

บทที่ 5

อภิปรายผล

การศึกษานี้เป็นการศึกษาเพื่อปรับปรุงน้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮกซิดีนให้มีข้อดีอย่างลดลงเพื่อส่งเสริมให้เกิดความร่วมมือในการใช้น้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮกซิดีนในกลุ่มผู้ป่วยที่จำเป็นต้องใช้มากขึ้น โดยวิธีการที่นำมาใช้ในครั้งนี้ได้แก่ การหาสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อก่อโรคฟันผุคือเชื้อ *สเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์* เพื่อหวังผลให้สามารถลดความเข้มข้นของคลอร์เฮกซิดีนลงได้โดยที่น้ำยาบ้วนปากสูตรปรับปรุงใหม่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อได้ไม่ด้อยกว่าเดิม และมีการเติมสารปรุงแต่งกลิ่นรสที่ทำให้รสชาติดีขึ้นในการปรับปรุงรสชาติอาศัยหลักการ Taste masking คือการใช้สารที่มีรสหวาน เฝื่อนและรสผลไม้ร่วมกันในการกลบรสขมและรสฝาดของเกลือโลหะในผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปาก และอาจจะมีการเติมกรดเพื่อให้รสเปรี้ยวแย่งจับตัวกับรสขมบนดมรับรสอีกด้วย ซึ่งในน้ำยาบ้วนปากสูตรปรับปรุงมีส่วนผสมของสารให้ความหวานต่างๆ ได้แก่ ซอBITOL โซลิตอล สารแต่งรสผลไม้คือรสส้ม และสารให้รสเปรี้ยวได้แก่ กรดซิตริก เพื่อช่วยให้รสชาติดีขึ้น⁷² และการเติมซึ่งคั่งลงในน้ำยาบ้วนปากสูตรปรับปรุงนอกจากหวังผลการยับยั้งเชื้อแล้วยังหวังว่าจะทำให้เกิดการยับยั้งเชื้อที่ยาวนานอีกด้วย ซึ่งจากการศึกษาในอาสาสมัครพบว่ายังสามารถตรวจพบซิงค์ในน้ำลายของอาสาสมัครได้หลังจากใช้ยาสี่ฟันที่ส่วนผสมของซิงค์ไปแล้วนาน 7 ชั่วโมง⁷³ นอกจากนั้นซิงค์ยังอาจแก้ไขข้อดีของคลอร์เฮกซิดีนในการลดความสามารถการรับรู้รสของผู้ป่วยหากใช้ในระยะเวลาอันยาวนานได้เนื่องจากซิงค์มีผลช่วยปรับปรุงการรับรู้รสเต็มของผู้ป่วยได้⁷⁴

โมเดลที่ใช้ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำยาบ้วนปากในห้องปฏิบัติการในการศึกษานี้ สามารถจำลองสถานการณ์จริงของการใช้งานได้ดี เนื่องจากใช้ไบโอฟิล์มแทนการทดสอบกับเซลล์แขวนลอย (planktonic cell) และในการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อทำโดยจำลองสภาวะหลังจากบ้วนน้ำยาบ้วนปากแล้วจะมีแบคทีเรียส่วนหนึ่งหลุดออกจากผิวฟันอาจจะด้วยแรงในการบ้วนหรือสารออกฤทธิ์ก็ตาม แต่เซลล์แบคทีเรียเหล่านั้นยังคงลอยอยู่ในช่องปาก และมีบางส่วนที่สามารถกลับมายึดเกาะที่ผิวฟันและสร้างไบโอฟิล์มได้ใหม่ ซึ่งในการทดสอบนี้ก็สามารถประเมินประสิทธิภาพของน้ำยาบ้วนปากในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มใหม่ได้ ทำให้ทราบได้ว่าเซลล์ที่หลงเหลืออยู่จากการใช้น้ำยาบ้วนปากนั้นมีประสิทธิภาพในการสร้างไบโอฟิล์มใหม่ได้หรือไม่ แต่ยังคงขาดการทดสอบถึงศักยภาพก่อโรคด้านอื่นที่อาจจะลดลงจนไม่มีผลต่อการเกิดโรคฟันผุ เช่น ความสามารถในการสร้างกรด ความหนาและอัตราเร็วในการสร้างไบโอฟิล์มใหม่ เป็นต้น ซึ่งในการศึกษาที่มีมาก่อนพบว่าซิงค์สามารถลดความสามารถในการสร้างกรดของคราบจุลินทรีย์ได้⁴⁹ ในส่วนของ การทดลองประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อในไบโอฟิล์มนั้น สามารถประเมินถึงระยะเวลาในการออกฤทธิ์ของน้ำยาบ้วนปากในไบโอฟิล์มได้ ซึ่งสามารถนำข้อมูลจากโมเดลนี้มาประยุกต์ใช้กับการพิจารณาถึงความถี่ในการใช้น้ำยาบ้วนปากต่อหนึ่งวันทางคลินิกได้ ซึ่งน่าจะมีผลต่อความร่วมมือในการใช้น้ำยาบ้วนปากของผู้ป่วย แต่ในการทดลองนี้ก็มีข้อดีคือไม่มีการจำลองสภาวะการรับประทานอาหาร การได้รับน้ำตาลของไบโอฟิล์ม และการไหลเวียนของน้ำลายมีเพียงการเปลี่ยนน้ำลายเทียมเท่านั้น

นอกจากนี้การศึกษายังมีการวัดผล 2 วิธีคือ วิธีแรกหาอัตราส่วนเซลล์มีชีวิตต่อเซลล์ตายจากการย้อมสีเซลล์ในไบโอฟิล์ม ซึ่งเป็นการวัดจำนวนเชื้อโดยตรง แต่วิธีนี้ไม่สามารถแยกชนิดของเชื้อได้ จึงมีการวัดผลด้วยวิธีที่สองคือการเพาะเลี้ยงเชื้อที่เหลืออยู่ในไบโอฟิล์มบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง ซึ่งแม้วิธีนี้เป็นการวัดจำนวนเชื้อทางอ้อม แต่สามารถระบุถึงชนิดของเชื้อกลุ่มที่เราสนใจได้จากการเลือกใช้ selective media

การทดสอบในอาสาสมัครมีการทดสอบเฉพาะความพึงพอใจในรสชาติ เนื่องจากมีข้อจำกัดทั้งด้านเวลาและค่าใช้จ่าย จึงไม่อาจติดตามผลทางคลินิกที่น่าสนใจที่คาดว่าจะเกิดขึ้น ได้แก่ การติดสีของคลอร์เฮกซิดีน บนเนื้อเยื่อและวัสดุอุด การเปลี่ยนแปลงการรับรู้รสชาติ และระดับของไบโอฟิล์มที่ลดลงทางคลินิกได้

การทดสอบระดับความพึงพอใจในรสชาติในครั้งนี้มีอาสาสมัครเพียงกลุ่มอายุเดียวได้แก่กลุ่มวัยรุ่นตอนปลาย อาจไม่สามารถนำไปแปลผลระดับความพึงพอใจในผู้ป่วยกลุ่มเด็ก กลุ่มวัยทำงานและผู้สูงอายุได้ ซึ่งในอนาคตควรมีการศึกษาเพิ่มเติมคุณสมบัติทางคลินิกและเพิ่มกลุ่มของอาสาสมัครให้มีความหลากหลายขึ้นเพื่อให้ได้ข้อมูลที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในทางคลินิกได้

5.1 ผลการศึกษาการทดสอบคุณสมบัติการเสริมฤทธิ์ ในการยับยั้งเชื้อ *สเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์*

การศึกษานี้เป็นการศึกษาเพื่อทดสอบคุณสมบัติการเสริมฤทธิ์ของสารคลอร์เฮกซิดีนและซิงค์คลอไรด์ต่อเชื้อ *สเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์* UA 159 เพื่อใช้เป็นสารออกฤทธิ์หลักและสารออกฤทธิ์รองในน้ำยาบ้วนปากสูตรปรับปรุง ผู้วิจัยได้ทำการเลือกสารออกฤทธิ์รองจากการค้นคว้าข้อมูลการศึกษาที่มีมาก่อนหน้า ซึ่งมีการศึกษาพบว่ามีการหลายชนิดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคฟันผุ เช่น ทองแดง สังกะสี โซลิทอล⁵⁹ พรอพอลิส⁷⁵ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซิติลไพริดีนียมคลอไรด์ ไตรโคลซาน เป็นต้น^{31, 36}

จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าค่า MIC ของคลอร์เฮกซิดีนต่อเชื้อ *สเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์* ATCC 25175 เท่ากับ 0.25-1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร³⁸ และค่า MIC ของซิงค์ออกไซด์ต่อเชื้อ *สเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์* ATCC6715 เท่ากับ 200-800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร⁷⁶ แต่ผลจากการทดลองในงานวิจัยนี้ได้ค่า MIC ของคลอร์เฮกซิดีนต่อเชื้อ *สเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์* UA 159 สูงกว่าค่าเดิม(1-2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และค่า MIC ของซิงค์คลอไรด์ต่อเชื้อ *สเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์* UA 159 ต่ำกว่าค่าเดิม (59-156 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ซึ่งแม้ค่าจะไม่ตรงกันแต่ก็มีค่าใกล้เคียงกัน อาจเนื่องมาจากการที่เราใช้เชื้อในสายพันธุ์ที่ต่างกันและสารซิงค์ที่เราใช้เป็นซิงค์คลอไรด์แต่ในรายงานที่ผ่านมาเป็นสารซิงค์ออกไซด์ ซึ่งมีการศึกษาที่พบว่าเกลือของซิงค์ที่ต่างชนิดกันก็ทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อต่างกันด้วย⁵⁵

การหาค่า FIC มีเกณฑ์ในการตัดสินคุณสมบัติการเสริมฤทธิ์หลายแบบซึ่งในการศึกษาของ Giertsen E และคณะในปี 1988 พบว่าผลค่าดัชนีการเสริมฤทธิ์ ($\sum FIC$) ระหว่าง คลอร์เฮกซิดีนและซิงค์คลอไรด์ในการต้านต่อเชื้อ *สเตรปโตคอคคัส ซอบรินัส* และ *สเตรปโตคอคคัส แชนกวีนิส* เท่ากับ 0.9 และในการศึกษานั้นแปลผลว่าสารทั้งสองชนิดนี้มีคุณสมบัติในการเสริมฤทธิ์ซึ่งกันและกัน (synergistic effect) เนื่องจากใช้เกณฑ์ของ Berenbaum MC ในปี 1981 ซึ่งหากค่า $\sum FIC < 1$ แสดงว่าสารทั้งสองชนิดมีคุณสมบัติในการเสริมฤทธิ์ซึ่งกันและกัน⁴⁹ แต่ในการศึกษาครั้งนี้ใช้เชื้อ *สเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์* ซึ่งเป็นเชื้อคนละชนิดกับการศึกษาก่อนหน้าแต่เนื่องจากเชื้อที่ใช้ทดสอบเป็นเชื้อกลุ่มแกรมบวกและ *สเตรปโตคอคคัส* เหมือนกันจึงได้ค่า $\sum FIC$ ไม่ต่างกัน แต่

