บทวิทยาการ
Original Article

การสร้างแผ่นชีวภาพนอกกายของแบคทีเรียที่แยกได้จากคลองรากฟัน: การศึกษานำร่อง

In Vitro Biofilm Formation from Root Canal Isolates: A Pilot Study

วีริยา จิระวโรภาส[1], แสงอุษา เขมาลีลากุล[2]
[1]นักศึกษาหลักสูตรประกาศนียบัตรบัณฑิตชั้นสูง สาขาวิทยาเอ็นโดดอนต์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
[2]ภาควิชาทันตกรรมบูรณะและปริทันตวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Weriya Jirawaropas[1], Saengusa Khemaleelakul[2]
[1]Highgraduate Student (Endodontics), Faculty of Dentistry, Chiang Mai University
[2]Department of Restorative Dentistry and Periodontology, Faculty of Dentistry, Chiang Mai University

ชม.ทันตสาร 2555; 33(1) : 51-61
CM Dent J 2012; 33(1) : 51-61

บทคัดย่อ

ในคลองรากฟันที่ติดเชื้อมักพบแบคทีเรียหลายชนิดอยู่ร่วมกันในลักษณะของแผ่นชีวภาพ แม้จะมีหลักฐานการค้นพบแผ่นชีวภาพในคลองรากฟันมานานแล้ว แต่ความรู้เรื่องกลไกการเกิดแผ่นชีวภาพยังมีน้อยมาก การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างแผ่นชีวภาพของแบคทีเรียที่แยกได้จากคลองรากฟันโดยใช้สภาวะของอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์จากหนองของผู้ป่วยรายหนึ่งมาสร้างแผ่นชีวภาพบนผนังคลองรากฟันวัวและกระจกปิดสไลด์ในสภาวะอาหารเข้มข้นและเจือจางเป็นเวลา 1 สัปดาห์ และ 4 สัปดาห์ จากนั้นศึกษาโครงสร้างของแผ่นชีวภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดและตรวจสอบความมีชีวิตของแบคทีเรียภายในแผ่นชีวภาพด้วยสีย้อมเซลล์มีชีวิต แล้วนำไปบันทึกภาพ

Abstract

Biofilms in infected root canals are known as multispecies biofilms, which are composed of restricted groups of bacteria. Even though evidence of biofilm in infected root canals has been reported, the knowledge of biofilm formation in root canals is still limited. The aim of this study was to generate biofilm from root canal isolates under different nutrient conditions. Five species of bacteria isolated from an infected root canal were cultured on bovine root canal dentin and on cover slips in rich and in diluted media for one and for four weeks. The biofilm formation was examined by scanning electron microscopy. The viability of bacterial cells in the

Corresponding Author:

แสงอุษา เขมาลีลากุล
อาจารย์ ดร.ภาควิชาทันตกรรมบูรณะและปริทันตวิทยา
คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 50200

Saengusa Khemaleelakul
Lecturer, Dr., Department of Restorative Dentistry and Periodontology, Faculty of Dentistry,
Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand.
E-Mail: saengusa_k@yahoo.com

ด้วยกล้องจุลทรรศน์คอนโฟคัล เลเซอร์ สแกนนิง ผลการศึกษาพบว่ามีแผ่นชีวภาพเกิดขึ้นบนผนังคลองรากฟันวัวมากกว่าบนกระจกปิดสไลด์ โดยแบคทีเรียที่พบในแผ่นชีวภาพที่เวลา 1 สัปดาห์ส่วนใหญ่เป็นกลุ่มแบคทีเรียรูปกลมมีส่วนน้อยเป็นรูปแท่ง และที่ 4 สัปดาห์พบแบคทีเรียรูปแท่งมากขึ้นและเกาะอยู่กับแบคทีเรียรูปกลม นอกจากนี้ยังพบว่าในสภาวะอาหารเจือจางเกิดแผ่นชีวภาพที่มีแบคทีเรียหนาแน่นกว่าสภาวะอาหารเข้มข้น โดยในทั้งสองสภาวะพบแบคทีเรียที่มีชีวิตมากกว่าแบคทีเรียที่ตายแล้ว การศึกษานี้สรุปได้ว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากคลองรากฟันมีความสามารถในการสร้างแผ่นชีวภาพในสภาวะนอกกายบนผนังคลองรากฟันวัวได้ดีในสภาวะอาหารที่เจือจางกว่าและภายในสัปดาห์ที่สี่จะพบการเกาะกลุ่มของแบคทีเรียรูปกลมและแท่ง

คำสำคัญ: แผ่นชีวภาพ เอ็นโดดอนติกส์ กล้องจุลทรรศน์คอนโฟคัล เลเซอร์ สแกนนิง สีย้อมเซลล์มีชีวิต

biofilm was analyzed by viability stain and confocal laser scanning microscopy. A greater amount of mixed-species bacterial aggregation was found on bovine root canal dentin than on cover slips. Cocci were predominantly observed in the one-week biofilms, with very few rods, whereas more rods co-aggregated with cocci were found in the four-week biofilms. Furthermore, biofilm formation in diluted medium was greater than that in rich medium. More live bacteria than dead cells were found in both media. It was concluded that the root canal isolates could form biofilm *in vitro* on bovine root canal dentin in diluted medium and that the co-aggregation between cocci and rods was found in the four-week biofilms.

