ผลการยับยั้งของสารสกัดจากสมุนไพรบางชนิดต่อการยึดเกาะของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์

นางสาวจิตรา ลิมทรง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยาช่องปาก
คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2543

ISBN 974-13-0877-9

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

INHIBITORY EFFECT OF SOME HERBAL EXTRACTS ON ADHERENCE OF STREPTOCOCCUS MUTANS

Miss Jittra Limsong

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fullfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Oral Biology
Faculty of Dentistry
Chulalongkorn University
Academic Year 2000

ISBN 974-13-0877-9

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลการยับยั้งของสารสกัดจากสมุนไพรบางชนิดต่อการยึดเกาะของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์
โดย	นางสาวจิตรา ลิมทรง
สาขาวิชา	ชีววิทยาช่องปาก
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. เอมอร เบญจวงศ์กุลชัย
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ จินตกร คูวัฒนสุชาติ

คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

……..คณบดีคณะทันตแพทยศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ สุรสิทธิ์ เกียรติพงษ์สาร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

…….ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร. รัตน์ เสรีนิราช)

…….อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. เอมอร เบญจวงศ์กุลชัย)

…….อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ จินตกร คูวัฒนสุชาติ)

……..กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร. ไพฑูรย์ สังวรินทะ)

……..กรรมการ
(อาจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร. ทิพวรรณ ธราภิวัฒนานนท์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จิตรา ลิมทรง : ผลการยับยั้งของสารสกัดจากสมุนไพรบางชนิดต่อการยึดเกาะของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์. (INHIBITORY EFFECT OF SOME HERBAL EXTRACTS ON ADHERENCE OF STREPTOCOCCUS MUTANS) อ.ที่ปรึกษา: รศ. ดร. เอมอร เบญจวงศ์กุลชัย, อ.ที่ปรึกษาร่วม: รศ. ทพ. จินตกร คูวัฒนสุชาติ 123 หน้า. ISBN 974-13-0877-9.

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาผลการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ ATCC 25175และ TPF-1 ในห้องปฏิบัติการ ด้วยสารสกัดจากสมุนไพรชนิดต่าง ๆ สมุนไพรที่นำมาทดสอบ ได้แก่ ข่อย, ชา, ชุมเห็ดเทศ, ฟ้าทะลายโจร, ฝรั่ง และ สีฟันคนทา โดยสกัดด้วยเอธานอล 50% หรือ 95% และอบแห้ง การวิจัยในส่วนแรกเป็นการทดสอบสารสกัดจากสมุนไพร ที่ความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อกับผิวแก้ว เพื่อเป็นการคัดแยก จากนั้น นำสารสกัดจากสมุนไพรที่ให้ผลยับยั้งการยึดเกาะกับผิวแก้ว ไปทำการทดสอบการยึดเกาะกับไฮดรอกซีอะพาไทท์ที่เคลือบด้วยน้ำลาย โดยใช้เชื้อแบคทีเรียติดฉลากสารรังสี เพื่อหาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดจากสมุนไพรที่ให้ผลยับยั้งการยึดเกาะ และศึกษากลไกการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อ โดยการทดสอบผลของสารสกัดจากสมุนไพรที่ความเข้มข้นดังกล่าว ต่อการทำงานของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรสและกลูแคนไบน์ดิงเลคติน ผลการวิจัยพบว่า สารสกัดจากสมุนไพรทุกชนิด ยกเว้นข่อย มีผลยับยั้งการยึดเกาะกับผิวแก้วของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ และเมื่อนำไปทดสอบกับไฮดรอกซีอะพาไทท์ที่เคลือบด้วยน้ำลาย พบว่า ชา, ชุมเห็ดเทศ, ฟ้าทะลายโจร และ สีฟันคนทา มีผลยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อ ATCC 25175 โดยชาให้ผลยับยั้งสูงที่สุด รองลงมา ได้แก่ ฟ้าทะลายโจร, ชุมเห็ดเทศ และ สีฟันคนทา ตามลำดับ ขณะที่ชุมเห็ดเทศและฟ้าทะลายโจร มีผลยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อ TPF-1 โดยทั้ง 2 ชนิดให้ผลยับยั้งใกล้เคียงกัน ความเข้มข้นของสารสกัดจากสมุนไพรที่น้อยที่สุดที่ให้ผลยับยั้งอย่างน้อย 50% ได้แก่ ชา 0.3%, ชุมเห็ดเทศ 0.5%, ฟ้าทะลายโจร 0.5% และ สีฟันคนทา 0.5% สำหรับเชื้อ ATCC 25175 และ ชุมเห็ดเทศ 0.4% และ ฟ้าทะลายโจร 0.5% สำหรับเชื้อ TPF-1 การทดสอบกลไกการยับยั้ง พบว่า สารสกัดจากสมุนไพรทุกชนิดที่ความเข้มข้นดังกล่าว มีผลลดแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรสจากเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ แต่มีเพียงชุมเห็ดเทศและฟ้าทะลายโจร ที่มีผลยับยั้งหรือลดแอคติวิตีของกลูแคนไบน์ดิงเลคตินจากเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า ชา, ชุมเห็ดเทศ, ฟ้าทะลายโจร และ สีฟันคนทา ให้ผลยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ ATCC 25175 ขณะที่ชุมเห็ดเทศและฟ้าทะลายโจร ให้ผลยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ TPF-1 ในห้องปฏิบัติการ ที่ระดับความเข้มข้นที่ใช้ในงานวิจัยนี้

ภาควิชา..... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา ชีววิทยาช่องปาก ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2543 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4176102132 : MAJOR ORAL BIOLOGY
KEYWORD: STREPTOCOCCUS MUTANS / ADHERENCE / HERB / GLUCOSYLTRANSFERASE / GLUCAN-BINDING LECTIN

JITTRA LIMSONG : INHIBITORY EFFECT OF SOME HERBAL EXTRACTS ON ADHERENCE OF STREPTOCOCCUS MUTANS. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. EM-ON BENJAVONGKULCHAI, THESIS CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. JINTAKORN KUVATANASUCHATI, 123 pp. ISBN 974-13-0877-9.

The objective of this study is to investigate the inhibitory effect of the crude extracts from some herbs on adherence of *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) ATCC 25175 and TPF-1 *in vitro*. Six herbs ie. *Streblus asper*; Chinese black tea (*Camellia sinensis*); *Cassia alata*; *Andrographis paniculata*; guava (*Psidium guajava*) and *Harrisonia perforata* were extracted with 50% or 95% ethanol and dried. Herbal extracted solution at 0.5% concentration (w/v) was initially tested for bacterial adherence on glass surfaces. The extracts that showed the inhibition on glass surfaces were then tested on saliva-coated hydroxyapatite by use of radiolabeled bacteria, in order to identify type and effective concentration of the extracts. To study the mechanism of action, the effect of the extracts at such concentration on glucosyltransferase and glucan-binding lectin activities were examined. It was found that all extracts, but *Streblus asper*, showed significant inhibitory effect on bacterial adherence to glass surfaces. For saliva-coated hydroxyapatite adherence assay, Chinese black tea, *Cassia alata*, *Andrographis paniculata* and *Harrisonia perforata* could inhibit adherence of *S. mutans* ATCC 25175. Chinese black tea was the strongest inhibitor followed by *Andrographis paniculata, Cassia alata* and *Harrisonia perforata*, respectively. For *S. mutans* TPF-1, adherence inhibition was observed from *Cassia alata* and *Andrographis paniculata* at similar level. The lowest concentrations of the extracts that inhibited the adherence at least 50% were 0.3% of Chinese black tea, 0.5% of *Cassia alata*, 0.5% of *Andrographis paniculata* and 0.5% of *Harrisonia perforata* for *S. mutans* ATCC 25175. For *S. mutans* TPF-1, the effective concentrations were 0.4% of *Cassia alata* and 0.5% of *Andrographis paniculata*. All extracts at such concentrations decreased the activity of glucosyltransferase from both strains. Only *Cassia alata* and *Andrographis paniculata* inhibited or decreased the activity of glucan-binding lectin from both strains. These findings suggested that Chinese black tea, *Cassia alata*, *Andrographis paniculata* and *Harrisonia perforata* could inhibit adherence of *S. mutans* ATCC 25175, when *Cassia alata* and *Andrographis paniculata* had effect on *S. mutans* TPF-1 *in vitro* at the concentrations employed in this study.

Department…….. Student's signature……..

Field of study Oral Biology Advisor's signature……..

Academic year 2000 Co-advisor's signature……

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ รศ.ดร.เอมอร เบญจวงศ์กุลชัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ รศ.ทพ.จินตกร คูวัฒนสุชาติ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ซึ่งท่านได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่าง ๆ ในการวิจัยมาด้วยดีตลอด

ขอขอบพระคุณ Prof. Douglas Bratthall และ รศ.ดร.ฤดี สุราฤทธิ์ ที่เอื้อเฟื้อเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ คุณลาวัลย์ บุญประคอง ที่ช่วยจัดหาใบฝรั่งในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ ผศ.ทพ.ดร.ประสิทธิ์ ภวสันต์ ที่ได้ให้คำแนะนำในการถ่ายรูปจากกล้องจุลทรรศน์ รวมทั้งคำแนะนำอื่น ๆ ที่เป็นประโยชน์

ขอขอบพระคุณ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ทุกท่าน ที่ได้ให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ภาควิชาชีวเคมี, ภาควิชาจุลชีววิทยา, ศูนย์วิจัยชีววิทยาช่องปาก, ฝ่ายวิจัย และ ภาควิชาเภสัชวิทยา ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัยนี้ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ผู้เกี่ยวข้องทุกท่าน ที่อำนวยความสะดวกและให้ความช่วยเหลืออย่างดี

ขอขอบพระคุณ คุณมารศรี อุชชิน, คุณสุภมาส แก้วกระแสสินธ์, คุณมาลี แซ่ก๊วย, อ.ทพญ.พรพรรณ ยวงนาค และ คุณชิดพล จันทรวรัญญู ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ อย่างดี, ให้คำแนะนำ และ มอบกำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมา

เนื่องจากทุนการวิจัยครั้งนี้ ส่วนหนึ่งได้รับมาจากทุนอุดหนุนการวิจัยของบัณฑิตวิทยาลัย จึงขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัยมา ณ ที่นี้ด้วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย……..……ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ……..…..จ
กิตติกรรมประกาศ……ฉ
สารบัญ……ช
สารบัญตาราง……....ฌ
สารบัญรูป……..ญ
บทที่
1 บทนำ……...1
1.1 หลักการและเหตุผล……1
1.2 คำถามของการวิจัย……..5
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย……..6
1.4 สมมติฐานของการวิจัย……..6
1.5 ขอบเขตของการวิจัย……..6
1.6 ประเภทของการวิจัย……..7
1.7 ปัญหาด้านจริยธรรม……7
1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัยนี้……7
2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง……8
2.1 โรคฟันผุ……8
2.2 เชื้อสเตร็พโตคอคไคในช่องปาก……10
2.3 กระบวนการเกิดโรคฟันผุ……11
2.4 การยึดเกาะของเชื้อสเตร็พโตคอคไค……..……..13
2.5 เอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส……..……..17
2.6 กลูแคนไบน์ดิงเลคติน……..……20
2.7 กลวิธีในการป้องกันฟันผุ……..…21
2.8 การยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อโดยสารสกัดจากธรรมชาติ……..……28
2.9 สมุนไพร……....30

หน้า

3 ระเบียบวิธีวิจัย……44
3.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย……44
3.2 วิธีดำเนินการวิจัย……47
3.3 การวิเคราะห์ข้อมูล……51
4 ผลการวิจัย……52
4.1 การสกัดสมุนไพร……52
4.2 การทดสอบผลการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อกับผิวแก้ว……53
4.3 การทดสอบฤทธิ์การฆ่าเชื้อแบคทีเรีย……56
4.4 การทดสอบผลการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อกับไฮดรอกซีอะพาไทท์……57
4.5 การทดสอบผลการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อกับไฮดรอกซีอะพาไทท์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ……62
4.6 การศึกษากลไกการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อ……66
5 อภิปราย สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ……78
5.1 อภิปรายผลการวิจัย……78
5.2 สรุปผลการวิจัย……86
5.3 ข้อเสนอแนะ……86
รายการอ้างอิง……88
ภาคผนวก……112
ภาคผนวก ก……113
ภาคผนวก ข……114
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์……123

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

1 การเปรียบเทียบน้ำหนักก่อนและหลังสกัดของสมุนไพรที่ใช้ในการวิจัย……...52
2 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสมุนไพรชนิดต่าง ๆ ที่ระดับความเข้มข้น 0.5% ต่อการยึดเกาะกับผิวแก้ว ระหว่างเชื้อ ATCC 25175 กับ เชื้อ TPF-1……55
3 ผลการทดสอบฤทธิ์การฆ่าเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ ATCC 25175 และ TPF-1 ของสมุนไพรชนิดต่าง ๆ ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 %……56
4 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสมุนไพรชนิดต่าง ๆ ที่ระดับความเข้มข้น 0.5% ในการยึดเกาะของเชื้อ ATCC 25175 กับไฮดรอกซีอะพาไทท์……59
5 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสมุนไพรชนิดต่าง ๆ ที่ระดับความเข้มข้น 0.5% ในการยึดเกาะของเชื้อ TPF-1 กับไฮดรอกซีอะพาไทท์……60
6 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสมุนไพรชนิดต่าง ๆ ที่ระดับความเข้มข้น 0.5% ในการยึดเกาะกับไฮดรอกซีอะพาไทท์ ระหว่างเชื้อ ATCC 25175 กับ เชื้อ TPF-1……61
7 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสมุนไพรชนิดต่าง ๆ ในการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรสของเชื้อ ATCC 25175……68
8 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสมุนไพรชนิดต่าง ๆ ในการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรสของเชื้อ TPF-1……69
9 ผลของสารสกัดจากสมุนไพรชนิดต่าง ๆ ต่อแอคติวิตีของกลูแคนไบน์ดิงเลคติน ในเชื้อ ATCC 25175 และ TPF-1……77

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่

1 ผลของสารสกัดจากสมุนไพรชนิดต่าง ๆ ที่ระดับความเข้มข้น 0.5% ต่อการยึดเกาะกับผิวแก้วของเชื้อ ATCC 25175 และ TPF-1 คิดเป็นเปอร์เซนต์เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม.....54
2 ผลของสารสกัดจากสมุนไพรชนิดต่าง ๆ ที่ระดับความเข้มข้น 0.5% ต่อการยึดเกาะกับไฮดรอกซีอะพาไทท์ ของเชื้อ ATCC 25175 และ TPF-1 คิดเป็นเปอร์เซนต์เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม.....58
3 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างการยึดเกาะของเชื้อ ATCC 25175 กับสารสกัดจากชาที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ.....63
4 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างการยึดเกาะของเชื้อ ATCC 25175 กับสารสกัดจากชุมเห็ดเทศที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ.....63
5 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างการยึดเกาะของเชื้อ ATCC 25175 กับสารสกัดจากฟ้าทะลายโจรที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ.....64
6 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างการยึดเกาะของเชื้อ ATCC 25175 กับสารสกัดจากสีฟันคนทาที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ.....64
7 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างการยึดเกาะของเชื้อ TPF-1 กับสารสกัดจากชุมเห็ดเทศที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ.....65
8 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างการยึดเกาะของเชื้อ TPF-1 กับสารสกัดจากฟ้าทะลายโจรที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ.....65
9 ผลของสารสกัดจากสมุนไพรชนิดต่าง ๆ ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรสจากเชื้อ ATCC 25175 คิดเป็นเปอร์เซนต์เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม.....67
10 ผลของสารสกัดจากสมุนไพรชนิดต่าง ๆ ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรสจากเชื้อ TPF-1 คิดเป็นเปอร์เซนต์เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม.....67
11 การรวมกลุ่มของเซลล์แบคทีเรียอย่างมาก ในสภาวะที่มีการทำงานของกลูแคนไบน์ดิงเลคตินในเชื้อ ATCC 25175 (กลุ่มควบคุมบวก).....71
12 การรวมกลุ่มของเซลล์แบคทีเรียอย่างมาก ในสภาวะที่มีการทำงานของกลูแคนไบน์ดิงเลคตินในเชื้อ TPF-1 (กลุ่มควบคุมบวก).....71
13 เซลล์แบคทีเรียไม่มีการรวมกลุ่ม ในสภาวะที่ไม่มีการทำงานของกลูแคนไบน์ดิงเลคตินในเชื้อ ATCC 25175 (กลุ่มควบคุมลบ).....72

หน้า

รูปที่

14 เซลล์แบคทีเรียไม่มีการรวมกลุ่ม ในสภาวะที่ไม่มีการทำงานของกลูแคนไบน์ดิงเลคตินในเชื้อ TPF-1 (กลุ่มควบคุมลบ)……...72
15 ผลของสารสกัดจากชา ที่ระดับความเข้มข้น 0.3% ต่อแอคติวิตีของกลูแคนไบน์ดิงเลคตินในเชื้อ ATCC 25175……..……73
16 ผลของสารสกัดจากชา ที่ระดับความเข้มข้น 0.5% ต่อแอคติวิตีของกลูแคนไบน์ดิงเลคตินในเชื้อ ATCC 25175……..……...…..73
17 ผลของสารสกัดจากชุมเห็ดเทศ ที่ระดับความเข้มข้น 0.5% ต่อแอคติวิตีของกลูแคนไบน์ดิงเลคตินในเชื้อ ATCC 25175……..……..……74
18 ผลของสารสกัดจากฟ้าทะลายโจร ที่ระดับความเข้มข้น 0.5% ต่อแอคติวิตีของกลูแคนไบน์ดิงเลคตินในเชื้อ ATCC 25175……..……..……74
19 ผลของสารสกัดจากสีฟันคนทา ที่ระดับความเข้มข้น 0.5% ต่อแอคติวิตีของกลูแคนไบน์ดิงเลคตินในเชื้อ ATCC 25175……..……..……75
20 ผลของสารสกัดจากชุมเห็ดเทศ ที่ระดับความเข้มข้น 0.4% ต่อแอคติวิตีของกลูแคนไบน์ดิงเลคตินในเชื้อ TPF-1……..……..……75
21 ผลของสารสกัดจากชุมเห็ดเทศ ที่ระดับความเข้มข้น 0.5% ต่อแอคติวิตีของกลูแคนไบน์ดิงเลคตินในเชื้อ TPF-1……..……..……76
22 ผลของสารสกัดจากฟ้าทะลายโจร ที่ระดับความเข้มข้น 0.5% ต่อแอคติวิตีของกลูแคนไบน์ดิงเลคตินในเชื้อ TPF-1……..……..……76

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

<u>หลักการและเหตุผล</u>

โรคฟันผุ (dental caries) เป็นปัญหาสำคัญทางด้านทันตสาธารณสุขในประเทศไทย จากการสำรวจสภาวะทันตสุขภาพแห่งชาติของกระทรวงสาธารณสุข พบว่า ประชากรไทยมากกว่าร้อยละ 70 เป็นโรคฟันผุ (กระทรวงสาธารณสุข, กรมอนามัย, กองทันตสาธารณสุข, 2538) แสดงให้เห็นว่า ปัญหานี้เป็นปัญหาที่จะต้องรีบแก้ไข

โรคฟันผุเกิดจากองค์ประกอบหลายประการ (multifactorial disease) ได้แก่ ตัวฟัน อาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต และ เชื้อแบคทีเรีย (Keyes and Jordan, 1963) โรคฟันผุนั้นอาจนับได้ว่าเป็นการติดเชื้อแบคทีเรียที่พบได้บ่อยที่สุดในร่างกายมนุษย์ แต่ด้วยความที่โรคนี้ไม่ใช่โรคที่เป็นอันตรายต่อชีวิต คนทั่วไปจึงไม่ได้ให้ความสำคัญกับโรคนี้มากนัก (Loesche, 1986)

กระบวนการเกิดโรคนั้นเกี่ยวข้องกับการสูญเสียแร่ธาตุ (demineralization) ของเคลือบฟัน (enamel) โดยกรดที่เชื้อแบคทีเรียสร้างขึ้นจากอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต เชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคมีอยู่หลายชนิด เชื้อตัวแรกที่มีการค้นพบว่าเป็นเชื้อก่อโรคฟันผุ คือ เชื้อแลคโตเบซิลไล (lactobacilli) แต่เชื้อกลุ่มที่มีบทบาทสำคัญมากที่สุดในปัจจุบัน ได้แก่ มิวแทนส์ สเตร็พโตคอคไค (mutans streptococci) (van Houte, 1994) ซึ่งค้นพบโดย Clarke ในปี ค.ศ.1924 (Clarke, 1924)

เชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตร็พโตคอคไคที่พบในคราบจุลินทรีย์ ส่วนใหญ่เป็นเชื้อสเตร็พโต คอคคัส มิวแทนส์ (*Streptococcus mutans*) ซีโรไทป์ (serotype) ที่พบมากที่สุด คือ ซีโรไทป์ c ส่วนเชื้อที่พบมากรองลงมา คือ เชื้อสเตร็พโตคอคคัส โซไบรนัส (*Streptococcus sobrinus*) เชื้อทั้ง 2 สปีชีส์ (species) นี้เป็นตัวการสำคัญในการก่อโรคฟันผุในมนุษย์ (Hamada and Slade, 1980; Loesche, 1986)

กระบวนการในการเกิดคราบจุลินทรีย์นั้น เป็นที่ยอมรับในปัจจุบันว่า ในขั้นแรก เชื้อแบคทีเรียจะต้องไปยึดเกาะบนผิวฟันก่อน (Gibbons, 1984; Hasty et al., 1992) จากนั้น เชื้อจึงจะเพิ่มจำนวนสะสม (accumulation) บนตัวฟัน สำหรับขั้นตอนในการยึดเกาะของเชื้อนั้นมีอยู่ 2 ขั้นตอน กล่าวคือ ขั้นแรก เป็นปฏิกิริยาระหว่างเชื้อกับผิวฟันซึ่งมีแอคควายด์เพลลิเคิล (acquired pellicle) ปกคลุมอยู่ โดยไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ในแอคควายด์เพลลิเคิลทำหน้าที่เป็นจุดเกาะของเชื้อ (binding site) ปฏิกิริยานี้เป็นปฏิกิริยาชนิดผันกลับได้ ที่เกี่ยวข้องกับแรงแวนเดอร์วาวส์ (van der Waal's forces) พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) อันตรกิริยาไฮโดรโฟบิค (hydrophobic

interaction) และอันตรกิริยาอิเลคโตรสแตติค (electrostatic interaction) ซึ่งยังมีความแข็งแรงไม่เพียงพอ ขั้นตอนนี้ควบคุมโดยโปรตีนที่ผิวเซลล์ของแบคทีเรีย ขั้นที่ 2 เป็นปฏิกิริยาชนิดผันกลับไม่ได้ เชื้อจะสังเคราะห์สารประเภทโพลิแซคคาไรด์ (polysaccharide) ที่ไม่ละลายน้ำ จากน้ำตาลซูโครส (sucrose) โดยอาศัยเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส (glucosyltransferase) ออกมานอกเซลล์ สารนี้คือ กลูแคน (glucan) กลูแคนที่ไม่ละลายน้ำนี้ มีบทบาทในการยึดเกาะของเชื้อกับผิวของแข็ง ซึ่งหมายถึงผิวฟันด้วย (Hamada, Koga and Ooshima, 1984; Curtiss, 1986; Gibbons, 1989) ทำให้เชื้อสามารถยึดเกาะได้อย่างแข็งแรง นอกจากนี้ ยังมี กลูแคนไบน์ดิงโปรตีน (glucan-binding protein) ซึ่งทำให้เกิดการรวมกลุ่ม (aggregation) ของเชื้อ ตัวเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรสเองก็มีคุณสมบัติเป็นกลูแคนไบน์ดิงโปรตีนด้วย เนื่องจากมีบริเวณที่จับกับกลูแคนได้ (glucan-binding region) ผลของการยึดเกาะของเชื้อ ในสภาวะที่มีน้ำตาลซูโครส และการรวมกลุ่มของเชื้อ ก็คือ การเกิดคราบจุลินทรีย์ ซึ่งจะทำให้เกิดสภาพที่เหมาะสมแก่การเข้ามาของเชื้อชนิดอื่น ๆ แม้ว่าเชื้อเหล่านั้นจะไม่มีความสามารถในการยึดเกาะกับผิวฟันก็ตาม ในที่สุด เชื้อเหล่านี้ก็จะร่วมกันผลิตกรดออกมาทำลายเคลือบฟันต่อไป กรดที่สำคัญ คือ กรดแลคติค (lactic acid) (Curtiss, 1986)

เอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส หรือ เดกซ์แทรนซูเครส (dextransucrase) หรือ กลูแคนซูเครส (glucansucrase) ส่วนใหญ่ถูกผลิตออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) และเป็นเอนไซม์ที่มีการผลิตได้โดยไม่ต้องมีการกระตุ้น (constitutive enzyme) เอนไซม์ชนิดนี้ส่วนใหญ่ผลิตได้โดยเชื้อลิวโคนอสตอค มีเซนทิรอยดีส์ (*Leuconostoc mesenteroides*) ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในดิน และเอนไซม์ที่ผลิตได้ มักเรียกว่า เดกซ์แทรนซูเครส เชื้ออีกชนิดหนึ่ง คือ เชื้อแบคทีเรียในสปีชีส์สเตร็พโตคอคคัส ซึ่งเป็นเชื้อในช่องปาก และเอนไซม์ที่ผลิตได้ มักเรียกว่า กลูโคซิลทรานสเฟอเรส นอกจากนี้ ยังสามารถพบได้ในเชื้อแลคโตเบซิลไล (Sidebotham, 1974) ปฏิกิริยาของเอนไซม์ คือ การนำ (transfer) กลูโคส (glucose) จากซูโครส มาให้ตัวรับ (acceptor) ทำให้เกิดเป็นโพลิเมอร์ (polymer) ของกลูโคส ซึ่งได้แก่ กลูแคน

มีการศึกษาและคัดแยกยีน (gene) ที่แสดงออกโดยทำหน้าที่สร้างเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส (GTF encoding gene) โดยค้นพบลำดับของ ยีนที่แสดงออกโดยการสร้างเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส ที่เรียกว่า จีทีเอฟ (*gtf*) ทั้งสิ้น 14 ชนิด (Monchois, Willemot and Monsan, 1999) โดยมี 3 ชนิดที่โคลน (clone) และหาลำดับ (sequence) ได้จากเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ คือ *gtf B* *gtf C* และ *gtf D* *gtf B* เป็น ยีนที่สร้างเอนไซม์ที่ผลิตกลูแคนชนิดไม่ละลายน้ำ ที่เรียกว่า GTF-I *gtf C* เป็นยีนที่สร้างเอนไซม์ ที่ผลิตกลูแคนทั้งชนิดที่ละลายและไม่ละลายน้ำ ที่เรียกว่า GTF-SI ส่วน *gtf D* สร้างเอนไซม์ที่ ผลิตกลูแคนชนิดละลายน้ำได้ ที่เรียกว่า GTF-S (Aoki at al., 1986; Shiroza, Ueda and Kuramitzu, 1987; Ueda, Shiroza and Kuramitzu, 1988; Hanada and

Kuramitzu, 1988; Hanada and Kuramitzu, 1989; Honda, Kato and Kuramitzu, 1990) โดยที่เอนไซม์ทั้ง 3 ไอโซไซม์ (isozyme) นี้มีความสำคัญร่วมกันในกระบวนการเกิดฟันผุ (Yamashita et al., 1993)

ในการยึดเกาะเพื่อเพิ่มจำนวนของเชื้อ นอกจากจะขึ้นอยู่กับเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส ซึ่งมีบทบาทในการสร้างกลูแคนแล้ว ยังอาจขึ้นอยู่กับโปรตีนที่มีส่วนที่สามารถเกาะกับกลูแคนได้ (glucan-binding domain) คือ กลูแคนไบน์ดิงโปรตีน ซึ่งหมายรวมทั้งเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรสเอง และ กลูแคนไบน์ดิงเลคติน (glucan-binding lectin) (Doyle and Taylor, 1994) คำว่ากลูแคนไบน์ดิงเลคติน ต่างจากคำว่า กลูแคนไบน์ดิงโปรตีน คือ กลูแคนไบน์ดิงเลคตินนั้น สามารถทำให้เกิดการรวมกลุ่มของเซลล์ (glucan-dependent aggregation) ได้ด้วย (Denson and Doyle, 1998)

เชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์สามารถผลิตกลูแคนไบน์ดิงเลคตินได้ โดยเลคตินจากเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ เป็นชนิดที่ต้องเหนี่ยวนำให้เกิด (inductive) (Denson and Doyle,1998) เชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ สามารถสังเคราะห์กลูแคนไบน์ดิงโปรตีนที่ไม่ใช่เอนไซม์ 3 ชนิด คือ GBP_{74} GBP_{59} และ Gbp C หรือถ้าเรียกโดยเรียงตามลำดับของการค้นพบ คือ Gbp A (GBP_{74}) Gbp B (GBP_{59}) และ Gbp C

มีสารหลายชนิดที่ผ่านการศึกษาค้นคว้าว่ามีความสามารถในการควบคุมฟันผุ เช่น ยาปฏิชีวนะ คลอเฮกซิดีน (chlorhexidine) ฟลูออไรด์ (fluoride) เอนไซม์ เป็นต้น แต่การใช้ยาปฏิชีวนะ มีผลกระทบต่อสมดุลของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในช่องปาก คลอเฮกซิดีนทำให้เกิดคราบสีบนตัวฟัน ฟลูออไรด์อาจทำให้เกิดภาวะฟันตกกระ (mottled enamel) ได้หากใช้มากเกินความจำเป็น ส่วนการใช้เอนไซม์ เช่น เดกซ์แทรเนส (dextranase) สามารถลดจำนวนคราบจุลินทรีย์ที่เพิ่งเกิดใหม่ แต่ไม่สามารถกำจัดคราบจุลินทรีย์ที่มีอยู่เดิมได้ (Parsons, 1974)

แนวทางใหม่ ๆ ในการป้องกันฟันผุ นอกเหนือจากแนวคิดในเรื่องวัคซีนป้องกันฟันผุ การใส่เชื้อทดแทนเข้าไปในปาก (replacement therapy) หรือ การเปลี่ยนแปลงอาหารที่รับประทานและเลือกรับประทานอาหารที่มีผลป้องกันฟันผุแล้ว การขัดขวางไม่ให้เกิดคราบจุลินทรีย์เป็นอีกวิธีหนึ่งที่น่าสนใจ โดยมีแนวทางหลักอยู่ 3 ประการ ได้แก่

1. การยับยั้งเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส ซึ่งจะเป็นผลให้ไม่เกิดการสร้างกลูแคน
2. การขัดขวางโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการยึดเกาะ หรือรวมกลุ่มของเชื้อแบคทีเรีย
3. การเพิ่มประสิทธิภาพของระบบต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย เช่น การใช้สาร 2 ชนิดร่วมกัน (combination product) การใช้สารบางชนิดเป็นตัวช่วยให้ยาถูกปล่อยออกมาในช่องปากอย่างช้า ๆ (slow-release devices)

งานวิจัยในปัจจุบันมีแนวโน้มไปในแง่การหาสารยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อ ซึ่งได้แก่ การใช้สารเคมีชนิดต่าง ๆ แต่แนวทางที่ได้รับความสนใจมากกว่า คือ การใช้สารสกัดจากธรรมชาติ ไม่ว่าจะเป็นพืชหรือสัตว์ เช่น รายงานการศึกษาสารไคโตแซน (chitosan) ที่พบว่า มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญแต่ไม่ทำลายเชื้อมิวแทนส์ สเตร็พโตคอคไค (Muzzarelli et al., 1990) โดยไคโตแซนไปยับยั้งการเกาะติดของเชื้อสเตร็พโตคอคไคในช่องปาก (oral streptococci) กับ ไฮดรอกซีอะพาไทท์ (hydroxyapatite) (Sano et al., 1991; Tarsi et al., 1997; Tarsi et al., 1998) , สารลักษณะคล้ายขี้ผึ้งที่ได้จากรวงผึ้ง ที่เรียกว่า Propolis สามารถลดจำนวนเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ ในน้ำลาย (Steinberg, Kaine and Gedalia, 1996) มีฤทธิ์ต้านเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ และ เชื้อสเตร็พโตคอคคัส โซไบรนัส และยับยั้งการทำงานของ เอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส (Ikeno, Ikeno and Miyazawa, 1991; Park et al., 1998) ยับยั้งการเกาะติดของเชื้อ (Koo et al., 2000) โดยมีผลต่อการผลิตกลูแคนชนิดไม่ละลายน้ำ (Ikeno et al., 1991; Koo et al., 2000) ในหลอดทดลอง นอกจากนี้ จากการทดสอบในหนู พบว่า สามารถลดการเกิดฟันผุจากเชื้อสเตร็พโตคอคคัส โซไบรนัสได้ (Ikeno et al., 1991; Koo et al., 1999) เป็นต้น ปัจจุบันมีความพยายามที่จะนำสมุนไพรมาใช้ในการรักษาโรคต่าง ๆ มากขึ้น ในส่วนของสมุนไพรไทยนั้น เป็นที่ทราบกันดีว่ามีการใช้ประโยชน์กันมาตั้งแต่สมัยโบราณ และ ปัจจุบันก็ยังมีการใช้อยู่ในชนบท ซึ่งรวมถึงการใช้งานทางทันตกรรมด้วย การส่งเสริมให้มีการใช้สมุนไพร นอกจากจะเป็นการอนุรักษ์ภูมิปัญญาแบบไทย และสนับสนุนนโยบายของรัฐบาลในการนำสมุนไพรมาใช้อย่างถูกต้องแล้ว ยังอาจช่วยลดค่าใช้จ่ายในการนำเข้ายาจากต่างประเทศได้ด้วย นักวิจัยในประเทศไทยจึงหันมาให้ความสนใจกับสมุนไพรไทยเหล่านี้ ในแง่ของการควบคุมโรคฟันผุนั้น มีรายงานการศึกษาต่าง ๆ เช่น รายงานผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ จากต้นฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*) (ชลธิชา อมรฉัตร และคณะ, 2534) , ใบฝรั่ง (*Psidium guajava*) (Kraivaphan, Amornchat and Triratana, 1992) , สีฟันคนทา หรือ ไม้จี้ (*Harrisonia perforata*) (Tandhachoon, Triratana and Soo-ampon, 1993) ใบข่อย (*Streblus asper*) ก็มีรายงานผลการยับยั้งการเจริญเติบโต (เทอดพงษ์ ตรีรัตน์ และ บุญนิตย์ ทวีบูรณ์, 2530) และการฆ่าเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ (Wongkham et al., 1996) จากการทดลองผสมสารสกัดจากใบข่อยในน้ำยาบ้วนปาก พบว่า สามารถลดจำนวนเชื้อในน้ำลาย โดยไม่มีผลกระทบต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และ ความทนต่อการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง (buffer capacity) ของน้ำลาย (Taweechaisupapong et al., 2000)

นอกจากสมุนไพรไทยที่กล่าวมาแล้ว พืชบางชนิดที่เห็นกันอยู่ในชีวิตประจำวัน ก็มีส่วนประกอบที่มีผลต่อเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคฟันผุด้วย เช่น Kim (1997) พบว่า สารสกัดจากหอมหัวใหญ่ (*Allium cepa L.*) สามารถฆ่าเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ และเชื้อสเตร็พโตคอคคัส

โซไบรนัส , Kashket และคณะ (1985) ได้ศึกษาสารสกัดจากเครื่องดื่ม บางชนิด พบว่า ชา กาแฟ และ โกโก้ (cocoa) มีสารที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลูโคซิล ทรานสเฟอเรส ในเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ เป็นต้น สำหรับชานั้น เป็นพืชที่ได้รับการวิจัยอย่างกว้างขวางในแง่การป้องกันฟันผุ ชาอู่ล่ง (Oolong tea) เป็นชาที่มีการศึกษากันมาก พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ ยับยั้งเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส การผลิตกลูแคนชนิดไม่ละลายน้ำ และ การยึดเกาะกับผิวแก้วและไฮดรอกซีอะพาไทท์ รวมทั้งลดอัตราการสร้างกรดของ เชื้อมิวแทนส์ สเตร็พโตคอคไค (Nakahara et al., 1993; Ooshima et al., 1993; Matsumoto et al., 1999) ส่วนการทดลองในหนู พบว่า ลดการเกิดฟันผุ และการสะสมของคราบจุลินทรีย์ (Ooshima et al., 1993) และเมื่อทดลองในมนุษย์ ก็สามารถลดการเกาะของคราบจุลินทรีย์ โดยไม่เปลี่ยนแปลงจำนวนของเชื้อในน้ำลาย (Ooshima et al., 1994) ชาเขียวญี่ปุ่น (Japanese green tea) มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ (Sakanaka et al., 1989; Horiba et al., 1991) ยับยั้งการผลิตกลูแคนชนิดไม่ละลายน้ำ และ การเกาะกับไฮดรอกซีอะพาไทท์ ของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ (Otake et al., 1991)

เนื่องจากยังมีสมุนไพรไทยอีกหลายชนิดที่ยังไม่ได้รับการทดสอบประสิทธิภาพในการป้องกันฟันผุ ถึงแม้จะมีสมุนไพรที่ได้รับการวิจัยในแนวทางดังกล่าวแล้ว แต่ยังไม่มีการศึกษาในแง่การยึดเกาะของเชื้อ ซึ่งเป็นกลไกสำคัญอันหนึ่งในการก่อโรค หากสามารถยับยั้ง หรือ ลดการยึดเกาะของเชื้อกับตัวฟัน ก็จะเป็นผลให้เชื้อนั้นทำลายตัวฟันไม่ได้ หรือ ได้น้อยลง ดังนั้น การวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาผลของสารสกัดจากสมุนไพรไทยชนิดต่าง ๆ ในการยับยั้งการยึดเกาะ ของเชื้อสำคัญในการก่อโรคฟันผุ คือ เชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐาน และเป็นแนวทางในการนำสมุนไพรไทยเหล่านี้มาพัฒนา เพื่อประโยชน์ในการป้องกันโรคฟันผุ อันเป็นปัญหาทันตสาธารณสุขที่สำคัญของชาติต่อไป

<u>คำถามของการวิจัย</u>

1. สารสกัดจากสมุนไพรที่นำมาทดสอบ มีผลยับยั้งการยึดเกาะกับไฮดรอกซีอะพาไทท์ของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์หรือไม่ และ มีผลการยับยั้งที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นอย่างไร
2. สารสกัดจากสมุนไพรที่นำมาทดสอบแต่ละชนิด มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ต่างกันหรือไม่ อย่างไร
3. สารสกัดจากสมุนไพรที่นำมาทดสอบ มีกลไกการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์อย่างไร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลการยับยั้งการยึดเกาะกับไฮดรอกซีอะพาไทท์ของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ โดยสารสกัดจาก สมุนไพรชนิดต่าง ๆ และที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ
2. เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ของสารสกัดจากสมุนไพรชนิดต่าง ๆ
3. เพื่อศึกษากลไกการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ โดยสารสกัดจากสมุนไพรเหล่านั้น

สมมติฐานการวิจัย

1. สารสกัดจากสมุนไพรที่นำมาทดสอบมีผลต่อการยึดเกาะกับไฮดรอกซีอะพาไทท์ของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ ไม่แตกต่างจากน้ำ
2. สารสกัดจากสมุนไพรที่นำมาทดสอบมีผลต่อการยึดเกาะกับไฮดรอกซีอะพาไทท์ของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ ไม่แตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ
3. สารสกัดจากสมุนไพรที่นำมาทดสอบแต่ละชนิด มีผลต่อการยึดเกาะกับไฮดรอกซีอะพาไทท์ของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ ไม่แตกต่างกัน
4. สารสกัดจากสมุนไพรที่นำมาทดสอบมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส ไม่แตกต่างจากบัฟเฟอร์
5. สารสกัดจากสมุนไพรที่นำมาทดสอบมีผลต่อการทำงานของกลูแคนไบน์ดิงเลคติน ไม่แตกต่างจากบัฟเฟอร์

ขอบเขตของการวิจัย

เป็นการศึกษาผลการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ ในห้องปฏิบัติการด้วยสารสกัดจากสมุนไพรชนิดต่าง ๆ โดยการทดสอบการเกาะกับผิวแก้วก่อน เพื่อเป็นการคัดแยก (screening) แล้วจึงจะทำการทดสอบการเกาะกับไฮดรอกซีอะพาไทท์ และหาความเข้มข้นที่เหมาะสม จากนั้น จะศึกษากลไกการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อ โดยการตรวจสอบการทำ งานของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส และ กลูแคนไบน์ดิงเลคติน นอกจากนี้ จะทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากสมุนไพรชนิดต่าง ๆ ในการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อด้วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประเภทของการวิจัย

เป็นการวิจัยแบบทดลอง (experimental research)

ปัญหาด้านจริยธรรม

ไม่มี

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัยนี้

1. เป็นงานวิจัยพื้นฐานเพื่อให้ทราบถึงชนิดของสมุนไพรที่มีผลยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อที่มีความสำคัญในการก่อโรคฟันผุ รวมถึงประสิทธิภาพของสารแต่ละชนิดเมื่อเปรียบเทียบกัน
2. เพื่อให้ทราบถึงกลไกการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อ โดยสารสกัดจากสมุนไพรนั้น ๆ
3. เป็นแนวทางในการนำสมุนไพรเหล่านี้มาพัฒนาเป็นยา หรือส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในช่องปากต่อไป
4. เป็นพื้นฐานในการวิจัยเกี่ยวกับการป้องกันโรคฟันผุในแง่มุมอื่น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

โรคฟันผุ

โรคฟันผุจัดว่าเป็นโรคเรื้อรังชนิดหนึ่ง ที่เกี่ยวข้องกับการทำลายโครงสร้างของฟัน ซึ่งอาจนำไปสู่การสูญเสียความสามารถในการบดเคี้ยวและความสวยงามของฟันที่เกิดโรค โรคฟันผุอาจก่อให้เกิดอาการเจ็บปวด มีความไวต่อความร้อน ความเย็น และรสหวาน หากโรคลุกลามออกไป ก็จะทำให้เกิดพยาธิสภาพในโพรงประสาทฟัน มีอาการเจ็บปวดอย่างรุนแรง ซึ่งจะต้องทำการรักษาโดยการรักษาคลองรากฟัน (root canal treatment) หรือถอนไป โรคฟันผุเป็นโรคที่เกิดในตำแหน่งเฉพาะ มีกระบวนการเกิดโรคที่มีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา (dynamic process) (Zero, 1999) ในระยะเริ่มแรก จะพบจุดขาว ๆ บนเคลือบฟัน ซึ่งเกิดจากการสูญเสียแร่ธาตุ (demineralization) จากนั้น จะลุกลามเข้าไปสู่เนื้อฟัน (dentin) และทะลุเข้าสู่โพรงประสาทฟัน (pulp) ในที่สุด

โรคฟันผุเกิดจากองค์ประกอบหลายประการ (multifactorial disease) ได้แก่ ตัวฟัน อาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต และ เชื้อแบคทีเรีย (Keyes and Jordan, 1963) และอาจนับได้ว่าเป็นการติดเชื้อแบคทีเรียที่พบได้บ่อยที่สุดในร่างกายมนุษย์ (Loesche, 1986) สิ่งสำคัญที่สุด คือ โรคฟันผุนั้นไม่สามารถเกิดขึ้นได้เมื่อไม่มีเชื้อแบคทีเรีย หรือไม่มีอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต ดังนั้น อาจกล่าวได้ว่า โรคฟันผุเป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับอาหารและเชื้อแบคทีเรีย (Bowen and Birkhed, 1986)

กระบวนการเกิดโรคนั้นเกี่ยวข้องกับการสูญเสียแร่ธาตุของเคลือบฟัน คราบจุลินทรีย์บนผิวฟันประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรียสร้างกรด ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากขบวนการเมทาโบลิซึม (metabolism) ของเชื้อ กล่าวคือ เชื้อแบคทีเรียในคราบจุลินทรีย์เป็นเชื้อที่ผลิตกรดได้ โดยเชื้อจะผลิตกรดเมื่อมีการหมัก (fermentation) อาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต (Loesche, 1986) กรดเหล่านี้สามารถละลายแร่ธาตุในเคลือบฟันหรือเนื้อฟัน (Featherstone and Rodgers, 1981) โดยกรดสามารถซึมผ่านคราบจุลินทรีย์ และเข้าไปสู่เคลือบฟันที่มีรูพรุนได้ จากนั้นจะแตกตัวได้ไฮโดรเจนไอออน (hydrogen ions) (Featherstone and Rodgers, 1981) เมื่อเกิดความเป็นกรดสูง กรดก็จะซึมผ่านเข้าสู่เคลือบฟันด้านในหรือเนื้อฟันได้อย่างรวดเร็ว ไฮโดรเจนไอออนนี้จะไปละลายแร่ธาตุแคลเซียมและฟอสเฟต ให้อยู่ในรูปสารละลาย ซึ่งสามารถซึมผ่านตัวฟันออกมา สิ่งสำคัญ คือ กรดแลคติคสามารถแตกตัวได้ง่ายกว่ากรดชนิดอื่น ๆ ซึ่งทำให้ความเป็นกรดด่างในคราบจุลินทรีย์ลดลงมาก หากกระบวนการดังกล่าวไม่มีการคืนสภาพด้วยกระบวนการสร้างสารประกอบแร่ธาตุขึ้นมาใหม่ (remineralization) แล้ว ในที่สุดก็จะเกิดรูผุบนตัวฟันขึ้น

ตัวฟัน

ความไวต่อการเกิดโรคฟันผุจะมีมากที่สุดเมื่อฟันเริ่มขึ้นมาในช่องปาก และจะลดลงตามอายุ (Carlos and Gittelsohn, 1965) โดยหลังจากที่ฟันขึ้นมาแล้ว จะมีกระบวนการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของผิวเคลือบฟัน คือ มีการสะสมของสารอินทรีย์เพิ่มขึ้น (Backer-Dirks, 1966) ผิวฟันยังมีลักษณะพิเศษต่างจากพื้นผิวอื่น ๆ ในร่างกาย ในแง่ที่เป็นพื้นผิวแข็งที่ไม่มีการหลุดออกและสามารถยึดกับไกลโคโปรตีน (glycoprotein) หลายชนิดในน้ำลายอย่างจำเพาะเจาะจง ทำให้เกิดเป็นแอคควายด์ เพลลิเคิล (acquired pellicle) (Lie, 1977)

อาหาร

มีหลักฐานที่บ่งชี้ชัดเจนว่า น้ำตาลเป็นปัจจัยเบื้องต้นในอาหารที่ก่อให้เกิดโรคฟันผุ (Newbrun, 1967) การรับประทานน้ำตาลมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคฟันผุอย่างเห็นได้ชัด (Gustafsson et al., 1954) อาหารประเภทแป้งทำให้เกิดโรคได้น้อยกว่าน้ำตาล (ซูโครส, กลูโคส, ฟรุคโทส) โดยน้ำตาลซูโครสมีความสามารถในการก่อโรคสูงที่สุด เนื่องมาจากบทบาทในการสร้างสารกลูแคน ส่วนอาหารประเภทแป้งจะละลายได้น้อยในช่องปาก และแพร่กระจายเข้าสู่คราบจุลินทรีย์ได้น้อย นอกจากนี้ แป้งมักถูกย่อยเป็นน้ำตาลมอลโทส ก่อนที่เชื้อแบคทีเรียในคราบจุลินทรีย์จะนำไปใช้ได้ และแป้งมักออกไปจากช่องปากก่อนที่จะถูกย่อย (Zero, 1999)

