บทที่ 2
วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. เชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส (*Porphyromonas gingivalis*)

1.1 ลักษณะทางจุลชีววิทยา

เชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส เป็นแบคทีเรียที่สำคัญในโรคปริทันต์อักเสบในผู้ใหญ่ (Adult periodontitis) เชื้อนี้อยู่ในกลุ่มแบคทีรอยดีสที่ผลิตเม็ดสีดำ (black picmented *bacteroides*) เดิมถูกจัดอยู่ในกลุ่มของ แบคทีรอยดีส เมลานิโนเจนิคัส (*Bacteroides melanninogenicus*) ต่อมามีการจัดกลุ่มใหม่และถูกแยกไปเป็นกลุ่มสปีชีส์ (species) ใหม่ คือ พอร์ไฟโรโมแนส (*Porphyromonas*)[32, 33] และเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ได้ถูกแยกเป็นชนิดใหม่ภายหลัง

เชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เคลื่อนที่ไม่ได้ มีรูปร่างเป็นแท่ง (rod) กลม (coccoid) หรือรี (coccobacillus) ในสภาวะที่มีฮีมิน (hemin) มากจะมีรูปร่างกลม และถ้ามีฮีมินจำกัดจะมีรูปร่างเป็นทั้งรีหรือแท่งสั้นๆ (coccobacillary) โครงสร้างผนังเซลล์เป็นแบบแกรมลบ (Gram negative)[34]

1.2 ปัจจัยความรุนแรงของเชื้อพอไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส

เปลือกหุ้มเซลล์ (capsule)

เปลือกหุ้มเซลล์เป็นส่วนประกอบสำคัญในการต้านการกลืนกินของเม็ดเลือดขาว (anti-phagocytic) ส่วนประกอบทางเคมีประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรท ซึ่งแต่ละสายพันธุ์จะมีส่วนประกอบแตกต่างกัน ยกตัวอย่างเช่น เชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส 381 ประกอบด้วย กาแล็คโทส กลูโคส กลูโคซามิน[35]

โปรตีนหุ้มเปลือกชั้นนอก (outer membrane proteins)

โปรตีนหุ้มเปลือกชั้นนอกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสมีอย่างน้อย 20 ชนิด มีขนาดประมาณ 20 ถึง 90 kDa[36] สามารถกระตุ้นไฟโบรบลาส (fibroblast) กระตุ้นการละลายกระดูก[37, 38] กระตุ้นการทำงานของ B cell และกระตุ้นการผลิต IL-1[39]

ไลโปโพลีแซคคาร์ไรด์ (lipopolysaccharide)

ไลโปโพลีแซคคาร์ไรด์ เป็นส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก เป็นโมเลกุลขนาดมากกว่าหรือเท่ากับ 10 kDa มีคุณสมบัติทั้งเข้ากับน้ำและไม่เข้ากับน้ำ (amphipathic) มีผลทาง

ชีวภาพ คือ การเป็นพิษต่อเซลล์ (endotoxicity) กระตุ้น B-cell, IFN-γ, IL-1, tumor necrosis factor (TNF) นอกจากนี้ยัง สามารถกระตุ้นให้เกิด prostaglandin E2 (PGE2) และ IL-8 ได้[40-47]

ฟิมเบรีย (fimbriae)

ฟิมเบรียเป็นส่วนของโปรตีนที่ยื่นออกจากผิวเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย บทบาทของฟิมเบรีย คือ ช่วยให้เชื้อยึดเกาะ (adherence) กับเซลล์สิ่งมีชีวิต เช่น เซลล์เยื่อบุเหงือก[48, 49]

โปรตีนเนส (proteinases)

โปรตีนเนส เป็นเอนไซม์ในผิวเปลือกหุ้มชั้นนอก หรือในถุง (vesicle) ของเปลือกหุ้มชั้นนอก ทำหน้าที่สลายพันธะระหว่างกรดอะมิโน ทำให้เชื้อสามารถบุกรุกทำลายเนื้อเยื่อและเซลล์ของร่างกาย (host cells)[50, 51] โปรตีนเนส ได้แก่ ทริปซิน (Trypsin) เป็ปติเดส (peptidases) ไทออล์ (Thiol) และเมททอลโลโปรติเนส (metalloproteinases) คอลลาจีเนส (collagenase) อะมิโนเป็ปติเดส (aminopeptidase) และทริปซินไลค์โปรติเนส (Trypsin-like proteinases) เป็นต้น นอกจากนี้ Uitto และคณะ[52]ทำการศึกษาพบว่าโปรติเนสของเชื้อ*พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส* สามารถกระตุ้นไฟโบรบลาสให้ผลิตคอลลาจีเนสได้

ซีเลคเตทเอนไซม์ (Selected enzyme)

ซีเลคเตทเอนไซม์มาจากการสลายของเซลล์หรือการขับออก (extrusion) ของถุงที่เปลือกหุ้มตัวอย่างเช่น อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส (alkaline phosphatase) ซึ่งมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับการดำเนินของโรคปริทันต์และการทำลายของกระดูกรองรับฟันในภาวะที่เป็นโรครุนแรง[53, 54] เอนไซม์ชนิดอื่นเช่น ซูเปอร์ออกไซด์ ดีสมิวเทส (superoxide dismutase) เปอร์ออกซิเดส (peroxidase) และคาตาเลส (catalase) ทำให้เชื้อทนต่อออกซิเจน-เจนเนอเรตท์ เรดิเคอร์ (oxygen-generated radicals) ได้[55, 56]

