

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การออกแบบวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลอง (experimental research) ในห้องปฏิบัติการ เพื่อการศึกษาประสิทธิภาพของแอนโทไซยานินต่อการสร้างอนุมูลอิสระและการฆ่าเชื้อ พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส ในไบโอฟิล์มที่ได้จากการเตรียมคราบจุลินทรีย์ในผู้ที่มีโรคปริทันต์ อักเสบ

2. การคัดเลือกอาสาสมัครในการเก็บคราบจุลินทรีย์

อาสาสมัครในการศึกษาคือ ผู้ป่วยที่มาติดต่อขอรับการรักษารโรคปริทันต์อักเสบ ณ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จำนวน 1 ราย

2.1 ข้อกำหนดในการคัดอาสาสมัคร (Inclusion criteria)

- 2.1.1 เป็นโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรัง (chronic periodontitis)
- 2.1.2 มีเลือดออกเมื่อทำการ โพรบ (bleeding on probing)
- 2.1.3 มีร่องลึกปริทันต์มากกว่าหรือเท่ากับ 5 มิลลิเมตร และสูญเสียการยึดเกาะ

ของอวัยวะปริทันต์ (attachment loss) มากกว่าหรือเท่ากับ 5 มิลลิเมตร

- 2.1.4 มีการละลายของกระดูกหุ้มรากฟัน
- 2.1.5 มีสุขภาพแข็งแรง

2.2 ข้อกำหนดในการไม่คัดอาสาสมัคร (Exclusion criteria)

- 2.2.1 เป็นโรคปริทันต์อักเสบชนิดรุนแรง (aggressive periodontitis)
- 2.2.3 มีประวัติในการรักษารโรคปริทันต์อักเสบภายใน 6 เดือนก่อนเก็บตัวอย่าง

เชื้อ

- 2.2.4 ได้รับยาปฏิชีวนะภายใน 3 เดือนก่อนเก็บตัวอย่างเชื้อ

งานวิจัยนี้ได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เลขที่ HE522351

3. รูปแบบการดำเนินการวิจัย

งานวิจัยนี้ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ

3.1 การทดสอบวิธีดำเนินการวิจัย (try protocol)

3.1.1 การทดสอบคุณสมบัติไวต่อแสงของสารทดสอบ

3.1.2 การทดลองหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงแผ่นฟิล์มชีวภาพ

3.1.3 การทดลองหาความเข้มข้นของอิริโทรซินที่เหมาะสม

3.2 การดำเนินการวิจัย

3.2.1 การทดสอบการสร้างรีแอคทีฟออกซิเจนสปีชีส์ของสารทดสอบ

3.2.2 การทดสอบการฆ่าเชื้อฟอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालีสในแผ่นฟิล์มชีวภาพ

ฟันของสารทดสอบ โดยวิธีโฟโตไดนามิกส์

4. เครื่องมือ

4.1 อุปกรณ์ทางคลินิก

4.1.1 ชุดตรวจฟัน ประกอบด้วยกระจกส่องปาก (mouth mirror) อุปกรณ์คีบ

สำลี (cotton plier) และเอ็กซ์พลอเรอร์ (explorer)

4.1.2 เครื่องมือตรวจปริทันต์ (periodontal probe)

4.1.3 อุปกรณ์เก็บเชื้อ ประกอบด้วยกระดาษรูปกรวย (paper point) เอฟ

เพนดอร์ฟ (eppendorf) ปราศจากเชื้อ ตะเกียง และ thioglycolate broth (Fluka, Switzerland)

4.2 อุปกรณ์ทางห้องปฏิบัติการ

4.2.1 อิริโทรซิน (erythrosine) (Fluka, Switzerland)

4.2.2 โคโพรพอร์ไฟริน (coproporphyrin III) (Sigma-Aldrich, USA)

4.2.3 แอนโทไซยานิน (anthocyanin-cyanidin) (Sigma, USA)

4.2.4 2, 2, 6, 6-tetraethyl-4-piperidone (TEMP) (Sigma-Aldrich, USA)

4.2.5 5, 5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (DMPO) (Sigma-Aldrich, USA)

4.2.6 สารละลายริงเกอร์ชนิดเม็ด (Ringer tablets) (MERCK, Germany)

4.2.7 เมธานอล (absolute methanol) (Sigma, USA)

4.2.8 กรดไฮโดรคลอริก (HCl) (BDH, England)

4.2.9 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) (MERK, Germany)

4.2.10 trypticase-soy broth (Sigma, USA)

4.2.11 ฮีมิน (hemin) (Sigma-Aldrich, USA)

4.2.12 ชุดสำเร็จรูปสำหรับ PCR (QIAGEN, Germany)

4.2.13 สารตั้งต้นสำหรับ PCR หรือไพรเมอร์ (primer)

4.2.14 อากาโรสเจล (agarose gel) (Bio-RAD Laboratories, Inc., USA)