Keywords: Biofilm, Endodontics, Confocal Laser Scanning Microscope, Viability stain

บทนำ

แบคทีเรียเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคในเนื้อเยื่อใน (pulp) และเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟัน (periapical tissue)[1] โดยพบว่าการติดเชื้อภายในคลองรากฟันจะเป็นการติดเชื้อร่วมกันหลายชนิด (mixed infection)[2-4] เป้าหมายหลักของการรักษาคลองรากฟันคือการกำจัดเชื้อภายในคลองรากฟันดังกล่าวเพื่อกระตุ้นให้เกิดการหายของเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟัน

แบคทีเรียที่อาศัยในแหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติส่วนใหญ่มักอยู่ร่วมกันในรูปของแผ่นชีวภาพเพื่อป้องกันตนเองจากสิ่งแวดล้อม[5,6] Nair และคณะได้แสดงหลักฐานการเกิดแผ่นชีวภาพในคลองรากฟันเป็นครั้งแรก[7] ต่อมาได้มีหลักฐานมากมายแสดงให้เห็นว่าในฟันที่ติดเชื้อสามารถพบแผ่นชีวภาพได้บนผนังคลองรากฟันบริเวณปลายรากฟันที่มีการละลาย และบนกัตตาเปอร์ชา (gutta-percha) ที่อุดเกินปลายราก[8-13]

โครงสร้างของแผ่นชีวภาพประกอบด้วยกลุ่มแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ประกอบกันเป็นโครงสร้างรูปร่างคล้ายเห็ดขนาดเล็ก (mushroom-shaped microcolonies) ในแต่ละกลุ่มของแบคทีเรียนี้อาจประกอบด้วยแบคทีเรียต่างชนิดกันและมีสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน ผิวด้านนอกของแผ่นชีวภาพจะถูกปกคลุมด้วยสารองค์ประกอบนอกเซลล์ (extracellular matrix) ที่ผลิตขึ้นจากแบคทีเรียเองซึ่งเป็นสารประเภทเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ (exopolysaccharides) ทำหน้าที่ป้องกันแผ่นชีวภาพจากสิ่งแวดล้อมและแรงกล (physical forces) ที่เป็นอันตรายจากภายนอก อีกทั้งยังทำให้แบคทีเรียในแผ่นชีวภาพมีความสามารถในการทนต่อยาฆ่าเชื้อได้มากกว่าแบคทีเรียที่ล่องลอย (planktonic bacteria) ถึง 1000 เท่า[14-16] ในแผ่นชีวภาพมีช่องทางไหลของของเหลว (fluid channels) อยู่ภายใน ซึ่งเป็นช่องทางให้มีการไหลผ่านของอาหารและออกซิเจนไปสู่บริเวณต่างๆ ภายในแผ่นชีวภาพ และยังเป็นช่องทางส่งผ่านเอ็นไซม์หรือเมตาบอไลท์ (metabolites) ตลอดจนของเสีย

(waste products) ที่แบคทีเรียสร้างขึ้นอีกด้วย[17]

ปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับการเกิดแผ่นชีวภาพในคลองรากฟัน นอกจากนี้การทดสอบประสิทธิภาพของยาหรือน้ำยาที่ใช้ในการรักษาคลองรากฟันมักทดสอบกับเชื้อที่ล่องลอยหรือทดสอบกับแผ่นชีวภาพของเชื้อชนิดเดียว (monospecies) ซึ่งมักเป็นเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน[18-26] ที่มีความแตกต่างจากเชื้อที่แยกได้จากสภาวะจริงในคลินิก ดังนั้นความรู้เรื่องกระบวนการเกิดแผ่นชีวภาพตลอดจนประสิทธิภาพของวิธีการกำจัดแผ่นชีวภาพในคลองรากฟันจึงยังมีอยู่จำกัด การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างแผ่นชีวภาพจากแบคทีเรียที่แยกได้จากคลองรากฟัน เพื่อจะได้นำไปประยุกต์ใช้ศึกษาถึงวิธีการต่างๆ ในการกำจัดเชื้อออกจากผนังคลองรากฟันต่อไป

ระเบียบและวิธีการศึกษา

การเตรียมโคทติง บัฟเฟอร์ผสมน้ำลาย

นำน้ำลายจากอาสาสมัคร 1 คนจำนวน 1.5 มิลลิลิตรไปกรองผ่านเยื่อกรอง (membrane filter) ที่มีรูเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2 ไมครอน แล้วนำมาผสมกับสารละลายโคทติง บัฟเฟอร์ (coating buffer; 0.02 M Na2CO3, 0.02 M Na2HCO3, pH 9.3) ที่ปราศจากเชื้อจำนวน 1000 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การเตรียมพื้นผิวสำหรับการยึดเกาะของแผ่นชีวภาพ

การทดสอบการสร้างแผ่นชีวภาพจะทำบนพื้นผิว 2 ชนิด ได้แก่ 1) บนผนังคลองรากฟันวัว เพื่อนำมาวิเคราะห์โครงสร้างของแผ่นชีวภาพ และ 2) บนกระจกปิดสไลด์ เพื่อนำมาตรวจสอบความมีชีวิตของแบคทีเรียในแผ่นชีวภาพ

นำฟันตัดล่างซี่กลางของวัว 10 ซี่ มากรอตัดส่วนตัวฟันออกที่รอยต่อระหว่างเคลือบฟันกับเคลือบรากฟัน (cemento-enamel junction) และตัดอีกครั้งที่ส่วนกลางของรากฟันให้เหลือรากฟันส่วนต้นยาว 5 มิลลิเมตร จากนั้นแบ่งรากฟันในแนวใกล้กลางและไกลกลางออกเป็น 2 ส่วน นำไปแช่ในน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.9 และฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำ (autoclave) เป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส

นำกระจกปิดสไลด์รูปกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 มิลลิเมตร จำนวน 16 แผ่นมาทำความสะอาดพื้นผิวโดยแช่ในกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 2 นอมัล (2N HCl) เป็นเวลา 7 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นสองครั้ง จากนั้นล้างด้วยสารละลายอะซีโตน (acetone) แล้วปล่อยให้แห้ง นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำเป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส

การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

ใช้แบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมดจากคลองรากฟันของผู้ป่วยรายหนึ่งที่มีสภาวะคลองรากฟันอักเสบแบบเฉียบพลัน (acute apical abscess) ซึ่งประกอบด้วยแบคทีเรียทั้งหมด 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Prevotella intermedia, Prevotella oralis, Prevotella buccae, Prevotella baroniae* และ *Streptococcus constellatus* โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งเติมเลือด (supplemented blood agar) ที่มีฮีมิน (hemin) ร้อยละ 0.0005 และเมนาไดโอน (menadione) ร้อยละ 0.0001 เป็นเวลา 48 ชั่วโมงในตู้บ่มเชื้อแบบไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง จากนั้นนำโคโลนี (colonies) ของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มาเพาะเลี้ยงข้ามคืนในอาหารเหลวชนิดทริปทิเคส ซอย (trypticase soy broth) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จนอาหารมีความขุ่นประมาณ 0.5 (สำหรับเชื้อกลุ่ม *Prevotella*) และ 0.7 (สำหรับเชื้อกลุ่ม Streptococcus) เมื่อวัดค่าความขุ่นด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer, Beckman DU650, California, USA) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ซึ่งได้ทดสอบแล้วว่าจะมีปริมาณเชื้อที่มีชีวิตประมาณ $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นปั่นหลอดเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่องเหวี่ยงสาร (centrifuge) ที่ความเร็ว 4800 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อให้เชื้อตกตะกอนที่ก้นหลอด ดูดส่วนเหนือตะกอน (supernatant) ออก เติมสารละลายพีบีเอส (PBS; phosphate buffer saline) จนมีปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าหลอดทดลองเป็นเวลา 1 นาที โดยตลอดกระบวนการนี้กระทำภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิห้อง จะได้สารละลายที่มีเชื้อแต่ละชนิดประมาณ $1x10^9$ เซลล์ต่อ

มิลลิลิตร

ขั้นตอนการสร้างแผ่นชีวภาพ

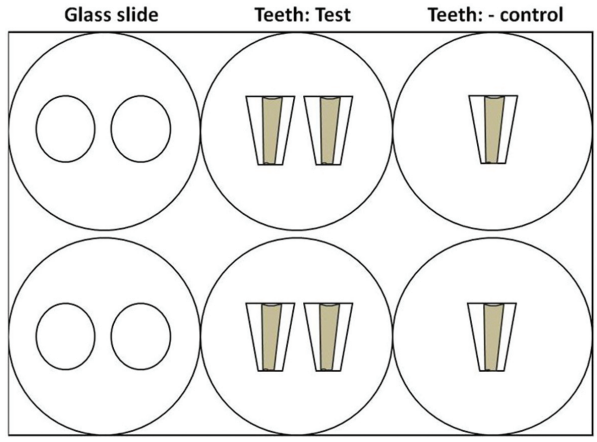
แบ่งกลุ่มทดลองออกเป็นกลุ่มย่อย 4 กลุ่ม ได้แก่ 1) กลุ่มสภาวะอาหารเข้มข้น ระยะเวลา 1 อาทิตย์ 2) กลุ่มสภาวะอาหารเข้มข้น ระยะเวลา 4 อาทิตย์ 3) กลุ่มสภาวะอาหารเจือจาง ระยะเวลา 1 อาทิตย์ 4) กลุ่มสภาวะอาหารเจือจาง ระยะเวลา 4 อาทิตย์

นำจานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 6 หลุม (six-well plate) จำนวน 4 จาน ที่มีฟันวัว และกระจกปิดสไลด์ (ดังรูป 1) มาเคลือบพื้นผิวด้วยสารละลายโคทติง บัฟเฟอร์ผสมน้ำลายปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน จากนั้นดูดสารละลายออกแล้วเติมอาหารเหลวชนิดคุกมีท (cooked meat medium; Oxoid, Cambridge, UK) ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตรลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 2 จาน ส่วนในจานเพาะเลี้ยงเซลล์อีก 2 จานใช้อาหารเหลวชนิดคุกมีทที่เจือจางความเข้มข้นลงครึ่งหนึ่ง จากนั้นเติมแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ๆ ละ 300 ไมโครลิตร (ซึ่งมีปริมาณเชื้อที่มีชีวิตชนิดละประมาณ $3x10^8$ เซลล์) ลงในทุกหลุม ยกเว้นหลุมที่เป็นกลุ่มควบคุมผลลบ นำไปเพาะเลี้ยงในตู้บ่มเชื้อแบบไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุกๆ 2 วัน โดยดูดอาหารเดิมออก 2.5 มิลลิลิตรแล้วเติมอาหารใหม่ในปริมาตรเท่ากัน เขย่าเบาๆ ให้อาหารผสมกัน แล้วเพาะเลี้ยงต่อไป เมื่อครบ 1 สัปดาห์ (กลุ่ม 1 และ 3) หรือ 4 สัปดาห์ (กลุ่ม 2 และ 4) จึงใช้ปิเปตดูดอาหารเลี้ยงเชื้อออกทั้งหมดแล้วล้างด้วยสารละลายพีบีเอส 2 ครั้ง เพื่อกำจัดเซลล์ที่ไม่ยึดเกาะกับพื้นผิวออกไป แล้วเติมสารละลายพีบีเอสในทุกหลุม จากนั้นนำผนังคลองรากฟันวัวและกระจกปิดสไลด์ไปตรวจสอบการเกิดแผ่นชีวภาพต่อไป

การตรวจสอบการเกิดแผ่นชีวภาพ

การตรวจสอบโครงสร้างของแผ่นชีวภาพบนผนังคลองรากฟันวัว

นำฟันวัวที่แช่ในสารละลายพีบีเอสไปทำให้คงสภาพ (fixation) ด้วยสารละลายกลูตาราลดีไฮด์ (glutaraldehyde) ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 และสารละลายออสเมียมเตตราออกไซด์ (osmium tetraoxide) ความเข้มข้นร้อยละ 1 แล้วล้างออกด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PO_4 Buffer) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ทำการดึงน้ำออก (dehydrated) ด้วยสารละลายเอธานอล (ethanol) ความเข้มข้นร้อยละ 30, 50, 80 และ 100 ตามลำดับ จากนั้นจึงทำให้แห้งและพ่นทับด้วยทอง (gold coating) นำไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (scanning electron microscope; JEOL JSM-5410LV, Tokyo, Japan) และบันทึกภาพแผ่นชีวภาพที่เกิดขึ้น



รูปที่ 1 *แสดงรากฟันวัวและแผ่นกระจกปิดสไลด์ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 6 หลุม*

Figure 1 *Bovine roots and glass slides in a 6-well plate.*

การตรวจสอบความมีชีวิตของแบคทีเรียในแผ่นชีวภาพบนกระจกปิดสไลด์

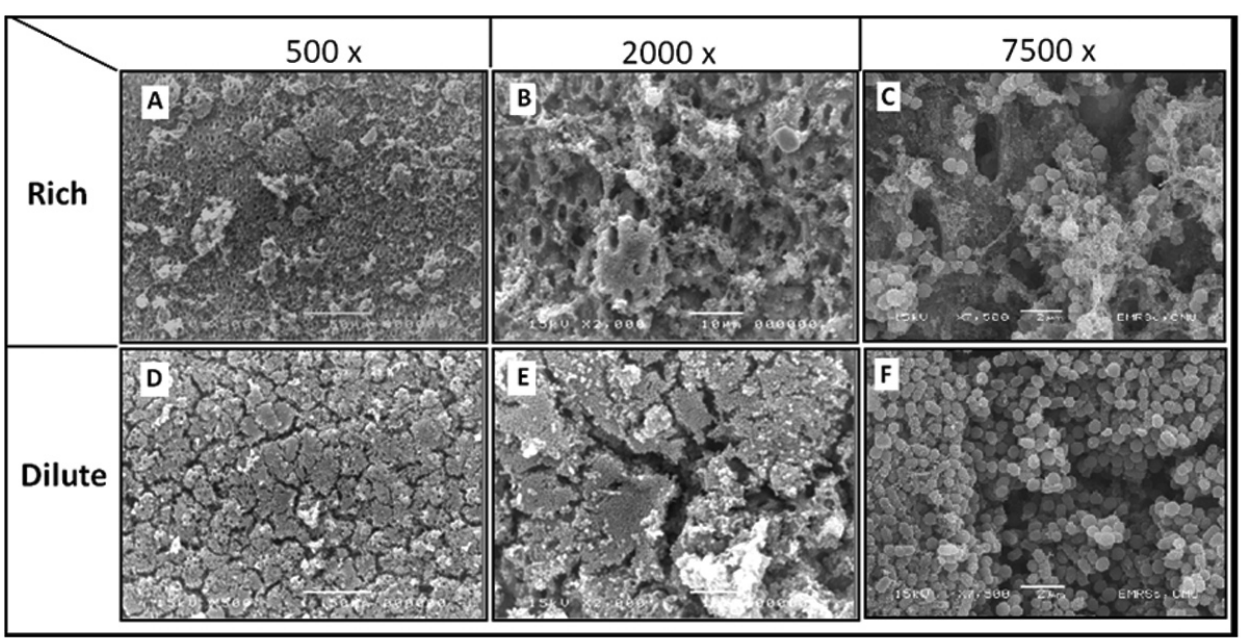
นำแผ่นกระจกปิดสไลด์ที่มีแผ่นชีวภาพติดบนพื้นผิวมาย้อมด้วยสีย้อมเซลล์มีชีวิตชนิดไลฟ์เดด แบค ไลท์ (Live/Dead *Bac* Light viability stain; Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) ซึ่งประกอบด้วยสารฟลูออเรสเซนท์สีเขียวชนิดซัยโต 9 (syto 9) และสารฟลูออเรสเซนท์สีแดงชนิดโพรพิเดียม ไอโอไดด์ (propidium iodide) โดยวางแผ่นกระจกปิดสไลด์บนแผ่นแก้วย้อมแกรม หยดสารละลายซัยโต 9 ความเข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ลงไปให้ทั่วแผ่นกระจกปิดสไลด์ ทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาทีในที่มืด จากนั้นจึงหยดสารละลายโพรพิเดียม ไอโอ

ไดด์ ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์อีกแผ่นหนึ่งแล้วนำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์คอนโฟคัล เลเซอร์ สแกนนิง (confocal laser scanning microscope; Nikon Digital Eclipse C1 plus, Tokyo, Japan) โดยจะบันทึกภาพของแผ่นชีวภาพจากผิวด้านบนแล้วค่อยลึกลงไปทีละชั้นๆ ละ 1 ไมครอน เซลล์ที่มีชีวิตจะติดสีเขียวส่วนเซลล์ที่ตายจะติดสีแดงหรือสีส้ม

ผลการศึกษา

ผลการตรวจแผ่นชีวภาพบนผนังคลองรากฟันวัวด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด

ไม่พบการเกิดแผ่นชีวภาพบนผนังคลองรากฟันวัวในกลุ่มควบคุมเลย ส่วนกลุ่มทดลองพบว่ามีแผ่นชีวภาพเกิดขึ้นในทุกตัวอย่าง โดยในสภาวะที่มีอาหารและระยะเวลาแตกต่างกันจะเกิดแผ่นชีวภาพที่มีลักษณะแตกต่างกันด้วย โดยในสภาวะอาหารเจือจางพบว่าเกิดแผ่นชีวภาพที่มีแบคทีเรียหนาแน่นกว่าในสภาวะอาหารเข้มข้น (รูป 2 และ 3) ทั้งนี้ปริมาณแบคทีเรียจะเพิ่มมากขึ้นตามเวลา โดยเมื่อสังเกตแผ่นชีวภาพที่กำลังขยายต่ำพบว่า ในกลุ่มสภาวะอาหารเข้มข้นมีแบคทีเรียเกาะกลุ่มกระจายอยู่ทั่วไปไม่หนาแน่น อีกทั้งยังสามารถเห็นลักษณะผนังคลองรากฟันที่มีรูเปิดของท่อเนื้อฟันกระจายอยู่ทั่วไป และบางตำแหน่งมีการยกตัวขึ้นมาของพื้นผิวคลองรากฟัน (รูป 2A, 2B, 3A, 3B) ส่วนในกลุ่มสภาวะอาหารเจือจางนั้นแบคทีเรียในแผ่นชีวภาพเบียดตัวกันหนาแน่นหลายชั้นจนมองไม่เห็นพื้นผิวของผนังคลองรากฟันเลย พบมีรอยแยกและมีรูกระจายอยู่ทั่วไปบนแผ่นชีวภาพด้วย (รูป 2D, 2E, 3D, 3E) เมื่อดูด้วย



รูปที่ 2 *ภาพตัวอย่างจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด แสดงแผ่นชีวภาพบนผนังคลองรากฟันวัวที่ระยะเวลา 1 สัปดาห์ ในสภาวะอาหารแตกต่างกัน*

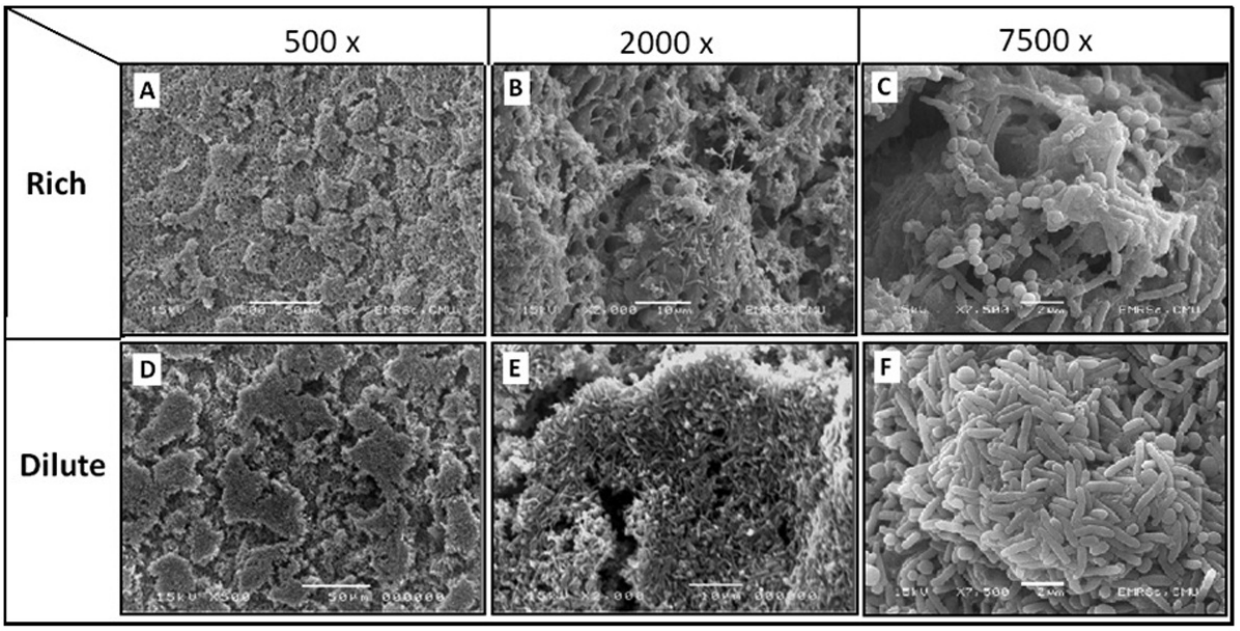
A, B, C แสดงแผ่นชีวภาพในสภาวะที่มีอาหารเข้มข้น เมื่อดูภายใต้กำลังขยาย 500, 2000, 7500 เท่า ตามลำดับ

D, E, F แสดงแผ่นชีวภาพในสภาวะที่มีอาหารเจือจาง เมื่อดูภายใต้กำลังขยาย 500, 2000, 7500 เท่า ตามลำดับ

Figure 2 *Representative SEM images of 1-week biofilms generated on bovine dentin in different nutrient conditions.*

A, B, C present the biofilms in rich condition when observed under 500x, 2000x, 7500x, respectively.

D, E, F present the biofilms in diluted condition when observed under 500x, 2000x and 7500x, respectively.



รูปที่ 3 *ภาพตัวอย่างจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด แสดงแผ่นชีวภาพบนผนังคลองรากฟันวัวที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์ ในสภาวะอาหารแตกต่างกัน*

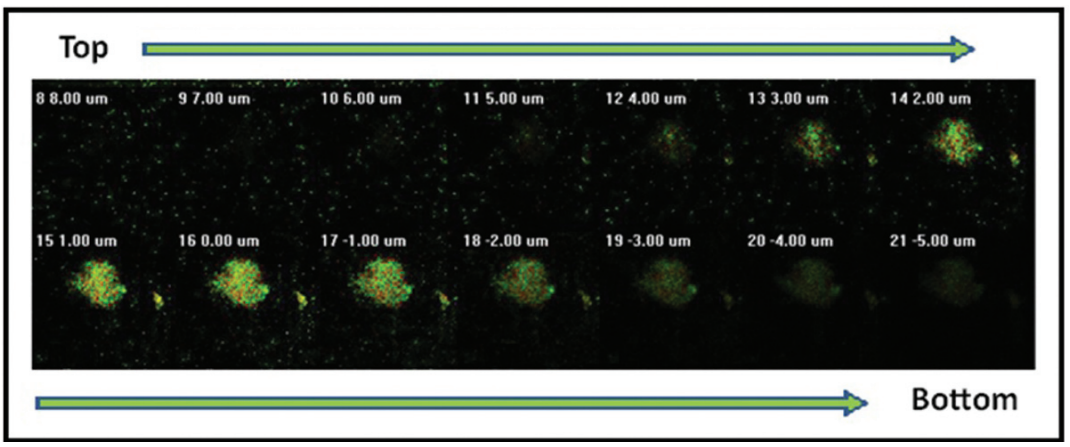
A, B, C แสดงแผ่นชีวภาพในสภาวะที่มีอาหารเข้มข้น เมื่อดูภายใต้กำลังขยาย 500, 2000, 7500 เท่า ตามลำดับ

D, E, F แสดงแผ่นชีวภาพในสภาวะที่มีอาหารเจือจาง เมื่อดูภายใต้กำลังขยาย 500, 2000, 7500 เท่า ตามลำดับ

Figure 3 *Representaive SEM images of 4-week biofilms generated on bovine dentin in different nutrient conditions.*

A, B, C present the biofilms in rich condition when observed under 500x, 2000x, 7500x, respectively.

D, E, F present the biofilms in diluted condition when observed under 500x, 2000x and 7500x, respectively.



รูปที่ 4 *แสดงภาพตัดขวางของแผ่นชีวภาพที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์ เมื่อถ่ายจากด้านบนลงล่าง (ชั้นละ 1 ไมครอน) ด้วยกล้องจุลทรรศน์คอนโฟคัล เลเซอร์ สแกนนิง กำลังขยาย 1000 เท่า*

Figure 4 *Representative series of CLSM images (1 μm in width) from top to bottom of a 4-week biofilm, 1000X.*

กำลังขยายที่มากขึ้นพบว่า แผ่นชีวภาพที่ระยะเวลา 1 สัปดาห์จะพบแบคทีเรียรูปกลมเป็นส่วนใหญ่ (รูป 2C, 2F) ในขณะที่แผ่นชีวภาพที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์จะพบแบค-ทีเรียรูปแท่งมากขึ้นและเกาะอยู่กับแบคทีเรียรูปกลม (รูป 3C, 3F)

ผลการตรวจสอบความมีชีวิตของแบคทีเรียในแผ่นชีวภาพบนกระจกปิดสไลด์

เมื่อตรวจสอบความมีชีวิตของแบคทีเรียในแผ่นชีวภาพบนกระจกปิดสไลด์พบว่า กลุ่มที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์มีความหนาของแผ่นชีวภาพเพียงเล็กน้อยทั้งในสภาวะที่มีอาหารเข้มข้นและอาหารเจือจาง จึงอ่านผลจากกลุ่มที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์เท่านั้น ซึ่งจะมีความหนาของแผ่นชีวภาพประมาณ 8-10 ไมครอน โดยพบว่าแผ่นชีวภาพประกอบไปด้วยเซลล์ที่มีชีวิต (ติดสีเขียว) เป็นส่วนใหญ่ทั้งในกลุ่มที่มีสภาวะอาหารเข้มข้นและในสภาวะที่มีอาหารเจือจาง โดยพบแบคทีเรียที่ยังมีชีวิตอยู่ในทุกระดับความลึกของแผ่นชีวภาพ (รูปที่ 4)

อภิปรายผลการทดลอง

การศึกษานี้ใช้แบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมดจากคลองรากฟันเดียวกันมาทดลองสร้างแผ่นชีวภาพบนผนังคลองรากฟันวัวภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนเพื่อจำลองการติดเชื้อภายในคลองรากฟันแบบปฐมภูมิ ผลการศึกษาพบแผ่นชีวภาพเกิดขึ้นตั้งแต่ระยะเวลา 1 สัปดาห์ โดยพบว่าประกอบด้วยแบคทีเรียรูปกลมเป็นส่วนใหญ่ สอดคล้องกับทฤษฎีการเกิดแผ่นชีวภาพซึ่งแบคทีเรียรูปกลมมักจะเป็นกลุ่มแรก (early colonizer) ที่มาเกาะบนพื้นผิวเพื่อสร้างแผ่นชีวภาพ[27] แบคทีเรียรูปกลมกลุ่ม Streptococci มีความสามารถในการเกาะติดกับเนื้อฟันได้ดี และรุกล้ำเข้าไปในท่อเนื้อฟันได้ เนื่องจากแบคทีเรียสามารถผลิตโปรตีนชนิดหนึ่งคือ แอนติเจนชนิดที่หนึ่ง/สอง (antigen I/II) ซึ่งเป็นสารแอดฮีซิน (adhesin) ชนิดหนึ่งที่สามารถจับกับคอลลาเจนชนิดที่หนึ่งและสอง (collagen type I and II) ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่อยู่ในเนื้อฟันได้ นอกจากนี้ยังสามารถยึดเกาะแบบเฉพาะเจาะจงกับตัวรับ (receptor) บนผิวเซลล์ของแบคทีเรียอีกหลายชนิดได้[28-30] ดังนั้นแผ่นชีวภาพที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์จึงพบทั้งแบคทีเรียรูปแท่งและรูปกลมที่มีการเกาะกลุ่มกันของแบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่มคล้ายกับที่พบในแผ่นชีวภาพบนผิวฟัน[31] แม้ว่าในการศึกษานี้ได้ใช้ผนังคลองรากฟันวัวแทนฟันมนุษย์ แต่ผลไม่แตกต่างกันเนื่องจากมีรายงานว่าฟันวัวมีโครงสร้างและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อเนื้อฟันไม่ต่างจากผนังคลองรากฟันมนุษย์[32]

การสร้างแผ่นชีวภาพของสิ่งมีชีวิตจำพวกโปรคาริโอท (prokaryotes) และยูคาริโอท (eukaryotes) นั้นสามารถพบได้ในสภาวะแร้นแค้น (extreme environment) เช่น บริเวณท่อน้ำทิ้งของเหมืองแร่ที่มีความเป็นกรดสูง ทะเลสาบที่มีความเค็มสูง และบริเวณน้ำพุร้อน[33-36] สภาวะขาดแคลนอาหารก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่กระตุ้นให้แบคทีเรียสร้างแผ่นชีวภาพขึ้นเพื่อความอยู่รอด ในการศึกษานี้แผ่นชีวภาพที่เกิดในสภาวะอาหารเจือจางมีความหนาแน่นของแบคทีเรียมากกว่าในสภาวะอาหารเข้มข้น โดยแผ่นชีวภาพในสภาวะอาหารเจือจางที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์มีความหนาแน่นของแบคทีเรียมากที่สุด ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดที่กำลังขยายสูงพบแบคทีเรียรูปกลมและรูปแท่งเกาะกลุ่มเบียดกันอย่างหนาแน่นหลายชั้นจนมองไม่เห็นผนังคลองรากฟัน และพบรูจำนวนมากกระจายอยู่บนผิวของแผ่นชีวภาพซึ่งคล้ายกับช่องทางไหลของของเหลว เมื่อเปรียบเทียบกับแผ่นชีวภาพที่พบภายในคลองรากของฟันที่มีเนื้อเยื่อปลายรากฟันอักเสบ[9-11,37] พบว่ามีลักษณะที่คล้ายกันกับผลการศึกษานี้ในแง่ของการกระจายตัวของกลุ่มแบคทีเรีย และโครงสร้างการเกาะกลุ่มของแบคทีเรีย อนึ่ง การสร้างแผ่นชีวภาพในสภาวะที่ขาดแคลนอาหารยังพบได้ในเชื้อกลุ่ม *Salmonella spp., Escherichea coli* และ *Staphylococcus sciuri*[38-40] อย่างไรก็ตาม ในเชื้อกลุ่ม *Listeria monocytogenes* และ *Enterococcus faecalis* มีรายงานว่าเชื้อสร้างแผ่นชีวภาพในสภาวะอาหารอุดมสมบูรณ์ได้ดีกว่าในสภาวะขาดแคลนอาหาร[21,38]

ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการสร้างแผ่นชีวภาพของแบคทีเรีย[39-41] มีหลายการศึกษาได้สร้างแผ่นชีวภาพในคลองรากฟันโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบหลักเป็นคาร์โบไฮเดรต[20,21,26] ซึ่งแตกต่างจากแหล่งอาหารในคลองรากฟัน และเอื้อต่อการเจริญของเชื้อจำพวกที่เจริญโดยอาศัยหรือไม่อาศัย

ออกซิเจน (facultative anaerobes) เท่านั้น ในการศึกษานี้จึงได้เลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดคุกมีท ซึ่งมีส่วนประกอบหลักคือโปรตีนจากหัวใจวัว โดยต้องการให้คล้ายกับสภาวะของการติดเชื้อในคลองรากฟันส่วนกลางและส่วนปลาย ซึ่งแหล่งอาหารของแบคทีเรียในบริเวณนี้ส่วนใหญ่จะประกอบด้วยเนื้อเยื่อในที่ถูกย่อยสลาย ซึ่งเป็นแหล่งของโปรตีนและไกลโคโปรตีน (glycoproteins) ที่เป็นอาหารหลักของแบคทีเรียจำพวกที่เจริญโดยไม่อาศัยออกซิเจน (anaerobes) ซึ่งเป็นเชื้อส่วนใหญ่ที่พบในคลองรากบริเวณนี้ เนื่องจากเป็นบริเวณที่ออกซิเจนและอาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรตจากภายในช่องปากเข้ามาไม่ถึง นอกจากนี้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดคุกมีท ยังมีคาร์โบไฮเดรตซึ่งเป็นแหล่งอาหารของแบคทีเรียจำพวกที่เจริญโดยอาศัยหรือไม่อาศัยออกซิเจนที่มักพบได้ในคลองรากบริเวณนี้ด้วย ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่แยกมาได้จากคลองรากฟันสามารถสร้างแผ่นชีวภาพที่มีลักษณะคล้ายกับที่พบในคลองรากได้ดีภายใต้สภาวะที่มีอาหารชนิดคุกมีทแบบเจือจาง

การศึกษาแผ่นชีวภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์คอนโฟคัล เลเซอร์ สแกนนิง เป็นวิธีที่มีข้อดีคือสามารถสังเกตและบันทึกภาพแผ่นชีวภาพในระดับต่างๆจากพื้นผิวได้โดยไม่ทำลายโครงสร้างของแผ่นชีวภาพ แต่พื้นผิวต้องมีความบางและแสงสามารถส่องผ่านได้ ในการศึกษานี้ได้ใช้สีย้อมเซลล์มีชีวิตร่วมด้วย และสร้างแผ่นชีวภาพบนแผ่นกระจกปิดสไลด์เพื่อจะได้สังเกตเห็นเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตายแล้วในแต่ละระดับความลึกของแผ่นชีวภาพได้ ผลการศึกษาพบว่ามีเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่เป็นส่วนมากในทุกระดับความลึกของแผ่นชีวภาพ อย่างไรก็ตาม พบว่าแผ่นชีวภาพที่เกิดบนแผ่นกระจกปิดสไลด์นั้นมีปริมาณและความหนาแน่นของแบคทีเรียน้อยกว่าบนผนังคลองรากฟันวัวมาก โดยมีความหนาเพียง 8-10 ไมครอน จึงทำให้ไม่สามารถศึกษาโครงสร้างของแผ่นชีวภาพได้ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะแบคทีเรียกลุ่มแรกสามารถเกาะกับผิวกระจกปิดสไลด์ได้ไม่ดีเท่าผนังคลองรากฟัน ทั้งนี้ ความสามารถในการยึดเกาะและสร้างแผ่นชีวภาพของแบคทีเรียนั้นนอกจากจะขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียและแหล่งอาหารแล้วยังมีรายงานว่าขึ้นอยู่กับชนิดของพื้นผิวที่แบคทีเรียยึดเกาะด้วย[38] อนึ่ง เนื่องจากความแตกต่างกันของพื้นผิวดังกล่าว จึงทำให้ไม่สามารถนำผลการศึกษาความมีชีวิตของเชื้อในแผ่นชีวภาพบนผิวกระจกปิดสไลด์ไปสรุปได้ว่าแบคทีเรียในแผ่นชีวภาพบนผนังคลองรากฟันจะมีการกระจายตัวของเซลล์ที่มีชีวิตในรูปแบบเดียวกัน

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากคลองรากฟันเดียวกันมีความสามารถในการสร้างแผ่นชีวภาพได้ดีบนผนังคลองรากฟันวัวในสภาวะที่มีอาหารจำกัด โดยพบการกระจายตัวและโครงสร้างการเกาะกลุ่มของแบคทีเรียคล้ายกันกับแผ่นชีวภาพที่มีรายงานว่าพบในคลองรากฟัน แม้ว่าในการศึกษานี้ไม่ได้มีการพิสูจน์ให้เห็นว่าแผ่นชีวภาพที่เกิดขึ้นนั้นประกอบไปด้วยแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ แต่ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดก็แสดงให้เห็นว่ามีทั้งแบคทีเรียรูปกลมและรูปแท่ง และจากข้อมูลที่ได้จากการศึกษาก่อนหน้านี้[42] ซึ่งได้รายงานว่าแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์มีความสามารถในการเกาะกลุ่มกัน (coaggregation) จึงอาจสันนิษฐานได้ว่าเป็นแผ่นชีวภาพที่เกิดจากแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ ผลการศึกษานำร่องนี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาโครงสร้างทางชีวภาพ ตลอดจนกลไกทางชีววิทยาของแผ่นชีวภาพในคลองรากฟัน ซึ่งจะนำไปสู่การคิดค้นวิธีการกำจัดแผ่นชีวภาพในคลองรากฟันให้ได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้การสนับสนุนการทำวิจัย

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. Moller AJ, Fabricius L, Dahlen G, Ohman AE, Heyden G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scand J Dent Res* 1981; 89: 475-484.