1.3 กลไกก่อโรคของเชื้อ*พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส*

พื้นผิวในช่องปากโดยทั่วไปจะถูกเคลือบด้วยเพลลิเคิล (pellicle) ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่พบมากในน้ำลาย ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวรับ (receptor) การยึดเกาะของเชื้อจุลินทรีย์ ในบริเวณผิวฟันจะมีการโคโลไนซ์ (colonization) โดยเชื้อจุลินทรีย์เริ่มแรก อาทิเช่น *S. gordonii, S. sanguis, S. oralis, S. mitis, S. crista* และ *A.viscosus* ที่อยู่แบบพึ่งพาอาศัยกัน ต่อมาเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส จะเข้ายึดเกาะกับคราบแบคทีเรียเริ่มแรกนั้น[57-60] และเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสยังสามารถยึดเกาะกับเชื้อที่มาโคโลไนซ์ภายหลังได้ ตัวอย่างเช่น เชื้อฟิวโซแบคทีเรียม นูคลีเอทัม (*Fusobacterium nucleatum*) และเชื้อทรีโปนีมา เดนติโคล่า (*Treponema denticola*)[61, 62] นอกจากนี้มีรายงานว่าเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส สามารถยึดเกาะกับถุงที่อยู่บริเวณเนื้อเยื่อชั้นนอกได้อีกด้วย[63]

เชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส สามารถยึดเกาะ (adhere) เนื้อเยื่อภายในช่องปากได้หลากหลาย ทั้งเนื้อเยื่อแข็ง (hard tissue) ได้แก่ ฟัน และยึดเกาะเยื่อเมือก (mucasal tissue) ได้แก่ เหงือก กระพุ้งแก้ม และลิ้น เชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสที่ยึดเกาะบริเวณร่องเหงือกและร่องลึกปริทันต์ สามารถก่อโรคได้อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งเชื้อเข้าสู่ใต้เหงือกได้โดยการแบ่งตัว (proliferation) หรือการหลุดของเซลล์ที่แบ่งตัวแล้ว (dislodged progeny)[64, 65]

จิงจิเพน (gingipains) ที่ผลิตโดยเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสสามารถทำลายโปรตีนที่เชื่อมกันของเซลล์เยื่อบุผิว (epithelial cells) นำไปสู่การกระตุ้นสัญญาณภายในเซลล์[66]

ปัจจัยเหล่านี้ทำให้เกิดการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกัน[67] เชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส กระตุ้นการสร้าง IL-8 และ MCP-1 ทำให้เกิดการรวมกลุ่ม และการเคลื่อนที่ของเม็ดเลือดขาวผ่านเยื่อบุหลอดเลือดลดลง เพิ่มปริมาณ IL-1β, IL-6, IL-1ra[68, 69] และมีผลต่อระบบ RANKL-OPG (RANKL-OPG system) ผ่านทาง prostaglandin E_2 เกิดการทำลายกระดูกและเกิดการอักเสบของอวัยวะปริทันต์[70]

2. วิธีการตรวจเชื้อ[71]

2.1 Phase contrast and darkfield microscopy

Phase contrast and darkfield microscopy เป็นวิธีการตรวจคราบจุลินทรีย์จากกล้องจุลทรรศน์ เพื่อประเมินผลการรักษาแบบ non-surgical โดยตรวจขนาด รูปร่าง และการเคลื่อนที่ของเชื้อจุลินทรีย์ การตรวจโดยวิธีนี้ไม่สามารถจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ได้

คราบจุลินทรีย์ของผู้ป่วยที่มีอวัยวะปริทันต์ที่ดีมีลักษณะเฉพาะ คือ มีเชื้อน้อย เชื้อส่วนใหญ่เป็นชนิดรูปร่างกลม เคลื่อนที่ไม่ได้ (non-motile cocci) ส่วนคราบจุลินทรีย์ของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบมีลักษณะเฉพาะ คือ มีเชื้อสไปโรขีต (spirochetes) เคลื่อนที่ได้ และลักษณะเชื้อจุลินทรีย์รูปแท่งโค้ง (curved rod) จำนวนมาก

2.2 Bacterial culture

Bacterial culture หรือการเพาะเชื้อ เป็นวิธีการที่สามารถตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายชนิด มีประโยชน์ในการทดสอบการตอบสนองต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อจุลินทรีย์ จึงมีส่วนช่วยในการเลือกใช้ยาปฏิชีวนะที่เหมาะสม

แต่การตรวจเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธีเพาะเชื้อมีข้อจำกัด คือ เชื้อจุลินทรีย์ต้องเป็นชนิดที่เพาะเลี้ยงได้เท่านั้น ทั้งยังมีค่าใช้จ่ายสูง และต้องใช้ห้องปฏิบัติการที่ได้มาตรฐาน

2.3 Immunoassays and nucleic acid probe assays

Immunoassays and nucleic acid probe assays เป็นวิธีตรวจหาสปีชีส์ (species) ของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งทั้งสองวิธีใช้สารจำเพาะต่อสปีชีส์ (species-specific reagents)

วิธี immunoassays ใช้แอนติบอดี (antibody) เพื่อสร้างเป็น antigen-antibody complexes กับแอนติเจน (antigens) ของเชื้อจุลินทรีย์ ส่วนวิธี nucleic acid probe assays ใช้ชิ้นส่วนของ DNA หรือ RNA เพื่อจับกับลำดับของกรดนิวคลิอิกที่เข้าคู่กัน (complementary nucleic acid sequences) ในเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมาย ซึ่งวิธีทั้งสองอาจเกิดข้อผิดพลาดจากการ cross-reactivity

2.4 Enzyme assays

Enzyme assays เป็นวิธีการตรวจเชื้อจุลินทรีย์แบบกลุ่ม โดยตรวจเอนไซม์ที่ปรากฏในบริเวณที่เนื้อเยื่อปริทันต์ถูกทำลาย เช่น คอลลาจีเนส (collagenase) เป็ปติเดส (peptidases) ทริปซินไลค์เอนไซม์ (Trypsin-like enzyme) นิวทรอลโปรติเอส (neutral proteases) และอิลาสเตส (elastase)

ทริปซินไลค์เอนไซม์ (Trypsin-like enzyme) ใช้ตรวจหากลุ่มเชื้อก่อโรคปริทันต์ เช่น *P. gingivalis B. forsythus* และ *T. denticola*

2.5 Polymerase chain reaction (PCR)

Polymerase chain reaction เป็นวิธีการตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ที่จำเพาะ และมีความไว (sensitivity) สูง โดยทำการสังเคราะห์สาย DNA ที่จำเพาะต่อสปีชีส์ของเชื้อจุลินทรีย์ เรียกว่า ไพรเมอร์ (primer) ซึ่งมี oligonucleotide ยาว 18-28 เบส ออกมา 2 ประเภท คือ forward primer และ reverse primer แล้วผสมไพรเมอร์ทั้งสองลงในของเหลวที่มี DNA สายคู่จากคราบจุลินทรีย์ จากนั้นจึงนำของเหลวที่ได้เข้าสู่กระบวนการเพิ่มจำนวน DNA ที่จำเพาะต่อไพรเมอร์ ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

ขั้นตอนที่ 1 denature คือ การแยกสาย DNA จากคราบจุลินทรีย์ออกเป็นสายเดี่ยว โดยเพิ่มอุณหภูมิของเหลวเป็น 90-95 องศาเซลเซียส

ขั้นตอนที่ 2 annealing คือ การทำให้ไพรเมอร์เข้าจับกับตำแหน่งจำเพาะบน DNA สายเดี่ยว โดยลดอุณหภูมิของเหลวลงเหลือ 40-60 องศาเซลเซียส

ขั้นตอนที่ 3 extension คือ การขยายสาย DNA ในขั้นตอนที่ 2 ให้กลายเป็น DNA สายคู่ โดยเพิ่มอุณหภูมิของเหลวเป็น 70-75 องศาเซลเซียส

ปรับอุณหภูมิซ้ำตามขั้นตอนที่ 1-3 เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA สายคู่ ทั้งนี้ขั้นตอน PCR จะแตกต่างกันตามชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ และควรปฏิบัติตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิตไพรเมอร์เท่านั้น เมื่อได้ปริมาณ DNA สายคู่จำนวนมากพอ หรือที่เรียกว่า ผลผลิต PCR จึงนำมาตรวจสอบ

ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ด้วยกระบวนการ electrophoresis ซึ่งแสดงแถบ DNA ที่ต่างกันตามชนิดของเชื้อจุลินทรีย์

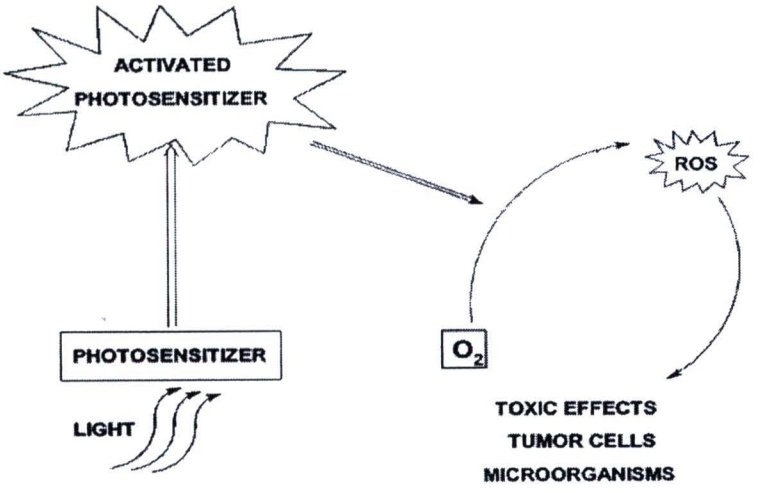
3. การรักษาโดยวิธีโฟโตไดนามิกส์ (Photodynamic therapy)

การรักษาโดยวิธีโฟโตไดนามิกส์ คือ การรักษาทางการแพทย์ซึ่งใช้ประโยชน์จากแสงโดยอาศัยพลังงานแสงมากระตุ้นสารไวต่อแสง (photosensitizing agent) ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน ทำให้เกิดกระบวนการสร้างรีแอคทีฟออกซิเจนสปีชีส์และอนุมูลอิสระ ส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์แบบเฉพาะที่ ซึ่งในทางคลินิกปฏิกิริยานี้เป็นพิษทั้งต่อเซลล์ (cytotoxic) และหลอดเลือด (vasculotoxic) ทั้งนี้ผลลัพธ์ขึ้นอยู่กับชนิดของสารไวต่อแสง[9]

ปัจจุบันมีการนำการรักษาโดยวิธีโฟโตไดนามิกส์มาใช้ในทางทันตกรรม ได้แก่ การรักษาโรคมะเร็งในช่องปาก การติดเชื้อแบคทีเรีย การติดเชื้อราในช่องปาก และวินิจฉัยรอยโรคในช่องปาก[72]

3.1 ปฏิกิริยาโฟโตไดนามิกส์ (photodynamic reaction)

วิธีโฟโตไดนามิกส์ ประกอบด้วย 3 องค์ประกอบหลัก ได้แก่ แสง สารไวต่อแสง และออกซิเจน ดังภาพที่ 1 การเกิดปฏิกิริยาเริ่มจากการที่แสงมีความยาวคลื่นจำเพาะ มาแผ่รังสี (irradiation) ให้แก่สารไวต่อแสง ซึ่งสารไวต่อแสงจะเปลี่ยนจากสถานะพื้นฐาน (ground state, S) เป็นสถานะถูกกระตุ้น (excited singlet state, S^*) ต่อมากลับสู่สถานะพื้นฐานด้วยการปลดปล่อยพลังงาน (emission) เป็นพลังงานแสง (fluorescence) หรือความร้อน และไปยังระดับพลังงาน excited triplet state (T) ซึ่งให้แสง (phosphorescence) เมื่อกลับไปสู่สถานะพื้นฐาน และในระหว่างนี้สารไวต่อแสงสามารถ เกิดรีแอคทีฟออกซิเจนสปีชีส์ โดยผ่าน 2 กลไกและทำลายเนื้อเยื่อเป้าหมาย[73]

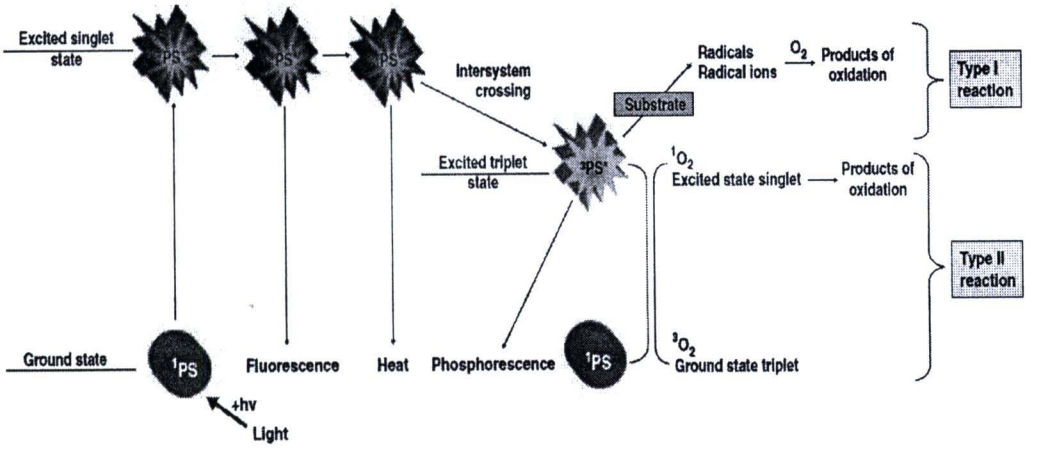


ภาพที่ 1 แสดงองค์ประกอบการเกิดปฏิกิริยาโฟโตไดนามิกส์[9]
ROS = reactive oxygen species

สารไวต่อแสงที่ triplet state สามารถเกิดปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุล โดยกลไกดังต่อไปนี้

กลไกที่ 1 เกิดการย้ายตำแหน่งของอิเล็กตรอน/ไฮโดรเจน (electron/hydrogen transfer) จากสารไวต่อแสง เกิดไอออน หรืออิเล็กตรอน/ไฮโดรเจน เคลื่อนย้ายจากโมเลกุลสารตั้งต้นไปเป็นอนุมูลอิสระ อนุมูลเหล่านี้ทำปฏิกิริยากับออกซิเจนอย่างรวดเร็ว เป็นผลให้เกิดรีแอคทีฟออกซิเจนสปีชีส์ ได้แก่ ซุปเปอร์ออกไซด์ (superoxide) ไฮดร็อกซิลเรดิเคิล (hydroxyl radicals) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide)

กลไกที่ 2 ปฏิกิริยาถ่ายเทพลังงานจากสารไวต่อแสงไปยังโมเลกุลของออกซิเจน ทำให้สารไวต่อแสงกลับสู่สถานะพื้นฐาน และเกิดซิงเกลทออกซิเจน ซึ่งมีคุณสมบัติไวต่อการเกิดปฏิกิริยา



ภาพที่ 2 แสดงกลไกที่ 1 และ 2 ในปฏิกิริยาโฟโตไดนามิกส์[73]

PS = photosensitizer

ในการรักษาโดยวิธีโฟโตไดนามิกส์ เป็นการยากที่จะจำแนกความแตกต่างระหว่างกลไกการเกิดปฏิกิริยาทั้งสอง แต่อย่างไรก็ตาม สามารถสรุปได้ว่ากลไกการเกิดปฏิกิริยา ขึ้นกับแหล่งกำเนิดแสง ปริมาณออกซิเจนและความเข้มข้นของสารไวต่อแสง[9]

คุณสมบัติของสารไวต่อแสงที่ดี[74]

1) คงอยู่ในเซลล์หรือเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมาย
2) เป็นพิษต่อเซลล์เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงเท่านั้น
3) สามารถสร้างซิงเกลทออกซิเจนหรือซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออนเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสง
4) สามารถนำออกจากร่างกายได้อย่างรวดเร็วและมีความเป็นพิษต่ำ
5) ไม่ทำลายเนื้อเยื่อหรือเซลล์ที่ดี

ได้มีการนำเมธิลีนบูล มาใช้เป็นสารไวต่อแสงในรูปแบบทางการค้าชื่อ Periowave™ Treatment kit ร่วมกับการขูดหินปูนเกลารากฟัน โดยนำเมธิลีนบูลใส่ในร่องลึกปริทันต์ทิ้งไว้ 60 วินาที และฉายแสงสีแดงผ่านไฟเบอร์ออฟติก(fiberoptic) เป็นเวลา 60 วินาที พบว่าได้ผลดีกว่าการขูดหินปูนเกลารากฟันเพียงอย่างเดียว[75]

3.2 ผลของวิธีโฟโตไดนามิกส์ต่อผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ

เชื้อแบคทีเรียแกรมลบประกอบด้วยเยื่อหุ้มเซลล์ 2 ชั้น คือ เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (outer cell membrane) และเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นใน (inner cell membrane) ซึ่งการทำลายเชื้อแบคทีเรียแกรมลบโดยวิธีโฟโตไดนามิกส์จำเป็นต้องอาศัยปฏิกิริยาทั้งสองขั้นตอน[76, 77] ดังนี้

ปฏิกิริยาที่ 1 (primary reaction) ซิงเกลทออกซิเจนทำปฏิกิริยากับส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก

ปฏิกิริยาที่ 2 (secondary reaction) เปอร์ออกซิเรดิเคิล (peroxy radical) ทำปฏิกิริยากับเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นใน

การทำลายผนังหุ้มเซลล์ชั้นในเป็นขั้นตอนที่สำคัญในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียแกรมลบโดยใช้สารไวแสง เนื่องจากทำให้เยื่อหุ้มเซลล์สูญเสียการป้องกัน (barrier function) รบกวนสมดุลอิออน (ion balance) และระบบเมตาบอลิซึม (metabolism) การสูญเสียการป้องกันจะทำให้สารไวต่อแสงเข้าสู่ไซโตพลาซึม (cytoplasm) ได้มากยิ่งขึ้น และเกิดปฏิกิริยาโฟโตออกซิเดชัน (photo oxidation) กับโปรตีน และ DNA ภายในเซลล์[74, 78]

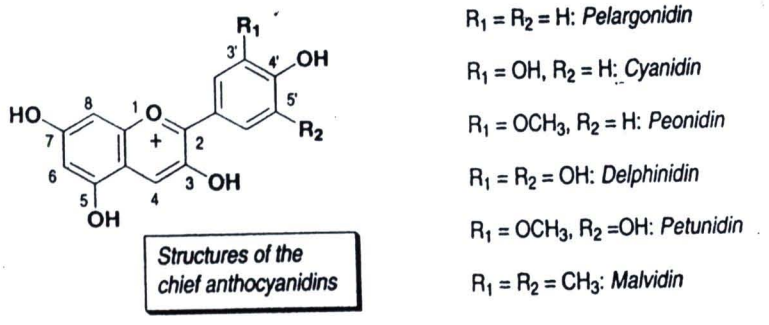
4. สารที่ใช้การศึกษา

4.1 แอนโทไซยานิน (Anthocyanin)

แอนโทไซยานิน (Anthocyanin) มาจากรากศัพท์ภาษากรีก คำว่า anthos หมายถึง ดอกไม้ และ kyanos หมายถึง สีน้ำเงิน[79] แอนโทไซยานินพบได้ในส่วนต่าง ๆ ของพืช ยกตัวอย่างเช่น ส่วนกลีบดอก ฐานกลีบดอก ผล ใบ ก้านใบ ราก และหัว[80] โดยพบได้ในพืชทุกชนิด เช่น องุ่น ดอกอัญชัญ หัวแครอท เป็นต้น

โมเลกุลของแอนโทไซยานินเป็นไกลโคไซด์ (glycoside) ซึ่งประกอบด้วยส่วนที่เป็นน้ำตาลและส่วนที่เป็นอะไกลโคน (aglycone) เรียกว่า แอนโทไซยานิดิน (anthocyanidin) ในเนื้อเยื่อพืชจะไม่พบอะไกลโคนในรูปอิสระ แต่พบในรูปไกลโคไซด์เท่านั้น[81]

แอนโทไซยานิดินที่พบส่วนใหญ่ ได้แก่ เพลาร์โกนิดิน (pelargonidin, Pg) ไซยานิดิน (cyanidin, Cy) เดลฟินิดิน (delphinidin, Dp) เพทูนิดีน (petunidin, Pt) พีโอนิดิน(peonidin, Pn) และมัลวิดิน (malvidin, Mv)[81] มีสูตรโครงสร้างดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 โครงสร้างของแอนโทไซยานิดิน[80]

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

คุณสมบัติทางชีวเคมี[80]

แอนโทไซยานินละลายได้ในน้ำ เนื่องจากคุณสมบัติของ 2-phenylbenzopyrylium cation ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นกรดอ่อน และเป็น electrophilic reagent ที่ดี สารละลายที่ pH < 3 จะเป็นรูปแบบ cation มีสีแดงและมีสภาพคงตัว ในสารละลายกรดอ่อน pH ระหว่าง 4-6 จะมีการสูญเสียโปรตอน 1-2 โปรตอน และนำไปสู่การเป็น anhydrobase ในสาระละลายที่เป็นกลางหรือ ionized จะคงตัวในสภาพ resonance ซึ่งจะมีสีน้ำเงิน เมื่อ pH เพิ่มขึ้นสารละลายจะไม่มีสีและจะมีคุณสมบัติเป็น ionized และโครงสร้างของแอนโทไซยานินจะถูกทำลาย

เนื่องจากในธรรมชาติ pH ใน vacuole ที่น้อยกว่า 3 นั้นมีน้อยมากจึงมีกระบวนการป้องกัน เพื่อให้แอนโทไซยานินมีสภาพคงตัวโดยอาจจะเป็นกลไกดังนี้

กลไกที่ 1 Intramolecular copigmentation จะมีสภาวะเป็นกรดโดยการใส่ acyl group เข้าไปในโมเลกุลน้ำตาลรอบแอนโทไซยานิน (ส่วนใหญ่อยู่ในรูปของ polyacyl-polyglycosyl-anthocyanins)

กลไกที่ 2 Self association หรือ autocopigmentation ซึ่งโมเลกุลของแอนโทไซยานินจะกองซ้อนกันและป้องกันซึ่งกันและกัน

กลไกที่ 3 Intermolecular copigmentation ด้วย flavonoid นอกจากนี้การดูดซึมไปยังโปรตีน, เพ็กติน (pectins) และแมคโครโมเลกุลอื่นจะช่วยให้แอนโทไซยานินมีการคงตัว

คุณสมบัติอื่นของแอนโทไซยานิน ดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 500-600 นาโนเมตร[19] ไม่คงตัวต่อออกซิเจน ความร้อน และแสง

การนำแอนโทไซยานินมาใช้ทางการแพทย์ได้แก่ นำมาใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ[20, 21] **ต้านการอักเสบ**[22, 23] **ต้านจุลชีพ**[24] **ต้านการเกิดมะเร็ง**[25, 26] **ทำให้การมองเห็นดีขึ้น**[27] **ชักนำการเกิด apoptosis**[28] **ป้องกันระบบประสาทเสื่อมสภาพ**[29] **และลดความเสี่ยงต่อโรคหัวใจและหลอดเลือด**[30]

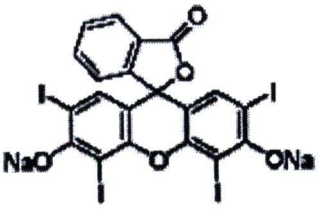
4.2 อีริโทรซิน (erythrosine)

อีริโทรซิน เป็นสีผสมอาหารจัดอยู่ในกลุ่มของ cyclic compound ที่เรียกว่า xanthenes ซึ่งมีรายงานว่าสามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 500-550 นาโนเมตร และสามารถเกิดปฏิกิริยาโฟโตไดนามิก[82, 83]

การศึกษาผลของอีริโทรซินต่อการเกิดมะเร็งต่อมไทรอยด์ พบว่าเมื่อผสมอีริโทรซินร้อยละ 4 ลงในอาหารให้หนูรับประทาน (basal diet) ติดต่อกันเป็นเวลา 19 สัปดาห์พบว่าหนูเกิดมะเร็งต่อมไทรอยด์[84]

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 12 ก.ค. 2555
เลขทะเบียน 240522
เลขเรียกหนังสือ

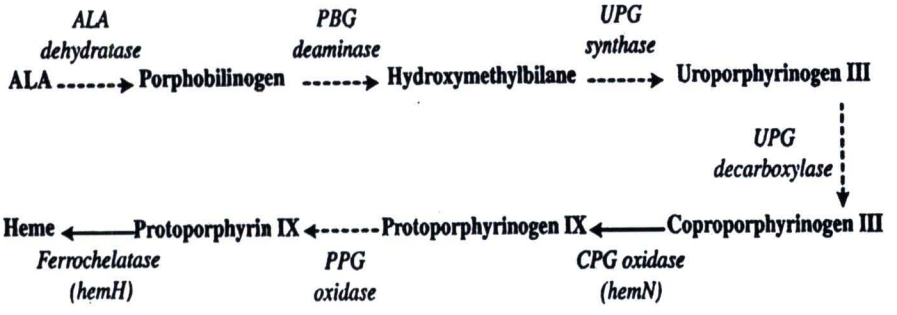
ในทางทันตกรรมนำอีริโทรซินเป็นสีที่นำมาใช้ย้อมคราบจุลินทรีย์โดยทั่วไป โดยใช้ที่ความเข้มข้น 9-25 mM จากการศึกษาของ Wood และคณะ[17] พบว่าอีริโทรซินสามารถต้านเชื้อ *S. mutans* ในไบโอฟิล์มด้วยวิธีการโฟโตไดนามิกส์



ภาพที่ 4 แสดงโครงสร้างของอีริโทรซิน

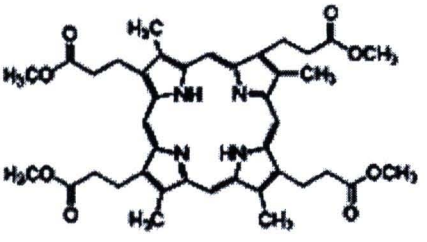
4.3 โคโปรพอร์ไฟริน III (coproporphyrin III)

โคโปรพอร์ไฟริน III เป็นสารตัวกลางหนึ่งในการสังเคราะห์ฮีม (heme) สามารถแบ่ง isomers ออกได้เป็น 2 ชนิดคือ methyl esters type I และ III isomers[85] ในการสังเคราะห์ฮีมของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส อาศัยเอนไซม์ทั้งจากภายในตัวเชื้อและจากภายนอก[86]



ภาพที่ 5 แสดงความสัมพันธ์ของโคโปรพอร์ไฟริน III การสังเคราะห์ฮีมของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิ วาลิส[86]
ลูกศรเส้นทึบ แทนเอนไซม์ที่สร้างจากเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส
ลูกศรเส้นประ แทนเอนไซม์ที่สร้างจากภายนอกเซลล์เชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส

มีรายงานว่า coproporphyrin สามารถสะสมได้ทั้งในของเซลล์เชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ[87] ได้แก่ เชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส[18] เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่าสาร coproporphyrin III tetramethyl ester มีคุณสมบัติเป็นสารไวต่อแสง[18, 88]โดยดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 405 ถึง 415 นาโนเมตร[18]

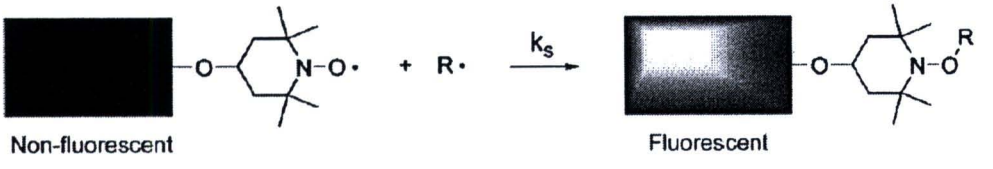


ภาพที่ 6 แสดงโครงสร้าง coproporphyrin III tetramethyl ester

5. วิธีการตรวจวัดอนุมูลอิสระ

5.1 วิธี Fluorescence sensor[89]

วิธี Fluorescence sensor คือ การใช้ prefluorescent radical probe ซึ่งเป็นโมกุลที่ไม่เรืองแสง (non-fluorescent) เมื่อทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระจะเกิดการเรืองแสง (fluorescent) ดังภาพที่ 7



ภาพที่ 7 แสดงการเรืองแสงของ fluorophore เมื่อทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ[89]

ตัวอย่างการใช้ prefluorescent radical probe และ photoinitiators ในการตรวจวัดการสร้างอนุมูลอิสระใน polymer film โดยใช้ fluorescence spectroscopy และ กล้องจุลทรรศน์โดยprefluorescent radical probes จะเป็นตัวสร้างภาพใน polymer film ซึ่ง prefluorescent radical

probes เป็นทั้งเครื่องมือที่ช่วยใน การศึกษากระบวนการของ photoinitiated radical ใน polymer film และช่วยในการเตรียมการสร้างภาพ

5.2 วิธี Dichlorofluorescein[90]

วิธี Dichlorofluorescein เป็นการตรวจวัดอนุมูลอิสระ โดยใช้สาร 2, 7 - dichlorofluorescin (DCFH) ที่ไม่เรืองแสง เมื่อทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระแล้วจะเกิดเป็น 2, 7 - dichlorofluorescin (DCF) ที่สามารถเรืองแสงได้ มีการนำวิธีการนี้มาประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดรีแอคทีฟออกซิเจนสปีชีส์ภายในเซลล์

5.3 วิธี Chemiluminescence

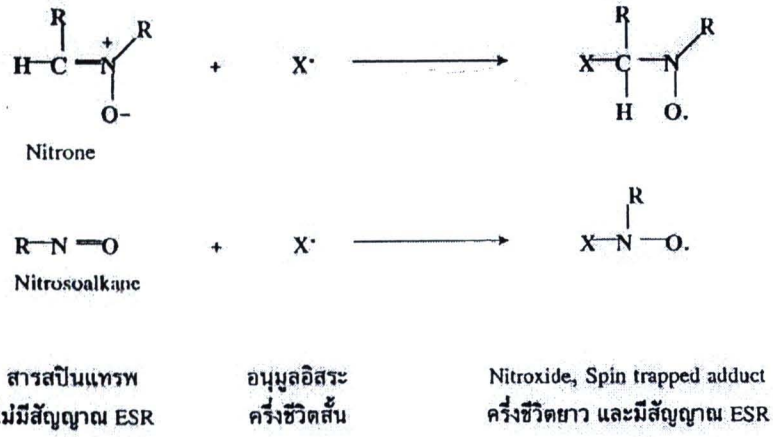
Suzuki และคณะ[91] ได้นำวิธี Chemiluminescence มาตรวจวัดรีแอคทีฟออกซิเจนสปีชีส์โดยใช้สาร chemiluminescent compounds และ superoxide dismutase ในการวัดซิงเกลทออกซิเจน และ ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion) โดยวัดการปลดปล่อยพลังงานที่ความยาวคลื่น 1, 268 นาโนเมตร นอกจากนี้ลูมินอล (luminal) สามารถเรืองแสงได้เมื่อทำปฏิกิริยากับซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion)[92]

5.4 วิธี Spin traping and Electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy

เป็นเทคนิคเดียวที่สามารถใช้ตรวจสอบอิเล็คตรอนไร้คู่หรืออนุมูลอิสระได้โดยตรง โดยดูดกลืนพลังงานคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าในช่วงคลื่นไมโครเวฟเมื่ออิเล็คตรอนอยู่ในสนามแม่เหล็ก ทำให้เกิดการเรียงตัวของอิเลคตรอน (electron) ในอนุมูลอิสระ ซึ่งผลรวมของการดูดกลืนคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าและพลังงานไมโครเวฟ จะแสดงผลออกมาในลักษณะของ EPR spectrum ที่จำเพาะแต่อย่างไรก็ตามอนุมูลอิสระ มีค่าครึ่งชีวิตสั้นมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งไฮดรอกซิลเรดิเคิล อยู่ที่ระดับ 10^{-9} วินาที ดังนั้นเทคนิกสปรินแทรพ เป็นวิธีที่นำมาใช้ร่วมกับวิธี Electron paramagnetic resonance spectroscopy เพื่อระบุชนิดของอนุมูลอิสระ และทำให้อนุมูลอิสระมีความคงตัวที่นานในรูปของสปินแอดดัคท์ (spin adduct) ซึ่งทำให้สามารถตรวจวัดได้ด้วยวิธี Electron paramagnetic resonance spectroscopy[93-95]

หลักการของเทคนิคการสปินแทรพ[95]

การสปินแทรพเป็นวิธีตรวจสอบและจำแนกชนิดของอนุมูลอิสระที่มีค่าครึ่งชีวิตสั้นโดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระกับสารในกลุ่ม nitrone หรือ nitrosoalkane ซึ่งให้ผลิตผลเป็นอนุมูลอิสระ nitroxide ที่มีค่าครึ่งชีวิตยาวขึ้น โดยทั่วไปจะเรียกอนุมูลอิสระ nitroxide นี้ว่าสปินแอดดัคท์



ภาพที่ 8 ปฏิกิริยาการสปินแทรพ[95]

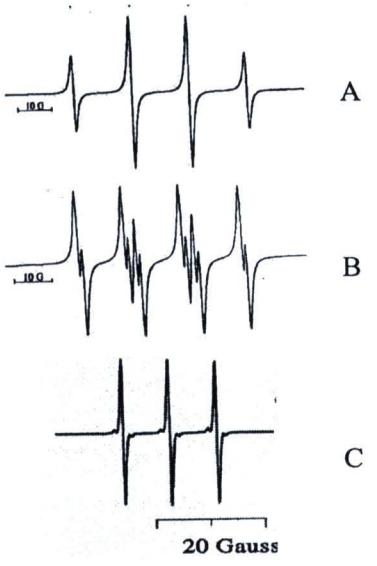
สาร 5, 5-dimethyl-1-pyroline N-oxide (DMPO) สามารถจับได้กับไฮดรอกซิลเรดิคอล (hydroxyl radical) และ ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion) ซึ่งจะอยู่ในรูปของ 5, 5-dimethyl-2-hydroxy-1-pyrrolidinyloxyl (DMPO-OH) adduct และ 5, 5-dimethyl-2-hydroperoxy-1-pyrrolidinyloxyl (DMPO-OOH) adduct ตามลำดับซึ่ง adducts เหล่านี้จะมีครึ่งชีวิต (half-life) ที่นานกว่า[96]

สาร 2, 2, 6, 6–tetramethyl-4-piperidone (TEMP) สามารถทำปฏิกิริยากับซิงเกลทออกซิเจน (singlet oxygen) ได้เป็น 2, 2, 6, 6-Tetramethylpiperidine-N-oxyl (TEMPO) ซึ่งเป็น nittroxide radical ที่มีความเสถียร และตรวจวัดได้ด้วยวิธี Electron paramagnetic resonance spectroscopy[97]

EPR สเปคตรัมของสปินแอดดัคท์[95]

EPR สเปคตรัมที่เห็นโดยทั่วไปมักจะเป็น first derivative ของสเปคตรัมการดูดกลืนพลังงาน (absorption spectrum) ซึ่งมีลักษณะจำเพาะของแต่ละสปินแอดดัคท์

สำหรับสปินแอดดัคท์ DMPO-OOH นั้นให้ ESR สเปคตรัม 12 เส้น ในขณะที่ DMPO-OH ให้ EPR สเปคตรัม 4 เส้น โดยมีความเข้มของสัญญาณ 1:2:2:1 รูปแบบของสเปคตรัมนี้เรียกว่าโครงสร้างไฮเปอร์ฟาย (hyperfine structure) จะเห็นได้ว่าโครงสร้างไฮเปอร์ฟายนั้นมีประโยชน์ในการจำแนกชนิดของอนุมูลอิสระ



ภาพที่ 9 แสดง EPR spectrum[95, 98]

A= DMPO-OH adduct, B = DMPO-OOH adduct, C = TEMPO

การศึกษาในเชิงปริมาณ[95]

วิธีการตรวจวัดปริมาณสปินแอดดัคท์จาก EPR สเปคตรัมทำได้ 2 วิธีคือ โดยการวัดพื้นที่ใต้เส้นสเปคตรัม (peak area) และโดยการวัดความสูงหรือความเข้มของสัญญาณ (peak height หรือ signal intensity)

1. โดยการวัดพื้นที่ใต้เส้นสเปคตรัม

วิธีนี้ทำได้โดยทำอิทิเกรชั่นหาพื้นที่ของสเปคตรัมที่สนใจ เทียบกับพื้นที่สเปคตรัมของสารมาตรฐานที่รู้ปริมาณ สารมาตรฐานโดยทั่วไปจะเป็นสารอนุมูลอิสระเสถียร (stable radical) ได้แก่ 1, 1-Diphenyl-2-picrylhyydrazyl (DPPH) ซึ่งให้สัญญาณ EPR 1 เส้น และ 2, 2, 6, 6-Tetramethylpiperidine-N-oxyl (TEMPO) ให้สัญญาณ EPR 3 เส้น และมีความเข้มของสัญญาณ 1:1:1

2. โดยการวัดความสูงหรือความเข้มของสัญญาณ EPR

เพื่อจะได้ค่าความเข้มข้นที่ถูกต้องนั้น ความสูงของเส้นสัญญาณต้องแปรผันตรงกับปริมาณของสปินแอดดัคท์ ดังนั้นสัญญาณ EPR ที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ ควรเป็นเส้นสัญญาณที่เกิดขึ้นในบริเวณสนามแม่เหล็กต่ำด้านซ้ายของสเปคตรัม (low magnetic field) หรือสัญญาณบริเวณกลางของสเปคตรัม (central magnetic field) ทั้งนี้เส้นสัญญาณนั้นควรจะแยกออกจากเส้นสัญญาณอื่นอย่างชัดเจน และไม่มีการซ้อนทับกับเส้นสัญญาณอื่นมากนัก

ปริมาณของสปินแอดดัคท์อาจรายงานเป็นความสูงของสัญญาณ (peak height) หรือ ความสูงสัมพัทธ์ (relative peak height) เทียบกับสัญญาณของสารอ้างอิง, Mn^{2+} แต่ถ้าต้องการรายงานเป็นปริมาณก็สามารถทำได้โดยการเปรียบเทียบความสูงสัญญาณของสารมาตรฐานที่รู้ปริมาณ ในกรณีนี้ความกว้างเส้นสัญญาณ (peak width) ของสารมาตรฐานและสารตรวจสอบไม่ควรมีความแตกต่างกันนอกจากนี้ยังต้องคำนึงถึงโครงสร้างไฮเปอร์ฟายด้วย

เช่นการหาปริมาณของ DMPO-OH โดยใช้สารมาตรฐาน TEMPO

ในกรณีนี้ TEMPO ให้โครงสร้างไฮเปอร์ฟาย 3 เส้นและมีความเข้มข้นของสัญญาณ 1:1:1 ดังนั้นความเข้มสัญญาณรวม, I_T คือ 3 และ DMPO-OH มีโครงสร้างไฮเปอร์ฟายซึ่งมีความเข้ม 1:2:2:1 ดังนั้นความเข้มสัญญาณรวม, I_D คือ 6

ถ้าปริมาณ TEMPO เท่ากับ M_T โดยวัดความสูงของสัญญาณ EPR ที่ตำแหน่งแรกได้ H_T และวัดความสูงจองสัญญาณ DMPO-OH ตำแหน่งแรกได้ H_D ดังนั้นปริมาณของ DMPO-OH หรือ M_D จะเท่ากับ $M_D = M_T \times (H_D/H_T) \times (I_D/I_T)$