4.2.15 ชุดสำเร็จรูปสำหรับแยก DNA (InstaGene™ Maxtrix, Bio-Rad

Laboratories, USA)

4.2.16 X-band EPR spectrometer (E 500, Bruker, USA) equipped ELEXSYS

Super High Sensitivity Probehead cavity

4.2.17 หลอดปรอท (mercury lamp) ขนาด 50 วัตต์ (ER 202 UV, Bruker, USA)

4.2.18 หลอดทังสเตน (Incandescent lamp) ขนาด 500 วัตต์ (POLALAMP,

Poland)

4.2.19 หลอดทังสเตน (Incandescent lamp) ขนาด 60 วัตต์ (LKS, Thailand)

4.2.20 อาหารเลี้ยงเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวัลิส (selective agar)

4.2.21 ออโตปีเปต (autopipette)

4.2.22 กระจกปิดสไลด์ (cover slide)

4.2.23 เครื่องดูดหินน้ำลาย และหัวดูดหินน้ำลาย P-10

4.2.24 ไม้กรองเข็มขนาด 0.2 ไมครอน

4.2.25 microtiter plate ชนิด 6 หลุม

4.2.26 anaerobic jar

4.2.27 anaerobic chamber (Sheldon Manufacturing, Inc., USA)

4.2.28 ถาดเลี้ยงเชื้อ (petri disk)

4.2.29 นาฬิกาจับเวลา

4.2.30 เครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง (Thermo electron corporation, Germany)

4.2.31 เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Renown technical co., LTD,

Thailand)

4.2.32 เครื่อง thermocycling (Biometra^R, Thailand)

4.2.33 ชุดเครื่องมือสำหรับทำอิเล็กโตรโฟเรซิส (C.B.S. Scientific company,

USA)

4.2.34 ชุดเครื่องมือสำหรับบันทึกภาพแถบ DNA (Pharmacia LKB., Sweden)

5. วิธีดำเนินการวิจัย

5.1 การทดสอบวิธีดำเนินการวิจัย

5.1.1 การทดสอบคุณสมบัติไวต่อแสงของสารทดสอบ

5.1.1.1 การเตรียมสารทดสอบ

เริ่มจากการนำแอนโทไซยานินและอีริโทรซินมาละลายในน้ำ ส่วนโคโพรเฟอร์ไฟรินนำมาละลายในกรดไฮโดรคลอริกและทำให้เป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ได้ stock solution ของสารทดสอบความเข้มข้น 220 ไมโครโมลาร์

สำหรับการทดสอบการสร้างรีแอกทีฟออกซิเจนสปีชีส์ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มดังนี้

1) ทดสอบการสร้างซิงเกิลออกซิเจน โดยเตรียม stock solution ปริมาตร 10 ไมโครลิตร แล้วเติม TEMP ความเข้มข้น 1 ไมลาร์ปริมาตร 30 ไมโครลิตร น้ำกลั่นปริมาตร 10 ไมโครลิตร สารละลายริงเกอร์ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำผสมเข้าด้วยกัน ได้เป็นสารละลายของสารทดสอบปริมาตรรวม 100 ไมโครลิตร ที่มีความเข้มข้นของสารทดสอบ 22 ไมโครโมลาร์

2) ทดสอบการสร้างซูเปอร์ออกไซด์และไฮดรอกซิลเรดิคัล โดยเตรียม stock solution ปริมาตร 10 ไมโครลิตร แล้วเติม DMPO ความเข้มข้น 1 ไมลาร์ปริมาตร 10 ไมโครลิตร น้ำกลั่นปริมาตร 10 ไมโครลิตร สารละลายริงเกอร์ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำผสมเข้าด้วยกัน ได้เป็นสารละลายของสารทดสอบปริมาตรรวม 100 ไมโครลิตร ที่มีความเข้มข้นของสารทดสอบ 22 ไมโครโมลาร์

5.1.1.2 การตรวจวัดรีแอกทีฟออกซิเจนสปีชีส์โดยวิธี electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy

เมื่อต้องการตรวจวัดรีแอกทีฟออกซิเจนสปีชีส์ในปฏิกิริยาจากข้อ

5.1.1.1 ให้นำส่วนผสมดังกล่าวใส่ใน capillary tube ใส่ลงใน EPR sample tube และวางใน EPR cavity หลังจากนั้นวางระยะของ EPR sample tube ให้ห่างจากแหล่งกำเนิดแสง 37 เซนติเมตร แล้วกระตุ้นสารทดสอบด้วยแสงจากหลอดปรอทขนาด 50 วัตต์ ความเข้มแสง 365.23 ลักซ์ จากนั้นบันทึกสัญญาณ EPR ที่เวลา 0 วินาที 30 วินาที 90 วินาที 3 นาที 4 นาที และ 5 นาที ตามลำดับ โดยปรับค่าต่าง ๆ ของเครื่อง EPR spectrometer ดังนี้ central field = 350.595.0 mT, modulation frequency = 100 KHz, amplitude modulation = 0.1 mT, microwave power = 10.15 mW, gain = 60 dB, scan time = 41.49 s และ time constant = 1.28 ms.