3. Fabricius L, Dahlen G, Holm SE, Moller AJ. Influence of combination of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. *Scand J Dent Res* 1982; 90: 200-206.
4. Fabricius L, Dahlen G, Ohman AE, Moller AJ. Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied times of closure. *Scand J Dent Res* 1982; 90: 134-144.
5. Jefferson KK. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol Lett* 2004; 236: 163-173.
6. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant micro-organisms. *Clin Microbiol Rev* 2002 Apr; 15: 167-193.
7. Nair PNR. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *J Endod* 1987; 13: 29-39.
8. Molven O, Olsen I, Kerekes K. Scanning electron microscopy of bacteria in the apical part of root canals in permanent teeth with periapical lesions. *Endod Dent Traumatol* 1991; 7: 226-229.
9. Siqueira JF, Jr., Lopes HP. Bacteria on the apical root surfaces of untreated teeth with periradicular lesions: a scanning electron microscopy study. *Int Endod J* 2001 Apr; 34: 216-220.
10. Sen BH, Piskin B, Demirci T. Observation of bacteria and fungi in infected root canals and dentinal tubules by SEM. *Endod Dent Traumatol* 1995 Feb; 11: 6-9.
11. Leonardo MR, Rossi M, Silva L, Ito I, Bonifacio K. EM evaluation of bacterial biofilm and microorganisms on the apical external root surface of human teeth. *J Endod* 2002; 28: 815-818.
12. Noiri Y, Ehara A, Kawahara T, Takemura N, Ebisu S. Participation of bacterial biofilms in refractory and chronic periapical periodontitis. *J Endod* 2002; 28: 679-683.
13. Richardson N, Mordan NJ, Figueiredo JA, Ng YL, Gulabivala K. Microflora in teeth associated with apical periodontitis: a methodological observational study comparing two protocols and three microscopy techniques. *Int Endod J* 2009; 42: 908-921.
14. Wilson M. Susceptibility of oral bacterial biofilms to antimicrobial agents. *J Med Microbiol* 1996; 44: 79-87.
15. Larsen T. Susceptibility of Porphyromonas gingivalis in biofilms to amoxicillin, doxycycline and metronidazole. *Oral Microbiol Immunol* 2002;17: 267-271.
16. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001; 358: 135-138.
17. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 1995; 49: 711-745.
18. Spratt DA, Pratten J, Wilson M, Gulabivala K. An in vitro evaluation of the antimicrobial efficacy of irrigants on biofilms of root canal isolates. *Int Endod J* 2001; 34: 300-307.
19. Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod* 2002; 28: 689-693.
20. Takemura N, Noiri Y, Ehara A, Kawahara T, Noguchi N, Ebisu S. Single species biofilm-forming ability of root canal isolates on gutta-percha points. *Eur J Oral Sci* 2004; 112: 523-529.
21. George S, Kishen A, Song KP. The role of environmental changes on monospecies bio-

film formation on root canal wall by Enterococcus faecalis. *J Endod* 2005; 31: 867-872.

22. Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL. Comparative evaluation of endodontic irrigants against Enterococcus faecalis biofilms. *J Endod* 2006; 32: 527-531.
23. Sena NT, Gomes BP, Vianna ME, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, et al. In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. *Int Endod J* 2006; 39: 878-885.
24. Chavez de Paz LE, Bergenholtz G, Dahlen G, Svensater G. Response to alkaline stress by root canal bacteria in biofilms. *Int Endod J* 2007; 40: 344-355.
25. Chavez de Paz LE, Bergenholtz G, Svensater G. The effects of antimicrobials on endodontic biofilm bacteria. *J Endod* 2010; 36: 70-77.
26. Liu H, Wei X, Ling J, Wang W, Huang X. Biofilm formation capability of Enterococcus faecalis cells in starvation phase and its susceptibility to sodium hypochlorite. *J Endod*; 36: 630-635.
27. Li J, Helmerhorst EJ, Leone CW, Troxler RF, Yaskell T, Haffajee AD, et al. Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *J Appl Microbiol* 2004; 97: 1311-1318.
28. Love RM. Invasion of dentinal tubules by root canal bacteria. *Endod Topics* 2004; 9: 52-65.
29. Switalski LM, Butcher WG, Caufield PC, Lantz MS. Collagen mediates adhesion of *Streptococcus mutans* to human dentin. *Infect Immun* 1993; 61: 4119-4125.
30. Love RM, McMillan MD, Jenkinson HF. Invasion of dentinal tubules by oral *streptococci is associated* with collagen recognition mediated by the antigen I/II family of polypeptides. *Infect Immun* 1997; 65: 5157-5164.
31. Tronstad L, Sunde PT. The evolving new understanding of endodontic infections. *Endod Topics* 2003; 6: 57-77.
32. Camargo CH, Siviero M, Camargo SE, de Oliveira SH, Carvalho CA, Valera MC. Topographical, diametral, and quantitative analysis of dentin tubules in the root canals of human and bovine teeth. *J Endod* 2007; 33: 422-426.
33. Bond PL, Smriga SP, Banfield JF. Phylogeny of microorganisms populating a thick, subaerial, predominantly lithotrophic biofilm at an extreme acid mine drainage site. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 3842-3849.
34. Brake SS, Hasiotis ST. Eukaryote-dominated biofilms in extreme environments: overlooked sources of information in the geologic record. *Palaios* 2008; 23: 121-123.
35. Lapaglia C, Hartzell PL. Stress-Induced Production of Biofilm in the Hyperthermophile Archaeoglobus fulgidus. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63: 3158-3163.
36. Dupraz C, Visscher PT. Microbial lithification in marine stromatolites and hypersaline mats. *Trends Microbiol* 2005; 13: 429-438.
37. Overman PR. Biofilm: A new view of plaque. *J Contemp Dent Pract* 2000; 1: 1-8.
38. Stepanovic S, Cirkovic I, Ranin L, Svabic-Viaholic M. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and Listeria monocytogenes on plastic surface. *Appl Microbiol* 2004; 38: 428-432.
39. Dewanti R, Wong AC. Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7. *Inter J Food Microbiol* 1995; 26: 147-164.

40. Stepanovic S, Davic I, Opavski N, Jezek P, Ranin L. Influence of the growth medium composition on biofilm formation by *Staphylococcus sciuri. Ann Microbiol* 2003; 53: 63-74.
41. Hood SK, Zottola EA. Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. *Inter J Food Microbiol* 1997; 37: 145-153.
42. Khemaleelakul S, Baumgartner JC, Pruksakorn S. Autoaggregation and coaggregation of bacteria associated with acute endodontic infections. *J Endod* 2006; 32: 312-318.