การศึกษานี้กับการศึกษาก่อนหน้าใช้เกณฑ์ในการการแปลผลต่างกัน ครึ่งนี้ใช้เกณฑ์ของสมาคมจุลชีววิทยาและโรคติดเชื้อแห่งยุโรป พบว่าสารทั้งสองชนิดมีคุณสมบัติในการเพิ่มเติมนั้นและกัน (additive effect) ไม่ใช่การเสริมฤทธิ์กัน

การทดสอบการเสริมฤทธิ์ตามวิธี checkerboard มีการแปลผลและวิธีการอ่านผลหลายแบบ ซึ่งแต่ละแบบจะทำให้การตีความหรือแปลผลแตกต่างกันได้ การอ่านผลแบ่งออกเป็น 4 วิธีใหญ่ๆ ได้แก่ 1. Mean fractional inhibitory concentration index อ่านค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (ไม่มีความขุ่น) ในแต่ละแถวและสดมภ์ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย 2. Full row/column อ่านค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดจากแถวและสดมภ์แรกที่มีการยับยั้งเชื้อ (ไม่มีความขุ่น) 3. Lowest FIC index อ่านค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ในไมโครเพลท 4. Two wells การใช้ไมโครเพลทสองเพลท เพลทแรกใช้ความเข้มข้นของสารทั้งสองชนิดเท่ากับ 0.25 ของค่า MIC เพลทที่สองใช้ความเข้มข้นของสารทั้งสองชนิดเท่ากับ 2 ของค่า MIC การแปลผลคือหากทั้งสองเพลทไม่พบความขุ่นเลยแสดงว่ามีการเสริมฤทธิ์ หากมีความขุ่นทั้งสองเพลทแสดงถึงการต้านฤทธิ์ หากพบทั้งความขุ่นและใสในทั้งสองเพลทอาจให้ผลว่าเพิ่มเติมนั้นหรือไม่มีผลต่อกัน⁷⁷ ในการศึกษาครั้งนี้อ่านผลบนไมโครเพลทแบบ Lowest FIC index วิธีการอ่านผลแต่ละแบบจะให้การแปลผลที่แตกต่างกัน สำหรับการศึกษาก่อนหน้าไม่มีการระบุถึงรายละเอียดวิธีการอ่านค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารที่นำมาคำนวณค่า $\sum FIC$

การศึกษาของ Giertsen E และคณะในปี 1988 ชี้ให้เห็นว่าคลอร์เฮกซิดีนและซิงค์คลอไรด์ให้ผลเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งเชื้อ อาจมาจากการที่คลอร์เฮกซิดีนมีผลรบกวนการควบคุมสารที่เข้าออกเซลล์ จึงทำให้ซิงค์เข้าสู่เซลล์และยับยั้งการเมตาบอลิซึมของแบคทีเรียได้ดีมากกว่าสภาวะที่มีสารใดสารหนึ่งเพียงตัวเดียว

การศึกษานี้ได้สรุปตามเกณฑ์ประเมินข้างต้นว่าสารทั้งสองชนิดมีคุณสมบัติเพิ่มเติมนั้นและกัน จากข้อมูลสนับสนุนจากการศึกษาของ Waler SM และ Rolla G ปี 1980 ที่ให้ความเห็นว่าอาจเป็นเพราะสารทั้งสองชนิดนี้มีตัวรับที่เซลล์ตัวเดียวกันและคลอร์เฮกซิดีนมีประสิทธิภาพในการจับกับตัวรับนั้นดีกว่าเมื่อนำสารทั้งสองชนิดมาใช้ร่วมกันจึงเห็นผลการยับยั้งไบโอฟิล์มจากคลอร์เฮกซิดีนเพียงตัวเดียว⁷⁸

5.2 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮกซิดีนในการยับยั้งเชื้อในไบโอฟิล์ม

5.2.1 ผลการการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำยาบ้วนปากในการยับยั้งเชื้อในไบโอฟิล์มโดยวิธีการย้อมสีเซลล์และวัดปฏิกิริยาฟลูออเรสเซนซ์

วิธีการย้อมสีเซลล์และวัดผลด้วยเครื่องวัดปฏิกิริยาฟลูออเรสเซนซ์ในการทดลองนี้ใช้ผลิตภัณฑ์ LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Bacterial Viability Kits (Molecular Probe, USA) ซึ่งประกอบด้วยสารย้อมสีฟลูออเรสเซนซ์ 2 ชนิด ได้แก่ SYTO[®] 9 เป็นสารย้อมที่ให้สีเขียวจากปฏิกิริยาฟลูออเรสเซนซ์ติดสปีกรดนิวคลีอิกในนิวเคลียสของเซลล์สามารถแทรกเข้าเซลล์ได้ทุกเซลล์ทั้งเซลล์ปกติและเซลล์ที่ตายหรือมีความเสียหายที่ผนังเซลล์ ส่วนสารย้อมสีอีกชนิดหนึ่งชนิด ได้แก่ propidium iodide เป็นสารที่ให้สีแดงในปฏิกิริยาฟลูออเรสเซนซ์เมื่อเข้าไปจับกับกรดนิวคลีอิกในนิวเคลียสของแบคทีเรีย แต่สารนี้จะสามารถเข้าเซลล์ได้ก็ต่อเมื่อเซลล์นั้นมีความเสียหายหรือรอยร้าวลักษณะที่ผนังเซลล์ ดังนั้นในทุกเซลล์สามารถมีสีเขียวจากเข้าไปของ SYTO[®] 9 แต่เซลล์ที่มีความเสียหายหรือตายจะมี propidium iodide เข้าไป และ propidium iodide มีความสามารถในการจับกับสารในนิวเคลียสได้

ดีกว่า ทำให้เซลล์ไหนที่สารสีแดงสามารถเข้าไปได้ก็จะสามารถแทนที่หรือแย่งจับได้ดีกว่าสีเขียว ดังนั้นจึงสามารถหาอัตราส่วนเซลล์ที่มีชีวิต (สีเขียว) ต่อเซลล์ตาย (สีแดง) ในไบโอฟิล์มภายหลังการทดสอบได้⁶⁹

จากการศึกษาพบว่าอัตราส่วนเซลล์ที่มีชีวิตต่อเซลล์ตายในไบโอฟิล์มของกลุ่มควบคุมลบและน้ำยาบ้วนปากทั้งสามชนิด ณ เวลาที่ 0, 2, 4, 8 และ 12 ชั่วโมงหลังจากที่ได้รับสารทดลองมีการเพิ่มขึ้นจากชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 12 หมายถึงมีการเพิ่มจำนวนขึ้นของเชื้อในไบโอฟิล์มทุกกลุ่มแต่กลุ่มควบคุมลบมีการเพิ่มจำนวนของเชื้อมากที่สุด แสดงว่าน้ำยาบ้วนปากทั้งสามชนิดมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อในไบโอฟิล์มเท่านั้น ไม่ได้มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ

ชั่วโมงที่ 0 2 4 และชั่วโมงที่ 8 พบว่าน้ำยาบ้วนปากสูตรดั้งเดิมมีค่าอัตราส่วนเซลล์ที่มีชีวิตต่อเซลล์ตายในไบโอฟิล์มต่ำที่สุดแสดงให้เห็ว่าน้ำยาบ้วนปากสูตรดั้งเดิมมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อในไบโอฟิล์มได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับน้ำยาบ้วนปากสูตรปรับปรุง แต่ความแตกต่างนั้นไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

ในชั่วโมงที่ 12 พบว่าน้ำยาบ้วนปากสูตรปรับปรุง 1 มีค่าอัตราส่วนเซลล์เป็นต่อเซลล์ตายในไบโอฟิล์มต่ำที่สุด โดยพบว่า ผลการทดลองทั้งสามชุดมีแนวโน้มเช่นเดียวกัน แต่ความแตกต่างที่ได้จากค่าเฉลี่ยไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ น้ำยาบ้วนปากสูตรปรับปรุง 1 ที่มีส่วนผสมของคลอร์เฮกซิดีนร้อยละ 0.12 เท่ากับสูตรดั้งเดิม แต่มีการเติมสารซิงค์คลอไรด์ร้อยละ 0.3 เพิ่ม ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าประสิทธิภาพที่เพิ่มขึ้นอาจเกิดจากผลของซิงค์คลอไรด์ที่เติมลงไป เนื่องจากซิงค์มีเป้าหมายในการเข้าทำปฏิกิริยากับเซลล์แบคทีเรียหลายตำแหน่ง⁵⁵ ทำให้ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในช่วงเวลาแรกเป็นผลของคลอร์เฮกซิดีนที่มีศักยภาพมากกว่า ซึ่งคลอร์เฮกซิดีนที่มีอยู่อาจจับกับตัวรับที่ไบโอฟิล์มและทำหน้าที่จนอิ่มตัวแล้ว แต่เมื่อเวลาผ่านไปในช่วงชั่วโมงที่ 12 จึงค้นสูตรปรับปรุง 1 อาจทำหน้าที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเพิ่มเติมโดยเข้าไปจับกับตัวรับอื่นที่ไม่ใช่ตัวเดียวกับคลอร์เฮกซิดีน

5.2.2 การศึกษาประสิทธิภาพของน้ำยาบ้วนปากในการยับยั้งเชื้อในไบโอฟิล์มโดยวิธีการนับโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง

จากการวัดผลของน้ำยาบ้วนปากโดยการนับจำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด เชื้อกลุ่มสเตรปโตคอคไคทั้งหมด และเชื้อกลุ่มมิวเทนส์ สเตรปโตคอคไค จากนั้นจึงแปลงผลเป็น $\log_{10}$ ของกลุ่มควบคุมลบเทียบกับกลุ่มน้ำยาบ้วนปาก พบว่าเชื้อทั้งสามกลุ่มที่นับได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิดของกลุ่มควบคุมลบมีจำนวนมากกว่ากลุ่มน้ำยาบ้วนปากทั้งสามกลุ่มประมาณ 2-3 $\log_{10}$ scale ในชั่วโมงที่ 0 และต่างกันประมาณ 2-3 $\log_{10}$ scale ในชั่วโมงที่ 4 และในชั่วโมงที่ 8 ต่างกันประมาณ 1-2 $\log_{10}$ scale แสดงให้เห็นว่าในระยะแรกประสิทธิภาพของน้ำยาบ้วนปากดีกว่าในช่วงเวลาที่ผ่านไป และการลดลงในระดับนี้น่าจะทำให้เกิดผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางคลินิกด้วยเช่นกัน

ณ ชั่วโมงที่ 0 หรือทันทีหลังการทดสอบ จำนวนเชื้อกลุ่มแอโรบิกและแฟคัลเททีฟทั้งหมด และเชื้อกลุ่มสเตรปโตคอคไคทั้งหมดในไบโอฟิล์มของน้ำยาบ้วนปากทั้งสามกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่พบความแตกต่างของจำนวนเชื้อกลุ่มมิวเทนส์ สเตรปโตคอคไคในไบโอฟิล์มของกลุ่มน้ำยาบ้วนปากสูตรดั้งเดิมและสูตรปรับปรุง 2 โดยที่สูตรดั้งเดิมมีจำนวนเชื้อกลุ่มนี้น้อยกว่าสูตรปรับปรุง 2 แสดงให้เห็นว่าคลอร์เฮกซิดีนมีผลต่อเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวเทนส์ เนื่องจากสูตรปรับปรุง 2 มีความเข้มข้นของคลอร์เฮกซิดีนซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียหลักในน้ำยาบ้วนปากน้อยกว่าสูตรดั้งเดิม และสอดคล้องกับผลการทดสอบโดยวิธีการย้อมสี

เซลล์และวัดปฏิกิริยาฟลูออเรสเซนซ์ ผลการยับยั้งเชื้อในไบโอฟิล์มระยะแรกน่าจะเป็นของคลอร์เฮกซิดีนที่มีศักยภาพมากกว่า ส่วนผลของเชื้อทั้งสามกลุ่ม ณ ชั่วโมงที่ 4 และ 8 พบว่าน้ำยาบ้วนปากทั้งสามกลุ่มมีจำนวนไม่ต่างกันทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าเมื่อเวลาผ่านไประยะหนึ่งประสิทธิภาพของน้ำยาบ้วนปากทั้งสามชนิดไม่แตกต่างกันทั้งที่ความเข้มข้นของคลอร์เฮกซิดีนไม่เท่ากัน ซึ่งอาจเป็นผลการยับยั้งเชื้อของซิงค์เช่นเดียวกับที่ได้อธิบายไปแล้วจากการทดลองข้างต้น

ผลของจำนวนเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไคของกลุ่มน้ำยาบ้วนปากทั้งสามชนิดที่ต่างจากกลุ่มควบคุมลบ และผลของอัตราส่วนเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไคต่อจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคไคแพคัลเทฟทั้งหมด และผลของอัตราส่วนเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไคต่อจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคไคทั้งหมด พบว่า ณ เวลาที่ 0 4 และ 8 ชั่วโมงทั้งสามกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แม้ในระยะแรกน้ำยาบ้วนปากสูตรดั้งเดิมจะลดเชื้อ *สเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์* ได้ดีกว่าน้ำยาบ้วนปากสูตรปรับปรุง 2 แต่เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับอัตราส่วนเชื้อเพื่อดูความจำเพาะต่อเชื้อกลุ่มนี้แล้วพบว่าความจำเพาะต่อเชื้อนี้ของน้ำยาบ้วนปากทั้งสามชนิดไม่แตกต่างกัน

5.3 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำยาบ้วนปากต่อการยับยั้งการยึดเกาะของเชือบนไบโอฟิล์ม

5.3.1 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำยาบ้วนปากต่อการยับยั้งการยึดเกาะของเชือบนไบโอฟิล์มด้วยวิธีย้อมสีเซลล์และวัดปฏิกิริยาฟลูออเรสเซนซ์

ในการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำยาบ้วนปากในยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อ ให้เวลาสำหรับเชื้อที่ผ่านการทดสอบในการยึดเกาะกับแผ่นคราบน้ำลายปราศจากเชื้อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เนื่องจากต้องการเห็นผลของน้ำยาบ้วนปากเปรียบเทียบกับกลีเซอรีนกับสถานการณ์จริง โดยหลังจากที่บ้วนปากหรือทำความสะอาดแล้วประมาณ 1 ชั่วโมง ส่วนใหญ่เราจะไม่มีการรับประทานใดๆ

วิธีการทดสอบในครั้งนี้เป็นการจำลองสถานการณ์ในช่องปาก ภายหลังจากที่มีการบ้วนปากด้วยน้ำยาบ้วนปากแล้วมีแบคทีเรียบางส่วนที่โดนชะล้างออกจากช่องปากไปทั้งจากแรงบ้วนและสารเคมีในน้ำยาบ้วนปาก ขณะที่แบคทีเรียบางส่วนที่หลุดลอกออกจากไบโอฟิล์มแต่ก็ยังคงล่องลอยอยู่ในช่องปากและทำการวัดประสิทธิภาพของน้ำยาบ้วนปากว่าทำให้แบคทีเรียเหล่านั้นสามารถกลับไปยึดเกาะกับแผ่นคราบน้ำลายได้มากน้อยเพียงใด โดยการวัดอัตราส่วนเซลล์ที่มีชีวิตต่อเซลล์ตายในไบโอฟิล์มเปรียบเทียบกัน และวัดผลว่าแบคทีเรียที่สามารถกลับมาเกาะแผ่นคราบน้ำลายได้นั้นเป็นแบคทีเรียชนิดใดและจำนวนเท่าใด โดยการเพาะเลี้ยงและนับโคโลนีเชื้อ

จากการวัดผลโดยการวัดอัตราส่วนเซลล์ที่มีชีวิตต่อเซลล์ตายในไบโอฟิล์มพบว่าน้ำยาบ้วนปากทั้งสามชนิดมีอัตราส่วนเซลล์ที่มีชีวิตต่อเซลล์ตายไม่แตกต่างกัน แต่น้อยกว่ากลุ่มควบคุมลบได้แก่น้ำกลั่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และกลุ่มน้ำยาบ้วนปากมีอัตราส่วนนี้น้อยกว่ากลุ่มควบคุมประมาณ 5 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับอัตราส่วนเซลล์ที่มีชีวิตต่อเซลล์ตายในไบโอฟิล์มระหว่างกลุ่มน้ำยาบ้วนปากแล้วพบว่ากลุ่มน้ำยาบ้วนปากสูตรดั้งเดิมมีค่าสูงสุดและสูตรปรับปรุง 2 ซึ่งมีความเข้มข้นของคลอร์เฮกซิดีนน้อยกว่ากลับมีค่าอัตราส่วนนี้น้อยกว่า แม้จะไม่พบนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งผลที่เกิดขึ้นอาจจะมาจากการที่สูตรปรับปรุง 2 มีทั้งสารไซลิทอลและซิงค์ที่มีผลยับยั้งเชื้อที่มีบทบาทในการยึดเกาะเริ่มแรกในไบโอฟิล์ม^{49, 59}

5.3.2 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำยาบ้วนปากต่อการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อบนไบโอฟิล์มด้วยวิธีการนับโคโลนิบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง

จากการวิเคราะห์นับจำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด เชื้อกลุ่ม สเตรปโตคอคไคทั้งหมด และเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค ($\log_{10}$) ของกลุ่มควบคุมลบเทียบกับกลุ่มน้ำยาบ้วนปากพบว่ากลุ่มควบคุมลบมีจำนวนเชื้อกลุ่มแอโรบิกและแฟคัลเททีฟทั้งหมดมากกว่ากลุ่มน้ำยาบ้วนปากทั้งสามกลุ่มประมาณ 2 $\log_{10}$ scale จำนวนเชื้อกลุ่ม สเตรปโตคอคไคทั้งหมดและเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไคต่างกันประมาณ 1-2 $\log_{10}$ scale แสดงให้เห็นว่าน้ำยาบ้วนปากทั้งสามชนิดสามารถลดการกลับมาเกาะใหม่ของเชื้อและการเกิดบนไบโอฟิล์มในระยะแรกภายหลังการทดสอบได้ และการลดลงในระดับนี้น่าจะทำให้เกิดผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางคลินิกด้วยเช่นกัน

เมื่อดูเฉพาะเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไคที่สามารถลดลงได้เมื่อเปรียบเทียบผลจากกลุ่มควบคุมลบแล้ว พบว่าน้ำยาบ้วนปากสูตรดั้งเดิมมีจำนวนเชื้อกลุ่มนี้น้อยที่สุดในไบโอฟิล์มที่เกิดขึ้นใหม่ สูตรปรับปรุง 1 มีค่ามากกว่าสูตรดั้งเดิมแต่น้อยกว่าสูตรปรับปรุง 2 แต่มีความแตกต่างประมาณ 0.01 $\log_{10}$ scale เท่านั้นซึ่งความแตกต่างนี้มีค่าน้อยมากเมื่อเทียบกับความแตกต่างทางคลินิก

เมื่อพิจารณาผลของเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไคที่แตกต่างกันพบว่าอัตราส่วนเชื้อกลุ่มนี้ต่อเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดของกลุ่มควบคุมลบและกลุ่มน้ำยาบ้วนปากสูตรดั้งเดิมต่ำกว่าน้ำยาบ้วนปากสูตรปรับปรุงทั้งสองสูตรอย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อดูอัตราส่วนเชื้อกลุ่มนี้ต่อเชื้อกลุ่มสเตรปโตคอคไคทั้งหมดแล้ว ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของกลุ่มทดลองทั้งสองกลุ่ม โดยพบว่ากลุ่มควบคุมลบและน้ำยาบ้วนปากสูตรปรับปรุง 1 มีค่าอัตราส่วนนี้ต่ำกว่าน้ำยาบ้วนปากสูตรดั้งเดิมและสูตรปรับปรุง 2

แม้การวัดผลจากการนับเชื้อในไบโอฟิล์มจะพบว่าจำนวนเชื้อทุกกลุ่มของน้ำยาบ้วนปากสูตรดั้งเดิมจะมีน้อยที่สุด แต่เมื่อพิจารณาจากอัตราส่วนเชื้อแล้ว พบว่ามีความแตกต่างกันโดยอัตราส่วนนี้อาจแสดงถึงความจำเพาะของน้ำยาบ้วนปากต่อเชื้อบางกลุ่มที่ไม่เท่ากัน โดยน้ำยาบ้วนปากสูตรดั้งเดิมมีความจำเพาะต่อเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค มากกว่าและน้ำยาบ้วนปากสูตรปรับปรุง 2 อาจมีผลต่อเชื้อในกลุ่มอื่นมากกว่า

การวัดผลโดยวิธีนับโคโลนิบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีข้อดีคือสามารถแสดงถึงจำนวนของเชื้อในไบโอฟิล์มได้ แต่ก็ไม่สามารถแสดงถึงความสามารถในการก่อโรคที่อาจลดลงหลังจากเซลล์แบคทีเรียได้รับน้ำยาบ้วนปาก เช่น การสร้างกรด การสร้างสารโพลีแซคคาไรด์มายึดเกาะกับพื้นผิวหรือเชื้ออื่น เป็นต้น ซึ่งผลของสารต้านแบคทีเรียที่ไม่ใช่กลุ่มฆ่าเชื้อแต่เป็นกลุ่มยับยั้งเชื้ออาจจะต้องมีการวัดผลด้วยวิธีอื่นๆร่วมด้วย ซึ่งในน้ำยาบ้วนปากสูตรปรับปรุงได้เพิ่มสารออกฤทธิ์รองอื่นๆ คือ ซิงค์คลอไรด์และโซลิทอลลงไปด้วย ซึ่งผลของซิงค์ในการยับยั้งเชื้อเป็นแบบผันกลับได้⁵⁵ และกลไกในการยับยั้งเชื้อที่สำคัญคือการยับยั้งการสร้างกรดของเชื้อ มีรายงานว่าสารโซลิทอลสามารถลดความสามารถในการยึดเกาะของเชื้อ *สเตรปโตคอคคัส แสงกวินิส* ในแผ่นคราบน้ำลายซึ่งไม่ใช่เชื้อในกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค แต่เป็นเชื้อที่มีบทบาทในการยึดเกาะเริ่มแรกในไบโอฟิล์ม⁵⁹ นอกจากนั้นมีการทดลองที่รายงานว่าเชื้อตัวนี้อ่อนไหว (sensitive) ต่อคลอร์เฮกซิดีน น้อยกว่า *สเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์*⁷⁹

5.4 การทดสอบความพึงพอใจในอาสาสมัคร

อาสาสมัครที่เข้าร่วมการศึกษาในครั้งนี้เริ่มแรกมีทั้งหมด 60 คนแบ่งเป็นเพศชายและเพศหญิงเท่ากันกลุ่มละ 30 คน แต่เมื่อมีการชักประวัติทางการแพทย์ทั่วไปพบว่าอาสาสมัครเพศชายจำนวน 4 คนที่มีประวัติแพ้ยาซึ่งเป็นเกณฑ์คัดออก โดยสรุปจึงมีอาสาสมัครที่สามารถนำข้อมูลมาวิเคราะห์ได้จำนวน 56 คนแบ่งเป็นเพศชาย 26 คน และเพศหญิงจำนวน 30 คน ทั้งหมดเป็นนักศึกษาทันตแพทย์ชั้นปีที่ 1-4 การเลือกกลุ่มอาสาสมัครในการศึกษาครั้งนี้เพื่อความสะดวกในการศึกษาและเก็บข้อมูล ทำให้ข้อมูลที่ได้เป็นตัวแทนของกลุ่มคนช่วงอายุวัยรุ่นเท่านั้น จึงอาจจะนำไปปรับใช้ในผู้ป่วยกลุ่มอื่นได้ยาก ประกอบกับการรับรู้รสชาติขึ้นกับปัจจัยหลายประการและมีลักษณะจำเพาะแต่ละคน⁸⁰ ได้แก่ ประสบการณ์การรับประทานอาหารและอาหารพื้นเมืองของเชื้อชาติหรือท้องถิ่นต่างๆด้วย อายุก็มีผลกับการรับรู้รสเช่นกันคือผู้ที่มีอายุน้อยกว่ามักจะรับรู้หรือไวต่อความขมและเปรี้ยวมากกว่าผู้ที่มีอายุมากและผู้ที่มีอายุมากจะรับรู้รสเผ็ดมากกว่าหรือไวกว่า เพศก็มีผลเช่นเดียวกันโดยมีการศึกษาที่พบว่าเพศหญิงรับรู้ขมมากกว่าเพศชาย⁸¹ รวมถึงมีการศึกษาว่าฮอร์โมนก็มีผลในการรับรู้รสเช่นกันโดยในหญิงตั้งครรภ์มีรายงานว่าจะมีการรับรู้รสเค็มลดลงและไวต่อรสขมมากขึ้น⁸²

จากข้อมูลก่อนเข้าร่วมการทดลอง พบว่าอาสาสมัครกลุ่มนี้ใช้น้ำยาบ้วนปากเป็นผลิตภัณฑ์ในการดูแลช่องปากประมาณร้อยละ 30 เท่านั้นอาจเนื่องจากอาสาสมัครกลุ่มนี้เป็นนักศึกษาทันตแพทย์ที่มีความรู้และทักษะในการทำความสะอาดช่องปากคืออยู่แล้วรวมถึงสุขภาพร่างกายแข็งแรงซึ่งไม่มีข้อบ่งชี้ที่ต้องใช้น้ำยาบ้วนปาก

จากการใช้การวัดผลความพึงพอใจและข้อมูลของน้ำยาบ้วนปากแต่ละชนิด เนื่องจากความพึงพอใจเป็นข้อมูลแบบนามธรรม และมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องทั้งทางร่างกาย ประสบการณ์และทางจิตใจ ผู้วิจัยจึงออกแบบการเก็บข้อมูลเพื่อลดความมีอคติ โดยเลือกใช้ visual analogue scale แบบที่ไม่มีเลขระบุคะแนนและใช้ช่วงเวลาปลอดการศึกษา 1 สัปดาห์เพื่อไม่ให้อาสาสมัครเกิดความจดจำและมีอคติตอนระบุคะแนน รวมถึงมีการปิดบังสองระดับโดยหนึ่งอาสาสมัครไม่ทราบชนิดของน้ำยาบ้วนปาก และสองผู้กรอกข้อมูลและวัดผลคะแนนจากแบบสอบถามไม่ทราบชนิดของน้ำยาบ้วนปากเช่นกัน

เมื่อวิเคราะห์ผลจากระดับคะแนนแยกตามชนิดของน้ำยาบ้วนปากพบว่าอาสาสมัครให้คะแนนสูตรดั้งเดิมมากกว่าสูตรปรับปรุงทั้งสองในหัวข้อต่อไปนี้ ได้แก่ สีน่าใช้กว่า มีความเย็นช้ำมากกว่า ให้ความรู้สึกสดชื่นมากกว่า ให้ความรู้สึกว้าช่องปากสะอาดมากกว่าและรู้สึกว้าคงค้างในช่องปากนานกว่า เนื่องจากผู้วิจัยไม่ทราบถึงส่วนประกอบที่แท้จริงภายในน้ำยาบ้วนปากสูตรดั้งเดิมเนื่องจากเป็นความลับของคณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น แต่จากการดมกลิ่นและชิมรสชาติแล้วคาดว่าสูตรดั้งเดิมจะปรุงแต่งรสกลืนมันท์และมีกลิ่นแอลกอฮอล์ชัดเจน ซึ่งน่าจะหมายถึงความรู้สึกเย็นซ่าและสดชื่นมาจากแอลกอฮอล์และรสมันท์ในน้ำยาบ้วนปากสูตรดั้งเดิมนั่นเอง ส่วนความรู้สึกคงค้างในช่องปากพบว่าสูตรดั้งเดิมได้ค่าคะแนนมากที่สุดและสูตรปรับปรุง 2 มีค่าน้อยที่สุดเนื่องจากสูตรปรับปรุง 2 มีความเข้มข้นของคลอรีนน้อยที่สุด ความขมในน้ำยาบ้วนปากจึงน่าจะมาจากคลอรีน ส่วนสูตรปรับปรุง 1 ซึ่งมีความเข้มข้นของคลอรีนเท่ากับสูตรดั้งเดิมแต่ความรู้สึกคงค้างในช่องปากน้อยกว่าอาจเนื่องมาจากสูตรปรับปรุงมีการปรุงแต่งกลิ่นรสด้วยสารให้ความหวาน ได้แก่ ซอร์บิทอล ไซลิทอล และเดมซิตริกเพื่อให้รสเปรี้ยวและรสหวานนี้กลบรสขมของคลอรีน ส่วนคะแนนความขมหลังจากที่บ้วนทันทีพบว่าสูตรปรับปรุง 2 มีค่าคะแนนมากที่สุดและสูตรดั้งเดิมน้อยที่สุดอาจเกิดจากสูตรปรับปรุงทั้งสองสูตรมีการเติมสารเพิ่มความหนืดและสารอุ้มน้ำที่ทำให้น้ำยาบ้วนปากหนืดขึ้นเพื่อเพิ่ม

การคงอยู่ซึ่งมันอาจจะเคลื่อนอยู่ที่พื้นผิวในช่องปากหรือติดที่ลิ้นทำให้รู้สึกถึงความขมในครั้งแรกได้มากกว่าซึ่งค่าคะแนนความหวานของน้ำยาบ้วนปากสูตรปรับปรุงทั้งสองสูตรก็มากกว่าสูตรดั้งเดิม แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนในหัวข้ออื่นๆ ได้แก่ กลิ่น ความเปรี้ยว ความพึงพอใจโดยรวมแล้วมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบน้ำยาบ้วนปากทั้งสามชนิด

การวิเคราะห์ข้อมูลแยกตามเพศพบว่าเพศหญิงให้คะแนนความพึงพอใจในสีของน้ำยาบ้วนปากมากกว่าเพศชาย และเพศชายรู้สึกว่าการปรับปรุง 2 ให้ความรู้สึกว่าสดชื่นและกลิ่นปากลดลงมากกว่าเพศหญิงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนข้อมูลอื่นๆ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

จากที่ได้กล่าวมาข้างต้นแล้วว่าอาสาสมัครกลุ่มนี้มีเฉพาะนักศึกษาทันตแพทย์และอยู่ในช่วงอายุเดียวเท่านั้นอาจจะไม่สามารถนำข้อมูลจากการศึกษานี้ไปประยุกต์ใช้กับผู้ป่วยทุกกลุ่มอายุได้ และวัตถุประสงค์ในการลดความเข้มข้นของคลอรีนในสูตรปรับปรุง 2 ก็เพื่อลดผลข้างเคียงต่างๆทางคลินิกด้วยผู้วิจัยจึงเสนอแนะว่าควรมีการติดตามผลการศึกษาทางคลินิกโดยเพิ่มกลุ่มเป้าหมายให้ครอบคลุมและมีการวัดผลในหลายรูปแบบต่อไปในอนาคต