เชื้อแบคทีเรีย

เชื้อสำคัญ 2 กลุ่มที่สามารถผลิตกรดแลคติค คือ เชื้อมิวแทนส์ สเตร็พโตคอคไค และเชื้อแลคโตเบซิลไล (Loesche, 1986) แต่ละชนิดยังสามารถแบ่งออกเป็นหลายสปีชีส์ ซึ่งล้วนก่อให้เกิดฟันผุทั้งสิ้น เชื้อแลคโตเบซิลไลเป็นเชื้อตัวแรกที่มีการค้นพบว่าเป็นเชื้อก่อโรคฟันผุ สามารถผลิตกรดแลคติคได้มาก และมักตรวจพบในคราบจุลินทรีย์ในระยะก่อนที่จะสังเกตเห็นรอยผุบนตัวฟัน (Leverett, Featherstone et al., 1993; Leverett, Proskin et al., 1993) แต่เชื้อกลุ่มที่มีบทบาทสำคัญมากที่สุดในปัจจุบัน คือ เชื้อมิวแทนส์ สเตร็พโตคอคไค (van Houte, 1994)

เชื้อสเตร็พโตคอคไคในช่องปาก (oral streptococci)

เชื้อสเตร็พโตคอคไคในช่องปาก เป็นเชื้อสเตร็พโตคอคไคที่มักอาศัยอยู่ในช่องปากและทางเดินหายใจส่วนบนของมนุษย์และสัตว์ โดยเป็นเชื้อปกติที่ไม่ก่อให้เกิดโรค แต่อาจเกิดการติดเชื้อฉวยโอกาส (opportunistic infections) ได้ เมื่อร่างกายมีภูมิต้านทานลดลงหรือมีการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อม (Whiley and Beighton, 1998)

ปัจจุบันมีการจำแนกชนิดของเชื้อสเตร็พโตคอคไคในช่องปากออกเป็น 4 กลุ่ม โดยอาศัยการเปรียบเทียบลำดับของยีนที่อาร์-อาร์เอ็นเอชนิด 16s (16s rRNA gene sequence comparison) (Kawamura et al., 1995) ได้แก่

1. กลุ่มแองจิโนซัส (anginosus group) ประกอบด้วย เชื้อสเตร็พโตคอคคัส แองจิโนซัส (*S.anginosus*), สเตร็พโตคอคคัส คอนสเตลลาตัส (*S.constellatus*) และสเตร็พโตคอคคัส อินเทอมีเดียส (*S.intermedius*)
2. กลุ่มไมติส (mitis group) ประกอบด้วย เชื้อสเตร็พโตคอคคัส ไมติส (*S.mitis*), สเตร็พโตคอคคัส ออราลิส (*S.oralis*), สเตร็พโตคอคคัส แซนควิส (*S.sanguis*), สเตร็พโตคอคคัส กอร์ดอนนิไอ (*S.gordonii*), สเตร็พโตคอคคัส พาราแซนควิส (*S.parasanguis*), สเตร็พโตคอคคัส คริสตา (*S.crista*) และสเตร็พโตคอคคัส นิวโมเนียอี (*S.pneumoniae*)
3. กลุ่มมิวแทนส์ (mutans group) ประกอบด้วย เชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ (*S.mutans*), สเตร็พโตคอคคัส โซไบรนัส (*S.sobrinus*), สเตร็พโตคอคคัส ไครซีตัส (*S.cricetus*), สเตร็พโตคอคคัส แรตตัส (*S.rattus*), สเตร็พโตคอคคัส ดาวน์นิไอ (*S.downeii*), สเตร็พโตคอคคัส มาเคซี (*S.macacae*) และสเตร็พโตคอคคัส ฟีรัส (*S.ferus*)
4. กลุ่มซัลไลวาเรียส (salivarius group) ประกอบด้วย เชื้อสเตร็พโตคอคคัส ซัลไลวาเรียส (*S.salivarius*), สเตร็พโตคอคคัส เวสทิบูลาริส (*S.vestibularis*) และสเตร็พโตคอคคัส เทอร์โมฟิลัส (*S.thermophilus*)

เชื้อกลุ่มมิวแทนส์ หรือที่เรียกว่า เชื้อมิวแทนส์ สเตร็พโตคอคไค ที่พบในคราบจุลินทรีย์ ส่วนใหญ่เป็นเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ ซีโรไทป์ (serotype) ที่พบมากที่สุด คือ ซีโรไทป์ c (Hamada and Slade, 1980; Loesche, 1986) Clarke (1924) เป็นผู้แยกเชื้อนี้ออกจากฟันผุได้เป็นคนแรก และต่อมา Fitzgerald และ Keyes (1960) ได้ทำการทดลองพบว่า เชื้อนี้ทำให้เกิดโรคฟันผุ Bratthall (1970) ได้แบ่งแยกชนิดของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ โดยวิธีทางเซรุ่ม (serological techniques) ออกเป็น 5 ซีโรไทป์ คือ a,b,c,d และ e ต่อมา Perch, Kjems และ Ravn (1974) ได้เพิ่มเติมซีโรไทป์ f และ g รวมเป็น 7 ซีโรไทป์ และภายหลัง Beighton, Russell และ Hayday (1981)

แยกได้เพิ่มอีก 1 ซีโรไทป์ คือ ซีโรไทป์ h รวมทั้งหมด 8 ซีโรไทป์ ปัจจุบัน เชื้อทั้ง 8 ซีโรไทป์นี้ ถูกจัดอยู่ในกลุ่มมิวแทนส์ สเตร็พโตคอคไค โดยถ้ากล่าวถึงเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ จะหมายถึงเฉพาะเชื้อที่อยู่ในซีโรไทป์ c, e และ f เท่านั้น สายพันธุ์มาตรฐานของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ คือ ATCC 25175 (หรือ NCTC 10449) (Whiley and Beighton, 1998) เชื้อที่พบในคราบจุลินทรีย์มากรองจากเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ คือ เชื้อสเตร็พโตคอคคัส โซไบรนัส (เดิมคือ เชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ ซีโรไทป์ d และ g) มักพบในฟันหลังมากกว่าฟันหน้า และเกี่ยวข้องกับการผุบริเวณพื้นผิวเรียบ (smooth surface caries) ทั้งเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์และเชื้อสเตร็พโตคอคคัส โซไบรนัส เป็นตัวการสำคัญในการก่อโรคฟันผุในมนุษย์ เนื่องจากเชื้อชนิดอื่นพบได้น้อยหรือไม่พบเลยในมนุษย์ (Hamada and Slade, 1980; Loesche, 1986)

<u>กระบวนการเกิดโรคฟันผุ</u>

ดังที่ได้กล่าวแล้วว่า ผิวฟันที่สัมผัสกับน้ำลายในช่องปากนั้น จะเกิดแอคควายด์ เพลลิเคิลขึ้น แอคควายด์ เพลลิเคิลเป็นชั้นที่มีลักษณะเป็นแผ่น และมีรูปร่างไม่แน่นอน มีความหนาระหว่าง 0.1 ถึง 3 ไมโครเมตร ประกอบด้วยสารหลายชนิด รวมทั้งสารในกลุ่มซัลเฟตและคาร์บอกซิล ซึ่งทำให้ผิวฟันมีประจุรวมเป็นลบ (Rogers, 1976) เชื้อแบคทีเรียก็มีประจุรวมเป็นลบเช่นกัน ดังนั้น โดยปกติแล้วจะมีแรงผลักกันระหว่างผิวฟันกับเชื้อแบคทีเรียในน้ำลายที่เข้าไปใกล้ผิวฟัน แต่เมื่อเกิดคราบจุลินทรีย์ขึ้น และมีกระบวนการยึดเกาะหลายขั้นตอนเข้ามาเกี่ยวข้อง การป้องกันโดยการผลักกันก็จะถูกทำลายไป (Loesche, 1986)

กระบวนการในการเกิดคราบจุลินทรีย์นั้น เป็นที่ยอมรับในปัจจุบันว่า ในขั้นแรก เชื้อแบคทีเรียจะต้องไปยึดเกาะบนผิวฟันก่อน (Gibbons, 1984; Hasty et al., 1992) จากนั้น เชื้อจึงจะเพิ่มจำนวนสะสมบนตัวฟัน สำหรับขั้นตอนในการยึดเกาะของเชื้อนั้นมีอยู่ 2 ขั้นตอน กล่าวคือ ขั้นแรกเป็นปฏิกิริยาระหว่างเชื้อกับผิวฟันซึ่งมีแอคควายด์ เพลลิเคิลปกคลุมอยู่ โดยไกลโคโปรตีนในแอคควายด์ เพลลิเคิลทำหน้าที่เป็นจุดเกาะของเชื้อ ปฏิกิริยานี้เป็นปฏิกิริยาชนิดผันกลับได้ ที่เกี่ยวข้องกับแรงแวนเดอร์วาวส์ พันธะไฮโดรเจน อันตรกิริยาไอออนนิค อันตรกิริยาไฮโดรโฟบิค และอันตรกิริยาอิเลคโตรสแตติค ซึ่งยังมีความแข็งแรงไม่เพียงพอ ขั้นตอนนี้ควบคุมโดยโปรตีนที่ผิวเซลล์ของแบคทีเรีย ขั้นที่ 2 เป็นปฏิกิริยาชนิดผันกลับไม่ได้ เชื้อจะสังเคราะห์สารประเภทโพลิแซคคาไรด์ที่ไม่ละลายน้ำ จากน้ำตาลซูโครส โดยอาศัยเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส ออกมานอกเซลล์ สารนี้ คือ กลูแคน กลูแคนที่ไม่ละลายน้ำนี้ มีบทบาทในการยึดเกาะของเชื้อกับผิวของแข็ง ซึ่งหมายถึงผิวฟันด้วย (Hamada, Koga and Ooshima, 1984; Curtiss, 1986; Gibbons, 1989) ทำให้เชื้อสามารถ

ยึดเกาะได้อย่างแข็งแรง นอกจากนี้ ยังมีกลูแคนไบน์ดิงโปรตีน ซึ่งทำให้เกิดการรวมกลุ่มของเชื้อ ผลของการยึดเกาะของเชื้อ ในสภาวะที่มีน้ำตาลซูโครส และการรวมกลุ่มของเชื้อ ก็คือ การเกิดคราบจุลินทรีย์ ซึ่งจะทำให้เกิดสภาพที่เหมาะสมแก่การเข้ามาของเชื้อชนิดอื่น ๆ แม้ว่าเชื้อเหล่านั้นจะไม่มีความสามารถในการยึดเกาะกับผิวฟันก็ตาม ในที่สุด เชื้อเหล่านี้ก็จะร่วมกันผลิตกรดออกมาทำลายเคลือบฟันต่อไป (Curtiss, 1986)

ดังนั้น จะเห็นได้ว่าปัจจัยสำคัญในการตั้งถิ่นฐาน (colonization) ของเชื้อแบคทีเรีย คือ ความสามารถในการยึดเกาะกับพื้นผิวของร่างกาย ประเด็นที่น่าสนใจเกี่ยวกับการยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรียในช่องปากระหว่างกระบวนการเกิดคราบจุลินทรีย์ (Scannapieco, 1994) ได้แก่

1. การยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรียกับพื้นผิวของร่างกายเป็นแบบ"เลือก" (selective) กล่าวคือ เชื้อแต่ละชนิดจะเลือกยึดเกาะกับพื้นผิวแต่ละประเภท แตกต่างกันไป
2. การยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรียเกิดขึ้นทั้งโดยกลไกที่ไม่จำเพาะเจาะจง และกลไกที่จำเพาะเจาะจง การยึดเกาะอาจทำได้โดยผ่านกลไกหลายชนิด แต่กลไกเหล่านั้นมีส่วนเสริมการทำงานซึ่งกันและกัน กลไกแบบทั่วไป คือ กลไกที่เกี่ยวข้องกับแรงที่ไม่จำเพาะเจาะจงระหว่างเชื้อแบคทีเรียกับพื้นผิวของร่างกาย จำพวกแรงแวนเดอร์วาวส์, พันธะไฮโดรเจน, อันตรกิริยาไอออนนิค, อันตรกิริยาไฮโดรโฟบิค (Rolla, 1983) ตัวอย่างเช่น อันตรกิริยาไอออนนิค จะเกี่ยวข้องกับการมีแคลเซียมทำหน้าที่เป็นสะพาน (calcium bridge) โดยอาจเกิดขึ้นระหว่างองค์ประกอบบนผิวเซลล์แบคทีเรียและพื้นผิวร่างกายที่มีประจุลบ อันตรกิริยาไฮโดรโฟบิค จะเกี่ยวข้องกับกรดไลโปติโคอิค (lipoteichoic acid: LTA) ซึ่งมีอยู่ในเชื้อแบคทีเรีย ทำให้เชื้อมีประจุไฟฟ้าลบ อย่างไรก็ตาม แรงทั้งหมดดังกล่าวยังไม่เพียงพอที่จะใช้อธิบายการตั้งถิ่นฐานของเชื้อแบคทีเรียบนพื้นผิวต่าง ๆ ได้ (Gibbons, Etherden and Peros, 1985) ดังนั้น จึงมีกลไกอีกอันหนึ่งที่เข้ามาเกี่ยวข้อง คือ กลไกแบบจำเพาะเจาะจง หรือ อันตรกิริยาสเทอริโอเคมิคัล (stereochemical interaction) ระหว่างแอดฮิซิน (adhesin) ที่ผิวเซลล์แบคทีเรียกับองค์ประกอบที่พื้นผิวร่างกาย กลไกนี้ช่วยอธิบายถึงรูปแบบการตั้งถิ่นฐานของเชื้อได้ชัดเจนขึ้น โปรตีนชนิดพิเศษ หรือแอดฮิซิน บนผิวเซลล์แบคทีเรียจะทำหน้าที่เป็นตัวกลางในการจับอย่างจำเพาะเจาะจงกับไลแกน (ligand) หรือรีเซ็พเตอร์ (receptor) บนพื้นผิวร่างกาย (Beachey, 1981) อาจกล่าวได้ว่า กลไกทั้งแบบไม่จำเพาะเจาะจงและอันตรกิริยาสเทอริโอเคมิคัล มีการทำงานร่วมกันในการส่งเสริมการยึดเกาะของเชื้อกับพื้นผิวร่างกาย
3. องค์ประกอบในน้ำลายมีบทบาทสำคัญในกระบวนการยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรีย โดยการสร้างไบโอฟิล์ม (biofilm) หรือเพลลิเคิลบนพื้นผิวในช่องปาก (Levine et al., 1985; Bradway et al., 1989) เพลลิเคิลบนผิวฟันนี้ทำหน้าที่เป็นตัวกลางในอันตรกิริยาหลายประเภทที่เกิดขึ้นบริเวณพื้น

ผิวในช่องปาก โดยผ่านองค์ประกอบทางเคมีบางอย่างที่ทำหน้าที่เป็นรีเซ็พเตอร์สำหรับการยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ โปรตีนชนิดต่าง ๆ ในน้ำลาย

4. หลังจากที่เชื้อแบคทีเรียเข้าไปยึดเกาะกับผิวฟันในขั้นแรกแล้ว กระบวนการเกิดคราบจุลินทรีย์ก็จะดำเนินต่อไป โดยมีการเจริญเติบโต การเพิ่มจำนวน และเชื้อชนิดอื่นเข้ามายึดเกาะเพิ่มเติม แหล่งอาหารของเชื้อเหล่านี้ คือ น้ำลาย โดยโปรตีนในน้ำลายจะถูกย่อยสลายโดยเชื้อชนิดต่าง ๆ ตามแต่ความต้องการสารอาหารในการเจริญเติบโตของเชื้อนั้น ๆ นอกจากนี้ การเกิดปฏิกิริยาต่อกันระหว่างเชื้อแบคทีเรียต่างชนิด ในลักษณะที่มีการรวมกลุ่มกัน ทำให้เชื้อแบคทีเรียสามารถยึดเกาะเพิ่มจำนวนมากขึ้น และเกิดเป็นคราบจุลินทรีย์นั่นเอง (Kolenbrander, 1988; Kolenbrander and London, 1993)
5. เชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่เข้าสู่ช่องปาก มิได้สามารถยึดเกาะและตั้งถิ่นฐานได้ทุกชนิด เชื้อส่วนใหญ่จะถูกกำจัดออกไป มีเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่สามารถเกาะติด และคงอยู่ในช่องปากได้ การกำจัดแบคทีเรียเกิดขึ้นโดยกระบวนการชะล้างทางกล (mechanical flushing) ซึ่งเป็นผลมาจากการเคลื่อนไหวทางสรีรวิทยา (physiological movement) เช่น การเคี้ยว การกลืน การพูด นอกจากนี้ องค์ประกอบในน้ำลายก็สามารถจับกับแอดฮีซินของแบคทีเรียได้ด้วย (Levine et al., 1985) อันตรกิริยาเหล่านี้เป็นผลให้เชื้อรวมกันเป็นกลุ่มก้อน (clumping) และถูกกำจัดออกไปจากพื้นผิวในช่องปาก (Kashket and Donaldson, 1972) แสดงว่า การยึดเกาะและตั้งถิ่นฐานของเชื้อแบคทีเรียบนเพลลิเคิลที่ผิวฟันแบบ"เลือก" ซึ่งเกิดขึ้นในระหว่างที่ร่างกายมีการกำจัดเชื้อออกจากช่องปากอยู่ด้วยนั้น จะต้องมีกลไกการตั้งถิ่นฐานที่มีความพิเศษ จึงสามารถต่อต้านแรงที่จะมากำจัดเชื้อนั้นได้

<u>การยึดเกาะของเชื้อสเตร็พโตคอคไค</u>

เชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดในคราบจุลินทรีย์จะเลือกยึดเกาะกับสารแตกต่างกันไป เช่น เราจะพบเชื้อสเตร็พโตคอคคัส แซนควิส และเชื้อแอคติโนไมซีส วิสโคซุส (*Actinomyces viscosus*) ที่ฟันมากกว่าที่เนื้อเยื่ออ่อน ขณะที่เชื้อสเตร็พโตคอคไคอื่น ๆ เช่น เชื้อสเตร็พโตคอคคัส ซัลไลวาเรียส มักพบอยู่ที่ลิ้น โดยทั่วไป เชื้อในกลุ่มมิวแทนส์ สเตร็พโตคอคไคและเชื้อแอคติโนไมซีส วิสโคซุส มักจะพบอยู่ที่ผิวของแข็งอย่างฟันหรือเครื่องมือในช่องปาก (Ellen, 1976; Hamada and Slade, 1980)

เชื้อสเตร็พโตคอคไคโดยปกติจะไม่ทำให้เกิดโรค ดังนั้น ปัจจัยสำคัญที่ชักนำให้เกิดโรคขึ้น จึงน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการรบกวนสมดุลระหว่างเชื้อแบคทีเรียกับร่างกายมนุษย์ ในกรณีของโรคฟันผุ ปัจจัยที่เกี่ยวข้อง คือ ปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อม เช่น อาหาร (น้ำตาล) เชื้อสเตร็พโตคอคไคมีปัจจัยที่

ทำให้เชื้อสามารถตั้งถิ่นฐานได้ (colonization factor) ซึ่งนับว่ามีความสำคัญอย่างยิ่งในกระบวนการเกิดโรค เพราะหากไม่มีปัจจัยเหล่านี้ เชื้อสเตร็พโตคอคไคจะไม่สามารถตั้งถิ่นฐานได้ และอาจไม่สามารถเปลี่ยนแปลงสถานะจากเชื้อปกติไม่ก่อโรค ไปเป็นเชื้อก่อโรคได้ จึงอาจกล่าวได้ว่า หากไม่มีปัจจัยในการตั้งถิ่นฐานที่เหมาะสม โรคที่เกิดจากการติดเชื้อสเตร็พโตคอคไคหลายโรคจะไม่สามารถเกิดขึ้นได้ อนึ่ง คำว่า การยึดเกาะ (adherence หรือ adhesion) และการตั้งถิ่นฐาน (colonization) นั้น ไม่สามารถแบ่งแยกออกจากกันได้อย่างชัดเจน เนื่องจากมีความคาบเกี่ยวกันอยู่ คำว่า ปัจจัยที่ทำให้เชื้อสามารถตั้งถิ่นฐานได้ (colonization factor) หมายถึง สิ่งที่ทำให้เชื้อแบคทีเรียสามารถ (1) ยึดเกาะกับผิวเนื้อเยื่อของมนุษย์ (2) ใช้ประโยชน์จากสารอาหารที่มีอยู่ และเกิดการแบ่งเซลล์บนเนื้อเยื่อมนุษย์ (3) แข่งขันหรือร่วมมือกับเชื้อชนิดอื่น ๆ ในสิ่งแวดล้อมนั้น ๆ และ (4) ต่อสู้กับระบบป้องกันของร่างกายมนุษย์ (Jenkinson and Lamont, 1997)

เมื่อกล่าวถึงในแง่การยึดเกาะแล้ว โดยทั่วไปเชื้อสเตร็พโตคอคไคมีคุณสมบัติในการยึดเกาะที่ดี โดยสามารถยึดเกาะกับสารได้หลายชนิด เช่น องค์ประกอบในน้ำลาย, เซลล์ของมนุษย์, เมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix), องค์ประกอบในซีรัม (serum) และ เชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ เป็นต้น (Jenkinson, 1995) คุณสมบัติในการจับได้หลากหลาย ทำให้เชื้อสเตร็พโตคอคไคสามารถยึดเกาะกับรีเซ็พเตอร์หลายชนิดได้พร้อมกัน ซึ่งเป็นผลมาจากการที่เชื้อสเตร็พโตคอคไคสามารถแสดงแอดฮิซินบนผิวเซลล์ได้หลายชนิด (Hasty et al., 1992) รวมทั้งมีรีเซ็พเตอร์สำหรับแอดฮิซินจากเซลล์อื่นด้วย ในทางคลินิกแล้ว การยึดเกาะของเชื้อสเตร็พโตคอคไคจะเกี่ยวข้องกับเครือข่ายของอันตรกิริยาต่าง ๆ ยิ่งมีจำนวนอันตรกิริยามาก การยึดเกาะก็ยิ่งมีความแข็งแรงมากขึ้น ดังนั้น เชื้อที่มีแอดฮิซินหลายชนิด จะมีข้อได้เปรียบกว่าเชื้ออื่น ๆ ในสิ่งแวดล้อมที่มีรีเซ็พเตอร์หลายชนิด การทำงานของแอดฮิซินที่แตกต่างกัน จึงมีผลสำคัญต่อการยึดเกาะ ทั้งในด้านการรวมกลุ่มของเชื้อ และการยึดเกาะกับเซลล์อื่น (Jenkinson and Lamont, 1997)

การยึดเกาะของเชื้อสเตร็พโตคอคไคกับองค์ประกอบในน้ำลาย

องค์ประกอบในน้ำลายจะเคลือบอยู่บนผิวฟัน เซลล์เยื่อบุผิว (epithelial cell) ของแก้มและลิ้น และพื้นผิวอื่น ๆ ในช่องปาก การยึดเกาะของเชื้อสเตร็พโตคอคไคกับพื้นผิวในช่องปาก เป็นผลเบื้องต้นจากการจับกันของเซลล์กับองค์ประกอบในน้ำลายดังกล่าว ซึ่งไม่ได้มีเฉพาะสารที่หลั่งออกมาจากต่อมน้ำลายเท่านั้น แต่รวมถึงผลผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย เช่น กลูแคน ซึ่งเชื้อสเตร็พโตคอคไคสามารถจับได้โดยผ่านกลูแคนไบน์ดิงโปรตีน (Banas, Russell and Ferretti, 1990), องค์ประกอบในอาหาร เช่น เลคติน ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับผิวเซลล์แบคทีเรีย, ผลผลิตจากซีรัม

เช่น ที่พบในน้ำเหลืองเหงือก (gingival crevicular fluid) รวมถึงสารประกอบอื่นที่มาจากทางเดินอาหารหรือทางเดินหายใจ (Gibbons, 1984) นอกจากนี้ เชื้อสเตร็พโตคอคไคยังสามารถจับกับไกลโคโปรตีน และอาจกระตุ้นให้เกิดการรวมกลุ่มของเชื้อได้ โปรตีนหรือไกลโคโปรตีนในน้ำลายที่สะสมอยู่บนเชื้อที่ยึดเกาะอยู่แล้ว ยังเป็นแหล่งให้เชื้อมายึดเกาะได้เพิ่มเติมอีกด้วย การจับกับโปรตีนหรือไกลโคโปรตีนในน้ำลายนี้ มีความสัมพันธ์กับการเข้าไปตั้งถิ่นฐานระยะแรก และการเพิ่มจำนวนสะสมในภายหลัง ก่อให้เกิดเป็นฟิล์มซึ่งมีลักษณะซับซ้อน ที่เรียกว่า คราบจุลินทรีย์ นอกจากนี้ องค์ประกอบอื่นในน้ำลาย เช่น ไลโซไซม์ (lysozyme) อาจทำให้เกิดการยึดเกาะของเชื้อสเตร็พโตคอคไคกับเพลลิเคิล โดยไม่ต้องอาศัยรีเซ็พเตอร์ที่จำเพาะเจาะจง (Tellefson and Germaine, 1986) ซึ่งในกรณีนี้ อันตรกิริยาอิเลคโตรสแตติคอาจมีความสำคัญมากกว่าการจับของแอดฮิซินกับรีเซ็พเตอร์ (Scannapieco, 1994)

แอดฮิซินของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ ที่มีอยู่ในปัจจุบัน ได้แก่

ก. สารในกลุ่มแอนติเจน I/II (Antigen I/II family) ซึ่งจะจับกับสารเอสเอจี (SAG: salivary agglutinin glycoprotein) ในน้ำลายจากต่อมพาโรติด (parotid saliva), สาร PRPs (proline-rich proteins) และไกลโคโปรตีนอื่นในน้ำลาย (Jenkinson and Demuth, 1997)

ข. กลูแคนไบน์ดิงโปรตีนชนิด GBP_{74} ซึ่งจะจับกับเดกซ์แทรนหรือกลูแคน (Banas et al., 1990)

ค. กลูแคนไบน์ดิงโปรตีนชนิด GBP_{59} ซึ่งจะจับกับกลูแคน (Smith et al., 1994)

การที่เชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์มีแอดฮิซินหลายชนิด ย่อมทำให้เกิดการยึดเกาะที่มั่นคง และทำให้มีโอกาสในการจับกับรีเซ็พเตอร์มากขึ้น นอกจากนี้ การมีแอดฮิซินที่หลากหลาย อาจมีส่วนทำให้เชื้อแบคทีเรียสามารถยึดเกาะกับพื้นผิวที่มีน้ำลายเคลือบอยู่ได้หลายประเภท เนื่องจากมีหลักฐานว่า โมเลกุลในน้ำลายมักจะกระจายอยู่ในช่องปากอย่างไม่มีระเบียบและไม่สม่ำเสมอ (Dawes and MacPherson, 1993)

สารในกลุ่มแอนติเจน I/II เป็นแอดฮิซินของเชื้อสเตร็พโตคอคไคที่มีการศึกษาวิจัยอยู่มาก นอกจากจะพบแอดฮิซินชนิดนี้ในเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์แล้ว ยังพบได้ในเชื้อสเตร็พโตคอคคัส โซไบรนัส สเตร็พโตคอคคัส กอร์ดอนนิไอ สเตร็พโตคอคคัส ออราลิส และสเตร็พโตคอคคัส อินเทอมีเดียส (Jenkinson and Demuth, 1997) โดยเป็นแอดฮิซินที่มีบทบาทในขั้นตอนการยึดเกาะขั้นแรกที่ไม่อาศัยน้ำตาลซูโครส แอดฮิซินชนิดนี้มีขนาดประมาณ 1500 – 1566 หน่วยกรดอะมิโน (amino acid residues) มีปลายอะมิโนที่มีลำดับส่งสัญญาณ (amino (N) – terminal signal sequence) และปลายคาร์บอกซิลที่มีลักษณะซ้ำกัน (conserved carboxyl (C) – terminal region) ที่ปลายคาร์บอกซิลยังมีโมทิฟ (motif) ที่มีลำดับกรดอะมิโนเป็น Leu–Pro–x–Thr–Gly ซึ่งมีความสำคัญในการเกาะที่ผนังเซลล์ (Schneewind, Fowler and Faull, 1995) สารในกลุ่มนี้มีชื่อเรียกต่าง ๆ กัน ขึ้นอยู่

กับผู้ค้นพบ ชื่อที่ใช้เรียกในเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ คือ Antigen I/II (Russell and Lehner, 1978), protein B (Russell, 1979), P1 (Forester, Hunter and Knox, 1983), SpaP (คำว่า Spa มาจากคำว่า surface protein antigen) (Kelly et al., 1989), PAc (Okahashi et al., 1989) และ AgB (Russell et al., 1980) ส่วนชื่อที่ใช้เรียกในเชื้อสเตร็พโตคอคคัส โซไบรนัส คือ SpaA (Abiko et al., 1989), PAg, Antigen I/II ซึ่งต่อมาทราบว่าเป็นโปรตีนชนิดเดียวกัน หรือคล้ายคลึงกัน แอนติเจน I/II นี้สามารถจับกับองค์ประกอบในน้ำลายที่มีลักษณะคล้ายมิวซิน (mucin-like salivary component) ที่เรียกว่า salivary agglutinin glycoprotein (SAG) โดยการเกิดอันตรกิริยาคล้ายเลคติน (lectin-like interaction) (Demuth, Golub and Malamud, 1990)

องค์ประกอบในน้ำลายบางชนิด ได้แก่ ซีครีทอรี ไอจีเอ (secretory Ig A) สามารถยับยั้งการยึดเกาะของเซลล์แบคทีเรียได้ เชื้อบางชนิดที่เข้ามาตั้งถิ่นฐานในช่องปากเป็นพวกแรก ๆ จึงมีการปรับตัว โดยการผลิตเอนไซม์ไอจีเอวันโปรตีเอส (IgA1 protease) ซึ่งไปย่อยไอจีเอวันของมนุษย์อย่างจำเพาะเจาะจง ดังนั้น เชื้อสเตร็พโตคอคไคที่สามารถผลิตเอนไซม์ไอจีเอวันโปรตีเอสได้ จึงมีข้อได้เปรียบกว่าเชื้ออื่น ๆ ในการตั้งถิ่นฐานในช่องปากของเด็กทารก ซึ่งมีซีครีทอรี ไอจีเออยู่มาก โดยได้รับทางน้ำนมมารดา (Kilian et al., 1996)

การยึดเกาะของเชื้อสเตร็พโตคอคไคกับเชื้ออื่น ๆ

ในคราบจุลินทรีย์อาจพบเชื้อแบคทีเรียต่าง ๆ กว่า 300 สปีชีส์ แม้ว่าเชื้อสเตร็พโตคอคไคในช่องปากจะสามารถยึดเกาะอย่างแน่นหนากับเพลลิเคิลบนผิวฟัน และกลายเป็นเชื้อส่วนใหญ่ในคราบจุลินทรีย์ระยะแรก เชื้อสเตร็พโตคอคไคเหล่านี้ก็ยังมีความสามารถในการยึดเกาะกับเชื้อแบคทีเรียอื่น ๆ หลายชนิดในคราบจุลินทรีย์ด้วย ได้แก่ เชื้อที่เข้ามาตั้งถิ่นฐานในระยะแรกเช่นเดียวกับเชื้อสเตร็พโตคอคไค เช่น เชื้อแอคติโนมัยซีส และเชื้อที่เข้ามาตั้งถิ่นฐานในระยะหลัง เช่น เชื้อพอร์ฟีโรโมแนส จิงจิวาลิส (*Porphyromonas gingivalis*) เชื้อแบคทีรอยดีส ฟอร์ไซธัส (*Bacteroides forsythus*) (Lamont, Hersey and Rosan, 1992; Yao et al., 1996)

การยึดเกาะระหว่างเชื้อ อาจเกิดจากการชักนำของโมเลกุลในน้ำลายได้ด้วย ผลผลิตจากเชื้อแบคทีเรียที่มีอยู่ในน้ำลาย เช่น กลูแคน จะทำงานร่วมกับกลูแคนไบน์ดิงโปรตีนที่เชื้อมิวแทนส์ สเตร็พโตคอคไคมีอยู่ ทำให้เชื้อต่าง ๆ เข้ามาเกาะติดกัน (Drake et al., 1988) เช่นเดียวกับการทำหน้าที่ในการยึดเกาะระหว่างเชื้อกับกลูแคนในเพลลิเคิล นอกจากนี้ สารเอสเอจียังเป็นตัวกลางในการยึดเกาะระหว่างเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ กับเชื้อสเตร็พโตคอคคัส กอร์ดอนนิไอได้ด้วย (Lamont et al., 1991)

การยึดเกาะของเชื้อสเตร็พโตคอคไคกับโมเลกุลในเมทริกซ์นอกเซลล์ หรือองค์ประกอบในซีรัม

องค์ประกอบของเมทริกซ์นอกเซลล์ เช่น ไฟโบรเนคติน (fibronectin), ไฟบริโนเจน (fibrinogen), คอลลาเจน (collagen), โปรทีโอไกลแคน (proteoglycan) เช่น เฮพาริน (heparin) ไม่ได้ทำหน้าที่เพียงแค่เป็นรีเซ็พเตอร์ในกระบวนการทำงานของเซลล์ร่างกายเท่านั้น หากยังเป็นรีเซ็พเตอร์ในกระบวนการยึดเกาะของเชื้อจุลินทรีย์ด้วย (Jenkinson and Lamont, 1997) Babu และ Dabbous (1986) พบว่า ไฟโบรเนคตินในน้ำลายที่เคลือบอยู่ที่เซลล์เยื่อบุผิวในช่องปาก และมีอยู่ในเพลลิเคิลด้วยนั้น เป็นสิ่งที่เชื้อสเตร็พโตคอคไคในช่องปากสามารถเกาะติดได้ นอกจากนี้ เชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ ยังสามารถจับกับเส้นใยคอลลาเจนชนิดที่ 1 (type I collagen fibers) เป็นผลให้เชื้อสเตร็พโตคอคไคสามารถยึดเกาะกับเนื้อฟันที่บริเวณรากฟันที่ไม่มีเคลือบรากฟันปกคลุม (dentin in exposed root surface) ซึ่งอาจทำให้เกิดคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือกขึ้นได้ (Jenkinson and Lamont, 1997)

<u>เอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส</u>

กลูแคนเป็นโพลิแซคคาไรด์ของน้ำตาลกลูโคส โดยเป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดโฮโมโพลิแซคคาไรด์ (homopolysaccharide) คือ ประกอบด้วยโมโนแซคคาไรด์ (monosaccharide) ชนิดเดียวกันมาต่อกัน กลูแคนมี 2 ชนิด คือ เดกซ์แทรน (dextran) และ มิวแทน (mutan) เดกซ์แทรนเป็นกลูแคนชนิดละลายน้ำได้ (water-soluble glucan) กลูโคสส่วนใหญ่ต่อกันด้วย พันธะแบบ α-(1$\rightarrow$6) บางครั้งจะมีการแตกแขนงด้วยพันธะแบบ α-(1$\rightarrow$2), α-(1$\rightarrow$3) หรือ α-(1$\rightarrow$4) ส่วนมิวแทนเป็นกลูแคนชนิดไม่ละลายน้ำ (water-insoluble glucan) กลูโคสต่อกันด้วยพันธะแบบ α-(1$\rightarrow$3)

เอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส หรือ เดกซ์แทรนซูเครส หรือ กลูแคนซูเครส (EC 2.4.1.5) ส่วนใหญ่ถูกผลิตออกมานอกเซลล์ และเป็นเอนไซม์ที่มีการผลิตได้โดยไม่ต้องมีการกระตุ้น เอนไซม์ชนิดนี้ส่วนใหญ่ผลิตได้โดยเชื้อลิวโคนอสตอค มีเซนทิรอยดีส ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในดิน และเอนไซม์ที่ผลิตได้ มักเรียกว่า เดกซ์แทรนซูเครส เชื้ออีกชนิดหนึ่ง คือ เชื้อแบคทีเรียในสปีชีส์สเตร็พโตคอคคัส ซึ่งเป็นเชื้อในช่องปาก และเอนไซม์ที่ผลิตได้ มักเรียกว่า กลูโคซิลทรานสเฟอเรส นอกจากนี้ ยังสามารถพบได้ในเชื้อแลคโตเบซิลไล ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดแลคติคได้ (lactic

bacteria) (Sidebotham, 1974) ปฏิกิริยาของเอนไซม์ คือ การนำกลูโคส จากซูโครส มาให้ตัวรับ ทำให้เกิดเป็นพอลิเมอร์ของกลูโคส ซึ่งได้แก่ กลูแคน

$$\text{n glucose-fructose} \xrightarrow{\text{GLUCOSYLTRANSFERASE}} \text{glucose}_n + \text{n fructose}$$

แต่หากมีตัวรับอื่น เช่น มอลโทส หรือ ไอโซมอลโทส เอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรสจะไปกระตุ้นการสร้างโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ แทนการสร้างกลูแคน (Koepsell et al., 1953) เอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรสมีความจำเพาะสูงกับซูโครส และไม่สามารถใช้กลูโคสอิสระ หรือกลูโคสจากไดแซคคาไรด์ (disaccharide) อื่น ๆ เป็นสารตั้งต้นได้ (Tanzer, Chassy and Krichevsky, 1972; Germaine, Chludzinski and Schachtele, 1974)

เอนไซม์เดกซ์แทรนซูเครส มักจะใช้ในทางอุตสาหกรรม โดยเดกซ์แทรนที่ผลิตได้ อาจนำไปใช้ทั้งทางการแพทย์ และเทคโนโลยีชีวภาพ (Soetaert et al., 1995) นอกจากนี้ อาจใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางและอาหารเสริม

เอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรสจากเชื้อสเตร็พโตคอคไคในช่องปาก มีบทบาทสำคัญในขบวนการเกิดโรคฟันผุ โดยกลูแคนที่ผลิตได้ จะช่วยในการยึดเกาะของเชื้อก่อโรคฟันผุ ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว เอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรสเป็นโปรตีนขนาดใหญ่ ประมาณ 1300 – 1700 หน่วยกรดอะมิโน ประกอบด้วย 2 ส่วนหลัก คือ บริเวณ 2/3 ของความยาวของปลายอะมิโน (N – terminal 2/3) ที่เป็นบริเวณเร่ง (catalytic domain) และ บริเวณ 1/3 ของความยาวของปลายคาร์บอกซิล (C – terminal 1/3) ที่มีกลูแคนไบน์ดิงโดเมน ที่ปลายอะมิโนจะพบส่วนที่เกาะกับซูโครส (sucrose binding domain) ซึ่งมีความสามารถในการจับกับซูโครส ทำให้เกิดกระบวนการไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ซูโครสถูกแยกเป็นกลูโคส และสร้างเป็นกลูแคนขึ้นมา โดย Su และ Robyt (1994) พบว่า บนเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส มีตำแหน่งยึดเกาะกับซูโครสอยู่ 2 ตำแหน่ง นอกจากนี้ Mooser และ Iwaoka (1989) ยังพบส่วนเร่งปฏิกิริยาที่มีกรดอะมิโนชนิดกรดแอสพาทิก (catalytic Asp residue) อยู่ที่ปลายอะมิโน ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวกับการที่เอนไซม์ไปจับกับส่วนกลูโคสของซูโครสด้วยพันธะโควาเลนต์ (covalent bonding) หากกรดแอสพาทิกนี้ถูกแทนที่ด้วยกรดอะมิโนชนิดอื่น จะทำให้แอคติวิตี (activity) ของเอนไซม์ และการยึดเกาะของเชื้อเสียไป (Mooser et al., 1991) โดยกรดแอสพาทิกมีความจำเป็นสำหรับการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ (Tsumori, Minami and Kuramitsu, 1997) Chia และคณะ (1997) เรียกชื่อบริเวณนี้ว่า Gtf-P1 ซึ่งมี 19 หน่วยกรดอะมิโน และสามารถพบได้เหมือนกันในไอโซไซม์ (isozyme) ต่าง ๆ ของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส แต่อาจมีความแตกต่างกันใน

การทำงาน (Chia, Yang and Chen., 1998) นอกจากนี้ ยังพบได้ในเอน ไซม์เดกซ์แทรนซูเครสจากเชื้อลิวโคนอสตอค มีเซนทิรอยดีสด้วย (Monchois et al., 1996) Mooser และคณะ (1991) ยังพบว่า ลำดับกรดอะมิโนที่อยู่รอบกรดแอสพาทิก มีลักษณะเหมือนกับบริเวณซ้ำ (conserved region) ของเอนไซม์ในกลุ่มแอลฟา อะไมเลส (α-amylase) ทุกตัว สำหรับปลายคาร์บอกซิล มีหน้าที่จับกับโพลิแซคคาไรด์ที่สร้างขึ้น (Ferretti, Gilpin and Russell, 1987; Wong et al., 1990) โดยมีส่วนกลูแคนไบน์ดิงโดเมน มีขนาดประมาณ 510 หน่วยกรดอะมิโน อยู่ที่ปลายคาร์บอกซิลนี้ (Lis, Shiroza and Kuramitsu, 1995) ส่วนกลูแคนไบน์ดิงโดเมนนี้ จำเป็นสำหรับการสร้างกลูแคน แต่ไม่มีความสำคัญในการย่อยสลายซูโครส (Abo et al., 1991; Nakano and Kuramitsu, 1992) Shimamura และคณะ (1994) พบว่า มีกรดอะมิโนหลายตำแหน่งของเอนไซม์ ที่มีบทบาทต่อโครงสร้างของกลูแคนที่สร้างขึ้น

การศึกษาและคัดแยกยีน (gene) ที่แสดงออกโดยทำหน้าที่สร้างเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส มีมาเป็นเวลากว่า 10 ปีแล้ว ปัจจุบันได้ค้นพบลำดับของยีนที่แสดงออกโดยการสร้างเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส ที่เรียกว่า จีทีเอฟ (*gtf*) ทั้งสิ้น 14 ชนิด (Monchois, Willemot and Monsan, 1999) โดยมี 3 ชนิดที่โคลน และหาลำดับได้จากเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ คือ *gtf B* *gtf C* และ *gtf D* *gtf B* เป็น ยีนที่สร้างเอนไซม์ที่ผลิตกลูแคนชนิดไม่ละลายน้ำ ที่เรียกว่า GTF-I *gtf C* เป็นยีนที่สร้างเอนไซม์ ที่ผลิตกลูแคนทั้งชนิดที่ละลายและไม่ละลายน้ำ ที่เรียกว่า GTF-SI ส่วน *gtf D* สร้างเอนไซม์ที่ ผลิตกลูแคนชนิดละลายน้ำได้ ที่เรียกว่า GTF-S (Aoki at al., 1986; Shiroza, Ueda and Kuramitsu, 1987; Ueda, Shiroza and Kuramitsu, 1988; Hanada and Kuramitsu, 1988; Hanada and Kuramitsu, 1989; Honda, Kato and Kuramitsu, 1990) แม้ว่า GTF-I และ GTF-SI ดูเหมือนจะมีความสำคัญในการยึดเกาะของเชื้อมากกว่า GTF-S (Fujiwara et al., 1996) แต่เอนไซม์ทั้ง 3 ไอโซไซม์นี้มีความสำคัญร่วมกันในกระบวนการเกิดฟันผุ (Yamashita et al., 1993) GTF-I และ GTF-SI มีลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) และกรดอะมิโนที่เหมือนกันอยู่มาก การสร้างกลูแคนของเอนไซม์ 2 ไอโซไซม์นี้ ไม่ต้องการตัวรับ และแอคติวิตีของเอนไซม์จะสูงขึ้นเมื่อมีเดกซ์แทรนอยู่ด้วย ขณะที่ การสร้างกลูแคนของ GTF-S ต้องการตัวรับ Vacca-Smith และ Bowen (1998) รายงานว่า GTF-SI มีความสามารถในการจับกับไฮดรอกซีอะพาไทท์ และไฮดรอกซีอะพาไทท์ที่มีน้ำลายเคลือบอยู่ สูงกว่า GTF-I และ GTF-S แสดงว่า GTF-SI มักจะจับกับผิวอะพาไทท์ ขณะที่ GTF-I จะจับกับผิวเซลล์แบคทีเรีย

<u>กลูแคนไบน์ดิงเลคติน</u>

Janda และ Kuramitsu (1977) รายงานว่า เชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์กลายพันธุ์ (mutant) ที่ขาดกลูแคนไบน์ดิงเลคติน แม้ยังมีแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรสตามปกติ ก็ไม่ทำให้เกิดโรคฟันผุ เพราะไม่สามารถเกาะกับผิวฟันได้ แสดงว่า ในการยึดเกาะเพื่อเพิ่มจำนวนของเชื้อ นอกจากจะขึ้นอยู่กับเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรสซึ่งมีบทบาทในการสร้างกลูแคนแล้ว ยังอาจขึ้นอยู่กับโปรตีนที่มีส่วนที่สามารถเกาะกับกลูแคนได้ คือ กลูแคนไบน์ดิงโปรตีน ซึ่งหมายรวมทั้งเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรสเอง และ กลูแคนไบน์ดิงเลคติน (Doyle and Taylor, 1994) หรืออาจกล่าวได้ว่า กลูแคนไบน์ดิงเลคติน คือ กลูแคนไบน์ดิงโปรตีนที่ไม่ใช่เอนไซม์ (non-enzymatic glucan-binding protein) เนื่องจากกลูแคนไบน์ดิงโปรตีนอื่น ที่เชื้อมิวแทนส์ สเตร็พโตคอคไคผลิตได้นอกเหนือจากเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส ไม่แสดงแอคติวิตีของเอนไซม์ นอกจากนี้ คำว่ากลูแคนไบน์ดิงเลคติน ต่างจากคำว่า กลูแคนไบน์ดิงโปรตีน คือ กลูแคนไบน์ดิงเลคตินนั้น สามารถทำให้เกิดการรวมกลุ่มของเซลล์ได้ด้วย (Denson and Doyle, 1998) โดย Ma และคณะ (1996) กล่าวว่า แบคทีเรียหลายชนิดผลิตเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรสแต่ไม่เกิดการรวมกลุ่มในสภาพแวดล้อมที่มีกลูแคน แสดงว่า เอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรสไม่ใช่เลคติน นอกจากนี้ ยังพบว่าเชื้อสเตร็พโตคอคคัส โซไบรนัส ผลิตกลูแคนไบน์ดิงโปรตีนอย่างน้อย 5 ชนิด แต่มีเพียงชนิดเดียวที่ทำให้เกิดการรวมกลุ่มของเซลล์ ในสภาพแวดล้อมที่มีกลูแคน

กลูแคนไบน์ดิงเลคตินของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส โซไบรนัส มีจุดเชื่อมต่อ (combining site) ขนาดใหญ่ (Landale and McCabe, 1987) กลูแคนไบน์ดิงเลคตินของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส โซไบรนัสจะจับกลูแคน ที่บริเวณกลูโคสที่ต่อกันด้วยพันธะแบบ α-(1$\rightarrow$6) ถึง 6-10 กลูโคส (Drake et al., 1988) นอกจากนี้ Drake, Taylor และ Doyle (1988) ยังพบว่า เชื้อสเตร็พโตคอคไคจำเป็นต้องใช้แมงกานัสไอออน (manganous ion: Mn^{2+}) ในการแสดงออกของกลูแคนไบน์ดิงเลคตินที่ผิวเซลล์ โดยเชื้อสเตร็พโตคอคไคมีระบบขนส่งที่จำเพาะเจาะจงมาก (highly specific transport system) ในการรับแมงกานัสไอออน (Bauer et al., 1993) แมงกานัสไอออนมีความจำเป็นในการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด (Schmid and Auling, 1987) รวมทั้งเชื้อสเตร็พโตคอคไคด้วย (Bowen, 1968) ซึ่งน่าจะมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคฟันผุ (Beighton, 1982)

ทั้งเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ และ เชื้อสเตร็พโตคอคคัส โซไบรนัส สามารถผลิตกลูแคนไบน์ดิงเลคตินได้ เลคตินจากเชื้อสเตร็พโตคอคคัส โซไบรนัส เป็นชนิดที่มีการผลิตได้เอง (constitutive) แต่เลคตินจากเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ เป็นชนิดที่ต้องเหนี่ยวนำให้เกิด (inductive) (Denson and Doyle,1998) เชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ สามารถสังเคราะห์กลูแคน

ไบน์ดิงโปรตีนที่ไม่ใช่เอนไซม์ 3 ชนิด คือ GBP_{74} GBP_{59} และ Gbp C หรือถ้าเรียกโดยเรียงตามลำดับของการค้นพบ คือ Gbp A (GBP_{74}) Gbp B (GBP_{59}) และ Gbp C (Russell, 1979; Banas, Russell and Ferretti, 1990; Smith et al., 1994; Sato, Yamamoto and Kizaki, 1997) Gbp A เป็นโปรตีนที่พบได้ทั้งที่ผิวเซลล์และนอกเซลล์ Gbp B ถูกหลั่งออกมานอกเซลล์เช่นเดียวกับเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส ส่วน Gbp C เกาะอยู่ที่ผนังเซลล์ (Hazlett, Michalek and Banas, 1998) Gbp A มีบริเวณ 3/4 ของความยาวของปลายคาร์บอกซิล เหมือนกับรีพีดโดเมนที่ปลายคาร์บอกซิล (carboxyl-terminal repeat domain) ของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส (Banas et al.,1990) Gbp B ยังไม่ทราบหน้าที่ที่แน่ชัด แต่ทราบว่ามันสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อฟันผุของร่างกายได้ (Smith et al., 1994) Gbp C มีลักษณะบางส่วนเหมือนกับแอดฮิซินในกลุ่มสปา (Spa) ของเชื้อสเตร็พโตคอคไคในช่องปาก (Sato et al., 1997)

<u>กลวิธีในการป้องกันฟันผุ</u>

กลวิธีโดยทั่วไปในการป้องกันฟันผุ ได้แก่

1. การต่อต้านเชื้อก่อโรคฟันผุ

การศึกษาวิจัยในเรื่อง การใช้สารเคมี วิธีทางอิมมูโนวิทยา หรือการใช้ยาต้านแบคทีเรีย เป็นผลให้เกิดยาชนิดใหม่ ๆ เพื่อใช้ในการป้องกันฟันผุ แต่ก็ยังไม่ให้ผลที่น่าพอใจ (Harris, 1989) ดังนั้นกลวิธีต่อต้านเชื้อก่อโรคฟันผุในทางปฏิบัติ จึงหันกลับไปที่วิธีการดั้งเดิม คือ การรักษาอนามัยในช่องปาก เช่น การกำจัดคราบจุลินทรีย์ออกจากช่องปาก โดยการแปรงฟันและการใช้ไหมขัดฟัน ซึ่งการคิดค้นยาสีฟันและการออกแบบแปรงสีฟันที่มีประสิทธิภาพดีขึ้น ออกมาในท้องตลาด ก็อาจมีส่วนช่วยได้บ้าง (Mandel, 1996)

ยาต้านเชื้อแบคทีเรียที่ให้ผลดีที่สุดในปัจจุบัน คือ คลอเฮกซีดีน (chlorhexidine) (Featherstone, 2000) ยาชนิดนี้นอกจากจะมีการศึกษาและใช้งานในลักษณะเป็นยาต้านการเกิดคราบจุลินทรีย์ (antiplaque) หรือต้านโรคเหงือกอักเสบ (antigingivitis) แล้ว ยังมีบางรายงานกล่าวถึงการใช้ยานี้ในการต้านเชื้อมิวแทนส์ สเตร็พโตคอคไคด้วย (Emilson, 1994)

2. การเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของอาหารที่ก่อโรคฟันผุ

ในระยะเริ่มแรก มาตรการในการเปลี่ยนแปลงอาหาร หมายถึง การจำกัดการรับประทานน้ำตาล โดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำตาลซูโครส แต่ในทางปฏิบัติแล้ว มาตรการดังกล่าวทำได้ยาก จึงได้มีการพัฒนาแนวทางใหม่เกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงอาหาร คือ การใช้สารให้ความหวานที่ไม่ทำให้ฟันผุทดแทนการใช้น้ำตาล ซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับมากกว่า ปัจจุบัน มีสารให้ความหวานทดแทนหลายชนิด และมีการนำไปใช้ในการผลิตขนมหวานหรือเครื่องดื่มในท้องตลาดด้วย ไซลิทอล (xylitol) เป็นสารให้ความหวานทดแทนที่ใช้ในแง่การป้องกันฟันผุมากที่สุด โดยเริ่มใช้ในหมากฝรั่ง มีงานศึกษาวิจัยที่รายงานการใช้หมากฝรั่งที่ใส่ไซลิทอล ว่าสามารถลดจำนวนเชื้อมิวแทนส์ สเตร็พโตคอคไค โดยการเปลี่ยนแปลงเมทาโบลิซึมของเชื้อ และยังกระตุ้นให้เกิดการสร้างสารประกอบแร่ธาตุขึ้นมาใหม่ (Trahan, 1995) และมีรายงานมากมายถึงการทดลองใช้หมากฝรั่งไซลิทอลในทางคลินิก พบว่า สามารถลดการเกิดโรคฟันผุได้ (Makinen et al., 1995; Sintes et al., 1995; Makinen et al., 1996) ปัจจุบันมีการผลิตยาสีฟันและน้ำยาบ้วนปากที่ผสมไซลิทอลออกมาในท้องตลาดด้วย (Mandel, 1996)

3. การใช้ฟลูออไรด์เพื่อเพิ่มความต้านทานของฟัน

การใช้ฟลูออไรด์ในรูปแบบต่าง ๆ นั้น เป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไปแล้วว่า สามารถลดการเกิดโรคฟันผุได้ รูปแบบต่าง ๆ ในการใช้ฟลูออไรด์ ได้แก่ การให้ฟลูออไรด์เสริม, การให้ฟลูออไรด์เฉพาะที่ และ การใช้ยาสีฟันผสมฟลูออไรด์ นอกจากนี้ ยังมีความพยายามนำฟลูออไรด์มาผสมในวัสดุอุดฟัน เพื่อให้ฟลูออไรด์ถูกปล่อยออกมาในช่องปาก เป็นการลดโอกาสการเกิดฟันผุซ้ำ (recurrent caries) ที่บริเวณนั้น (Shern, 1995)

4. การเคลือบหลุมร่องฟัน (sealant)

การเคลือบหลุมร่องฟันเป็นอีกวิธีหนึ่งในการเพิ่มความต้านทานของฟัน ในตำแหน่งที่ฟลูออไรด์ให้ผลไม่เต็มที่ คือ บริเวณหลุม (pits) และร่อง (fissures) บนตัวฟัน (Mandel, 1996)

การศึกษาค้นคว้าทางชีววิทยาระดับโมเลกุลและเทคโนโลยีที่ก้าวหน้า ทำให้เกิดกลวิธีใหม่ ๆ ในการป้องกันฟันผุ อันได้แก่

1. วัคซีนป้องกันฟันผุ

การวิจัยเรื่องวัคซีนป้องกันฟันผุเริ่มมานานกว่า 50 ปีแล้ว (Bowen, 1996) จากความก้าวหน้าด้านชีววิทยาระดับโมเลกุล โดยมีการโคลน (cloning) และหาลักษณะการทำงาน (functional characterization) ของปัจจัยก่อโรค (virulence factor) ในเชื้อมิวแทนส์ สเตร็พโตคอคไค รวมถึงความก้าวหน้าทางด้านอิมมูโนวิทยาที่เยื่อเมือก (mucosal immunology) และการพัฒนาระบบนำส่งแอนติเจนที่มีประสิทธิภาพ เพื่อกระตุ้นการตอบสนองของไอจีเอในน้ำลายนั้น ทำให้เกิดการพัฒนาวัคซีนป้องกันฟันผุที่ปลอดภัยและมีประสิทธิภาพ แอนติเจนที่ได้รับความสนใจนำมาทำเป็นวัคซีน ได้แก่ แอนติเจนที่เกี่ยวข้องกับการยึดเกาะของเชื้อ คือ แอนติเจน I/II และ เอนไซม์กลูโคซิล ทรานสเฟอเรส (Hajishengallis and Michalek, 1999)

ส่วนกลวิธีใหม่ ๆ ในการให้ภูมิคุ้มกัน มีดังนี้

1.1 แอคทีฟ อิมมูไนเซชัน (active immunization)

หมายถึง การใส่แอนติเจนเฉพาะอย่างเข้าไปในร่างกาย เพื่อกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันโรค มีทั้งการให้โดยการรับประทานและการให้ทางระบบ

1.1.1 การใช้เปปไทด์ของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ ที่สังเคราะห์ขึ้น (synthetic *S.mutans* peptides)

การใช้เปปไทด์สังเคราะห์ มีข้อดีกว่าการใช้ผนังเซลล์หรือเอนไซม์ของเชื้อจริง เพราะไม่ทำให้เกิดการตอบสนองของเนื้อเยื่อร่างกาย (host tissue reactivity) (Smith et al., 1993)

1.1.2 การพ่วง (coupling) แอนติเจนของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ เข้ากับคลอเลราทอกซิน (cholera toxin)

การพ่วงโปรตีนหรือแอนติเจนเข้ากับส่วนที่ไม่ก่อโรค (nontoxic subunit) ของคลอเลราทอกซิน เป็นวิธีแก้ปัญหาเรื่องโปรตีนถูกย่อยโดยเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหาร เนื่องจากคลอเลราทอกซินเป็นอิมมูโนเจนของเยื่อเมือก (mucosal immunogen) ที่ดี สามารถจับกับเซลล์ของระบบน้ำเหลือง (lymphoid cells) และทำหน้าที่เป็นตัวช่วยในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Katz et al., 1993)

1.1.3 การเชื่อมต่อยีนของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ กับอนุพันธ์ของเชื้อซัลโมเนลลา (salmonella) ที่ไม่ก่อโรค

เชื้อซัลโมเนลลา เป็นเวคเตอร์ของวัคซีน (vaccine vector) ที่ดี สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในทางเดินอาหารได้มาก (Jagusztyn-Krynicka, Clark-Curtiss and Curtiss, 1993)

1.1.4 การใช้ระบบไลโปโซม (liposome delivery system)

ไลโปโซมเป็นถุงที่มีเยื่อฟอสโฟไลปิด 2 ชั้น (bilayered phospholipid membrane) ที่มีลักษณะคล้ายเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) (Rabinovich et al., 1994) สามารถใช้เป็นตัวเคลือบวัคซีน ทำให้แอนติเจนไม่ถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ในทางเดินอาหาร

1.2 แพสสีฟ อิมมูไนเซชัน (passive immunization)

หมายถึง การให้แอนติบอดีเข้าสู่ร่างกายโดยตรง

1.2.1 โมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal Ab)

ทำโดยเคลือบโมโนโคลนอลแอนติบอดี บนผิวฟันที่ขัดสะอาดแล้ว (Ma, Smith and Lehner, 1987; Ma and Lehner, 1990) อย่างไรก็ตาม เนื่องจากวิธีนี้การใช้วิธีนี้ไม่ได้กระตุ้นการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจง (specific Ab) จึงต้องทำโดยต่อเนื่อง เช่น ให้ในรูปน้ำยาบ้วนปากหรือยาสีฟัน

1.2.2 แอนติบอดีในนมวัวหรือหางนม (immune bovine milk and whey)

ทำโดยการให้แอนติเจนที่ผลิตจากเซลล์ของเชื้อมิวแทนส์ สเตร็พโตคอคไคแก่วัว เพื่อกระตุ้นไอจีจีแอนติบอดี (IgG Ab) ทั้งในซีรัมและน้ำนมวัว แล้วนำน้ำนมหรือหางนมนั้นมาทำเป็นวัคซีนอีกต่อหนึ่ง (Michalek et al., 1987; Filler et al., 1991)

1.2.3 แอนติบอดีจากไข่แดง (egg yolk Ab)

ใช้ไข่ไก่จากไก่ที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ เป็นแหล่งของแอนติบอดี (Otake et al., 1991; Hamada et al., 1991)

1.2.4 แอนติบอดีจากพืช (transgenic plant Ab)

Ma และคณะ (1995) ศึกษาการกระตุ้นการสร้างซีครีทอรีไอจีเอในยาสูบ ซึ่งไอจีเอชนิดนี้เป็นแอนติบอดีหลักที่พบในช่องปากตามธรรมชาติ จึงน่าจะได้ผลดีกว่าการใช้แอนติบอดีชนิดไอจีจีจากสัตว์ดัง 3 วิธีแรก และ การใช้พืช ยังสามารถควบคุมโครงสร้างของตัวแอนติบอดีได้ง่ายกว่า ทำให้ไม่มีปัญหาเรื่องการกระตุ้นเนื้อเยื่อของร่างกายโดยแอนติบอดีจากสัตว์ นอกจากนี้ หากคำนึงถึงการนำมาใช้ในวงกว้าง ก็สามารถทำได้ง่าย ผลิตได้

ปริมาณมาก และราคาไม่แพง โดยการใช้พืชที่มีการบริโภคในชีวิตประจำวัน เช่น ข้าว (Hiatt and Ma, 1992; Ma et al., 1995)

อย่างไรก็ดี เนื่องจากโรคฟันผุไม่ได้เป็นอันตรายร้ายแรงถึงชีวิต จึงยังมีความสงสัยอยู่ว่า การให้วัคซีนเพื่อป้องกันโรคมีความจำเป็นเพียงใด ปัจจุบัน แนวโน้มของการทำวัคซีนป้องกันฟันผุ จะพยายามให้ออกมาในรูปการรับประทานมากกว่า ดังนั้น การให้แพสสีฟ อิมมูไนเซชัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้พืชเป็นตัวกลาง จึงเป็นความหวังที่น่าสนใจอันหนึ่ง (Mandel, 1996) สำหรับกลุ่มเป้าหมายที่ควรได้รับวัคซีนในอนาคต ได้แก่ เด็กเล็กและมารดา โดยให้วัคซีนในระยะที่ฟันของเด็กกำลังจะขึ้น เพื่อขัดขวางการถ่ายทอดและการตั้งถิ่นฐานของเชื้อมิวแทนส์ สเตร็พโตคอคไคจากมารดา (Gregory, 1994) ในระยะยาว ควรใช้วัคซีนในประเทศที่มีอัตราการเกิดโรคฟันผุสูง และไม่มีมาตรการเติมฟลูออไรด์ในน้ำประปาหรือการให้ฟลูออไรด์เฉพาะที่ที่เพียงพอ (Mandel, 1996)

2. การใส่เชื้อทดแทนเข้าไปในปาก (replacement therapy)

คือ การใช้เชื้อที่กลายพันธุ์ไป และขาดคุณสมบัติที่จะทำให้เกิดโรค ให้เจริญบนตัวฟันแทนที่เชื้อปกติในช่องปากซึ่งมีคุณสมบัติก่อโรคได้

เนื่องจากกรดสำคัญที่เชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ผลิตออกมา คือ กรดแลคติค จึงมีผู้ศึกษาวิจัยหาเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์กลายพันธุ์ ที่ไม่มียีนของเอนไซม์แลคเตทดีไฮโดรจีเนส (lactate dehydrogenase: LDH) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรดแลคติค (Johnson, Gross and Hillman, 1980; Fitzgerald et al., 1989) นอกจากนี้ ยังมีความพยายามที่จะถ่ายทอดยีนอาร์จินีน ดีอะมิเนส (arginine deaminase gene) จากเชื้อสเตร็พโตคอคคัส แซนควิส ไปใส่เชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ เพื่อขัดขวางการผลิตกรด โดยยีนนี้ควบคุมการสร้างเบสของดีเอ็นเอ (Marquis, 1993) อย่างไรก็ตาม แม้ว่าความก้าวหน้าด้านพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) จะเอื้อต่อการสร้างเชื้อกลายพันธุ์ที่ไม่ทำให้เกิดฟันผุ แต่การทำให้เชื้อเหล่านี้เข้าไปตั้งถิ่นฐานอย่างถาวรในช่องปากยังเป็นเรื่องที่ทำได้ยาก เพราะนอกจากจะต้องมีการพิสูจน์ให้แน่ชัดว่า เชื้อเหล่านี้เป็นเชื้อกลายพันธุ์ที่มียีนเปลี่ยนแปลงไปเพียงยีนเดียว (isogenic mutant) แล้ว ยังต้องคำนึงถึงความปลอดภัย และความเข้ากันได้กับเชื้อไม่ก่อโรคอื่น ๆ ในช่องปากด้วย อย่างไรก็ดี แนวทางการใส่เชื้อทดแทนนี้ นับว่าเป็นสิ่งท้าทายให้นักวิจัยค้นคว้าต่อไป (Mandel, 1996)

3. การขัดขวางไม่ให้เกิดคราบจุลินทรีย์

การต้านเชื้อแบคทีเรียอีกแนวหนึ่ง คือ การป้องกันไม่ให้เกิดคราบจุลินทรีย์ ซึ่งสามารถ

ทำได้หลายวิธี ได้แก่

3.1 การยับยั้งเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส ซึ่งจะเป็นผลให้ไม่มีการสร้างกลูแคน

3.2 การขัดขวางโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการยึดเกาะ หรือรวมกลุ่มของเชื้อแบคทีเรีย

3.3 การเพิ่มประสิทธิภาพของระบบต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย เช่น การใช้สาร 2 ชนิดร่วมกัน (combination product) โดยการใช้โลหะหนักบางชนิดร่วมกับน้ำยาฆ่าเชื้อ หรือการใช้สารพวกโพลิเมอร์เป็นตัวช่วยให้ยาถูกปล่อยออกมาในช่องปากอย่างช้า ๆ (slow-release devices) (Russell, 1994)

ในส่วนของการยับยั้งเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรสนั้น ได้มีการทดลองวิธีการต่าง ๆ มากมาย แต่ก็ยังไม่ค่อยประสบผลสำเร็จมากนัก ตัวอย่างเช่น การใช้น้ำตาลที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงซูโครส (sucrose analogue) แต่ขัดขวางการสังเคราะห์กลูแคน หรือ การใช้สารสกัดจากพืช หรือรา ที่ไปเปลี่ยนแปลงการยึดเกาะของกลูแคนที่ผิวเซลล์ (Russell, 1994) Smith และ Taubman (1987) พบว่า แอนติบอดีต่อเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส สามารถลดการตั้งถิ่นฐานและการเพิ่มจำนวนของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ได้

4. การเพิ่มความต้านทานของฟัน

4.1 การเพิ่มความสามารถในการรับฟลูออไรด์

วิธีการหนึ่ง คือ การใช้สารละลายกรดแคลเซียมฟอสเฟต (acidified calcium phosphate) ก่อนการให้สารละลายฟลูออไรด์ (Shern, 1995) ซึ่งสามารถทำได้ในลักษณะการให้ฟลูออไรด์เฉพาะที่โดยทันตแพทย์ หรือใช้ด้วยตนเอง หรืออาจทำให้อยู่ในรูปหมากฝรั่งหรือยาสีฟัน

4.2 การใช้สารเพิ่มการสร้างสารประกอบแร่ธาตุขึ้นมาใหม่ (remineralizing agent)

Tung, Markovic และ O'Farrell (1994) ได้รายงานการใช้แคลเซียมฟอสเฟต (amorphous calcium phosphate: ACP) ในหมากฝรั่ง โดยสารนี้สามารถเปลี่ยนรูปเป็นไฮดรอกซีอะพาไทท์ และเข้าไปอยู่ที่รูเล็ก ๆ ซึ่งเกิดขึ้นในฟันผุระยะแรกได้ นอกจากนี้ Chow และคณะ (1994) ยังรายงานการใช้แคลเซียมฟอสเฟตอีกรูปแบบหนึ่ง คือ เตตระแคลเซียมฟอสเฟต (tetracalcium phosphate) ผสมกับไดแคลเซียมฟอสเฟต (dicalcium phosphate anhydrous) สารแคลเซียมฟอสเฟตเหล่านี้ อาจนำมาใส่ในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ได้

4.3 การใช้แผ่นโพลิเมอร์ (polymeric coatings)

Johnston และ Bowen (1991) ได้ศึกษาการใช้แผ่นโพลิเมอร์บาง ๆ ไปปิดทับตัวฟันและ

ผิวรากฟันที่ไม่มีเหงือกปกคลุม

4.4 การใช้แสงเลเซอร์ (laser light)

เคยมีรายงานว่า แสงเลเซอร์สามารถเปลี่ยนแปลงพื้นผิวของเคลือบฟัน และเพิ่มความต้านทานต่อการทำลายจากกรด (Stern, Sognnaes and Goodman, 1966) ต่อมา Featherstone และคณะ (1998) ได้รายงานว่า แร่ธาตุในฟันสามารถดูดซับแสงคาร์บอนไดออกไซด์เลเซอร์ (CO_2 laser light) ได้ แสงนี้จะถูกเปลี่ยนเป็นความร้อนอย่างรวดเร็ว และเกิดเป็นผิวคล้ายเซรามิค ซึ่งมีความทนทานต่อกรดสูง โดยทำได้ผลดีในที่หลุมและร่องฟัน นอกจากนี้ แสงเลเซอร์ยังสามารถนำมาใช้ในการกำจัดรอยผุ และยับยั้งโรคฟันผุมิให้ลุกลามมากขึ้นด้วย แต่ยังเป็นเพียงการทดลองในห้องปฏิบัติการเท่านั้น ในการนำมาใช้งานนั้น คุณสมบัติที่พึงปรารถนาของเลเซอร์ คือ สามารถนำมาใช้ในการกำจัดรอยผุ และปรับสภาพโดยรอบรอยผุที่กำจัดออกไปแล้วนั้น ให้มีความต้านทาน ไม่เกิดการผุลุกลามต่อ

4.5 การเพิ่มความต้านทานของร่างกาย (augmenting host resistance)

จากการค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับโครงสร้างและการทำงานของโปรตีนในน้ำลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันตนเองของเนื้อเยื่อในช่องปาก ทำให้เกิดแนวความคิดในการส่งเสริมระบบป้องกันตามธรรมชาตินี้ (Mandel, 1989) ในน้ำลายมีโปรตีนหลายชนิดที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ ไลโซไซม์, แลคโตเฟอริน (lactoferrin), เพอร์ออกซิเดส (peroxidase), ฮิสเททิน (histatin) โปรตีนบางชนิดก็ทำให้เชื้อเกิดการจับตัวเป็นก้อน และขัดขวางการยึดเกาะของเชื้อกับฟัน ได้แก่ มิวซิน (mucin), ซีครีทอรีไอจีเอ, ไกลโคโปรตีนจากต่อมพาโรติด, ไฟโบรเนคติน ส่วนโปรตีนอีกกลุ่มหนึ่ง สามารถเปลี่ยนค่าความเป็นกรดด่างในคราบจุลินทรีย์ และเพิ่มปริมาณแคลเซียมและฟอสเฟตในคราบจุลินทรีย์ได้ (Mandel, 1996) เราสามารถสร้างสารเหล่านี้ด้วยเทคโนโลยีการตัดต่อดีเอ็นเอ (recombinant DNA technology) นอกจากนี้ Levine (1993) ได้วิจัยถึงการใช้น้ำลายเทียม (artificial saliva) ที่มีการเติมโมเลกุลที่มีในน้ำลายธรรมชาติลงไป เพื่อกระตุ้นระบบป้องกันของร่างกาย ในผู้ป่วยที่มีสภาวะปากแห้ง (xerostomia) ซึ่งต่อไปอาจมีการเติมสารเหล่านี้ลงในน้ำยาบ้วนปากและยาสีฟันได้

<u>การยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อโดยสารสกัดจากธรรมชาติ</u>

งานวิจัยในปัจจุบันมีแนวโน้มไปในแง่การหาสารยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อ ซึ่งได้แก่ การใช้สารเคมีชนิดต่าง ๆ เช่น พาลาติโนส (palatinose) (Hamada et al.,1984), ไอออนของโลหะ (metal ion), ตัวออกซิไดซ์ (oxidizer) (Wunder and Bowen, 1999) แต่แนวทางที่ได้รับความสนใจมากกว่า คือ การใช้สารสกัดจากธรรมชาติ ไม่ว่าจะเป็นพืชหรือสัตว์ มีรายงานการศึกษาสารไคโตแซน ซึ่งเป็นอนุพันธ์ชนิดหนึ่งของไคติน (chitin) เป็นคาร์โบไฮเดรตที่ได้มาจากกระดองหรือเปลือกของสัตว์จำพวกปูหรือกุ้ง พบว่า มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ แต่ไม่ทำลายเชื้อมิวแทนส์ สเตร็พโตคอคไค (Muzzarelli et al., 1990) ต่อมา ได้พบว่า ไคโตแซนไปยับยั้งการเกาะติดของเชื้อสเตร็พโตคอคไคในช่องปากกับไฮดรอกซีอะพาไทท์ (Sano et al., 1991; Tarsi et al., 1997; Tarsi et al., 1998) สารลักษณะคล้ายขี้ผึ้งที่ได้จากรวงผึ้ง ที่เรียกว่า Propolis สามารถลดจำนวนเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ ในน้ำลาย (Steinberg, Kaine and Gedalia, 1996) มีฤทธิ์ต้านเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ และ เชื้อสเตร็พโตคอคคัส โซไบรนัส และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส (Ikeno, Ikeno and Miyazawa, 1991; Park et al., 1998) ยับยั้งการเกาะติดของเชื้อ (Koo et al., 2000) โดยมีผลต่อการผลิตกลูแคนชนิดไม่ละลายน้ำ (Ikeno et al., 1991; Koo et al., 2000) ในหลอดทดลอง นอกจากนี้ จากการทดสอบในหนู พบว่า สามารถลดการเกิดฟันผุจากเชื้อสเตร็พโตคอคคัส โซไบรนัสได้ (Ikeno et al., 1991; Koo et al., 1999) Wu-Yuan, Chen และ Wu (1988) รายงานว่าสารแกลโลแทนนิน (gallotannin) จากลูกสมอจีน (Chinese nutgall หรือ *Melaphis chinensis*) มีฤทธิ์ยับยั้งการยึดเกาะกับผิวแก้วของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ และเชื้อสเตร็พโตคอคคัส โซไบรนัส, การทำงานของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส และการรวมกลุ่มของเชื้อ สารสกัดจากกิ่งไม้ที่ใช้ถูฟันของไนจีเรีย (Nigerian chewing sticks หรือ *Serindeia warnecki*) สามารถยับยั้งการยึดเกาะกับผิวแก้วและไฮดรอกซีอะพาไทท์ของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ได้ (Wolinsky and Sote, 1984) Wolinsky และคณะ (1996) ยังได้ศึกษาสารสกัดจากกิ่งนีม (Neem stick หรือ *Azadirachta indica*) ซึ่งเป็นกิ่งไม้ที่ใช้ถูฟันอีกชนิดหนึ่ง พบว่า สามารถยับยั้งการยึดเกาะกับไฮดรอกซีอะพาไทท์ และการผลิตกลูแคนของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ และ เชื้อสเตร็พโตคอคคัส โซไบรนัสได้ สารประเภทโพลิแซคคาไรด์ที่สกัดจากสาหร่ายทะเลชื่อ *Gloiopeltis furcata* สามารถยับยั้งการเกาะของเชื้อมิวแทนส์ สเตร็พโตคอคไค กับไฮดรอกซีอะพาไทท์ และลดการเพิ่มจำนวนของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส โซไบรนัส รวมทั้งการเกิดฟันผุในหนูทดลอง (Saeki et al., 1996) นอกจากนี้ กรดไขมันจากสาหร่ายชนิดเดียวกันนี้ ก็มีฤทธิ์ต้านเชื้อมิวแทนส์ สเตร็พโตคอคไค และยับยั้งการผลิตกลูแคนชนิดไม่ละลายน้ำ จากเชื้อสเตร็พโตคอคคัส โซไบรนัส (Kurihara et al., 1999)

Mitsunaga และ Abe (1997) รายงานว่า สารสกัดจากเปลือกของต้นแบล็ควอทเทิล (black wattle หรือ *Acacia mearnsii*) และต้นลาช (larch หรือ Larix spp.) มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส จากเชื้อสเตร็พโตคอคคัส โซไบรนัส Tagashira และคณะ (1997) ได้ศึกษาผลของต้นฮอพ (hop หรือ *Humulus lupulus*) พบว่า สารประเภทโพลิฟีนอลของฮอพ สามารถยับยั้งการยึดเกาะกับผิวแก้วของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ และ เชื้อสเตร็พโตคอคคัส โซไบรนัส รวมทั้งยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส แต่ไม่มีผลต่อการเจริญและการผลิตกรดของเชื้อ นอกเหนือจากสารสกัดจากพืชหรือสัตว์ดังกล่าวมาแล้ว ยังมีรายงานการศึกษาเชื้อชนิดอื่นเพื่อหาสารหรือเอนไซม์ที่ไปมีผลต่อเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ด้วย (Yokogawa et al., 1974; Koga et al., 1982; Kim et al., 1999)

ปัจจุบันมีความพยายามที่จะนำสมุนไพรมาใช้ในการรักษาโรคต่าง ๆ มากขึ้น มีการศึกษาผลในการต้านเชื้อแบคทีเรียของสมุนไพรชนิดต่าง ๆ กันอย่างกว้างขวาง สารสกัดจาก สมุนไพรหลายชนิดได้ถูกนำมาผสมในผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในช่องปาก คือ ยาสีฟัน และ น้ำยาบ้วนปาก (van der Weijden et al., 1998) ในส่วนของสมุนไพรไทยนั้น เป็นที่ทราบกันดีว่ามีการใช้ประโยชน์กันมาตั้งแต่สมัยโบราณ และ ปัจจุบันก็ยังมีการใช้อยู่ในชนบท ซึ่งรวมถึงการใช้งานทางทันตกรรมด้วย นักวิจัยในประเทศไทยจึงหันมาให้ความสนใจกับสมุนไพรไทยเหล่านี้ ในแง่ของการควบคุมโรคฟันผุนั้น มีรายงานผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ จากต้นฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*) (ชลธิชา อมรฉัตร และคณะ, 2534) ใบฝรั่ง (*Psidium guajava*) (Kraivaphan, Amornchat and Triratana, 1992) สีฟันคนทา หรือ ไม้จี้ (*Harrisonia perforata*) (Tandhachoon, Triratana and Soo-ampon, 1993) ส่วน Koontongkaew และ Thaweboon (1986) ได้รายงานผลของสารสกัดจากหมาก (betel nut หรือ *Areca catechu*) ต่อเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase) ของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ นอกจากนี้ ใบข่อย (*Streblus asper*) ก็มีรายงานผลการยับยั้งการเจริญเติบโต (เทอดพงษ์ ตรีรัตน์ และ บุญนิตย์ ทวีบูรณ์, 2530) และการฆ่าเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ (Wongkham et al., 1996) จากการทดลองผสมสารสกัดจากใบข่อยในน้ำยาบ้วนปาก พบว่า สามารถลดจำนวนเชื้อในน้ำลาย โดยไม่มีผลกระทบต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และ ความทนต่อการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง (buffer capacity) ของน้ำลาย (Taweechaisupapong et al., 2000)

นอกจากสมุนไพรไทยที่กล่าวมาแล้ว พืชบางชนิดที่เห็นกันอยู่ในชีวิตประจำวัน ก็มีส่วนประกอบที่มีผลต่อเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคฟันผุด้วย Kim (1997) พบว่า สารสกัดจากหอมหัวใหญ่ (*Allium cepa L.*) สามารถฆ่าเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ และเชื้อสเตร็พโตคอคคัส โซไบรนัสได้ ส่วน Shouji และคณะ (2000) รายงานถึงเห็ดชีตาเกะ (shiitake หรือ *Lentinus edodes*) ซึ่งเป็นเห็ด

ที่คนญี่ปุ่นนิยมรับประทาน ว่า มีผลยับยั้งการผลิตกลูแคนชนิดไม่ละลายน้ำ ของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ และ เชื้อสเตร็พโตคอคคัส โซไบรนัสได้ รวมทั้ง ลดการเกิดคราบจุลินทรีย์ในหนูทดลองด้วย Kashket และคณะ (1985) ได้ศึกษาสารสกัดจากเครื่องดื่ม บางชนิด พบว่า ชา กาแฟ และ โกโก้ (cocoa) มีสารที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลูโคซิล ทรานสเฟอเรส ในเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ สำหรับชานั้น เป็นพืชที่ได้รับการวิจัยอย่างกว้างขวางในแง่การป้องกันฟันผุ ชาอู่ล่ง เป็นชาที่มีการศึกษากันมาก พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ ยับยั้งเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส การผลิตกลูแคนชนิดไม่ละลายน้ำ และ การยึดเกาะกับผิวแก้วและไฮดรอกซีอะพาไทท์ รวมทั้งลดอัตราการสร้างกรดของ เชื้อมิวแทนส์ สเตร็พโตคอคไค (Nakahara et al., 1993; Ooshima et al., 1993; Matsumoto et al., 1999) ส่วนการทดลองในหนู พบว่า ลดการเกิดฟันผุ และการสะสมของคราบจุลินทรีย์ (Ooshima et al., 1993) และเมื่อทดลองในมนุษย์ ก็สามารถลดการเกาะของคราบจุลินทรีย์ โดยไม่เปลี่ยนแปลงจำนวนของเชื้อในน้ำลาย (Ooshima et al., 1994) ชาเขียวญี่ปุ่น มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ (Sakanaka et al., 1989; Horiba et al., 1991) ยับยั้งการผลิตกลูแคนชนิดไม่ละลายน้ำ และ การเกาะกับไฮดรอกซีอะพาไทท์ ของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ (Otake et al., 1991) นอกจากนี้ ยังมีรายงานการยับยั้งเชื้อโดย ชาดาร์จีลิง (Darjeeling tea) ของอินเดีย (Rosen et al., 1984) และชานิวเจอร์ซีย์ (New Jersey tea หรือ *Ceanothus americanus*) (Li, Cai and Wu, 1997) ด้วย

<u>สมุนไพร</u>

1. ข่อย

1.1 ข้อมูลทั่วไป

(เสงี่ยม พงษ์บุญรอด, 2493; สมพร (ภูติยานันท์) หิรัญรามเดช, 2524; วิทย์ เที่ยงบูรณะธรรม, 2531)

มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Streblus asper* Lour. อยู่ในวงศ์ Moraceae มีชื่อเรียกพื้นเมืองอื่น ๆ ว่า ส้มผ่อ ส้มพ่อ ส้มพล, สั้มพอ (เลย) ขอย (ภาคใต้) ขรอย ขันตา กักไม้ฝอย (ภาคเหนือ) ตองขะแน่ (กะเหรี่ยง) สะนาย (เขมร) ชื่ออื่น ๆ ที่รู้จัก ได้แก่ Bar-inca, Berrikka, Rudi, Sehwri, Sekut, Shakhotaka, Siamese rough bush, Tooth brush tree (Glasby, 1991) ข่อยเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง พบได้ในประเทศเขตร้อนทั่ว ๆ ไป ถิ่นกำเนิด คือ อินเดีย ศรีลังกา มาเลเซีย เวียดนาม ไทย จีนตอนใต้ และฟิลิปปินส์ ชอบขึ้นตามที่ลุ่มแฉะ เป็นไม้ที่ทนทานต่อดินฟ้าอากาศมาก

แต่เจริญเติบโตช้า นิยมนำมาปลูกเป็นรั้วบ้าน ใบข่อยมีขนาดเล็ก ลักษณะหนาแข็ง หยาบสากมือ ขอบใบหยักแบบซี่เลื่อย ดอกตัวผู้เป็นช่อกลมก้านสั้น สีเหลืองอมเขียว หรือเกือบขาว ดอกตัวเมียออกเป็นคู่ ก้านยาว สีเขียว ผลสุกมีสีเหลืองอ่อน เปลือกนอกฉ่ำน้ำและนิ่ม เมล็ด มีลักษณะเกือบกลม คล้ายเมล็ดพริกไทย เปลือกต้นข่อยมีรสเมา ข่อยขยายพันธุ์โดยการใช้เมล็ด

1.2 สรรพคุณ

(เสงี่ยม พงษ์บุญรอด, 2493; สมพร (ภูติยานันท์) หิรัญรามเดช, 2524; วิทย์ เที่ยงบูรณะธรรม, 2531)

ยาง มีน้ำย่อยที่มีคุณสมบัติย่อยน้ำนม ใช้เป็นยาฆ่าเชื้อ ยาแก้มือและเท้าแตก (Mukherjee and Roy, 1983)

เปลือกต้น ต้มน้ำ มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ ล้างแผล แก้โรคผิวหนัง ต้มกับเกลือ เป็นยาอมแก้รำมะนาด ทางอินเดีย ใช้ต้มรับประทานแก้โรคท้องร่วง เป็นไข้ ปวดฟัน เหงือกอักเสบ (Gaitonde, Vaz and Patel, 1964) ใช้มวนเป็นยาสูบ แก้ริดสีดวงจมูก ใช้ฆ่าเชื้อในช่องปากและทางเดินอาหาร นอกจากนี้ ยังใช้ทำสมุดข่อย สำหรับตำราโบราณต่าง ๆ ซึ่งมีความคงทนมาก ปลวกแมลงไม่กิน เก็บไว้ได้นานหลายร้อยปี

กิ่ง นำมาทุบใช้สีฟัน เพื่อฆ่าเชื้อในช่องปากและทำให้ฟันทน แข็งแรง

ใบ ใช้ขัดเครื่องครัวให้สะอาด ใช้แทนกระดาษทรายขัดไม้ และถูเมือกปลาไหลออกได้ดี นอกจากนี้ ยังนำมาคั่วชงดื่มแทนน้ำชา ช่วยระบายอ่อน ๆ บำรุงธาตุ เจริญอาหาร ขับผายลม แก้ปวดประจำเดือน

เมล็ด ใช้ผสมในยาอายุวัฒนะหลายตำรับ เจริญอาหาร ขับผายลม บำรุงธาตุ รักษาท้องขึ้น ท้องอืด ท้องเฟ้อ ฆ่าเชื้อในช่องปากและทางเดินอาหาร

ราก ใส่แผล รักษาบาดแผลให้หายเร็ว แก้พิษงู

เปลือกราก มีฤทธิ์เป็นยาบำรุงหัวใจ ใช้แก้ไข้ เป็นยาถ่าย แก้ปวดฟันและรำมะนาด

1.3 งานวิจัยทางวิทยาศาสตร์

มีผู้แยกสารคาร์ดิแอก ไกลโคไซด์ (cardiac glycoside) ซึ่งมีฤทธิ์บำรุงหัวใจ จากเปลือกรากของต้นข่อย ได้มากกว่า 20 ชนิด (Fiebig et al., 1985) และ Fiebig และคณะ (1985) ได้รายงานถึงสารคาร์ดิแอก ไกลโคไซด์ 2 ชนิดจากเปลือกต้นข่อย คือ strebloside และ mansonin

สำหรับงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสารสกัดจากใบข่อยและเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ ได้แก่ รายงานการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ (เทอดพงษ์ ตรีรัตน์ และบุญนิตย์ ทวีบูรณ์, 2530) รายงานการฆ่าเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ (Wongkham et al., 1996) และรายงานผลลดจำนวนเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ในน้ำลาย เมื่อใช้น้ำยาบ้วนปากที่ผสมสารสกัดจากใบข่อย (Taweechaisupapong et al., 2000)

2. ชา

2.1 ข้อมูลทั่วไป

(สมพร (ภูติยานันท์) หิรัญรามเดช, 2524; พเยาว์ เหมือนวงษ์ญาติ, 2529; วิทย์ เที่ยงบูรณะธรรม, 2531; สัณห์ ละอองศรี, 2535; วันดี กฤษณพันธ์, 2537)

มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Camellia sinensis* Ktze. อยู่ในวงศ์ Theaceae มีชื่อเรียกพื้นเมืองอื่น ๆ ว่า เมี่ยง, เมี่ยงป่า (ภาคเหนือ) ลาพ่ะ (กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน) ชื่อภาษาอังกฤษ คือ tea ชาเป็นไม้ขนาดย่อมถึงขนาดกลาง เป็นพืชในเขตอบอุ่น ชอบขึ้นในที่สูงตามภูเขา ต้องการน้ำมาก มีอายุยืน มีแหล่งกำเนิดแถบจีนใต้ แคว้นอัสสัม อินเดีย พม่า ไทย อินโดนีเซีย และอินโดจีน ใบ มีลักษณะหนา เหนียว รูปไข่ เป็นใบเดี่ยวออกสลับกัน ขอบใบหยักเล็ก ๆ เหมือนฟันเลื่อย คล้ายใบข่อย แต่ยาวและใหญ่กว่า ใบเขียวตลอดปี ดอก มีขนาดใหญ่ สีขาวนวล กลิ่นหอม เป็นดอกเดี่ยวหรือเป็นกระจุก คล้ายดอกส้มเขียวหวาน เป็นดอกสมบูรณ์เพศ ผล มีลักษณะเป็นกล่อง (capsule) ใน 1 ผลมีเมล็ดอยู่ภายในประมาณ 1-3 เมล็ด เมล็ด รูปร่างกลม ขนาดใหญ่ ชาขยายพันธุ์โดยการใช้เมล็ด การจำแนกพันธุ์ชา จัดแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มพันธุ์ คือ กลุ่มพันธุ์ชาอัสสัม กลุ่มพันธุ์ชาจีน และกลุ่มพันธุ์ชาเขมร

การจำแนกชนิดของชา โดยทั่วไปจะจำแนกตามกรรมวิธีในการผลิต สามารถแบ่งได้ 3 ประเภท คือ ชาเขียว หรือชาที่ไม่ผ่านการหมัก (green tea or non-fermented tea), ชากึ่งหมัก (semi-fermented tea) และ ชาดำ หรือชาหมัก (black tea or fermented tea) (Dan, 1986) ชาเขียวส่วนใหญ่ผลิตในประเทศจีนและญี่ปุ่น โดยนำใบชาที่เก็บจากต้นมาทำให้แห้งโดยเร็วที่สุด คือ นำมาคั่วที่ความร้อนไม่สูงนัก เพื่อทำลายเอนไซม์ที่มีอยู่ในใบชาให้หมดไป จะได้ไม่เกิดการหมัก (fermentation) ตัวอย่างเช่น ชาเขียวญี่ปุ่น ชากึ่งหมัก เป็นชาที่ผ่านการหมักใบชาสดระหว่างขั้นตอนการผลิตเพียงบางส่วน มีกลิ่นรสเฉพาะ เป็นที่นิยมอย่างกว้างขวาง บางครั้งจะมีการเพิ่มกลิ่นหอมของชา โดยการอบใบชาด้วยดอกมะลิ เรียกชาชนิดนี้ว่า ชามะลิ (jasmine tea) หรืออาจใช้ดอก

ประยงค์อบแทนก็ได้ ชากึ่งหมักมีหลายชนิด แต่ชนิดที่รู้จักกันมาก คือ ชาอู่ล่ง (oolong tea) ชาดำ บางครั้งคนไทยเรียกว่า ชาฝรั่ง ส่วนใหญ่ผลิตในประเทศอินเดียและศรีลังกา โดยนำใบชาที่เก็บมาได้กองสุมไว้เพื่อให้เกิดการหมัก พร้อมทั้งขยี้ใบเพื่อให้เซลล์แตก และเกิดการออกซิไดส์ (oxidation) ทั้งนี้เพื่อเร่งให้เกิดการหมักเร็วขึ้นด้วย หลังจากนั้น จึงนำไปทำให้แห้งโดยใช้ความร้อน

สารอินทรีย์ในใบชาที่พบในปริมาณสูง ได้แก่ สารโพลิฟีนอล โปรตีน คาเฟอีน (caffeine) และสารให้กลิ่น สารโพลิฟีนอลส่วนใหญ่ที่พบ ได้แก่ แทนนิน ซึ่งเป็นคำทั่วไปของสารโพลิฟีนอลที่สามารถจับกับโปรตีนได้ แทนนินในใบชาสามารถจำแนกได้ 4 กลุ่ม คือ คาเทชิน (catechins), ฟลาโวนอลและฟลาโวนอล ไกลโคไซด์ (flavonols and flavonol glycosides), ฟลาโวนและกรดฟีนอลลิก (flavones and phenolic acids) และเดพไซด์ (depsides) กลุ่มที่พบมากกว่า 80% คือ คาเทชิน ซึ่งจำแนกย่อยลงไปได้อีก 6 รูป (form) คือ epicatechin (EC), epicatechin gallate (ECG), epigallocatechin (EGC), epigallocatechin gallate (EGCG), catechin (C) และ gallocatechin (GC) สารคาเทชินที่พบในปริมาณสูงที่สุด คือ EGCG โดยพบได้ 9-13% และเป็นรูปที่มีประโยชน์ทางการแพทย์ (สัณห์ ละอองศรี, 2535)

2.2 สรรพคุณ

(สมพร (ภูติยานันท์) หิรัญรามเดช, 2524; พเยาว์ เหมือนวงษ์ญาติ, 2529; วิทย์ เที่ยงบูรณะธรรม, 2531; วันดี กฤษณพันธ์, 2537)

ใบ นำมาต้มเคี่ยวเอาน้ำกิน ช่วยกระตุ้นให้หายเหนื่อย กระชุ่มกระชวย และไม่ง่วงนอน มีฤทธิ์ขับปัสสาวะ แก้ท้องร่วง ร้อนใน ป้องกันการเป็นโรคกระเพาะ มีฤทธ์ฝาดสมาน รักษาอาการปวดเมื่อยตามร่างกาย บำรุงหัวใจให้ชุ่มชื่น คนทางเหนือนิยมเคี้ยวและอมใบเมี่ยง แทนการเคี้ยวหมากของคนภาคกลาง และช่วยดับกลิ่นปาก ป้องกันเชื้อโรค นอกจากนี้ ยังใช้ดับกลิ่นในโลงศพ หรือถูมือที่รับประทานอาหารมีกลิ่นติดมือ

ใบอ่อน นำมายำเป็นอาหาร

กาก ใช้พอกแผลไฟไหม้น้ำร้อนลวก

ดอก ทำเป็นเครื่องหอม

เมล็ด มีน้ำมันระเหยยาก (fixed oil) ใช้ทำเนยเทียม (magarine)

กากเมล็ด ใช้สระผม มีคุณสมบัติล้างสิ่งสกปรกได้ดี เนื่องจากมีสารซาโปนิน (saponin) และน้ำมันที่ติดมากับกาก ยังช่วยทำให้เส้นผมชุ่มชื้นเป็นมันเงางาม

2.3 งานวิจัยทางวิทยาศาสตร์

มีรายงานการศึกษาสารสกัดจากชาเขียวญี่ปุ่น ว่ามีผลป้องกันอาการเป็นพิษของตับ (antihepatotoxic effect) (Hikino et al., 1985) ป้องกันการเกิดมะเร็ง (Oguni et al., 1988) และเป็นสารแอนติออกซิแดนซ์ (antioxidant) (Okuda et al., 1983) นอกจากนี้ ยังมีผลต่อเชื้อแบคทีเรียในทางเดินอาหารด้วย (Ryu, 1980; Toda et al., 1989)

ส่วนการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับโรคฟันผุ มีผู้ศึกษากันอย่างกว้างขวาง Ramsey, Hardwick และ Tamacas (1975) ได้รายงานว่า ชามีผลป้องกันฟันผุในเด็ก Shyu, Meng และ Sun (1977) รายงานถึงผลลดฟันผุในหนูทดลองจากชาไต้หวัน ส่วน Elvin-Lewis, Vitale และ Kobjas (1980) และ Elvin-Lewis และ Steelman (1986) รายงานว่า ชาสามารถลดการเจริญเติบโต การยึดเกาะ และการเก็บสะสมโพลิแซคคาไรด์ของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ โดยคาดว่าเป็นผลจากสารแทนนินและฟลูออไรด์ ซึ่ง Rosen และคณะ (1984) ได้ทำการทดลองในหนู โดยใช้ชาที่มีปริมาณแทนนินและฟลูออไรด์ต่าง ๆ กัน พบว่า การยับยั้งฟันผุมีความสัมพันธ์กับปริมาณฟลูออไรด์ แต่ไม่สัมพันธ์กับแทนนิน อย่างไรก็ตาม Sakanaka และคณะ (1989) พบว่า ชาเขียวญี่ปุ่นสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ได้ โดยสารสำคัญออกฤทธิ์เป็นสารโพลิฟีนอล โดยเฉพาะสาร GC นอกจากนี้ Otake และคณะ (1991) ก็ได้ศึกษาผลของชาเขียวญี่ปุ่นเช่นกัน พบว่าสามารถยับยั้งการยึดเกาะและการสร้างกลูแคนของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ รวมทั้งการเกิดฟันผุในหนูทดลอง โดยสารสำคัญออกฤทธิ์ คือ EGCG และ ECG ผลของแทนนินต่อการลดฟันผุยังมีในรายงานการวิจัยอื่น ๆ อีกด้วย (Stralfors, 1967; Paolino, Kashket and Sparagna, 1980; Wolinsky and Sote, 1984; Kashket et al., 1985; Wu-Yuan et al., 1988) ขณะที่ Kubo, Muroi และ Himejima (1992) รายงานว่า สารให้กลิ่นในชาเขียวญี่ปุ่นเป็นสารออกฤทธิ์ในการลดฟันผุ นอกจากนี้ ยังมีรายงานอื่น ๆ ที่กล่าวถึงผลของสารสกัดจากชาเขียวญี่ปุ่นต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์เช่นกัน (Horiba et al., 1991; Saeki et al., 1993) สำหรับชาอู่ล่งนั้น พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ ยับยั้งเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส การผลิตกลูแคนชนิดไม่ละลายน้ำ และ การยึดเกาะกับผิวแก้วและไฮดรอกซีอะพาไทท์ รวมทั้งลดอัตราการสร้างกรดของเชื้อมิวแทนส์ สเตร็พโตคอคไค (Nakahara et al., 1993; Ooshima et al., 1993; Matsumoto et al., 1999) ส่วนการทดลองในหนู พบว่า ลดการเกิดฟันผุ และการสะสมของคราบจุลินทรีย์ (Ooshima et al., 1993) และเมื่อทดลองในมนุษย์ ก็สามารถลดการเกาะของคราบจุลินทรีย์ โดยไม่เปลี่ยนแปลงจำนวนของเชื้อในน้ำลาย (Ooshima et al., 1994) โดย Nakahara และคณะ (1993) กล่าวว่า ชาอู่ล่งและชาดำมีสารโพลิฟีนอลที่ไม่พบในชาเขียว สารดังกล่าวแสดงผลยับยั้งเอนไซม์กลูโคซิล

ทรานสเฟอเรสได้ดีมาก การที่ชาอู่ล่งและชาดำมีสารดังกล่าว น่าจะมาจากการเกิดขบวนการโพลิเมอร์ไรเซชั่น (polymerization) ของสารโพลิฟีนอลพวกคาเทชิน ระหว่างขบวนการหมักใบชา การทำงานของเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase) หรือ เพอร์ออกซิเดส (peroxidase) ในใบชาระหว่างการหมักทำให้สารโมโนเมอริค โพลิฟีนอล (monomeric polyphenol) กลายเป็นสารโพลิเมอริค โพลิฟีนอล (polymeric polyphenol) ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรสนั่นเอง (Hamada et al., 1996)

3. ชุมเห็ดเทศ

3.1 ข้อมูลทั่วไป

(สมพร (ภูติยานันท์) หิรัญรามเดช, 2524; วิทย์ เที่ยงบูรณะธรรม, 2531; วันดี กฤษณพันธ์, 2537; โครงการสมุนไพรเพื่อการพึ่งตนเอง, ศูนย์ข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2529)

มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Cassia alata* Linn. อยู่ในวงศ์ Leguminosae มีชื่อเรียกพื้นเมืองอื่น ๆ ว่า ชุมเห็ดใหญ่ (ภาคกลาง) ขี้คาก, ลับมืนหลวง,หมากกะลิงเทศ (ภาคเหนือ) ส้มเห็ด (เชียงราย) ตะสีพอ (กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน) จุมเห็ด (ภาคอีสาน) ตุ๊ยเฮียะเต่า, ฮุยวิจวบักทง (จีน) ชื่ออื่น ๆ ที่รู้จัก ได้แก่ Candle bush, Acapulco, Ringworm bush, Ringworm cassia, Candelabra bush, Seven-golden-candle stick ชุมเห็ดเทศเป็นไม้พุ่มขนาดกลาง สูงประมาณ 2-3 เมตร เป็นพืชพื้นเมืองของอเมริกาเขตร้อน พบขึ้นได้ทั่วไปในประเทศไทย ทั้งบนที่ราบและบนเขาสูง ชอบที่ชุ่มชื้น ไม่ชอบที่ร่ม ขึ้นได้ในดินทุกชนิด และไม่ต้องการการเอาใจใส่ ปลูกแล้วปล่อยทิ้งไว้ให้โตขึ้นเองได้ มักนิยมปลูกเป็นไม้ประดับ ใบ เป็นใบประกอบแบบขนนก ยาว 30-60 เซนติเมตร ใบย่อยเรียงเป็นคู่ 8-20 คู่ รูปไข่ โคนใบมน ปลายใบมนหรือเว้าเล็กน้อย ขอบใบเรียบเป็นสีแดง ดอก เป็นช่อสีเหลืองเข้ม ออกเป็นช่อใหญ่ คล้ายเทียนบูชาพระขนาดใหญ่ ก้านดอกสั้น เกสรตัวผู้มี 9-10 อัน เกสรตัวเมียมี 1 อัน ผล เป็นฝักยาวรูปบรรทัด มี 4 ปีก ฝักอ่อนสีเขียว ฝักแก่สีน้ำตาลดำและแตกตามยาว ฝักหนึ่งมี 50-60 เมล็ด เมล็ด แบนเป็นรูปสามเหลี่ยม สีน้ำตาลเข้มถึงดำ ผิวขรุขระ ชุมเห็ดเทศขยายพันธุ์โดยการใช้เมล็ด

ใบชุมเห็ดเทศมีคุณสมบัติเป็นยาระบาย เนื่องจากมีสารแอนทราควิโนน ไกลโคไซด์ (anthraquinone glycosides) ขณะเดียวกันก็มีสารแทนนิน ช่วยสมานแผล และป้องกันท้องร่วง นอกจากนี้ สารไกลโคไซด์ ยังมีฤทธิ์กระตุ้นหัวใจด้วย

3.2 สรรพคุณ

(สมพร (ภูติยานันท์) หิรัญรามเดช, 2524; วิทย์ เที่ยงบูรณะธรรม, 2531; วันดี กฤษณพันธ์, 2537; โครงการสมุนไพรเพื่อการพึ่งตนเอง, ศูนย์ข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2529)

ใบ ทาแก้กลาก เกลื้อน หิด โรคผิวหนัง ฝี แผลพุพองที่เป็นหนอง โรคน้ำกัดเท้า แก้กษัยเส้น ขับปัสสาวะ รักษากระเพาะปัสสาวะอักเสบ เป็นยาระบาย ถ่ายเสมหะ ทำให้หัวใจเป็นปกติ

ดอก ทำให้ผิวหนังดี มีสี ผุดผ่องเป็นยองใย และเป็นยาระบาย

ฝัก ใช้ผสมกับยารักษากลาก และเป็นยาขับพยาธิ

เมล็ด ใช้รักษาอาการท้องผูก รักษาโรคผิวหนัง ขับพยาธิ

ราก ใช้ผสมยาบำรุงธาตุ แก้ปัสสาวะเหลือง โรคตาเหลือง ใช้ต้มกินเป็นยารักษาตกมูกเลือด ทำให้เจริญอาหาร มีคุณสมบัติเป็นยารักษาหิดและสิว โรคผิวหนังทุกชนิด กลากเกลื้อน เป็นยาระบายท้อง รักษาท้องผูก ถ่ายเสมหะ รักษากษัยเส้นและขับปัสสาวะ ทำให้หัวใจเป็นปกติ

ต้น ใช้เป็นยารักษาคุดทะราด และกลากเกลื้อน รักษากษัยเส้น ขับพยาธิ และขับปัสสาวะ รักษาท้องผูก และทำให้หัวใจเป็นปกติ

ทั้งต้น ใช้ขับพยาธิในลำไส้ ถ่ายพิษ รักษาโรคผิวหนัง ถ่ายเสมหะ รักษาฟกบวม รักษาริดสีดวง ดีซ่าน และฝี

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี พบว่า ใบชุมเห็ดเทศประกอบด้วยสารสำคัญ 2 กลุ่ม (ทวีผล เดชาติวงศ์ ณ อยุธยา, 2532) คือ

ก. สารอนุพันธ์ของไฮดรอกซีแอนทราซีน (hydroxyanthracene derivatives) ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ในการเป็นยาระบาย (laxative properties) เช่น rhein, rhein-8-glucoside, emodin, aloe-emodin, chrysophanol และ physcione

ข. สารอนุพันธ์ของไฮดรอกซีแอนทราซีนซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อรา (fungicidal activities) เช่น aloe-emodin, emodin, rhein และ aloe-emodin anthrone

3.3 งานวิจัยทางวิทยาศาสตร์

จากการศึกษาองค์ประกอบในใบชุมเห็ดเทศ พบว่ามีสารแอนทราควิโนน (Hauptmann and Lacerda Nazario, 1950) สารฟลาโวนอยด์ (flavonoids) (Gupta and Singh,

1991) สารควิโนน (quinones) และสเทอรอล (sterols) (Mulchandani and Hassarajani, 1975) โดยการศึกษาผลของสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศ พบว่า สามารถทำลายเซลล์มะเร็งได้ (Belkin and Fitzgerald, 1952) เป็นยาระบาย (Rai, 1978) ลดน้ำตาลในเลือดในหนูทดลอง (Palanichamy, Nagarajan, and Devasagayam, 1988) มีฤทธิ์ต้านการอักเสบและแก้ปวด (Palanichamy and Nagarajan, 1990a) นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด (Dhawan et al., 1977; Fuzellier, Mortier and Lectard, 1982) แต่ยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับเชื้อก่อโรคฟันผุ

รายงานการวิจัยเกี่ยวกับชุมเห็ดเทศ ส่วนใหญ่มุ่งไปที่การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อรา โดย Dhawan และคณะ (1977) พบว่า สารสกัดจากชุมเห็ดเทศมีฤทธิ์ต้านเชื้อกลาก (dermatophytes) เช่นเดียวกับ Fuzellier และคณะ (1982) ที่พบว่า สารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศ สามารถฆ่าเชื้อกลาก เชื้อคริปโตคอคคัส (cryptococcus) และเชื้อแคนดิดา (candida) ได้ แต่มีความขัดแย้งกับงานวิจัยของ Palanichamy และ Nagarajan (1990b) ที่พบว่า สารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศสามารถฆ่าเชื้อกลาก แต่ไม่มีผลต่อเชื้อแคนดิดา ซึ่งตรงกับ Ibrahim และ Osman (1995) ที่ศึกษาสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศในประเทศมาเลเซีย พบว่า มีฤทธิ์ต้านเชื้อกลาก แต่ไม่มีผลต่อแบคทีเรียและยีสต์ (แคนดิดาและคริปโตคอคคัส) และ รัชชพิน ศรีสัจจะลักษณ์ และคณะ (2539) ที่พบว่า สารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ (*Candida albicans*)

ส่วนการทดลองในมนุษย์ มีรายงานการรักษาโรคกลากโดยใช้ครีมชุมเห็ดเทศ (สุทธิศักดิ์ จารุธนเศรษฐ์, เพชรรัตน์ สายสุวรรณ และ นิตยา นามด้วง, 2535) และการรักษาโรคเกลื้อนโดยสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศ (Damodaran and Venkataraman, 1994)

4. ฟ้าทะลายโจร

4.1 ข้อมูลทั่วไป

(พเยาว์ เหมือนวงษ์ญาติ, 2529; วิทย์ เที่ยงบูรณะธรรม, 2531; วันดี กฤษณพันธ์, 2537; โครงการสมุนไพรเพื่อการพึ่งตนเอง, ศูนย์ข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2529)

มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Andrographis paniculata* Nees. อยู่ในวงศ์ Acanthaceae มีชื่อเรียกพื้นเมืองอื่น ๆ ว่า ฟ้าทะลาย, น้ำลายพังพอน (กรุงเทพ) เมฆทะลาย (ยะลา) ฟ้าสะท้าน (พัทลุง) หญ้ากันงู (สงขลา) ฟ้าสาง (พนัสนิคม) เขยตายยายคลุม (โพธาราม) สามสิบดี (ร้อยเอ็ด) ขุนโจรห้าร้อย ชี้กระเช้า คีปังฮี, ชวงชิมน้อย, เจ็กเกี้ยงฮี่, โข่งเช่า, ซี้บังกี่, ชวนชินเหลียน (จีน) ชื่อ

อื่น ๆ ที่รู้จัก ได้แก่ The Creat, Creyat root, Halviva, Kariyat, Green Chiretta, Kreat, Kalmegh ฟ้าทะลายโจรเป็นไม้ล้มลุก ลำต้นตรง ตระกูลเดียวกับต้อยติ่ง เหงือกปลาหมอ และทองพันชั่ง สูงประมาณ 1-2 ฟุต แตกกิ่งก้านออกด้านข้าง เป็นไม้กลางแจ้ง ปลูกง่ายมาก ขึ้นได้ในดินทุกชนิด และปลูกได้ทุกฤดูกาล พบขึ้นอยู่ตามป่าดงดิบ ป่าสน ป่าก่อ ป่าเต็งรัง ตามริมถนน และมีปลูกตามบ้านทั่วไป ใบ เป็นใบเดี่ยว ออกตรงข้ามกันเป็นคู่ ๆ รูปร่างยาวรี โคนใบแหลม ผิวใบเป็นมันสีเขียว ขอบใบเรียบหรือหยักเล็กน้อย มีรสขม ดอก ออกเป็นช่อ ขนาดเล็ก สีขาวอมม่วง มีรอยกระ ลักษณะเป็นหลอด เกสรตัวผู้มี 2 อัน ช่อเกสรตัวเมียเรียวยาว ผล เป็นฝักสีเขียวอมน้ำตาล ปลายแหลม คล้ายผลต้อยติ่ง แต่เล็กและสั้นกว่า ฝักแก่แตกออกเป็น 2 ซีก ภายในมีหลายเมล็ด เมล็ด แบน สีเหลืองถึงน้ำตาลเข้ม ค่อนข้างโปร่งแสง ฟ้าทะลายโจรขยายพันธุ์โดยการใช้เมล็ด

ฟ้าทะลายโจรเป็นสมุนไพรที่ใช้กันแพร่หลายในทวีปเอเชีย ทั้งในประเทศจีน ฮ่องกง ชวา และอินเดีย โดยเฉพาะในจีน มีปรากฏในเภสัชตำรับในชื่อ ชวนซินเหลียน และมีการสกัดออกมาใช้เป็นยาแผนปัจจุบันหลายรูปแบบ เช่น ยาเม็ด ยาน้ำ ยาฉีด หรือผสมในขวดน้ำเกลือ ตัวอย่างยาเม็ดของจีน ได้แก่ Kang yan tablets, Chuanxinlian tablets และ Chuanxinlian antiphlogistic pill สำหรับยาฉีด มีชื่อว่า Yamdepieng และ Chuanxinlian ruangas injection ส่วนในประเทศไทย ฟ้าทะลายโจรจัดเป็นสมุนไพรชนิดหนึ่งในโครงการสาธารณสุขมูลฐาน ซึ่งเน้นให้ชาวบ้านดูแลสุขภาพด้วยตนเอง

4.2 สรรพคุณ

(พเยาว์ เหมือนวงษ์ญาติ, 2529; วิทย์ เที่ยงบูรณะธรรม, 2531; วันดี กฤษณพันธ์, 2537; โครงการสมุนไพรเพื่อการพึ่งตนเอง, ศูนย์ข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2529)

ใบ แก้บิดชนิดติดเชื้อ แก้ทางเดินอาหารอักเสบ แก้หวัด ทอนซิลอักเสบ เจ็บคอ ขับเสมหะ แก้ปอดอักเสบ และแก้อาการท้องเดิน

ทั้งต้นบนดิน แก้ไข้ บิด ท้องเสีย เป็นยาบำรุง รักษาฝีหนอง แผลไฟไหม้น้ำร้อนลวก แผลบวมอักเสบ แก้งูสวัดและเริม

4.3 งานวิจัยทางวิทยาศาสตร์

การศึกษาสารประกอบทางเคมีของใบฟ้าทะลายโจร พบสารไดเทอร์ปีนอยด์ แลค

โตน (diterpenoid lactone) ได้แก่ แอนโดรกราโฟไลด์ (andrographolide) ซึ่งทำให้ฟ้าทะลายโจรมีรสขม (Chakravarti and Chakrevarti, 1952; Moktader and Guha-Sircar, 1993) ส่วนการศึกษาในต้นฟ้าทะลายโจร พบสารนีโอแอนโดรกราโฟไลด์ (neoandrographolide) (Chan, Taylor and Willis, 1968; Chan et al., 1971) สำหรับสารไดเทอร์ปีนอยด์อื่น ๆ ที่พบ ได้แก่ deoxyandrographolide, panicolide, 14-deoxy-19-oxoandrographolide, 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide, 14-deoxy-11,12-oxoandrographolide, 14-deoxy-12-methoxyandrographolide, 14-deoxy-19-β-D-glucoside (Weiming and Xiaotian, 1982; Fujita et al., 1984) นอกจากสารประกอบแลคโตนแล้ว ในฟ้าทะลายโจรยังมีสารประกอบฟลาโวน ได้แก่ andrographin, panicolin, mono-o-methylwigtin, apigenin-7,4-dimethylether และ 5-hydroxy-3,7,8,2'-tetramethoxyflavone (สำนักงานคณะกรรมการสาธารณสุขมูลฐาน, 2529; Tang and Eisenbrand, 1992) สารฟลาโวนนี้จะพบในรากเป็นส่วนใหญ่ ในการศึกษาวิจัยทางเภสัชวิทยาและผลการรักษาทางคลินิก มักให้ความสำคัญกับแลคโตน โดยเฉพาะแอนโดรกราโฟไลด์ มากกว่าฟลาโวน ซึ่งยังมีรายงานการวิจัยน้อย

การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของฟ้าทะลายโจร พบว่า มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ บวม (Tajuddin, Shalid and Tariq, 1984; เสาวภา ลิมป์พานิชกุล, 2533;กมล สวัสดีมงคล และคณะ, 2534) มีสรรพคุณเป็นยารักษาแผลในกระเพาะอาหาร และลำไส้อักเสบ (ศิริมา พรสุวัฒนกุล, 2532; Viswanatiian et al., 1981) มีฤทธิ์ลดไข้ (กมล สวัสดีมงคล และคณะ, 2534; Thamlikitkul et al., 1991) มีผลทำให้หัวใจเต้นช้าลง และลดความดันโลหิต (กมล สวัสดีมงคล และคณะ, 2534; Nazimudeen, Ramaswamy and Kameswaran, 1978) ใช้แก้โรคบิด ท้องร่วง เนื่องจากมีผลลดการบีบตัวของลำไส้เล็ก (โสภิต ธรรมอารี และคณะ, 2528; กมล สวัสดีมงคล และคณะ, 2534; ปัญจางค์ ธนังกูล และ ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ, 2528) มีฤทธิ์ฆ่าพยาธิได้ (โครงการสมุนไพรเพื่อการพึ่งตนเอง, ศูนย์ข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2529) นอกจากนี้ ยังมีฤทธิ์ในการป้องกันสารพิษหรือยาต่าง ๆ ต่อตับ (วันดี อุดมอักษร, 2536; พรเพ็ญ เปรมโยธิน, พรพิมล กิจสนาโยธิน และ ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ, 2538; Choudhury, 1978; Choudhury and Poddar, 1983; Choudhury, 1984; Choudhury, Haque and Poddar, 1987; Handa, 1990; Handa and Sharma, 1990; Shukla et al., 1992) ส่วนการศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสแตพฟิโลคอคคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*) ที่ทำให้เกิดหนอง, เอสเชอริเชีย โคไล (*Escherichia coli*), เบซิลลัส สับทิลิส (*Bacillus subtilis*), โปรเตียส วัลการิส (*Proteus vulgaris*) (George and Pandalai, 1949; Joshi and Magar, 1952; Nakanishi et al., 1965) และเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคอุจจาระร่วงอื่น ๆ เช่น ซัลโมเนลลา เครเฟล (*Salmonella*

krefeld), ซัลโมเนลลา ไทฟี (*Salmonella typhi*), วิบริโอ คลอเรลา (*Vibrio cholerae*), ชิเจลลา ไดเซนเทเรียอี (*Shigella dysenteriae*) (ธิดารัตน์ ปลื้มใจ, 2535) ส่วนจริยา สินเดิมสุข (2536) รายงานผลต้านเชื้อในกลุ่มซัลโมเนลลา แต่ไม่มีผลต่อเชื้อกลุ่มชิเจลลา นอกจากนี้ ปัญจางค์ ธนังกูล และชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ (2528) ยังรายงานว่า ฟ้าทะลายโจรมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อบิดจากแบคทีเรียพวกชิเจลล่า ได้ดีกว่าการใช้ยาเตตราซัยคลิน (Tetracycline) ด้วย

สำหรับงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเชื้อก่อโรคฟันผุ มีรายงานของชลธิชา อมรฉัตร และคณะ (2534) ว่าสารสกัดจากต้นฟ้าทะลายโจร มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตร็พโตคอคคัสมิวแทนส์

5. ฝรั่ง

5.1 ข้อมูลทั่วไป

(สมพร (ภูติยานันท์) หิรัญรามเดช, 2524; พเยาว์ เหมือนวงษ์ญาติ, 2529; วันดี กฤษณพันธ์, 2537; โครงการสมุนไพรเพื่อการพึ่งตนเอง, ศูนย์ข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2529)

มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Psidium guajava* Linn. อยู่ในวงศ์ Myrtaceae มีชื่อเรียกพื้นเมืองอื่น ๆ ว่า มะก้วย, มะก้วยกา, มะมั่น (ภาคเหนือ) บักสีดา (ภาคอีสาน) มะสีดา (ภาคตะวันออก) สีดา (นครปฐม) ย่าหมู, ยามู (ภาคใต้) มะปุ่น (สุโขทัย, ตาก) มะแกว (แพร่) จุ่มโป (สุราษฎร์ธานี) ชมพู (ปัตตานี) ชื่ออื่น ๆ ที่รู้จัก ได้แก่ Guava, Psidium, Guayaba, Djambu bidji, Abas, Amrood, Motiram, Goiabeira (Pery, 1980) ฝรั่งเป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็กถึงกลาง เป็นไม้พื้นเมืองของเปรู แต่ได้นำมาปลูกในประเทศทั่ว ๆ ไปที่มีอากาศร้อน ใบ เป็นใบเดี่ยว ออกเป็นคู่ตรงกันข้าม รูปร่างรี ปลายใบและโคนใบค่อนข้างมน ดอก ออกเป็นช่อ ๆ ละ 2-4 ดอก กลีบดอกสีขาว ร่วงง่าย เกสรตัวผู้มีจำนวนมาก ผล ผลดิบมีสีเขียวและแข็ง รสฝาด ผลสุกมีสีเขียวอ่อนปนเหลือง นิ่ม มีกลิ่นเฉพาะ มีเมล็ดมาก เมล็ด สีน้ำตาล แข็ง ฝังอยู่ตรงกลางของเนื้อผลที่มีสีขาว ฝรั่งขยายพันธุ์โดยการใช้เมล็ด ฝรั่งมีหลายชนิด แต่ละชนิดมีรูปร่างและขนาดแตกต่างกันไป เป็นผลไม้ที่นิยมรับประทานกันโดยทั่วไป

5.2 สรรพคุณ

(สมพร (ภูติยานันท์) หิรัญรามเดช, 2524; พเยาว์ เหมือนวงษ์ญาติ, 2529; วันดี กฤษณพันธ์, 2537; โครงการสมุนไพรเพื่อการพึ่งตนเอง, ศูนย์ข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2529)

<u>เปลือกราก เปลือกต้น</u> ใช้แก้ท้องร่วงท้องเดิน สมานแผล แก้เหงือกบวม แก้บิดมูกเลือด

<u>ใบ</u> ใช้รับประทานแก้ท้องร่วงที่ไม่รุนแรง นำมาคั้นเอาน้ำ ใช้ล้างแผล ฆ่าเชื้อ ทำให้แผลหายเร็ว ดูดหนอง ดูดน้ำเหลือง มีน้ำมันหอมระเหย ใช้เคี้ยวระงับกลิ่นปาก ฆ่าเชื้อในปาก ดับกลิ่นสุรา ดับกลิ่นในตู้เย็นและตู้กับข้าว ดับกลิ่นในโลงศพ แก้แพ้ยุง ทางอินเดียใช้แก้ไอ (Khan and Ahmad, 1985)

<u>ผล</u> ผลดิบมีสารแทนนิน ช่วยแก้ท้องเดิน รักษาโรคกระเพาะลำไส้ แก้บิดมูกเลือด ผลสุกเป็นยาระบายอ่อน ๆ ช่วยดูดกลิ่น ดับกลิ่นปาก รักษาเสมหะให้มีปริมาณและความเหนียวพอเหมาะ มีวิตามินซีสูง ใช้ป้องกันรักษาโรคลักปิดลักเปิด และใช้ทำเป็นเครื่องดื่มได้ นอกจากนี้ ยังใช้ในอุตสาหกรรมทำเยลลี เนื่องจากมีสารเพกติน (pectin)

5.3 งานวิจัยทางวิทยาศาสตร์

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในใบฝรั่ง พบสารหลายชนิด ได้แก่ เซกุยเทอร์ปีน (seguiterpene), ไตรเทอร์ปีน (triterpene), ฟลาวานอยด์ (flavanoid), อัลเคน (alkane), เบนซินอยด์ (benzenoid), อัลคาลอยด์ (alkaloid) และ แทนนิน โดยแทนนินอาจเป็นสารออกฤทธิ์ในการต้านเชื้อ เนื่องจากสามารถทำให้เกิดการจับตัวของโปรตีน (protein coagulation) ได้ (Osman, Younes and Sheta, 1974; Mishra and Misra, 1981) นอกจากนี้ ยังมีน้ำมันหอมระเหยชนิดต่าง ๆ ด้วย (Smith and Siwatibau, 1975)

มีรายงานว่าน้ำฝรั่งมีผลลดน้ำตาลในเลือด ทั้งในหนูทดลองและในมนุษย์ (Collier and van de Piji, 1949; Cheng and Yang, 1983) Jaiarj และคณะ (1999) ได้รายงานฤทธิ์แก้ไอของสารสกัดจากใบฝรั่งในหนูทดลอง ส่วนฤทธิ์ต่อเชื้อโรคนั้น มีรายงานว่า สารสกัดจากฝรั่งมีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราบางชนิด (Collier and van de Piji, 1949; Malcolm and Sofowora, 1969; Dhawan et al., 1977) รวมทั้งเชื้อไวรัส (Simons, Swidler and Moss, 1963) นอกจากนี้ ยังมีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของแมลง (Prabhu and John, 1975) และมีรายงานว่า สารสกัดจากใบฝรั่ง สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคท้องร่วงได้ (Gritsanaphan

and Chulasiri, 1983) ปัญจางค์ ธนังกูล และ ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ (2530) ได้ทดลองใช้สารสกัดจากใบฝรั่งในการรักษาอาการท้องร่วงในผู้ป่วย พบว่า มีผลลดอาการได้ ส่วนจริยา สินเดิมสุข, สม เกียรติ ดีกิจเสริมพงศ์ และ วีณา จารุปรีชาชาญ (2532) ได้เปรียบเทียบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียในโรคอุจจาระร่วง ระหว่างใบฝรั่งกับเปลือกมังคุด พบว่า ใบฝรั่งให้ผลดีกว่า นอกจากนี้ สารสกัดจากใบฝรั่งยังมีฤทธิ์ต้านเชื้อสแตพฟิโลคอคคัส ออเรียสด้วย

สำหรับงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับโรคในช่องปาก Kraivaphan, Amornchat และ Triratana (1992) รายงานว่าสารสกัดจากใบฝรั่ง สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์, แบคทีรอยดีส จิงจิวาลิส (*Bacteroides gingivalis*) และ แอคติโนเบซิลลัส แอคติโนมัยซีเต็มโคมิแทนส์ (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*) ได้ และจากการทดลองใช้น้ำยาบ้วนปากที่ผสมสารสกัดจากใบฝรั่งในมนุษย์ พบว่า สามารถลดการอักเสบของเหงือก การเกิดคราบจุลินทรีย์ และบริเวณที่มีความรุนแรงของโรคได้ (Kraivaphan et al., 1991; Kraivaphan et al., 1994)

6. **สีฟันคนทา**

6.1 ข้อมูลทั่วไป

(เสงี่ยม พงษ์บุญรอด, 2493; พยอม ตันติวัฒน์, 2521; วิทย์ เที่ยงบูรณะธรรม, 2531)

มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Harrisonia perforata* Merr. อยู่ในวงศ์ Simaroubaceae มีชื่อเรียกพื้นเมืองอื่น ๆ ว่า คนทา (ภาคกลาง) ไม้จี้, หนามจี้ (ภาคเหนือ) สีฟัน กะลันทา สีฟันคนทาเป็นไม้พุ่มขนาดย่อม สูง 3-4 เมตร เป็นพืชเขตร้อน พบในพม่า ชวา ฟิลิปปินส์ ทางตะวันออกเฉียงใต้ของจีน และไทย เป็นไม้ขึ้นเองตามป่าราบทั่วไปทุกภาค กิ่ง มีหนามแหลมคม ตามต้นและกิ่งก้านตลอดต้น ใบ เป็นใบรวมรูปขนนก ลักษณะเป็นช่อแบนยื่นออกไป และมีใบขวางเป็นตอน ๆคู่ตรงกันข้าม ใบย่อยเป็นรูปไข่ มีครีบที่ก้านใบ ใบอ่อนมีสีแดง ดอก มีสีขาว ผล ลักษณะกลม ฉ่ำน้ำ ราก มีรสขม

6.2 สรรพคุณ

(เสงี่ยม พงษ์บุญรอด, 2493; พยอม ตันติวัฒน์, 2521)

ราก ใช้ต้มกิน แก้ไข้ทุกชนิด

เปลือกราก ทำยาต้ม แก้ท้องร่วงและโรคลำไส้

เปลือก ต้มเคี่ยวเอาน้ำพ่นตาสัตว์ แก้ตาเจ็บ
กิ่งอ่อน เอามาทุบเป็นฝอย ใช้เป็นไม้สีฟัน

6.3 งานวิจัยทางวิทยาศาสตร์

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของไม้สีฟันคนทา พบสารไลโมนอยด์ (limonoid) และโครโมน (chromone) (Tanaka et al., 1995) ในใบสีฟันคนทา พบสารพวกไลโมนอยด์ (Byrne et al., 1991; Sung et al., 1995; Khuong-Huu et al., 2000) ในเปลือก พบสารพวกควอสซินอยด์ (quassinoid) (Kamiuchi et al., 1996) และการทดสอบสารสกัดจากกิ่งสีฟันคนทา พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ และ แอคติโนเบซิลลัส แอคติโนมัยซีเต็มโคมิแทนส์ ได้ (Tandhachoon et al., 1993)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

วัสดุ อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

วัสดุ

1. เชื้อแบคทีเรียสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25175 (American Type Culture Collection, U.S.A.) และ สายพันธุ์ TPF-1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากคนไทย

   เพาะเลี้ยงบนไมติส ซาไลวาเรียส อะการ์ (mitis-salivarius agar) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการถ่ายเชื้อใหม่ทุก ๆ เดือน และส่วนหนึ่งเก็บรักษาในกลีเซอรีน 50% (glycerine) ที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส ซึ่งจะนำมาใช้เมื่อถ่ายเชื้อบนไมติส ซาไลวาเรียสครบทุก 20 ครั้ง เพื่อป้องกันการกลายพันธุ์ของเชื้อ
2. ทริปติค ซอย บรอธ (tryptic soy broth; Mikrobiologie; Merck, Germany)
3. สมุนไพร ได้แก่ ข่อย (*Streblus asper*) ชา (*Camellia sinensis*) ชุมเห็ดเทศ (*Cassia alata*) ฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*) ฝรั่ง (*Psidium guajava*) สีฟันคนทา (*Harrisonia perforata*)

ชนิดของสมุนไพร	ส่วนที่ใช้	แหล่งที่มา
ข่อย	ใบ	ซื้อจากร้านขายยาสมุนไพร ในรูปผงบดแห้ง
ชา	ใบ	ใบชาสำเร็จรูป ยี่ห้อชาระมิงค์ นำมาบดเป็นผง
ชุมเห็ดเทศ	ใบ	ซื้อจากร้านขายยาสมุนไพร ในรูปผงบดแห้ง
ฟ้าทะลายโจร	ต้น	ซื้อจากร้านขายยาสมุนไพร ในรูปผงบดแห้ง
ฝรั่ง	ใบ	ใบสด ล้างสะอาด ตากแห้ง นำมาบดเป็นผง
สีฟันคนทา	กิ่ง	ซื้อจากร้านขายยาสมุนไพร ในรูปผงบดแห้ง

4. เอธานอล (ethanol)
5. โพแทสเซียม ไดไฮโดรเจน ฟอสเฟต (potassium dihydrogen phosphate; Riedel; Riedel-de Haen AG, Germany)
6. โพแทสเซียม ไฮโดรเจน ฟอสเฟต (potassium hydrogen phosphate; Merck; E.Merck, Germany)
7. โพแทสเซียม คลอไรด์ (potassium chloride; Riedel; Riedel-de Haen AG, Germany)
8. แคลเซียม คลอไรด์ (calcium chloride; Riedel; Riedel-de Haen AG, Germany)
9. แมกนีเซียม คลอไรด์ (magnesium chloride; Merck; E.Merck, Germany)
10. ไกลซีน (glycine; BDH; BDH Laboratory Supplies, England)
11. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide; Merck; E.Merck, Germany)
12. ทริปซิน (trypsin 1:250; Sigma; Sigma Chemical Co., U.S.A.)
13. โบวายน์ ซีรัม อัลบูมิน (bovine serum albumin; Sigma; Sigma Chemical Co., U.S.A.)
14. ซูโครส (Microbiologie; Merck, Germany)
15. ซูโครสติดฉลากสารรังสี (sucrose [glucose-^{14}C(u)]; Dupont; NEN Products, U.S.A.)
16. ไทมิดีนติดฉลากสารรังสี (thymidine–(methyl–^{3}H); Sigma; Sigma Chemical Co., U.S.A.)
17. กลูแคน ที 2000 (glucan T-2000; Sigma; Sigma Chemical Co., U.S.A.)
18. แอมโมเนียม ซัลเฟต (ammonium sulfate; Riedel; Riedel-de Haen AG, Germany)
19. ลิควิดซินทิลแลนท์ (liquid scintillant; Wallac, OptiPhase “HiSafe”; Fisons Chemicals, England)
20. เม็ดไฮดรอกซีอะพาไทท์ (hydroxyapatite beads Bio-Gel® HTP Gel; Bio-Rad; Bio-Rad Laboratories, U.S.A.)
21. กระดาษกรองเบอร์ 1 และ 42 (Whatman; Whatman International Ltd., England)
22. แผ่นกรองเชื้อแบคทีเรีย (membrane filter) ขนาดรู 0.22 ไมโครเมตร (Acrodisc; Gelman Sciences, U.S.A.)
23. กลาสไมโครไฟเบอร์ฟิลเตอร์ (glass microfibre filter) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.4เซนติเมตร (Whatman; Whatman International Ltd., England)
24. ถุงไดอะไลซิส (dialysis bag; Spectrapor; Spectrum Medical Industries Inc., U.S.A.)

<u>อุปกรณ์</u>

1. ตู้อบแห้งสูญญากาศ (vacuum-drying oven; Dibl.-Ing.W.Ehert, VTS 70; Dibl.-Ing.W.Ehert Gmbh, Germany)
2. ภาชนะดูดความชื้น (desiccator)
3. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (autoclave; Rexall, LS-2D; Rexall Industries Co. Ltd., Taiwan)
4. ตู้ปฏิบัติการปลอดเชื้อ (laminar air flow; Forma Scientific, B.H.A.120; Forma Scientific, U.S.A.)
5. ตู้อบเชื้อที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ (infrared CO_2 incubator; Forma Scientific, 3194; Forma Scientific, U.S.A.)
6. เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer; Shimadzu, UV-1201 V; Shimadzu Corporation, Japan และ Bausch & Lomb, spectronic 21; Milton Roy Company, U.S.A.)
7. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (waterbath; Heto, DT-CB 22-20e; Heto Lab Equipment A/S, Denmark และ Stuart Scientific, SWB; Stuart Scientific Co.Ltd., UK)
8. เครื่องสั่นไฟฟ้า (vortex; Genie 2; Scientific Industries, U.S.A.)
9. เครื่องเหวี่ยง (centrifuge; Sigma, 101; Western Germany)
10. เครื่องเหวี่ยงขนาดเล็ก (microcentrifuge; Hero lab, Microcen 13; Hero lab GmbH, Germany)
11. เครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง (high speed centrifuge; Sorvall, Super T 21; Dupont Company, U.S.A.)
12. เครื่องเขย่า (shake 'n' stack hybridization oven; Hybaid, HBOVCST220; Hybaid Limited, UK)
13. ตู้แช่แข็ง (freezer; Revco, ULT 1340-7-VBA; Revco Scientific Inc., U.S.A.)
14. เครื่องวัดรังสีเบต้า (liquid scintillation counter; Wallac, 1414 Winspectral; Wallac Oy, Finland)
15. ชุดกรอง (Millipore, OM 037; Millipore Corporation, U.S.A.)
16. กล้องจุลทรรศน์พร้อมกล้องถ่ายรูป (Olympus, BH2 and Olympus, O-35A; Olympus Optical Company Limited, Japan)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การสกัดสมุนไพร

นำผงสมุนไพร ใส่ในภาชนะแก้วที่มีฝาปิด แช่ด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมตามเวลาที่กำหนด ในอัตราส่วน 100 กรัม ต่อ ตัวทำละลาย 1 ลิตร ระหว่างที่แช่นี้กวนวันละหลาย ๆ ครั้ง โดยข่อย แช่ในเอธานอล 50% เป็นเวลา 7 วัน (Wongkham et al., 1996) ชา แช่ในเอธานอล 50% เป็นเวลา 1 วัน (Ooshima et al., 1993) นอกนั้น แช่ในเอธานอล 95% เป็นเวลา 7 วัน (Kraivaphan et al., 1992; Tandhachoon et al., 1993; ชลธิชา อมรฉัตร และคณะ, 2534; รัชชพิน ศรีสัจจะลักษณ์ และคณะ, 2539) เมื่อครบเวลา กรองด้วยกระดาษกรอง เก็บส่วนที่เป็นของเหลวไว้ นำของเหลวที่ได้ไปต้มและระเหยเอาตัวทำละลายออก อบสารสกัดที่ได้ในตู้อบแห้งสูญญากาศ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกว่าน้ำหนักของสารเปลี่ยนแปลงไม่เกิน 1% ภายในเวลา 1 เดือน เก็บสารสกัดที่ได้ไว้ในภาชนะดูดความชื้น ณ อุณหภูมิห้อง

2. การเตรียมสารสกัดเพื่อทดสอบ

ในการเตรียมสารสกัดสำหรับการทดลองแต่ละหัวข้อ จะละลายสารสกัดในตัวทำละลายเดิมให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายโดยน้ำหนักต่อปริมาตร (w/v) ตามที่ต้องการในแต่ละการทดลอง แล้วทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านแผ่นกรองเชื้อแบคทีเรีย เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

เพาะเลี้ยงเชื้อในทริปติค ซอย บรอธ ในตู้อบเชื้อที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วปรับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร จนได้เท่ากับ 0.7 ซึ่งคิดเป็นจำนวนเชื้อประมาณ 3×10^8 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร (CFU/ml) สำหรับเชื้อแบคทีเรียติดฉลากสารรังสี จะเลี้ยงเชื้อในทริปติค ซอย บรอธที่ผสมไทมิดีนติดฉลากสารรังสี 10 ไมโครคิวรี่ต่อมิลลิลิตร (μCi/ml) ในตู้อบเชื้อที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำส่วนเซลล์ที่ได้มาล้างด้วยบัฟเฟอร์ โพแทสเซียม คลอไรด์ 2 ครั้ง แล้วแขวนลอยในบัฟเฟอร์ โพแทสเซียม คลอไรด์ที่มีโบวายน์ ซีรัม อัลบูมิน 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4. <u>การทดสอบผลการยับยั้งการยึดเกาะกับผิวแก้ว</u> (ดัดแปลงจากวิธีการของ Hamada และคณะ, 1981)

เตรียมเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 200 ไมโครลิตร (ตามข้อ 3.1) ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีฝาปิด ซึ่งมีทริปติค ซอย บรอธ ผสมซูโครส ปริมาตร 800 ไมโครลิตร โดยความเข้มข้นสุดท้ายของซูโครสเป็น 1% และ สารสกัดจากสมุนไพร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร โดยความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5 % นำไปเพาะเลี้ยงในตู้อบเชื้อที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยเอียงหลอด 30 องศา (หลอดที่ 1) เมื่อครบเวลา ถ่ายสารทั้งหมดในหลอดที่ 1 ไปใส่หลอดเปล่า (หลอดที่ 2) เติมโพแทสเซียม ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (0.05 โมลาร์ พีเอช 6.8) 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่ 1 เขย่าเบา ๆ เทใส่หลอดที่ 2 รวมกับของเดิม จะได้ส่วนของเซลล์ที่ไม่ยึดเกาะกับผิวแก้ว สำหรับหลอดที่ 1 ซึ่งมีเซลล์ที่ยึดเกาะกับผิวแก้วนั้น ทำให้หลุดออกโดยใส่ทริปซิน 0.25% 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วสั่นด้วยเครื่องสั่นไฟฟ้า จะได้ส่วนของเซลล์ที่ยึดเกาะกับผิวแก้ว จากนั้น นำหลอดทั้งสองไปปั่นแยกเซลล์ ที่ความเร็ว 3500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติมโพแทสเซียม ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (0.05 โมลาร์ พีเอช 6.8) เพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ใช้ค่าการดูดกลืนแสงของหลอดซึ่งมีเซลล์ที่ยึดเกาะกับผิวแก้ว มาคำนวณเป็นเปอร์เซนต์การยึดเกาะ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม*** และคัดเลือกชนิดของสมุนไพรที่ให้ผลยับยั้ง โดยมีเกณฑ์อย่างน้อย 50% เพื่อทำการทดสอบในข้อ 5 ต่อไป

*** กลุ่มควบคุม มี 2 หลอด ได้แก่ ก. ใส่น้ำกลั่น แทนสารสกัดจากสมุนไพร

ข. ใส่ตัวทำละลาย แทนสารสกัดจากสมุนไพร

หมายเหตุ : แต่ละตัวอย่างทำซ้ำ 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย

5. <u>การทดสอบฤทธิ์การฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ</u>

เตรียมสารสกัดจากสมุนไพรให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5% ผสมสารสกัดจากสมุนไพร 10 ไมโครลิตร กับ เชื้อแบคทีเรีย 200 ไมโครลิตร และ ทริปติค ซอย บรอธ 800 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวไปเจือจาง ดูดมา 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนไมติส ซาไลวาเรียสอะการ์เป็นเวลา 2 วัน เพื่อตรวจสอบว่ามีโคโลนีของเชื้อขึ้นบนอะการ์หรือไม่ หากไม่มี แสดงว่า สารสกัดจากสมุนไพรมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งจะต้องทดสอบใหม่ที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่า 0.5% และเลือกความเข้มข้นของสมุนไพรที่มากที่สุดที่ไม่มีผลฆ่าเชื้อ มาทำการทดสอบในข้อ 6 ต่อไป

หมายเหตุ : แต่ละตัวอย่างทำซ้ำ 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย

6. การทดสอบผลการยับยั้งการยึดเกาะกับไฮดรอกซีอะพาไทท์ (Saeki et al., 1996)

6.1 การเตรียมเพลลิเคิล (pellicle)

เก็บน้ำลายจากอาสาสมัคร โดยกระตุ้นการไหลของน้ำลายด้วยพาราฟิล์ม แล้วบ้วนน้ำลายลงในถ้วยแช่น้ำแข็ง นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 g 15 นาที เก็บเฉพาะส่วนใสมาไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้งาน ในส่วนไฮดรอกซีอะพาไทท์ แช่เม็ดไฮดรอกซีอะพาไทท์ 5 มิลลิกรัม ในบัฟเฟอร์ โพแทสเซียม คลอไรด์ (ประกอบด้วย โพแทสเซียม คลอไรด์ 0.05 โมลาร์, โพแทสเซียม ฟอสเฟต 1 มิลลิโมลาร์, แคลเซียม คลอไรด์1 มิลลิโมลาร์, แมกนีเซียม คลอไรด์ 0.1 มิลลิโมลาร์ พีเอช 6.0) 120 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งไว้ค้างคืน จากนั้น วันรุ่งขึ้น เคลือบเม็ดไฮดรอกซีอะพาไทท์ด้วยน้ำลายที่เตรียมไว้ ปริมาตร 120 ไมโครลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 5 รอบต่อนาที จากนั้นล้างด้วยบัฟเฟอร์ โพแทสเซียม คลอไรด์ 3 ครั้ง ๆ ละ 1 มิลลิลิตร แล้วแช่เม็ดไฮดรอกซีอะพาไทท์ใน สารละลายโบวายน์ ซีรัม อัลบูมินในบัฟเฟอร์ โพแทสเซียม คลอไรด์ ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที และล้างอีกครั้งหนึ่ง