ปริมาณซิงเกิลทออกซิเจนคำนวณจากผลต่างที่ลดลงของพื้นที่ใต้กราฟ เมื่อเทียบกับเวลา 0 วินาที ปริมาณไฮดรอกซิลเรดิคัลคำนวณจากความสูงลำดับที่ 2 ของความเข้มของสัญญาณ DMPO-OH

แบ่งการทดสอบออกเป็น 6 กลุ่ม กลุ่มละ 3 ตัวอย่างดังนี้

กลุ่มที่ 1 อิริโทรซินความเข้มข้น 22 ไมโครโมลาร์ และกระตุ้นด้วยแสง

กลุ่มที่ 2 โคโปรพอร์ไฟรินความเข้มข้น 22 ไมโครโมลาร์ และกระตุ้น

ด้วยแสง

กลุ่มที่ 3 แอนโทไซยานินความเข้มข้น 22 ไมโครโมลาร์ และกระตุ้น

ด้วยแสง

กลุ่มที่ 4 อิริโทรซินและโคโปรพอร์ไฟรินความเข้มข้น 22 ไมโครโม

ลาร์ และกระตุ้นด้วยแสง

กลุ่มที่ 5 อิริโทรซินและแอนโทไซยานินความเข้มข้น 22 ไมโครโมลาร์

และกระตุ้นด้วยแสง

กลุ่มที่ 6 โคโปรพอร์ไฟรินและแอนโทไซยานินความเข้มข้น 22 ไมโคร

โมลาร์ และกระตุ้นด้วยแสง

5.1.2 การทดลองหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงแผ่นฟิล์มชีวภาพ

5.1.2.1 เก็บตัวอย่างน้ำลาย

เก็บตัวอย่างน้ำลายจำนวน 5 มิลลิลิตรจากอาสาสมัครที่มีคุณสมบัติตามข้อกำหนดในการคัดเลือกอาสาสมัคร มาเจือจางกับสารละลายริงเกอร์ ในสัดส่วน 1:10 แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000 x g เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านไส้กรองเข็มขนาด 0.2 ไมครอน และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5.1.2.2 เก็บตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์

ทำการเก็บเชื้อจากอาสาสมัครในการศึกษาที่มีคุณสมบัติตามข้อกำหนดในการคัดเลือกอาสาสมัคร โดยสอดกระดาศรูปกรวยลงในร่องลึกปริทัศน์ ที่พื้น 3 ซีซีละ 1 แท่ง แล้วเคลื่อนกระดาศรูปกรวยไปทางด้านข้างผิวพื้นเพื่อเก็บตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ และนำตัวอย่างเชื้อที่ได้ใส่ลงใน thioglycolate broth

5.1.2.3 การเตรียมแผ่นฟิล์มชีวภาพ

นำกระดาศปิดสไลด์ที่ผ่านการซังน้ำหนักและเคลือบด้วยน้ำลายที่เตรียมไว้ ใส่ลงใน microtiter plate ชนิด 6 หลุม กลุ่มละ 1 แผ่น ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 คืน (overnight) จากนั้นดูดน้ำลายออกจากกระดาศปิดสไลด์มาใส่ลงใน trypticase-soy broth ที่มีฮีมินความ

เข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ หลุมละ 4 มิลลิลิตร เติมตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ที่เก็บใน thioglycolate broth ลงใน microtiter plate ชนิด 6 หลุม หลุมละ 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปเพาะเลี้ยงใน anaerobic jar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 48 ชั่วโมง

5.1.2.4 การนับจำนวนหน่วยก่อรูปโคโลนีของเชื้อพอร์ไฟโรโมนัส จิงจิवालิส ต่อมิลลิกรัม

ล้างแผ่นกระจกปิดสไลด์ด้วยสารละลายริงเกอร์ 1.5 มิลลิลิตร 2 ครั้ง และนำมาซับบนผ้าก๊อชที่ปราศจากเชื้อ นาน 30 วินาที แล้วเอียงกระจกปิดสไลด์ 30 วินาที จากนั้นนำมาชั่งบนเครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 3 ตำแหน่ง เติมสารละลายริงเกอร์ในอัตราส่วน 100 ไมโครลิตรต่อน้ำหนักแผ่นฟิล์มชีวภาพ 1 มิลลิกรัม แล้วทำให้แขวนลอยด้วยเครื่องดูดหินน้ำลาย ที่แอมพลิจูด 1 ใน 3 นาน 30 วินาที แล้วนำมาเจือจาง 100 เท่า ด้วยสารละลายริงเกอร์ ตัวอย่างละ 2 ครั้ง นำมาเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อพอร์ไฟโรโมนัส จิงจิवालิส[99] ใน anaerobic jar เป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 วัน จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดมานับจำนวนหน่วยก่อรูปโคโลนีของเชื้อพอร์ไฟโรโมนัส จิงจิवालิส และคำนวณค่าร้อยละจำนวนหน่วยก่อรูปโคโลนีต่อมิลลิกรัมของน้ำหนักแผ่นฟิล์มชีวภาพในแต่ละวัน

5.1.3 การทดลองหาความเข้มข้นของอิริโทรซินที่เหมาะสม

5.1.3.1 การเก็บตัวอย่างน้ำลาย

เก็บตัวอย่างน้ำลายจำนวน 5 มิลลิลิตรจากอาสาสมัครที่มีคุณสมบัติตามข้อกำหนดในการคัดเลือกอาสาสมัครมาเจือจางกับสารละลายริงเกอร์ ในสัดส่วน 1:10 แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000 $\times g$ เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านไส้กรองเส้นขนาด 0.2 ไมครอน และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5.1.3.2 การเก็บตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์

ทำการเก็บเชื้อจากอาสาสมัครในการศึกษาที่มีคุณสมบัติตามข้อกำหนดในการคัดเลือกอาสาสมัคร โดยสอดกระดาศรูปกรวยลงในร่องลึกปริทัศน์ ที่ฟัน 3 ซี่ ซี่ละ 1 แท่ง แล้วเคลื่อนกระดาศรูปกรวยไปทางด้านข้างผิวฟันเพื่อเก็บตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ และนำตัวอย่างเชื้อที่ได้ใส่ลงใน thioglycolate broth

5.1.3.3 การเตรียมแผ่นฟิล์มชีวภาพ

นำกระจกปิดสไลด์ที่ผ่านการชั่งน้ำหนักและเคลือบด้วยน้ำลายที่เตรียมไว้ ใส่ลงใน microtiter plate ชนิด 6 หลุม หลุมละ 1 แผ่น ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 คืน (overnight) จากนั้นดูดน้ำลายออกจากกระจกปิดสไลด์มาใส่ลงใน trypticase-soy broth ที่มีฮีมินความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ หลุมละ 4 มิลลิลิตร เติมตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ที่เก็บใน thioglycolate broth ลงใน

microtiter plate ชนิด 6 หลุม หลุมละ 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปเพาะเลี้ยงใน anaerobic jar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 ชั่วโมง

5.1.3.4 การเตรียมสารทดสอบ

เริ่มจากการนำอิริโทรซินมาละลายในน้ำ ได้ stock solution คือ อิริโทรซิน ความเข้มข้น 2200 ไมโครโมลาร์ จากนั้นนำมาเจือจางด้วยน้ำปราศจากเชื้อ ได้อิริโทรซินความเข้มข้น 22, 88, 110, 220, 440 ไมโครโมลาร์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

5.1.3.5 การทดสอบการฆ่าเชื้อฟอร์โฟโรโมแนส จิงจิवालิสในแผ่นฟิล์มชีวภาพพื้นของอิริโทรซิน แบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม กลุ่มละ 2 ตัวอย่าง ดังนี้

- กลุ่มที่ 1 (กลุ่มควบคุม) ไม่ได้รับสารไวต่อแสง และไม่ถูกกระตุ้นด้วยแสง
- กลุ่มที่ 2 ได้รับอิริโทรซินความเข้มข้น 22 ไมโครโมลาร์ และกระตุ้นด้วยแสง
- กลุ่มที่ 3 ได้รับอิริโทรซินความเข้มข้น 88 ไมโครโมลาร์ และกระตุ้นด้วยแสง
- กลุ่มที่ 4 ได้รับอิริโทรซินความเข้มข้น 110 ไมโครโมลาร์ และกระตุ้นด้วยแสง
- กลุ่มที่ 5 ได้รับอิริโทรซินความเข้มข้น 220 ไมโครโมลาร์ และกระตุ้นด้วยแสง
- กลุ่มที่ 6 ได้รับอิริโทรซินความเข้มข้น 440 ไมโครโมลาร์ และกระตุ้นด้วยแสง

ก่อนการทำการทดลองจะหาค่า trypticase-soy broth ที่มีฮิโมโนความเข้มข้น 10 µg/ml ออกจาก microtiter plate แล้วล้างด้วยสารละลายริงเกอร์ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร 2 ครั้ง จากนั้นเติมสารทดสอบทิ้งไว้ 10 นาที วาง microtiter plate ห่างจากหลอดทั้งสदनขนาด 60 วัดค่าความเข้มแสง 4,444 ลักซ์ เป็นระยะทาง 11.4 เซนติเมตร นาน 15 นาที

5.1.3.6 การนับจำนวนหน่วยก่อรูปโคโลนีของเชื้อฟอร์โฟโรโมแนส จิงจิवालิส ต่อมิลลิกรัม

ล้างแผ่นกระจกปิดสไลด์ด้วยสารละลายริงเกอร์ 1.5 มิลลิลิตร 2 ครั้ง และนำมาซับบนผ้าก๊อชที่ปราศจากเชื้อ นาน 30 วินาที แล้วเอียงกระจกปิดสไลด์ 30 วินาที จากนั้นนำมาซั้งบนเครื่องซั้งน้ำหนักทศนิยม 3 ตำแหน่ง เติมสารละลายริงเกอร์ในอัตราส่วน 100 ไมโครลิตรต่อน้ำหนักแผ่นฟิล์มชีวภาพพื้น 1 มิลลิกรัม แล้วทำให้แขวนลอยด้วยเครื่องซุดหินน้ำลายที่แอมพลิจูด 1 ใน 3 นาน 30 วินาที แล้วนำมาเจือจาง 1000 เท่า ด้วยสารละลายริงเกอร์ ตัวอย่างละ 2 ครั้ง นำมาเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อฟอร์โฟโรโมแนส จิงจิवालิส ใน anaerobic jar เป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 วัน จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดมานับจำนวนหน่วยก่อรูปโคโลนี และคำนวณค่าร้อยละจำนวนหน่วยก่อรูปโคโลนีต่อมิลลิกรัมของน้ำหนักแผ่นฟิล์มชีวภาพพื้นในแต่ละวัน

5.2 การดำเนินการวิจัย

5.2.1 การทดสอบการสร้างรีแอคทีฟออกซิเจนสปีชีส์ของสารทดสอบ

5.2.1.1 การเตรียมสารทดสอบ

เริ่มจากการนำแอนโทไซยานินและอีริโทรซินมาละลายในน้ำ ส่วนโคโปรฟอร์ไฟรินนำมาละลายในกรดไฮโดรคลอริกและทำให้เป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ได้ stock solution ของสารทดสอบคือ อีริโทรซิน ความเข้มข้น 2200 ไมโครโมลาร์ โคโปรฟอร์ไฟริน 2200 ความเข้มข้น ไมโครโมลาร์ และแอนโทไซยานินความเข้มข้น 606 ไมโครโมลาร์

สำหรับการทดสอบการสร้างรีแอคทีฟออกซิเจนสปีชีส์ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มดังนี้

1) ทดสอบการสร้างซิงเกิลออกซิเจน เดิม TEMP ความเข้มข้น 1 โมลาร์ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในอีริโทรซินความเข้มข้น 220 ไมโครโมลาร์ โคโปรฟอร์ไฟรินความเข้มข้น 22, 88, 220 ไมโครโมลาร์ และแอนโทไซยานินความเข้มข้น 101, 202, 303 ไมโครโมลาร์ แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอล ผสมเข้าด้วยกัน ได้เป็นสารละลายของสารทดสอบปริมาตรรวม 100 ไมโครลิตร

2) ทดสอบการสร้างซูเปอร์ออกไซด์และไฮดรอกซิลเรดิคัล เดิม DMPO ความเข้มข้น 1 โมลาร์ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในอีริโทรซินความเข้มข้น 220 ไมโครโมลาร์ โคโปรฟอร์ไฟรินความเข้มข้น 22, 88, 220 ไมโครโมลาร์ และแอนโทไซยานินความเข้มข้น 101, 202, 303 ไมโครโมลาร์ แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอล ผสมเข้าด้วยกัน ได้เป็นสารละลายของสารทดสอบปริมาตรรวม 100 ไมโครลิตร

5.2.1.2 การตรวจวัดรีแอคทีฟออกซิเจนสปีชีส์โดยวิธี electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy เมื่อต้องการตรวจวัดรีแอคทีฟออกซิเจนสปีชีส์ในปฏิกิริยาจากข้อ 5.2.1.1ให้นำส่วนผสมดังกล่าวใส่ใน capillary tube ใส่ลงใน EPR sample tube และวางใน EPR cavity หลังจากนั้นวางระยะของ EPR sample tube ให้ห่างจากแหล่งกำเนิดแสง 40.1 เซนติเมตร แล้วกระตุ้นสารทดสอบด้วยแสงจากหลอดทั้งสแตนขนาด 500 วัตต์ ความเข้มแสง 4,444 ลักซ์ จากนั้นบันทึกสัญญาณ EPR ที่เวลา 0, 0.5, 1.5, 3, 4, 5, 7, 10 และ 15 นาที ตามลำดับ โดยปรับค่าต่าง ๆ ของเครื่อง EPR spectrometer ดังนี้ central field = 350.595.0 mT, modulation frequency = 100 KHz, amplitude modulation = 0.1 mT, microwave power = 10.15 mW, gain = 60 dB, scan time = 41.49 s และ time constant = 1.28 ms.

แบ่งการทดสอบออกเป็น 13 กลุ่ม กลุ่มละ 3 ตัวอย่าง ดังนี้

- กลุ่มที่ 1 อิริโทรซินความเข้มข้น 220 ไมโครโมลาร์ และกระตุ้นด้วยแสง
- กลุ่มที่ 2 โคโปรพอร์ไฟรินความเข้มข้น 22 ไมโครโมลาร์ และกระตุ้นด้วยแสง
- กลุ่มที่ 3 โคโปรพอร์ไฟรินความเข้มข้น 88 ไมโครโมลาร์ และกระตุ้นด้วยแสง
- กลุ่มที่ 4 โคโปรพอร์ไฟรินความเข้มข้น 220 ไมโครโมลาร์ และกระตุ้นด้วยแสง
- กลุ่มที่ 5 แอนโทไซยานินความเข้มข้น 101 ไมโครโมลาร์ และกระตุ้นด้วยแสง
- กลุ่มที่ 6 แอนโทไซยานินความเข้มข้น 202 ไมโครโมลาร์ และกระตุ้นด้วยแสง
- กลุ่มที่ 7 แอนโทไซยานินความเข้มข้น 303 ไมโครโมลาร์ และกระตุ้นด้วยแสง
- กลุ่มที่ 8 อิริโทรซินความเข้มข้น 220 ไมโครโมลาร์ร่วมกับโคโปรพอร์ไฟรินความเข้มข้น 22 ไมโครโมลาร์ และกระตุ้นด้วยแสง
- กลุ่มที่ 9 อิริโทรซินความเข้มข้น 220 ไมโครโมลาร์ร่วมกับโคโปรพอร์ไฟรินความเข้มข้น 88 ไมโครโมลาร์ และกระตุ้นด้วยแสง
- กลุ่มที่ 10 อิริโทรซินความเข้มข้น 220 ไมโครโมลาร์ร่วมกับโคโปรพอร์ไฟรินความเข้มข้น 220 ไมโครโมลาร์ และกระตุ้นด้วยแสง
- กลุ่มที่ 11 อิริโทรซินความเข้มข้น 220 ไมโครโมลาร์ร่วมกับแอนโทไซยานินความเข้มข้น 101 ไมโครโมลาร์ และกระตุ้นด้วยแสง
- กลุ่มที่ 12 อิริโทรซินความเข้มข้น 220 ไมโครโมลาร์ร่วมกับแอนโทไซยานินความเข้มข้น 202 ไมโครโมลาร์ และกระตุ้นด้วยแสง
- กลุ่มที่ 13 อิริโทรซินความเข้มข้น 220 ไมโครโมลาร์ร่วมกับแอนโทไซยานินความเข้มข้น 303 ไมโครโมลาร์ และกระตุ้นด้วยแสง

5.2.2 การทดสอบการทำลายเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส ในแผ่นฟิล์มชีวภาพพื้นของสารทดสอบ โดยวิธีโฟโตไดนามิกส์

5.2.2.1 การเก็บตัวอย่างน้ำลาย

เก็บตัวอย่างน้ำลายจำนวน 5 มิลลิลิตรจากอาสาสมัครที่มีคุณสมบัติตามข้อกำหนดในการคัดเลือกอาสาสมัคร มาเจือจางกับสารละลายริงเกอร์ ในสัดส่วน 1:10 แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความแรง 2,000 x g เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่านไส้กรองเข็มขนาด 0.2 ไมครอน และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5.2.2.2 การเก็บตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์

ทำการเก็บเชื้อจากอาสาสมัครในการศึกษาที่มีคุณสมบัติตามข้อกำหนดในการคัดเลือกอาสาสมัคร โดยสอดกระดาศรูปกรวยลงในร่องลึกปริมาตร ที่พื้น 3 ซี

ซึ่งละ 2 แท่ง แล้วเคลื่อนกระดวยรูปกรวยไปทางด้านข้างผิวพื้นเพื่อเก็บตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ และนำตัวอย่างเชื้อที่ได้เก็บใน thioglycolate broth 3 แท่ง และเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส 3 แท่ง

5.2.2.3 การตรวจวิเคราะห์โดยวิธี Polymerase chain reaction (PCR)

แยกสกัด DNA ของเชื้อจุลินทรีย์จากกระดวยรูปกรวยที่เก็บไว้ใน เอพเพนดอร์ฟที่เก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาวางที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำกระดวยรูปกรวย มาใส่เอพเพนดอร์ฟที่มีน้ำปราศจากเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำมาปั่นด้วยความเร็วสูงสุด (high speed) นาน 1 นาที แล้วเหวี่ยงที่ 12,000 rpm. นาน 1 นาที นำสารละลายด้านบนออก แล้วเติม Insta Gene matrix 200 ไมโครลิตร นำไป incubate ที่ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาปั่นด้วยความเร็วสูงสุดอีก 10 วินาที และคัมในน้ำเดือด 8 นาที จากนั้นนำมาปั่นด้วยความเร็วสูงสุคนาน 10 วินาทีอีกครั้ง แล้วเหวี่ยงที่ 12,000 rpm. นาน 3 นาที

เตรียมสารที่ใช้ในกระบวนการ PCR ตามคำแนะนำของ บริษัทผู้ผลิตชุดสำเร็จรูปสำหรับ PCR เติมไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อฟอร์โฟโรโมแนส จึงจิवालิส แล้วนำเข้าเครื่อง thermocycling กำหนดค่าอุณหภูมิในขั้นตอน initial denature 95 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ขั้นตอน denature 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที ขั้นตอน annealing 60 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ขั้นตอน extension 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และขั้นตอนสุดท้าย (final step) 72 องศาเซลเซียส 2 นาที โดยกำหนดจำนวนรอบเป็น 36 รอบ[100] นำผลผลิตที่ได้จากกระบวนการ PCR มาวิเคราะห์ในอากาโรสเจลโดยวิธีอิเล็กโตรโฟเรซิส จากนั้นนำแผ่นอากาโรสเจลที่ผ่านกระบวนการอิเล็กโตรโฟเรซิสแล้วมาบันทึกภาพแถบดีเอ็นเอ

5.2.2.4 การเตรียมแผ่นฟิล์มชีวภาพพื้น

นำกระจกปิดสไลด์ที่ผ่านการซักรีดน้ำหนักและเคลือบด้วยน้ำลายที่เตรียมไว้ ใส่ลงใน microtiter plate ชนิด 6 หลุม หลุมละ 1 แผ่น ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 คืน (overnight) จากนั้นดูดน้ำลายออกจากกระจกปิดสไลด์มาใส่ลงใน trypticase-soy broth ที่มีฮีมินความเข้มข้น 10 µg/ml หลุมละ 4 มิลลิลิตร เติมตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ที่เก็บใน thioglycolate broth ลงใน microtiter plate ชนิด 6 หลุม หลุมละ 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปเพาะเลี้ยงใน anaerobic jar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 ชั่วโมง

5.2.2.5 การเตรียมสารทดสอบ

เริ่มจากการนำแอนโทไซยานินและอีริโทรซินมาละลายในน้ำ ส่วนโคโปรฟอร์ไฟรินนำมาละลายในกรดไฮโดรคลอริกและทำให้เป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ได้ stock solution คือ อีริโทรซิน ความเข้มข้น 2200 ไมโครโมลาร์ โคโปรฟอร์ไฟริน 2200 ความเข้มข้น ไมโครโมลาร์ และแอนโทไซยานินความเข้มข้น 606 ไมโครโมลาร์ จากนั้นนำมาเจือ

จากด้วยน้ำปราศจากเชื้อ ได้อิริโทรซินความเข้มข้น 220 ไมโครโมลาร์ โคโปรพอร์ไฟรินความเข้มข้น 22, 88, 220 ไมโครโมลาร์ และแอนโทไซยานินความเข้มข้น 101, 202, 303 ไมโครโมลาร์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

5.2.2.6 การทดสอบการทำลายเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จึงพิจารณาผลในแผ่นฟิล์มชีวภาพฟิมของสารทดสอบ แบ่งออกเป็น 16 กลุ่ม กลุ่มละ 3 ตัวอย่าง ดังนี้

- กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม (ไม่ได้รับสารทดสอบ และไม่ได้กระตุ้นด้วยแสง)
- กลุ่มที่ 2 ได้รับอิริโทรซินความเข้มข้น 220 ไมโครโมลาร์ และกระตุ้นด้วยแสง
- กลุ่มที่ 3 ได้รับโคโปรพอร์ไฟรินความเข้มข้น 22 ไมโครโมลาร์ และกระตุ้นด้วยแสง
- กลุ่มที่ 4 ได้รับโคโปรพอร์ไฟรินความเข้มข้น 88 ไมโครโมลาร์ และกระตุ้นด้วยแสง
- กลุ่มที่ 5 ได้รับโคโปรพอร์ไฟรินความเข้มข้น 220 ไมโครโมลาร์ และกระตุ้นด้วยแสง
- กลุ่มที่ 6 ได้รับแอนโทไซยานินความเข้มข้น 101 ไมโครโมลาร์
- กลุ่มที่ 7 ได้รับแอนโทไซยานินความเข้มข้น 202 ไมโครโมลาร์
- กลุ่มที่ 8 ได้รับแอนโทไซยานินความเข้มข้น 303 ไมโครโมลาร์
- กลุ่มที่ 9 ได้รับอิริโทรซินความเข้มข้น 220 ไมโครโมลาร์ร่วมกับโคโปรพอร์ไฟรินความเข้มข้น 22 ไมโครโมลาร์ และกระตุ้นด้วยแสง
- กลุ่มที่ 10 ได้รับอิริโทรซินความเข้มข้น 220 ไมโครโมลาร์ร่วมกับโคโปรพอร์ไฟรินความเข้มข้น 88 ไมโครโมลาร์ และกระตุ้นด้วยแสง
- กลุ่มที่ 11 ได้รับอิริโทรซินความเข้มข้น 220 ไมโครโมลาร์ร่วมกับโคโปรพอร์ไฟรินความเข้มข้น 220 ไมโครโมลาร์ และกระตุ้นด้วยแสง
- กลุ่มที่ 12 ได้รับอิริโทรซินความเข้มข้น 220 ไมโครโมลาร์ร่วมกับแอนโทไซยานินความเข้มข้น 101 ไมโครโมลาร์ และกระตุ้นด้วยแสง
- กลุ่มที่ 13 ได้รับอิริโทรซินความเข้มข้น 220 ไมโครโมลาร์ร่วมกับแอนโทไซยานินความเข้มข้น 202 ไมโครโมลาร์ และกระตุ้นด้วยแสง
- กลุ่มที่ 14 ได้รับอิริโทรซินความเข้มข้น 220 ไมโครโมลาร์ร่วมกับแอนโทไซยานินความเข้มข้น 303 ไมโครโมลาร์ และกระตุ้นด้วยแสง
- กลุ่มที่ 15 ได้รับการกระตุ้นด้วยแสง
- กลุ่มที่ 16 ได้รับคลอเฮกซีดินความเข้มข้นร้อยละ 0.12

ก่อนการทำการทดลองจะดูด trypticase-soy broth ที่มีอีมินความเข้มข้น 10 µg/ml ออกจาก microtiter plate แล้วล้างด้วยสารละลายยิบเบอเรอร์ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร 2 ครั้ง จากนั้นเติมสารทดสอบทิ้งไว้ 10 นาที วาง microtiter plate ห่างจากหลอดทั้งสदनขนาด 60

วัดค่าความเข้มแสง 4,444 ลักซ์ เป็นระยะทาง 11.4 เซนติเมตร นาน 15 นาที แล้วกระตุ้นสารทดสอบด้วยแสง

5.2.2.7 การนับจำนวนหน่วยก่อรูปโคโลนีของเชื้อพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालิส ต่อมิลลิกรัม

ล้างแผ่นกระจกปิดสไลด์ด้วยสารละลายริงเกอร์ 1.5 มิลลิตร 2 ครั้ง และนำมาซับบนผ้าก๊อชที่ปราศจากเชื้อ นาน 30 วินาที แล้วเอียงกระจกปิดสไลด์ 30 วินาที จากนั้นนำมาซังบนเครื่องซังน้ำหนักทศนิยม 3 ตำแหน่ง เติมสารละลายริงเกอร์ในอัตราส่วน 100 ไมโครลิตรต่อน้ำหนักแผ่นฟิล์มชีวภาพ 1 มิลลิกรัม แล้วทำให้แขวนลอยด้วยเครื่องดูดหินน้ำลายที่แอมพลิจูด 1 ใน 3 นาน 30 วินาที แล้วนำมาเจือจาง 100 เท่า และ 1000 เท่า ด้วยสารละลายริงเกอร์ตัวอย่างละ 3 ครั้ง นำมาเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालิส ใน anaerobic jar เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดมานับจำนวนหน่วยก่อรูปโคโลนี และคำนวณค่าร้อยละจำนวนหน่วยก่อรูปโคโลนีต่อมิลลิกรัมของน้ำหนักแผ่นฟิล์มชีวภาพ

การทดลองการฆ่าเชื้อพอร์ไฟโรโมนเนสจิงจิवालิสในชีวภาพ
จำนวนกลุ่มทดลอง 16 กลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มทดลอง มีจำนวน 9 ตัวอย่าง ซึ่งแต่ละตัวอย่างจะทำการนับหน่วยก่อรูปโคโลนีของเชื้อพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालิส ต่อมิลลิกรัมซ้ำ 3 ครั้ง

6. การวิเคราะห์ทางสถิติ

6.1 วิเคราะห์ความแตกต่างของปริมาณรีแอกทีฟออกซิเจนสปีชีส์ในหน่วย Arbitrary Unit ระหว่างกลุ่มทดลอง โดยใช้สถิติเชิงพรรณนา ประเมินจากค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

6.2 วิเคราะห์ความแตกต่างของเชื้อพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालิส ในหน่วย cfu/mg ระหว่างกลุ่มทดลอง โดยใช้สถิติ Mann-whitney U test

6.3 วิเคราะห์ความแตกต่างของเชื้อพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालิส ระหว่างกลุ่มการทดลองในหน่วย $\log_{10}(\text{cfu/mg})$

7. สถานที่ดำเนินการวิจัย

คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล