

การด้านการสร้างไบโอฟิล์มของสารสกัดเซอริซินที่เคลือบบนแผ่นไทเทเนียมด้วยวิธีทำให้เกิดฟิล์มบางหลายชั้นของโพลีอิเล็กโทรไลต์

Anti-biofilm Activity of Sericin Extract Coated on Titanium by Polyelectrolyte Multilayer Film Technique

จิตรัตน์ อังวรารวงศ์¹, นบชนก แก้ววิเชียร², ปณิสรา ภูครองแถว², อรอุมา อังวรารวงศ์³

Thidarat Angwarawong¹, Nopchanok Kaewwichian², Panisa Phukrongthaw², Onauma Angwaravong³

¹สาขาวิชาทันตกรรมประดิษฐ์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น ประเทศไทย

¹Department of Prosthodontics, Faculty of Dentistry, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

²คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น ประเทศไทย

²Faculty of Dentistry, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

³แขนงวิชาทันตกรรมสำหรับเด็ก สาขาวิชาทันตกรรมป้องกัน คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น ประเทศไทย

³Division of Pediatric Dentistry, Department of Preventive Dentistry, Faculty of Dentistry, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

บทคัดย่อ

การติดเชื้อที่เกี่ยวข้องกับสิ่งปลูกฝังเป็นภาวะแทรกซ้อนหนึ่งที่พบได้ในผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยรากฟันเทียม โดยสาเหตุที่สำคัญเกิดจากการยึดติดของเชื้อจุลชีพและการสร้างไบโอฟิล์มบนสิ่งปลูกฝังไทเทเนียม มีหลายการศึกษาพยายามปรับปรุงคุณสมบัติพื้นผิวของไทเทเนียมด้านการต้านเชื้อจุลชีพ การทำให้เกิดฟิล์มบางหลายชั้นของโพลีอิเล็กโทรไลต์หรือพอลิเมอร์ฟิล์ม เป็นเทคนิคหนึ่งที่ใช้ในการปรับปรุงคุณสมบัติทางพื้นผิวของชีววัสดุ เซอริซินเป็นไกลโคโปรตีนที่ผลิตจากหอนไหม มีคุณสมบัติในการส่งเสริมกระบวนการออสติโออินทีเกรชันและมีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ คือ ปรับปรุงคุณสมบัติด้านการต้านการสร้างไบโอฟิล์มของพื้นผิวไทเทเนียมโดยใช้สารสกัดเซอริซินที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 0.5 1.5 และ 10 โดยมวลต่อปริมาตร เคลือบบนไทเทเนียมด้วยวิธีพอลิเมอร์ฟิล์ม ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างกระดูกปฏิกิริยาของมนุษย์ ทดสอบการต้านการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อสเตรปโทคอกคัส ออเรียส และแคนดิดา อัลบิแคนส์ ด้วยวิธีวัดการสร้างไบโอฟิล์มและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดหรือเอสซีเอ็ม ผลการศึกษาพบว่าไทเทเนียมที่เคลือบด้วยสารสกัดเซอริซินไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างกระดูกปฏิกิริยาของมนุษย์ ที่ 24 ชั่วโมง ร้อยละการมีชีวิตของเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ ที่อยู่ในไบโอฟิล์มลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติบนพื้นผิวไทเทเนียมที่เคลือบด้วยสารสกัดเซอริซินเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้เคลือบ ขณะที่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของร้อยละการมีชีวิตของเชื้อสเตรปโทคอกคัส ออเรียส ที่อยู่ในไบโอฟิล์มในทุกกลุ่ม ผลที่ได้จากการวิเคราะห์เอสซีเอ็มสอดคล้องกับผลที่ได้จากวิธีวัดการสร้างไบโอฟิล์ม สรุปได้ว่าไทเทเนียมที่เคลือบด้วยสารสกัดเซอริซินที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 0.5 1.5 และ 10 โดยมวลต่อปริมาตร ด้วยวิธีพอลิเมอร์ฟิล์มสามารถลดการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์บนพื้นผิวไทเทเนียม ผลที่ได้นี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของเทคนิคนี้เพื่อเป็นทางเลือกในการลดภาวะแทรกซ้อนจากการติดเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ ในผู้ป่วยที่ผ่าตัดทางทันตกรรมรากฟันเทียม

คำสำคัญ: การด้านการสร้างไบโอฟิล์ม, เซอริซิน, วิธีทำให้เกิดฟิล์มบางหลายชั้นของโพลีอิเล็กโทรไลต์, ไทเทเนียม

Abstract

Implant-related infection is a complication that could be found in patients receiving dental implant treatment. It is mainly caused by microbial adhesion and biofilm formation on titanium-base implants. Many studies tried to improve titanium surface properties to achieve antimicrobial activity. Polyelectrolyte multilayer (PEM) film is one of the methods used to modify biomaterial surface properties. Sericin, a glycoprotein produced by silkworm, is capable of promoting osseointegration process and possesses antimicrobial activity. The objective of this study is to improve anti-biofilm activity of titanium surface, using sericin extracts at concentrations of 0.1, 0.5, 1, 5 and 10 % w/v coating on titanium surface by PEM film technique. The cytotoxicity test was performed on primary human osteoblasts. The anti-biofilm activity against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* was determined by biofilm formation assay and scanning electron microscope (SEM). The results showed that titanium coated with sericin extracts showed no toxic effect on osteoblasts at 24 hours incubation period. The percentage of *Candida albicans* cell viability in biofilm was significantly reduced on sericin-coated titanium surface compared to uncoated group, whereas no significant difference of *Staphylococcus aureus* cell viability was found. The results from SEM analysis corresponded to the results from the biofilm formation assay. In conclusion, coating titanium surfaces with sericin extract at concentrations of 0.1, 0.5, 1, 5 and 10 % w/v by PEM film technique could reduce *Candida albicans* biofilm formation on titanium surface. These findings suggested the potential of this technique as an alternative way to reduce complication from *Candida albicans* infection in patients receiving implant treatment.

Keyword: Anti-biofilm activity, Sericin, Polyelectrolyte multilayers film, Titanium

Received date: Jul 9, 2019

Revised date: Aug 15, 2019

Accepted date: Dec 13, 2019

Doi: 10.14456/jdat.2020.13

ติดต่อเกี่ยวกับบทความ:

ธิดารัตน์ อังวรารวงศ์ สาขาวิชาทันตกรรมประดิษฐ์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002 ประเทศไทย

โทรศัพท์: 043-202-405 โทรสาร: 043-202-862 อีเมล: Thidarat_ang@hotmail.com

Correspondence to:

Thidarat Angwarawong, Department of Prosthodontics, Faculty of Dentistry, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand.

Tel: 043 202 405, Fax: 043 202 862, E-mail: Thidarat_ang@hotmail.com

บทนำ

ไทเทเนียมและไทเทเนียมอัลลอยด์เป็นชีววัสดุปลูกฝัง (implanted biomaterials) ที่ได้รับความนิยมทั้งทางการแพทย์และทันตกรรม เช่น ใช้เป็นสิ่งปลูกฝังออร์โธพีดิกส์ (orthopedic implant) และรากฟันเทียม (dental implant) เนื่องจากมีคุณสมบัติทางกลและเคมีที่ดี มีความต้านทานต่อการสึกกร่อนและมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatibility) กับเนื้อเยื่อในร่างกาย¹

ปัจจุบันมีความพยายามปรับปรุงคุณสมบัติของไทเทเนียมอย่างต่อเนื่องโดยมุ่งเน้นให้สามารถทำหน้าที่ได้หลากหลาย ทั้งการเพิ่มคุณสมบัติด้านการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactivity) เพื่อตอบสนองอย่างจำเพาะเจาะจงต่อการเกาะกลุ่ม (colonization) ของเซลล์ชนิดต่าง ๆ เช่น เซลล์สร้างกระดูก (osteoblasts) เซลล์สร้างเส้นใย (fibroblasts) และแมกโครเฟจ (macrophage) ให้การเกิดกระดูกเชื่อมประสาน

หรือกระบวนการออสซิโออินทีเกรชัน (osseointegration) ได้เร็วขึ้น รวมถึงต้องสามารถต่อต้านการสร้างแผ่นคราบชีวภาพหรือไบโอฟิล์ม (biofilm formation) และต่อสู้กับการติดเชืบบนพื้นผิวไทเทเนียม²

การติดเชืบบริเวณผิวรากฟันเทียมเป็นภาวะแทรกซ้อนที่สามารถพบได้บ่อย นอกจากจะเกิดจากความบกพร่องเกี่ยวกับความสามารถของระบบภูมิคุ้มกัน (compromised immune ability) ที่บริเวณรอยต่อระหว่างกระดูกและเนื้อเยื่อแล้ว การสร้างไบโอฟิล์มบนพื้นผิวรากฟันเทียมถือว่ามีบทบาทสำคัญในการเริ่มต้นของกระบวนการติดเชื้อ³ ในช่องปากมีภาวะแวดล้อมจุลภาคที่มีความซับซ้อนของเชื้อจุลชีพ มีแนวโน้มที่จะยึดติด (adhesion) กับพื้นผิวใด ๆ ก็ตามที่เหมาะสมและสร้างไบโอฟิล์มขึ้นมาได้⁴ มีรายงานว่า การเกิดเนื้อเยื่อรอบสิ่งปลูกฟันอักเสบ (peri-implantitis) มีความสัมพันธ์กับเชื้อจุลชีพก่อโรคปริทันต์ ได้แก่ เชื้อแอกกรีเกรทิแบคทีเรีย แอคทีโนมัยซีเทมโคมิแทนส์ (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) พอร์ไฟโรโมนาส จิงจิวัลลิส (*Porphyromonas gingivalis*) แทนเนอเรลลา ฟอรัซียเรีย (*Tannerella forsythia*) และทรีโพเนมา เดนทิกอลา (*Treponema denticola*)^{4,5} และมีรายงานว่าผู้ป่วยที่สูญเสียฟันจากโรคปริทันต์และแทนที่ฟันที่สูญเสียไปโดยการใส่รากฟันเทียมมีโอกาสสูงที่จะเกิดเนื้อเยื่อรอบสิ่งปลูกฟันอักเสบ⁵ อย่างไรก็ตามการเกิดเนื้อเยื่อรอบสิ่งปลูกฟันอักเสบยังมีความสัมพันธ์กับเชื้อจุลชีพที่ไม่ได้พบทั่วไปในโรคปริทันต์อักเสบด้วย ได้แก่ เชื้อในสกุลสแตฟีโลคอคคัส (*Staphylococcus* species) เช่น สแตฟีโลคอคคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*; *S. aureus*) และสแตฟีโลคอคคัส อีพิดิเดมิส (*Staphylococcus epidermidis*) และเชื้อในสกุลแคนดิดา (*Candida* species) เช่น แคนดิดา อัลบิแคนส์ (*Candida albicans*; *C. albicans*)^{4,5} โดยพบว่า เชื้อสแตฟีโลคอคคัส ออเรียส และแคนดิดา อัลบิแคนส์ เป็นเชื้อจุลชีพที่พบได้บ่อยในผู้ป่วยที่เกิดเนื้อเยื่อรอบสิ่งปลูกฟันอักเสบ^{5,6} มีรายงานว่าเชื้อสแตฟีโลคอคคัส ออเรียส มีความสามารถในการจับที่สูงและจำเพาะ (high and specific affinity) กับพื้นผิวไทเทเนียม เป็นตัวเริ่มต้นในการสร้างไบโอฟิล์ม และเป็นสาเหตุที่พบได้บ่อยในการติดเชื้อที่เกี่ยวข้องกับสิ่งปลูกฝัง (implant-related infection)⁷ ขณะที่แคนดิดา อัลบิแคนส์ เป็นจุลชีพก่อโรคแบบฉวยโอกาส (opportunistic pathogen) ที่พบได้ทั่วไปในไบโอฟิล์มบนพื้นผิวรากฟันเทียม และสามารถพัฒนาต่อให้เกิดเนื้อเยื่อรอบสิ่งปลูกฟันอักเสบได้⁶ นอกจากนี้แคนดิดา อัลบิแคนส์ ที่อยู่ในไบโอฟิล์มยังมีอิทธิพลต่อการเพิ่มการเกาะกลุ่มของเชื้อจุลชีพชนิดอื่นในไบโอฟิล์ม⁸ และทำให้เชื้อจุลชีพที่อยู่ในไบโอฟิล์มเกิดการดื้อต่อยาต้านจุลชีพที่ใช้ในการรักษาการติดเชื้อมากยิ่งขึ้น^{9,10} ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าเชื้อสแตฟีโลคอคคัส ออเรียส และแคนดิดา อัลบิแคนส์เป็นจุลชีพก่อโรคที่มีบทบาทสำคัญต่อการเกิดเนื้อเยื่อรอบสิ่งปลูกฟันอักเสบและการติดเชื้อของรากฟันเทียม

การสร้างไบโอฟิล์มที่เริ่มต้นทันทีหลังจากการยึดติดของเชื้อจุลชีพเป็นเหตุการณ์สำคัญที่ทำให้เกิดการติดเชื้อที่เกี่ยวข้องกับสิ่งปลูกฝัง ดังนั้นการป้องกันการสร้างไบโอฟิล์มโดยการเตรียมพื้นผิวชีววัสดุให้มีคุณสมบัติต้านเชื้อจุลชีพถือเป็นวิธีการที่ดีที่สุดในการหลีกเลี่ยงการแพร่กระจายของจุลชีพก่อโรคและการเสื่อมสภาพของวัสดุ (material deterioration)¹¹ ในทศวรรษที่ผ่านมา มีการศึกษาจำนวนมากรายงานความสามารถในการปรับเปลี่ยนพื้นผิวของวัสดุปลูกฝังไทเทเนียม (titanium-based implant) เพื่อส่งเสริมการเกิดกระบวนการออสซิโออินทีเกรชัน ลดการยึดติดของเชื้อจุลชีพ ด้านการสร้างไบโอฟิล์มและทำให้เกิดประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อจุลชีพ^{2,3,11-13} เช่น การเคลือบพื้นผิวไทเทเนียมด้วยธาตุโลหะอนินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อจุลชีพ (inorganic antimicrobial metal elements) ได้แก่ เงิน (Ag; silver) ทองแดง (Cu; copper) หรือสังกะสี (Zn; zinc) โดยวิธีสปัตเตอริง (sputtering) หรือการพ่นเคลือบด้วยพลาสมา (plasma spray) แม้ว่าวิธีการนี้จะมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อจุลชีพ อย่างไรก็ตามวิธีการนี้จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง นอกจากนี้การปลดปล่อยไอออนของโลหะ (metallic ions release) จากชั้นที่เคลือบอาจจะทำให้เกิดความเป็นพิษกับเซลล์และเนื้อเยื่อข้างเคียงได้²

วิธีทำให้เกิดฟิล์มบางหลายชั้นของโพลีอิเล็กโตรไลต์หรือพอลิเมอร์ฟิล์ม (polyelectrolyte multilayer (PEM) film technique) เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ในการปรับปรุงพื้นผิวของวัสดุ ที่ใช้หลักการของการดูดซับเป็นชั้นต่อชั้น (layer by layer) ของสารละลายโพลีอิเล็กโตรไลต์ที่มีประจุตรงกันข้าม ส่งผลให้เกิดแรงดึงดูดไฟฟ้าสถิตต่อกัน (electrostatic interaction) โดยชั้นของโพลีอิเล็กโตรไลต์เหล่านี้สามารถจัดระเบียบได้ด้วยตัวเอง (electrostatic self-assembly) และทำให้เกิดเป็นแผ่นฟิล์มหลายชั้นระดับนาโนเมตร¹⁴ ที่สามารถควบคุมความหนาของพอลิเมอร์ฟิล์มได้และเลือกใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นโพลีอิเล็กโตรไลต์ได้หลากหลาย เช่น ดีเอ็นเอ โปรตีน โมเลกุลชีวภาพ และโพลิเมอร์ชีวภาพ วิธีนี้มีข้อดี คือ ทำได้ง่าย รวดเร็ว สามารถทำซ้ำได้ ราคาไม่แพง มีความเสถียร ไม่มีข้อจำกัดของรูปร่างชีววัสดุที่นำมาเคลือบ มีประสิทธิภาพในการสร้างพื้นผิวที่มีความไวทางชีวภาพ และสามารถนำไปพัฒนาพื้นผิววัสดุเพื่อใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ได้มากมาย¹⁵ มีหลายการศึกษาทำการปรับปรุงคุณสมบัติด้านการต้านเชื้อจุลชีพของพื้นผิวรากฟันเทียมด้วยวิธีพอลิเมอร์ฟิล์ม^{16,17} เช่น Wong และคณะ ในปี 2010¹⁷ พบว่าเจนตามัยซิน (gentamycin) และไดโคลฟีแนก (diclofenac) ในพอลิเมอร์ฟิล์มที่เคลือบบนไทเทเนียมสามารถต้านการยึดติดและมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อสแตฟีโลคอคคัส ออเรียส ได้โดยไม่เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างกระดูกของหนูชนิดเอ็มซี3ที3-อี1 (MC3T3-E1 cells) ในปี 2019 Rodríguez และคณะ¹⁶ พบว่าเปปไทด์ (β-peptide)

ไคโตซาน (chitosan) และกรดไฮอะลูโรนิก (hyaluronic acid) ในพีอีเอ็มฟิล์มมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อสแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส และส่งเสริมการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูก เอ็มซี3ที3-01

เซอริซิน (sericin) คือ โกลโคโปรตีนธรรมชาติที่สร้างจากหนอนไหม (silkworm) พบได้ประมาณร้อยละ 25-30 ของโปรตีนไหม เป็นโปรตีนก้อนกลมที่ละลายน้ำได้ (water soluble globular protein family)¹⁸ มีคุณสมบัติชอบน้ำ (hydrophilic) ออสัญฐาน (amorphous) และลักษณะคล้ายกาว ทำหน้าที่ในการยึดโปรตีนเส้นไหมไฟโบรอิน (silk fibroin protein) เข้าด้วยกันเพื่อสร้างเป็นรังไหม ในอดีตเซอริซินถือว่าเป็นของเสียที่เกิดจากกระบวนการผลิตเส้นไหม อย่างไรก็ตามในปัจจุบันพบว่าเซอริซินมีคุณสมบัติที่ดีทางชีวภาพหลายด้าน เช่น มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเนื้อเยื่อ มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidation)¹⁹ ช่วยในการหายของแผล (wound healing)²⁰ การต้านเชื้อจุลชีพ^{13,21} ป้องกันรังสียูวี²² การต้านมะเร็ง²² และส่งเสริมให้เกิดกระบวนการสร้างกระดูก²³ จึงมีการนำเอาเซอริซินมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางทั้งทางการแพทย์ ยา และอุตสาหกรรมด้านความสวยงาม^{18,24,25}

เซอริซินมีการนำมาใช้ในการปรับปรุงพื้นผิวของไทเทเนียม เช่น Zhang และคณะในปี 2008¹³ ปรับปรุงพื้นผิวไทเทเนียมด้วยกรดโพลีเมทาคริลิก (poly(methacrylic acid)) และเซอริซินที่ได้จากไหมบอมบิกซ์ มอไร (*Bombyx mori*) พบว่าสามารถส่งเสริมการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cell proliferation) การทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase activity) และเพิ่มการสะสมของแคลเซียม (calcium deposition) ได้นอกจากนี้ยังมีประสิทธิภาพในการลดการยึดติดของเชื้อสแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส และสแตปฟีโลคอคคัส อีพิเดอร์มิดิส ได้มากกว่ากลุ่มควบคุมไทเทเนียม ในปี 2013 Nayak และคณะ²³ ทำการตรึงพื้นผิวไทเทเนียมด้วยเซอริซินที่ได้จากไหมทาสาร์ แอนเทอเรีย มายลิทตา (*Tasar silkworm, Antheraea mylitta*) จากนั้นนำมาทดสอบการทำงานของเซลล์ไลน์สร้างกระดูกหนูเอ็มจี-63 (MG-63 cells) พบว่าไทเทเนียมที่ตรึงพื้นผิวด้วยเซอริซินสามารถส่งเสริมการยึดติดของเซลล์ การเพิ่มจำนวนของเซลล์ และการแสดงออกของยีนโบนีโอโซโลโปรตีน (bone sialoprotein) ออสติโอแคลซิน (osteocalcin) และเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส เมื่อเปรียบเทียบกับไทเทเนียมที่ไม่ได้ปรับปรุงพื้นผิว

ในปัจจุบันมีการศึกษาเพียงเล็กน้อยที่ใช้เซอริซินในการปรับปรุงพื้นผิวของไทเทเนียมเพื่อส่งเสริมการทำงานของเซลล์สร้างกระดูกและต้านเชื้อจุลชีพ^{13,23} นอกจากนี้ยังไม่มีการศึกษาใดที่ใช้เซอริซินในการปรับปรุงพื้นผิวของไทเทเนียมด้วยวิธีพีอีเอ็มฟิล์มเพื่อศึกษาผลการต้านการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อจุลชีพ ดังนั้นการศึกษานี้จึงศึกษาคุณสมบัติของเซอริซินที่เคลือบบนแผ่นไทเทเนียม

ด้วยวิธีพีอีเอ็มฟิล์ม ในด้านการต้านการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อสแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส และแคนดิดา อัลบิแคนส์ เพื่อหวังผลในการลดการติดเชื้อที่เกี่ยวข้องกับสิ่งปลูกฝัง ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของความล้มเหลวของรากฟันเทียม

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมแผ่นไทเทเนียม

แท่งไทเทเนียม (commercial pure titanium grade II, KVM Heating Element Co., Lt., Pathumthani, Thailand) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร ถูกตัดให้มีความหนา 3 มิลลิเมตร และขัดให้เรียบทั้งสองด้านด้วยกระดาษทรายน้ำความละเอียด 500 800 และ 1000 ด้วยเครื่องขัดพื้นผิววัสดุ (variable speed grinder polisher, Ecomet 3, Buehler, Illinois, USA) จากนั้นทำความสะอาดด้วยน้ำไร้ประจุ (deionized water) ภายใต้อุปกรณ์ทำความสะอาดระบบอัลตราโซนิก (ultrasonic cleaner, Vibraclean 300, MDT biologic company, New York, USA) 10 นาที 2 ครั้ง ตามด้วยอะซิโตนและเอทานอลอย่างละ 10 นาที เพื่อกำจัดไขมัน²⁸ และล้างด้วยน้ำไร้ประจุ 5 นาที

2. การเคลือบไทเทเนียมด้วยสารสกัดเซอริซินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยวิธีทำให้เกิดพีอีเอ็มฟิล์ม

เตรียมสารละลายโพลีไดอัลลิโดแมททิวแอมโมเนียมคลอไรด์หรือพีดีดีเอ็มซี (poly(diallyldimethylammonium chloride), PDADMAC, Aldrich, Missouri, USA) และสารละลายโพลีไซเดียม-4-สไตรีนซัลโฟเนทหรือพีเอสเอส (poly(sodium 4-styrene sulfonate), PSS, Aldrich) ให้มีความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ในไฮเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ และเตรียมสารละลายสารสกัดเซอริซินที่ได้จากไหมบอมบิกซ์ มอไร (*Bombyx mori*, sericin extract powder, Specialty Natural Product®, Chonburi, Thailand) ให้ได้ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยมวลต่อปริมาตร จากนั้นนำมาเจือจางต่อให้ได้ความเข้มข้นร้อยละ 5 1.0.5 และ 0.1 โดยมวลต่อปริมาตร

การทำให้เกิดพีอีเอ็มฟิล์มบนแผ่นไทเทเนียม โดยจุ่มไทเทเนียมที่เตรียมไว้ลงในสารละลายชนิดต่าง ๆ บนเครื่องเขย่าแบบหมุนเป็นวงกลม (orbital shaker, PSU-10i, Grant Instrument (Cambridge) Ltd, Cambridge, UK) เริ่มจากจุ่มไทเทเนียมลงในสารละลายพีดีดีเอ็มซีซึ่งเป็นสารละลายที่มีประจุบวก 5 นาที ล้างด้วยน้ำไร้ประจุ 3 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที แล้วจุ่มต่อในสารละลายพีเอสเอส ซึ่งเป็นสารละลายที่มีประจุลบ เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำไร้ประจุ 3 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที ทำการจุ่มสลับไปมาจนถึงขั้นที่ 9 ซึ่งเป็นขั้นที่พีดีดีเอ็มซีอยู่ด้านบนสุด²⁶ จากนั้นนำไปจุ่มในสารละลายสารสกัดเซอริซินที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 0.5 1.5 หรือ 10 โดยมวลต่อปริมาตร 30 นาที ล้างด้วยน้ำไร้ประจุ 3 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที ทิ้งไว้ให้แห้ง

ก่อนนำชิ้นงานไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป นำชิ้นงานไปทำให้ปราศจากเชื้อทั้งสองด้านด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet) ที่ได้จากตู้กรองอากาศปราศจากเชื้อ (airstream class II biological safety cabinet, Esco Lifesciences (Thailand) Co., Ltd, Bangkok, Thailand) ด้านละ 30 นาที²⁷

3. การเพาะเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์ (primary human osteoblast cell culture)

นำเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์ที่ได้จากการตัดปุ่มกระดูก (torectomy) ขากรรไกรบนหรือล่างที่ขัดขวางการใส่ฟันเทียมที่เหลือจากโครงการวิจัยเลขที่ HE612210 ซึ่งผ่านการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟีนอลเรด (Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) with phenol red, Gibco, New York, USA) ที่มีการเติมแอลกลูตามีน (L-glutamine, GlutaMax™ supplement, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) ความเข้มข้นร้อยละ 1 ยาต้านปฏิชีวนะและยาต้านเชื้อรา (antibiotic-antimycotic, Thermo Fisher Scientific) ความเข้มข้นร้อยละ 1 และซีรัมที่ได้จากลูกอ่อนวัว (fetal bovine serum, FBS, HyClone™ FBS, HyClone, Utah, USA) ร้อยละ 15 ในสภาวะควบคุมที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 อากาศร้อยละ 95 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในการศึกษาที่ใช้เซลล์รุ่น (passage) ที่ 5 ถึง 6 จากอาสาสมัคร 3 ราย

4. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์ต่อสารสกัดเคโรซินที่เคลือบบนแผ่นไทเทเนียม โดยวิธีเอ็มทีที (MTT assay)

นำชิ้นตัวอย่างที่ปราศจากเชื้อของทั้ง 7 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มไทเทเนียมที่ไม่ได้เคลือบซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม (control group) กลุ่มไทเทเนียมที่เคลือบด้วยพีแอดีแม็กและพีเอสเอส 9 ชั้น ที่มีชั้น

พีแอดีแม็กอยู่บนสุด กลุ่มไทเทเนียมที่เคลือบด้วยสารสกัดเคโรซินที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 0.5 1 5 และ 10 โดยมวลต่อปริมาตร กลุ่มละ 3 ชิ้น ใส่ลงไปในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุม (24-well tissue culture plate, 24-well TCP, Corning, NY, USA) หลุมละ 1 ชิ้น ทำการหว่านเซลล์สร้างกระดูกในปริมาณ 5×10^4 เซลล์ต่อหลุมบนชิ้นงานตัวอย่าง และบนจานเลี้ยงเซลล์ ซึ่งใช้เป็นกลุ่มควบคุมแบบลบ (negative control) ทั้งไว้ 10 นาที จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ 500 ไมโครลิตรต่อหลุม และเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก ล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลาเยนหรือพีบีเอส (phosphate buffer saline, PBS) ใส่สารละลายเอ็มทีที ((3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), MTT, USB Corporation, Ohio, USA) ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็มที่ปราศจากฟีนอลเรด (DMEM without phenol red, Gibco) หลุมละ 300 ไมโครลิตร แล้วนำไปเพาะเลี้ยงต่อ 30 นาที เมื่อครบเวลาดูดสารละลายเอ็มทีทีที่ทิ้ง ล้างด้วยพีบีเอส และใส่สารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์หรือดีเอ็มเอสโอ (dimethyl sulfoxide, DMSO, Merck, Darmstadt, Germany) หลุมละ 500 ไมโครลิตร นำไปฉายให้ผลึกออกให้หมด จากนั้นดูดสารละลายที่ได้ในขั้นตอนสุดท้ายไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสงไมโครเพลต (microplate reader, Varioskan Flash, Thermo Fisher scientific) ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ภายในเวลา 30 นาที จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์เปรียบเทียบกับไทเทเนียมที่ไม่ได้เคลือบที่เป็นกลุ่มควบคุมตามสมการที่ 1 การศึกษาครั้งนี้ในแต่ละการทดลองใช้ตัวอย่าง 3 ชิ้นต่อกลุ่ม และทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง แต่ละครั้งใช้เซลล์สร้างกระดูกจากอาสาสมัครคนละราย

$$\text{ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มที่เพาะเลี้ยงบนไทเทเนียมที่เคลือบด้วยสารต่าง ๆ} \times 100}{\text{ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มที่เพาะเลี้ยงบนไทเทเนียมที่ไม่ได้เคลือบ}} \quad \text{สมการที่ 1}$$

5. การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

เตรียมเชื้อสแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส สายพันธุ์ ATCC 25923 DMST 8840 และแคนดิดา อัลบิแคนส์ สายพันธุ์ ATCC 10231 DMST 5815 โดยการถ่ายเชื้อ (streak) จากแหล่งเก็บเชื้อ (stock culture) ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดวุ้นทริปติกชอย (Tryptic soy agar, Soyabean Casein Digest Medium (Tryptone

Soya Broth), HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, India) แล้วบ่มในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเชยเชื้อ 1 โคโลนีใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวทริปติกชอย (Tryptic soy broth) นำมาบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบตามเวลาทำการปรับปริมาณเชื้อ โดยปรับปริมาณเชื้อสแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส ให้ได้เท่ากับ 10^8 โคโลนีฟอร์มมิงยูนิต

ต่อมิลลิลิตรหรือซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร (colony forming unit per milliliter; CFU/ml) และเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ ให้ได้เท่ากับ 10^6 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร โดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer, DU 730, Beckman Coulter Inc., California, USA) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีค่าความเข้มแสง (optical density, OD) เท่ากับ 0.1 เท่ากันทั้ง 2 เชื้อ²⁸

6. การทดสอบประสิทธิภาพการด้านการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดเซอรินซินที่เคลือบบนไทเทเนียมด้วยวิธีวัดการสร้างไบโอฟิล์ม (biofilm formation assay)

ทำการดูดเชื้อแต่ละชนิดที่เตรียมไว้ จำนวน 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง ตามด้วยชิ้นงาน 1 ชิ้นต่อ 1 หลอดทดลอง แล้วนำไปบ่มเพาะเชื้อในเครื่องเขย่าแบบหมุนเป็นวงกลม 24 ชั่วโมง เพื่อส่งเสริมให้เกิดการยึดติดของเชื้อ (adhesion phase) บนชิ้นงาน และเกิดเป็นไบโอฟิล์ม (biofilm phase) ขึ้น เมื่อครบกำหนดเวลาดูดอาหารเลี้ยงเชื้อออก ล้างด้วยฟิเอส 5 มิลลิลิตร 3 ครั้ง เพื่อกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ได้ยึดติด (non-adherent cells) บนชิ้นงานออก จากนั้นใส่ฟิเอสลงในหลอดทดลอง 5 มิลลิลิตร ทำการปิดฝาหลอดทดลองแล้วห่อหุ้มส่วนฝาหลอดทดลองด้วยแผ่นพาราฟิล์ม (Parafilm M® Laboratory Film, California, USA) นำหลอดทดลอง

ทั้งหมดไปสั่นในเครื่องอัลตราโซนิกเป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปสั่นต่อในเครื่องผสมสารวอร์เท็กซ์ (vortex mixer, Vortex-Genie®2, NewYork, USA) 1 นาที เพื่อให้จุลินทรีย์ที่อยู่ในไบโอฟิล์มหลุดออกจากชิ้นงาน²⁹ จากนั้นทำการดูดฟิเอสที่มีเชื้อจุลินทรีย์แขวนลอยอยู่จำนวน 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นตริฟิว (microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีฟิเอสอยู่ 900 ไมโครลิตร จากนั้นทำให้เจือจางลงครึ่งละ 10 เท่า (ten-fold serial dilution) จนถึงความเข้มข้นที่ 10^{-6} ทำการหยดเชื้อแต่ละชนิดของและความเข้มข้นลงจานเพาะเชื้อ (drop plate technique) หยดละ 10 ไมโครลิตร จำนวน 3 หยด ต่อความเข้มข้น นำไปบ่มเพาะเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการนับจำนวนโคโลนีในแต่ละจานเพาะเชื้อ โดยจะเลือกนับที่ระดับความเข้มข้นที่มีโคโลนีแยกออกจากกันอย่างชัดเจนและอยู่ในช่วง 3-30 โคโลนีต่อหยด นำจำนวนโคโลนีจากทั้ง 3 หยด ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันมาหาจำนวนโคโลนีเฉลี่ย จากนั้นคำนวณหาค่าการเจริญเติบโตของเชื้อบนจานเพาะเชื้อในหน่วยซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร (สมการที่ 2) จากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณร้อยละการมีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ในไบโอฟิล์ม โดยเทียบกับกลุ่มควบคุม (สมการที่ 3) ในแต่ละการทดลองจะใช้ชิ้นตัวอย่าง 3 ชิ้นต่อกลุ่ม ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

$$\text{จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ (CFU/ml)} = \frac{\text{จำนวนโคโลนีเฉลี่ย} \times \text{ระดับความเจือจาง}}{\text{ปริมาตรของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ (ml)}} \quad \text{สมการที่ 2}$$

$$\text{ร้อยละการมีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ในไบโอฟิล์ม} = \frac{\text{จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ (CFU/ml) ของกลุ่มไทเทเนียมที่เคลือบด้วยสารต่าง ๆ} \times 100}{\text{จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ (CFU/ml) ของกลุ่มไทเทเนียมที่ไม่ได้เคลือบ}} \quad \text{สมการที่ 3}$$

7. ตรวจสอบรูปร่างและปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

นำชิ้นตัวอย่างแต่ละชิ้นที่ผ่านการฆ่าเชื้อใส่ลงในหลอดทดลองที่มีเชื้อสแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส เท่ากับ 10^8 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร หรือมีเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ เท่ากับ 10^6 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร จำนวน 5 มิลลิลิตร ไปบ่มเพาะเชื้อในเครื่องเขย่าแบบหมุนเป็นวงกลม ในตู้บ่มเชื้อ 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเชื้อออก ล้างด้วยฟิเอส 1 ครั้ง ทำการตรึงเซลล์ (fixation) ด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde, Aldrich) ร้อยละ 3 นาน 30 นาที ล้างด้วยฟิเอส 2 ครั้ง นำไปประจุอีก 3 ครั้ง และทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำชิ้นงานตัวอย่างมาอบด้วยทองร้อยละ 99.9

เพื่อตรวจสอบรูปร่างและปริมาณของเชื้อผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope, SEM, S-3000N, HITACHI, Tokyo, Japan) ในแต่ละการทดลองจะใช้ชิ้นตัวอย่าง 3 ชิ้นต่อกลุ่ม ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

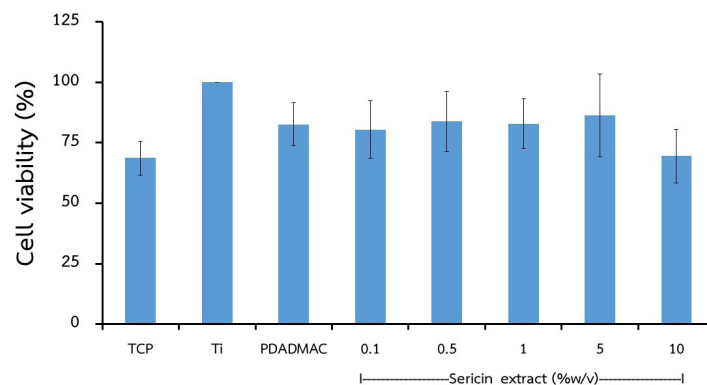
นำข้อมูลที่ได้จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์และการด้านการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อจุลินทรีย์บนแผ่นไทเทเนียมที่เคลือบด้วยสารสกัดเซอรินซินด้วยวิธีฟิเอสฟิล์มมาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยทดสอบการแจกแจงของข้อมูลด้วยสถิติทดสอบโคลโมโกรอฟ-สมิรโนฟ (Kolmogorov-Smirnov test) พบว่าข้อมูลมีการแจกแจงแบบปกติ จึงทำการวิเคราะห์ข้อมูลต่อด้วย

การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one-way analysis of variance, one-way ANOVA) และการเปรียบเทียบพหุคูณ (multiple comparison) ด้วยวิธีบอนเฟอร์โรนี (Bonferroni) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยโปรแกรมเอสพีเอสเอส (SPSS® 22.0 for window)

ผลการศึกษา

1. ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์ต่อสารสกัดเซอรินซินที่เคลือบบนแผ่นไทเทเนียม

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างกระดูกต่อสารสกัดเซอรินซินที่เคลือบบนไทเทเนียมด้วยวิธีพีอีเอ็มฟิล์มที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 0.5 1 5 และ 10 โดยมวลต่อปริมาตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์ต่อสารสกัดเซอรินซินที่เคลือบบนแผ่นไทเทเนียมด้วยพีอีเอ็มฟิล์ม ที่เวลาเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

ตัวย่อ: TCP, จานเลี้ยงเซลล์; Ti, แผ่นไทเทเนียม; PDADMAC, แผ่นไทเทเนียมที่เคลือบด้วยพีดีดีเอ็ม

Figure 1 Percentage of primary human osteoblast cell variability on sericin coated on titanium by PEM film technique at 24 hours incubation. Data were presented as the mean $\pm$ SD (n=3).

Abbreviations: TCP, Tissue culture plate; Ti, Titanium disc; PDADMAC, PDADMAC coated on titanium disc

2. ผลการทดสอบประสิทธิภาพการด้านการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดเซอรินซินที่เคลือบบนไทเทเนียม

การศึกษาการด้านการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อสแตปิโลคอคคัส ออเรียส (รูปที่ 2A) พบว่าไทเทเนียมที่ไม่ได้เคลือบมีค่าร้อยละการมีชีวิตของเชื้อที่อยู่ในไบโอฟิล์มมากที่สุดและมีค่าใกล้เคียงกลุ่มที่เคลือบด้วยพีดีดีเอ็มค้อยู่ชั้นบนสุด ส่วนกลุ่มที่เคลือบด้วยสารสกัดเซอรินซินที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 0.5 1 5 และ 10 โดยมวลต่อปริมาตร มีค่าร้อยละการมีชีวิตของเชื้อน้อยกว่ากลุ่มไทเทเนียมที่ไม่ได้เคลือบและกลุ่มที่เคลือบด้วยพีดีดีเอ็มค้อยู่ชั้นบนสุด อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกกลุ่มการทดลอง แสดงให้เห็นว่าสารสกัดเซอรินซินที่ความเข้มข้น

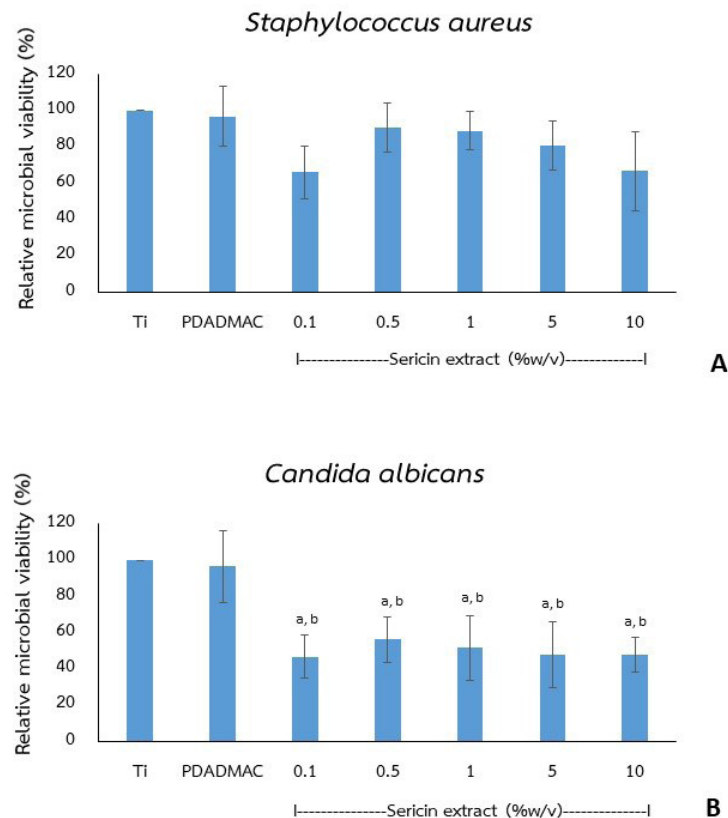
พบว่ากลุ่มไทเทเนียมที่เคลือบด้วยสารสกัดเซอรินซินทุกความเข้มข้นมีค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์น้อยกว่ากลุ่มไทเทเนียมที่ไม่ได้เคลือบ แต่มีค่ามากกว่ากลุ่มที่เพาะเลี้ยงบนจานเลี้ยงเซลล์ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมแบบลบ อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนชิ้นงานไทเทเนียมของทุกกลุ่มการทดลอง แสดงให้เห็นว่าสารสกัดเซอรินซินที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1-10 โดยมวลต่อปริมาตร ที่เคลือบบนไทเทเนียมด้วยวิธีพีอีเอ็มฟิล์มไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์ ดังนั้นจึงใช้ความเข้มข้นของสารสกัดเซอรินซินที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1-10 โดยมวลต่อปริมาตร ในการทดสอบความสามารถในการด้านการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อจุลินทรีย์

ร้อยละ 0.1-10 โดยมวลต่อปริมาตรที่เคลือบบนไทเทเนียมด้วยวิธีพีอีเอ็มฟิล์มไม่มีความมีประสิทธิภาพในการด้านการสร้างสแตปิโลคอคคัส ออเรียส ไบโอฟิล์มเมื่อเปรียบเทียบกับแผ่นไทเทเนียมที่ไม่ได้เคลือบ

การศึกษาการด้านการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ (รูปที่ 2B) พบว่าไทเทเนียมที่ไม่ได้เคลือบมีค่าร้อยละการมีชีวิตของเชื้อที่อยู่ในไบโอฟิล์มมากที่สุด และมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มที่เคลือบด้วยพีดีดีเอ็มค้อยู่ชั้นบนสุด ขณะที่กลุ่มที่เคลือบด้วยสารสกัดเซอรินซินที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 0.5 1 5 และ 10 โดยมวลต่อปริมาตร มีค่าร้อยละการมีชีวิตของเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ ที่อยู่ในไบโอฟิล์ม แตกต่างกับ

อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีค่าแตกต่างจากกลุ่มไทเทเนียมที่ไม่ได้เคลือบและกลุ่มที่เคลือบด้วยพีดีดีเอ็มที่ชั้นบนสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลที่ได้นี้อาจกล่าวได้ว่าสารสกัดเซอรินที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1-10 โดยมีผลต่อปริมาณที่เคลือบอยู่บน

แผ่นไทเทเนียมด้วยวิธีพีอีเอ็มฟิล์มมีประสิทธิภาพในการต้านการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ เมื่อเปรียบเทียบกับแผ่นไทเทเนียมที่ไม่ได้เคลือบ



รูปที่ 2 ร้อยละการมีชีวิตของเชื้อสแตปไฟโลคอคคัส ออเรียส (A) และแคนดิดา อัลบิแคนส์ (B) ในไบโอฟิล์ม ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($n=3$) a แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มไทเทเนียมที่ไม่ได้เคลือบกับกลุ่มอื่นๆ b แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มไทเทเนียมที่มีพีดีดีเอ็มที่ชั้นบนสุดกับกลุ่มอื่นๆ ($p<0.05$)

ตัวย่อ: TCP, จานเลี้ยงเซลล์; Ti, แผ่นไทเทเนียม; PDADMAC, แผ่นไทเทเนียมที่เคลือบด้วยพีดีดีเอ็ม

Figure 2 Percentage of microbial viability of *Staphylococcus aureus* biofilm(A) and *Candida albicans* (B) in biofilm. Data were presented as the mean $\pm$ SD ($n=3$). a indicates significant difference between uncoated Ti group and other groups. b indicates significant difference between PDADMAC coated on Ti group and other groups ($p<0.05$).

Abbreviations: TCP, Tissue culture plate; Ti, Titanium disc; PDADMAC, PDADMAC coated on titanium disc

3. ผลการตรวจสอบการรูปร่างและปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

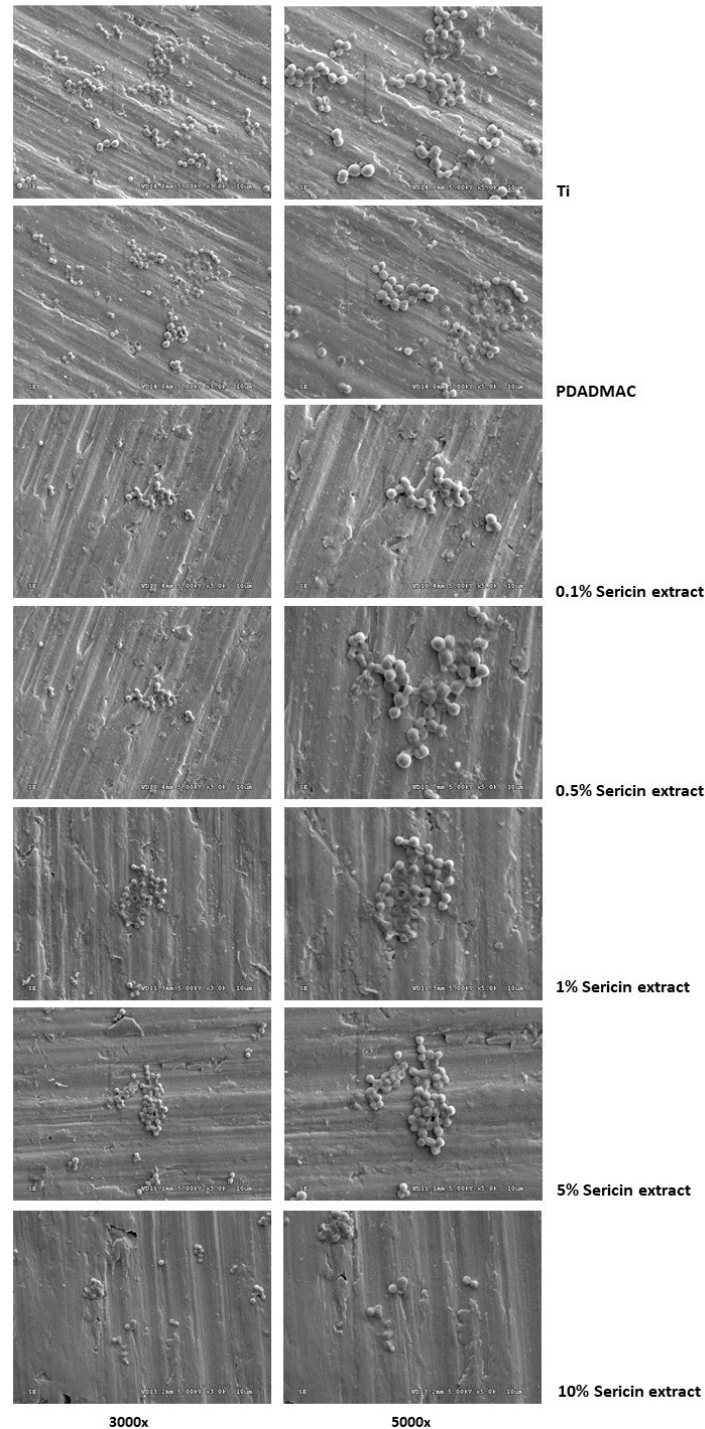
การตรวจสอบรูปร่างและปริมาณของเชื้อสแตปไฟโลคอคคัส ออเรียส (รูปที่ 3) และแคนดิดา อัลบิแคนส์ (รูปที่ 4) ที่อยู่ในไบโอฟิล์มบนไทเทเนียมที่มีการเตรียมพื้นผิวที่แตกต่างกัน ที่ 24 ชั่วโมง พบว่าการเปลี่ยนแปลงพื้นผิวของไทเทเนียมโดยการเคลือบด้วยพีดีดีเอ็ม ชั้นบนสุดและเซอรินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ไม่มีผลต่อรูปร่างปกติของเชื้อทั้งสองชนิด เมื่อตรวจสอบด้วยเอสอีเอ็ม พบว่า เชื้อสแตปไฟโลคอคคัส ออเรียส ยังคงแสดงรูปร่างกลมที่จับตัวกันเป็นกลุ่ม

เหมือนกันในทุกพื้นผิว ส่วนแคนดิดา อัลบิแคนส์ พบทั้งเซลล์รูปร่างค่อนข้างกลมของยีสต์ (yeast) และรูปร่างเป็นสาย (filamentous) แบบซูโดไฮฟี (pseudo-hyphae) และไฮฟี (hyphae) อย่างไรก็ตามพื้นผิวที่แตกต่างกันส่งผลให้มีปริมาณเชื้อในไบโอฟิล์มแตกต่างกัน โดยพบว่าปริมาณเชื้อในไบโอฟิล์มของทั้ง 2 ชนิด เป็นไปในทิศทางเดียวกัน โดยกลุ่มไทเทเนียมที่ไม่ได้เคลือบสารใด ๆ มีปริมาณของเชื้อทั้งสองชนิดหนาแน่นใกล้เคียงกันกับกลุ่มไทเทเนียมที่เคลือบพีดีดีเอ็มชั้นบนสุด แต่มีความหนาแน่นมากกว่ากลุ่มไทเทเนียมที่ถูกเคลือบด้วยสารสกัด เซอรินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยเฉพาะ

ในเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ จะเห็นความแตกต่างอย่างชัดเจน ส่วนไทเทเนียมที่ถูกเคลือบด้วยสารสกัดเซอรินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างของปริมาณของเชื้อสแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส

และแคนดิดา อัลบิแคนส์ ที่ชัดเจน ซึ่งผลที่ได้จากตรวจสอบด้วยเอสอีเอ็มสอดคล้องกับผลที่ได้จากวิธีวัดการสร้างไบโอฟิล์ม

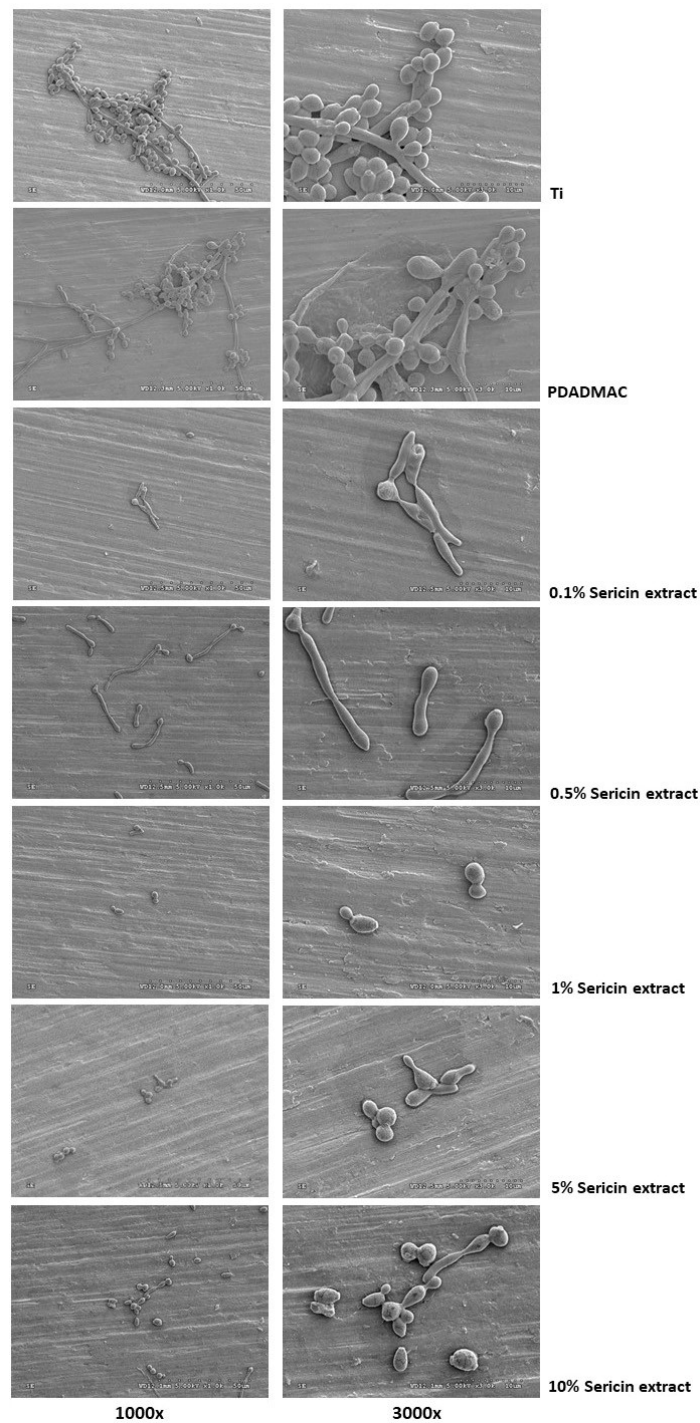
Staphylococcus aureus



รูปที่ 3 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของสแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส ไบโอฟิล์ม ที่กำลังขยาย 3000x และ 5000x ด้วย: TCP,จานเลี้ยงเซลล์; Ti,แผ่นไทเทเนียม; PDADMAC,แผ่นไทเทเนียมที่เคลือบด้วยพีแอดีแม็ค

Figure 3 Scanning electron micrograph of *Staphylococcus aureus* biofilm at 3000x and 5000x magnification
Abbreviations: TCP, Tissue culture plate; Ti, Titanium disc; PDADMAC, PDADMAC coated on titanium disc

Candida albicans



รูปที่ 4 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของแคนดิดา อัลบิแคนส์ ไบโอฟิล์ม ที่กำลังขยาย 1000x และ 3000x ด้วย: TCP,จานเลี้ยงเซลล์; Ti,แผ่นไทเทเนียม; PDADMAC,แผ่นไทเทเนียมที่เคลือบด้วยพีแอดีเอ็มซี

Figure 4 Scanning electron micrograph of *Candida albicans* biofilm at 1000x and 3000x magnification
Abbreviations: TCP, Tissue culture plate; Ti, Titanium disc; PDADMAC, PDADMAC coated on titanium disc

บทวิจารณ์

การติดเชื้อที่เกี่ยวข้องกับสิ่งปลูกฝังเป็นสาเหตุอย่างหนึ่งที่นำไปสู่ความล้มเหลว ไทเทเนียมและไทเทเนียมอัลลอยด์ที่ใช้ทำสิ่งปลูกฝังทางการแพทย์มีคุณสมบัติเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเนื้อเยื่อของร่างกาย ดังนั้นหลังจากฝังสิ่งปลูกฝังไทเทเนียมเข้าไปในกระดูกจะเกิดการสร้างขึ้นของโปรตีนปกคลุมผิวสิ่งปลูกฝัง ทำให้เกิดสภาวะที่เหมาะสมต่อการยึดติดและเจริญเติบโตของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกระดูกรอบสิ่งปลูกฝัง ในทางตรงข้ามก็จะเกิดสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกาะกลุ่มของเชื้อจุลินทรีย์ด้วยและเกิดไบโอฟิล์มขึ้นมาได้ภายใน 30 นาที^{3,12} การก่อตัวของไบโอฟิล์มมีบทบาทสำคัญในการเริ่มและการลุกลามของการติดเชื้อรอบ ๆ สิ่งปลูกฝัง³⁰ โดยจะทำให้ลายเนื้อเยื่อที่อยู่ข้างเคียง นำไปสู่การเกิดหลอดเลือดมากที่ไม่ดี (poor vascularization) สิ่งปลูกฝังหลวม (loosening) หรือแยกออก (detachment) หรือเกิดการเคลื่อนตำแหน่ง (dislocation) ในที่สุดก็ส่งผลให้เกิดความล้มเหลวของสิ่งปลูกฝัง³¹ นอกจากนี้การติดเชื้อที่เกี่ยวข้องกับไบโอฟิล์มบนอุปกรณ์การแพทย์ทำให้เกิดปัญหาต่อการรักษามากยิ่งขึ้นเนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ในไบโอฟิล์มจะดื้อต่อยาต้านจุลินทรีย์ และพบบ่อยครั้งว่ามีความจำเป็นที่จะต้องเอาสิ่งปลูกฝังเหล่านี้ออก¹⁰ ดังนั้นการป้องกันการสร้างไบโอฟิล์มโดยการเตรียมพื้นผิววัสดุให้มีความเหมาะสมด้านเชื้อจุลินทรีย์ถือเป็นวิธีการที่ดีที่สุดในการหลีกเลี่ยงการแพร่กระจายของจุลินทรีย์ก่อโรคและการเสื่อมสภาพของวัสดุ¹¹

การศึกษารุ่นนี้เป็นการศึกษาแรกที่ทำการศึกษาการเตรียมแผ่นไทเทเนียมที่เคลือบด้วยสารสกัดเซโรซินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยวิธีฟิสิกส์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการต้านการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อสแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส และแคนดิดา อัลบิแคนส์ แม้ว่าจะมีรายงานว่าเกิดการเนื้องอกของสิ่งปลูกฝังอีกเสบมีความสัมพันธ์กับจุลินทรีย์ก่อโรครุนแรง อย่างไรก็ตามการเกิดเนื้องอกของสิ่งปลูกฝังอีกเสบยังมีความสัมพันธ์เชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ได้พบทั่วไปในโรครุนแรงอีกเสบด้วย ได้แก่ เชื้อในสกุลสแตปฟีโลคอคคัส และเชื้อในสกุลแคนดิดา ในการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้เชื้อจุลินทรีย์ 2 ชนิด คือเชื้อสแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส และแคนดิดา อัลบิแคนส์ เนื่องจากมีการศึกษาพบว่าเชื้อสแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส มีความสามารถในการยึดติดกับพื้นผิวไทเทเนียม เป็นตัวเริ่มต้นในการสร้างไบโอฟิล์มและพบได้บ่อยในการติดเชื้อชีววัสดุที่เป็นโลหะทั้งสิ่งปลูกฝังออร์โทพีดิกส์ และรากฟันเทียม⁷ นอกจากนี้จากการศึกษาของKronstrom และคณะ ในปี 2000³² อ้างว่าเชื้อสแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส มีความสัมพันธ์กับการเกิดความล้มเหลวของกระบวนการออสซิโออินทีเกรชั่น จากการตรวจพบปริมาณซีรัมอิมมูโนโกลอบูลินจี

แอนติบอดีไคเตอร์ (serum IgG antibody titers) ต่อเชื้อสแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส ในผู้ป่วยที่เกิดความล้มเหลวของกระบวนการออสซิโออินทีเกรชั่นในระยะที่สองของการผ่าตัดรากฟันเทียม (stage-two implant surgery) มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่ประสบความสำเร็จของกระบวนการออสซิโออินทีเกรชั่นในการใส่รากฟันเทียม ซึ่งเป็นการบ่งชี้ถึงกระบวนการในการป้องกันเพื่อต่อต้านต่อการติดเชื้อสแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส ในปี 2014 Persson และคณะ⁵ พบปริมาณของเชื้อสแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส ในตำแหน่งที่เกิดเนื้องอกของสิ่งปลูกฝังอีกเสบมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับตำแหน่งรากฟันเทียมที่มีสุขภาพดี (healthy implant site) ส่วนแคนดิดา อัลบิแคนส์ เป็นเชื้อราที่พบบ่อยที่สุดในช่องปาก¹⁰ และสามารถพบได้ในคนที่มีสุขภาพช่องปากที่ดี เชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์สามารถยึดติดและเกิดการสร้างไบโอฟิล์มขึ้นมาได้กับทุกส่วนของส่วนประกอบของรากฟันเทียม (dental implant components) โดยเฉพาะส่วนฟิกซ์เจอร์ (fixture) ที่พบว่ามี การสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ มากกว่าและหนาแน่นกว่าชิ้นส่วนอื่น ๆ เช่น หลักยึดสิ่งปลูกฝัง (implant abutment) ในปี 2019 Alrabiah และคณะ⁶ พบว่าไบโอฟิล์มใต้เหงือกในตำแหน่งที่เกิดเนื้องอกของสิ่งปลูกฝังอีกเสบจะมีเชื้อในสกุลแคนดิดา มากกว่าตำแหน่งรากฟันเทียมที่มีสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยแคนดิดา อัลบิแคนส์ เป็นจุลินทรีย์ก่อโรคในสกุลแคนดิดาที่พบมากที่สุดในโครงสร้างของไบโอฟิล์ม มีหลายการศึกษาที่รายงานถึงอิทธิพลของเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ ที่เจริญเติบโตอยู่ในไบโอฟิล์ม เช่น Janus และคณะ ในปี 2017⁸ พบว่าในสภาวะที่มีอากาศ (aerobic condition) เชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ที่อยู่ในไบโอฟิล์มจะส่งเสริมให้เกิดการเกาะกลุ่มกันของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ซึ่งได้แก่ เชื้อสกุลพรีโวเทลลา (*Prevotella species*) และสกุลฟูโซแบคทีเรีย (*Fusobacterium species*) ได้มากกว่าในไบโอฟิล์มที่ไม่มีเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ อยู่ ดังนั้นผู้วิจัยกลุ่มนี้จึงสรุปว่าเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ สามารถเปลี่ยนแปลงชีวนิเวศจุลินทรีย์หรือไม่โครไบโอม (microbiome) ของแบคทีเรีย โดยการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียที่ไม่ต้องการอากาศ (anaerobic bacteria) ในระยะเริ่มต้นของการเกิดไบโอฟิล์มได้ ในทางกลับกันเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ สเตรปโตคอคคัส แซงควินิส (*Streptococcus sanguinis*) และสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ (*Streptococcus mutans*) ที่เจริญเติบโตร่วมกับแคนดิดา อัลบิแคนส์ ไบโอฟิล์มบนไทเทเนียมก็มีอิทธิพลต่อการควบคุมความรุนแรง (virulence) ของเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์

โดยแสดงให้เห็นจากการเพิ่มการเจริญเติบโตของไฮฟี (hyphal development) และเพิ่มการแสดงออกของยีนส์ที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของแคนดิดา อัลบิแคนส์ หลายชนิด³³ มีรายงานว่าแคนดิดา อัลบิแคนส์ ที่เจริญเติบโตอยู่ในไบโอฟิล์มจะมีความดื้อต่อยาต้านเชื้อราฟลูโคนาโซล (antifungal fluconazole) 100 เท่าหรือมากกว่า และมีความดื้อต่อยาต้านเชื้อราแอมโฟเทอริซิน บี (antifungal amphotericin B) มากกว่า 20-30 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ (planktonic cells)¹⁰ นอกจากนี้แคนดิดา อัลบิแคนส์ ที่อยู่รวมกันกับเชื้อสแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส ในไบโอฟิล์มจะส่งผลให้เชื้อสแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส มีลักษณะฟีโนไทป์ (phenotype) แตกต่างไปจากไบโอฟิล์มที่มีเชื้อสแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส เพียงชนิดเดียว และมีผลให้เชื้อสแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส มีความดื้อต่อยาแวนโคไมซิน (vancomycin) มากขึ้น⁹ จากที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นว่าทั้งเชื้อสแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส และแคนดิดา อัลบิแคนส์ มีความสัมพันธ์กับการเกิดการติดเชื้อของรากฟันเทียมและเป็นเชื้อที่ทำให้เกิดปัญหาต่อการรักษามากยิ่งขึ้น

ก่อนเริ่มต้นศึกษาประสิทธิภาพการต้านการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดเซโรซินที่เคลือบบนไทเทเนียมด้วยวิธีฟิโอะเอ็มฟิล์มได้ทำการทดสอบก่อนว่าไทเทเนียมที่ทำการเตรียมด้วยวิธีนี้มีความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างกระดูกหรือไม่ ในการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้เซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์ในการทดสอบแทนการใช้เซลล์ที่ได้จากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น เช่น หนู เนื่องจากต้องการลดปัจจัยความแตกต่างของเซลล์และต้องการเชื่อมโยงผลที่ได้ไปยังการใช้งานทางคลินิก ส่วนการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ในการศึกษานี้เลือกใช้วิธีเอ็มทีที เนื่องจากวิธีนี้เป็นวิธีวัดความเป็นพิษและความมีชีวิตของเซลล์จากการวัดกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ (cellular metabolic activity) ที่ได้รับการยอมรับทำได้ง่าย ราคาไม่แพง และมีความแม่นยำในการทำซ้ำสูง (high reproducibility) แต่วิธีนี้ต้องระมัดระวังการถูกรบกวนโดยสารที่มีสีอื่น ๆ วิธีเอ็มทีทีอาศัยหลักการว่าเซลล์ที่มีชีวิตจะใช้เอนไซม์ไมโทคอนเดรียดีไฮโดรจีเนส (mitochondrial dehydrogenase) เปลี่ยนสารละลายเอ็มทีทีสีเหลืองที่เป็นเกลือเตตราโซเลียม (tetrazolium salt) ให้เป็นผลิตภัณฑ์ฟอร์มาซาน (formazan) ที่มีสีม่วง ไม่ละลายน้ำแต่สามารถละลายได้ในตัวทำละลาย เช่น ดีเอ็มเอสโอ ทำให้ได้สารละลายสีม่วงน้ำเงินที่นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงและคำนวณร้อยละการมีชีวิตของเซลล์³⁴

ผลการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์ที่ 24 ชั่วโมง แม้ว่าสารสกัดเซโรซินที่เคลือบบนแผ่นไทเทเนียมด้วยวิธีฟิโอะเอ็มฟิล์มที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 0.5 1 5 และ 10 โดยมวลต่อปริมาตร มีค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์

น้อยกว่ากลุ่มไทเทเนียมที่ไม่ได้เคลือบ อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่มไทเทเนียมที่เคลือบด้วยสารสกัดเซโรซินมีค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ค่ามากกว่า 50 และมีค่าสูงกว่ากลุ่มของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงอยู่บนภาตเลี้ยงเซลล์ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมแบบลบและใช้เป็นมาตรฐานทั่วไปในการเลี้ยงเซลล์ ผลที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่าไทเทเนียมที่เคลือบด้วยสารสกัดเซโรซินด้วยวิธีฟิโอะเอ็มฟิล์มที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1-10 โดยมวลต่อปริมาตร ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างกระดูก ดังนั้นจึงสามารถใช้สารสกัดเซโรซินที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1-10 โดยมวลต่อปริมาตร ในการศึกษาประสิทธิภาพในการต้านการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อจุลินทรีย์ในขั้นตอนต่อไปได้

การทดสอบการต้านเชื้อจุลินทรีย์สามารถทำได้หลายวิธี เช่น วิธีดิสคิฟฟิวชัน (disc diffusion method)³⁵ วิธีไทม์คิลลิ่ง (time killing assay)³⁵ และวิธีวัดการสร้างไบโอฟิล์ม²⁹ ในการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้วิธีวัดการสร้างไบโอฟิล์มในการทดสอบการต้านเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งวิธีนี้ประกอบไปด้วยหลายขั้นตอน ได้แก่ การทำให้เกิดการยึดติดของเชื้อจุลินทรีย์ จากนั้นทำการบ่มเพาะเชื้อต่อเพื่อให้เกิดการสร้างไบโอฟิล์ม เมื่อถึงระยะเวลาที่กำหนดทำการล้างเชื้อที่ไม่ได้ยึดติดออก ตามด้วยการทำให้จุลินทรีย์ที่อยู่ในไบโอฟิล์มหลุดออกจากชิ้นงาน จากนั้นทำการเจือจางสารละลายฟิโอะเอ็มทีทีที่มีเชื้อจุลินทรีย์แขวนลอยอยู่และนำไปบ่มเพาะเชื้อ เมื่อครบตามกำหนดเวลาจึงทำการนับจำนวนโคโลนีในแต่ละจานเพาะเชื้อเพื่อคำนวณหาค่าการเจริญเติบโตของเชื้อต่อไป จะเห็นว่าวิธีการนี้ได้จำลองให้ไบโอฟิล์มเกิดขึ้นซึ่งเป็นการเลียนแบบการเกิดไบโอฟิล์มก่อนที่จะเกิดการติดเชื้อบนสิ่งปลูกฝังในมนุษย์ แต่วิธีการนี้ก็มีข้อจำกัดเนื่องจากไม่สามารถทราบได้ว่าในขั้นตอนการเขย่าและสั่นชิ้นงานเพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์อยู่ในไบโอฟิล์มหลุดออกจากชิ้นงานนั้นเชื้อจุลินทรีย์ที่หลุดออกจากชิ้นงานหมดหรือไม่ อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ครั้งนี้ได้มีการควบคุมระยะเวลาที่ใช้ในการเขย่าและสั่นชิ้นงานให้เท่ากันทุกกลุ่มทดลอง ร่วมกับผลที่ได้จากเอสบีเอ็มทีที่พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ยูบขึ้นงานในทุกกลุ่มการทดลองมีปริมาณไม่มากนัก จึงคิดว่าระยะเวลาที่ใช้ในการเขย่าและสั่นเพื่อเอาเชื้อจุลินทรีย์ออกจากวิธีและระยะเวลาที่กำหนดไว้น่าจะทำให้เชื้อหลุดออกได้หมด อย่างไรก็ตามถ้าต้องการยืนยันว่าระยะเวลาที่ใช้ในการเขย่าและสั่นตามที่กำหนดไว้ในการศึกษานี้เพียงพอต่อการทำให้เชื้อหลุดออกจากชิ้นงานหมดหรือไม่ อาจตรวจสอบได้โดยการนำชิ้นงานภายหลังจากการการเขย่าไปตรวจสอบด้วยเอสบีเอ็ม

ผลที่ได้จากการศึกษาประสิทธิภาพในการต้านการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อจุลินทรีย์ครั้งนี้ พบว่าสารสกัดเซโรซินที่เคลือบบน

แผ่นไทเทเนียมด้วยวิธีฟิโอะเอ็มฟิล์มที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 0.5 1.5 และ 10 โดยมวลต่อปริมาตร ไม่มีผลต่อการต้านการยึดติดของเชื้อสแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส แต่มีประสิทธิภาพในการต้านการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ เมื่อเทียบกับแผ่นไทเทเนียมที่ไม่ได้เคลือบ จากการทบทวนวรรณกรรมที่ผ่านมาการศึกษาเพียงเล็กน้อยที่รายงานถึงผลของเซอรินต่อการต้านการยึดติดของเชื้อสแตปฟีโลคอคคัส ออเรียสและเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์^{13,20,21,36} โดยผลของเซอรินต่อการต้านเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับ Ahamad และ Vootla ในปี 2018²¹ ที่พบว่าสารสกัดเซอรินที่ได้จากไหมทาชาร์ แอนเทอเรีย มายลิทา ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.0025-0.01 โดยมวลต่อปริมาตร มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ และสแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส อย่างไรก็ตามผลที่ได้เกี่ยวกับประสิทธิภาพของสารสกัดเซอรินต่อการต้านเชื้อสแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส ยังมีความขัดแย้งกันในปัจจุบัน เช่น Senakoon และคณะ ในปี 2009³⁶ พบว่าสารสกัดเซอรินที่ได้จากไหมป่าอีรีหรือชาเมียรินี (Eri silkworm, *Samia ricini*) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.002-0.004 โดยมวลต่อปริมาตร มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตและการแบ่งเซลล์ (cell division) ของเชื้อสแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส โดยทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อสแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส มีรูปร่างที่ผิดปกติและสูญเสียการทำหน้าที่ไป สอดคล้องกับ Ahamad และ Vootla²¹ ที่กล่าวไว้ข้างต้นและยังสอดคล้องกับ Zhang และคณะ ในปี 2008¹³ ที่รายงานประสิทธิภาพในการต้านการยึดติดของเชื้อสแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส บนไทเทเนียมที่ทำการปรับปรุงโดยตรงพื้นผิวด้วยการใช้กรดโพลีเมทาคริลิกร่วมกับเซอรินที่ได้จากบอมบิกซ์ มอไร ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยมวลต่อปริมาตร ว่าสามารถลดการยึดติดของเชื้อสแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส ได้มากกว่ากลุ่มควบคุมไทเทเนียม อย่างไรก็ตามผู้วิจัยกลุ่มนี้อ้างว่าประสิทธิภาพในการต้านการยึดติดของเชื้อสแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส บนพื้นผิวไทเทเนียมที่ปรับปรุงนี้เป็นผลมาจากกรดโพลีเมทาคริลิกที่เคลือบอยู่ชั้นล่างมากกว่าผลจากเซอรินที่อยู่ชั้นบน ซึ่งตรงกันข้ามกับผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ ที่พบว่าการใช้พีแด้กแม็ค พีเอสเอส และสารสกัดเซอรินจากไหมบอมบิกซ์ มอไร ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 - 10 โดยมวลต่อปริมาตร ในการปรับปรุงพื้นผิวแผ่นไทเทเนียมด้วยวิธีฟิโอะเอ็มฟิล์มไม่มีประสิทธิภาพในการต้านการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อสแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส รวมถึงแผ่นไทเทเนียมที่มีชั้นพีแด้กแม็คอยู่บนสุดก่อนที่จะเคลือบด้วยเซอรินก็ไม่มีประสิทธิภาพในการต้านการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อสแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส เช่นกัน โดยผลที่ได้ในการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Liu และคณะ ในปี 2018²⁰ ที่พบว่าวัสดุทำแผล (wound dressing)

ที่ได้จากการผสมเซอรินความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยมวลต่อปริมาตร เข้าไปในวุ้น (agar) ไม่มีผลต่อเชื้อสแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส ในด้านการต้านเชื้อแบคทีเรียและการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (bacteriostatic activity) การที่ผลการศึกษาที่ผ่านมามีความแตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากเซอรินที่ใช้ในการทดสอบได้มาจากไหมต่างสายพันธุ์กัน วิธีการสกัดเซอรินต่างกัน ความเข้มข้นของเซอรินที่ใช้แตกต่างกัน รวมถึงการนำเอาเซอรินมาประยุกต์ใช้ด้วยวิธีที่ต่างกัน นอกจากนี้ยังมีความแตกต่างกันในวิธีการทดสอบชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ และวิธีการคำนวณประสิทธิภาพในการต้านเชื้อและการเจริญเติบโตของเชื้อจุลชีพ ซึ่งปัจจัยทั้งหมดเหล่านี้อาจทำให้ได้ผลการทดลองที่ได้แตกต่างกันไป

ความเข้มข้นของสารสกัดเซอรินที่ใช้ในการศึกษานี้ แม้ว่าจะมีค่ามากกว่าการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Ahamad และ Vootla²¹ และการศึกษาของ Senakoon และคณะ³⁶ แต่จะเห็นว่าทั้งสองกลุ่มการศึกษานี้ใช้สารละลายสารสกัดเซอรินทดสอบกับเชื้อจุลชีพโดยตรง ต่างจากการศึกษาของ Zhang และคณะ¹³ และการศึกษาของ Liu และคณะ²⁰ ที่มีการใช้สารสกัดเซอรินเข้าไปในวัสดุที่ต้องการทดสอบก่อนที่จะนำมาทดสอบกับเชื้อจุลชีพ ซึ่งพบว่าความเข้มข้นของสารสกัดเซอรินที่ใช้อยู่ในช่วงร้อยละ 0.5-2 โดยมวลต่อปริมาตร ซึ่งก็มีค่าเพิ่มมากขึ้นกว่าสองการศึกษาแรกในการศึกษารุ่นนี้เลือกใช้ความเข้มข้นร้อยละ 0.1-10 โดยมวลต่อปริมาตร ซึ่งมีช่วงที่คาบเกี่ยวกับการศึกษาของ Zhang และคณะ และ Liu และคณะ นอกจากนี้ความเข้มข้นของสารสกัดเซอรินที่ใช้ในการศึกษารุ่นนี้เป็นความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดเซอรินที่ใช้ในการเคลือบเพื่อทำให้เกิดฟิโอะเอ็มฟิล์ม แต่ไม่ใช่ความเข้มข้นของสารสกัดเซอรินที่เคลือบอยู่บนแผ่นไทเทเนียม ซึ่งจะมีปริมาณของสารสกัดเซอรินน้อยกว่าในสารละลายที่ใช้ในการเตรียมฟิโอะเอ็มฟิล์มมาก เนื่องจากโดยทั่วไปแล้วฟิโอะเอ็มฟิล์มที่เคลือบอยู่บนวัสดุจะมีความหนาระดับนาโนเมตร¹⁴ ดังนั้นแม้ว่าความเข้มข้นของสารละลายสารสกัดเซอรินที่เตรียมในการศึกษานี้จะมีความเข้มข้นมากกว่าการศึกษาก่อนหน้านี้แต่ความเข้มข้นหรือปริมาณของเซอรินที่อยู่ในฟิโอะเอ็มฟิล์มอาจจะมีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย ซึ่งปริมาณของสารสกัดเซอรินที่แท้จริงที่อยู่ในฟิโอะเอ็มฟิล์มบนไทเทเนียมจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมในอนาคต

ในการศึกษารุ่นนี้พบว่าประสิทธิภาพในการต้านการเกิดไบโอฟิล์มของแคนดิดา อัลบิแคนส์ บนไทเทเนียมที่เคลือบด้วยสารสกัดเซอรินที่ความเข้มข้นที่ต่างกันไม่แสดงผลออกมาตามขนาดของความเข้มข้นที่ใช้ (dose-dependent effect) ทั้งที่ความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดเซอรินที่ใช้มีค่าต่างกันถึง 100 เท่า น่าจะมาจากเหตุผลที่ความเข้มข้นหรือปริมาณของเซอรินที่อยู่ใน

ฟิโอฟิล์มทุกความเข้มข้นอาจมีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย แม้ว่าผลที่ได้จากการศึกษาในหลอดทดลอง (*in vitro*) ครั้งนี้พบว่า สารสกัดเซอรินที่เคลือบบนไทเทเนียมมีประสิทธิภาพในการลดจำนวนการมีชีวิตของเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ ได้ถึงประมาณร้อยละ 50 และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตาม การทดลองในระดับนี้ยังไม่สามารถกำจัดเชื้อได้หมด และยังไม่ทราบแน่ชัดว่ามีความแตกต่างในทางคลินิกหรือไม่ ดังนั้นจำเป็นต้องทำการศึกษาเพิ่มทางคลินิกต่อไปในอนาคต

มีรายงานว่ากรดอะมิโน (amino acid) หลายชนิด เช่น อาร์จินีน (arginine) และไลซีน (lysine) มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น เชื้อสแตปิโลคอคคัส ออเรียส สแตปิโลคอคคัส อีพิเดอร์มิดิส เอสเชอริเชีย โคไล (*Escherichia coli*) และแคนดิดา อัลบิแคนส์^{37,38} เซอรินเป็นไกลโคโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่สำคัญ 18 ชนิด โดยพบกรดอะมิโนชนิดเซอริน (serine) มากที่สุดประมาณร้อยละ 31 ตามมาด้วยไกลซีน (glycine) ร้อยละ 19.1 และกรดแอสพาร์ติก (aspartic acid) ร้อยละ 17.8 ส่วนอาร์จินีน และไลซีนพบเพียงเล็กน้อย คือ ร้อยละ 3.9 และ 2.7 ตามลำดับ³⁹ การศึกษานี้ให้ข้อมูลว่าสารสกัดเซอรินที่เคลือบบนแผ่นไทเทเนียมด้วยวิธีทำให้เกิดฟิโอฟิล์มที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1-10 โดยมวลต่อปริมาตร ไม่ส่งผลต่อเชื้อสแตปิโลคอคคัส ออเรียส ทั้งนี้อาจเกิดจากอาร์จินีนและไลซีนที่พบในเซอรินที่ใช้ในการศึกษานี้มีปริมาณที่น้อยเกินกว่าที่จะส่งผลต่อเชื้อสแตปิโลคอคคัส ออเรียส หรืออาจเกิดจากสัดส่วนของอาร์จินีนและไลซีนในสารสกัดเซอรินที่ใช้ในการศึกษานี้ไม่เอื้อต่อการต้านการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อสแตปิโลคอคคัส ออเรียส จากการศึกษาของ Borman และคณะ ในปี 2017⁴⁰ รายงานว่าสัดส่วนของอาร์จินีนและไลซีนมีผลต่อประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อสแตปิโลคอคคัส ออเรียส โดยสายเปปไทด์ที่มีอาร์จินีน 3 ตัว และ ไลซีน 1 ตัว จะมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อสแตปิโลคอคคัส ออเรียส แต่จะให้ผลตรงกันข้ามถ้าแทนที่อาร์จินีนด้วยไลซีน ในการศึกษาพบว่าสารสกัดเซอรินที่เคลือบบนแผ่นไทเทเนียมด้วยวิธีทำให้เกิดฟิโอฟิล์มที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1-10 โดยมวลต่อปริมาตร มีประสิทธิภาพในการต้านการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ยังไม่ทราบถึงกลไกที่แน่ชัดในการต้านการสร้างแคนดิดา อัลบิแคนส์ ไบโอฟิล์มของสารสกัดเซอรินที่เคลือบบนแผ่นไทเทเนียมด้วยวิธีฟิโอฟิล์ม แต่คาดว่าจะมาจากการกรดอะมิโนที่อยู่ในสารสกัดเซอริน โดยเฉพาะกรดอะมิโนชนิดไลซีน และอาร์จินีนที่สามารถทะลุผ่านผนังเซลล์ (cell wall) และเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ของแคนดิดา อัลบิแคนส์ ไปจับกับเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย (mitochondrial membrane) ส่งผลให้ไมโทคอนเดรีย

เกิดความเสียหาย (mitochondrial damage) ในที่สุดก็เกิดการตายของเซลล์แบบที่มีการตั้งโปรแกรมไว้แล้วหรือที่เรียกว่า อะพอโทซิส (cell apoptosis)⁴¹ อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคตเพื่อให้ทราบถึงกลไกการต้านการสร้างแคนดิดา อัลบิแคนส์ ไบโอฟิล์มของสารสกัดเซอรินที่เคลือบบนแผ่นไทเทเนียมด้วยวิธีฟิโอฟิล์มที่แน่ชัด เพื่อที่จะนำสารสกัดเซอรินมาประยุกต์ใช้ให้ได้ประสิทธิภาพมากที่สุดในการป้องกันการติดเชื้อในผู้ป่วยผ่าตัดฝังรากฟันเทียม

บทสรุป

สารสกัดเซอรินที่เคลือบบนแผ่นไทเทเนียมด้วยวิธีฟิโอฟิล์มที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 0.5 1 5 และ 10 โดยมวลต่อปริมาตร ไม่มีประสิทธิภาพในการต้านการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อสแตปิโลคอคคัส ออเรียส แต่สามารถต้านการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ ได้เมื่อเทียบกับแผ่นไทเทเนียมที่ไม่ได้เคลือบ โดยความเข้มข้นของเซอรินในช่วงร้อยละ 0.1-10 โดยมวลต่อปริมาตร มีผลต่อร้อยละการมีชีวิตของเชื้อ แคนดิดา อัลบิแคนส์ ในไบโอฟิล์มไม่แตกต่างกัน

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้ทำการวิจัยขอขอบคุณคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่สนับสนุนทุนวิจัยและเอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัยในครั้งนี้
แหล่งเงินทุน: คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

1. Kulkarni M, Mazare A, Gongadze E, Perutkova Š, Kralj-Iglič V, Milošev I, et al. Titanium nanostructures for biomedical applications. *Nano-technology* 2015;26(6):062002.
2. Spriano S, Yamaguchi S, Baino F, Ferraris S. A critical review of multifunctional titanium surfaces: New frontiers for improving osseointegration and host response, avoiding bacteria contamination. *Acta Biomater* 2018;79:1-22.
3. Zhao L, Chu PK, Zhang Y, Wu Z. Antibacterial coatings on titanium implants. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009;91(1):470-80.
4. Belibasakis GN. Microbiological and immuno-pathological aspects of peri-implant diseases. *Arch Oral Biol* 2014;59(1):66-72.
5. Persson GR, Renvert S. Cluster of bacteria associated with peri-implantitis. *Clin Implant Dent Relat Res* 2014;16(6):783-93.
6. Alrabiah M, Alshagroud RS, Alsahhaf A, Almojaly SA, Abduljabbar T, Javed F. Presence of *Candida* species in the subgingival oral biofilm of patients with peri-implantitis. *Clin Implant Dent Relat Res* 2019;21(4):781-85.

7. Harris LG, Richards RG. Staphylococci and implant surfaces: a review. *Injury* 2006;37 Suppl 2:S3-14.
8. Janus MM, Crielard W, Volgenant CM, van der Veen MH, Brandt BW, Krom BP. *Candida albicans* alters the bacterial microbiome of early *in vitro* oral biofilms. *J Oral Microbiol* 2017;9(1):1270613.
9. Harriott MM, Noverr MC. *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* form polymicrobial biofilms: effects on antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53(9):3914-22.
10. K Kumamoto CA. *Candida* biofilms. *Curr Opin Microbiol* 2002;5(6):608-11.
11. Chouirfa H, Bouloussa H, Migonney V, Falentin-Daudre C. Review of titanium surface modification techniques and coatings for antibacterial applications. *Acta Biomater* 2019;83:37-54.
12. Damiati L, Eales MG, Nobbs AH, Su B, Tsimbouri PM, Salmeron-Sanchez M, *et al*. Impact of surface topography and coating on osteogenesis and bacterial attachment on titanium implants. *J Tissue Eng* 2018;9:2041731418790694.
13. Zhang F, Zhang Z, Zhu X, Kang ET, Neoh KG. Silk-functionalized titanium surfaces for enhancing osteoblast functions and reducing bacterial adhesion. *Biomaterials* 2008;29(36):4751-9.
14. Decher G. Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. *Science* 1997;277(5330):1232-37.
15. Boudou T, Crouzier T, Ren K, Blin G, Picart C. Multiple functionalities of polyelectrolyte multilayer films: new biomedical applications. *Adv Mater* 2010;22(4):441-67.
16. Rodríguez LAL, Lee MR, Ortiz BJ, Gastfriend BD, Whitehead R, Lynn DM, *et al*. Preventing *S. aureus* biofilm formation on titanium surfaces by the release of antimicrobial beta-peptides from polyelectrolyte multilayers. *Acta Biomater* 2019;93:50-62.
17. Wong SY, Moskowitz JS, Veselinovic J, Rosario RA, Timachova K, Blaisse MR, *et al*. Dual functional polyelectrolyte multilayer coatings for implants: permanent microbicidal base with controlled release of therapeutic agents. *J Am Chem Soc* 2010;132(50):17840-8.
18. Zhang YQ. Applications of natural silk protein sericin in biomaterials. *Biotechnol Adv* 2002;20(2):91-100.
19. Fan JB, Wu LP, Chen LS, Mao XY, Ren FZ. Antioxidant activities of silk sericin from silkworm *bombyx mori*. *J Food Biochem* 2007;33(1):74-88.
20. Liu L, Cai R, Wang Y, Tao G, Ai L, Wang P, *et al*. Polydopamine-Assisted Silver Nanoparticle Self-Assembly on Sericin/Agar Film for Potential Wound Dressing Application. *Int J Mol Sci* 2018;19(10):2875.
21. Ahamad SI, Vootla SK. Extraction and evaluation of antimicrobial potential of *Antheraea mylitta* silk sericin. *Int J Recent Sci Res* 2018;9(1):23019-22.
22. Zhaorigetu S, Yanaka N, Sasaki M, Watanabe H, Kato N. Inhibitory effects of silk protein, sericin on UVB-induced acute damage and tumor promotion by reducing oxidative stress in the skin of hairless mouse. *J Photochem Photobiol B* 2003;71(1-3):11-17.
23. Nayak S, Dey T, Naskar D, Kundu SC. The promotion of osseointegration of titanium surfaces by coating with silk protein sericin. *Biomaterials* 2013;34(12):2855-64.
24. Kunz RI, Brancalho RM, Ribeiro LF, Natali MR. Silkworm Sericin: Properties and Biomedical Applications. *Biomed Res Int* 2016;2016:8175701.
25. Lamboni L, Gauthier M, Yang G, Wang Q. Silk sericin: A versatile material for tissue engineering and drug delivery. *Biotechnol Adv* 2015;33(8):1855-67.
26. Angwarawong T, Dubas ST, Arksornnukit M, Pavasant P. Differentiation of MC3T3-E1 on poly(4-styrenesulfonic acid-co-maleic acid) sodium salt-coated films. *Dent Mater J* 2011;30(2):158-69.
27. Katara G, Hemvani N, Chitnis S, Chitnis V, Chitnis DS. Surface disinfection by exposure to germicidal UV light. *Indian J Med Microbiol* 2008;26(3):241-2.
28. Shrivastava S, Bera T, Roy A, Singh G, Ramachandrarao P, Dash D. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology* 2007;18(22):225103.
29. Marra J, Paleari AG, Rodriguez LS, Leite AR, Pero AC, Compagnoni MA. Effect of an acrylic resin combined with an antimicrobial polymer on biofilm formation. *J Appl Oral Sci* 2012;20(6):643-8.
30. Peri-implant mucositis and peri-implantitis: a current understanding of their diagnoses and clinical implications. *J Periodontol* 2013;84(4):436-43.
31. Campoccia D, Montanaro L, Arciola CR. The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance. *Biomaterials* 2006;27(11):2331-9.
32. Kronstrom M, Svensson B, Erickson E, Houston L, Braham P, Persson GR. Humoral immunity host factors in subjects with failing or successful titanium dental implants. *J Clin Periodontol* 2000;27(12):875-82.
33. Cavalcanti YW, Wilson M, Lewis M, Del-Bel-Cury AA, da Silva WJ, Williams DW. Modulation of *Candida albicans* virulence by bacterial biofilms on titanium surfaces. *Biofouling* 2016;32(2):123-34.
34. Mueller H, Kassack MU, Wiese M. Comparison of the usefulness of the MTT, ATP, and calcein assays to predict the potency of cytotoxic agents in various human cancer cell lines. *J Biomol Screen* 2004;9(6):506-15.
35. Balouiri M, Sadiki M, Ibensouda SK. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal* 2016;6(2):71-79.
36. Senakoon W, Nuchadomrong S, Sirimungkararat S, Senawong T, Kitikoon P. Antibacterial Action of Eri (Samia Ricini) Sericin Against *Escherichia Coli* and *Staphylococcus Aureus*. *As. J. Food Ag-Ind* 2009;Special Issue:S222-S28
37. Pinazo A, Manresa MA, Marques AM, Bustelo M, Espuny MJ, Pérez L. Amino acid-based surfactants: New antimicrobial agents. *Adv Colloid Interface Sci* 2016;228:17-39.
38. Dawgul MA, Greber KE, Bartoszewska S, Baranska-Rybak W, Sawicki W, Kamysz W. *In Vitro* Evaluation of Cytotoxicity and Permeation Study on Lysine- and Arginine-Based Lipopeptides with Proven Antimicrobial Activity. *Molecules* 2017;22(12):2173.
39. Kato N, Sato S, Yamanaka A, Yamada H, Fuwa N, Nomura M. Silk protein, sericin, inhibits lipid peroxidation and tyrosinase activity. *Biosci Biotechnol Biochem* 1998;62(1):145-7.
40. Bormann N, Kolisak A, Kasper S, Schoen L, Hilpert K, Volkmer R, *et al*. A short artificial antimicrobial peptide shows potential to prevent or treat bone infections. *Sci Rep* 2017;7(1):1506.
41. Park SC, Kim JY, Kim EJ, Cheong GW, Lee Y, Choi W, *et al*. Hydrophilic Linear Peptide with Histidine and Lysine Residues as a Key Factor Affecting Antifungal Activity. *Int J Mol Sci* 2018;19(12): pii: E3781.