6.2 การทดสอบการยับยั้งการยึดเกาะ

ในหลอดที่ทำการทดลอง ประกอบด้วย เชื้อแบคทีเรียซึ่งเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมไทมิดีนติดฉลากสารรังสี (ตามข้อ 3) ปริมาตร 60 ไมโครลิตร, สารสกัดจากสมุนไพร 30 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้ายตามข้อ 5), ซูโครส 4% ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และ เม็ดไฮดรอกซีอะพาไทท์ที่เตรียมไว้ (ตามข้อ 6.1) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง จากนั้น ล้างด้วยบัฟเฟอร์ โพแทสเซียม คลอไรด์ 3 ครั้ง ๆ ละ 1 มิลลิลิตร นับจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะกับเม็ดไฮดรอกซีอะพาไทท์ โดยวัดปริมาณรังสีบนเม็ดไฮดรอกซีอะพาไทท์ ด้วยเครื่องวัดรังสีเบต้า ใช้ค่าปริมาณรังสีที่วัดได้ มาคำนวณเป็นเปอร์เซนต์การยึดเกาะ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และเลือกเฉพาะสารสกัดที่ให้ผลการยับยั้งการยึดเกาะกับเม็ดไฮดรอกซีอะพาไทท์ มาทำการทดสอบต่อไป

หมายเหตุ : แต่ละตัวอย่างทำซ้ำ 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย

7. การทดสอบผลการยับยั้งการยึดเกาะกับไฮดรอกซีอะพาไทท์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ทดสอบผลการยับยั้งการยึดเกาะกับไฮดรอกซีอะพาไทท์ ตามวิธีในข้อ 6 โดยใช้ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เลือกความเข้มข้นของสมุนไพรที่เหมาะสมมาทำการทดสอบในข้อ 8 และ 9 ต่อไป โดยมีเกณฑ์ คือ ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ให้ผลการยับยั้งอย่างน้อย 50% แต่หากไม่มีความเข้มข้นใดที่ให้ผลยับยั้งอย่างน้อย 50% ให้ใช้ความเข้มข้นที่ให้ผลยับยั้งสูงที่สุดแทน

หมายเหตุ : แต่ละตัวอย่างทำซ้ำ 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย

8. การทดสอบการทำงานของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส (Benjavongkulchai et al., 1996)

8.1 การเตรียมเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรสแบบหยาบ (crude enzyme preparation)

เตรียมเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 10 มิลลิลิตร (ตามข้อ 3.1) มาเพาะเลี้ยงในทริปติค ซอย บรอธ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ในตู้อบเชื้อที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็ว 3,000 g 15 นาที นำส่วนน้ำใส มาตกตะกอนด้วย แอมโมเนียม ซัลเฟต ที่มีความอิ่มตัว 85% ทิ้งไว้ค้างคืน จากนั้น นำมาปั่นที่ความเร็ว 10,000 g 15 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนตะกอนมาละลายในโพแทสเซียม ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (0.1 โมลาร์ พีเอช 6.0) แล้วไดอะไลซ์ (dialyze) ผ่านถุงไดอะไลซิส ด้วยบัฟเฟอร์เดิม ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บสารละลายโปรตีนที่ได้ (เอนไซม์) ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

8.2 การตรวจสอบการยับยั้งแอคติวิตี (activity) ของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส

ใช้วิธีเรดิโอไอโซโทป (radioisotope method) โดยเตรียมสารสกัดจากสมุนไพร 10 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้ายตามข้อ 7) ผสมกับโพแทสเซียม ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (0.1 โมลาร์ พีเอช 6.0) 40 ไมโครลิตร และ เอนไซม์ 50 ไมโครลิตร โดยเอนไซม์ที่ใช้มีค่าแอคติวิตีระหว่าง 17-40 มิลลิยูนิต** ต่อเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร (แอคติวิตีจำเพาะ (specific activity) ของเอนไซม์จากเชื้อ ATCC 25175 และ TPF-1 มีค่า 29.8 และ 56.3 มิลลิยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ) จากนั้นจึงใส่สารตั้งต้น คือ สารละลายซูโครสติดฉลากสารรังสีในโพแทสเซียม ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลา หยุดปฏิกิริยาโดยเติมเอธานอล 95 %แช่เย็น 800 ไมโครลิตร แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 30 นาที จากนั้นจึงกรองด้วยกลาสไมโครไฟเบอร์ฟิลเตอร์ ล้างด้วยเอธานอล 95 เปอร์เซนต์แช่เย็น 2 ครั้ง นำกลาสไมโครไฟเบอร์ฟิลเตอร์ไปวัดปริมาณรังสี ใช้ค่าปริมาณรังสีที่วัดได้ มาคำนวณเป็นเปอร์เซนต์ของแอคติวิตี เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

หมายเหตุ : แต่ละตัวอย่างทำซ้ำ 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย

9. การตรวจสอบการยับยั้งแอคติวิตีของกลูแคนไบน์ดิงเลคติน (Drake et al., 1988)

ใช้วิธีเซนตริฟิวเกชั่น-แอคกริเกชั่น (centrifugation-aggregation assay) โดยเตรียมเชื้อแบคทีเรียในไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์ บัฟเฟอร์ โดยนำเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อไปปั่นแยกเซลล์ ที่ความเร็ว 6,000 g แล้วแขวนลอยเชื้อในไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์ บัฟเฟอร์ ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรเท่ากับ 0.7 จากนั้น ผสมสารสกัดจากสมุนไพร 50 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้ายตามข้อ 7) กับเชื้อแบคทีเรีย 3 มิลลิลิตร สั่นด้วยเครื่องสั่นไฟฟ้า 5 วินาที แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้น เติมกลูแคน ที

2000 ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สั่นด้วยเครื่องสั่นไฟฟ้า 5 วินาที แล้วนำไปปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็ว 8,200 g 15 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และแขวนลอยเชื้อในไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์ บัฟเฟอร์ 4 มิลลิลิตร สเมียร์ (smear) เชื้อบนแผ่นสไลด์แก้ว ย้อมด้วยสีคริสตัล ไวโอเลต ตรวจดูลักษณะของเชื้อ แล้วบันทึกภาพไว้
หมายเหตุ : แต่ละตัวอย่างทำซ้ำ 3 ครั้ง

<u>การวิเคราะห์ข้อมูล</u>

คำนวณเป็นค่าเฉลี่ยของเปอร์เซนต์การยึดเกาะ และแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส โดยให้ค่าการยึดเกาะและแอคติวิตีของเอนไซม์ในกลุ่มควบคุมเป็น 100%

เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติแบบการทดสอบนัยสำคัญของความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ย (Student's t-test)

เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสมุนไพรในการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อ ระหว่างเชื้อ 2 สายพันธุ์ โดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติแบบการทดสอบนัยสำคัญของความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ย (Student's t-test)

เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสมุนไพรที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน และระหว่างสมุนไพรแต่ละชนิด โดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติแบบการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One way ANOVA)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. การสกัดสมุนไพร

งานวิจัยนี้ เลือกศึกษาผลของสารสกัดจากสมุนไพร 6 ชนิด ได้แก่ ข่อย, ชา, ชุมเห็ดเทศ, ฟ้าทะลายโจร, ฝรั่ง และสีฟันคนทา โดยมีการเตรียมสมุนไพรก่อนสกัด และเปรียบเทียบน้ำหนักก่อนและหลังสกัด พบว่า ชามีเปอร์เซนต์ของน้ำหนักสารสกัดเมื่อเปรียบเทียบกับก่อนสกัดสูงที่สุด รองลงมา ได้แก่ ฝรั่ง, ข่อย, ฟ้าทะลายโจร, ชุมเห็ดเทศ และสีฟันคนทา ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบน้ำหนักก่อนและหลังสกัด ของสมุนไพรที่ใช้ในการวิจัย

ชนิดของสมุนไพร	น้ำหนัก(กรัม)		% น้ำหนักสารสกัดเมื่อเปรียบเทียบกับก่อนสกัด
	ก่อนสกัด	หลังสกัด	
ข่อย	1000	62.0	6.20%
ชา	1000	235.0	23.50%
ชุมเห็ดเทศ	1000	40.5	4.05%
ฟ้าทะลายโจร	1000	60.2	6.02%
ฝรั่ง	600	42.0	7.00%
สีฟันคนทา	1000	24.0	2.40%

2. การทดสอบผลการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อกับผิวแก้ว

2.1 การทดสอบความแตกต่างในการยึดเกาะของเชื้อ ระหว่างกลุ่มควบคุมที่ใส่น้ำกลั่นกับกลุ่มควบคุมที่ใส่เอธานอล 95%

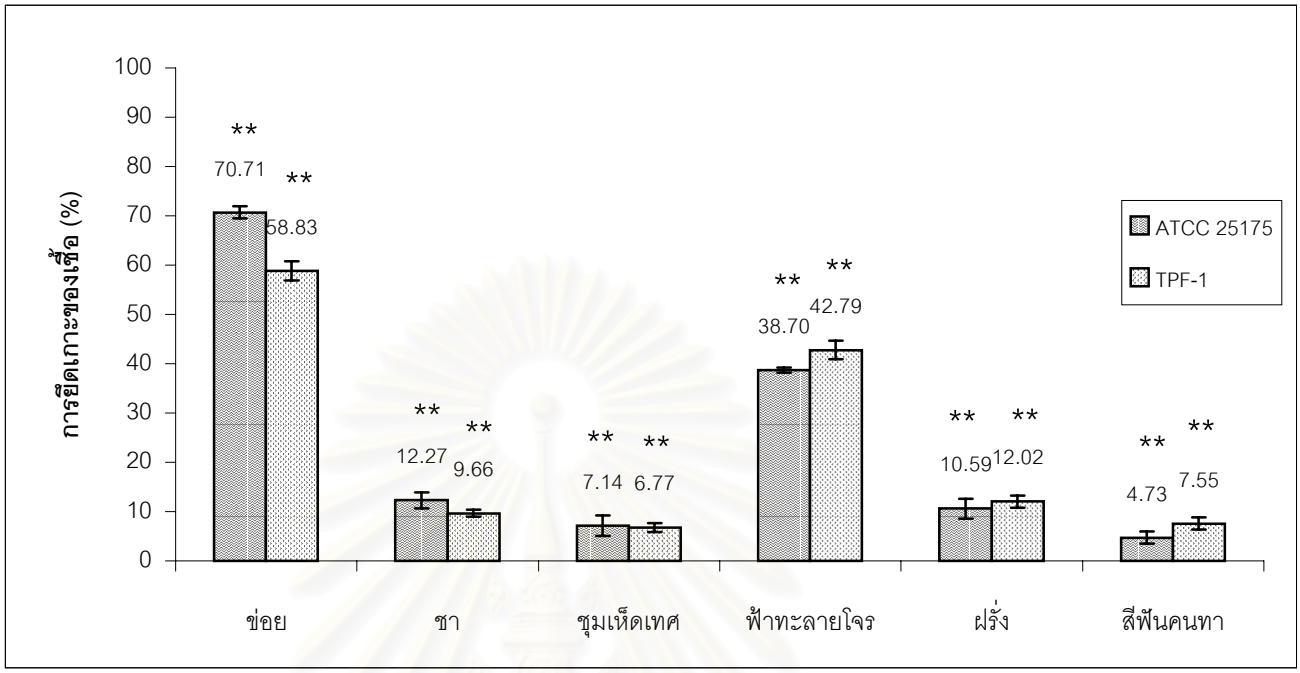
การประเมินว่าตัวทำละลายของสารสกัดจากสมุนไพร คือ เอธานอล 95% มีผลต่อการยึดเกาะของเชื้อหรือไม่ พบว่า สำหรับเชื้อ ATCC 25175 เอธานอล 95% ให้ผลการยึดเกาะเท่ากับ 97.41 $\pm$0.47% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ใส่น้ำกลั่น และไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) เมื่อใช้สถิติ Unpaired t-test สำหรับเชื้อ TPF-1 เอธานอล 95% ให้ผลการยึดเกาะเท่ากับ 96.30 $\pm$4.08% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ใส่น้ำกลั่น และไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) เมื่อใช้สถิติ Unpaired t-test

2.2 การทดสอบผลยับยั้งของสารสกัดจากสมุนไพรต่อการยึดเกาะของเชื้อกับผิวแก้ว

เป็นการศึกษานำร่อง เพื่อคัดทิ้งสารสกัดจากสมุนไพรที่ให้ผลยับยั้งการยึดเกาะต่ำกว่า 50% โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองแก้วที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อผสมซูโครส 1% และสารสกัดจากสมุนไพร ความเข้มข้น 0.5% แล้ววัดปริมาณเชื้อที่ยึดเกาะกับผิวแก้ว พบว่า สำหรับเชื้อ ATCC 25175 มีสมุนไพร 5 ชนิด ได้แก่ ชา, ชุมเห็ดเทศ, ฟ้าทะลายโจร, ฝรั่ง และสีฟันคนทา ที่มีผลทำให้เชื้อยึดเกาะได้ต่ำกว่า 50% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยสีฟันคนทาให้ผลยับยั้งสูงที่สุด รองลงมา ได้แก่ ชุมเห็ดเทศ, ฝรั่ง, ชา และฟ้าทะลายโจร ตามลำดับ ส่วนข่อย ให้ผลยับยั้งต่ำกว่า 50% สำหรับเชื้อ TPF-1 ให้ผลคล้ายคลึงกับเชื้อ ATCC 25175 กล่าวคือ มีสมุนไพร 5 ชนิด ได้แก่ ชา, ชุมเห็ดเทศ, ฟ้าทะลายโจร, ฝรั่ง และสีฟันคนทา ที่มีผลทำให้เชื้อยึดเกาะได้ต่ำกว่า 50% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เช่นเดียวกัน โดยชุมเห็ดเทศให้ผลยับยั้งสูงที่สุด รองลงมา ได้แก่ สีฟันคนทา, ชา,ฝรั่ง และฟ้าทะลายโจร ตามลำดับ ส่วนข่อย ให้ผลยับยั้งต่ำกว่า 50% (รูปที่ 1)

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสมุนไพรชนิดต่าง ๆ ในการยับยั้งการยึดเกาะกับผิวแก้ว ระหว่างเชื้อ 2 ชนิด พบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ยกเว้นข่อย ซึ่งมีผลต่อการยึดเกาะของเชื้อ TPF-1 มากกว่าเชื้อ ATCC 25175 ($p<0.01$) (ตารางที่ 2)

จากผลการศึกษานำร่องดังกล่าว จึงได้เลือกสมุนไพรที่ให้ผลยับยั้งเกิน 50% ได้แก่ ชา, ชุมเห็ดเทศ, ฟ้าทะลายโจร, ฝรั่ง และสีฟันคนทา มาทำการทดสอบฤทธิ์การฆ่าเชื้อแบคทีเรียต่อไป



รูปที่ 1 ผลของสารสกัดจากสมุนไพรชนิดต่าง ๆ ที่ระดับความเข้มข้น 0.5% ต่อการยึดเกาะกับผิวแก้วของเชื้อ ATCC 25175 และ TPF-1 คิดเป็นเปอร์เซนต์เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) โดยใช้สถิติ Unpaired t-test เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสมุนไพรชนิดต่าง ๆ ที่ระดับความเข้มข้น 0.5% ต่อการยึดเกาะกับผิวแก้ว ระหว่างเชื้อ ATCC 25175 กับ เชื้อ TPF-1

ชนิดของสมุนไพร	การยึดเกาะของเชื้อ (เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม) (x ± S.D.)		นัยสำคัญทางสถิติ
	เชื้อ ATCC 25175	เชื้อ TPF-1	
ข่อย	70.71 ± 1.19	58.83 ± 1.89	**
ชา	12.27 ± 1.62	9.66 ± 0.71	NS
ชุมเห็ดเทศ	7.14 ± 2.07	6.77 ± 0.89	NS
ฟ้าทะลายโจร	38.70 ± 0.54	42.79 ± 1.88	NS
ฝรั่ง	10.59 ± 2.07	12.02 ± 1.26	NS
สีฟันคนทา	4.73 ± 1.24	7.55 ± 1.23	NS

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) เมื่อใช้สถิติ Unpaired t-test

NS หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) เมื่อใช้สถิติ Unpaired t-test

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. การทดสอบฤทธิ์การฆ่าเชื้อแบคทีเรีย

การทดสอบสารสกัดจากสมุนไพร 5 ชนิด คือ ชา, ชุมเห็ดเทศ, ฟ้าทะลายโจร, ฝรั่ง และสีฟันคนทา ที่ระดับความเข้มข้น 0.5% ว่ามีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์หรือไม่ เพื่อเป็นการยืนยันว่า ผลการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อกับผิวแก้วนั้น มิได้เป็นผลจากการฆ่าเชื้อหากมีผล จึงค่อยทดสอบที่ความเข้มข้นต่ำกว่า โดยเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดบรอธที่ผสมสารสกัดจากสมุนไพร แล้วนำอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอะการ์ พบว่าเชื้อยังสามารถเจริญเติบโตได้ แสดงว่าสารสกัดจากสมุนไพรทั้ง 5 ชนิดไม่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ทั้ง 2 สายพันธุ์ (ตารางที่ 3)

ดังนั้น จึงนำสมุนไพรทั้ง 5 ชนิดไปทดสอบการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อกับไฮดรอกซีอะพาไทท์ โดยใช้ความเข้มข้นเดียวกับที่ทำการทดสอบกับผิวแก้ว คือ 0.5%

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบฤทธิ์การฆ่าเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ ATCC 25175 และ TPF-1 ของสมุนไพรชนิดต่าง ๆ ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 %

ชนิดของสมุนไพร	จำนวนเชื้อ (CFU/ml) ($x \pm S.D.$)		นัยสำคัญทางสถิติ	การแปลผล
	เชื้อ ATCC 25175 ($x10^9$)	เชื้อ TPF-1 ($x10^6$)		
กลุ่มควบคุม	2.57 ± 0.41	1.93 ± 0.09	NS	-
ชา	2.21 ± 0.35	1.88 ± 0.09	NS	ไม่มีผลฆ่าเชื้อหรือยับยั้งการเจริญเติบโต
ชุมเห็ดเทศ	2.73 ± 0.24	1.60 ± 0.23	NS	ไม่มีผลฆ่าเชื้อหรือยับยั้งการเจริญเติบโต
ฟ้าทะลายโจร	2.58 ± 0.35	1.78 ± 0.20	NS	ไม่มีผลฆ่าเชื้อหรือยับยั้งการเจริญเติบโต
ฝรั่ง	2.34 ± 0.47	1.94 ± 0.06	NS	ไม่มีผลฆ่าเชื้อหรือยับยั้งการเจริญเติบโต
สีฟันคนทา	2.32 ± 0.46	1.97 ± 0.13	NS	ไม่มีผลฆ่าเชื้อหรือยับยั้งการเจริญเติบโต

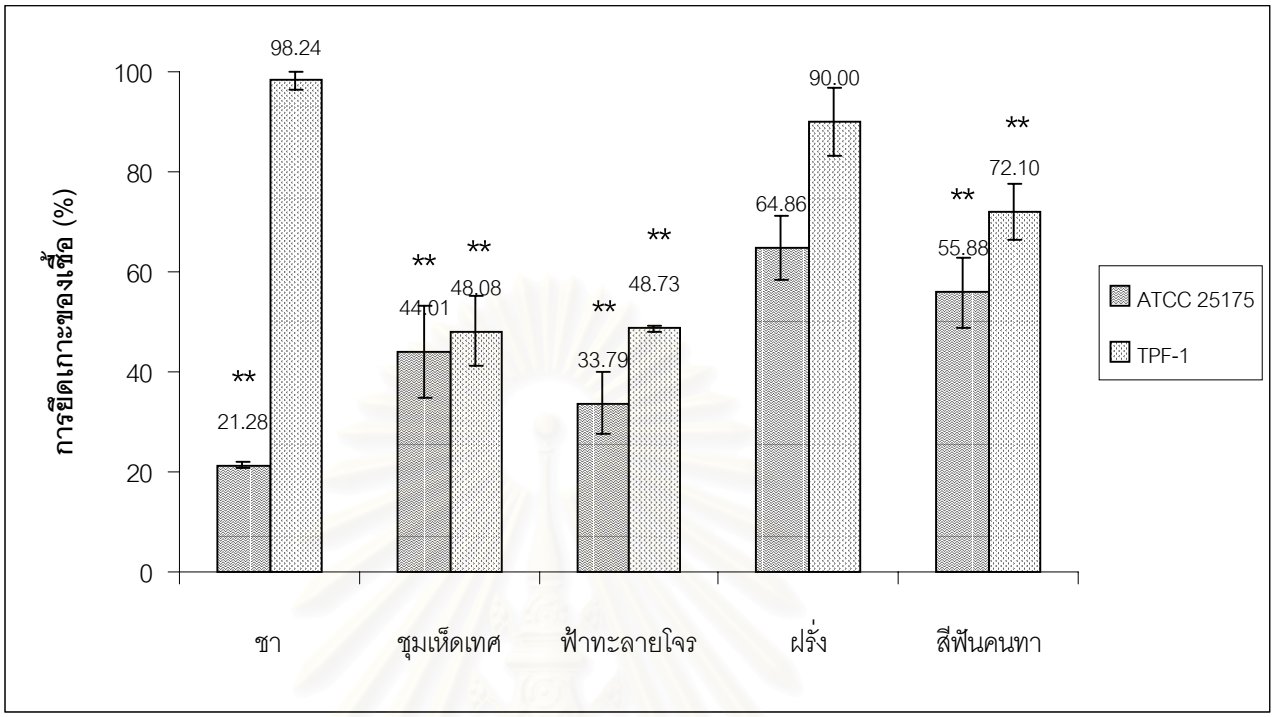
4. การทดสอบผลการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อกับไฮดรอกซีอะพาไทท์

การทดสอบผลการยับยั้งของสารสกัดจากสมุนไพร 5 ชนิด คือ ชา, ชุมเห็ดเทศ, ฟ้าทะลายโจร, ฝรั่ง และสีฟันคนทา ที่ระดับความเข้มข้น 0.5% ต่อการยึดเกาะของเชื้อกับไฮดรอกซีอะพาไทท์ โดยนำเชื้อที่ติดฉลากสารรังสี ผสมสารละลายซูโครส 1% และสารสกัดจากสมุนไพร มาทดสอบกับเม็ดไฮดรอกซีอะพาไทท์ แล้ววัดปริมาณรังสีบนเม็ดไฮดรอกซีอะพาไทท์ พบว่า สำหรับเชื้อ ATCC 25175 ชา, ชุมเห็ดเทศ, ฟ้าทะลายโจร และสีฟันคนทา มีผลทำให้เชื้อยึดเกาะได้ต่ำกว่า 50% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยชาให้ผลยับยั้งสูงที่สุด รองลงมา ได้แก่ ฟ้าทะลายโจร, ชุมเห็ดเทศ และสีฟันคนทา ตามลำดับ ส่วนฝรั่ง มีผลทำให้เชื้อยึดเกาะได้ 64.86 $\pm$ 6.37% สำหรับเชื้อ TPF-1 มีเพียงชุมเห็ดเทศและฟ้าทะลายโจร ที่มีผลทำให้เชื้อยึดเกาะได้ต่ำกว่า 50% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยมีค่าการยึดเกาะใกล้เคียงกัน (48.08 $\pm$ 6.95% และ 48.73 $\pm$ 0.64% ตามลำดับ) ส่วนชา, ฝรั่ง และสีฟันคนทา ให้ผลยับยั้งต่ำกว่า 30% (รูปที่ 2)

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อ ในกลุ่มของสารสกัดจากสมุนไพรซึ่งให้ผลยับยั้งการยึดเกาะ คือ สำหรับเชื้อ ATCC 25175 ได้แก่ ชา, ชุมเห็ดเทศ, ฟ้าทะลายโจร และสีฟันคนทา สำหรับเชื้อ TPF-1 ได้แก่ ชุมเห็ดเทศและฟ้าทะลายโจร ที่ระดับความเข้มข้น 0.5% พบว่า สำหรับเชื้อ ATCC 25175 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ในกลุ่มของสมุนไพร 4 ชนิด ยกเว้นระหว่างชากับสีฟันคนทา ($p<0.05$) (ตารางที่ 4) สำหรับเชื้อ TPF-1 ชุมเห็ดเทศให้ผลยับยั้งไม่แตกต่างจากฟ้าทะลายโจรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) (ตารางที่ 5)

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสมุนไพรชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 0.5% ในการยับยั้งการยึดเกาะกับไฮดรอกซีอะพาไทท์ ระหว่างเชื้อ 2 ชนิด พบว่า ชาและฟ้าทะลายโจร ให้ผลยับยั้งในเชื้อ TPF-1 สูงกว่าในเชื้อ ATCC 25175 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$ และ $p<0.05$ ตามลำดับ)

จากผลการทดสอบนี้ จึงได้เลือกสมุนไพรที่ให้ผลยับยั้งการยึดเกาะกับไฮดรอกซีอะพาไทท์ดังกล่าวข้างต้น มาทดสอบผลที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ



รูปที่ 2 ผลของสารสกัดจากสมุนไพรชนิดต่าง ๆ ที่ระดับความเข้มข้น 0.5% ต่อการยึดเกาะกับไฮดรอกซีอะพาไทท์ ของเชื้อ ATCC 25175 และ TPF-1 คิดเป็นเปอร์เซนต์เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) โดยใช้สถิติ Unpaired t-test เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสมุนไพรชนิดต่าง ๆ ที่ระดับความเข้มข้น 0.5% ในการยึดเกาะของเชื้อ ATCC 25175 กับไฮดรอกซีอะพาไทท์

ATCC 25175	กลุ่มควบคุม	ชา	ชุมเห็ดเทศ	ฟ้าทะลายโจร	ฝรั่ง	สีฟันคนทา
กลุ่มควบคุม						
ชา	**					
ชุมเห็ดเทศ	**	NS				
ฟ้าทะลายโจร	**	NS	NS			
ฝรั่ง	*	**	NS	NS		
สีฟันคนทา	**	*	NS	NS	NS	

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) เมื่อใช้สถิติ One way ANOVA

* หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อใช้สถิติ One way ANOVA

NS หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) เมื่อใช้สถิติ One way ANOVA

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสมุนไพรชนิดต่าง ๆ ที่ระดับความเข้มข้น 0.5% ในการยึดเกาะของเชื้อ TPF-1 กับไฮดรอกซีอะพาไทท์

TPF- 1	กลุ่มควบคุม	ชา	ชุมเห็ดเทศ	ฟ้าทะลายโจร	ฝรั่ง	สีฟันคนทา
กลุ่มควบคุม						
ชา	NS					
ชุมเห็ดเทศ	**	**				
ฟ้าทะลายโจร	**	**	NS			
ฝรั่ง	NS	NS	**	**		
สีฟันคนทา	**	*	*	*	NS	

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) เมื่อใช้สถิติ One way ANOVA

* หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อใช้สถิติ One way ANOVA

NS หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) เมื่อใช้สถิติ One way ANOVA

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสมุนไพรชนิดต่าง ๆ ที่ระดับความเข้มข้น 0.5% ในการยึดเกาะกับไฮดรอกซีอะพาไทท์ ระหว่างเชื้อ ATCC 25175 กับ เชื้อ TPF-1

ชนิดของสมุนไพร	การยึดเกาะของเชื้อ (เปอร์เซนต์เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม) (x ± S.D.)		นัยสำคัญทางสถิติ
	ATCC 25175	TPF-1	
ชา	21.28 ± 0.64	98.24 ± 1.85	**
ชุมเห็ดเทศ	44.01 ± 9.31	48.08 ± 6.95	NS
ฟ้าทะลายโจร	33.79 ± 6.10	48.73 ± 0.64	*
ฝรั่ง	64.86 ± 6.37	90.00 ± 6.96	NS
สีฟันคนทา	55.88 ± 6.92	72.10 ± 5.52	NS

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) เมื่อใช้สถิติ Unpaired t-test

* หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อใช้สถิติ Unpaired t-test

NS หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) เมื่อใช้สถิติ Unpaired t-test

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

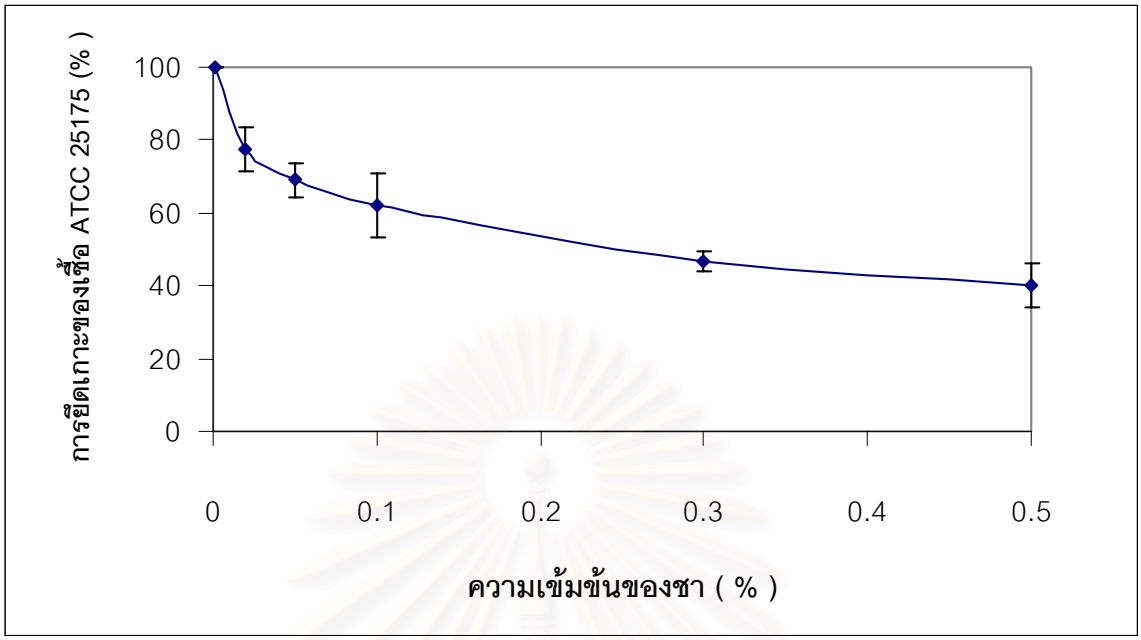
5. การทดสอบผลการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อกับไฮดรอกซีอะพาไทท์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

การทดสอบผลการยับยั้งการยึดเกาะกับไฮดรอกซีอะพาไทท์ของสารสกัดจากสมุนไพรที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ โดยทดสอบผลของชา, ชุมเห็ดเทศ, ฟ้าทะลายโจร และสีฟันคนทา กับเชื้อ ATCC 25175 และ ทดสอบชุมเห็ดเทศและฟ้าทะลายโจร กับเชื้อ TPF-1 ที่ช่วงความเข้มข้นต่าง ๆ ระหว่าง 0.02% ถึง 0.6% เพื่อตรวจสอบแนวโน้มการตอบสนองต่อสารสกัดจากสมุนไพร และหาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ให้ผลยับยั้งเชื้อได้อย่างน้อย 50% ผลปรากฏว่า เชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ มีการตอบสนองต่อสารสกัดจากสมุนไพรในลักษณะขึ้นกับปริมาณสาร (dose-dependent) และพบว่า สำหรับเชื้อ ATCC 25175 ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ให้ผลยับยั้งอย่างน้อย 50% ของชา, ชุมเห็ดเทศ, ฟ้าทะลายโจร และสีฟันคนทา คือ 0.3% (รูปที่ 3), 0.5% (รูปที่ 4), 0.5% (รูปที่ 5) และ0.5% (รูปที่ 6) ตามลำดับ สำหรับเชื้อ TPF-1 ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ให้ผลยับยั้งอย่างน้อย 50% ของชุมเห็ดเทศและฟ้าทะลายโจร คือ 0.4% (รูปที่ 7) และ0.5% (รูปที่ 8) ตามลำดับ

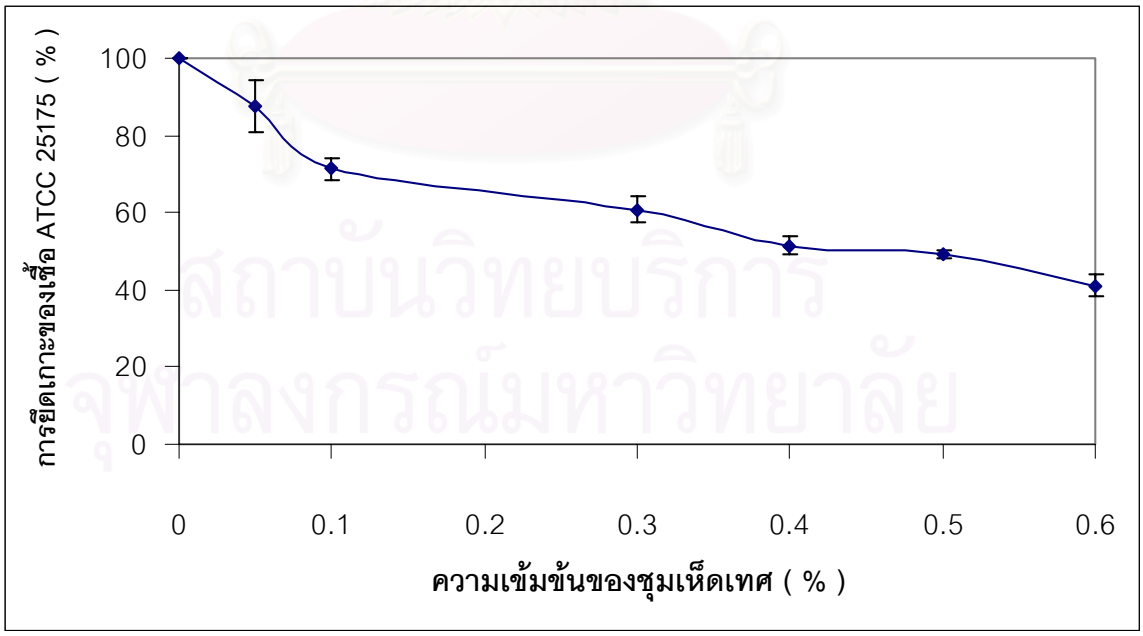
เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากสมุนไพรซึ่งให้ผลยับยั้งอย่างน้อย 50% ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 0.5% ได้แก่ ชา สำหรับเชื้อ ATCC 25175 และ ชุมเห็ดเทศ สำหรับเชื้อ TPF-1 พบว่า ในการทดสอบกับเชื้อ ATCC 25175 นั้น ชา 0.3% และชา 0.5% ให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ส่วนการทดสอบกับเชื้อ TPF-1 นั้น ชุมเห็ดเทศ 0.4% และชุมเห็ดเทศ 0.5% ให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) (แสดงในภาคผนวก ข)

จากผลการทดสอบข้างต้น จึงได้เลือกความเข้มข้นของสมุนไพรตามผลการศึกษาข้างต้นมาศึกษากลไกการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อ และศึกษาเพิ่มเติมในชา 0.5% และชุมเห็ดเทศ 0.5% ด้วย ดังนี้ สำหรับเชื้อ ATCC 25175 ได้แก่ ชา, ชุมเห็ดเทศ, ฟ้าทะลายโจร,สีฟันคนทา 0.5% และ ชา 0.3% สำหรับเชื้อ TPF-1 ได้แก่ ชุมเห็ดเทศ, ฟ้าทะลายโจร 0.5% และ ชุมเห็ดเทศ 0.4%

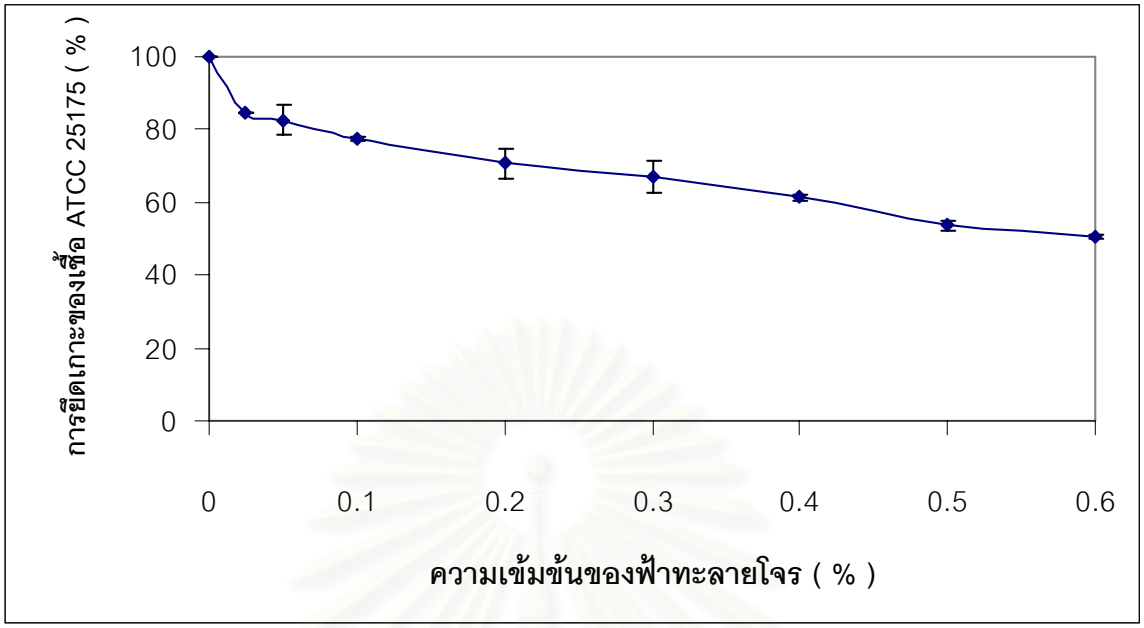
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



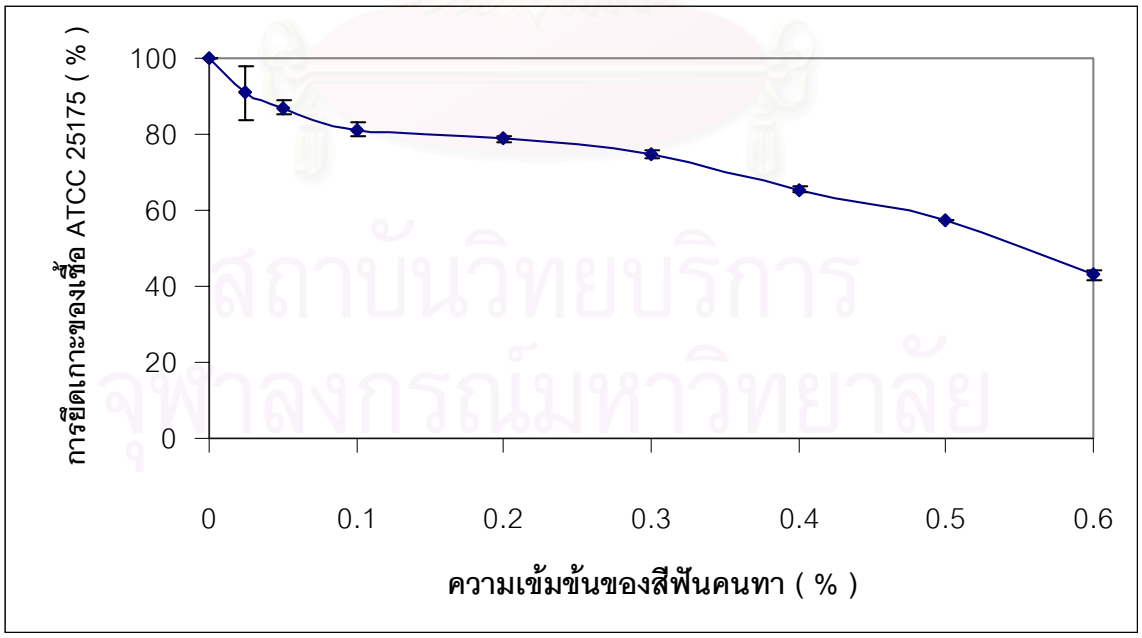
รูปที่ 3 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างการยึดเกาะของเชื้อ ATCC 25175 กับสารสกัดจากชาที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ



รูปที่ 4 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างการยึดเกาะของเชื้อ ATCC 25175 กับสารสกัดจากชุมเห็ดเทศที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

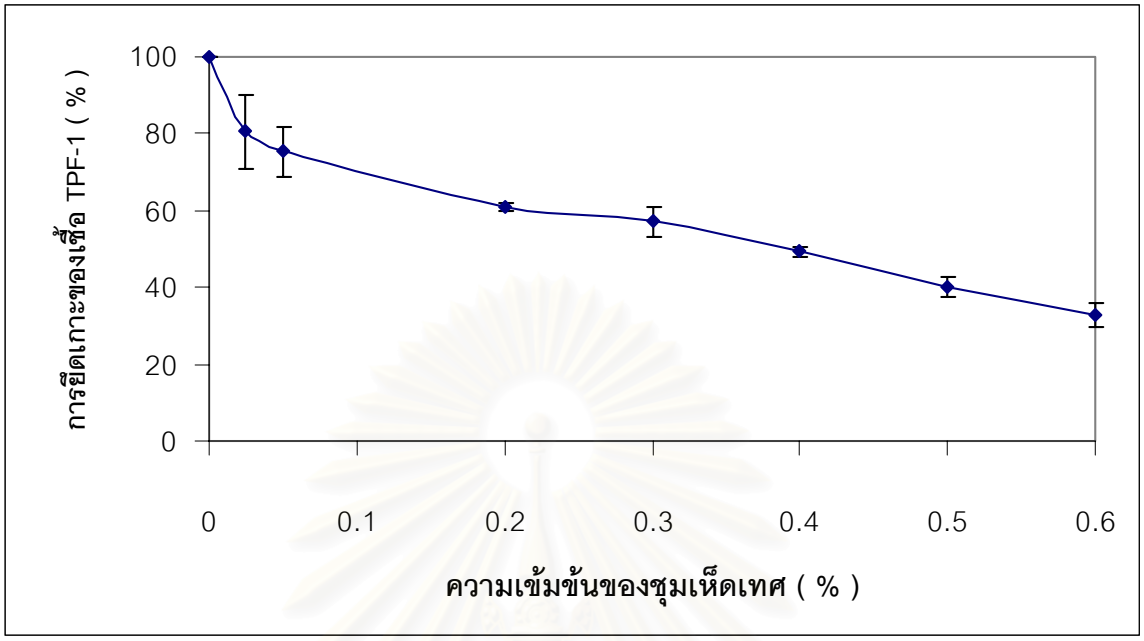


รูปที่ 5 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างการยึดเกาะของเชื้อ ATCC 25175 กับสารสกัดจากฟ้าทะลายโจรที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

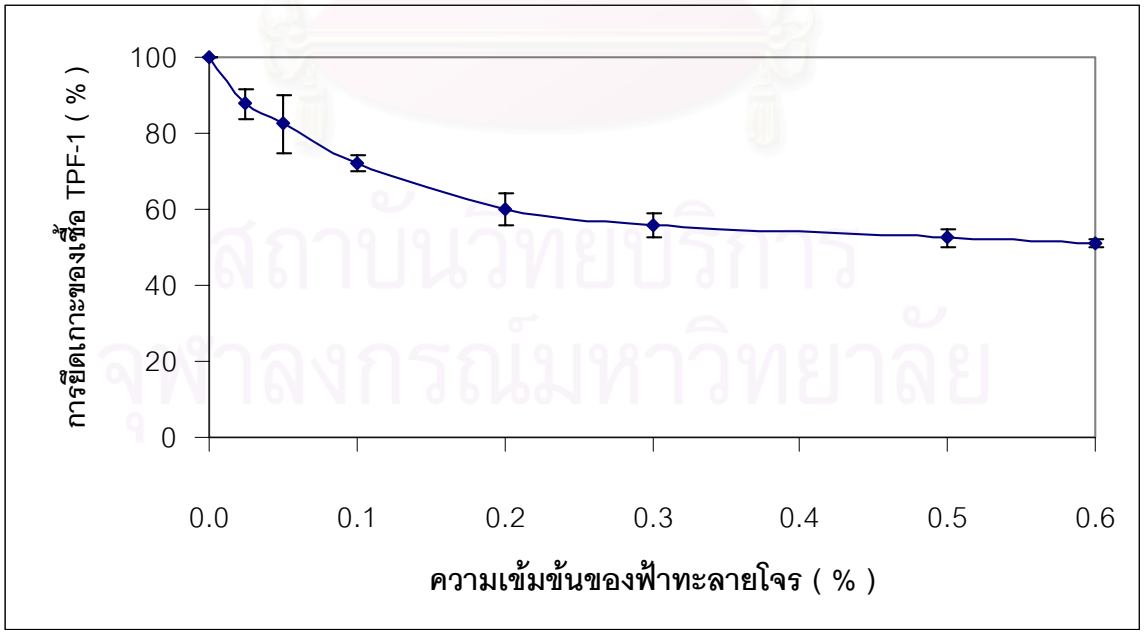


รูปที่ 6 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างการยึดเกาะของเชื้อ ATCC 25175 กับสารสกัดจากสีฟันคนทาที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 7 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างการยึดเกาะของเชื้อ TPF-1 กับสารสกัดจากชุมเห็ดเทศ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ



รูปที่ 8 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างการยึดเกาะของเชื้อ TPF-1 กับสารสกัดจากฟ้าทะลายโจร ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

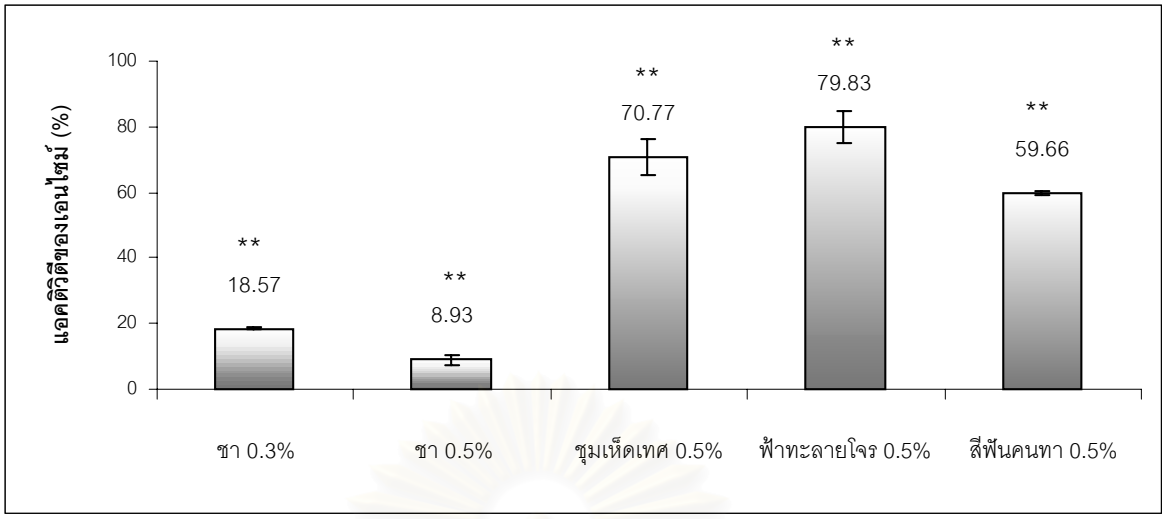
6. การศึกษากลไกการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อ

ทำการศึกษา 2 กลไก คือ แอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส และแอคติวิตีของกลูแคนไบน์ดิงเลคติน โดยทดสอบสมุนไพรตามชนิดและความเข้มข้น ดังนี้ สำหรับเชื้อ ATCC 25175 ทดสอบ ชา, ชุมเห็ดเทศ, ฟ้าทะลายโจร, สีฟันคนทา 0.5% และ ชา 0.3% สำหรับเชื้อ TPF-1 ทดสอบ ชุมเห็ดเทศ, ฟ้าทะลายโจร 0.5% และ ชุมเห็ดเทศ 0.4%

6.1 การตรวจสอบการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส

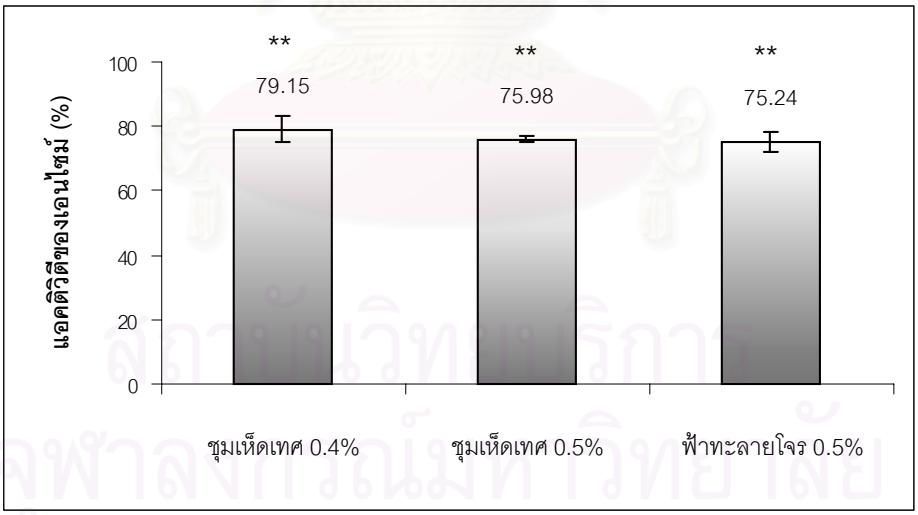
การทดสอบการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรสที่เตรียมได้จากเชื้อ ด้วยวิธีเรดิโอไอโซโทป คือ ใช้สารตั้งต้นของปฏิกิริยาเป็นสารละลายซูโครสติดฉลากสารรังสี แล้ววัดปริมาณรังสีในผลิตภัณฑ์ พบว่า สำหรับเชื้อ ATCC 25175 สมุนไพรทั้ง 4 ชนิด 5 ตัวอย่าง มีผลทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรสลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยชา 0.5% ให้ผลยับยั้งสูงที่สุด รองลงมา ได้แก่ ชา 0.3%,สีฟันคนทา 0.5%, ชุมเห็ดเทศ 0.5% และฟ้าทะลายโจร 0.5% ตามลำดับ (รูปที่ 9) สำหรับเชื้อ TPF-1 สมุนไพรทั้ง 2 ชนิด 3 ตัวอย่าง มีผลทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรสลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เช่นเดียวกัน โดยให้ผลยับยั้งใกล้เคียงกัน (รูปที่ 10)

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรสระหว่างสมุนไพรแต่ละชนิด พบว่า สำหรับเชื้อ ATCC 25175 ชา 0.3% กับชา 0.5% ให้ผลยับยั้งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แต่ทั้ง 2 ความเข้มข้นให้ผลสูงกว่าชุมเห็ดเทศ, ฟ้าทะลายโจร และสีฟันคนทา อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) ขณะที่สีฟันคนทาให้ผลยับยั้งสูงกว่าฟ้าทะลายโจร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) (ตารางที่ 7) สำหรับเชื้อ TPF-1 ชุมเห็ดเทศ 0.4% กับชุมเห็ดเทศ 0.5% ให้ผลไม่แตกต่างกัน และไม่แตกต่างจากฟ้าทะลายโจรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) (ตารางที่ 8)



รูปที่ 9 ผลของสารสกัดจากสมุนไพรชนิดต่าง ๆ ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส จากเชื้อ ATCC 25175 คิดเป็นเปอร์เซนต์เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) โดยใช้สถิติ Unpaired t-test เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม



รูปที่ 10 ผลของสารสกัดจากสมุนไพรชนิดต่าง ๆ ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส จากเชื้อ TPF-1 คิดเป็นเปอร์เซนต์เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) โดยใช้สถิติ Unpaired t-test เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 7 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสมุนไพรชนิดต่าง ๆ ในการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรสของเชื้อ ATCC 25175

ATCC 25175	กลุ่มควบคุม	ชา 0.3%	ชา 0.5%	ชุมเห็ดเทศ 0.5%	ฟ้าทะลายโจร 0.5%	สีฟันคนทา 0.5%
กลุ่มควบคุม						
ชา 0.3%	**					
ชา 0.5%	**	NS				
ชุมเห็ดเทศ 0.5%	**	**	**			
ฟ้าทะลายโจร 0.5%	**	**	**	NS		
สีฟันคนทา 0.5%	**	**	**	NS	**	

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) เมื่อใช้สถิติ One way ANOVA

NS หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) เมื่อใช้สถิติ One way ANOVA

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสมุนไพรชนิดต่าง ๆ ในการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรสของเชื้อ TPF-1

TPF-1	กลุ่มควบคุม	ชุมเห็ดเทศ 0.4%	ชุมเห็ดเทศ 0.5%	ฟ้าทะลายโจร 0.5%
กลุ่มควบคุม				
ชุมเห็ดเทศ 0.4%	**			
ชุมเห็ดเทศ 0.5%	**	NS		
ฟ้าทะลายโจร 0.5%	**	NS	NS	

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) เมื่อใช้สถิติ One way ANOVA

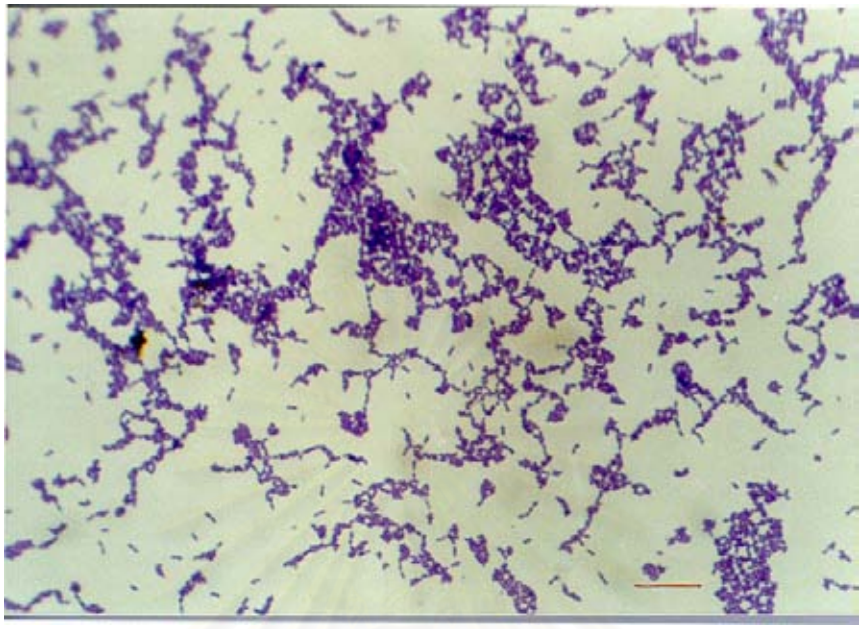
NS หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) เมื่อใช้สถิติ One way ANOVA

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

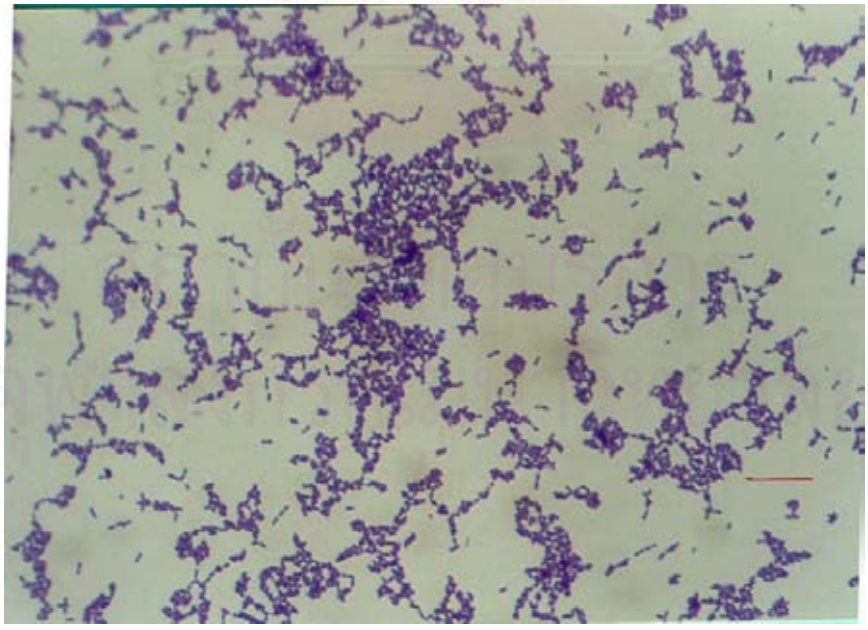
6.2 การตรวจสอบการยับยั้งแอคติวิตีของกลูแคนไบน์ดิงเลคติน

การทดสอบการยับยั้งแอคติวิตีของกลูแคนไบน์ดิงเลคติน ด้วยวิธีเซนตริฟิวเกชั่น-แอคกริเกชั่น คือ เติมสารกลูแคนลงในเชื้อที่แขวนลอยในบัฟเฟอร์ ก่อนนำไปปั่นด้วยความเร็วสูง แล้วนำมาตรวจสอบลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยในสภาวะที่มีการทำงานของกลูแคนไบน์ดิงเลคติน จะพบการรวมกลุ่มของเซลล์แบคทีเรียอย่างมาก มีลักษณะเป็นกลุ่มก้อนขนาดใหญ่ ส่วนในสภาวะที่การทำงานของกลูแคนไบน์ดิงเลคตินลดลง จะพบการรวมกลุ่มของเซลล์แบคทีเรีย ในลักษณะที่กลุ่มก้อนมีขนาดเล็ก หรือหากมีการยับยั้งการการทำงานของกลูแคนไบน์ดิงเลคติน จะพบว่าไม่มีการรวมกลุ่มของเซลล์ โดยเซลล์จะมีลักษณะเป็นสายสั้น ๆ กระจายอยู่ทั่วไป จากผลการทดลอง พบว่า ในกลุ่มควบคุมบวก ซึ่งเติมกลูแคน จะพบการรวมกลุ่มของเซลล์แบคทีเรียอย่างมาก มีลักษณะเป็นกลุ่มก้อนขนาดใหญ่ (รูปที่ 11 และ 12) ส่วนในกลุ่มควบคุมลบ ซึ่งไม่เติมกลูแคน จะพบว่าไม่มีการรวมกลุ่มของเซลล์ โดยเซลล์จะมีลักษณะเป็นสายสั้น ๆ กระจายอยู่ทั่วไป (รูปที่ 13 และ 14) และเมื่อทำการทดสอบกับสมุนไพรต่าง ๆ พบว่า สำหรับเชื้อ ATCC 25175 ชาทั้ง 2 ความเข้มข้น และสีฟันคนทา ไม่ให้ผลยับยั้งการรวมกลุ่มของเซลล์ ส่วนชุมเห็ดเทศและฟ้าทะลายโจร มีผลทำให้แอคติวิตีของกลูแคนไบน์ดิงเลคตินลดลง สำหรับเชื้อ TPF-1 ชุมเห็ดเทศทั้ง 2 ความเข้มข้น ให้ผลยับยั้งแอคติวิตีของกลูแคนไบน์ดิงเลคติน ส่วนฟ้าทะลายโจรมีผลทำให้แอคติวิตีของกลูแคนไบน์ดิงเลคตินลดลง (รูปที่ 15-22 และ ตารางที่ 9)

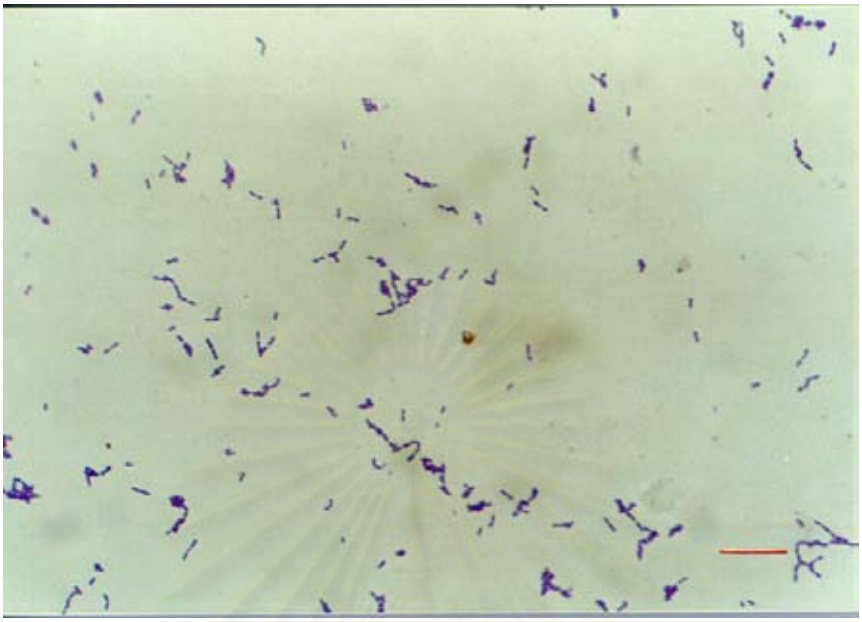
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



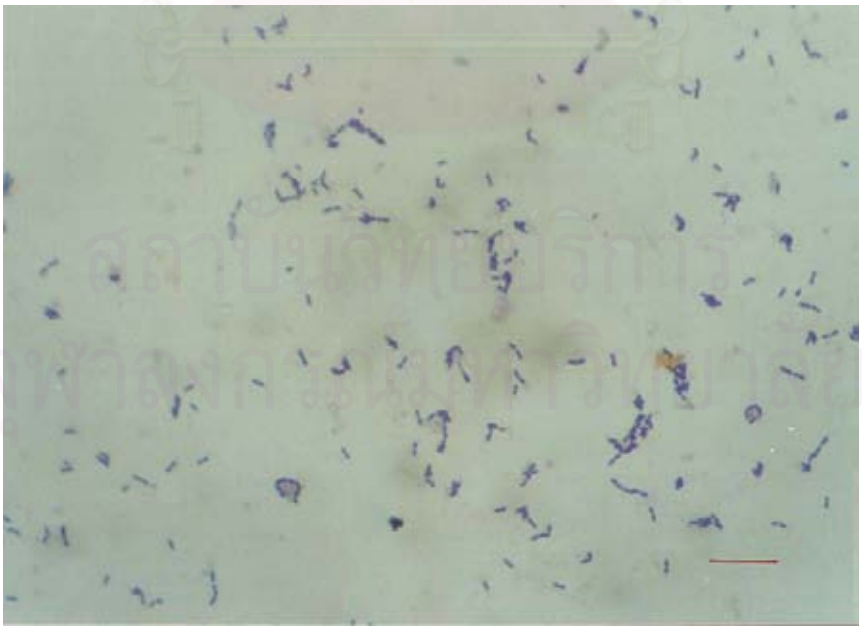
รูปที่ 11 การรวมกลุ่มของเซลล์แบคทีเรียอย่างมาก ในสภาวะที่มีการทำงานของกลูแคนไบน์ดิง เลคติน ในเชื้อ ATCC 25175 (กลุ่มควบคุมบวก) (เครื่องหมายบาร์ = 10 ไมโครเมตร)



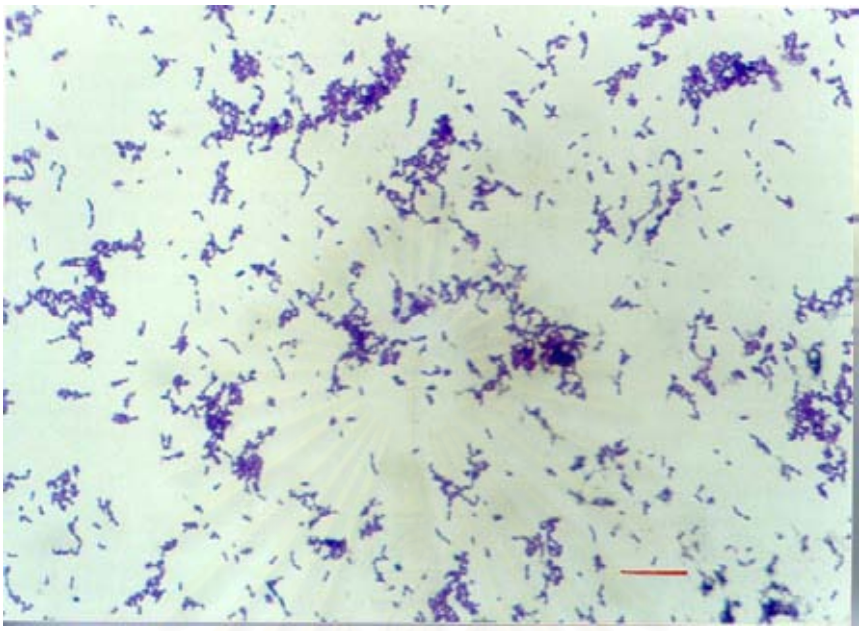
รูปที่ 12 การรวมกลุ่มของเซลล์แบคทีเรียอย่างมาก ในสภาวะที่มีการทำงานของกลูแคนไบน์ดิง เลคติน ในเชื้อ TPF-1 (กลุ่มควบคุมบวก) (เครื่องหมายบาร์ = 10 ไมโครเมตร)



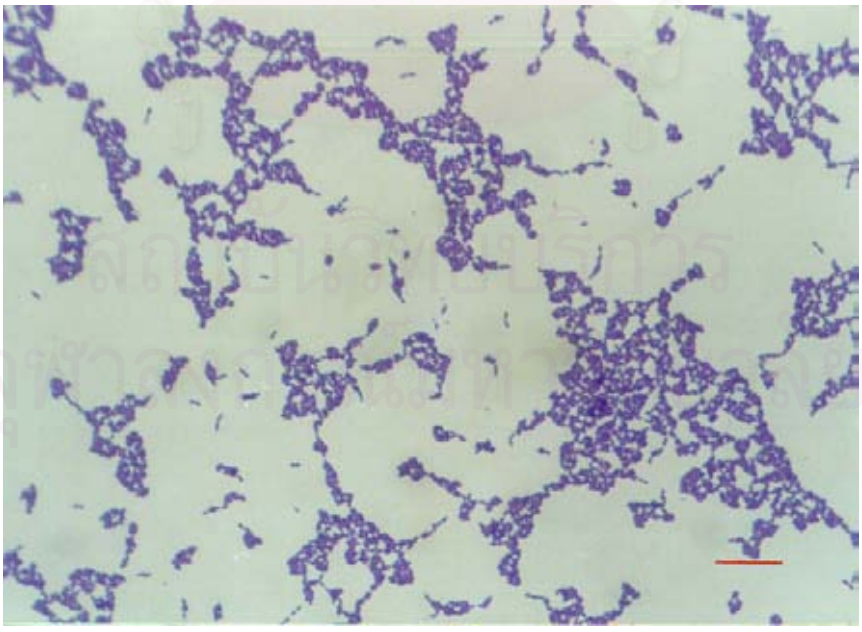
รูปที่ 13 เซลล์แบคทีเรียไม่มีการรวมกลุ่ม ในสภาวะที่ไม่มีการทำงานของกลูแคนไบน์ดิงเลคติน ใน เชื้อ ATCC 25175 (กลุ่มควบคุมลบ) (เครื่องหมายบาร์ = 10 ไมโครเมตร)



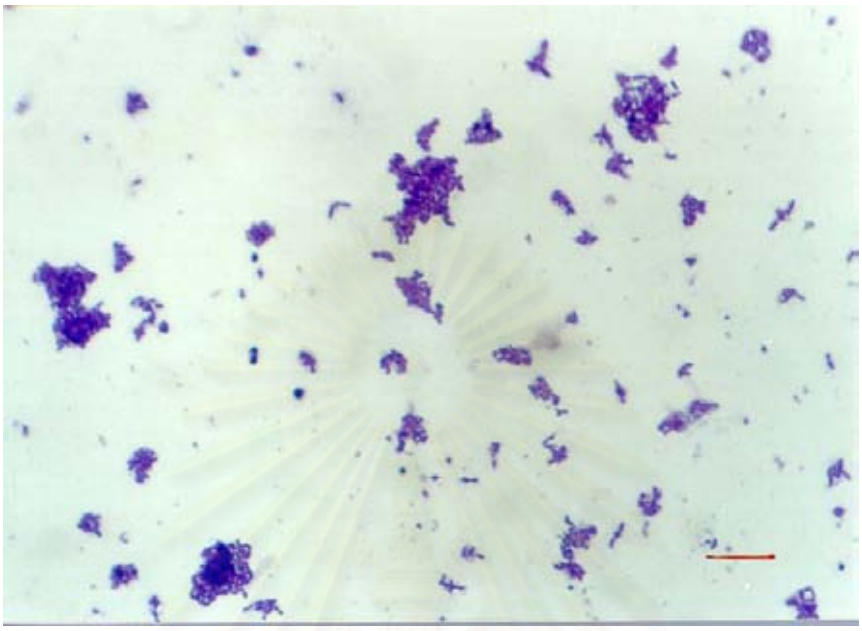
รูปที่ 14 เซลล์แบคทีเรียไม่มีการรวมกลุ่ม ในสภาวะที่ไม่มีการทำงานของกลูแคนไบน์ดิงเลคติน ในเชื้อ TPF-1 (กลุ่มควบคุมลบ) (เครื่องหมายบาร์ = 10 ไมโครเมตร)



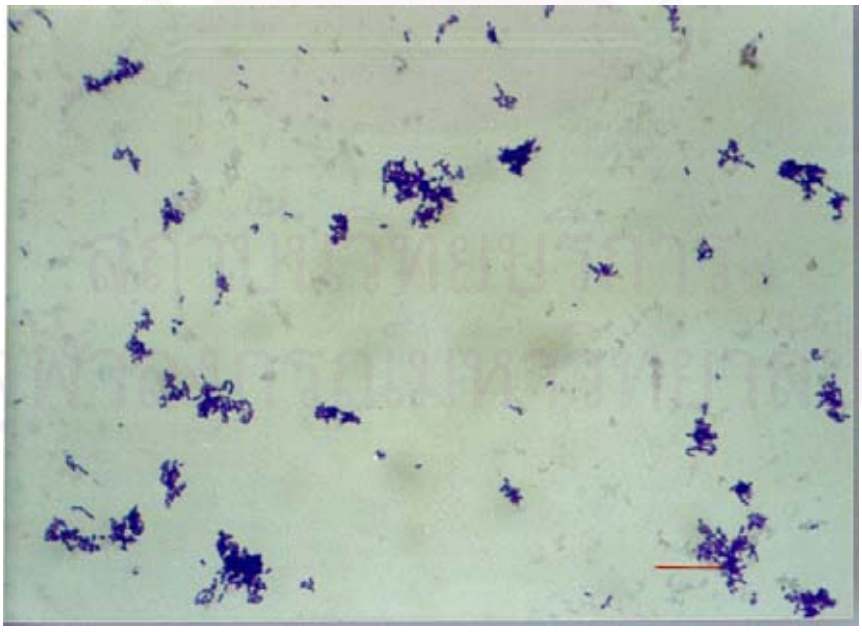
รูปที่ 15 ผลของสารสกัดจากชา ที่ระดับความเข้มข้น 0.3% ต่อแอคติวิตีของกลูแคนไบน์ดิงเลคติน ในเชื้อ ATCC 25175 (เครื่องหมายบาร์ = 10 ไมโครเมตร)



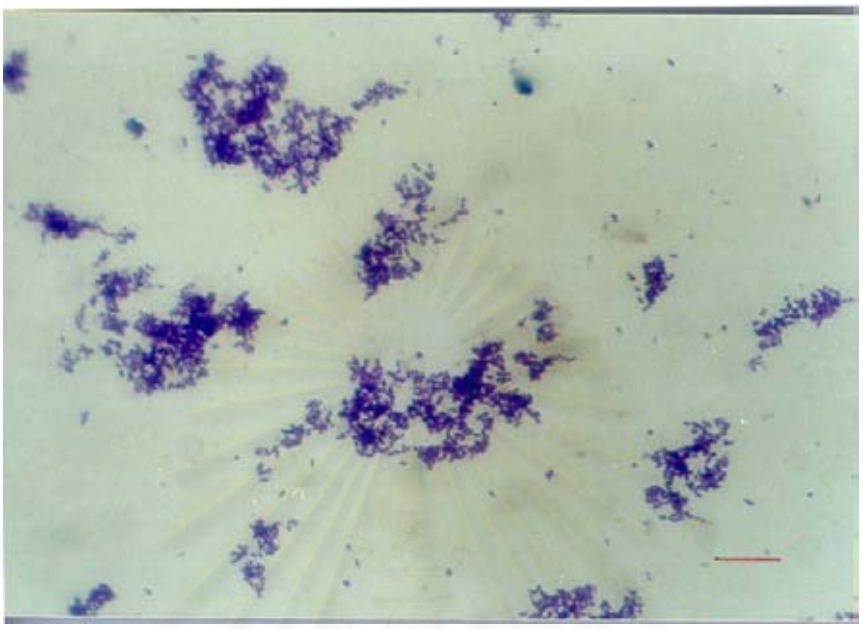
รูปที่ 16 ผลของสารสกัดจากชา ที่ระดับความเข้มข้น 0.5% ต่อแอคติวิตีของกลูแคนไบน์ดิงเลคติน ในเชื้อ ATCC 25175 (เครื่องหมายบาร์ = 10 ไมโครเมตร)



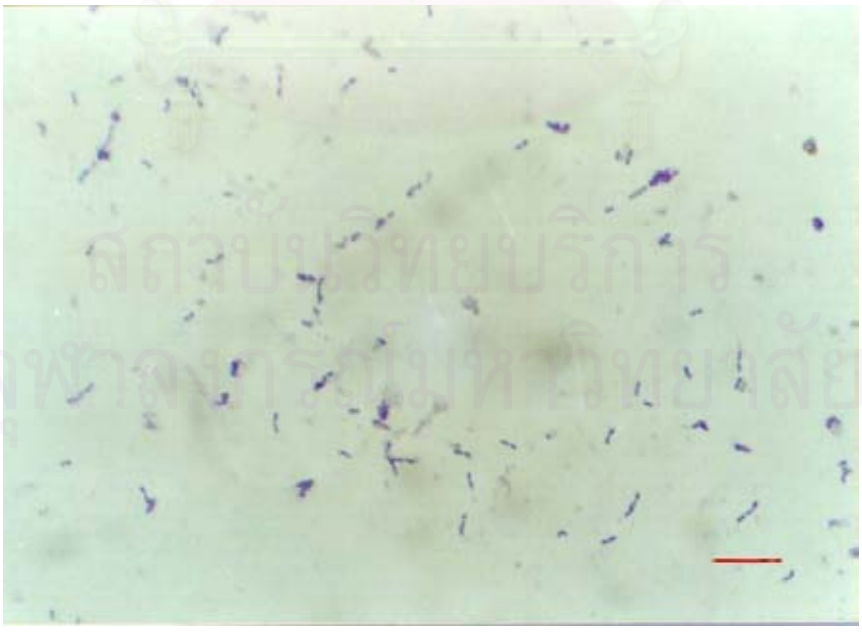
รูปที่ 17 ผลของสารสกัดจากชุมเห็ดเทศ ที่ระดับความเข้มข้น 0.5% ต่อแอคติวิตีของกลูแคนไบน์ดิงเลคตินในเชื้อ ATCC 25175 (เครื่องหมายบาร์ = 10 ไมโครเมตร)



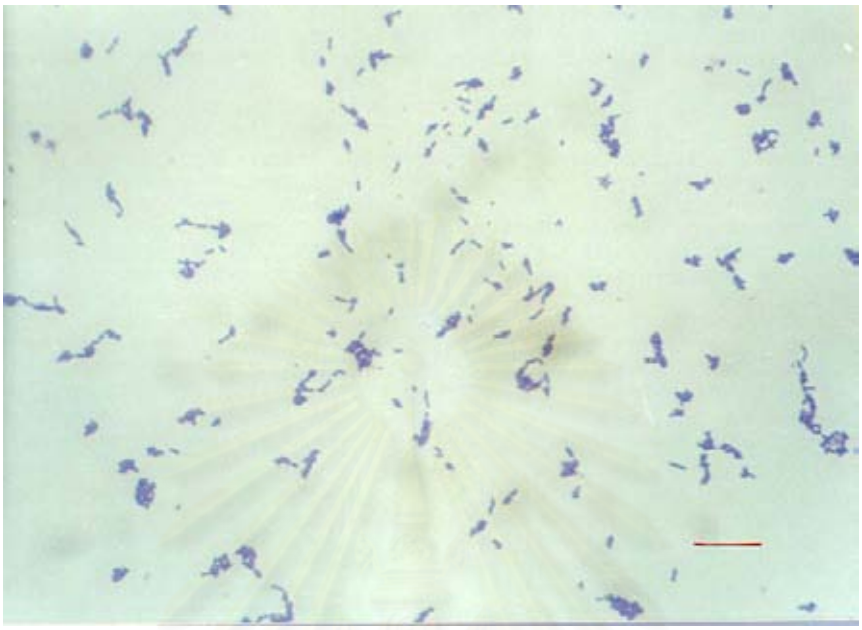
รูปที่ 18 ผลของสารสกัดจากฟ้าทะลายโจร ที่ระดับความเข้มข้น 0.5% ต่อแอคติวิตีของกลูแคนไบน์ดิงเลคติน ในเชื้อ ATCC 25175 (เครื่องหมายบาร์ = 10 ไมโครเมตร)



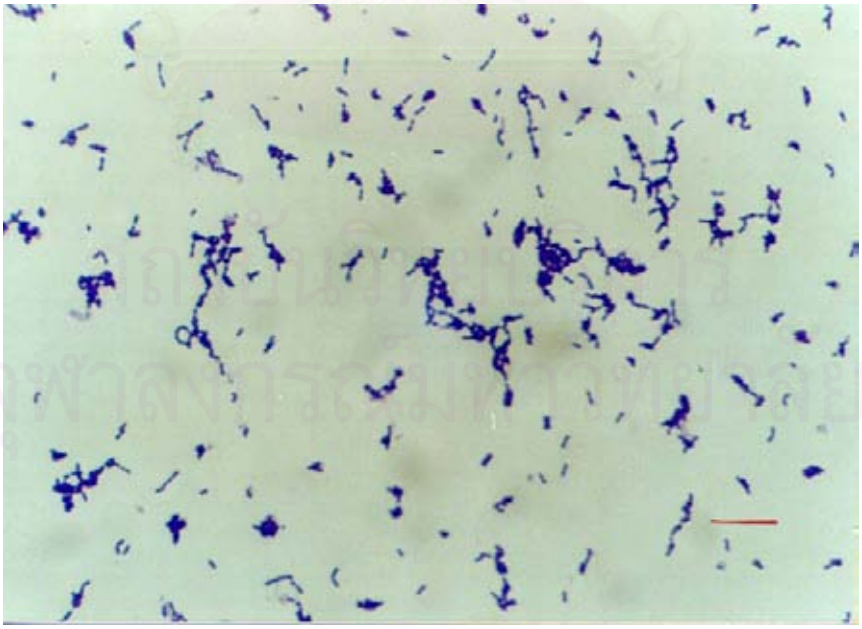
รูปที่ 19 ผลของสารสกัดจากสีฟันคนทา ที่ระดับความเข้มข้น 0.5% ต่อแอคติวิตีของกลูแคนไบน์ดิงเลคตินในเชื้อ ATCC 25175 (เครื่องหมายบาร์ = 10 ไมโครเมตร)



รูปที่ 20 ผลของสารสกัดจากชุมเห็ดเทศ ที่ระดับความเข้มข้น 0.4% ต่อแอคติวิตีของกลูแคนไบน์ดิงเลคตินในเชื้อ TPF-1 (เครื่องหมายบาร์ = 10 ไมโครเมตร)



รูปที่ 21 ผลของสารสกัดจากชุมเห็ดเทศ ที่ระดับความเข้มข้น 0.5% ต่อแอคติวิตีของกลูแคนไบน์ดิงเลคตินในเชื้อ TPF-1 (เครื่องหมายบาร์ = 10 ไมโครเมตร)



รูปที่ 22 ผลของสารสกัดจากฟ้าทะลายโจร ที่ระดับความเข้มข้น 0.5% ต่อแอคติวิตีของกลูแคนไบน์ดิงเลคติน ในเชื้อ TPF-1 (เครื่องหมายบาร์ = 10 ไมโครเมตร)

ตารางที่ 9 ผลของสารสกัดจากสมุนไพรชนิดต่าง ๆ ต่อแอคติวิตีของกลูแคนไบน์ดิงเลคติน ในเชื้อ ATCC 25175 และ TPF-1

ชนิดของสมุนไพร	การรวมกลุ่มของเซลล์แบคทีเรีย	
	เชื้อ ATCC 25175	เชื้อ TPF-1
ชา 0.3 %	++[#]	NA*
ชา 0.5 %	++	NA
ชุมเห็ดเทศ 0.4 %	NA	-[฿]
ชุมเห็ดเทศ 0.5 %	+[@]	-
ฟ้าทะลายโจร 0.5 %	+	+
สีฟันคนทา 0.5 %	++	NA

[#] ++ หมายถึง มีการรวมกลุ่มของเซลล์อย่างมาก

[@] + หมายถึง มีการรวมกลุ่มของเซลล์

[฿] - หมายถึง ไม่มีการรวมกลุ่มของเซลล์

* NA = ไม่ได้ทำการทดสอบ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

อภิปราย สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

อภิปรายผลการวิจัย

เชื้อแบคทีเรียในช่องปาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อสเตร็พโตคอคไค มีความสามารถในการยึดเกาะกับผิวฟันได้สูง กระบวนการยึดเกาะนี้ เป็นขั้นตอนแรกในการเกิดคราบจุลินทรีย์ และนำไปสู่การเกิดโรคฟันผุต่อไป (Schilling and Doyle, 1995) ดังนั้น หากสามารถยับยั้งหรือลดการยึดเกาะของเชื้อ ก็จะเป็นผลให้เชื้อนั้นทำลายตัวฟันไม่ได้หรือได้น้อยลง ปัจจุบันมีความพยายามที่จะนำสมุนไพรและพืชบางชนิดมาใช้ในการรักษาและป้องกันโรคต่าง ๆ มากขึ้น ดังนั้น การวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาผลของสารสกัดจากสมุนไพรไทยชนิดต่าง ๆ ในการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25175 และสายพันธุ์ TPF-1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากคนไทย สำหรับสมุนไพรที่เลือกนำมาศึกษาในครั้งนี้ เป็นสมุนไพรที่ยังไม่มีผู้ศึกษาในแง่การยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อมาก่อน ยกเว้นชา ที่มีรายงานวิจัยผลของชาอู่ล่งและชาเขียวญี่ปุ่น (Otake et al., 1991; Ooshima et al., 1993; Nakahara et al., 1993; Matsumoto et al., 1999) แต่ชาที่ได้เลือกนำมาวิจัยในครั้งนี้ มิใช่ชา 2 ชนิดดังกล่าว หากเป็นชาจีนใบคอ หมายถึง ชาจีนชนิดใบที่มีสีดำเข้มกว่าชาจีนทั่วไป (บริษัท ชาระมิงค์ จำกัด, จดหมาย, 6 มกราคม 2544) ซึ่งเป็นชาที่ปลูกในประเทศไทย

การทดสอบการยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรียในช่องปากกับผิวฟัน ที่ทำในห้องปฏิบัติการนั้น สามารถทดสอบกับวัสดุได้หลายชนิด เช่น แผ่นโลหะ, ลวด, ผิวแก้ว, ไฮดรอกซีอะพาไทท์, ผงเคลือบฟัน หรือ ฟันที่นำมาตัดแบ่ง ในการวิจัยครั้งนี้ ได้เลือกใช้การทดสอบกับไฮดรอกซีอะพาไทท์ ซึ่งเป็นแคลเซียมฟอสเฟตรูปแบบหนึ่ง เนื่องจากมีข้อดีหลายประการ กล่าวคือ มีคุณลักษณะเป็นตัวแทนที่ดีของฟัน สามารถจับกับโปรตีนในน้ำลายได้เช่นเดียวกับเคลือบฟัน และแคลเซียมฟอสเฟตรูปแบบนี้มีความหนาแน่น สามารถแยกออกจากเชื้อแบคทีเรียที่แขวนลอยอยู่ได้ง่าย (Schilling and Doyle, 1995) นอกจากนี้ การนำมาใช้งานก็ไม่ยุ่งยากนัก และสามารถทำซ้ำได้ อย่างไรก็ตาม การทดสอบวิธีนี้มีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง และจำนวนชนิดของสมุนไพรที่น่าสนใจจะนำมาทดสอบก็มีถึง 6 ชนิด จึงได้เลือกทำการศึกษานำร่องก่อน เพื่อคัดทิ้งสารสกัดจากสมุนไพรที่ให้ผลยับยั้งต่ำ ซึ่งใช้เกณฑ์ 50% โดยใช้วิธีการทดสอบการยึดเกาะกับผิวแก้ว ซึ่งมีกลไกในการยึดเกาะที่อาศัยกลูแคน เช่นเดียวกับการยึดเกาะกับผิวฟัน (Hamada et al., 1984; Curtiss, 1986; Gibbons, 1989)

การทดสอบการยับยั้งการยึดเกาะกับผิวแก้วในงานวิจัยนี้ พบว่า สารสกัดจากสมุนไพรที่นำมาทดสอบ ณ ความเข้มข้น 0.5% ให้ผลยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์มากกว่า 50% ยก

เว้นข่อย (รูปที่ 1) และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการยึดเกาะกับผิวแก้วระหว่างเชื้อ ATCC 25175 กับเชื้อ TPF-1 พบว่า สารสกัดจากสมุนไพรที่นำมาทดสอบ ให้ผลยับยั้งในเชื้อ 2 สายพันธุ์ไม่แตกต่างกัน ยกเว้นข่อย (ตารางที่ 2) สำหรับผลการศึกษาชานั้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ooshima และคณะ (1993) และ Nakahara และคณะ (1993) ที่ได้ศึกษาผลของสารโพลิฟีนอลที่สกัดได้จากชาอู่ล่ง ต่อการยึดเกาะของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ สายพันธุ์ MT8148R กับผิวแก้ว แม้ว่าในการศึกษาดังกล่าว จะพบระดับการยับยั้ง 50% ที่ความเข้มข้นประมาณ 0.025% ซึ่งต่ำกว่าความเข้มข้นที่ใช้ในการวิจัยนี้ 20 เท่า แต่ก็สามารถอธิบายได้ว่า สารสกัดจากชาที่ใช้ในงานวิจัยดังกล่าว เป็นสารโพลิฟีนอล ซึ่งเป็นสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ (partial purified) ในขณะที่ สารสกัดจากชาที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ เป็นสารสกัดแบบหยาบ (crude extract)

สำหรับข่อย เมื่อได้พิจารณาถึงสาเหตุที่เลือกสมุนไพรชนิดนี้มาทำการทดสอบ คือ มีงานวิจัยของ Wongkham และคณะ (1996) ที่รายงานถึงฤทธิ์ฆ่าเชื้อของสารสกัดจากข่อยความเข้มข้น 0.2% ต่อเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ สายพันธุ์ ATCC 25175 และ TPF-1 และผู้วิจัยคาดว่าสารสกัดจากข่อยน่าจะมีผลยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อด้วยนั้น แต่เมื่อทำการทดลองครั้งนี้ กลับพบว่า สารสกัดจากข่อยไม่ให้ผลยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อกับผิวแก้ว จึงอาจเป็นไปได้ที่ใบข่อยที่นำมาใช้ในการวิจัยครั้งนี้ มีความแตกต่างจากใบข่อยที่ใช้ในงานวิจัยดังกล่าว ดังนั้น จึงได้ทำการทดสอบฤทธิ์การฆ่าเชื้อของสารสกัดจากข่อยเพื่อเป็นการยืนยันด้วย ผลการทดสอบพบว่า สารสกัดจากข่อยในงานวิจัยนี้ไม่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ แต่มีผลลดการเจริญเติบโตของเชื้อ ซึ่งตรงกับงานวิจัยของเทอดพงษ์ ตรีรัตน์ และบุญนิตย์ ทวีบูรณ์ (2530) ที่รายงานว่า สารสกัดจากข่อยที่ความเข้มข้น 0.14% มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ ความแตกต่างของผลที่ได้ดังกล่าว อาจมีสาเหตุมาจากใบข่อยที่ใช้ เนื่องจากงานวิจัยของ Wongkham และคณะนั้น ใช้ใบข่อยที่ปลูกเอง แต่งานวิจัยครั้งนี้ ใช้ใบข่อยที่ซื้อมาจากร้านขายยาสมุนไพร

จากการศึกษานำร่องข้างต้น จึงได้ทำการทดสอบฤทธิ์การฆ่าเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากสมุนไพรเพียง 5 ชนิด โดยได้คัดทิ้งสารสกัดจากข่อย เนื่องจากให้ผลการยับยั้งการยึดเกาะกับผิวแก้วต่ำกว่าเกณฑ์ที่ตั้งไว้ การทดสอบนี้เริ่มต้นที่ความเข้มข้นของสารสกัดจากสมุนไพร 0.5% ก่อน หากความเข้มข้นนี้มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ จึงจะทำการทดสอบที่ความเข้มข้นต่ำกว่า ผลการทดลองพบว่า สารสกัดจากสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ไม่มีฤทธิ์ฆ่าหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ เนื่องจากเชื้อยังสามารถเจริญเติบโตได้ในปริมาณที่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3) ผลที่ได้นี้แตกต่างจากงานวิจัยที่ศึกษาผลของสมุนไพรต่อเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ ได้แก่ ผลของสารสกัดแบบหยาบจากฟ้าทะลายโจร ที่ความเข้มข้น 0.85% และ 0.625% ต่อเชื้อสายพันธุ์ $KPSK_2$ และ GS-5 ตามลำดับ (ชลธิชา อมรฉัตร และคณะ, 2534) และผลของสารสกัดแบบหยาบ

จากสีฟันคนทา ที่ความเข้มข้น 16% และ 5% ต่อเชื้อสายพันธุ์ $KPSK_2$ และ GS-5 ตามลำดับ (Tandhachoon et al., 1993) ซึ่งพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ ความแตกต่างนี้น่าจะเนื่องมาจากความเข้มข้นของสารสกัดจากสมุนไพรที่ใช้ในการศึกษานี้ต่ำกว่าความเข้มข้นที่ใช้ในงานวิจัยดังกล่าว อย่างไรก็ตาม มีรายงานการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่ความเข้มข้นต่ำ ได้แก่ การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสายพันธุ์ MT8148R โดยสารโพลิฟีนอลจากชาอู่ล่ง ที่ความเข้มข้น 0.1% (Matsumoto et al., 1999) และการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสายพันธุ์ MT8148R และ IFO 13955 โดยสารโพลิฟีนอลจากชาเขียวญี่ปุ่น ที่ความเข้มข้น 0.025% (Sakanaka et al., 1989) ซึ่งสารสกัดจากสมุนไพรที่ใช้ในงานวิจัยดังกล่าวเป็นสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ การที่สารสกัดจากสมุนไพรบางชนิดมีผลลดการเจริญเติบโตของเชื้อ อาจเป็นไปได้ว่า สารสกัดจากสมุนไพรไปยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเชื้อ (Matsumoto et al., 1999)

หลังจากทดสอบสารสกัดจากสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 0.5% แล้วไม่พบว่ามีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ จึงนำสารสกัดจากสมุนไพรเหล่านั้นมาทดสอบผลการยับยั้งการยึดเกาะกับไฮดรอกซีอะพาไทท์ ผลการทดสอบพบว่า มีความแตกต่างจากการทดสอบกับผิวแก้ว กล่าวคือ ชา, ชุมเห็ดเทศ, ฟ้าทะลายโจร และสีฟันคนทา มีผลยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อ ATCC 25175 สูงกว่า 50% ขณะที่มีเพียงชุมเห็ดเทศและฟ้าทะลายโจรที่มีผลยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อ TPF-1 สูงกว่า 50% และสมุนไพรทุกชนิดให้ผลในการยับยั้งการยึดเกาะกับผิวแก้วของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์มากกว่าไฮดรอกซีอะพาไทท์ นอกจากนี้ ผลการทดสอบยังมีความแตกต่างระหว่างเชื้อ 2 สายพันธุ์ด้วย โดยเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบผลการยับยั้งของสารสกัดจากชาต่อเชื้อ 2 สายพันธุ์ จะเห็นว่า มีความแตกต่างอย่างเห็นได้ชัด กล่าวคือ ชาสามารถยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อ ATCC 25175 ได้เกือบ 80% แต่กลับไม่มีผลยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อ TPF-1 (เปอร์เซนต์การยึดเกาะเท่ากับ 98.24 $\pm$ 1.85%) (รูปที่ 2) แสดงให้เห็นว่า สายพันธุ์ที่แตกต่างกัน มีผลต่อการตอบสนองต่อสารหรือยา โดยอาจเป็นผลมาจากความแตกต่างของตำแหน่งที่ยึดเกาะของแต่ละสายพันธุ์ (Gibbons and Etherden, 1982) ซึ่งอาจนำไปสู่การตอบสนองต่อไกลโคโปรตีนในน้ำลายในลักษณะที่แตกต่างกันได้ (Applebaum et al., 1979) ส่วนในประเด็นที่ผลการทดสอบกับไฮดรอกซีอะพาไทท์แตกต่างจากการทดสอบกับผิวแก้ว แม้ว่าทั้ง 2 วิธีการจะอาศัยกลไกการยึดเกาะด้วยกลูแคนเช่นเดียวกันนั้น สามารถอธิบายได้ว่า ในการยึดเกาะกับไฮดรอกซีอะพาไทท์นั้น มีองค์ประกอบอื่นที่สำคัญเข้ามาเกี่ยวข้องด้วย คือ โปรตีนในน้ำลาย ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องในกระบวนการยึดเกาะแบบจำเพาะเจาะจงของเชื้อ ทำให้การยึดเกาะของเชื้อกับไฮดรอกซีอะพาไทท์มีความแข็งแรงมากกว่าการยึดเกาะกับผิวแก้ว สารสกัดจากสมุนไพรจึงมีผลยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อกับไฮดรอกซีอะพาไทท์ได้น้อยกว่าการยึดเกาะกับผิวแก้ว นอกจากนี้ เวลาที่ใช้ในการทดสอบก็ไม่เท่ากัน คือ การยึดเกาะกับผิวแก้ว ต้องใช้เวลาถึง 6 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการยึดเกาะของ

เชื้อเพียงพอที่จะมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ซึ่งช่วงเวลาขนาดนั้น จะมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเชื้อขึ้น ค่าที่วัดได้จึงเป็นค่าการยึดเกาะของเชื้อที่มีการเจริญเติบโต ในขณะที่การยึดเกาะกับไฮดรอกซีอะพาไทท์ ใช้เวลาเพียง 1 ชั่วโมง ก็เพียงพอแล้วสำหรับการวัดปริมาณรังสี ค่าที่วัดได้จึงเป็นค่าการยึดเกาะของเชื้อที่มีอยู่เดิม ปัจจัยเหล่านี้ น่าจะมีผลให้การตอบสนองต่อสารสกัดจากสมุนไพรจากการทดสอบ 2 วิธีมีความแตกต่างกัน

จากรายงานการศึกษาในอดีตที่ผ่านมาเกี่ยวกับการยึดเกาะของเชื้อกับไฮดรอกซีอะพาไทท์ที่เคลือบด้วยน้ำลาย มีรายงานของ Matsumoto และคณะ (1999) กล่าวว่า สารโพลิฟีนอลจากชาอู่ล่งที่ความเข้มข้น 0.1% สามารถยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ MT8148R ได้ 58% นอกจากนี้ Otake และคณะ (1991) ก็ได้รายงานผลยับยั้งของสารโพลิฟีนอลจากชาเขียวญี่ปุ่น ต่อการยึดเกาะของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ JC-2 ที่ความเข้มข้น 0.01% โดยสามารถยับยั้งได้ 83.1% ส่วนสมุนไพรชนิดอื่น ๆ ยังไม่มีรายงานการศึกษาถึงผลของสมุนไพรต่อการยึดเกาะของเชื้อกับไฮดรอกซีอะพาไทท์เลย

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการยึดเกาะกับไฮดรอกซีอะพาไทท์ของเชื้อ ATCC 25175 ระหว่างสมุนไพรชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ชา, ชุมเห็ดเทศ, ฟ้าทะลายโจร และสีฟันคนทา พบว่า ชาสามารถยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อได้มากกว่าสีฟันคนทาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ซึ่งเมื่อพิจารณาถึงงานวิจัยที่ผ่านมา (Matsumoto et al., 1999; Ooshima et al., 1993) ที่แสดงให้เห็นว่าชาอู่ล่งสามารถยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อ ทั้งกับผิวแก้วและไฮดรอกซีอะพาไทท์ได้สูง ณ ความเข้มข้นต่ำ ก็น่าจะเป็นข้อสนับสนุนถึงประสิทธิภาพของชาในการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ ส่วนชุมเห็ดเทศ และฟ้าทะลายโจร มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อได้ไม่แตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในเชื้อ TPF-1 ด้วย (ตารางที่ 4 และ 5) นอกจากนี้ เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสมุนไพรชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 0.5% ในการยับยั้งการยึดเกาะกับไฮดรอกซีอะพาไทท์ระหว่างเชื้อ ATCC 25175 กับเชื้อ TPF-1 พบว่า สารสกัดจากฟ้าทะลายโจร ให้ผลในการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อ ATCC 25175 สูงกว่าเชื้อ TPF-1 (ตารางที่ 6)

การประเมินผลการยับยั้งการยึดเกาะกับไฮดรอกซีอะพาไทท์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ มีจุดมุ่งหมายเพื่อตรวจสอบแนวโน้มการตอบสนองต่อสารสกัดจากสมุนไพร และเพื่อหาค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งการยึดเกาะได้อย่างน้อย 50% พบว่า การตอบสนองต่อสารสกัดจากสมุนไพรของเชื้อ 2 สายพันธุ์ เป็นไปในทิศทางเดียวกัน คือ มีลักษณะขึ้นกับปริมาณสาร (dose-dependent) (รูปที่ 3, 4, 5, 6, 7 และ 8) สำหรับความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ให้ผลยับยั้งเชื้อได้อย่างน้อย 50% สำหรับเชื้อ ATCC 25175 ได้แก่ ชา 0.3%, ชุมเห็ดเทศ 0.5%, ฟ้าทะลายโจร 0.5% และสีฟันคนทา 0.5% ส่วนเชื้อ TPF-1 ได้แก่ ชุมเห็ดเทศ 0.4% และฟ้าทะลายโจร 0.5% หมายความว่า ชาให้ผลยับยั้งเชื้อ ATCC 25175

ได้อย่างน้อย 50% ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 0.5% และชุมเห็ดเทศให้ผลยับยั้งเชื้อ TPF-1 ได้อย่างน้อย 50% ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 0.5% จึงได้ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างชา 0.3% กับ 0.5% ในเชื้อ ATCC 25175 และระหว่างชุมเห็ดเทศ 0.4% กับ 0.5% ในเชื้อ TPF-1 ผลปรากฏว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แสดงให้เห็นว่า ชาและชุมเห็ดเทศ มีประสิทธิภาพสูงกว่าสมุนไพรชนิดอื่น ในการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อ ATCC 25175 และ TPF-1 ตามลำดับ เนื่องจากสามารถใช้ที่ความเข้มข้นต่ำได้

กลไกการยึดเกาะของเชื้อที่เกี่ยวข้องกับน้ำตาลซูโครส ซึ่งเป็นผลให้เชื้อสามารถยึดเกาะได้อย่างแข็งแรงนั้น เกิดจากการที่เชื้อสังเคราะห์สารประเภทโพลิแซคคาไรด์ที่ไม่ละลายน้ำ จากน้ำตาลซูโครส โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส สารนี้ คือ กลูแคน (Hamada et al., 1984; Curtiss, 1986; Gibbons, 1989) ดังนั้น การยับยั้งกลไกการผลิตกลูแคน จะมีผลจำกัดการยึดเกาะของเชื้อได้ ในงานวิจัยครั้งนี้ จึงได้ศึกษาการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส ซึ่งเป็นกลไกสำคัญที่มีผลลดการยึดเกาะของเชื้อ โดยทดสอบชา 0.3%, ชา 0.5%, ชุมเห็ดเทศ 0.5%, ฟ้าทะลายโจร 0.5% และสีฟันคนทา 0.5% กับเชื้อ ATCC 25175 และทดสอบชุมเห็ดเทศ 0.4%, ชุมเห็ดเทศ 0.5% และฟ้าทะลายโจร 0.5% กับเชื้อ TPF-1 พบว่า สารสกัดจากสมุนไพรทุกชนิดมีผลลดแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p< 0.01$) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากสมุนไพรดังกล่าวสามารถยับยั้งกลไกการสร้างกลูแคน เป็นผลให้เชื้อยึดเกาะได้น้อยลง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง สารสกัดจากชา 0.5% สามารถลดแอคติวิตีของเอนไซม์จากเชื้อ ATCC 25175 ได้มากกว่า 90% (รูปที่ 9) และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส ระหว่างสารสกัดจากสมุนไพรแต่ละชนิด พบว่า ในการทดสอบกับเชื้อ ATCC 25175 ชา 0.3% และ0.5% ให้ผลสูงกว่าสารสกัดจากสมุนไพรชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p <0.01$) (ตารางที่ 7) ผลการวิจัยนี้สนับสนุนผลการศึกษาของ Nakahara และคณะ (1993) ซึ่งรายงานการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ MT8148R โดยสารโพลิฟีนอลจากชาอู่ล่ง และพบว่าสารนี้สามารถลดการทำงานของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรสลงได้เกือบสมบูรณ์ เมื่อใช้ความเข้มข้นสูงกว่า 0.025% นอกจากนี้ Otake และคณะ (1991) ยังได้รายงานว่า สารโพลิฟีนอลจากชาเขียวญี่ปุ่น สามารถลดแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรสลงได้ 67.5% เมื่อใช้ความเข้มข้น 0.33%

เมื่อพิจารณาผลของสารสกัดจากสมุนไพรแต่ละชนิดในการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อกับไฮดรอกซีอะพาไทท์ และการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส พบว่า สารสกัดจากสมุนไพรบางชนิดให้ผลการทดสอบทั้ง 2 การทดสอบไปในทิศทางเดียวกัน กล่าวคือ สารสกัดจากชาให้ผลยับยั้งเชื้อ ATCC 25175 สูง ทั้งในการยับยั้งการยึดเกาะและการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์

ขณะที่สารสกัดจากสมุนไพรชนิดอื่น ๆ ให้ผลการยับยั้งเชื้อ ATCC 25175 และ TPF-1 ไม่สูง ทั้งในการยับยั้งการยึดเกาะและการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ แสดงว่า การที่สารสกัดจากชาสามารถยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อ ATCC 25175 กับไฮดรอกซีอะพาไทท์ได้มากนั้น น่าจะเป็นผลส่วนใหญ่จากกลไกที่สารสกัดจากชายับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส ส่วนในสารสกัดจากสมุนไพรชนิดอื่น ๆ จะเป็นผลส่วนใหญ่จากกลไกเดียวกันนี้หรือไม่ ยังไม่สามารถสรุปได้

การศึกษาวิจัยเพื่อหาสารที่ไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรสที่ทำกันอยู่ในปัจจุบัน ส่วนใหญ่จะศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์ในสารละลาย มิได้ศึกษาเอนไซม์ในลักษณะที่ยึดเกาะอยู่กับเพลลิเคิลบนตัวฟัน Wunder และ Bowen (1999) ได้ศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรสของสารบางชนิด ระหว่างการทดสอบกับเอนไซม์ในรูปสารละลาย กับในรูปที่เอนไซม์ยึดเกาะกับไฮดรอกซีอะพาไทท์ที่เคลือบด้วยน้ำลาย พบว่า เอนไซม์ที่อยู่ในรูปยึดเกาะกับเพลลิเคิล จะมีความต้านทานต่อการยับยั้งของสารเหล่านั้น สูงกว่าเอนไซม์ในรูปสารละลาย แสดงว่า การศึกษาปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรสในลักษณะดังกล่าว อาจมีความแตกต่างจากในสารละลายได้ในการวิจัยครั้งนี้ ได้ทำการศึกษาการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรสซึ่งอยู่ในรูปสารละลายเท่านั้น การทดสอบสารเดียวกันนี้ โดยศึกษาเอนไซม์ที่อยู่ในรูปยึดเกาะกับเพลลิเคิล จะให้ผลที่แตกต่างไปหรือไม่ เป็นสิ่งที่จะต้องศึกษาต่อไป

ในการยึดเกาะเพื่อเพิ่มจำนวนของเชื้อ นอกจากจะขึ้นอยู่กับเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรสซึ่งมีบทบาทในการสร้างกลูแคนแล้ว ยังอาจขึ้นอยู่กับกลูแคนไบน์ดิงเลคตินด้วย กลูแคนไบน์ดิงเลคตินมีความสำคัญในการทำให้เซลล์แบคทีเรียมารวมกลุ่มกัน (Denson and Doyle, 1998) ดังนั้น กลไกการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้ออีกกลไกหนึ่ง นอกเหนือจากการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส ที่ได้ศึกษาในงานวิจัยครั้งนี้ คือ การยับยั้งแอคติวิตีของกลูแคนไบน์ดิงเลคติน ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดจากฟ้าทะลายโจรมีผลทำให้แอคติวิตีของกลูแคนไบน์ดิงเลคตินของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ลดลง เช่นเดียวกับสารสกัดจากชุมเห็ดเทศ 0.5% ในการทดสอบกับเชื้อ ATCC 25175 แต่สารสกัดจากชุมเห็ดเทศ 0.4% และ 0.5% สามารถยับยั้งแอคติวิตีของกลูแคนไบน์ดิงเลคตินได้ ในการทดสอบกับเชื้อ TPF-1 ส่วนสารสกัดจากชาและสีฟันคนทา ไม่ให้ผลลดหรือยับยั้งเลย (รูปที่ 15-22 และ ตารางที่ 9) แสดงว่า สารสกัดจากชุมเห็ดเทศและฟ้าทะลายโจร สามารถยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อ โดยลดการรวมกลุ่มของเซลล์ เมื่อพิจารณาผลการทดสอบนี้ร่วมกับการทดสอบกลไกการทำงานของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรสแล้ว ทำให้กล่าวได้ว่า สารสกัดจากชุมเห็ดเทศและฟ้าทะลายโจรสามารถยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ โดยผ่านกลไกอย่างน้อย 2 กลไก คือ การยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส และการยับยั้งแอคติวิตีของกลูแคนไบน์ดิงเลค

ติน ส่วนสารสกัดจากชาและสีฟันคนทานั้น สามารถยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ ATCC 25175 โดยผ่านกลไกอย่างน้อย 1 กลไก คือ การยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส ส่วนกลไกอื่น ๆ ที่อาจเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อนั้น ได้แก่ การยับยั้งการทำงานของแอดฮีซินบางชนิด การเสียสภาพการยึดเกาะกับผิวฟัน (detachment) และไฮโดรโฟบิซิตี้ของผิวเซลล์ (cell surface hydrophobicity) ซึ่งแม้ว่าจะยังไม่เป็นที่แน่ชัดว่าเชื้อก่อโรคฟันผุนั้น มีความสัมพันธ์กับคุณสมบัติดังกล่าว (Koga et al., 1986) แต่ก็เป็นที่ยอมรับกันทั่วไปว่า ความสามารถของเชื้อในการยึดเกาะกับผิวฟันนั้น เกี่ยวข้องกับแรงหลายชนิด รวมถึงอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิคด้วย (Gibbons, 1984; Svanberg et al., 1984; Ohta et al., 1989) และอาจมีกลไกอื่น ๆ อีก ซึ่งเป็นเรื่องที่จะต้องศึกษาต่อไป จากการศึกษางานวิจัยในอดีตที่ผ่านมา ไม่ปรากฏว่ามีงานที่ทำการศึกษาการยับยั้งแอคติวิตีของกลูแคนไบน์ดิงเลคตินในเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ แต่มีรายงานการศึกษาที่กระทำในเชื้อสเตร็พโตคอคคัส โซไบรนัส โดย Luengpailin และคณะ (2000) รายงานว่าฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้นประมาณ 1.5 mM มีผลลดแอคติวิตีของกลูแคนไบน์ดิงเลคตินได้ 50%

เมื่อพิจารณาผลของสารสกัดจากสมุนไพรแต่ละชนิดในการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อกับไฮดรอกซีอะพาไทท์ การยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส และการยับยั้งแอคติวิตีของกลูแคนไบน์ดิงเลคติน จะเห็นได้ว่า ผลการยับยั้งการยึดเกาะกับไฮดรอกซีอะพาไทท์ของเชื้อ ATCC 25175 โดยสารสกัดจากชานั้น น่าจะเป็นผลจากกลไกการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส เนื่องจากสารสกัดจากชาให้ผลยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรสสูง แต่ไม่มีผลต่อแอคติวิตีของกลูแคนไบน์ดิงเลคติน ขณะที่ผลการยับยั้งการยึดเกาะกับไฮดรอกซีอะพาไทท์ของเชื้อ ATCC 25175 โดยสารสกัดจากสีฟันคนทา น่าจะเป็นผลจากกลไกการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรสเช่นกัน เนื่องจากสารสกัดจากสีฟันคนทาให้ผลยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรสพอสมควร แต่ไม่มีผลต่อแอคติวิตีของกลูแคนไบน์ดิงเลคติน ส่วนผลการยับยั้งการยึดเกาะกับไฮดรอกซีอะพาไทท์ของเชื้อ ATCC 25175 และ TPF-1 โดยสารสกัดจากชุมเห็ดเทศและฟ้าทะลายโจรนั้น น่าจะเป็นผลจากกลไกการยับยั้งแอคติวิตีของกลูแคนไบน์ดิงเลคติน เนื่องจากสารสกัดจากชุมเห็ดเทศและฟ้าทะลายโจรให้ผลยับยั้งหรือลดแอคติวิตีของกลูแคนไบน์ดิงเลคติน แต่มีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรสไม่มากนัก ซึ่งเมื่อพิจารณาถึงขั้นตอนในการทำงานของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรสและกลูแคนไบน์ดิงเลคติน ในกระบวนการยึดเกาะของเชื้อแล้ว จะเห็นได้ว่า เชื้อจะผลิตกลูแคนโดยอาศัยเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรสก่อน จากนั้นจึงจะเกิดการรวมกลุ่มของเชื้อในสภาวะที่มีกลูแคนโดยผ่านการทำงานของกลูแคนไบน์ดิงเลคติน ดังนั้นการทำงานของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรสจึงเกิดขึ้นก่อนการทำงานของกลูแคนไบน์ดิงเลคติน แสดงว่า การยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อโดยสารสกัดจากชาและสีฟันคนทา น่าจะเกิดขึ้นในลำดับก่อน

การยับยั้งโดยสารสกัดจากชุมเห็ดเทศและฟ้าทะลายโจร นอกจากนี้ ในกรณีที่พิจารณาผลการยับยั้งการยึดเกาะของสารสกัดจากสมุนไพรต่อเชื้อแต่ละสายพันธุ์ พบว่า สารสกัดจากสมุนไพรน่าจะมีผลยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อ ATCC 25175 โดยผ่านกลไกการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรสและกลูแคนไบน์ดิงเลคติน เนื่องจากสารสกัดจากชาสามารถลดแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรสจากเชื้อ ATCC 25175 ได้มาก ขณะเดียวกัน สารสกัดจากชุมเห็ดเทศและฟ้าทะลายโจรก็สามารถลดแอคติวิตีของกลูแคนไบน์ดิงเลคตินจากเชื้อสายพันธุ์นี้ด้วย ขณะที่ สารสกัดจากสมุนไพรน่าจะมีผลยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อ TPF-1 โดยผ่านกลไกการยับยั้งแอคติวิตีของกลูแคนไบน์ดิงเลคติน เนื่องจากสารสกัดจากชุมเห็ดเทศและฟ้าทะลายโจรสามารถลดหรือยับยั้งแอคติวิตีของกลูแคนไบน์ดิงเลคตินจากเชื้อ TPF-1 ได้ แต่มีผลลดแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรสได้น้อย ดังนั้น อาจเป็นไปได้ว่า เชื้อ ATCC 25175 เป็นเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์สายพันธุ์ที่เข้ามายึดเกาะและตั้งถิ่นฐานบนผิวฟันในระยะแรก ส่วนเชื้อ TPF-1 เป็นเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์สายพันธุ์ที่เข้ามายึดเกาะและตั้งถิ่นฐานบนผิวฟันในระยะหลัง

มีงานวิจัยที่ศึกษาถึงสารออกฤทธิ์สำคัญ (active ingredient) ของชาต่อเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์อยู่มาก โดย Sakanaka และคณะ (1989) ได้ศึกษาชาเขียวญี่ปุ่นพบว่า สารสำคัญในใบชาได้แก่ สารประกอบโพลิฟีนอลชนิดต่าง ๆ ซึ่งส่วนมากเป็นสารแทนนิน โดยเฉพาะอย่างยิ่งแทนนินกลุ่มคาเทชิน ส่วน Ooshima และคณะ (1991) ได้ศึกษาสารสำคัญในชาอู่ล่ง พบว่าเป็นสารประเภทโพลิฟีนอลเช่นกัน แต่มีโครงสร้างต่างจากที่พบในชาเขียวญี่ปุ่นและชาฝรั่ง และเมื่อพิจารณาถึงผลการยับยั้งการยึดเกาะและแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส โดยสารโพลิฟีนอลจากชาอู่ล่ง (Nakahara et al., 1993; Ooshima et al., 1995; Matsumoto et al., 1999) แล้ว ก็เป็นการยืนยันได้ว่า สารออกฤทธิ์สำคัญของชาในการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ ได้แก่ สารโพลิฟีนอล ส่วนสมุนไพรชนิดอื่น ๆ ที่นำมาวิจัยในครั้งนี้ ยังไม่มีรายงานที่ชัดเจนถึงสารออกฤทธิ์ในการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อ แต่ได้มีผู้ศึกษาถึงสารสำคัญในสมุนไพรดังกล่าว ได้แก่ สารแอนทราควิโนนในใบชุมเห็ดเทศ (Hauptman and Lacerda Nazario, 1950), สารนีโอแอนโดรกราโฟไลด์ในต้นฟ้าทะลายโจร (Chan et al., 1968; Chan et al., 1971), สารแทนนินในใบฝรั่ง (Osman et al., 1974; Mishra and Misra, 1981) สารไลโมนอยด์และโครโมนในสีฟันคนทา (Mitsunaga et al., 1995) ดังนั้น อาจเป็นไปได้ว่า สารเหล่านี้เป็นสารออกฤทธิ์สำคัญในการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อ

สรุปผลการวิจัย

จากงานวิจัยครั้งนี้ สามารถสรุปได้ว่า

1. สารสกัดจากชา, ชุมเห็ดเทศ, ฟ้าทะลายโจร และสีฟันคนทา มีผลยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ ATCC 25175 กับไฮดรอกซีอะพาไทท์ และมีค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ให้ผลยับยั้งอย่างน้อย 50% เท่ากับ 0.3%, 0.5%, 0.5% และ 0.5% ตามลำดับ ขณะที่สารสกัดจากชุมเห็ดเทศและฟ้าทะลายโจร มีผลยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ TPF-1 กับไฮดรอกซีอะพาไทท์ และมีค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ให้ผลยับยั้งอย่างน้อย 50% เท่ากับ 0.4% และ 0.5% ตามลำดับ
2. สารสกัดจากชาสามารถยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อ ATCC 25175 ได้สูงที่สุด รองลงมา ได้แก่ ฟ้าทะลายโจร, ชุมเห็ดเทศ และสีฟันคนทา ตามลำดับ โดยสารสกัดจากชามีผลยับยั้งสูงกว่าสีฟันคนทาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ส่วนสารสกัดจากชุมเห็ดเทศและฟ้าทะลายโจร ให้ผลยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อ TPF-1 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)
3. สารสกัดจากชุมเห็ดเทศและฟ้าทะลายโจร มีความสามารถในการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ ATCC 25175 และ TPF-1 โดยผ่านกลไกอย่างน้อย 2 กลไก คือ การยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส และการยับยั้งแอคติวิตีของกลูแคนไบน์ดิงเลคติน ขณะที่สารสกัดจากชาและสีฟันคนทานั้น สามารถยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ ATCC 25175 โดยผ่านกลไกอย่างน้อย 1 กลไก คือ การยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส

ข้อเสนอแนะ

1. เนื่องจากงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส ซึ่งอยู่ในรูปของสารละลาย ดังนั้น ควรมีการศึกษาสารสกัดจากสมุนไพรที่ให้ผลยับยั้งเหล่านี้เพิ่มเติม ในลักษณะของเอนไซม์ที่อยู่ในรูปยึดเกาะกับเพลลิเคิล เพื่อให้ผลการวิจัยมีความสมบูรณ์มากขึ้น
2. เนื่องจากงานวิจัยนี้ได้ศึกษากลไกการยึดเกาะของเชื้อเพียง 2 กลไก จึงควรศึกษาถึงกลไกอื่น ๆ เช่น การยับยั้งการทำงานของแอดฮีซินอื่น ๆ, ไฮโดรโฟบิซิตี้ของผิวเซลล์ เพื่อเป็นข้อมูลเพิ่มเติม
3. ควรมีการแยกสารออกฤทธิ์สำคัญของสมุนไพรที่ให้ผลยับยั้งเหล่านี้ เพื่อให้ได้ข้อมูลทางเภสัชวิทยาเพิ่มขึ้น และควรมีการศึกษาในด้านอื่น ๆ เพิ่มเติม ได้แก่ การศึกษาทางพิษวิทยา, การ

ศึกษาในระดับเซลล์ที่นำมาจากเนื้อเยื่อมนุษย์, การศึกษาในสัตว์ทดลอง เพื่อสามารถนำข้อมูลเหล่านี้มาเป็นประโยชน์ในการพัฒนาทางเภสัชวิทยาต่อไป

4. ในแง่ของการนำไปพัฒนาเป็นยาเพื่อใช้ทดสอบทางคลินิก เช่น น้ำยาบ้วนปาก สิ่งที่ต้องคำนึงถึง คือ สายพันธุ์ของเชื้อที่มีการตอบสนองต่อสารสกัดจากสมุนไพรเหล่านี้, ราคาของสมุนไพร, ความคุ้มค่าในการนำมาใช้ เมื่อเปรียบเทียบกับยามาตรฐาน (ถ้ามี)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กมล สวัสดีมงคล และคณะ. 2534. การศึกษาทางเภสัชวิทยาของฟ้าทะลายโจร. กรุงเทพมหานคร: กองวิจัยและพัฒนาสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.

คณะกรรมการสาธารณสุขมูลฐาน, สำนักงาน. 2529. ข้อมูลฟ้าทะลายโจร *Andrographis paniculata* (Burm.F.) Nees. กรุงเทพมหานคร: สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข.

ชลธิชา อมรฉัตร, เพชรรัตน์ ไกรวพันธุ์, วีระชัย ไกรวพันธุ์ และ เทอดพงษ์ ตรีรัตน์. 2534. ฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียในช่องปากของสารสกัดจากฟ้าทะลายโจร. ว ทันต 41: 178-185.

ชาระมิงค์ จำกัด, บริษัท. 6 มกราคม 2544. จดหมาย.

จริยา สินเดิมสุข. 2536. ฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดบริสุทธิ์จากสมุนไพรฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*) ต่อเชื้อโรคท้องร่วงที่พบมากในเมืองไทย. ว กรมการแพทย์ 18: 394-400.

จริยา สินเดิมสุข, สมเกียรติ ดีกิจเสริมพงศ์ และ วีณา จารุปรีชาชาญ. 2532. เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการรักษาโรคอุจจาระร่วงระหว่างใบฝรั่งและเปลือกมังคุด. ว เภสัช มหิดล 16: 32-35.

ทวีผล เดชาติวงศ์ ณ อยุธยา. 2532. การพัฒนายาจากชุมเห็ดเทศ. ในรายงานการสัมมนาการวิจัยและพัฒนายาจากสมุนไพร, หน้า 85-90. 23-25 สิงหาคม 2532 ณ โรงแรมขอนแก่นโฮเต็ล จังหวัดขอนแก่น.

เทอดพงษ์ ตรีรัตน์ และ บุญนิตย์ ทวีบูรณ์. 2530. การทดสอบประสิทธิภาพส่วนสกัดของข่อยต่อเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์และสเตร็พโตคอคคัส ซาไลวาเรียส. ว ทันต 37: 119-125.

ธิดารัตน์ ปลื้มใจ. 2535. ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของฟ้าทะลายโจร. ว กรมวิทย พ 34: 9-15.

ปัญจางค์ ธนังกูล และ ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ. 2528. การศึกษาทางคลินิคของสมุนไพรฟ้าทะลายโจรในโรคอุจจาระร่วงและบิดแบคทีเรีย. รามาธิบดีเวชสาร 8: 57-61.

ปัญจางค์ ธนังกูล และ ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ. 2530. การศึกษาผลทางคลินิคของใบฝรั่งในโรคอุจจาระร่วง. สารศิริราช 39: 263-267.

พยอม ตันติวัฒน์. 2521. สมุนไพร. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: สมาคมสมุนไพรแห่งประเทศไทย.

พรเพ็ญ เปรมโยธิน, พรพิมล กิจสนาโยธิน และ ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ. 2538. ฤทธิ์ป้องกันพิษต่อตับของแอนโดรกราโฟไลด์ในเซลล์ตับอิสระของหนูขาว: รายงานผลการวิจัย ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช. กรุงเทพมหานคร: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พเยาว์ เหมือนวงษ์ญาติ. 2529. ตำราวิทยาศาสตร์สมุนไพร. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์เมดิคัล มีเดีย.

รัชชพิน ศรีสัจจะลักษณ์, วรลักษณ์ ปรัชญพฤทธิ์, เทอดพงษ์ ตรีรัตน์, วินัย ลีลาพฤทธิ์ และ ธนิยา หมวดเชียงคะ. 2539. ผลของสารสกัดเหง้าข่า ใบชุมเห็ดเทศ และต้นทองพันชั่ง ต่อเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์. ว ทันต มหิดล 16: 67-74.

วันดี กฤษณพันธ์. 2537. สมุนไพรน่ารู้. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วันดี อุดมอักษร. 2536. ฤทธิ์ของสารแอนโดรกราโฟไลด์ และสารสกัดด้วยน้ำของสมุนไพรฟ้าทะลายโจรต่อพิษของเอธานอลในตับของหนูขาว. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สหสาขาเภสัชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วิทย์ เที่ยงบูรณะธรรม. 2531. พจนานุกรมสมุนไพรไทย. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: โอ.เอส. พริ้นติ้ง เฮ้าส์.

ศิริมา พรสุวัฒนกุล. 2532. การศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรฟ้าทะลายโจร และเปล้าน้อยในการยับยั้งและรักษาโรคแผลในกระเพาะอาหาร. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาเภสัชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สมพร (ภูติยานันท์) หิรัญรามเดช. 2524. หนังสือคู่มือ สมุนไพรใกล้ตัว ตอนที่ 2. พิมพ์ครั้งที่ 2. (ม.ป.ท.).

สมุนไพรเพื่อการพึ่งตนเอง, โครงการ. ศูนย์ข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. 2529. ก้าวไปกับสมุนไพร. เล่มที่ 1. กรุงเทพมหานคร: ธรรมกมลการพิมพ์.

สัณห์ ละอองศรี. 2535. ชา. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์รั้วเขียว.

สาธารณสุข, กระทรวง. กรมอนามัย, กองทันตสาธารณสุข. 2538. รายงานผลการสำรวจสภาวะทันตสุขภาพแห่งชาติ ครั้งที่ 4 พ.ศ.2537 ประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 1. (ม.ป.ท.).

สุทธิศักดิ์ จารุธนเศรษฐ์, เพชรรัตน์ สายสุวรรณ และ นิตยา นามด้วง. 2535. การรักษาโรคกลากโดยชุมเห็ดเทศครีม. สรรพสิทธิเวชสาร 13: 143-147.

เสงี่ยม พงษ์บุญรอด. 2493. ไม้เทศ, เมืองไทย สรรพคุณของยาเทศและยาไทย. (ม.ป.ท.).

เสาวภา ลิมป์พานิชกุล. 2533. การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสมุนไพรฟ้าทะลายโจรในหนูขาว. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สหสาขาเภสัชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

โสภิต ธรรมอารี, จันทิมา ปโชติการ, มณฑิรา ตัณฑ์เกยูร และ จันทนี อิทธิพานิชพงศ์. 2528. ฤทธิ์ของ

ยาสมุนไพร 30 ชนิดที่มีสรรพคุณในการรักษาโรคท้องร่วงและบิดต่อการบีบตัวของลำไส้เล็กหนูตะเภา. จุฬาลงกรณ์เวชสาร. 29: 39-51.

ภาษาอังกฤษ

Abiko, Y., Hayakawa, M., Aoki, H., Sato, S., and Takiguchi, H. 1989. Cloning of the gene for cell-surface protein antigen A from *Streptococcus sobrinus* (serotype *d*). Arch Oral Biol 34: 571-575.

Abo, H., Matsumura, T., Kodama, T., Ohta, H., Fukui, K., Kato, K., and Kagawa, H. 1991. Peptide sequences for sucrose splitting and glucan binding within *Streptococcus sobrinus* glucosyltransferase (water-insoluble glucan synthetase). J Bacteriol 173: 989-996.

Aoki, H., Shiroza, T., Hayakawa, M., Sato, S., and Kuramitsu, H.K. 1986. Cloning of a *Streptococcus mutans* glucosyltransferase gene coding for insoluble glucan synthesis. Infect Immun 53: 587-594.

Appelbaum, B., Golub, E., Holt, S., and Rosan, B. 1979. *In vitro* studies of dental plaque formation: Adsorption of oral streptococci to hydroxyapatite. Infect Immun 25: 717-728.

Babu, J.P., and Dabbous, M.K. 1986. Interaction of salivary fibronectin with oral streptococci. J Dent Res 65: 1094-1100.

Backer-Dirks, O. 1966. Post-eruptive changes in dental enamel. J Dent Res 45: 503-511.

Banas, J.A., Russell, R.R.B., and Ferretti, J.J. 1990. Sequence analysis of the gene for the glucan-binding protein of *Streptococcus mutans* Ingbritt. Infect Immun 58: 667-673.

Bauer, P.D., Trapp, C., Drake, D., Taylor, K.G., and Doyle, R.J. 1993. Acquisition of manganous ions by mutans group streptococci. J Bacteriol 175: 819-825.

Beachey, E.H. 1981. Bacterial adherence: Adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. J Infect Dis 143: 325-345.

Beighton, D. 1982. The influence of manganese on carbohydrate metabolism and caries induction by *Streptococcus mutans* strain Ingbritt. Caries Res 16: 189-192.

Beighton, D., Russell, R.R.B., and Hayday, H. 1981. The isolation and characterization of

Streptococcus mutans serotype *h* from dental plaque of monkeys (*Macaca fascicularis*). J Gen Microbiol 124: 271-279.

Belkin, M., and Fitzgerald, D.B. 1952. Tumor-damaging capacity of plant materials. I. Plants used as cathartics. J Nat Cancer Inst 13: 139-149.

Benjavongkulchai, E.,Surarit, R., Bucke, C., and Svasti, J. 1996. Synthesis of oligosaccharides by dextransucrase from a local strain of *Streptococcus mutans*. J Sci Soc Thailand 22: 105-110.

Bowen, W.H. 1968. The trace element requirements of cariogenic and non-cariogenic streptococci. Arch Oral Biol 13: 713-714.

Bowen, W.H. 1996. Vaccine against dental caries–a personal view. J Dent Res 75: 1530-1533.

Bowen, W.H., and Birkhed, D. 1986. Dental caries: Dietary and microbiology factors. In L. Granath; and W.D. McHugh (eds.), Systematized prevention of oral disease: Theory and practice, pp. 19-41. Boca Raton, FL: CRC Press.

Bratthall, D. 1970. Demonstration of five serological groups of streptococcal strains resembling *Streptococcus mutans*. Odontol Revy 21: 143-152.

Bradway, S.D., Bergey, E.J., Jones, P.C., and Levine, M.J. 1989. Biochem J 261: 887-896.

Byrne, L.T., Tri, M.V., Phuong, N.M., Sargent, M.V., Skelton, B.W., and White, A.H. 1991. Perforatin: A novel tetranortriterpenoid from *Harrisonia perforata*. Aust J Chem 44: 165-169.

Carlos, J.P., and Gittelsohn, A.M. 1965. Longitudinal studies of the natural history of caries. Arch Oral Biol 10: 739-751.

Chakravarti, D., and Chakravarti, R.N. 1952. Andrographolide. Part I. J Chem Soc 3: 1697-1700.

Chan, W.R., Taylor, D.R., and Willis, C.R. 1968. The structure of neoandrographolide–a diterpene glucoside from *Andrographis paniculata* Nees. Tetrahedron Letters 46: 4803-4806.

Chan, W.R., Taylor, D.R., Willis, C.R., and Bodden, R.L. 1971. The structure and stereochemistry of neoandrographolide, a diterpene glucoside from *Andrographis paniculata* Nees. Tetrahedron 27: 5081-5091.

Cheng, J.T., and Yang, R.S. 1983. Hypoglycemic effect of guava juice in mice and human subjects. Am J Clin Med 11: 74-76.

Chia, J.-S., Lin, S.W., Yang, C.-S., and Chen, J.-Y. 1997. Antigenicity of a synthetic peptide from glucosyltransferases of *Streptococcus mutans* in humans. Infect Immun 65: 1126-1130.

Chia, J.-S., Yang, C.-S., and Chen, J.-Y. 1998. Functional analysis of a conserved region in glucosyltransferases of *Streptococcus mutans*. Infect Immun 66: 4797-4803.

Choudhury, B.R. 1984. Andrographolide and kalmegh (*Andrographis paniculata*) extract:: *In vivo* and *in vitro* effect in hepatic lipid peroxidation. Methods Find Exp Clin Pharm 6: 481-485.

Choudhury, B.R., Haque, S.J., and Poddar, M.K. 1987. *In vivo* and *in vitro* effects of kalmegh (*Andrographis paniculata*) extract and andrographolide on hepatic microsomal drug metabolizing enzymes. Planta Med 53: 135-140.

Choudhury, B.R., and Poddar, M.K. 1983. Effect of kalmegh extract on rat liver and serum enzyme. Methods Find Exp Clin Pharm 5: 727-730.

Choudhury, S.K. 1978. Influence of *Andrographis paniculata* (kalmegh) on bile flow and hexobarbitone sleeping in experimental animals. Indian J Exp Biol 16: 830-832.

Chow, L.C., Takagi, S., Shern, R.J., Chow, T.H., Takagi, K.K., and Sieck, B.A. 1994. Effects on whole saliva of chewing gums containing calcium phosphates. J Dent Res 73: 26-32.

Clarke, J.K. 1924. On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. Br J Exp Pathol 5: 141-147.

Collier, W.A., and van der Piji, L. 1949. The antibiotic action plants, especially the higher plants with result with Indonesian plant. Chron Nat 105: 8-11.

Curtiss III, R. 1986. Genetic analysis of *Streptococcus mutans* virulence and prospects for an anticaries vaccine. J Dent Res 65: 1034-1045.

Damodaran, S., and Venkataraman, S. 1994. A study on the therapeutic efficacy of *Cassia alata*, Linn. Leaf extract against *Pityriasis versicolor*. J Ethnopharmacol 42: 19-23.

Dan, G. 1986. Food and drink in China–a visitor's guide. 1st ed. Beijing: New World Press.

Dawes, C., and MacPherson, L.M.D. 1993. The distribution of saliva and sucrose around the mouth during the use of chewing gum and the implications for the site-specificity of caries and calculus deposition. J Dent Res 72: 852-857.

Demuth, D.R., Golub, E.E., and Malamud, D. 1990. Streptococcal-host interactions. Structural and function analysis of a *Streptococcus sanguis* receptor for a human salivary glycoprotein. J Biol Chem 265: 7120-7126.

Denson, A.M., and Doyle, R.J. 1998. Stabilization of the glucan-binding lectin of *Streptococcus sobrinus* by specific ligand. Arch Oral Biol 43: 33-38.

Dhawan, B.N., Patnaik, G.K., Rastogi, R.P., Singh, K.K., and Tandon, J.S. 1977. Screening of Indian plants for biological activity: Part VI. Indian J Exp Biol 15: 208-219.

Doyle, R.J., and Taylor, K.G. 1994. Sucrose, glucan-binding proteins and oral streptococcal adhesion. Cell Mater 4: 91-100.

Drake, D., Taylor, K.G., Bleiweis, A.S., and Doyle, R.J. 1988. Specificity of the glucan-binding lectin of *Streptococcus cricetus*. Infect Immun 56: 1864-1872.

Drake, D., Taylor, K.G., and Doyle, R.J. 1988. Expression of the glucan-binding lectin of *Streptococcus cricetus* requires manganous ion. Infect Immun 56: 2205-2207.

Ellen, R.P. 1976. Establishment and distribution of *Actinomyces viscosus* and *Actinomyces naeslundii* in the human oral cavity. Infect Immun 14: 1119-1124.

Elvin-Lewis, M., and Steelman, R. 1986. The anticariogenic effects of tea drinking among Dallas schoolchildren. J Dent Res 65: 198, Abst. No. 257.

Elvin-Lewis, M., Vitale, M., and Kopjas, T. 1980. Anticariogenic potential of commercial teas. J Prev Dent 6: 273-284.

Emilson, C.G. 1994. Potential efficacy of chlorhexidine against mutans streptococci and human dental caries. J Dent Res 73: 682-691.

Featherstone, J.D.B. 2000. The science and practice of caries prevention. J Am Dent Assoc 131: 887-899.

Featherstone, J.D.B., Barrett-Vespone, N.A., Fried, D., Kantotowitz, Z., and Seka, W. 1998. CO_2 laser inhibition of artificial caries-like lesion progression in dental enamel. J Dent Res 77: 1397-1403.

Featherstone, J.D.B., and Rodgers, B.E. 1981. Effect of acetic, lactic and other organic

acids on the formation of artificial carious lesions. Caries Res 15: 377-385.

Ferretti, J.J., Gilpin, M.L., and Russell, R.R.B. 1987. Nucleotide sequence of a glucosyltransferase gene from *Streptococcus sobrinus* Mfe28. J Bacteriol 169: 4271-4278.

Fiebig, M., Huh, C., Pezzuto, J.M., Kinghorn, A.D., and Farnsworth, N.R. 1985. Plant anticancer agents, XLI. Cardiac glycosides from *Streblus asper*. J Nat Prod 48: 981-985.

Filler, S.J., Gregory, R.L., Michalek, S.M., Katz, J., and McGhee, J.R. 1991. Effect of immune bovine milk on *Streptococcus mutans* in human dental plaque. Arch Oral Biol 36: 41-47.

Fitzgerald, R.J., Adams, B.O., Sandham, H.J., and Abhyankar, S. 1989. Cariogenicity of a lactate dehydrogenase-deficient mutant of *Streptococcus mutans* serotype c in gnotobiotic rats. Infect Immun 57: 823-826.

Fitzgerald, R.J., and Keyes, P.H. 1960. Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster. J Am Dent Assoc 61: 9-19.

Forester, H., Hunter, N., and Knox, K.W. 1983. Characteristics of a high molecular weight extracellular protein of *Streptococcus mutans*. J Gen Microbiol 129: 2779-2788.

Fujita, T., Fujitani, R., Takeda, Y., Takaishi, Y., Yamada, T., Kido, M., and Miura, I. 1984. On the diterpenoids of *Andrographis paniculata*: X-ray crystallographic analysis of andrographolide and structure determination of new minor diterpenoids. Chem Pharm Bull 32: 2117-2125.

Fujiwara, T., Tamesada, M., Bian, Z., Kawabata, S., Kimura, S., and Hamada, S. 1996. Deletion and reintroduction of glucosyltransferase genes of *Streptococcus mutans* and role of their gene products in sucrose dependent cellular adherence. Microb Pathol 20: 225-233.

Fuzellier, M.C., Mortier, F., and Lectard, P. 1982. Antifungal activity of *Cassia alata* L. Ann Pharm Fr 40: 357-363.

Gaitonde, B.B., Vaz, A.X., and Patel, J.R. 1964. Chemical and pharmacological study of root bark of *Streblus asper* Linn. Indian J Med Sci 18: 191-199.

George, M., and Pandalai, K.M. 1949. Investigations on plant antibiotics. Part IV. Indian J

Med Res 37: 169-180.

Germaine, G.R., Chludzinski, A.M., and Schachtele, C.F. 1974. *Streptococcus mutans* dextransucrase: Requirement of primer dextran. J Bacteriol 120: 287-294.

Gibbons, R.J. 1984. Adherence interactions which may affect microbial ecology in the mouth. J Dent Res 63: 378-385.

Gibbons, R.J. 1989. Bacterial adhesion to oral tissue: A model for infectious diseases. J Dent Res 68: 750-760.

Gibbons, R.J., Etherden, I. 1982. Enzymatic modification of bacterial receptors on saliva-treated hydroxyapatite surfaces. Infect Immun 36: 52-58.

Gibbons, R.J., Etherden, I., and Peros, W. 1985. Aspects of the attachment of oral streptococci to experimental pellicles. In S. Mergenhagen; and B. Rosan (eds.), Molecular basis of oral microbial adhesion, pp. 77-84. Washington, D.C.: American Society for Microbiology.

Glasby, J.S. 1991. Dictionary of plant containing second metabolites. London: Tayler & Trancis.

Gregory, R.L. 1994. Dental caries vaccines: Science and status. Compendium 15; 1282-1293.

Gritsanapan, W., and Chulasiri, M. 1983. Preliminary study of antidiarrheal plants: Antibacterial activity. Mahidol Univ J Pharm Sci 10: 119-123.

Gupta, D., and Singh, J. 1991. Flavanoid glycosides from *Cassia alata*. Phytochemistry 30: 2761-2763.

Gustafsson, B.E., Quensel, C.E., Lanke, L.S., Lundquist, C., Grahnen, H., Bonow, B.E., and Krasse, B. 1954. The Vipeholm dental caries study: The effect of different levels of carbohydrate intake on caries activity in 436 individuals observed for five years. Acta Odontol Scand 11: 232-364.

Hajishengallis, G., and Michalek, S.M. 1999. Current status of a mucosal vaccine against dental caries. Oral Microbiol Immunol 14: 1-20.

Hamada, S., Horikoshi, T., Minami, T., Kawabata, S., Hiraoka, J., Fujiwara, T., and Ooshima,

T. 1991. Oral passive immunization against dental caries in rats by use of hen egg yolk antibodies specific for cell-associated glucosyltransferase of *Streptococcus mutans*. Infect Immun 59: 4161-4167.

Hamada, S., Koga, T., and Ooshima, T. 1984. Virulence factors of *Streptococcus mutans* and dental caries prevention. J Dent Res 63: 407-411.

Hamada, S., Kontani, M., Hosono, H., Ono, H., Tanaka, T., Ooshima, T., Mitsunaga, T., and Abe, I. 1996. Peroxidase-catalyzed generation of catechin oligomers that inhibit glucosyltransferase from *Streptococcus sobrinus*. FEMS Microbiol Lett 143: 35-40.

Hamada, S., and Slade, H.D. 1980. Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol Rev 44: 331-384.

Hamada, S., Torii, T., Kotani, S., and Tsuchitani, Y. 1981. Adherence of *Streptococcus sanguis* clinical isolates to smooth surfaces and interaction of the isolates with *Streptococcus mutans* glucosyltransferase. Infect Immun 32: 364-372.

Hanada, N., and Kuramitsu, H.K. 1988. Isolation and characterization of the *Streptococcus mutans* glucosyltransferase *gtfC* gene, coding for synthesis of both soluble and insoluble glucans. Infect Immun 56: 1999-2005.

Hanada, N., and Kuramitsu, H.K. 1989. Isolation and characterization of the *Streptococcus mutans gtfD* gene, coding for primer-dependent soluble glucan synthesis. Infect Immun 57: 2079-2085.

Handa, S.S. 1990. Hepatoprotective activity of andrographolide against galactosamine & paracetamol intoxication in rats. Indian J Med Res 92: 284-292.

Handa, S.S., and Sharma, A. 1990. Hepatoprotective activity of andrographolide from *Andrographis paniculata* against carbontetrachloride. Indian J Med Res 92: 276-283.

Harris, R. 1989. Dental science in a new age: A history of the National Institute of Dental Research. Rockville, MD: Montrose Press.

Hasty, D.L., Ofek, I., Courtney, H.S., and Doyle, R.J. 1992. Multiple adhesins of streptococci. Infect Immun 60: 2147-2152.

Hauptmann, H., and Lacerda Nazario, L. 1950. Some constituents of the leaves of *Cassia alata* L. J Am Chem Soc 72: 1492-1495.

Hazlett, K.R.O., Michalek, S.M., and Banas, J.A. 1998. Inactivation of the *gbpA* gene of *Streptococcus mutans* increases virulence and promotes *in vivo* accumulation of recombination between the *gtfB* and *C* genes. Infect Immun 66: 2180-2185.

Hiatt, A., and Ma, J.K.-C. 1992. Monoclonal antibody engineering in plants. FEBS Lett 307: 71-75.

Hikino, H., Kiso, Y , Hatano, T., Yoshida, T., and Okuda, T. 1985. Antihepatotoxicity actions of tannins. J Ethnopharmacol 14: 19-29.

Honda, O., Kato, C., and Kuramitsu, H.K. 1990. Nucleotide sequence of the *Streptococcus mutans gtfD* gene encoding the glucosyltransferase-S enzyme. J Gen Microbiol 136: 2099-2105.

