งทำได้โดยวิธีการทำความสะอาดทางกล วิธีการทำความสะอาดทางเคมี วิธีการทำความสะอาดทางกลร่วมกับทางเคมี และวิธีการทำความสะอาดทางเลือกอื่น การทำความสะอาดทางกลร่วมกับทางเคมีเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในในการกำจัดแผ่นชีวภาพ^(6,7)

การทำมาสะอาดทางกลช่วยกำจัดแผ่นชีวภาพ ส่วนการใช้สารเคมีช่วยเสริมในบริเวณที่การทำมาสะอาดทางกลเข้าไม่ถึง เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับผู้สูงอายุหรือผู้พิการที่มีปัญหาการใช้มือ ข้อเสียของการทำมาสะอาดด้วยสารเคมีคือบางชนิดมีฤทธิ์กัดกร่อนฟันเทียมที่เป็นโลหะ และบางชนิดเกิดการติดสีที่ฟันเทียม วิธีการทำมาสะอาดทางเลือกอื่นได้แก่ การใช้เครื่องอัลตราโซนิค⁽⁸⁾ การใช้เครื่องมือโคโรเวฟ⁽⁹⁾ การใช้เครื่องพลาสมา^(10,11) หรือการปรับเปลี่ยนวัสดุทำฐานฟันเทียมให้มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ⁽¹²⁾

ปัจจุบันพลาสมาได้รับความสนใจจากหลากหลายสาขา โดยเฉพาะด้านชีววิทยาทางการแพทย์ พลาสมาแบบนอน-เทอร์มอลที่ความดันบรรยากาศ (non-thermal atmospheric pressure plasma) เป็นพลาสมาที่นิยมนำมาใช้ประโยชน์และศึกษาวิจัยเนื่องจากมีอุณหภูมิพลาสมาต่ำคือน้อยกว่า 40 องศาเซลเซียส⁽¹³⁾ เกิดในสภาวะความดันบรรยากาศและไม่เกิดอันตรายต่อเนื้อเยื่อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม^(14,15) แบ่งประเภทออกเป็นพลาสมาแบบนอน-เทอร์มอลที่ความดันบรรยากาศชนิดไดอิเล็กทริกแบริเออร์ดีสชาร์จ (dielectric barrier discharge; DBD) และพลาสมาแบบนอน-เทอร์มอลที่ความดันบรรยากาศชนิดเจ็ท (non-thermal atmospheric pressure plasma jet, NAPPJ)^(16,17) ปฏิกริยาของพลาสมาต่อสิ่งมีชีวิตเกิดจากอนุภาคที่มีประจุ รังสีอัลตราไวโอเล็ต สารประกอบไนโตรเจนที่ไวต่อปฏิกริยา เช่น ไนตริกออกไซด์ (NO) ไนโตรเจนไดออกไซด์ (NO₂) เพอร์ออกซิไนไทรด์ (ONOO⁻) และสารประกอบออกซิเจนที่ไวต่อปฏิกริยา เช่น ออกซิเจนอะตอม (O) ไฮดรอกซิลเรดิคัล (OH⁻) ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H₂O₂) ซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (O₂⁻) และโอโซน (O₃)⁽¹⁸⁾ การศึกษาผลของพลาสมาต่อจุลชีพหรือเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมพบว่า พลาสมามีฤทธิ์ต้านจุลชีพ⁽¹⁹⁻²¹⁾ กระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์^(22,23) และกระตุ้นการตายของเซลล์โดยขึ้นกับปริมาณพลาสมาและระยะเวลา^(14,16,24) จาก 2 กระบวนการที่สำคัญ คือปฏิกริยาระหว่างพลาสมา กับของเหลวในเนื้อเยื่อ⁽¹⁸⁾ และสารประกอบไนโตรเจนและออกซิเจนที่ไวต่อปฏิกริยาที่เกิดขึ้นมาภายหลัง^(17,18) อนุภาคที่มีประจุเป็นตัวเริ่มปฏิกริยาในกระบวนการเพอร์ออกซิเดชัน (peroxidation process) มีเป้าหมายอยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งเป็นบริเวณที่จะสังเกตเห็นผลกระทบของพลาสมาในลำดับแรก^(14,25,26) สารประกอบไนโตรเจนและ

ออกซิเจนที่ไวต่อปฏิกริยา คือ อนุมูลอิสระที่มีออกซิเจนหรือไนโตรเจน ซึ่งเกิดขึ้นภายหลังจากปฏิกริยาระหว่างพลาสมา กับของเหลวในเนื้อเยื่อ^(17,18) เป็นอนุมูลที่ไม่เสถียร เกิดปฏิกริยาเพอร์ออกซิเดชันได้อย่างรวดเร็วกับ โปรตีน ไขมัน หรือดีเอ็นเอ และจะเกิดปฏิกริยาถูกโซ่ทำลายโครงสร้างของเซลล์ทำให้เซลล์ตายได้⁽²⁷⁾ ส่วนรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่เกิดจากพลาสมาพบว่าไม่ใช้กลไกหลักในการฆ่าเชื้อจุลชีพ แต่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการทำลายจุลชีพของพลาสมา^(14,28)

ทางทันตกรรมมีการนำพลาสมาที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าแบคทีเรียและรามามาใช้ในงานรักษาคลองรากฟัน เป็นต้น และพบว่าพลาสมาสามารถฆ่าเชื้อราโดยเฉพาะราแคนดิดา-อัลบิแคนส์ เนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์ของราแคนดิดาอัลบิ-แคนส์เกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพภายหลังจากได้รับพลาสมา^(19,20) ส่วนการศึกษาเกี่ยวกับผลของพลาสมาต่อแผ่นชีวภาพของราแคนดิดาอัลบิแคนส์ที่มักก่อตัวบนวัสดุฟันเทียมยังมีค่อนข้างน้อย ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาในประเด็นนี้ โดยมีวัตถุประสงค์ทำการทดสอบประสิทธิภาพของพลาสมาแบบนอน-เทอร์มอลที่ความดันบรรยากาศในการกำจัดแผ่นชีวภาพของราแคนดิดาอัลบิแคนส์ที่ก่อตัวบนวัสดุฟันเทียม หากพลาสมามีประสิทธิภาพในการกำจัดแผ่นชีวภาพของราแคนดิดาอัลบิแคนส์ได้ อาจสามารถนำมาพัฒนาและประยุกต์ใช้สำหรับการดูแลอนามัยฟันเทียมเพื่อป้องกันโรคปากอักเสบเหตุฟันเทียมต่อไป

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

วิจัยแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่ 1 การทดสอบหาระยะเวลาที่น้อยที่สุดที่สามารถกำจัดราแคนดิดาอัลบิแคนส์ได้ไม่น้อยกว่าร้อยละ 80 ด้วยพลาสมาแบบนอน-เทอร์มอลที่ความดันบรรยากาศ และส่วนที่ 2 การทดสอบการกำจัดแผ่นชีวภาพของราแคนดิดาอัลบิแคนส์บนแผ่นเรซินอะคริลิกชนิดบ่มตัวด้วยความร้อนด้วยพลาสมาแบบนอน-เทอร์มอลที่ความดันบรรยากาศ

การเตรียมเครื่องกำเนิดพลาสมาแบบนอน-เทอร์มอลที่ความดันบรรยากาศ

เครื่องแหล่งกำเนิดพลาสมาแบบนอน-เทอร์มอลที่ความดันบรรยากาศที่ใช้ในการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยแม่โจ้ และหัวกำเนิดพลาสมาแบบเส้นยาว 80 มิลลิเมตร จากมหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ โครงสร้างหัวพลาสมา

ทำด้วยวัสดุพอลิเอทิลีน (polyethylene) และขึ้นรูปด้วยเครื่องพิมพ์ 3 มิติ โดยขั้วไฟฟ้าแบบเส้นอยู่ด้านล่างสุด ใช้แก๊สอาร์กอนอัตราการไหล 5 ลิตรต่ออนาที เพื่อสร้างพลาสมาจ่ายไฟฟ้ากระแสตรงขาเข้า 20 โวลต์ 1 แอมแปร์ เปลี่ยนเป็นไฟฟ้ากระแสสลับขาออกเพื่อสร้างพลาสมาความถี่ 125 กิโลเฮิร์ตซ์ 3.6 กิโลโวลต์ 20 มิลลิแอมแปร์ ทำการวัดค่าโดย P6015A Tektronix high voltage probe และ P6021A Tektronix current probe โดยระยะของตัวอย่างห่างจากแหล่งกำเนิดพลาสมา 2 เซนติเมตร

1. การทดสอบหาระยะเวลาน้อยที่สุดที่ใช้ในการกำจัดราแคนดิดาอัลบิแคนส์ได้อย่างมีประสิทธิภาพด้วยพลาสมาแบบนอน-เทอร์มอลที่ความดันบรรยากาศ โดยการหาปริมาณของราจากการนับจำนวนโคโลนีที่ปรากฏและโดยวิธีเอ็มทีที (MTT assay)

การเตรียมราแคนดิดาอัลบิแคนส์

ราแคนดิดาอัลบิแคนส์สายพันธุ์ ATCC 10231 (จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย) และสายพันธุ์คลินิก 2 สายพันธุ์ (จากผู้ป่วยโรคปากอักเสบเหตุฟันเทียมที่มารับการรักษาที่คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยไม่ได้แยกสายพันธุ์) ทำการเพาะเลี้ยงราแคนดิดาอัลบิแคนส์ทั้ง 3 สายพันธุ์ ในอาหารเลี้ยงจุลชีพแบบเหลว (Sabouraud Dextrose Broth; SDB) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนทำการทดสอบ

งานวิจัยได้ผ่านการรับรองโครงการศึกษาวิจัยในมนุษย์จากคณะกรรมการพิทักษ์สิทธิ สวัสดิภาพและป้องกันอันตรายของผู้ถูกวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เอกสารเลขที่ 6/2561 และผ่านการรับรองการอนุมัติให้ดำเนินการวิจัยด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ จากคณะกรรมการความปลอดภัยทางชีวภาพระดับส่วนงานชุดที่ 5 มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (Approval No. CMUIBC A-0561005)

1.1 การหาปริมาณของราโดยการนับจำนวนโคโลนีที่ปรากฏ⁽²⁹⁾

นำราแคนดิดาอัลบิแคนส์ที่เตรียมไว้มาปรับความเข้มข้นเริ่มต้นในหลอดทดลองให้มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 1×10^6 หน่วยก่อรูปโคโลนีต่อมิลลิเมตร (CFU/ml) นำมาเจือจางด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (phosphate-buffered saline; PBS) จนได้ความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^3 หน่วย

ก่อรูปโคโลนีต่อมิลลิเมตร จำนวน 2 มิลลิเมตร นำเชื้อ 100 ไมโครลิตร มาเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงจุลชีพแบบวุ้น (Sabouraud Dextrose Agar; SDA) ในจานเพาะเลี้ยงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร จำนวน 15 จาน แบ่งกลุ่มทดลองออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 3 จาน กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมที่ไม่ผ่านพลาสมา กลุ่มที่ 2, 3, 4 และ 5 เป็นกลุ่มทดลองที่นำไปสัมผัสพลาสมาเป็นเวลา 2, 5, 8 และ 10 นาที ตามลำดับ นำจานเพาะเลี้ยงทั้ง 15 จานบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีของราที่ปรากฏ เพื่อหาระยะเวลาน้อยที่สุดที่ใช้กำจัดราได้ไม่น้อยกว่าร้อยละ 80 ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งในราทั้ง 3 สายพันธุ์

1.2 การหาปริมาณของราโดยวิธีเอ็มทีที⁽²⁹⁾

นำราแคนดิดาอัลบิแคนส์ที่เตรียมมาปรับความเข้มข้นเริ่มต้นด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีนในหลอดทดลองให้มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 1×10^7 หน่วยก่อรูปโคโลนีต่อมิลลิเมตร นำเชื้อ 1 มิลลิเมตร จำนวน 15 หลอด ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้เชื้อตกตะกอนแบ่งกลุ่มทดลองออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 3 หลอด กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมที่ไม่สัมผัสพลาสมา กลุ่มที่ 2, 3, 4 และ 5 เป็นกลุ่มทดลอง เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ดูดเชื้อออกมา 25 ไมโครลิตร ใส่ในจานเพาะเลี้ยงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.5 เซนติเมตร นำกลุ่มทดลองไปสัมผัสพลาสมาที่ระยะห่าง 2 เซนติเมตร เป็นเวลา 2, 5, 8 และ 10 นาทีตามลำดับ จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงจุลชีพแบบเหลว (SDB) 100 ไมโครลิตร ลงในจานเพาะเลี้ยงเพื่อชะเซลล์เชื้อราที่ติดกับจานเพาะเลี้ยง ดูดเชื้อ 100 ไมโครลิตร จากจานเพาะเลี้ยง ใส่ในหลอดใหม่ เติมสาร 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิเมตร ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ในกลุ่มทดลองทั้ง 5 กลุ่ม ห่อด้วยฟอยล์ป้องกันแสงตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้เซลล์ตกตะกอน ดูดอาหารเลี้ยงจุลชีพแบบเหลว (SDB) ที่แยกชั้นออก เติมน้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ดูดน้ำกลั่นที่แยกชั้นออก เหลือเฉพาะเซลล์ราที่ตกตะกอน เติมไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide; DMSO) 70 ไมโครลิตร เพื่อละลายสารฟอร์มazan (formazan) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็น

เวลา 3 นาที ดูดสารละลายใส่ลงในจานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง ELISA microplate reader ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เพื่อหาปริมาณของเซลล์ที่มีชีวิต

2. การทดสอบประสิทธิภาพของพลาสติกแบบนอน-เทอร์มอลที่ความดันบรรยากาศในการกำจัดแผ่นชีวภาพของราแคนดิดาอัลบิแคนส์บนแผ่นเรซินอะคริลิกชนิดบ่มตัวด้วยความร้อน

การเตรียมแผ่นเรซินอะคริลิกชนิดบ่มตัวด้วยความร้อน

เตรียมแผ่นเรซินอะคริลิกชนิดบ่มตัวด้วยความร้อนรูปทรงกระบอก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร หนา 2 มิลลิเมตร (Vertex™ Heat-curing acrylics, Netherlands, Lot No. XK253P04) แช่ในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 37±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 50±2 ชั่วโมง เพื่อกำจัดมอนอเมอร์ตกค้าง⁽³⁰⁾ ทำการปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

การเตรียมน้ำลาย⁽³¹⁾

เก็บน้ำลายในสภาวะไม่ถูกกระตุ้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำมาปั่นที่แรงหมุนเหวี่ยง 1500xg เป็นเวลา 15 นาที ให้เศษอาหารตกตะกอน ใช้ปิเปตต์ดูดน้ำลายส่วนที่เป็นของเหลวเหนือตะกอนกรองด้วยกระดาษกรอง 0.45 ไมครอน (micro-pore membrane filter; Minisart®) เพื่อกรองจุลินทรีย์ออกจากน้ำลาย

การสร้างแผ่นชีวภาพของราแคนดิดาอัลบิแคนส์บนแผ่นเรซินอะคริลิก⁽³²⁾

นำแผ่นเรซินอะคริลิกแช่ในน้ำลายปริมาตร 200 ไมโครลิตร ในจานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อสร้างคราบน้ำลาย ดูดน้ำลายออกและเติมราแคนดิดาอัลบิแคนส์จำนวน 100 ไมโครลิตร (มีเชื้อประมาณ 1x10² หน่วยก่อรูปโคโลนี) บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที เพื่อให้เกิดการยึดติดของจุลินทรีย์ ดูดสารละลายออก ล้างแผ่นเรซินอะคริลิกด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ซาไลน์ 200 ไมโครลิตร จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์แบบเหลว (SDB) 200 ไมโครลิตร บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อสร้างแผ่นชีวภาพบนแผ่นเรซินอะคริลิก

การทำปริมาณของแผ่นชีวภาพของราแคนดิดาอัลบิแคนส์บนแผ่นเรซินอะคริลิก⁽⁸⁾

แบ่งกลุ่มแผ่นเรซินอะคริลิกที่มีแผ่นชีวภาพของราแคนดิดาอัลบิแคนส์ ออกเป็นกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง นำไปผ่านพลาสติกโดยวิธีที่อธิบายในการทดสอบหาระยะเวลาที่น้อยที่สุดที่ใช้ในการกำจัดแคนดิดาอัลบิแคนส์ได้ไม่น้อยกว่าร้อยละ 80 จากนั้นนำแผ่นเรซินอะคริลิกใส่ในหลอดที่มีอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์แบบเหลว (SDB) 1 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้แผ่นชีวภาพหลุดออกจากแผ่นเรซินอะคริลิก และกระจายตัว ดูดจุลินทรีย์ออกมา 100 ไมโครลิตร เกลี่ยให้กระจายทั่วอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์แบบวุ้น (SDA) บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีของราที่ปรากฏ ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งในราทั้ง 3 สายพันธุ์

นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงของแผ่นชีวภาพราแคนดิดาอัลบิแคนส์บนแผ่นเรซินอะคริลิกหลังได้รับพลาสติก ถูกศึกษาโดยสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 500 และ 5,000 เท่า

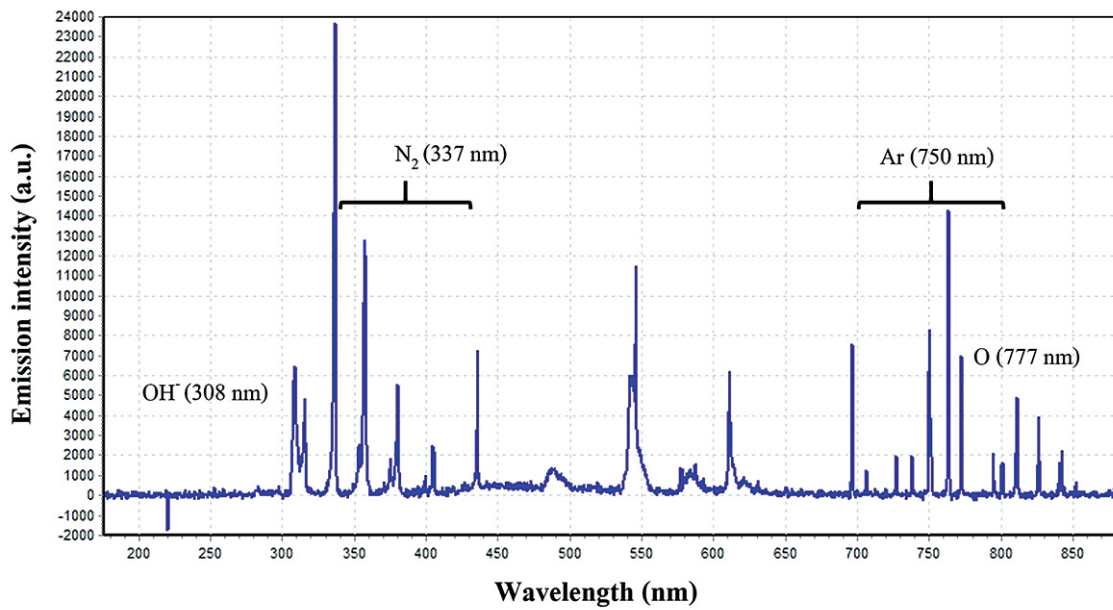
ผลการศึกษา

ข้อมูลจาก optical emission spectrum (OES) พบองค์ประกอบหลักของพลาสติกที่เกิดจากแก๊สอาร์กอน อัตราการไหล 5 ลิตรต่อนาที ประกอบด้วยอาร์กอนที่มีความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ออกซิเจนอะตอมที่มีความยาวคลื่น 777 นาโนเมตร ไนโตรเจนที่มีความยาวคลื่น 337 นาโนเมตร และไฮดรอกซิลเรดิคัลที่มีความยาวคลื่น 308 นาโนเมตร (รูปที่ 1) อนุภาคที่เกิดเป็นตัวเริ่มปฏิกิริยาในกระบวนการเพอร์ออกซิเดชันมีเป้าหมายอยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์^(14,25,26)

1. การทดสอบหาระยะเวลาที่น้อยที่สุดที่ใช้ในการกำจัดราแคนดิดาอัลบิแคนส์ได้อย่างมีประสิทธิภาพด้วยพลาสติกแบบนอน-เทอร์มอลที่ความดันบรรยากาศ โดยวิธีนับจำนวนโคโลนีที่ปรากฏและโดยวิธีเอ็มทีที

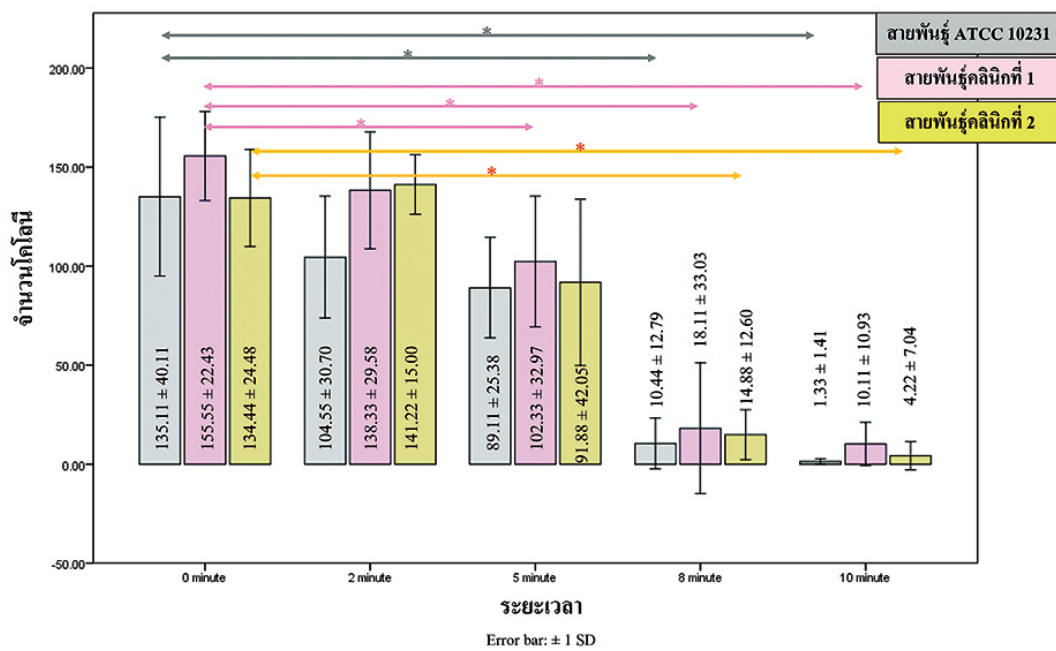
1.1 การหาปริมาณของราโดยการนับจำนวนโคโลนีที่ปรากฏ

ปริมาณราแคนดิดาอัลบิแคนส์ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองนำเสนอเป็นค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนี±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน



รูปที่ 1 Optical emission spectrum ของพลาสมาแบบนอน-เทอร์มอลที่ความดันบรรยากาศที่เกิดจากแก๊สอาร์กอน อัตราการไหล 5 ลิตร ต่อนาที

Figure 1 Optical emission spectrum of Ar plasma at gas flow 5 standard liter per minute.



*The mean difference is significant at the 0.05 level.

รูปที่ 2 ผลของระยะเวลาต่อการเจริญเติบโตของราแคนดิดาอัลบิแคนส์ทั้ง 3 สายพันธุ์ เมื่อสัมผัสกับพลาสมาแบบนอน-เทอร์มอลที่ความดันบรรยากาศ ทาบปริมาณของราโดยการนับจำนวนโคโลนีที่ปรากฏ

Figure 2 Exposure times of non-thermal atmospheric pressure plasma affecting on the growth of Candida albicans cultures examined by colony counting.

ความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลองและกลุ่มควบคุม วิเคราะห์ทั้ง 2 กลุ่ม ด้วยความแปรปรวนทางเดียว (One way ANOVA) หากมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างทั้ง 2 กลุ่ม ($p < 0.05$) จึงนำข้อมูลมาทำการเปรียบเทียบพหุคูณ (Multiple comparison) ด้วยต้นเน็ตที่ทรี (Dunnett T3) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จากการศึกษพบว่าปริมาณของราแคนดิดาอัลบิแคนส์ทั้ง 3 สายพันธุ์ ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อจุลชีพสัมผัสกับพลาสมาเป็นเวลา 8 หรือ 10 นาที โดยร้อยละ 88-99 ของการเจริญเติบโตของราแคนดิดาอัลบิแคนส์ทั้ง 3 สายพันธุ์ ถูกยับยั้งหลังสัมผัสพลาสมาเป็นเวลา 8 หรือ 10 นาที (รูปที่ 2)

1.2 การหาปริมาณของราโดยวิธีเอ็มทีที

ปริมาณราแคนดิดาอัลบิแคนส์ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองนำเสนอเป็นค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสง±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน วิเคราะห์ทั้ง 2 กลุ่ม ด้วยความแปรปรวนทางเดียว หากมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างทั้ง 2 กลุ่ม ($p < 0.05$) จึงนำข้อมูลมาทำการเปรียบเทียบพหุคูณ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 หลังการสัมผัสกับพลาสมาแบบนอน-เทอร์มอลที่ความดันบรรยากาศ ปริมาณของราแคนดิดาอัลบิแคนส์ทั้ง 3 สายพันธุ์ ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

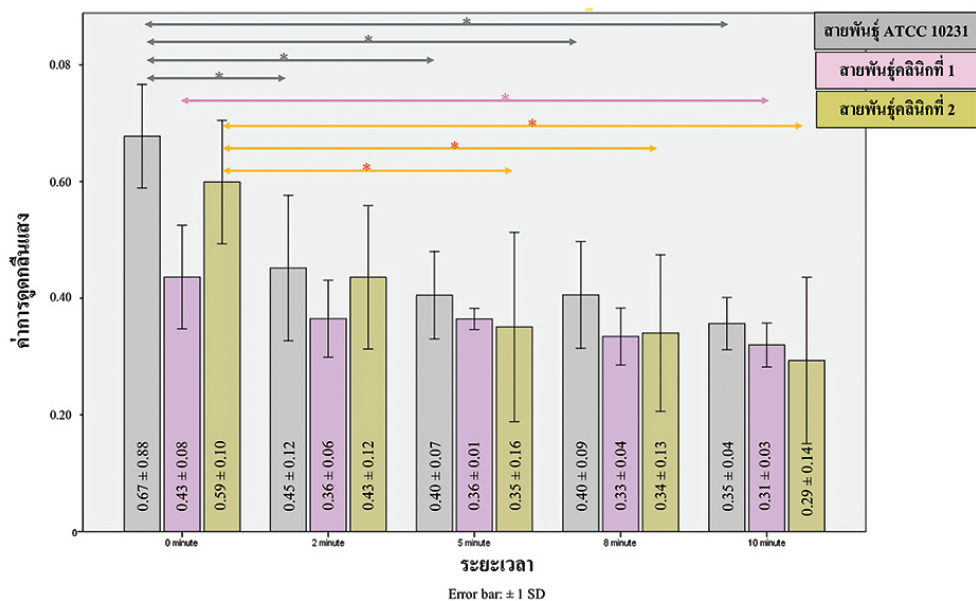
โดยร้อยละ 26-51 ของการเจริญเติบโตของราแคนดิดาอัลบิแคนส์ทั้ง 3 สายพันธุ์ ถูกยับยั้งหลังสัมผัสพลาสมาเป็นเวลา 2, 10 หรือ 5 นาที ตามลำดับ (รูปที่ 3)

การทดสอบโดยการนับจำนวนโคโลนีที่ปรากฏ จากการวิเคราะห์ค่าสถิติระยะเวลาที่น้อยที่สุดที่สามารถกำจัดราได้อย่างมีประสิทธิภาพ คือ 8 นาที

2. การทดสอบประสิทธิภาพของพลาสมาแบบนอน-เทอร์มอลที่ความดันบรรยากาศในการกำจัดแผ่นชีวภาพของราแคนดิดาอัลบิแคนส์บนแผ่นเรซินอะคริลิกชนิดบ่มตัวด้วยความร้อน

จากตารางที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ย logarithm (CFU/ml) ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของราทั้ง 3 สายพันธุ์ ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ได้รับพลาสมาเป็นเวลา 8 นาที พบว่าสามารถกำจัดหรือต้านแผ่นชีวภาพของราแคนดิดาอัลบิแคนส์ได้ลดลงประมาณ 2-log_{10} ถึง 4-log_{10} (ตารางที่ 1)

นอกจากนี้ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 500 เท่า พบว่าลักษณะแผ่นชีวภาพของกลุ่มควบคุมมีการสร้างสายราแทงงอกออกจากอีสต์เซลล์ (รูปที่ 4 A) ส่วนกลุ่มทดลองที่ได้รับพลาสมาเป็นเวลา 8 นาที พบว่าโครงสร้างแผ่นชีวภาพถูกทำลาย มีการลดลงของจำนวนเซลล์



*The mean difference is significant at the 0.05 level.

รูปที่ 3 ผลของระยะเวลาต่อการเจริญเติบโตของราแคนดิดาอัลบิแคนส์ทั้ง 3 สายพันธุ์ เมื่อสัมผัสกับพลาสมาแบบนอน-เทอร์มอลที่ความดันบรรยากาศ หาปริมาณของราโดยวิธีเอ็มทีที

Figure 3 Exposure times of non-thermal atmospheric pressure plasma affecting on the growth of Candida albicans examined by MTT assays.

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพของพลาสมาแบบนอน-เทอร์มอลที่ความดันบรรยากาศในการกำจัดหรือต้านแผ่นชีวภาพของราแคนดิดาอัลบิแคนส์ 3 สายพันธุ์ บนแผ่นเรซินอะคริลิก

Table 1 Efficiency of non-thermal atmospheric pressure plasma on biofilm formed by 3 strains of *Candida albicans* on acrylic resin samples.

กลุ่มการทดลอง	ค่าเฉลี่ย logarithm (CFU/ml) ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน		
	สายพันธุ์ ATCC 10231	สายพันธุ์คลินิกที่ 1	สายพันธุ์คลินิกที่ 2
กลุ่มควบคุม	4.85±0.27	5.26±0.33	5.56±0.19
กลุ่มที่สัมผัสพลาสมาเป็นเวลา 8 นาที	0.94±0.95*	2.79±0.63*	2.60±1.53*
Reduction factor (RF)	3.91	2.47	2.96

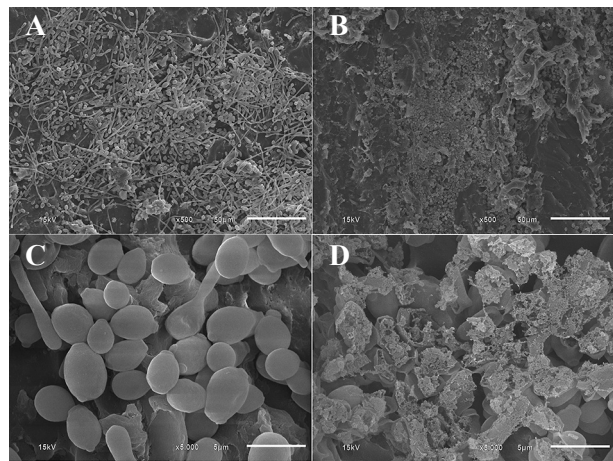
*The mean difference is significant at the 0.05 level.

และสายรา (รูปที่ 4 B) และที่กำลังขยาย 5,000 เท่า ภาพแสดงให้เห็นว่าโครงสร้างเซลล์ราที่อยู่ด้านบนของกลุ่มทดลองถูกทำลายอย่างรุนแรงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยเซลล์ราที่อยู่ด้านล่างยังมีลักษณะเซลล์ปกติ (รูปที่ 4 C และ D)

บทวิจารณ์

จากการศึกษาประสิทธิภาพของพลาสมาแบบนอน-เทอร์มอลที่ความดันบรรยากาศในการกำจัดหรือต้านราแคนดิดาอัลบิแคนส์ทั้ง 3 สายพันธุ์ ในสภาวะที่เป็นเซลล์เดี่ยว (planktonic cell) โดยการหาปริมาณของราด้วยการนับจำนวนโคโลนี และวิธีเอ็มทีที พบว่าราแคนดิดาอัลบิแคนส์ทั้ง 3 สายพันธุ์ มีจำนวนลดลงตามระยะเวลาที่ได้รับพลาสมามากขึ้น แต่วิธีเอ็มทีทีที่มีคาร์บอนการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อน้อยกว่าการนับจำนวนโคโลนี ซึ่งเกิดจากจำนวนจุลชีพเริ่มต้นที่ใช้ในการทดสอบของวิธีเอ็มทีทีนั้นมีมากกว่า

พลาสมาแบบนอน-เทอร์มอลที่ความดันบรรยากาศมีประสิทธิภาพในการกำจัดหรือต้านแผ่นชีวภาพของราแคนดิดาอัลบิแคนส์ทั้ง 3 สายพันธุ์ บนแผ่นเรซินอะคริลิก โดยพลาสมาสามารถกำจัดหรือต้านแผ่นชีวภาพของราแคนดิดาอัลบิแคนส์สายพันธุ์ ATCC 10231 (ลดลงประมาณ 4-log₁₀) ได้มากกว่าสายพันธุ์คลินิกทั้ง 2 สายพันธุ์ (ลดลงประมาณ 2-log₁₀ หรือ 3-log₁₀) ผลที่ได้อาจแสดงให้เห็นว่าราแคนดิดาอัลบิแคนส์สายพันธุ์ ATCC 10231 น่าจะไวต่อพลาสมาเมื่อเทียบกับสายพันธุ์คลินิก การศึกษานี้ไม่ได้บ่งบอกความรุนแรงในการก่อโรคระหว่างสายพันธุ์ ส่วนระยะเวลา 8 นาทีที่ใช้การทดสอบอาจจะไม่ใช่เวลาที่เหมาะสมที่สุดในการกำจัดหรือต้านแผ่นชีวภาพ เนื่องจากสภาวะของเชื้อในการทดสอบ



รูปที่ 4 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของแผ่นชีวภาพของราแคนดิดาอัลบิแคนส์สายพันธุ์คลินิกที่ 1 ในกลุ่มควบคุม (A, C) และกลุ่มทดลองที่ได้รับพลาสมาเป็นเวลา 8 นาที (B, D) (ที่กำลังขยาย 500 เท่า และ 5,000 เท่า)

Figure 4 SEM photographs of 1st clinical strain *Candida albicans* biofilm in the control group (A, C) and 8 minutes plasma treatment group (B, D) under magnifications x500 and x5000.

ส่วนที่ 1 เป็นเซลล์เดี่ยว เมื่อนำมาใช้ในการทดสอบส่วนที่ 2 เชื้อมีการสร้างแผ่นชีวภาพ มีปริมาณจุลชีพเริ่มต้นมากขึ้น นอกจากนี้ผลการศึกษานี้มีความสอดคล้องกับการศึกษาอื่นๆ โดย Matthes และคณะ⁽¹⁰⁾ และ Wang และคณะ⁽¹¹⁾ แม้จะให้ประสิทธิภาพระดับที่แตกต่างกัน

Matthes และคณะ⁽¹⁰⁾ ได้ศึกษาเกี่ยวกับประสิทธิภาพของพลาสมาแบบนอน-เทอร์มอลที่ความดันบรรยากาศชนิด

ได้อิเล็กทริกแบรีเออร์ดิสซาร์จ ของราสายพันธุ์ ATCC 10231 ในการกำจัดแผ่นชีวภาพบนแผ่นเรซินอะคริลิก ใช้แก๊สอาร์กอนที่อัตราการไหล 0.05 ลิตรต่อนาที ใช้ไฟฟ้ากระแสสลับความถี่ 40 กิโลเฮิร์ตซ์ 10 กิโลโวลต์ พบว่าสามารถกำจัดแผ่นชีวภาพได้แตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่เวลา 1, 5 และ 10 นาที ส่วน Wang และคณะ⁽¹¹⁾ ได้ศึกษาประสิทธิภาพของพลาสมาแบบนอน-เทอร์มอลที่ความดันบรรยากาศชนิดเจ็ท ของราสายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 10231 ในการกำจัดแผ่นชีวภาพบนแผ่นเรซินอะคริลิก ใช้แก๊สอาร์กอนและแก๊สออกซิเจนร้อยละ 2 ที่อัตราการไหล 5 ลิตรต่อนาที ใช้ไฟฟ้ากระแสสลับความถี่ 10 กิโลเฮิร์ตซ์ 18 กิโลโวลต์ พบว่าสามารถกำจัดแผ่นชีวภาพได้แตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่เวลา 1, 2, 4, 6 และ 8 นาที โดยไม่ปรากฏโคโลนีของราแคนดิดาอัลบิแคนส์หลังจากสัมผัสพลาสมาเป็นเวลา 8 นาที ส่วนประสิทธิภาพของพลาสมาแบบนอน-เทอร์มอลที่ความดันบรรยากาศในการกำจัดแผ่นชีวภาพของราแคนดิดาอัลบิแคนส์ที่แตกต่างนั้นน่าจะขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ลักษณะการผลิตพลาสมา ชนิดและปริมาณของแก๊ส กระแสไฟฟ้า ระยะห่างระหว่างพลาสมา กับจุลชีพ ระยะเวลาที่ได้รับพลาสมา ปริมาณจุลชีพเริ่มต้นในการทดลอง และวิธีการหาปริมาณจุลชีพ เป็นต้น

ในการศึกษาภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 5,000 เท่า พบโครงสร้างเซลล์ราแคนดิดาอัลบิแคนส์ทั้ง 3 สายพันธุ์ ถูกทำลายอย่างรุนแรงหลังสัมผัสพลาสมาเป็นเวลา 8 นาที ซึ่งสอดคล้องกับหลายการศึกษา^(11,19,20,33) แต่จากภาพยังพบเซลล์ราที่รูปร่างเซลล์ปกติอยู่ด้านล่างของแผ่นชีวภาพ (รูปที่ 4 D) หลักฐานในปัจจุบันเชื่อว่าอนุภาคที่เกิดจากพลาสมาเป็นตัวเริ่มปฏิกิริยาในกระบวนการเพอร์ออกซิเดชันมีเป้าหมายอยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์^(14,25,26) อนุภาคที่มีประจุจะมีผลโดยตรงก่อให้เกิดแรงทางไฟฟ้า ทำให้เกิดแรงดึงที่เยื่อหุ้มเซลล์จนเกิดการแตกของเยื่อหุ้มเซลล์^(16,25) โดยเกิดขึ้นกับเซลล์ราที่อยู่ด้านบนของแผ่นชีวภาพ สำหรับเซลล์ราที่อยู่ด้านล่างของแผ่นชีวภาพ จะได้รับผลกระทบโดยอ้อมจากปฏิกิริยาระหว่างพลาสมา กับของเหลวในเนื้อเยื่อเกิดเป็นอนุมูลอิสระที่ไม่เสถียร^(17,18) มีผลกระทบต่อสารส่งสัญญาณระหว่างเซลล์ และสามารถเกิดปฏิกิริยาเพอร์ออกซิเดชันได้อย่างรวดเร็วกับโปรตีน ชั้นไขมัน หรือดีเอ็นเอ เป็นสาเหตุที่ทำให้เซลล์ตายได้⁽²⁷⁾ ถึงแม้ว่า

รูปร่างของเซลล์รายังมีลักษณะปกติ

บทสรุป

ภายใต้ข้อจำกัดของการทดลอง สรุปได้ว่าพลาสมาแบบนอน-เทอร์มอลที่ความดันบรรยากาศมีประสิทธิภาพในการกำจัดหรือต้านแผ่นชีวภาพของราแคนดิดาอัลบิแคนส์ทั้งสายพันธุ์ ATCC 10231 และสายพันธุ์คลินิกอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นการนำพลาสมาไปใช้ในการควบคุมแผ่นชีวภาพของราแคนดิดาอัลบิแคนส์จึงอาจเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการดูแลอนามัยฟันเทียม เพื่อป้องกันการเกิดโรคปากอักเสบเหตุฟันเทียม อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับระยะเวลาที่เหมาะสม และความปลอดภัยในการนำไปใช้กับผู้ป่วย เป็นต้น ก่อนนำไปใช้ทางคลินิก

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ดร.ธนพัฒน์ ศาสตราวุฒิ ศูนย์วิจัยทางทันต-แพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้คำแนะนำด้านสถิติ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ที่สนับสนุนเครื่องพลาสมาต้นแบบ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ที่พัฒนาหัวกำเนิดพลาสมาแบบเส้น คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ประดิษฐ์แทนหมุนอัตราเร็วคงที่ และคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือ อุปกรณ์ ห้องปฏิบัติการวิจัย และจัดสรรทุนอุดหนุนงานวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประจำปีงบประมาณ 2561

เอกสารอ้างอิง

1. Institute for Population and Social Research Mahidol University, Fundamental of Thai Gerontology Research and development Institute. *Situation of the Thai Elderly 2016*. 1st ed. Bangkok: Amarin Printing and Publishing Public Company Limited; 2016: 138. (in Thai)
2. Gendreau L, Loewy ZG. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *J Prosthodont* 2011; 20(4): 251-260.
3. Jankittivong A, Aneksuk V, Langlais RP. Oral mucosal conditions in elderly dental patients. *Oral Dis* 2002; 8(4): 218-223.

4. Maller US, Karthik KS, Maller SV. Candidiasis in denture wearers-a literature review. *JIADS* 2010; 1(1): 27-30.
5. Koumoongkonkit R. *Denture stomatitis*. 3rd ed. Chiang Mai: Trio Advertising & Media Company Limited; 2013: 186. (in Thai)
6. Felton D, Cooper L, Duqum I, et al. Evidence-based guidelines for the care and maintenance of complete dentures: a publication of the American College of Prosthodontists. *J Prosthodont* 2011; 20 Suppl 1: S1-S12.
7. Nishi Y, Seto K, Kamashita Y, Take C, Kurono A, Nagaoka E. Examination of denture-cleaning methods based on the quantity of microorganisms adhering to a denture. *Gerodontology* 2012; 29(2): e259-266.
8. Wu T, Hu W, Guo L, et al. Development of a new model system to study microbial colonization on dentures. *J Prosthodont* 2013; 22(5): 344-350.
9. Brondani MA, Samim F, Feng H. A conventional microwave oven for denture cleaning: a critical review. *Gerodontology* 2012; 29(2): e6-15.
10. Matthes R, Jablonowski L, Koban I, et al. In vitro treatment of *Candida albicans* biofilms on denture base material with volume dielectric barrier discharge plasma (VDBD) compared with common chemical antiseptics. *Clin Oral Investig* 2015; 19(9): 2319-2326.
11. Wang GM, Sun PP, Pan H, et al. Inactivation of *Candida albicans* biofilms on polymethyl methacrylate and enhancement of the drug susceptibility by cold Ar/O₂ Plasma Jet. *Plasma Chem Plasma Process* 2016; 36: 383-396.
12. Sivakumar I, Arunachalam KS, Sajjan S, Ramaraju AV, Rao B, Kamaraj B. Incorporation of antimicrobial macromolecules in acrylic denture base resins: a research composition and update. *J Prosthodont* 2014; 23(4): 284-290.
13. Kim JH, Lee MA, Han GJ, Cho BH. Plasma in dentistry: a review of basic concepts and applications in dentistry. *Acta Odontol Scand* 2014; 72(1): 1-12.
14. Dobrynin D, Fridman G, Friedman G, Fridman A. Physical and biological mechanisms of direct plasma interaction with living tissue. *New J Phys* 2009; 11: 115020.
15. Liu D, Xiong Z, Du T, Zhou X, Cao Y, Lu X. Bacterial-killing effect of atmospheric pressure non-equilibrium plasma jet and oral mucosa response. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2011; 31(6): 852-856.
16. Hoffmann C, Berganza C, Zhang J. Cold atmospheric plasma: methods of production and application in dentistry and oncology. *Med Gas Res* 2013; 3(1): 21.
17. von Woedtke T, Metelmann HR, Weltmann KD. Clinical plasma medicine: state and perspectives of in vivo application of cold atmospheric Plasma. *Contrib Plasma Phys* 2014; 54(2): 104-117.
18. Weltmann KD, von Woedtke T. Plasma medicine-current state of research and medical application. *Plasma Phys Control Fusion* 2017; 59: 014031.
19. Xiong Z, Lu XP, Feng A, Pan Y, Ostrikov K. Highly effective fungal inactivation in He+O₂ atmospheric-pressure nonequilibrium plasmas. *Physics of Plasma* 2010; 17: 123502.
20. Koban I, Matthes R, Hübner NO, et al. Treatment of *Candida albicans* biofilms with low-temperature plasma induced by dielectric barrier discharge and atmospheric pressure plasma jet. *New J Phys* 2010; 12: 073039.
21. Lu X, Xiong Z, Zhao F, Xian Y, Xiong Q. A simple atmospheric pressure room-temperature air plasma needle device for biomedical applications. *Appl Phys Lett* 2009; 95(18).

22. Lloyd G, Friedman G, Jafri S, Schultz G, Fridman A, Harding K. Gas plasma: medical uses and developments in wound care. *Plasma Process Polym* 2010; 7(3-4): 194-211.
23. Hasse S, Duong Tran T, Hahn O, et al. Induction of proliferation of basal epidermal keratinocytes by cold atmospheric-pressure plasma. *Clin Exp Dermatol* 2016; 41(2): 202-209.
24. Dezest M, Chavatte L, Bourdens M, et al. Mechanistic insights into the impact of Cold Atmospheric Pressure Plasma on human epithelial cell lines. *Sci Rep* 2017; 7: 41163.
25. Stoffels E, Sakiyama Y, Graves DB. Cold atmospheric plasma: charged species and their interactions with cells and tissues. *IEEE Transactions on Plasma Science* 2008; 36(4): 1441-1457.
26. Fridman G, Brooks AD, Balasubramanian M, et al. Comparison of direct and indirect effects of non-thermal atmospheric-pressure plasma on bacteria. *Plasma Process Polym* 2007; 4(4): 370-375.
27. Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J* 1996; 313: 17-29.
28. Lackmann JW, Schneider S, Edengeiser E, et al. Photons and particles emitted from cold atmospheric-pressure plasma inactivate bacteria and biomolecules independently and synergistically. *J R Soc Interface* 2013; 10(89): 20130591.
29. Park G, Ku YB, Jung G, et al. Analysis of the biological effects of a non-thermal plasma on *Saccharomyces Cerevisiae*. *JKPS* 2012; 60(6): 916-920.
30. Association Ad. Revised American Dental Association specification no. 12 for denture base polymers. *J Am Dent Assoc* 1975; 90: 451-458.
31. Navazesh M. Methods for collecting saliva. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 694: 72-77.
32. Costa AC, Pereira CA, Freire F, Junqueira JC, Jorge AO. Methods for obtaining reliable and reproducible results in studies of *Candida* biofilms formed in vitro. *Mycoses* 2013; 56(6): 614-622.
33. Shi XM, Zhang GJ, Yuan YK, Ma Y, Xu GM, Yang Y. Research on the inactivation effect of low-temperature plasma on *Candida albicans*. *IEEE Transactions on Plasma Science* 2008; 36(2): 498-503.



THE 5TH THAI-GERMAN DENTAL CONGRESS

Esthetic and Implantology: Integrated Biology and Digital Dentistry

8 - 10 January 2020, Chiang Mai, Thailand

Venue: The Empress Convention Centre, Empress Hotel

for more information:

www.tgdentalcongress.com



WWW.TGDENTALCONGRESS.COM