Horiba, N., Maekawa, Y., Ito, M., Matsumoto, T., and Nakamura, H. 1991. A pilot study of Japanese green tea as a medicament: Antibacterial and bactericidal effects. J Endod 17: 122-124.

Ibrahim, D., and Osman, H. 1995. Antimicrobial activity of *Cassia alata* from Malaysia. J Ethnopharmacol 45: 151-156.

Ikeno, I., Ikeno, T., and Miyazawa, C. 1991. Effects of propolis on dental caries in rats. Caries Res 25: 347-351.

Jagusztyn-Krynicka, E.K., Clark-Curtiss, J.E., and Curtiss III, R. 1993. *Escherichia coli* heat-labile toxin subunit B fusions with *Streptococcus sobrinus* antigens expressed by *Salmonella typhimurium* oral vaccine strains: Importance of the linker hybrid proteins. Infect Immun 61: 1004-1015.

Jaiarj, P., Khoohaswan, P., Wongkrajang, Y., Peungvicha, P., Suriyawong, P., Saraya, S., and Ruangsomboon, O. 1999. Anticough and antimicrobial activities of *Psidium guajava* Linn. leaf extract. J Ethnopharmacol 67: 203-212.

Janda, W.M., and Kuramitsu, H.K. 1977. Properties of a variant of *Streptococcus mutans* altered in its ability to interact with glucans. Infect Immun 16: 575-586.

Jenkinson, H.F. 1995. Genetic analysis of adherence by oral streptococci. J Ind Microbiol 15: 186-192.

Jenkinson, H.F., and Demuth, D.R. 1997. Structure, function and immunogenicity of streptococcal antigen I/II polypeptides. Mol Microbiol 23: 183-190.

Jenkinson, H.F., and Lamont, R.J. 1997. Streptococcal adhesion and colonization. Crit Rev Oral Biol Med 8: 175-200.

Johnson, C.P., Gross, S.M., and Hillman, J.D. 1980. Cariogenic potential *in vitro* in man and *in vivo* in the rat of lactate dehydrogenase mutants of *Streptococcus mutans*. Arch Oral Biol 25: 707-713.

Johnston, A.D., and Bowen, R.L. 1991. Protective coatings for tooth crowns. JADA 122: 49-51.

Joshi, C.G., and Magar, N.G. 1952. Antibiotic activity of some Indian medicinal plants. J Sci Indian Res 11B: 261-263.

Kamiuchi, K., Mitsunaga, K., Koike, K., Ouyang, Y., Ohmoto, T., and Nikaido, T. 1996. Quassinoids and limonoids from *Harrisonia perforata*. Heterocycles 43: 653-664.

Kashket, S., and Donaldson, C.G. 1972. Saliva-induced aggregation of oral streptococci. J Bacteriol 112: 1127-1133.

Kashket, S., Poalino, V.J., Lewis, D.A., and van Houte, J. 1985. *In-vitro* inhibition of glucosyltransferase from the dental plaque bacterium *Streptococcus mutans* by common beverages and food extracts. Arch Oral Biol 30: 821-826.

Kashket, S., Poalino, V.J., Lewis, D.A., and van Houte, J. 1985. Glucosyltransferase inhibition by tannin-like constituents of beverages. J Dent Res 64: 212, Abst. No. 338.

Katz, J., Harmon, C.C., Buckner, G.P., Richardson, G.J., Russell, M.W., and Michalek, S.M. 1993. Protective salivary immunoglobulin A responses against *Streptococcus mutans* infection after intranasal immunization with *S.mutans* antigen I/II coupled to the B subunit of cholera toxin. Infect Immun 61: 1964-1971.

Kawamura, Y., Hou, X., Sultana, F., Miura, H., and Ezaki, T. 1995. Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. Int J Syst Bacteriol 45: 406-408.

Kelly, C., Evans, P., Bergmeier, L., Lee, S.F., Progulske-Fox, A., Harris, A.C., Aitken, A., Bleiweis, A.S., and Lehner, T. 1989. Sequence analysis of the cloned streptococcal cell surface antigen I/II. FEBS Lett 258: 127-132.

Keyes, P.H., and Jordan, H.V. 1963. Factors influencing the initiation, transmission and inhibition of dental caries. In R.S. Harris (ed.) , Mechanisms of hard tissue destruction, pp. 261-283. New York, NY: Academic Press.

Khan, M.I.H., and Ahmad, J. 1985. A pharmacognostic study of *Psidium guajava* L. Int J Crude Drug Res 23: 95-103.

Khuong-Huu, Q., Chiaroni, A., Riche, C., Nguyen-Ngoc, H., Nguyen-Viet, K., and Khuong-Huu, F. 2000. New rearranged limonoids from *Harrisonia perforata*. J Nat Prod 63: 1015-1018.

Kilian, M., Reinholdt, J., Lomholt, H., Poulsen, K., and Frandsen, E.V.G. 1996. Biological significance of IgA1 proteases in bacterial colonization and pathogenesis: Critical evaluation of experimental evidence. APMIS 104: 321-338.

Kim, J.H. 1997. Anti-bacterial action of onion (*Allium cepa* L.) extracts against oral pathogenic bacteria. J Nihon Univ Sch Dent 39: 136-141.

Kim, S.Y., Ohk, S.H., Bai, D.H., and Yu, J.H. 1999. Purification and properties of bacteriolytic enzymes from *Bacillus licheniformis* YS-1005 against *Streptococcus mutans*. Biosci Biotechnol Biochem 63: 73-77.

Koepsell, H.J., Tsuchiya, H.M., Hellman, N.N., Kazenko, A., Hoffman, C.A., Sharpe, E.S., and Jackson, R.W. 1953. Enzymatic synthesis of dextran. Acceptor specificity and chain initiation. J Biol Chem 200: 793-801.

Koga, T., Asakawa, H., Okahashi, N., and Hamada, S. 1986. Sucrose-dependent cell adherence and cariogenicity if serotype *c Streptococcus mutans*. J Gen Microbiol 132: 2873-2883.

Koga, T., Hamada, S., Murakawa, S., and Endo, A. 1982. Effect of a glucosyltransferase inhibitor on glucan synthesis and cellular adherence of *Streptococcus mutans*. Infect Immun 38: 882-886.

Kolenbrander, P.E. 1988. Intergeneric coaggregation among human oral bacteria and ecology of dental plaque. Ann Rev Microbiol 42: 627-656.

Kolenbrander, P.E., and London, J. 1993. Adhere today, here tomorrow: Oral bacterial adherence. J Bacteriol 175: 3247-3252.

Koo, H., Gomes, B.P.F.A., Rosalen, P.L., Ambrosano, G.M.B., Park, Y.K., and Cury, J.A.

2000. *In vitro* antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. Arch oral Biol 45: 141-148.

Koo, H., Rosalen, P.L., Cury, J.A., Park, Y.K., Ikegaki, M., and Sattler, A. 1999. Effect of *Apis mellifera* propolis from two Brazillian regions on caries development in desalivated rats. Caries Res 33: 393-400.

Koontongkaew, S., and Thaweboon, B. 1986. The effect of betel nut extracts on dehydrogenase activity of *Streptococcus mutans* GS 5. J Dent Assoc Thai 36: 223-228.

Kraivaphan, P., Amornchat, C., and Triratana, T. 1992. The effect of *Psidium guajava* and *Ficus religiosa* extracts against oral bacteria. J Dent Assoc Thai 42: 176-182.

Kraivaphan, V., Boonyamanond, L., Amornchat, C., Triratana, T., and Kraivaphan, P. 1991. The effect of a mouthrinse containing *Psidium guajava* extract on gingivitis. J Dent Assoc Thai 41: 323-328.

Kraivaphan, V., Kraivaphan, P., Amornchat, C., Triratana, T., and Pobrurksa, C. 1994. The clinical effect of a mouthrinse containing *Psidium guajava* extract on plaque formation. J Dent Assoc Thai 44: 56-60.

Kubo, I., Muroi, H., and Himejima, M. 1992. Antimicrobial activity of green tea flavor components and their combination effects. J Agric Food Chem 40: 245-248.

Kurihara, H., Goto, Y., Aida, H., Hosokawa, M., and Takahashi, K. 1999. Antibacterial activity against cariogenic bacteria and inhibition of insoluble glucan production by free fatty acids obtained from dried *Gloiopeltis furcata.* Fisheries Sci 65: 129-132.

Lamont, R.J., Demuth, D.R., Davis, C.A., Malamud, D., and Rosan, B. 1991. Salivary-agglutinin-mediated adherence of *Streptococcus mutans* to early plaque bacteria. Infect Immun 59: 3446-3450.

Lamont, R.J., Hersey, S.G., Rosan, B. 1992. Characterization of the adherence of *Porphyromonas gingivalis* to oral streptococci. Oral Microbiol Immunol 7: 193-197.

Landale, E.C., and McCabe, M.M. 1987. Characterization by affinity electrophoresis of an α-1,6-glucan-binding protein from *Streptococcus sobrinus*. Infect Immun 55: 3011-3016.

Leverett, D.H., Featherstone, J.D.B., Proskin H.M., Adair, S.M., Eisenberg, A.D., Mundorff-

Shrestha, S.A., Shields, C.P., Shaffer, C.L., and Billings, R.J. 1993. Caries risk assessment by a cross-sectional discrimination model. J Dent Res 72: 529-537.

Leverett, D.H., Proskin, H.M., Featherstone, J.D.B., Adair, S.M., Eisenberg, A.D., Mundorff-Shrestha, S.A., Shields, C.P., Shaffer, C.L., and Billings, R.J. 1993. Caries risk assessment in a longitudinal discrimination model. J Dent Res 72: 538-543.

Levine, M.J. 1993. Development of artificial salivas. Crit Rev Oral Biol Med 4: 279-286.

Levine, M.J., Tabak, L.A., Reddy, M., and Mandel, I.D. 1985. Nature of salivary pellicles in microbial adherence: Role of salivary mucins. In S.E. Mergenhagen; and B. Rosan (eds.), Molecular basis of oral microbial adhesion, pp. 125-130. Washington, D.C.: American Society for Microbiology.

Li, X.C., Cai, L., and Wu, C.D. 1997. Antimicrobial compounds from *Ceanothus americanus* against oral pathogens. Phytochemistry 46: 97-102.

Lie, T. 1977. Early dental plaque morphogenesis. J Periodont Res 12: 73-89.

Lis, M., Shiroza, T., and Kuramitsu, H.K. 1995. Role of C-terminal direct repeating units of the *Streptococcus mutans* glucosyltransferase-S in glucan binding. Appl Environ Microbiol 61: 2040-2042.

Loesche, W.J. 1986. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microbiol Rev 50: 353-380.

Luengpailin, S., Banas, J.A., and Doyle, R.J. 2000. Modulation of glucan-binding protein activity in streptococci by fluoride. Biochim Biophys Acta 1474: 346-352.

Ma, J.K.-C., Hiatt, A., Hein, M., Vine, N.D., Wang, F., Stabila, P., Vandolleweerd, C., Mostov, K., and Lehner, T. 1995. Generation and assembly of secretory antibodies in plants. Science 268: 716-719.

Ma, J.K.-C., and Lehner, T. 1990. Prevention of colonization of *Streptococcus mutans* by topical application of monoclonal antibodies in human subjects. Arch Oral Biol 35: 115S-122S.

Ma, J.K.-C., Smith, R., and Lehner, T. 1987. Use of monoclonal antibodies in local passive immunization to prevent colonization of human teeth by *Streptococcus mutans*. Infect Immun 55: 1274-1278.

Ma, Y., Lassiter, M.O., Banas, J.A., Galperin, M.Y., Taylor, K.G., and Doyle, R.J. 1996.

Multiple glucan-binding proteins of *Streptococcus sobrinus.* J Bacteriol 178: 1572-1577.

Makinen, K.K., Bennett, C.A., Hujoel, P.P., Isokangas, P.J., Isotupa, K.P., Pape, H.R., Jr., and Makinen, P.L. 1995. Xylitol chewing gums and caries rates: A 40-month cohort study. J Dent Res 74: 1904-1913.

Makinen, K.K., Hujoel, P.P., Bennett, C.A., Isotupa, K.P., Makinen, P.-L., and Allen, P. 1996. Polyol chewing gums and caries rates in primary dentition: A 24-month cohort study. Caries Res 30: 408-417.

Malcolm, S.A., and Sofowora, E.A. 1969. Antimicrobial activity of selected Nigerian folk remedies and their constituent plants. Lloydia 32: 512-517.

Mandel, I.D. 1989. The role of saliva in maintaining oral homeostasis. J Am Dent Assoc 119: 298-304.

Mandel, I.D. 1996. Caries prevention: Current strategies, new directions. J Am Dent Assoc 127: 1477-1488.

Marquis, R. 1993. Arginine deaminase and alkali generation in plaque. In W.H. Bowen; and L.A. Tabak (eds.), Cariology for the nineties, pp. 309-317. Rochester, NY: University of Rochester Press.

Matsumoto, M., Minami, T., Sasaki, H., Sobue, S., Hamada, S., and Ooshima, T. 1999. Inhibitory effect of oolong tea extract on caries-inducing properties of mutans streptococci. Caries Res 33: 441-445.

Michalek, S.M., Gregory, R.L., Harmon, C.C., Katz, J., Richardson, G.J., Hilton, T., Filler, S.J., and McGhee, J.R. 1987. Protection of gnotobiotic rats against dental caries by passive immunization with bovine milk antibodies to *Streptococcus mutans*. Infect Immun 55: 2341-2347.

Mishra, C.S., and Misra, K. 1981. Chemical constituents of *Psidium guajava* heartwood. J Indian Chem Soc 38: 201-202.

Mitsunaga, T., and Abe, I. 1997. Inhibitory effects of bark proanthocyanidins on the activities of glucosyltransferases of *Streptococcus sobrinus*. J Wood Chem Technol 17: 327-340.

Moktader, A., and Guha-Sircar, S.S. 1993. On the bitter principle from *Andrographis*

paniculata, Nees. Part I. J Indian Chem Soc 16: 333-338.

Monchois, V., Willemot, R.-M., and Monsan, P. 1999. Glucansucrase: Mechanism of action and structure-function relationships. FEMS Microbiol Rev 23: 131-151.

Monchois, V., Willemot, R.-M., Remaud-Simeon, M., Croux, C., and Monsan, P. 1996. Cloning and sequencing of a gene coding for a novel dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 synthesizing only α(1-6) and α(1-3) linkages. Gene 182: 23-32.

Mooser, G., Hefta, S.A., Paxton, R.J., Shively, J.E., and Lee, T.D. 1991. Isolation and sequence of an active-site peptide containing a catalytic aspartic acid from two *Streptococcus sobrinus* α-glucosyltransferases. J Biol Chem 266: 8916-8922.

Mooser, G., and Iwaoka, K.R. 1989. Sucrose 6-α-D-glucosyltransferase from *Streptococcus sobrinus*: Characterization of a glucosyl-enzyme complex. Biochemistry 28: 443-449.

Mukherjee, K., and Roy, L.N. 1983. Chemical examination of *Streblus asper* leaves. Int J Crude Drug Res 21: 189-190.

Mulchandani, N.V., and Hassarajani, S.A. 1975. Tabulated phytochemical reports. Phytochemistry 14: 2728.

Muzzarelli, R., Tarsi, R., Filippini, O., Giovanetti, E., Biagini, G., and Varaldo, P.E. 1990. Antimicrobial properties of N-carboxybutyl chitosan. Antimicrob Agents Chemother 34: 2019-2023.

Nakahara, K., Kawabata, S., Ono, H., Ogura, K., Tanaka, T., Ooshima, T., and Hamada, S. 1993. Inhibitory effect of oolong tea polyphenols on glucosyltransferases of mutans streptococci. Appl Environ Microbiol 59: 968-973.

Nakanishi, K. et al. 1965. Phytochemical survey of Malaysian plants, preliminary chemical and pharmacological screening. Chem Phar Bull 13: 882-890.

Nazimudeen, S.K., Ramaswamy, S., and Kameswaran, L. 1978. Effect of *Andrographis paniculata* on snake venom induced death and its mechanism. Indian J Pharm Sci 40: 132-135.

Newbrun, E. 1967. Sucrose: The arch criminal of dental caries. Odontol Rev 18: 373-386.

Oguni, I., Nasu, K., Yamamoto, S., and Nomura, T. 1988. On the antitumor activity of fresh green tea leaf. Agric Biol Chem 52: 1879-1880.

Ohta, H., Kato, H., Okahashi, N., Takahashi, I., Hamada, S. , and Koga, T. 1989. Characterization of a cell-surface protein antigen of hydrophilic *Streptococcus mutans* strain GS-5. J Gen Microbiol 135: 981-988.

Okahashi, N., Sasakawa, C., Yoshikawa, M., Hamada, S., and Koga, T. 1989. Cloning of the surface protein antigen gene from serotype c *Streptococcus mutans*. Mol Microbiol 3: 221-228.

Okuda, T., Kimura, Y., Yoshida, T., Hatano, T., Okuda, H., and Arichi, S. 1983. Studies on the activities of tannins and related compounds from medicinal plants and drugs. I. Inhibitory effects on lipid peroxidation in mitochondria and microsomes of liver. Chem Phar Bull 31: 1625-1631.

Ooshima, T., Minami, T., Aono,W., Izumitani, A., Sobue, S., Fujiwara, T., Kawabata, S., and Hamada, S. 1993. Oolong tea polyphenols inhibit experimental dental caries in SPF rats infected with mutans streptococci. Caries Res 27: 124-129.

Ooshima, T., Minami, T., Aono, W., Tamura, Y., and Hamada, S. 1994. Reduction of dental plaques deposition in humans by oolong tea extract. Caries Res 28: 146-149.

Osman, A. M., Younes, M. E.-G., and Sheta, A.E. 1974. Triterpenoids of the leaves of *Psidium guajava*. Phytochemistry 13; 2015-2016.

Otake, S., Makimura, M., Kuroki, T., Nishihara, Y., and Hirasawa, M. 1991. Anticaries effects of polyphenolic compounds from Japanese green tea. Caries Res 25: 438-443.

Otake, S., Nishihara, Y., Makimura, M., Hatta, H., Kim, M., Yamamoto, T., and Hirasawa, M. 1991. Protection of rats against dental caries by passive immunization with hen-egg-yolk antibody (Ig Y). J Dent Res 70: 162-166.

Palanichamy, S., and Nagarajan, S. 1990a. Analgesic activity of *Cassia alata* leaf extract and kaempferol 3-*O*-sophoroside. J Ethnopharmacol 29: 73-78.

Palanichamy, S., and Nagarajan, S. 1990b. Antifungal activity of *Cassia alata* leaf extract. J Ethnopharmacol 29: 337-340.

Palanichamy, S., Nagarajan, S., and Devasagayam, M. 1988. Effect of *Cassia alata* leaf

extracts on hyperglycemic rats. J Ethnopharmacol 22: 81-90.

Park, Y.K., Koo, M.H., Abreu, J.A.S., Ikegaki, M., Cury, J.A., and Rosalen, P.L. 1998. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. Curr Microbiol 36: 24-28.

Parsons, J.C. 1974. Chemotherapy of dental plaque-a review. J Periodontol 45: 177-186.

Paolino, V.J., Kashket, S., and Sparagna, C.A. 1980. Inhibition of dextran synthesis by tannic acid. J Dent Res 59: 389, Abst. No. 488.

Perch, B., Kjems, E., and Ravn, T. 1974. Biochemical and serological properties of *Streptococcus mutans* from various human and animal sources. APMIS 82: 357-370.

Pery, L.M. 1980. Medicinal plants of east and southeast Asia. Massachusetts: MIT Press.

Prabhu, V.K.K., and John, M. 1975. Juvenomimetic activity in some plants. Experientia 31: 913. (Abstract).

Rabinovich, N.R., McInnes, P., Klein, D.L., and Hall. B.F. 1994. Vaccine technologies: View to the future. Science 265: 1401-1404.

Rai, P.P. 1978. Anthrecene derivatives in leaves and fruits of *Cassia alata*. Curr Sci 47: 271-272.

Ramsey, A.C., Hardwick, J.L., and Tamacas, J.C. 1975. Fluoride intakes and caries increments in relation to tea consumption. Caries Res 9: 312. (Abstract).

Rogers, A.H. 1976. Bacteriocinogeny and the properties of some bacteriocins of *Streptococcus mutans*. Arch Oral Biol 21: 99-104.

Rolla, G. 1983. Pellicle formation. In E.P. Lazzari (ed.), Handbook of experimental aspects of oral biochemistry, pp. 245. Boca Raton, FL: CRC Press.

Rosen, S., Elwin-Lewis, M., Beck, F.M., and Beck, E.X. 1984. Anticariogenic effects of tea in rats. J Dent Res 63: 658-660.

Russell, M.W., Bergmeier, L.A., Zander, E.D., and Lehner, T. 1980. Protein antigens of *Streptococcus mutans*: Purification and properties of a double antigen and its protease resistant component. Infect Immun 28: 486-493.

Russell, M.W., and Lehner, T. 1978. Characterization of antigens extracted from cells and culture fluid of *Streptococcus mutans* serotype *c*. Arch Oral Biol 23: 7-15.

Russell, R.B.B. 1979. Wall-associated protein antigens of *Streptococcus mutans*. J

Gen Microbiol 114; 109-115.

Russell, R.B.B. 1994. Control of specific plaque bacteria. Adv Dent Res 8: 285-290.

Ryu, E. 1980. Prophylactic effect of tea on pathogenic micro-organism infection to human and animals (1). Int J Zoon 7: 164-170.

Saeki, Y., Ito, Y., Shibata, M., Sato, Y., Takazoe, I., and Okuda, K. 1993. Antimicrobial action of green tea extract, flavono flavor and copper chlorophyll against oral bacteria. Bull Tokyo Dent Coll 34: 33-37.

Saeki, Y., Kato, T., Naito, Y., Takazoe, I., and Okuda, K. 1996. Inhibitory effect of funoran on the adherence and colonization of mutans streptococci. Caries Res 30: 119-125.

Sakanaka, S., Kim, M., Taniguchi, M., and Yamamoto, T. 1989. Antibacterial substances in Japanese green tea extract against *Streptococcus mutans*, a cariogenic bacterium. Agric Biol Chem 53: 2307-2311.

Sano, H., Matsukubo, T., Shibasaki, K., Itoi, H., and Takaesu, Y. 1991. Inhibition of adsorption of oral streptococci to saliva treated hydroxyapatite by chitin derivatives. Bull Tokyo Dent Coll 32: 9-17.

Sato, Y., Yamamoto, Y., and Kizaki, H. 1997. Cloning and sequence analysis of the *gbpC* gene encoding a novel glucan-binding protein of *Streptococcus mutans*. Infect Immun 65: 668-675.

Scannapieco, F.A. 1994. Saliva-bacterium interactions in oral microbial ecology. Crit Rev Oral Biol Med 5: 203-248.

Schilling, K.M., and Doyle, R.J. 1995. Bacterial adhesion to hydroxylapatite. Method Enzymol 253: 536-542.

Schmid, J., and Auling, G. 1987. Manganese transport in *Brevibacterium ammoniagenes* ATCC 6872. J Bacteriol 169: 3385-3387.

Schneewind, O., Fowler, A., and Faull, K. F. 1995. Structure of the cell wall anchor of surface proteins in *Staphylococcus aureus*. Science 268: 103-106.

Shern, R.J. 1995. New approaches to delivery of fluorides. J Clin Dent 6: 124-129.

Shimamura, A., Nakano, Y.J., Mukasa, H., and Kuramitsu, H.K. 1994. Identification of amino acid residues in *Streptococcus mutans* glucosyltransferases influencing the structure of the glucan product. J Bacteriol 176: 4845-4850.

Shiroza, T., Ueda, S., and Kuramitsu, H.K. 1987. Sequence analysis of the *gtfB* gene from *Streptococcus mutans*. J Bacteriol 169: 4263-4270.

Shouji, N., Takada, K., Fukushima, K., and Hirasawa, M. 2000. Anticaries effect of a component from shiitake (an edible mushroom). Caries Res 34: 94-98.

Shukla, B., Visen, P.K.S., Patnaik, G.K., and Dhawan, B.N. 1992. Choleretic effect of andrographolide in rats and guinea pigs. Planta Med 58: 146-149.

Shyu, K., Meng, C., and Sun, J. 1977. The anticariogenic effect of Taiwan tea. Chinese Med J 24: 55-61.

Sidebotham, R.L. 1974 Dextrans. Adv Carbohydr Chem Biochem 30: 371-444.

Simons, J.N., Swidler, R., and Moss, L.M. 1963. Succulent-type plants as sources of plant virus inhibitors. Phytopathology 53: 677-683.

Sintes, J.L., Escalante, C., Stewart, B., McCool, J.J., Garcia, L., Volpe, A., and Triol, C. 1995. Enhanced anticaries efficacy of a 0.243% sodium fluoride/10% xylitol/silica dentifrice: 3-year clinical results. Am J Dent 8: 231-235.

Smith, D.J., Akita, H., King, W.F., and Taubman, M.A. 1994. Purification and antigenicity of a novel glucan-binding protein of *Streptococcus mutans*. Infect Immun 62: 2545-2552.

Smith, D.J., and Taubman, M.A. 1987. Oral immunization of humans with *Streptococcus sobrinus* glucosyltransferase. Infect Immun 55: 2562-2569.

Smith, D. J., Taubman, M.A., Holmberg, C.F., Eastcott, J., King, W.F., and Ali-Salaam, P. 1993. Antigenicity and immunogenicity of a synthetic peptide derived from glucan-binding domain of mutans streptococcal glucosyltransferase. Infect Immun 61: 2899-2905.

Smith, R. M., and Siwatibau, S. 1975. Sesquiterpene hydrocarbons of Fijian guavas. Phytochemistry 14: 2013-2015.

Soetaert, W., Schwengers,D., Bucholz, K., and Vandamme, E.J. 1995. A wide range of carbohydrate modifications by a single microorganisms: *Leuconostoc mesenteroides*. In S.B. Petersen; B. Svensson; and S. Pederson (eds.), Carbohydrate bioengineering, Vol.10, pp. 351-358. Amsterdam: Elsevier.

Steinberg, D., Kaine, G., and Gedalia, I. 1996. Antibacterial effect of propolis and honey on

oral bacteria. Am J Dent 9: 236-239.

Stern, R.H., Sognnaes, R.F., and Goodman, F. 1966. Laser effect on *in vitro* enamel permeability and solubility. J Am Dent Assoc 73: 838-843.

Stralfors, A. 1967. Effect of hamster caries by purine derivatives vanillin and some tannin-containing materials. Arch Oral Biol 12: 321-332.

Su, D., and Robyt, J.F. 1994. Determination of the number of sucrose and acceptor binding sites for *Leuconostoc mesenteroides* B-512FM dextransucrase, and the confirmation of the two-site mechanism for dextran synthesis. Arch Biochem Biophys 308: 471-476.

Sung, T.V., Phuong, N.M., Kamperdick, C., and Adam, G. 1995. Perforatinolone, a limonoid from *Harrisonia perforata*. Phytochemistry 38: 213-215.

Svanberg, M., Westergren, G., and Olsson, J. 1984. Oral implantation in humans of *Streptococcus mutans* strains with different degrees of hydrophobicity. Infect Immun 43: 817-821.

Tagashira, M., Uchiyama, K., Yoshimure, T., Shirota, M., and Uemitzu, N. 1997. Inhibition by hop bract polyphenols of cellular adherence and water-insoluble glucan synthesis of mutans streptococci. Biosci Biotech Biochem 61: 332-335.

Tajuddin , Shalid, A., and Tariq, M. 1984. Anti-inflammatory activity of *Andrographis paniculata* Nees. Med & Aromat Plant Abstr 6: 486. (Abstract).

Tanaka, T., Koike, K., Mitsunaga, K., Narita, K., Takano, S., Kamioka, A., Sase, E., Ouyong, Y., and Ohmoto, T. 1995. Chromones from *Harrisonia perforata*. Phytochemistry 40: 1787-1790.

Tang, W., and Eisenbrand, G. 1992. Chinese drugs of plant origin. Germany: Springer-Verlag.

Tandhachoon, K., Triratana, T., and Soo-ampon, S. 1993. The testing of crude extract *Harrisonia perforata* against *Streptococcus mutans* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans.* J Dent Assoc Thai 43: 336-340.

Tanzer, J.M., Chassy, B.M., and Krichevsky, M.I. 1972. Sucrose metabolism by *Streptococcus mutans*, SL-I. Biochim Biophys Acta 261: 379-387.

Tarsi, R., Corbin, B., Pruzzo, C., and Muzzarelli, R.A.A. 1998. Effect of low-molecular-

weight chitosans on the adhesive properties of oral streptococci. Oral Microbiol Immunol 13: 217-224.

Tarsi, R., Muzzarelli, R.A.A., Guzman, C.A., and Pruzzo, C. 1997. Inhibition of *Streptococcus mutans* adsorption to hydroxyapatite by low-molecular-weight chitosans. J Dent Res 76: 665-672.

Taweechaisupapong, S., Wongkham, S., Chareonsuk, S., Suparee, S., Srilalai, P., and Chaiyarak, S. 2000. Selective activity of *Streblus asper* on mutans streptococci. J Ethnopharmacol 70: 73-79.

Tellefson, L.M., and Germaine, G.R. 1986. Adherence of *Streptococcus sanguis* to hydroxyapatite coated with lysozyme and lysozyme-supplemented saliva. Infect Immun 51: 750-759.

Thamlikitkul, V. et al. 1991. Efficacy of *Andrographis paniculata*, Nees for pharyngotonsillitis in adults. J Med Assoc Thai 74: 437-442.

Toda, M., Okubo, S., Hiyoshi, R., and Shimamura, T. 1989. The bactericidal activity of tea and coffee. Lett Appl Microbiol 8: 123-125.

Trahan, L. 1995. Xylitol: A review of its action on mutans streptococci and dental plaque-its clinical significance. Int Dent J 45 (Suppl1): 77-92.

Tsumori, H., Minami, T., and Kuramitsu, H.K. 1997. Identification of essential amino acids in the *Streptococcus mutans* glucosyltransferases. J Bacteriol 179: 3391-3396.

Tung, M.S., Markovic, M., and O'Farrell, T.J. 1994. Effects on saliva of chewing gums containing amorphous calcium phosphates. J Dent Res 73: 340, Abst. No. 1903.

Ueda, S., Shiroza, T., and Kuramitsu, H.K. 1988. Sequence analysis of the *gtfC* gene from *Streptococcus mutans* GS-5. Gene 69: 101-109.

Vacca-Smith, A.M., and Bowen, W. H. 1998. Binding properties of streptococcal glucosyltransferases for hydroxyapatite, saliva-coated hydroxyapatite, and bacterial surfaces. Arch Oral Biol 43: 103-110.

van Houte, J. 1994. Role of microorganisms in caries etiology. J Dent Res 73: 672-681.

van der Weijden, G.A., Timmer, C.J., Timmerman, M.F., Reijerse, E., Mantel, M.S., and van der Velden, U. 1998. The effect of herbal extracts in an experimental mouthrinse on established plaque and gingivitis. J Clin Periodontol 25: 399-403.

Viswanathan, S., Kulanthaivel, P., Nazimudeen, S.K., Vinayakam, T., Gopalakrishnan, C. and Kameswaran, L. 1981. The effect of apigenin 7,4'-di-o-methyl ether, a flavone from *Andrographis paniculata* on experimentally induced ulcers. Indian J Pharm Sci 43: 159-161.

Weiming, C., and Xiaotian, L. 1982. Deoxyandrographolide-19β-D-glucoside from the leaves of *Andrographis paniculata*. Planta Med 45: 245-246.

Whiley, R.A., and Beighton, D. 1998. Current classification of the oral streptococci. Oral Microbiol Immunol 13; 195-216.

Wolinsky, L.E., Mania, S., Nachnani, S., and Ling, S. 1996. The inhibiting effect of aqueous *Azadirachta indica* (Neem) extract upon bacterial properties influencing *in vitro* plaque formation. J Dent Res 75: 816-822.

Wolinsky, L.E., and Sote, E.O. 1984. Isolation of natural plaque-inhibiting substances from 'Nigerian chewing sticks'. Caries Res 18: 216-225.

Wong, C., Hefta, S.A., Paxton, R.J., Shively, J.E., and Mooser, G. 1990. Size and subdomain architecture of the glucan-binding domain of sucrose: 3-α-D-glucosyltransferase from *Streptococcus sobrinus*. Infect Immun 58: 2165-2170.

Wongkham, S., Pienthaweechai, K., Laupattarakasaem, P., Areejitranusorn, P., Wongkham, C., Jantamongkol, K., Leungpailin, S., and Techanitiswad, T. 1996. Bactericidal activity of *Streblus asper*. In Second Thai- French Symposium on Plant Molecular Biology, pp. 363-374. Bordeaux.

Wunder, D., and Bowen, W.H. 1999. Action of agents on glucosyltransferases from *Streptococcus mutans* in solution and adsorbed to experimental pellicle. Arch Oral Biol 44: 203-214.

Wu-Yuan, C.D., Chen, C.Y., and Wu, R.T. 1988. Gallotannins inhibit growth, water-soluble glucan synthesis, and aggregation of mutans streptococci. J Dent Res 67: 51-55.

Yamashita, Y., Bowen, W.H., Burne, R.A., and Kuramitsu, H.K. 1993. Role of the *Streptococcus mutans gtf* genes in caries induction in the specific-pathogen free rat model. Infect Immun 61: 3811-3817.

Yao, E.S., Lamont, R.J., Leu, S.P., and Weinberg, A. 1996. Interbacterial binding among

strains of pathogenic and commensal oral bacterial species. Oral Microbiol Immunol 11: 35-41.

Yokogawa, K., Kawata, S., Nishimura, S., Ikeda, Y., and Yoshimura, Y. 1974. Mutanolysin, bacteriolytic agent for cariogenic streptococci: Partial purification and properties. Antimicrob Ag Chemther 6: 156-165.

Zero, D.T. 1999. Dental caries process. Dent Clin North Am 43: 635-664.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

การทดสอบความแตกต่างในการยึดเกาะของเชื้อกับไฮดรอกซีอะพาไทท์ ระหว่างกลุ่มควบคุมที่ใส่บัฟเฟอร์กับกลุ่มควบคุมที่ใส่เอธานอล

ในการทดสอบผลการยับยั้งของสารสกัดจากสมุนไพรต่อการยึดเกาะของเชื้อกับไฮดรอกซีอะพาไทท์นั้น ต้องการให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของตัวทำละลายของสารสกัดจากสมุนไพรน้อยที่สุด จึงได้เตรียมสารสกัดจากสมุนไพรในเอธานอล ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของเอธานอลในสารละลายทั้งหมดเป็น 1.6% (เตรียมสารสกัดจากสมุนไพรในเอธานอล 95% ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมกับบัฟเฟอร์ ปริมาตร 28 ไมโครลิตร) และทำการประเมินว่า การใช้เอธานอล 1.6% มีผลต่อการยึดเกาะของเชื้อ ATCC 25175 หรือไม่ พบว่า สำหรับ เอธานอล 1.6% ให้ผลการยึดเกาะเท่ากับ 99.67 $\pm$6.00% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ใส่บัฟเฟอร์ และไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) เมื่อใช้สถิติ Unpaired t-test

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

การทดสอบทางสถิติ One Way ANOVA
เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากชาที่ความเข้มข้นต่าง ๆ
ต่อการยึดเกาะของเชื้อ ATCC 25175

Multiple Comparisons

Dependent Variable: ADHERE

Scheffe

(I) concentration	(J) concentration	Mean Difference (I-J)	Sig.
0.02%	0.05%	8.4033	.579
	0.1%	15.2067	.113
	0.3%	30.7667*	.002
	0.5%	37.1733*	.000
0.05%	0.02%	-8.4033	.579
	0.1%	6.8033	.741
	0.3%	22.3633*	.015
	0.5%	28.7700*	.003
0.1%	0.02%	-15.2067	.113
	0.05%	-6.8033	.741
	0.3%	15.5600	.102
	0.5%	21.9667*	.016
0.3%	0.02%	-30.7667*	.002
	0.05%	-22.3633*	.015
	0.3%	-15.5600	.102
	0.5%	6.4067	.779
0.5%	0.02%	-37.1733*	.000
	0.05%	-28.7700*	.003
	0.1%	-21.9667*	.016
	0.3%	-6.4067	.779

* The mean difference is significant at the .05 level.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทดสอบทางสถิติ One Way ANOVA
เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากชุมเห็ดเทศที่ความเข้มข้นต่าง ๆ
ต่อการยึดเกาะของเชื้อ ATCC 25175

Multiple Comparisons

Dependent Variable: ADHERE

Scheffe

(I) concentration	(J) concentration	Mean Difference (I-J)	Sig.
0.05%	0.1%	16.2950	.061
	0.3%	26.8050*	.005
	0.4%	36.2000*	.001
	0.5%	38.4800*	.000
	0.6%	46.5600*	.000
0.1%	0.05%	-16.2950	.061
	0.3%	10.5100	.377
	0.4%	19.9050*	.037
	0.5%	22.1850*	.021
	0.6%	30.2650*	.004
0.3%	0.05%	-26.8050*	.005
	0.1%	-10.5100	.377
	0.4%	9.3950	.479
	0.5%	11.6750	.287
	0.6%	19.7550*	.038
0.4%	0.05%	-36.2000*	.001
	0.1%	-19.9050*	.037
	0.3%	-9.3950	.479
	0.5%	2.2800	.997
	0.6%	10.3600	.389
0.5%	0.05%	-38.4800*	.000
	0.1%	-22.1850*	.021
	0.3%	-11.6750	.287
	0.4%	-2.2800	.997
	0.6%	8.0800	.615
0.6%	0.05%	-46.5600*	.000
	0.1%	-30.2650*	.004
	0.3%	-19.7550*	.038
	0.4%	-10.3600	.389
	0.5%	-8.0800	.615

* The mean difference is significant at the .05 level.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทดสอบทางสถิติ One Way ANOVA
เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากฟ้าทะลายโจรที่ความเข้มข้นต่าง ๆ
ต่อการยึดเกาะของเชื้อ ATCC 25175

Multiple Comparisons

Dependent Variable: ADHERE

Scheffe

(I) concentration	(J) concentration	Mean Difference (I-J)	Sig.
0.025%	0.05%	1.8367	.999
	0.1%	7.1800	.556
	0.2%	13.8600*	.022
	0.3%	17.4550*	.008
	0.4%	23.1850*	.001
	0.5%	30.8267*	.000
	0.6%	33.7450*	.000
0.05%	0.025%	-1.8367	.999
	0.1%	5.3433	.759
	0.2%	12.0233*	.027
	0.3%	15.6183*	.009
	0.4%	21.3483*	.001
	0.5%	28.9900*	.000
	0.6%	31.9083*	.000
0.1%	0.025%	-7.1800	.556
	0.05%	-5.3433	.759
	0.2%	6.6800	.535
	0.3%	10.2750	.187
	0.4%	16.0050*	.015
	0.5%	23.6467*	.000
	0.6%	26.5650*	.000
0.2%	0.025%	-13.8600*	.022
	0.05%	-12.0233*	.027
	0.1%	-6.6800	.535
	0.3%	3.5950	.187
	0.4%	9.3250	.015
	0.5%	16.9667*	.000
	0.6%	19.8850*	.000

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(I) concentration	(J) concentration	Mean Difference (I-J)	Sig.
0.3%	0.025%	-17.4550*	.008
	0.05%	-15.6183*	.009
	0.1%	-10.2750	.187
	0.2%	-3.5950	.956
	0.4%	5.7300	.777
	0.5%	13.3717*	.028
	0.6%	16.2900*	.014
0.4%	0.025%	-23.1850*	.001
	0.05%	-21.3483*	.001
	0.1%	-16.0050*	.015
	0.2%	-9.3250	.191
	0.3%	-5.7300	.777
	0.5%	7.6417	.384
	0.6%	10.5600	.166
0.5%	0.025%	-30.8267*	.000
	0.05%	-28.9900*	.000
	0.1%	-23.6467*	.000
	0.2%	-16.9667*	.002
	0.3%	-13.3717*	.028
	0.4%	-7.6417	.384
	0.6%	2.9183	.986
0.6%	0.025%	-33.7450*	.000
	0.05%	-31.9083*	.000
	0.1%	-26.5650*	.000
	0.2%	-19.8850*	.001
	0.3%	-16.2900*	.014
	0.4%	-10.5600	.166
	0.5%	-2.9183	.986

* The mean difference is significant at the .05 level.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทดสอบทางสถิติ One Way ANOVA
เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากสีฟันคนทาที่ความเข้มข้นต่าง ๆ
ต่อการยึดเกาะของเชื้อ ATCC 25175

Multiple Comparisons

Dependent Variable: ADHERE

Scheffe

(I) concentration	(J) concentration	Mean Difference (I-J)	Sig.
0.025%	0.05%	3.9200	.856
	0.1%	9.5733	.073
	0.2%	11.9867*	.018
	0.3%	15.9250*	.004
	0.4%	25.3400*	.000
	0.5%	33.5200*	.000
	0.6%	47.7800*	.000
0.05%	0.025%	-3.9200	.856
	0.1%	5.6533	.401
	0.2%	8.0667	.100
	0.3%	12.0050*	.018
	0.4%	21.4200*	.000
	0.5%	29.6000*	.000
	0.6%	43.8600*	.000
0.1%	0.025%	-9.5733	.073
	0.05%	-5.6533	.401
	0.2%	2.4133	.976
	0.3%	6.3517	.395
	0.4%	15.7667*	.002
	0.5%	23.9467*	.000
	0.6%	38.2067*	.000
0.2%	0.025%	-11.9867*	.018
	0.05%	-8.0667	.100
	0.1%	-2.4133	.976
	0.3%	3.9383	.853
	0.4%	13.3533*	.008
	0.5%	21.5333*	.000
	0.6%	35.7933*	.000

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(I) concentration	(J) concentration	Mean Difference (I-J)	Sig.
0.3%	0.025%	-15.9250*	.004
	0.05%	-12.0050*	.018
	0.1%	-6.3517	.395
	0.2%	-3.9383	.853
	0.4%	9.4150	.127
	0.5%	17.5950*	.002
	0.6%	31.8550*	.000
0.4%	0.025%	-25.3400*	.000
	0.05%	-21.4200*	.000
	0.1%	-15.7667*	.002
	0.2%	-13.3533*	.008
	0.3%	-9.4150	.127
	0.5%	8.1800	.232
	0.6%	22.4400*	.000
0.5%	0.025%	-33.5200*	.000
	0.05%	-29.6000*	.000
	0.1%	-23.9467*	.000
	0.2%	-21.5333*	.000
	0.3%	-17.5950*	.002
	0.4%	-8.1800	.232
	0.6%	14.2600*	.010
0.6%	0.025%	-47.7800*	.000
	0.05%	-43.8600*	.000
	0.1%	-38.2067*	.000
	0.2%	-35.7933*	.000
	0.3%	-31.8550*	.000
	0.4%	-22.4400*	.000
	0.5%	-14.2600*	.010

* The mean difference is significant at the .05 level.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทดสอบทางสถิติ One Way ANOVA
เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากชุมเห็ดเทศที่ความเข้มข้นต่าง ๆ
ต่อการยึดเกาะของเชื้อ TPF-1

Multiple Comparisons

Dependent Variable: ADHERE

Scheffe

(I) concentration	(J) concentration	Mean Difference (I-J)	Sig.
0.025%	0.05%	5.2233	.959
	0.2%	19.6517	.083
	0.3%	23.3067*	.015
	0.4%	31.2267*	.004
	0.5%	40.2600*	.000
	0.6%	47.7567*	.000
0.05%	0.025%	-5.2233	.959
	0.2%	14.4283	.303
	0.3%	18.0833	.072
	0.4%	26.0033*	.015
	0.5%	35.0367*	.001
	0.6%	42.5333*	.000
0.2%	0.025%	-19.6517	.083
	0.05%	-14.4283	.303
	0.3%	3.6550	.996
	0.4%	11.5750	.627
	0.5%	20.6083	.065
	0.6%	28.1050*	.017
0.3%	0.025%	-23.3067*	.015
	0.05%	-18.0833	.072
	0.2%	-3.6550	.996
	0.4%	7.9200	.853
	0.5%	16.9533	.100
	0.6%	24.4500*	.023
0.4%	0.025%	-31.2267*	.004
	0.05%	-26.0033*	.015
	0.2%	-11.5750	.627
	0.3%	-7.9200	.853
	0.5%	9.0333	.766
	0.6%	16.5300	.261

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(I) concentration	(J) concentration	Mean Difference (I-J)	Sig.
0.5%	0.025%	-40.2600*	.000
	0.05%	-35.0367*	.001
	0.2%	-20.6083	.065
	0.3%	-16.9533	.100
	0.4%	-9.0333	.766
	0.6%	7.4967	.881
0.6%	0.025%	-47.7567*	.000
	0.05%	-42.5333*	.000
	0.2%	-28.1050*	.017
	0.3%	-24.4500*	.023
	0.4%	-16.5300	.261
	0.5%	-7.4957	.881

* The mean difference is significant at the .05 level.

การทดสอบทางสถิติ One Way ANOVA
เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากฟ้าทะลายโจรที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการยึดเกาะของเชื้อ TPF-1

Multiple Comparisons

Dependent Variable: ADHERE

Scheffe

(I) concentration	(J) concentration	Mean Difference (I-J)	Sig.
0.025%	0.05%	5.2817	.934
	0.1%	15.4500	.161
	0.2%	27.7217*	.003
	0.3%	31.9917*	.001
	0.5%	35.1000*	.001
	0.6%	36.5100*	.001
0.05%	0.025%	-5.2817	.934
	0.1%	10.1683	.458
	0.2%	22.4400*	.006
	0.3%	26.7100*	.002
	0.5%	29.8183*	.002
	0.6%	31.2283*	.001

(I) concentration	(J) concentration	Mean Difference (I-J)	Sig.
0.1%	0.025%	-15.4500	.161
	0.05%	-10.1683	.458
	0.2%	12.2717	.270
	0.3%	16.5417	.077
	0.5%	19.6500*	.050
	0.6%	21.0600*	.034
0.2%	0.025%	-27.7217*	.003
	0.05%	-22.4400*	.006
	0.1%	-12.2717	.270
	0.3%	4.2700	.958
	0.5%	7.3783	.764
	0.6%	8.7883	.609
0.3%	0.025%	-31.9917*	.001
	0.05%	-26.7100*	.002
	0.1%	-16.5417	.077
	0.2%	-4.2700	.958
	0.5%	3.1083	.995
	0.6%	4.5183	.968
0.5%	0.025%	-35.1000*	.001
	0.05%	-29.8183*	.002
	0.1%	-19.6500*	.050
	0.2%	-7.3783	.764
	0.5%	-3.1083	.995
	0.6%	1.4100	1.000
0.6%	0.025%	-36.5100*	.001
	0.05%	-31.2283*	.001
	0.1%	-21.0600*	.034
	0.2%	-8.7883	.609
	0.3%	-4.5183	.968
	0.5%	-1.4100	1.000

* The mean difference is significant at the .05 level.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวจิตรา ลิมทรง เกิดเมื่อวันที่ 18 ตุลาคม พ.ศ. 2516 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรี ทันตแพทยศาสตรบัณฑิต จากคณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2540 และได้เข้ารับราชการที่คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นอาจารย์ประจำภาควิชาเภสัชวิทยา หลังจากนั้น ได้เข้าศึกษาต่อในระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาช่องปาก ในปี พ.ศ. 2541

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย