

บทที่ 1

บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

จากการสำรวจสภาวะปริทันต์ในทันตสุขภาพแห่งชาติปี 2550 พบว่าโรคปริทันต์อักเสบ (periodontal disease) ในกลุ่มผู้สูงอายุเพิ่มสูงขึ้นอย่างมากจึงนับได้ว่าเป็นโรคที่สำคัญและเป็นปัญหาในช่องปาก (1) โรคปริทันต์อักเสบเป็นโรคที่มีการอักเสบของอวัยวะปริทันต์ (periodontium) หรือ อวัยวะรอบๆ ฟัน ซึ่งประกอบด้วย เหงือก (gingiva) เคลือบรากฟัน (cementum) เอ็นยึดปริทันต์ (periodontal ligament) และกระดูกเบ้าฟัน (alveolar bone)

โรคปริทันต์อักเสบจัดเป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ โดยเมื่อมีเชื้อก่อโรคปริทันต์บุกรุกเข้ามาในอวัยวะปริทันต์ ในช่วงแรกจะเกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายเฉพาะที่เป็นแบบระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (innate immune system) ทำให้มีการหลั่งไซโตไคน์และสารอักเสบเพื่อทำลายเชื้อก่อโรคและส่งผลให้เหงือกมีการอักเสบ โดยอาการที่แสดงออก คือ เหงือกบวมแดง ซึ่งถ้าไม่สามารถกำจัดเชื้อก่อโรคได้ เชื้อจะบุกรุกเข้ามาในอวัยวะปริทันต์ที่ลึกมากขึ้น รวมถึงร่างกายจะเพิ่มการหลั่งไซโตไคน์และสารอักเสบมากขึ้น ทำให้ปฏิกิริยาของการอักเสบขยายวงกว้างไปยังเนื้อเยื่อยึดของเหงือก (gingival connective tissue) และกระดูกเบ้าฟัน อาการที่พบในระยะที่มีการลุกลามนี้คือมีความลึกของร่องปริทันต์ (probing depth, PD) (2) นั่นคือเกิดการทำลายของเนื้อเยื่อปริทันต์รวมถึงการละลายของกระดูกเบ้าฟันซึ่งจะนำไปสู่การโยกของฟันและสูญเสียฟันไปในที่สุด (3)

เชื้อก่อโรคปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรัง (chronic periodontitis) เป็นแบคทีเรียชนิดแกรมลบซึ่งไม่ใช่ออกซิเจนในการดำรงชีวิตโดยเชื่อที่เป็นสาเหตุหลัก คือ *พอร์ไฟโรโมนาส จิงจิวัลิส* (*Porphyromonas gingivalis*) *แทนเนอเรลลา ไฟไซเทีย* (*Tannerella forsythia*) และ *แอกกิริเกติแบกเทอริ แอคติโนมัยซิเทมคอมมิแทนส์* (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) (4) การกระจายและความชุกของเชื้อขึ้นกับเชื้อชาติหรือ ตำแหน่งทางภูมิศาสตร์ (geographic location) โดยในประเทศไทยมีการศึกษาพบเชื้อ *พอร์ไฟโรโมนาส จิงจิวัลิส* *แทนเนอเรลลา ไฟไซเทีย* ที่ *โพนินาเดนติโคลา* (*Treponema denticola*) และ *แอกกิริเกติแบกเทอริ แอคติโนมัยซิเทมคอมมิแทนส์* ในภาคใต้และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยการศึกษาในภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบว่า เมื่อตรวจ

คราบจุลินทรีย์ใต้เหงือก (subgingival plaque) ของผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรังระดับปานกลางถึงรุนแรงพบเชื้อก่อโรคที่เด่นเป็นกลุ่มสีแดง (red complex)(5) ซึ่งกลุ่มสีแดงประกอบไปด้วยเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส แทนเนอเรลลา โฟไซเทียและทีโพนีมา เดนทีกอลา ผลการสำรวจดังกล่าว ตรงกับการศึกษาที่ผ่านมาว่าเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส มีความสัมพันธ์กับลักษณะทางคลินิกของโรคปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรังรวมถึงมีการดำเนินและการลุกลามของโรค(6-8)และยังมีการศึกษาที่พบว่าเมื่อปริมาณเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสลดลงในตำแหน่งที่เป็นโรคทำให้ตำแหน่งเหล่านี้มีการหายของโรค (9) และการทดลองในสัตว์ทดลองได้ยืนยันถึงความสัมพันธ์ของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส ต่อการเกิดโรคปริทันต์อักเสบ (10) เชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส กระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายเมื่อมีการลุกลามอวัยวะปริทันต์ทั้งที่เป็นเชื้อที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต โดยอาศัยปัจจัยก่อโรค (virulence factor) ได้แก่ ส่วนประกอบต่างๆ ของเชื้อและเอนไซม์ที่ถูกสร้างออกมานอกเซลล์ ได้มีการศึกษาปัจจัยในการก่อโรคเหล่านี้ในหลายรูปแบบ เช่น น้ำที่ใสเลี้ยงเชื้อ (culture supernatants) ตัวเชื้อ (whole cells) ส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อ (sonicated cells) และสารที่แยกสกัดให้บริสุทธิ์ได้แก่ ไลโปโพลีแซคคาไรด์ และมีรายงานว่าทำให้เกิดการละลายของกระดูกโดยตรง (4) เช่น เมื่อนำไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส มาทดสอบกับเซลล์สร้างกระดูกพบว่า กระตุ้นให้เกิดการละลายกระดูก (8) ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้เลือกเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส มาทดลองในรูปส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อ

เมื่อเชื้อก่อโรคพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส ลุกลามเข้าสู่ร่องเหงือกและอวัยวะปริทันต์ก่อให้เกิดการทำลายเซลล์และอวัยวะปริทันต์ได้โดยตรง หรือไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายเหนี่ยวนำให้มีการสร้างและหลั่งไซโตไคน์ต่างๆออกมา (4, 8, 11) ไซโตไคน์ที่ถูกหลั่งออกมาในช่วงต้นของการอักเสบ เช่น อินเตอร์ลิวคิน-1 (IL-1) สามารถกระตุ้นการผลิตสารอักเสบส่งผลให้มีการตอบสนองของการอักเสบมากยิ่งขึ้น(12) เช่น อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า (IL-1 β) อินเตอร์ลิวคิน-6 (IL-6) อินเตอร์ลิวคิน-11 (IL-11) อินเตอร์ลิวคิน-17 (IL-17) และทีเอ็นเอฟแอลฟา (TNF-alpha) แม้ว่าไซโตไคน์ต่างๆ เหล่านี้จะอยู่ในเนื้อเยื่อเหงือก แต่เมื่อมีความเข้มข้นมากพอหรือถ้ามีการลุกลามของโรคมามาก ทำให้ไซโตไคน์เหล่านี้แพร่ผ่านชั้นเนื้อเยื่อเข้าไปถึงกระดูกโดยตรง ซึ่งจะกระตุ้นการสร้างกลุ่มโมเลกุลที่ทำให้เกิดการละลายตัวของกระดูกได้

การละลายตัวของกระดูกเบ้าฟันที่เกิดขึ้นในโรคปริทันต์อักเสบนั้นเป็นผลจากการทำงานที่มากเกินไปของเซลล์สลายกระดูก ทำให้เกิดความไม่สมดุลระหว่างการสร้างและการละลายตัวของกระดูกพบว่า สมดุลของการละลายของกระดูกเบ้าฟันถูกควบคุมโดยกลุ่มโปรตีนที่ทำงานอย่างสัมพันธ์กัน ที่สำคัญได้แก่ รีเซปเตอร์ แอคทีเวเตอร์ ของนิวเคลียร์ แฟกเตอร์ แคปตา บี ไลแกน

หรือแรงค์แอล (receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand, RANKL) และออสทีโอโปรติเจอรินหรือโอพีจี (osteoprotegerin, OPG) โปรตีนแรงค์แอลที่เซลล์สักราะห้ขึ้น มีทั้งที่อยู่ในรูปแบบโมเลกุลที่เชื่อมหุ้มเซลล์ (membrane-bound molecule) ของเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast) หรือในรูปแบบโมเลกุลที่ถูกปล่อยออกมา (soluble form) แรงค์แอลทั้งสองรูปแบบสามารถจับกับตัวรับคือ รีเซปเตอร์ แอคทิเวเตอร์ ของนิวเคลียร์ แฟกเตอร์ แคปปา บีหรือ แรงค์ (receptor activator of nuclear factor-kappaB, RANK) ซึ่งอยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ตั้งต้นของเซลล์สลายกระดูก (pre-osteoclast) แล้วทำให้เกิดการกระตุ้นให้มีการส่งสัญญาณเข้าไปในเซลล์ตั้งต้นเหนี่ยวนำให้เซลล์ตั้งต้นพัฒนาไปเป็นเซลล์สลายกระดูกที่เจริญเต็มที่(13)มีลักษณะเป็นเซลล์หลายนิวเคลียส (multi-nucleated cell) มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโดยจับกันแน่น (tight junction) ระหว่างบริเวณที่เป็นกระดูกกับ เบซอล เมมเบรน (basal membrane) ซึ่งจะหลั่งเอนไซม์มาละลายกระดูก ในภาวะที่การสร้างและการละลายของกระดูกมีความสมดุล โอพีจีจะถูกหลั่งออกมาจากเซลล์สร้างกระดูก ซึ่งอยู่ในรูปโมเลกุลที่ถูกปล่อยออกมา เป็นตัวขัดขวางการจับของแรงค์และแรงค์แอล โดยไปจับกับแรงค์แอล ส่งผลไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์สลายกระดูก (2) เมื่อเซลล์ของอวัยวะปริทันต์ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบ และเกิดการละลายกระดูกในโรคปริทันต์อักเสบที่มีการลุกลามพบว่ามีการเพิ่มสัดส่วนการแสดงออกของจีนแรงค์แอลต่อจีนโอพีจี (2)

เมื่อมีการกระตุ้นการละลายของกระดูกมากทำให้ความสมดุลระหว่างการสร้างและการละลายตัวของกระดูกเปลี่ยนแปลงไป ร่างกายจะปรับให้เข้าสู่สมดุลใหม่โดยลดสัดส่วนการแสดงออกของจีนแรงค์แอลต่อจีนโอพีจี นั่นคือปริมาณการแสดงออกของจีนโอพีจีเพิ่มสูงใกล้เคียงกับแรงค์แอล ทำให้โอพีจีไปจับกับแรงค์แอล เพื่อป้องกันการจับกันของแรงค์แอลกับแรงค์เป็นผลทำให้ลดการสร้างเซลล์สลายกระดูกที่เจริญเต็มที่ การติดตามการเกิดการละลายตัวของกระดูกอาจพิจารณาได้จากสัดส่วนของการแสดงออกของจีนแรงค์แอลต่อจีนโอพีจี (2)

ปัจจุบันมีความสนใจนำสมุนไพรมาใช้ในการป้องกันและรักษาโรคเพิ่มขึ้น ข่อยเป็นพืชสมุนไพรไทยที่มีสรรพคุณหลายอย่างที่ค้ต่อสุขภาพฟันและอนามัยช่องปาก มีรายงานการนำมาใช้ในการรักษาโรคปริทันต์ เช่น ในสมัยโบราณใช้กิ่งข่อยทุบให้น้มน้เพื่อแปรงฟัน ใช้น้ยาจากค้ข่อยผสมเกลือใส่ฟันหรือถูบริเวณที่ปวดฟัน เหงือกบวมเพื่อบรรเทาอาการเจ็บปวด มีการศึกษาที่พบว่า สารสกัดจากใบข่อยมีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อ *พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวัลิส* (14) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาทางคลินิกโดยผสมสารสกัดจากใบข่อยในรูปของยาสีฟัน น้ยาบ้วนปาก เจลหรือน้ยาฉีดล้างในร่องลึกปริทันต์พบว่า สามารถลดการอักเสบของเหงือกและลดเชื้อจุลินทรีย์ได้โดยไม่ทำให้ระบบนิเวศน์ของเชื้อในช่องปากเสียสมดุลไป และมีความปลอดภัยในการใช้ (15-20) การศึกษาผลของข่อยในการต้านการอักเสบในระดับโมเลกุลนั้น ในปัจจุบันมีเพียงการศึกษาการแสดงออกของ

จิ้นไซโคลออกซีจีเนส-2 หรือคอก 2 (cyclooxygenase-2, COX-2) และอินเตอร์ลิวคิน-1เบต้าจากเซลล์โมโนไซต์ (21) และเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก (22) ซึ่งพบว่า สารสกัดจากใบข่อยสามารถยับยั้งการแสดงออกของจิ้นคอก-2 และอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้าได้ และพบว่าสารสกัดจากใบข่อยมีผลทำให้มีแนวโน้มการแสดงออกของจิ้นโอพีจีในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกเพิ่มขึ้น ซึ่งคอก-2 อินเตอร์ลิวคิน-1เบต้า และโอพีจีเป็นจิ้นที่เกี่ยวข้องในกระบวนการละลายตัวของกระดูกเบ้าฟัน ซึ่งการละลายตัวของกระดูกเบ้าฟันเป็นอาการที่สำคัญอย่างหนึ่งของโรคปริทันต์อักเสบ อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาผลของสารสกัดจากใบข่อยต่อการแสดงออกของจิ้นแรงค์แอลและโอพีจีในเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์เมื่อถูกกระตุ้นด้วยส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อ *พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส* ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากใบข่อยในประเด็นดังกล่าว โดยเลือกใช้เซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์มาศึกษาเพื่อให้เป็นตัวแทนของเซลล์สร้างกระดูกของมนุษย์ ซึ่งผลจากการศึกษานี้อาจสามารถใช้เป็นแนวทางในการคิดค้นหาวิธีการรักษาการอักเสบและการสูญเสียกระดูกจากโรคปริทันต์อักเสบวิธีใหม่โดยใช้สมุนไพรไทยต่อไป

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากใบข่อยต่อการแสดงออกของจิ้นแรงค์แอลและจิ้นโอพีจีในเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์ เมื่อถูกกระตุ้นด้วยส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อ *พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส*

3. สมมติฐานการวิจัย

สารสกัดจากใบข่อยมีผลลดการแสดงออกของจิ้นแรงค์แอลและเพิ่มการแสดงออกของจิ้นโอพีจีในเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์ เมื่อถูกกระตุ้นด้วยส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อ *พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส* เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่ไม่มีสารสกัดจากใบข่อย

4. ขอบเขตของงานวิจัย

เป็นการศึกษาถึงผลของสารสกัดจากใบข่อยในรูปของการสกัดแบบหยาบ (crude extract) ต่อเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์ เมื่อถูกกระตุ้นด้วยส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อ *พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส* ไม่ได้ศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากใบข่อย รวมถึงใช้ส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อ *พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส* โดยไม่ได้แยกสกัดส่วนประกอบในเชื้อที่ถูกทำให้แตกตัวให้บริสุทธิ์

5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 5.1 ทำให้ทราบข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับผลของสารสกัดจากใบข่อยต่อการแสดงออกของ
 จีนเรงค์แอลและจีนโอพีจีในเซลล์สร้างกระดูกปฏิกิริยาของมนุษย์ เมื่อถูกกระตุ้น
 ด้วยส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อ *พอร์ไฟโรโมแนส* *จึงจิवालิส*
- 5.2 ความรู้ที่ได้จะสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นแนวทางในการป้องกันและรักษาโรค
 ปริทันต์อักเสบโดยใช้สารสกัดจากใบข่อย โดยมุ่งไปที่การยับยั้งการละลายตัวของ
 กระดูก กล่าวคือ หากยับยั้งการหลั่งหรือผลิตเรงค์แอลจะยังผลให้เกิดการคงตัว
 (bone stabilization) หรือยับยั้งการละลายตัวของกระดูก

บทที่ 2

วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. โรคปริทันต์อักเสบ

จากการสำรวจสถานะปริทันต์ในทันตสุขภาพแห่งชาติปี 2550 โดยใช้ดัชนี CPI (Community Periodontal Index) เป็นเกณฑ์ซึ่งเลือกวัดสถานะปริทันต์ที่เป็นโรคในระดับสูงสุดของแต่ละคน ในกลุ่มอายุต่างๆ พบว่า เด็กวัยรุ่นมีสถานะเหงือกปกติ (CPI=0) มากขึ้นจากปี 2544 โดยสำรวจในกลุ่มอายุ 12 และ 15 ปี ซึ่งสถานะเหงือกปกติในกลุ่มอายุ 12 ปีเปลี่ยนจากร้อยละ 9.5 มาเป็นร้อยละ 18 ส่วนกลุ่มอายุ 15 ปีเปลี่ยนจากร้อยละ 3.8 มาเป็นร้อยละ 13.9 แต่ในวัยทำงาน (35- 44 ปี) และผู้สูงอายุ (60-74 ปี) มีร่องลึกปริทันต์ ≥ 6 มิลลิเมตร (CPI=4) เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับปี 2544 โรคปริทันต์อักเสบรุนแรง (CPI=4) ในวัยทำงานเพิ่มจากร้อยละ 10.5 เป็นร้อยละ 15.5 และในผู้สูงอายุเพิ่มจากร้อยละ 25.7 เป็นร้อยละ 68.8 จะเห็นได้ว่าโรคปริทันต์อักเสบในกลุ่มผู้สูงอายุเพิ่มสูงขึ้นอย่างมากจึงนับได้ว่าเป็นโรคที่สำคัญและเป็นปัญหาในช่องปาก(1)

โรคปริทันต์อักเสบเป็นโรคที่มีการอักเสบของอวัยวะปริทันต์ (periodontium) หรือ อวัยวะรอบๆฟัน ซึ่งประกอบด้วยเหงือก (gingiva) เคลือบรากฟัน (cementum) เอ็นยึดปริทันต์ (periodontal ligament) และกระดูกเบ้าฟัน (alveolar bone) โรคปริทันต์อักเสบจัดเป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียซึ่งอาศัยอยู่ในคราบจุลินทรีย์รอบตัวฟันเป็นเวลานาน เมื่อเชื้อก่อโรคปริทันต์อักเสบบุกรุกเข้ามาในอวัยวะปริทันต์ ในช่วงแรกจะเกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายเฉพาะที่เป็นแบบระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (innate immune system) ทำให้มีการหลั่งไซโตไคน์และสารอักเสบเพื่อทำลายเชื้อก่อโรคและส่งผลให้เหงือกมีการอักเสบ อาการที่แสดงออกคือ เหงือกบวมแดง ซึ่งถ้าไม่สามารถกำจัดเชื้อก่อโรคได้ เชื้อจะบุกรุกเข้ามาในอวัยวะปริทันต์ที่ลึกมากขึ้น รวมถึงร่างกายจะเพิ่มการหลั่งไซโตไคน์และสารอักเสบมากขึ้น ทำให้ปฏิกิริยาของการอักเสบขยายวงกว้างไปยังเนื้อเยื่อยึดต่อของเหงือก (gingival connective tissue) และกระดูกเบ้าฟัน อาการที่พบในระยะที่มีการลุกลามนี้คือมีความลึกของร่องปริทันต์ (probing depth, PD) (2) นั่นคือเกิดการทำลายของเนื้อเยื่อปริทันต์รวมถึงการละลายของกระดูกเบ้าฟันซึ่งจะนำไปสู่การโยกของฟันและสูญเสียฟันไปในที่สุด (3)

เชื้อก่อโรคปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรัง (chronic periodontitis) เป็นแบคทีเรียชนิดแกรมลบ ซึ่งไม่ใช่ออกซิเจนในการดำรงชีวิตโดยเชื่อที่เป็นสาเหตุหลัก คือ พอร์ไฟโรโมนัส จิงจิवालิส (*Porphyromonas gingivalis*) แทนเนอเรลลา ไฟไซเทีย (*Tannerella forsythia*) และแอกกริเกติแบกเทอร์ แอกติโนมัยซิเทมคอมมิแทนส์ (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) (4) การกระจายและความชุกของเชื้อขึ้นกับเชื้อชาติหรือ ตำแหน่งทางภูมิศาสตร์ (geographic location) โดยในประเทศไทยมีการศึกษาพบเชื้อพอร์ไฟโรโมนัส จิงจิवालิส แทนเนอเรลลา ไฟไซเทีย ที่โพนิมา เคนทีโคลา (*Treponema denticola*) และแอกกริเกติแบกเทอร์ แอกติโนมัยซิเทมคอมมิแทนส์ ในภาคใต้และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยการศึกษาในภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบว่าเมื่อตรวจคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือก (subgingival plaque) ของผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรังระดับปานกลางถึงรุนแรงพบเชื้อก่อโรคที่เด่นเป็นกลุ่มสีแดง (red complex) (5) ซึ่งกลุ่มสีแดงประกอบไปด้วยเชื้อพอร์ไฟโรโมนัส จิงจิवालิส แทนเนอเรลลา ไฟไซเทียและทีโพนิมา เคนทีโคลาซึ่ง Socransky และคณะได้จำแนกเชื้อแบคทีเรียในคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือก เป็นกลุ่มตามปริมาณของเชื้อที่ตรวจพบและชนิดของเชื้อต่าง ๆ ที่อาศัยอยู่ร่วมกันด้วยวิธีการตรวจสอบดีเอ็นเอ (DNA-hybridization) และพบว่าเชื้อในกลุ่มสีแดงมีความสัมพันธ์กับลักษณะทางคลินิกของโรคปริทันต์ชนิดเรื้อรัง คือ พบเชื้อในร่องลึกปริทันต์ที่ลึกและบริเวณที่มีเลือดออกเมื่อใช้โพรบ (probe) ซึ่งอาจพบเฉพาะเชื้อพอร์ไฟโรโมนัส จิงจิवालิส ชนิดเดียวหรืออาจพบร่วมกับเชื้อ แทนเนอเรลลา ไฟไซเทีย และทีโพนิมา เคนทีโคลา (6)

2. เชื้อพอร์ไฟโรโมนัส จิงจิवालิส

เชื้อพอร์ไฟโรโมนัส จิงจิवालิส เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ไม่ใช้ออกซิเจนในการดำรงชีวิต มีรูปร่างเป็นแท่ง (rod) กลม (cocci) หรืออิรี (coccobacilli) มีขนาด 0.3-0.5 x 1.2-5 ไมครอน เป็นแบคทีเรียที่ผลิตเม็ดสีพอร์ไฟริน (porphyrin pigment) ซึ่งมีสีดำเกิดจากเชื้อพอร์ไฟโรโมนัส จิงจิवालิส มีการสะสมฮีมิน (hemin) เพื่อนำธาตุเหล็ก (iron) มาช่วยในการเติบโต ในภาวะที่มีฮีมินมากจะมีรูปร่างกลม และถ้ามีฮีมินจำกัดจะมีรูปร่างเป็นทรงรี หรือแท่งสั้นๆ ลักษณะโคโลนิบนอาหารเลี้ยงเชื้อผสมเลือด (blood agar) เป็นสีดำ ในระยะเริ่มแรกโคโลนีจะมีสีเหลืองถึงเขียว ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเลือดหรือฮีมินผสม โคโลนีจะไม่มีสี (23, 24)

แนวคิดเกี่ยวกับเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุการเกิดโรคปริทันต์อักเสบมี 2 แนวคิด คือ มีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรียที่ไม่จำเพาะเจาะจง (non-specific plaque hypothesis) ที่กล่าวว่าโรคปริทันต์อักเสบเกิดจากสารพิษซึ่งสร้างจากเชื้อทุกชนิดที่อยู่ในคราบจุลินทรีย์ และอีกแนวคิดกล่าวว่า การเกิดโรคปริทันต์อักเสบมีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรียที่จำเพาะ (specific plaque hypothesis) นั่นคือ

ต้องเป็นเชื้อที่ก่อโรคเท่านั้นซึ่งอาจเป็นเชื้อแบคทีเรียตัวใดตัวหนึ่ง หรือกลุ่มของเชื้อที่จำเพาะก็ได้ เมื่อเชื้อที่จำเพาะมีปริมาณมากขึ้นจะทำให้เกิดพยาธิสภาพมากขึ้น ซึ่งนักวิจัยเชื่อในแนวคิดที่ว่าเชื้อที่จำเพาะก่อให้เกิดโรคปริทันต์อักเสบ (25)

หลักเกณฑ์ในการพิจารณาเชื้อที่จำเพาะต่อการก่อโรคปริทันต์อักเสบพิจารณาจาก(26)

2.1 ความสัมพันธ์ต่อตำแหน่งที่เกิดโรค โดยต้องมีหลักฐานที่พบเชื้อจำนวนมากใน

ตำแหน่งที่เป็นโรค

2.2 การกำจัดเชื้อในตำแหน่งที่เกิดโรค เมื่อกำจัดเชื้อแบคทีเรียในตำแหน่งที่เกิดโรคแล้ว

จะทำให้ลักษณะทางคลินิกดีขึ้น

2.3 ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยร่างกายมีการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่

เฉพาะเจาะจง (cellular or humoral immune response) ต่อเชื้อ

2.4 การศึกษาในสัตว์ทดลอง โดยเชื้อแบคทีเรียนั้นทำให้เกิดโรคปริทันต์อักเสบใน

สัตว์ทดลองได้

2.5 ป้องกันโรค โดยป้องกันโรคของเชื้อแบคทีเรียนั้นสามารถทำลายเนื้อเยื่อได้

เชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส มีหลักฐานแสดงได้ตามหลักเกณฑ์ดังกล่าว โดยเมื่อมีเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส มีผลทำให้เกิดโรคปริทันต์อักเสบมากขึ้น ในการศึกษาของ Slots ซึ่งศึกษาในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดรุนแรง (advanced periodontitis) 196 คนพบเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส อยู่ในตำแหน่งที่มีการดำเนินโรคร้อยละ 42-52 และพบในตำแหน่งที่ไม่มีการดำเนินโรคร้อยละ 14 (7) และในการศึกษาของ Kamma และคณะพบว่าในร่องเหงือกที่ลึกมากกว่า 6 มิลลิเมตรพบเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส ได้ร้อยละ 26.7 (27) ในการกำจัดเชื้อพบว่าเมื่อลดปริมาณเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส ลงในตำแหน่งของการเป็นโรค ทำให้ตำแหน่งเหล่านี้มีการหายของโรค(9) เมื่อเชื้อรุกรานเข้ามาในร่างกายจะทำให้ร่างกายสร้างแอนติบอดีต่อเชื้อโดยมีการศึกษาพบว่าในผู้ป่วยเป็นโรคปริทันต์อักเสบที่มีเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส จะมีไอจีจีแอนติบอดี (28) และการทดลองในสัตว์ทดลองโดย Holt และคณะนำเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส มากระตุ้นในเหงือกถึงพบว่าทำให้เกิดโรคปริทันต์อักเสบ (10) ส่วนปัจจัยก่อโรคของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส ได้แก่ โลโปโพลีแซคคาไรด์หรือแอลพีเอส (lipopolysaccharide, LPS) โพลีแซคคาไรด์แคปซูล (polysaccharide capsule) ฟิมเบรีย (fimbriae) ฮีแมกกลูทีนิน (hemagglutinins) และเอนไซม์ที่ถูกสร้างออกมาออกเชื้อ ได้แก่ โปรติเอส (protease) คอลลาจีเนส (collagenase) ฟอสโฟไลเปส (phospholipase) ทริปซิน (trypsin) ไฟบิโนไลซิน (fibrinolysin) จิงจิเพน (gingipain) รวมถึงแขนที่ใช้ยึดเกาะ (adhesins) (4, 29, 30)

เชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิส กระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายเมื่อมีการลุกลามอวัยวะปรีทันต์ทั้งที่เป็นเชื้อที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต โดยอาศัยปัจจัยก่อโรค (virulence factor) ได้แก่ ส่วนประกอบต่างๆ ของเชื้อและเอนไซม์ที่ถูกสร้างออกมานอกเซลล์ ได้มีการศึกษาปัจจัยในการก่อโรคเหล่านี้ในหลายรูปแบบ เช่น น้ำที่ใสเลี้ยงเชื้อ (culture supernatants) ตัวเชื้อ (whole cells) เชื้อที่ถูกทำให้แตกตัว (sonicated cell) และสารที่แยกสกัดให้บริสุทธิ์ได้แก่ ไลโปโพลีแซคคาไรด์ และมีรายงานว่าทำให้เกิดการละลายของกระดูกโดยตรง (4) เช่น เมื่อนำไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิส มาทดสอบกับเซลล์สร้างกระดูกพบว่า กระตุ้นให้เกิดการละลายกระดูก (8) ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้เลือกเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิส มาทดลองในรูปแบบเชื้อที่ถูกทำให้แตกตัว

เมื่อเชื้อก่อโรคพอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิส ลุกลามเข้าสู่ร่องเหงือกและอวัยวะปรีทันต์ ก่อให้เกิดการทำลายเซลล์และอวัยวะปรีทันต์ได้โดยตรง หรือไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายเหนี่ยวนำให้มีการสร้างและหลั่งไซโตไคน์ต่างๆออกมา (4, 8, 11) ไซโตไคน์ที่ถูกหลั่งออกมาในช่วงต้นของการอักเสบ เช่น อินเตอร์ลิวคิน-1 (IL-1) สามารถกระตุ้นการผลิตสารอักเสบส่งผลให้มีการเพิ่มการตอบสนองของการอักเสบมากยิ่งขึ้น (12) เช่น อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า อินเตอร์ลิวคิน-6 อินเตอร์ลิวคิน-11 อินเตอร์ลิวคิน-17 และทีเอ็นเอฟแอลฟา (TNF-alpha) แม้ว่าไซโตไคน์ต่างๆ เหล่านี้จะอยู่ในเนื้อเยื่อเหงือกแต่เมื่อมีความเข้มข้นมากพอหรือถ้ามีการลุกลามของโรคมามาก ทำให้ไซโตไคน์เหล่านี้แพร่ผ่านชั้นเนื้อเยื่อเข้าไปถึงกระดูกโดยตรงซึ่งจะกระตุ้นการสร้างกลุ่มโมเลกุลที่ทำให้เกิดการละลายตัวของกระดูกได้ ดังภาพที่ 1

3. กระดูก

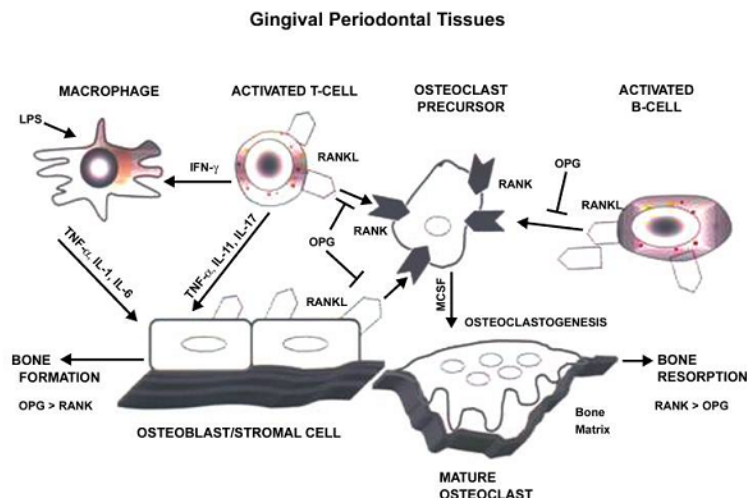
ในภาวะปกติกระดูกจะมีการรักษาสสมดุลระหว่างการสร้างและการละลายตัวของกระดูกเป็นวัฏจักรซึ่งเกี่ยวข้องกับเซลล์ 2 กลุ่ม คือ เซลล์สร้างกระดูกและเซลล์สลายกระดูก เซลล์สร้างกระดูกทำหน้าที่หลักในการสร้างกระดูกโดยสังเคราะห์โปรตีนชนิดต่างๆที่จำเพาะต่อกระดูก (bone matrix) ซึ่งหลั่งออกนอกเซลล์ (extracellular matrix) เพื่อเป็นโครงสร้างของการสะสมแร่ธาตุ (mineralization) นอกจากนี้ยังทำหน้าที่ควบคุมการละลายตัวของกระดูกโดยการกระตุ้นให้เซลล์สลายกระดูกพัฒนาตัวให้สมบูรณ์และเกิดการสลายกระดูก (osteoclastogenesis) เซลล์สลายกระดูกทำหน้าที่หลั่งสารเพื่อสลายโปรตีนกระดูกโดยขณะที่มีการละลายของกระดูกจะมีการสร้างกระดูกขึ้นมาทดแทนตลอดเวลา สมดุลนี้เป็นการทำงานอย่างสัมพันธ์กันระหว่างเซลล์ 2 กลุ่มดังกล่าว ซึ่งมีการควบคุมทางโมเลกุลผ่านการทำงานของไซโตไคน์ที่สำคัญได้แก่ แรงค์แอล (receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand, RANKL หรือมีชื่อเรียกอื่นเป็น TRANCE, ODF, OPGL) แรงค์

(receptor activator of nuclear factor-kappa B, RANK หรือมีชื่อเรียกอื่นเป็น TRANCE receptor) และโอพีจี (osteoprotegerin, OPG หรือมีชื่อเรียกอื่นเป็น OCIF) ดังภาพที่ 2

กลไกการสร้างเซลล์สลายกระดูก (osteoclastogenesis) จะเกี่ยวข้องกับโมเลกุลที่เชื่อมเซลล์ ซึ่งได้แก่ แรังก์ และแรังก์แอล โดยแรังก์จะแสดงอยู่บนเซลล์ตั้งต้นของเซลล์สลายกระดูก ในขณะที่แรังก์แอลพบว่ามีอยู่บนเซลล์ของเซลล์สร้างกระดูก ที่ ลิมโฟไซต์ที่ถูกกระตุ้น (activated T lymphocyte) และบี ลิมโฟไซต์ที่ถูกกระตุ้น (activated B lymphocyte) นอกจากนี้ยังพบว่าแรังก์แอล ถูกหลั่งออกมาในรูปที่ถูกปลดปล่อยออกมาได้อีกด้วย เมื่อแรังก์แอลจับกับตัวรับคือแรังก์ซึ่งอยู่บนเซลล์ตั้งต้นของเซลล์สลายกระดูกจะเกิดการกระตุ้นให้มีการส่งสัญญาณเข้าไปในเซลล์และเหนี่ยวนำให้เซลล์เจริญเป็นเซลล์สลายกระดูกที่พัฒนาสมบูรณ์(13, 31-34) ในการด้านการสร้างเซลล์สลายกระดูกจะมีโอพีจีเป็นโปรตีนตัวรับที่มีความสามารถในการแข่งขันกับแรังก์แอล ส่งผลให้เกิดการลดการเชื่อมจับกันระหว่างแรังก์แอลและแรังก์ ผลลัพธ์คือการป้องกันการสร้างเซลล์สลายกระดูก(35, 36) ดังภาพที่ 1 ดังนั้นในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับว่าความสมดุลระหว่างแรังก์ แรังก์ แอล และ โอพีจีมีผลต่อการควบคุมการสร้างและทำลายกระดูก

โอพีจีในมนุษย์ มีการแสดงออกในเนื้อเยื่อหลายชนิดนอกเหนือจากเซลล์สร้างกระดูก ได้แก่ หัวใจ ไต ตับ ม้าม และไขกระดูก(37) โดยพบว่าลำดับกรดอะมิโนของโอพีจีมีความใกล้เคียงกับตัวรับทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์ ซูเปอร์แฟมิลี (TNF-R superfamily) ซึ่งรวมถึงแรังก์ด้วย โอพีจีประกอบไปด้วยโดเมนซิสเทอีน-ริช (cysteine-rich domain) 4 โดเมนทางด้านปลายเอ็น (N-terminal) ซึ่งส่วนนี้เป็นส่วนที่มีความใกล้เคียงกับตัวรับทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์-2 มาก และมี 2 โดเมนเดธ (death domain) ทางด้านปลายซี (C-terminal) แต่ไม่มีส่วนข้ามผ่านแผ่นเยื่อ (transmembrane) และไม่มีส่วนหางภายในเซลล์ (cytoplasmic tail) ดังนั้นจึงมีลักษณะเป็นโปรตีนที่ถูกหลั่งออกมา (secreted protein) ซึ่งจะทำหน้าที่ไปขัดขวางการจับกันของแรังก์แอลและแรังก์ ทำให้เกิดการยับยั้งกระบวนการสร้างเซลล์สลายกระดูกที่พัฒนาตัวสมบูรณ์(38)

กระบวนการสลายกระดูกเบ้าฟันจะเกิดขึ้นเมื่อเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายถูกกระตุ้นด้วยเชื้อก่อโรคโดยทั่วไปจะเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ทำให้เกิดโรคปริทันต์อักเสบ ทำให้เกิดการเหนี่ยวนำให้มีการสร้างและหลั่งไซโตไคน์ต่างๆออกมา (4, 8, 11) ในเหงือกหรืออวัยวะปริทันต์ที่มีการลุกลาม การติดตามการเกิดการละลายตัวของกระดูกพิจารณาได้จากสัดส่วนของการแสดงออกของอินแรังก์แอลต่ออินโอพีจี (2) ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างเซลล์เมื่อมีการละลายของกระดูกเบ้าฟัน โดยการละลายของกระดูกเบ้าฟันเกิดขึ้นเมื่อเกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายในเนื้อเยื่อเหงือก โดยแมคโครฟาจ (macrophages) ที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนของเชื้อก่อโรค โดยทั่วไปจะเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ทำให้เกิดโรคปริทันต์อักเสบ ส่งผลให้มีการหลั่งไซโตไคน์ที่เอ็นเอฟแอลฟา อินเตอร์ลิวคิน-1 อินเตอร์ลิวคิน-6 ร่วมกับปัจจัยแคลซิโทรฟิก (calcitropic factor) เช่น วิตามินดี พรอสตาแกลนดิน กลูโคคอร์ติคอยด์ (glucocorticoid) ซึ่งทั้งไซโตไคน์และปัจจัยนี้มีผลต่อการแสดงออกของยีนแรงค์แอลของเซลล์สร้างกระดูก เมื่อมีการจับกันระหว่างแรงค์แอลและแรงค์ของเซลล์ตั้งต้นของเซลล์สลายกระดูกทำให้มีการส่งสัญญาณเข้าไปในเซลล์และเหนี่ยวนำให้เกิดการละลายของกระดูก เมื่อระดับของแมคโครฟาจ โคโลนี-สติมูเลติง แฟกเตอร์ (macrophage colony-stimulating factor) สูงพอ โอพีจีเป็นโปรตีนตัวรับที่ถูกสร้างจากเซลล์สร้างกระดูก มีความสามารถในการแย่งจับกับแรงค์แอล ส่งผลให้เกิดการลดการเชื่อมจับกันระหว่างแรงค์แอลและแรงค์ ส่วนที่ ลิมโฟไซท์ที่ถูกกระตุ้น จะส่งผลต่อกระดูกโดยหลั่งไซโตไคน์ที่เอ็นเอฟแอลฟา อินเตอร์ลิวคิน-11 อินเตอร์ลิวคิน-17 มีผลต่อการแสดงออกของยีนแรงค์แอลของเซลล์สร้างกระดูก (จะส่งผลให้ให้เกิดการละลายของกระดูกทางอ้อม) ในกรณีแมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้น (มีเอ็มเอชซีกลุ่มที่ 2 จับกับแอนติเจน (MHC class II+antigen)) ไปจับกับที่ ลิมโฟไซท์ทำให้ที่ ลิมโฟไซท์มีการแสดงออกของยีนแรงค์แอล (จะส่งผลให้เกิดการละลายของกระดูกโดยตรง)และมีการศึกษาที่พบว่าบี ลิมโฟไซท์ที่ถูกกระตุ้นทำให้มีการแสดงออกของยีนแรงค์แอลทั้งที่อยู่ในรูปแบบที่ติดกับผิวเซลล์หรือในรูปแบบ โมเลกุลที่ถูกปล่อยออกมา (39) ในการด้านการสร้างเซลล์สลายกระดูกจะมีโอพีจีเป็นโปรตีนตัวรับที่มีความสามารถในการแย่งจับกับแรงค์แอล ทำให้ขัดขวางการเกิดการสลายกระดูก กระบวนการสลายกระดูกเบ้าฟันจะเกิดขึ้นเมื่อเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายถูกกระตุ้นในเหงือกหรืออวัยวะปริทันต์ (นำมาจาก Taubman, 2005) (34)

โอพีจี > แรงค์แอล

แรงค์แอล > โอพีจี

โอพีจี > แรงค์

แรงค์ > โอพีจี



การสร้างกระดูก

การละลายตัวของกระดูก

ภาพที่ 2 โมเลกุลที่ควบคุมสมดุลระหว่างการสร้างและการละลายตัวของกระดูก



ภาพที่ 3 สัดส่วนการสร้างหรือการละลายกระดูก โดยการสร้างหรือการละลายกระดูก จะขึ้นกับสัดส่วนการแสดงออกของจิ้นแรงค์แอลต่อจิ้นโอพีจี ซึ่งเมื่อมีการสร้างหรือการละลายกระดูกขึ้นทั้งสองมีการแสดงออกที่สัมพันธ์กัน(นำมาจาก Cochran, 2008) (2)

4. เชื้อพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालิส และการแสดงออกของจิ้นแรงค์ แรงค์แอล และโอพีจี

การละลายตัวของกระดูกเป่าฟันในโรคปริทันต์อักเสบนั้นส่วนหนึ่งเป็นผลมาจากการกระตุ้นเซลล์สลายกระดูก จากการศึกษาขบวนการควบคุมการทำงานของเซลล์สลายกระดูกในห้องปฏิบัติการพบว่า ทั้งปัจจัยทางร่างกายและเชื้อแบคทีเรียสามารถกระตุ้นเซลล์สลายกระดูกให้มีการทำลายกระดูกเป่าฟัน ซึ่งในกรณีของโรคปริทันต์อักเสบพบว่าจะมีการแสดงออกของการละลายตัวของกระดูกเป่าฟันมากกว่าการสร้างซ่อมแซมจึงปรากฏให้เห็นรอยวิกรของกระดูกเป่าฟัน มีการศึกษาที่พบว่าการแสดงออกของแรงค์แอลจะเพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับปริมาณของเชื้อพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालิส (40) มีรายงานพบว่าสามารถตรวจพบการแสดงออกของเมซเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอ (mRNA) และปริมาณโปรตีนของแรงค์แอลในเนื้อเยื่อตลอดจนความเข้มข้นของแรงค์แอลในน้ำเหลืองร่องเหงือกที่ได้จากผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบในระดับที่มากกว่าในกลุ่มเนื้อเยื่อปกติ (41, 42) และเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อที่ได้จากผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบพบว่าตำแหน่งเฉพาะที่มีการแสดงออกของแรงค์แอลจะมีอาการทางคลินิกที่รุนแรงกว่าตำแหน่งที่ไม่มีการแสดงออกของแรงค์

แอล (43) ในทางกลับกันพบว่าเนื้อเยื่อที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบจะมีระดับการแสดงออกของเมซเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอและปริมาณโปรตีนโอพีจีต่ำกว่าเนื้อเยื่อปกติ (41, 44) น้ำเหลืองร่องเหงือกของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบจะมีความเข้มข้นของโอพีจีลดลง ความเข้มข้นของแรงค์แอลเพิ่มขึ้น และสัดส่วนความเข้มข้นของแรงค์แอลต่อโอพีจีในน้ำเหลืองร่องเหงือกของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบสูงกว่าคนปกติ (42) นอกจากนี้การศึกษาผลของโอพีจีในการป้องกันการละลายตัวของกระดูกในสัตว์ทดลองพบว่าหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นโรคปริทันต์อักเสบ เมื่อได้รับโอพีจีทางระบบ หรือได้รับการถ่ายโอนยีนโอพีจี (OPG gene transfer) จะมีการละลายตัวของกระดูกเบ้าฟันลดลง และพบว่าโอพีจียังไปยับยั้งกระบวนการสร้างเซลล์สลายกระดูกได้อีกด้วย (45, 46) ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบระหว่างการแสดงออกของยีน รวมถึงปริมาณการสร้างและการหลั่งของโอพีจีก็จะสามารถเป็นตัวบอกระดับการป้องกันการละลายตัวของกระดูกได้

5. การใช้เซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์ในห้องปฏิบัติการ

การเลี้ยงเซลล์ (cell culture) เป็นวิธีการหนึ่งในการศึกษาวิจัยในระดับเซลล์และโมเลกุล โดยสามารถใช้เป็นแบบจำลองเพื่อศึกษาถึงพื้นฐานและลักษณะชีวเคมีของเซลล์ ที่ได้รับผลกระทบต่อสารที่เป็นสาเหตุของโรคหรือเพื่อใช้ศึกษาประสิทธิภาพของยาหรือสารเคมีใหม่ๆ ในการศึกษาเบื้องต้นสามารถใช้พิจารณาถึงการรอดชีวิตและการเจริญเติบโตของเซลล์เมื่อได้รับสารกระตุ้นหรือยา รวมถึงหาปริมาณยาและวิธีการที่เหมาะสมในการรักษาโรคที่สนใจ การใช้เซลล์ในการทดสอบยาและสารต่างๆ เป็นขั้นตอนเบื้องต้นที่สำคัญตามมาตรฐานขององค์การอาหารและยาก่อนที่จะนำมาใช้ในมนุษย์ การใช้เซลล์เป็นแบบจำลองการศึกษามีข้อได้เปรียบ คือ สามารถควบคุมปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาและภาวะแวดล้อมในการทดลองได้มากกว่าการทำในสิ่งมีชีวิต หรือการทดลองทางคลินิก และการใช้เซลล์ทดสอบเพียงชนิดเดียวกับสารทดสอบจะทำให้เห็นผลที่เกิดขึ้นโดยตรง ซึ่งมักใช้ในการศึกษาเชิงลึก เช่น วิถีโมเลกุล (molecular pathways) (47) ที่เกี่ยวข้องต่อการตอบสนองของเซลล์ต่อสารทดสอบ นอกจากนี้ยังมีค่าใช้จ่ายที่น้อยกว่า ทั้งนี้ผลการศึกษาที่ได้จากการทดลองในเซลล์ มีข้อจำกัดที่สำคัญ คือ เป็นผลเพียงด้านหนึ่งที่เกิดขึ้นจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อเพียงชนิดเดียวที่ถูกเลี้ยงในภาวะแวดล้อมจำลอง ในขณะที่ในสิ่งมีชีวิตมีเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ ทำงานร่วมกัน ดังนั้นการแปลผลการทดสอบที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์จึงมีข้อจำกัด โดยเฉพาะการปรับใช้ผลในทางคลินิก โดยเซลล์ที่สนใจนำมาศึกษาในการวิจัยนี้เป็นเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์

เซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์ สามารถเลี้ยงให้เป็นเซลล์ชั้นเดียวที่เรียงตัวเกาะบนผิวภาชนะ มีลักษณะเหมือนเซลล์สร้างเส้นใย (fibroblast) เป็นเซลล์เรียวยาว ถ้าเซลล์มีจำนวนมากอาจ

พบลักษณะเซลล์เบียดกันแน่นโค้งเหมือนคลื่น ซึ่งโดยทั่วไปลักษณะของเซลล์ปฐมภูมิขึ้นอยู่กับเซลล์ต้นกำเนิดและการปรับตัวของเซลล์ให้เข้ากับสิ่งแวดล้อม การแยกเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิ (cell isolation) ทำได้โดยการย่อยด้วยเอนไซม์ให้เซลล์สร้างกระดูกที่ฝังอยู่ในเมทริกซ์ออกมาจากกระดูก (enzymatic dissociation) โดยเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์นั้นเป็นตัวแทนของเซลล์สร้างกระดูกของมนุษย์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการได้สะดวกและได้ผลการทดลองเป็นที่น่าเชื่อถือ แต่เซลล์ปฐมภูมิมิข้อจำกัดคือเซลล์จะแก่ลงและหยุดแบ่งตัว โดยข้อจำกัดดังกล่าวขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์และอายุของผู้บริจาค โดยพบว่าเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์สามารถแบ่งตัวได้ประมาณ 50 รุ่น (generation) หรือถ้าคิดเป็นจำนวนพาสเซจ (passage) จะมีค่าเท่ากับจำนวนรุ่นเมื่อเปลี่ยนสถานะในอัตราส่วน 1:2 (48)

เซลล์สร้างกระดูกมีการเจริญเติบโตแบ่งเป็น 3 ระยะ คือ ระยะแบ่งตัว (proliferation) ระยะเจริญเติบโตเต็มที่ซึ่งผลิตโปรตีนหลั่งออกนอกเซลล์แล้วเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (differentiation) และระยะสะสมแร่ธาตุ (mineralization) ซึ่งเซลล์สร้างกระดูกเจริญเติบโตเต็มที่เมื่อแบ่งตัวเพียงพอแล้ว (post-proliferation) และเริ่มเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ในห้องปฏิบัติการในระยะดังกล่าว จำเป็นต้องเพิ่มสารที่ช่วยในการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์เพื่อจำลองภาวะในร่างกายตามธรรมชาติ นอกเหนือจากฟีตัล โบวาย ซีรัม หรือเอฟบีเอส (Fetal bovine serum, FBS) โดยเติมแอล-แอสคอร์บิก แอซิด (L-ascorbic acid) และเบต้า กลีเซอโรฟอสเฟต (β -glycerophosphate) หลังจากนั้นในระยะเริ่มสะสมแร่ธาตุของเซลล์ในห้องปฏิบัติการจำเป็นต้องเพิ่มฮอร์โมนกลูโคคอร์ติคอยด์ ซึ่งมักใช้เป็นเดกซามิทาโซน (dexamethasone) (49)

การเปลี่ยนแปลงและการพัฒนาของเซลล์ในระยะต่างๆ รวมทั้งการสร้างสารเมทริกซ์และการสะสมแร่ธาตุมีกลไกควบคุมอย่างเป็นลำดับ (49, 50) โดยผ่านการหลั่งสารหรือโมเลกุลกระตุ้นสัญญาณต่างๆ (molecular signaling) ที่มีความจำเพาะต่อการสร้างกระดูกในระยะนั้นๆ ดังนั้นการตรวจหาโมเลกุลจำเพาะต่อเซลล์สร้างกระดูก หรือการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับโมเลกุลจำเพาะเหล่านี้ จึงสามารถใช้ติดตามการพัฒนาของเซลล์ในระยะต่างๆ และเพื่อเป็นการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเซลล์ที่แยกได้ว่าเป็นเซลล์สร้างกระดูกก่อนนำมาทดลองในขั้นต่อไป โดยพิจารณาได้จากการแสดงออกของยีนที่จำเพาะต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเช่น การแสดงออกของยีนรันซ์ 2 (*RUNX 2*) และจากลักษณะทางกายภาพ ได้แก่ การสร้างอัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase) และการสร้างโนดูล (bone nodule assay)

เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์สร้างกระดูก เซลล์จะเพิ่มการแสดงออกของยีน รันรีเลตเทด ทรานสคริปชัน แฟกเตอร์ 2 หรือรันซ์ 2 (Runt-related transcription factor 2, *RUNX 2* หรือมีชื่อเรียกอื่นเป็น *AML3*, *CBFA1*, *PEBP2 α A*) ซึ่งเป็นทรานสคริปชัน แฟกเตอร์ที่มีความ

จำเป็นอย่างมากในการแสดงออกของจีนที่สร้างเมทริกซ์ของกระดูก เช่น จีนออสทีโอแคลซิน (*OSTEOCALCIN*) (51) และจีนโบน ไซอะโลโปรตีน (*BONE SIALOPROTEIN*) (52) มีการศึกษาในหนูที่ไม่จันรันซ์ 2 (*Runt2^{-/-}*) พบว่าไม่มีการสร้างกระดูกตั้งแต่ในช่วงเป็นเอ็มบริโอ (embryo) (53) และการศึกษาในหนูที่ตัดต่อจันรันซ์ 2 ออกพบว่า มีการสร้างกระดูกอ่อนในระยะแรกแต่ไม่มีการสะสมแร่ธาตุ ความบกพร่องของจีนนี้ในมนุษย์แบบ heterozygous จะทำให้เกิดเป็นกลุ่มอาการ cleidocranial dysplasia (54, 55) โดยกระดูกของผู้ป่วยจะมีการสะสมของแร่ธาตุที่ลดลง และกระดูกบางขึ้นหายไปเนื่องจากไม่มีการพัฒนาเช่นเดียวกับที่พบในหนูทดลอง มีการศึกษาพบว่าเมื่อมีฮอร์โมนกลูโคคorticoid จะเพิ่มปริมาณโปรตีนรันซ์ 2 และการทำงานของ DNA binding activity ในเซลล์สร้างกระดูกจากมนุษย์แต่ไม่พบการเพิ่มปริมาณในหนู การแสดงออกของเมเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอของรันซ์ 2 อยู่ในระดับคงที่ในเซลล์สร้างกระดูก แต่ในระยะหลังเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์หรือเริ่มสะสมแร่ธาตุจะมีการแสดงออกเพิ่มขึ้น การพิสูจน์เอกลักษณ์ของเซลล์สร้างกระดูกจึงควรทำในระยะดังกล่าว (56)

นอกจาก รันซ์ 2 แล้ว เซลล์สร้างกระดูกยังมีการสังเคราะห์ทรานสคริปชัน แฟกเตอร์ที่จำเพาะอื่น ๆ ที่สำคัญ ได้แก่ ออสเทริก (OSTERIX, *OSX* มีชื่อเรียกอื่นเป็น SP7) เป็นทรานสคริปชัน แฟกเตอร์ที่ส่งผลให้มีการทำงานของอัลคาไลน์ ฟอสฟาเตสโดยศึกษาในเซลล์สร้างกล้ามเนื้อของหนู (C2C12) และส่งผลให้มีการสะสมแร่ธาตุ (calcification) (57) มีการศึกษาในหนูที่ตัดต่อจีนออสเทริกออก แต่ยังคงมีจันรันซ์ 2 ส่งผลให้หนูไม่มีการสร้างกระดูกและไม่มีเซลล์สร้างกระดูก และศึกษาในกรณีที่หนูที่ถูกตัดต่อจันรันซ์ 2 ออกพบว่าจะไม่มีการแสดงออกของจีนออสเทริก นั่นคือการทำงานของออสเทริกเป็นวิถีสัญญาณที่อยู่ขึ้นต่ำกว่า (downstream) รันซ์ 2 เพื่อเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์สร้างกระดูก (58) แต่บางการศึกษาพบว่าแม้ตัดต่อจันรันซ์ 2 ออก ก็มีวิถีสัญญาณจาก สแมด ซิกเนลลิง (SMAD signaling) หรือจากโบนมอร์โฟเจเนติก โปรตีน 2 ซิกเนลลิงหรือบีเอ็มพี 2 ซิกเนลลิง (BONE MORPHOGENETIC PROTEIN 2 signaling, BMP2 signaling) ทำให้กระตุ้นการแสดงออกของจีนออสเทริก จึงสรุปได้ว่ากลไกควบคุมออสเทริกผ่านได้ทั้งทางรันซ์ 2 หรือ ไม่ผ่านรันซ์ 2 (57) อย่างไรก็ตามการแสดงออกของจีนออสเทริกสามารถใช้ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเซลล์ และพิสูจน์เอกลักษณ์ของเซลล์สร้างกระดูก

การสร้างอัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เซลล์สร้างกระดูกสังเคราะห์ขึ้นในระยะเริ่มต้นของการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและระยะสะสมแร่ธาตุที่หลั่งออกนอกผิวเซลล์ (49) โดยเป็นปัจจัยหนึ่งที่ช่วยกระตุ้นให้เกิดการสะสมผลึกของแคลเซียม ฟอสเฟตในถุงน้ำในเซลล์ (shed membrane-limited matrix vesicle) และจากนั้นจึงหลั่งออกนอกเซลล์เป็นออสติอยด์ (osteoid, collagenous extracellular matrix) (59) เอนไซม์เป็นส่วนสำคัญในการสร้างเป็นไฮดรอกซีอะพา

ไทด์ (hydroxyapatite) ในการวัดการทำงานของเอนไซม์นี้อัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส ควรทำการวัดเมื่อเซลล์หยุดแบ่งตัวและเริ่มมีการพัฒนาในระยะแรก (early differentiation) โดยใช้สารตั้งต้น (substrate) ที่ทำปฏิกิริยาเฉพาะต่อเอนไซม์ดังกล่าว เช่น nitro-blue tetrazolium and 5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate (NBT-BCIP) เพื่อให้เห็นลักษณะทางกายภาพของเอนไซม์ หลังจากเซลล์สร้างกระดูกเจริญเติบโตเต็มที่จะมีการฝังตัวอยู่ในเมทริกซ์ที่หลั่งออกมาและมีการสะสมแร่ธาตุซึ่งเกิดเป็นลักษณะโนดูล (bone nodule) ในระยะนี้สามารถวัดการสร้างโนดูลได้ โดยการวัดการสร้างโนดูลเป็นการวัดผลผลิตและการสะสมของสารประกอบแคลเซียมจากเซลล์สร้างกระดูกที่เจริญเติบโตเต็มที่ (49)

6. สมุนไพรข่อย

ข่อยเป็นพืชในตระกูลโมราซีอี (Moraceae) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่าสเตรบลัส แอสเปอร (Streblus asper Lour.) หรือสเตรบลัสแลคเตสเซนส์ (Streblus lactescens Blanco) หรือ คาลิยัสแลคเตสเซนส์ (Carius lactescens Blanco) ข่อยเป็นไม้ต้นขนาดกลาง เป็นไม้ผลัดใบ สูงประมาณ 5-10 เมตร ลำต้นค่อนข้างคดงอ เป็นปุ่มปม ขึ้นเป็นต้นเดี่ยวหรือเป็นกลุ่ม เรือนยอดรูปทรงกลม กิ่งอ่อนมีขนสาก เปลือกต้นสีเทาขาว ขรุขระ เมื่อกรีดลำต้นและกิ่งจะมีน้ำยางสีขาวข้น ใบเป็นใบเดี่ยวรูปไข่ ปลายมนแหลม ขอบใบหยัก ผิวใบทั้งสองด้านมีขนสากเช่นเดียวกับที่กิ่งอ่อน ท้องใบสีจางกว่าหลังใบ ใบอ่อนสีเขียวอ่อน ใบแก่สีเขียวเข้ม ดอกออกเป็นช่อขนาดเล็ก ดอกเพศผู้และเพศเมียอยู่ต่างช่อกัน ดอกเพศผู้สีเขียวอ่อน ดอกเพศเมียสีเหลืองอ่อน ผลกลมเล็กมีสีเขียว ผลเมื่อสุกมีสีเหลือง เมล็ดกลมแข็งสีขาว มี 1 เมล็ด ข่อยพบได้ทั่ว ๆ ไปตามพื้นที่ราบ ป่าเบญจพรรณ ป่าเต็งรัง เจริญได้ดีในดินทุกชนิด ชอบแดดจัด ข่อยมีถิ่นกำเนิดในอินเดีย จีนตอนใต้ ตะวันออกของหมู่เกาะฟิลิปปินส์ มาเลเซีย พม่า ไทย (60)

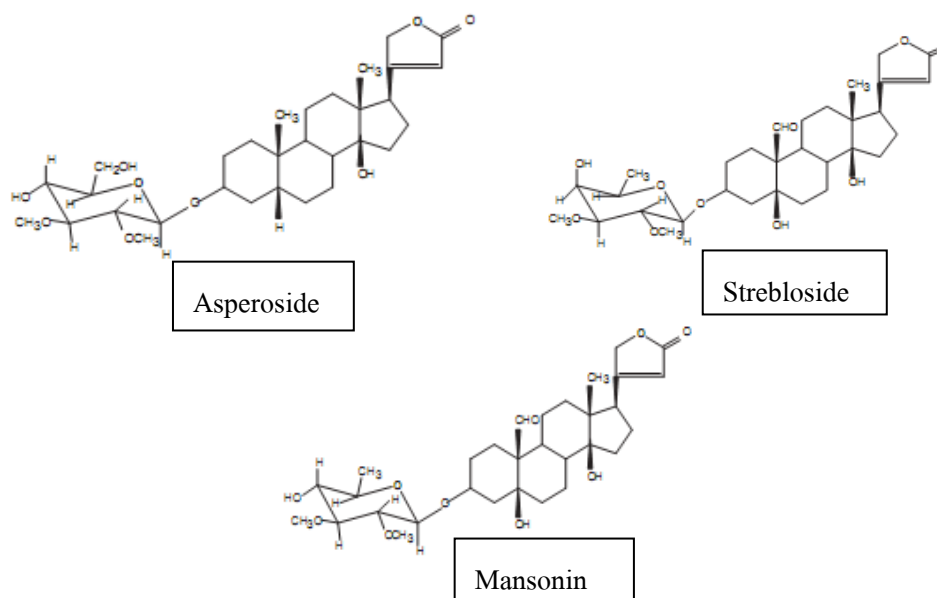
ข่อยเป็นพืชที่นำมาใช้ประโยชน์ในด้านสมุนไพร เช่น อินเดียใช้น้ำต้มจากเปลือกข่อยเป็นยาแก้ไข้ โรคบิด ท้องร่วง รักษาไช้นัส และแก้พิษงู ยางจากต้นข่อยสามารถนำเชื้อได้ รากใช้เป็นยาแก้บิดและใช้พอกบริเวณที่เกิดฝี ชาวฮินดูใช้กิ่งข่อยขบสีฟันทำให้ฟันทนทานและใช้ฆ่าแมลง น้ำต้มจากเปลือกใช้ทำความสะอาดแผลและรักษาโรคผิวหนัง ยางจากต้นข่อยใช้เป็นยาระงับประสาท และแก้ปวดบวม เมล็ดใช้แก้ท้องร่วง ริดสีดวง และเลือดกำเดา รากใช้แก้ลมบ้าหมู น้ำสกัดจากข่อยใช้เป็นยารักษาเชื้อและช่วยกระตุ้นการหดตัวของกล้ามเนื้อ นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติยับยั้งการเกิดมะเร็งอีกด้วย ในภาคเหนือของไทยใช้ใบข่อยอบไฟให้เหลืองกรอบ ชงน้ำต่างใบชา เพื่อใช้เป็นยาระบายอ่อน ๆ ขับปัสสาวะ แก้ไตพิการและเป็นยาบำรุงหัวใจ เมล็ดรับประทานเป็นยาอายุวัฒนะ บำรุงธาตุ เจริญอาหาร แก้ท้องอืดท้องเฟ้อและขับลม เปลือกต้นข่อยแก้พิษในกระดูกและเส้นเอ็น

โรคผิวหนังและริดสีดวงทวาร เนื้อต้นข่อยแก้ริดสีดวงจมูก รากต้นข่อยช่วยรักษาบาดแผลให้แห้ง นอกจากนี้ น้ำยางต้นข่อยผสมเกลือใส่ฟันหรือถูบริเวณที่ปวดฟันหรือเหงือกบวมจะแก้อาการเจ็บปวดนี้ได้ (61-63)

สารเคมีสำคัญที่พบในข่อยจะแตกต่างกันไปตามวิธีสกัด ในใบข่อยที่ทำการสกัดด้วยไดเอทิลอีเทอร์และโครมาโตกราฟี สารเคมีที่พบ (20) ได้แก่

- 6.1 แอสเปอร์โรไซด์ (asperoside) สูตรโมเลกุล $C_{31}H_{48}O_9$ มีชื่อทางเคมีว่า 3-digitocigennin-2, 3-di-O-methy-D-glycopyranoside
- 6.2 สเตรปโบลไซด์ (strebloside) สูตรโมเลกุล $C_{31}H_{46}O_{10}$ มีชื่อทางเคมีว่า 3-strophanhidin-2, 3-di-O-methy-D-fucopyranoside
- 6.3 คาลาโลไซด์ สูตรโมเลกุล $C_{31}H_{48}O_{10}$
- 6.4 อินโครไซด์ สูตรโมเลกุล $C_{31}H_{48}O_{10}$
- 6.5 ลักคโนไซด์ สูตรโมเลกุล $C_{31}H_{48}O_{10}$

นอกจากนี้ยังมีสารที่ยังวิเคราะห์ไม่ได้อีกหลายชนิด ซึ่งมีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{31}H_{48}O_{10}$, $C_{31}H_{46}O_{10}$ ส่วนในการสกัดกิ่งข่อยมีส่วนประกอบที่สำคัญคือแอสเปอร์โรไซด์ สเตรปโบลไซด์ แมนโซนิน (mansonin) (64) ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 โครงสร้างของส่วนประกอบในสารสกัดจากกิ่งข่อย (นำมาจาก Rastogi, 2006) (64)

มีการศึกษาถึงความสามารถของสารสกัดจากใบข่อยซึ่งสกัดในเอทานอลร้อยละ 50 พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญและทำลายเชื้อในกลุ่มสเตรปโตคอคคัสสปีชีส์ (*Streptococcus species*)

ได้แก่ เชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ (*Streptococcus mutans*) และเชื้อสเตรปโตคอคคัส ซาลิวาเรียส (*Streptococcus salivarius*) ซึ่งเป็นเชื้อที่มีบทบาทสำคัญต่อการเกิดโรคฟันผุ นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อในคลองรากฟันทั้งชนิดที่ใช้และไม่ใช้ออกซิเจนในการดำรงชีวิต รวมถึงเชื้อก่อโรคปริทันต์อักเสบในช่องปาก ได้แก่ เชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจีวาลิส และแอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทม โคมิแทนส์ พบว่าความเข้มข้นของสารสกัดจากใบช่อยที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทม โคมิแทนส์ (minimal inhibitory concentration, MIC) มีค่าเท่ากับ 7.81 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นของสารสกัดช่อยที่น้อยที่สุดที่สามารถทำลายเชื้อแอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทม โคมิแทนส์ (minimum bactericidal concentration, MBC) มีค่าเท่ากับ 15.62 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยไม่มีฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์หรือเป็นพิษ (14, 16, 20, 65-68) เมื่อเปรียบเทียบกับพืชอื่น ๆ ที่มีรายงานการใช้เพื่อลดแบคทีเรียในช่องปาก เช่น ใบฝรั่ง ใบชาจีน พบว่าช่อยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ อย่างมีนัยสำคัญและสามารถลดการเจริญของเชื้อนี้ได้มากกว่าพืชชนิดอื่น (69) จากการศึกษายังพบว่าสารสกัดจากใบช่อยในน้ำเกลือมีเลกตินเป็นองค์ประกอบ ซึ่งเลกตินทำให้เชื้อจุลินทรีย์เกาะกลุ่มกันเอง ดังนั้นจึงทำให้เชื้อไม่สามารถเกาะที่ผิวฟัน และหลุดออกขณะแปรงฟันได้ โดยวิธีนี้สามารถลดเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคฟันผุและโรคปริทันต์ได้ และยังพบว่าช่อยมีคุณสมบัติในการลดการยึดเกาะของเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ (*Candida albicans*) ต่อเซลล์เยื่อบุผิวกระพุ้งแก้มและฐานฟันเทียมชนิดอะคริลิก (denture acrylic) ได้ (70, 71)

มีการศึกษาโดยนำสารสกัดจากใบช่อยมาทำเป็นผลิตภัณฑ์ คือ น้ำยาบ้วนปากและเจล ซึ่งสารสกัดจากใบช่อยในรูปน้ำยาบ้วนปากช่วยลดการอักเสบของโรคเหงือกอักเสบแต่ไม่มีผลการเพิ่มของแผ่นคราบจุลินทรีย์ (17) ส่วนในรูปเจลผสมสารสกัดจากใบช่อยนำมาใช้ร่วมกับการรักษาโรคปริทันต์อักเสบโดยผ่านการทดสอบความปลอดภัยในการใช้ทางคลินิกในกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดีจำนวน 40 คน โดยได้ทำการทดสอบการเกิดปฏิกิริยาของเจลผสมสารสกัดจากใบช่อยกับผิวหนัง (skin irritation test) พบว่าค่าความแดงของผิวหนังบริเวณที่ทดสอบเปรียบเทียบกับผิวหนังปกติพบความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และไม่พบความผิดปกติหรืออาการไม่พึงประสงค์ใด ๆ เกิดขึ้นกับอาสาสมัคร นอกจากนี้เมื่อทดสอบความปลอดภัยทางคลินิกโดยการใส่เจลผสมสารสกัดจากใบช่อยความเข้มข้นร้อยละ 24 ลงในร่องเหงือกของอาสาสมัครที่ไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบและมีสุขภาพแข็งแรงภายในช่วงเวลา 6 สัปดาห์ ผลการศึกษายืนยันว่า ไม่พบอาการข้างเคียงหรืออาการไม่พึงประสงค์ใด ๆ ในผู้ป่วย (20) และปลอดภัยเมื่อใช้ในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังโดยไม่มีอาการข้างเคียงใด ๆ ซึ่งเจลผสมสารสกัดจากใบช่อยสามารถลดเชื้อพอร์ไฟโร

โมแนส จิงจิวิลิส ได้อย่างมีนัยสำคัญที่สัปดาห์ที่ 6 และ 12 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ซูดหินน้ำลาย และเกลารากฟันเพียงอย่างเดียว (19)

การศึกษาผลของข้อในการด้านการอักเสบในระดับโมเลกุลนั้น ในปัจจุบันมีเพียง การศึกษาการแสดงออกของจิ้นไซโคลออกซีจีเนส-2 หรือคอก 2 (cyclooxygenase-2, COX-2) และ อินเตอร์ลิวคิน-1เบต้าจากเซลล์โมโนไซต์ (21) และเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก (22) ซึ่งพบว่า สารสกัด จากใบข่อยสามารถยับยั้งการแสดงออกของจิ้นคอก-2 และอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้าได้ และพบว่าข่อย มีผลทำให้มีการแสดงออกของจิ้นโอพีจีในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ซึ่งคอก-2 อินเตอร์ลิวคิน-1เบต้า และ โอพีจีเป็นจิ้นที่เกี่ยวข้องในกระบวนการละลายตัวของกระดูกเบ้าฟัน ซึ่งเป็นอาการที่สำคัญอย่างหนึ่งของโรคปริทันต์อักเสบ

7. การรักษาโรคปริทันต์อักเสบ

ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไปว่าพยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์อักเสบขึ้นอยู่กับความ สมดุลของปัจจัยต่างๆ ทั้งปัจจัยทางด้านเชื้อก่อโรคและปัจจัยทางระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย การ รักษาโรคปริทันต์อักเสบมีจุดประสงค์ คือ การหยุดยั้งพยาธิสภาพของโรค การป้องกันการกลับเป็น ซ้ำ การคงสภาพของอวัยวะปริทันต์ การซ่อมแซม และการสร้างอวัยวะปริทันต์ใหม่หรือการเจริญ ทดแทนอวัยวะปริทันต์ที่ถูกทำลาย โดยการกำจัดสาเหตุ คือ กำจัดเชื้อจุลินทรีย์และปัจจัยที่ส่งเสริม ความรุนแรงของเชื้อจุลินทรีย์ การควบคุมไม่ให้เกิดแผ่นคราบจุลินทรีย์ใหม่โดยการซูดหินน้ำลาย และเกลารากฟัน และ/หรือร่วมกับการใช้ยาขยับยั้งจุลินทรีย์รูปแบบต่างๆ ทั้งทางระบบและแบบ เฉพาะที่และการปรับระดับความสมดุลของระบบภูมิคุ้มกันโดยส่งเสริม ควบคุม หรือปรับเปลี่ยน การตอบสนองภูมิคุ้มกันของร่างกาย ได้แก่ การยับยั้งการสร้างเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส (matrix metalloproteinase) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อปริทันต์ (72, 73) การยับยั้งการสร้างสารการอักเสบ เช่น โพรสตาแกรนดิน (prostaglandin) ซึ่งเป็นสารอักเสบสำคัญ ที่ส่งผลให้เกิดการบวมแดงและกระตุ้นการละลายตัวของกระดูก โดยการใช้ยาขยับยั้งการอักเสบที่ ไม่ใช่สเตียรอยด์ (NSAID) (74)

ในปัจจุบันได้มีการศึกษามากมายเพื่อหาแนวทางการรักษาด้วยวิธีใหม่ๆ ซึ่งการรักษาที่มีผล ไปยับยั้งการทำงานของไซโตไคน์เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ได้รับ ความสนใจ โดยหลักการพื้นฐานของการ รักษาด้วยวิธีนี้ ได้แก่ การทำให้ไซโตไคน์หมดฤทธิ์ (neutralization of cytokine) การขัดขวางตัวรับ ไซโตไคน์ (blockage of cytokine receptor) และการกระตุ้นวิถีสัญญาณที่มีผลยับยั้งการอักเสบ (activation of anti-inflammatory pathway) ซึ่งการรักษาด้วยวิธีนี้ ได้แก่ การใช้ตัวรับต่อลอย (soluble receptor) ของไซโตไคน์อักเสบมาทำหน้าที่เป็นสารต้าน (antagonist) การทำงานของไซโต

ไคน์ การใช้แอนติบอดีต้านไซโตไคน์ (anti-cytokine antibody) และการรักษาด้วยจีน (gene therapy) โดยการถ่ายโอนจีนจากภายนอก (exogenous gene) เข้าไปในเซลล์เพื่อให้เซลล์มีการแสดงออกของจีนที่ต้องการ (75) นอกจากนี้การรักษาเพื่อยับยั้งการละลายตัวของกระดูกเบาพันธ์เป็นอีกวิธีหนึ่งที่มีการศึกษา โดยในปัจจุบันการค้นพบโอพีจี แรงค์แอล และแรงค์ได้เป็นการเปิดประตูการศึกษาวิจัยในด้านกระบวนการสร้างและกระตุ้นเซลล์สลายกระดูก และวิธีการรักษาที่มีผลในการยับยั้งการละลายตัวของกระดูกเบาพันธ์ที่เกิดจากการทำงานของวิถีสัญญาณนี้ ได้แก่ การใช้โอพีจีรีคอมบิแนนท์ (recombinant OPG) การใช้แอนติบอดีต้านแรงค์แอล การไปควบคุมที่ระดับตัวรับหรือการส่งสัญญาณของแรงค์และแรงค์แอล เป็นต้น (37) ซึ่งสารสกัดจากไขข้อยังมีผลทำให้มีการแสดงออกของจีนโอพีจีในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ดังนั้นสารสกัดจากไขข้ออาจมีผลเพิ่มการแสดงออกของจีนโอพีจีในเซลล์สร้างกระดูกปฐมนิคมของมนุษย์ อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาผลของสารสกัดจากไขข้อต่อการแสดงออกของจีนแรงค์แอลและโอพีจีในเซลล์สร้างกระดูกปฐมนิคมของมนุษย์ เมื่อถูกกระตุ้นด้วยส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อฟอร์โฟโรโมแนส จึงจิวาลิส

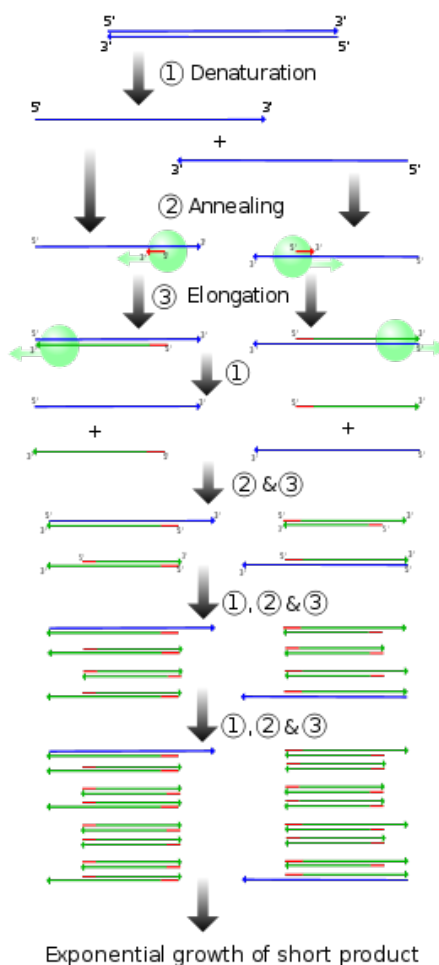
8. การตรวจหาการแสดงออกของจีนโดยวิธี เรียล ไทม์ โพลีเมอเรส เซน รีแอคชั่น (Real Time Polymerase Chain Reaction) (76-79)

โพลีเมอเรส เซน รีแอคชั่นหรือพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR) อาศัยหลักการของดีเอ็นเอ เพรพลิเคชัน (DNA replication) ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของ ดีเอ็นเอแม่แบบ (template DNA) โดยมีการทำปฏิกิริยาอย่างต่อเนื่องกันเป็นลูกโซ่ ทำให้ได้ดีเอ็นเอสายใหม่เพิ่มขึ้นเป็นล้านเท่าในหลอดทดลอง ในการเร่งปฏิกิริยาให้สายดีเอ็นเอยาวออกไปจะใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอ โพลีเมอเรส (DNA polymerase) ซึ่งจะใช้เป็นแทค โพลีเมอเรส (Taq polymerase) ที่สามารถทนความร้อนได้สูงโดยไม่เสียคุณสมบัติของเอนไซม์ ซึ่งสกัดมาจากแบคทีเรีย (*Thermus aquaticus*) ที่เจริญเติบโตได้ในบ่อน้ำพุร้อน ในการต่อสายดีเอ็นเอจะเลือกจับเอานิวคลีโอไทด์ (deoxynucleotide triphosphate, dNTPs) ตัวใดตัวหนึ่งใน 4 ชนิด คือ ดีเอทีพี ดีจีทีพี ดีซีทีพี ดีทีทีพี (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) เข้ามาต่อเป็นเบสคู่สมกับดีเอ็นเอสายแม่แบบ ส่วนประกอบต่างๆ ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมีดังนี้ คือ ดีเอ็นเอแม่แบบ, เอนไซม์ดีเอ็นเอ โพลีเมอเรส, นิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิด, โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ (Oligonucleotide primer) อย่างน้อย 1 คู่ และบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ซึ่งต้องอาศัยปฏิกิริยาที่ต่อเนื่องหลายๆ รอบซึ่งแต่ละรอบจะประกอบด้วย 3 ขั้นตอนได้แก่

- 1) ดีเนเจอร์ชัน (Denaturation) เป็นขั้นตอนการทำให้ดีเอ็นเอสายคู่แยกจากกันเป็นสายเดี่ยว โดยอาศัยความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 90 – 95 องศาเซลเซียส

- 2) ไพรมเมอร์ อะนัลลิง (Primer annealing) เป็นขั้นตอนที่มีการลดอุณหภูมิลงมาที่ประมาณ 45-60 องศาเซลเซียส เพื่อให้ไพรมเมอร์ 2 สาย เข้าไปจับคู่สมบนดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็นแม่แบบ
- 3) โปรดัค เอ็กเทนชัน (Product extension) เป็นขั้นตอนการขยายสายดีเอ็นเอโดยการต่อลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าที่ปลายสามไพรม์-ไฮดรอกซี(3'-OH) ของไพรมเมอร์ แล้วมีการขยายสายดีเอ็นเอสายใหม่จากทิศทาง 5' ไป 3' โดยอาศัยเอนไซม์ดีเอ็นเอ โพลีเมอเรส ที่อุณหภูมิประมาณ 70-75 องศาเซลเซียส

ถ้าพิจารณาสายดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้น โดยเริ่มจากสายดีเอ็นเอแม่แบบ 1 คู่ เมื่อสิ้นสุดรอบที่ 1 จะได้สายดีเอ็นเอเป็น 2 คู่ เมื่อทำเช่นนี้หลายๆ รอบของพีซีอาร์ ดีเอ็นเอก็จะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าของทุกๆ รอบลักษณะทวีคูณเป็น 2^n เมื่อ n เป็นจำนวนรอบของปฏิกิริยา ดังนั้นถ้าปฏิกิริยาดำเนินไปได้ 20 รอบ จะได้ดีเอ็นเอ 2^{20} ชุด หรือมีปริมาณของดีเอ็นเอประมาณ 1 ล้านเท่า ดังภาพที่ 5



ภาพที่ 5 หลักการของโพลีเมอเรส เชนรีแอคชัน หรือ พีซีอาร์ (80)

ในการตรวจหาการแสดงออกของจีน สามารถประยุกต์หลักการพีซีอาร์ เป็นขยายสัญญาณของจีนที่แสดงออกจากเอ็ม-อาร์เอ็นเอโดยใช้ซีดีเอ็นเอ (cDNA) เป็นแม่แบบของกระบวนการพีซีอาร์ การสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอ ได้จากกระบวนการ รีเวอร์สทรานสคริปชัน โพลีเมอเรส เช่น รีแอกชัน (Reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) โดยหลักการ คือ ทำการสกัดอาร์เอ็นเอให้มีความบริสุทธิ์ จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอนการสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอ (cDNA) โดยกระบวนการรีเวอร์สทรานสคริปชัน อาศัยเอนไซม์รีเวอร์สทรานสคริปเทส (enzyme reverse transcriptase, RT) เอนไซม์นี้สามารถสร้างสายดีเอ็นเอได้ทั้งจากแม่พิมพ์ที่เป็นดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ โดยทั่วไปรีเวอร์สทรานสคริปชันที่ใช้ในงานซีดีเอ็นเอเป็นเอนไซม์ที่ได้มาจากไวรัส (retroviruses) สองตัว คือ เอเวียน ไมอีโลบลาสโตซิส (Avian myeloblastosis, AMV) และโมโลนี มิวรีน ลิวคีเมีย ไวรัส (Moloney murine leukemia virus, MMLV) ซึ่งมีประสิทธิภาพในการสร้างซีดีเอ็นเอไม่แตกต่างกัน จากนั้นเลือกไพรเมอร์ที่จะใช้มี 3 แบบ คือ ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ (gene specific primer, GSP) ซึ่งจำเพาะในการสร้างซีดีเอ็นเอที่สุด โดยต้องรู้ลำดับเบสของอาร์เอ็นเอแม่แบบเพื่อออกแบบให้จำเพาะ ไพรเมอร์โอลิโก ดีที (Oligo dT primer) มีความจำเพาะต่ออาร์เอ็นเอแม่แบบที่มีโพลี เอ (poly A) ส่วนไพรเมอร์แรนดอม เฮกซะเมอร์ (Random hexamers) ไม่มีความจำเพาะจึงสามารถเข้าจับกับอาร์เอ็นเอแม่แบบทั้งหมดได้แก่ อาร์อาร์เอ็นเอ (rRNA), เอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) และทีอาร์เอ็นเอ (tRNA) จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอนการทำพีซีอาร์ โดยอาศัยแม่แบบจากซีดีเอ็นเอเพื่อสร้างสายดีเอ็นเอขึ้นมาใหม่มีลักษณะรูปแบบการทำเหมือนพีซีอาร์แบบดั้งเดิม (conventional PCR) และสุดท้ายจะได้สายดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนมากมายจากสายอาร์เอ็นเอตั้งต้น

พีซีอาร์แบบดั้งเดิมมีข้อจำกัดคือไม่สามารถบอกปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นได้ (quantitative analysis) (81) แม้ว่าจะมีการพัฒนารูปแบบการวิเคราะห์เชิงปริมาณแบบต่างๆ (82) แต่วิเคราะห์ได้เพียงว่ามีดีเอ็นเอแม่แบบอยู่ในสิ่งส่งตรวจหรือไม่ จึงเป็นการหาปริมาณในลักษณะเซมิ-ควอนติเตตีฟ (semi- quantitative) โดยจะตรวจผลผลิตพีซีอาร์หลังจากปฏิกิริยาการเพิ่มขยายสิ้นสุด แต่ส่วนใหญ่วิธีการจะค่อนข้างยุ่งยากไม่เหมาะสำหรับการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมาก เนื่องจากมีโอกาสที่จะเกิดความผิดพลาดในการทำ เกิดความไม่แม่นยำถูกต้อง และยังใช้เวลานาน โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอใช้เวลา 2 -3 ชั่วโมง จากนั้นนำมาตรวจวิเคราะห์ผลด้วยการใช้กระแสไฟฟ้าเหนี่ยวนำให้เคลื่อนตัวผ่านแผ่นวุ้น (agarose gel electrophoresis) โดยแผ่นวุ้นจะถูกนำมาย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide, EtBr) ซึ่งจะแทรกตัวเข้าไปอยู่ระหว่างสายคู่ของดีเอ็นเอ เมื่อถูกกระตุ้น (excite) ด้วยแสงอุลตราไวโอเลตหรือยูวี (Ultraviolet, UV) สามารถเรืองแสง (emit) เป็นแถบให้มองเห็นหรือถ่ายภาพได้ซึ่งใช้เวลานาน 1-2 ชั่วโมง ซึ่งพีซีอาร์แบบดั้งเดิมสามารถแยกความแตกต่างของตัวอย่างที่แตกต่างกัน 10 เท่าขึ้นไป (83) จากลักษณะการตรวจ

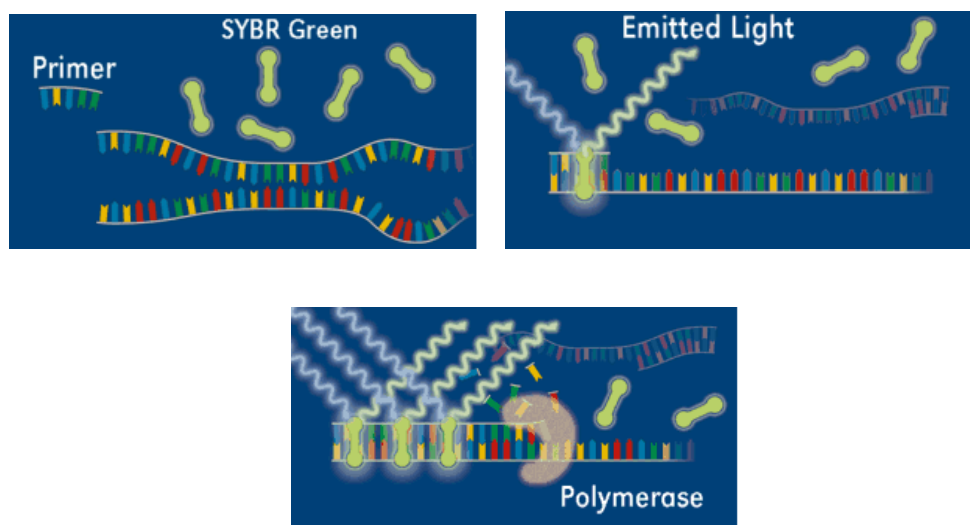
วิเคราะห์ดังกล่าวยังก่อให้เกิดการฟุ้งกระจายของผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) ซึ่งส่งผลให้เกิดการปนเปื้อนของผลผลิตพีซีอาร์ครั้งก่อน (carry over contamination) นำไปสู่การเกิดผลบวกเท็จ (false positive) (84)

จากข้อจำกัดพีซีอาร์แบบดั้งเดิมดังกล่าวจึงพัฒนาเทคนิคเป็น เรียล ไทม์ พีซีอาร์ (real time PCR หรือ kinetics PCR หรือ Quantitative real time PCR) ขึ้น (85) โดยพัฒนาเทคโนโลยีในการตรวจหาผลผลิตพีซีอาร์ในสารละลายโดยใช้สารเรืองแสง (fluorescence reporters) ต่างๆ และการพัฒนาเครื่องปรับเปลี่ยนอุณหภูมิอัตโนมัติ (thermocycler) ซึ่งแต่เดิมเป็นแค่เครื่องควบคุมอุณหภูมิขึ้นลงตามระยะเวลาที่กำหนด มาเป็นเครื่องปรับเปลี่ยนอุณหภูมิอัตโนมัติแบบเรียล ไทม์ (real time thermocycler) โดยเพิ่มส่วนที่เป็นแหล่งกำเนิดแสงเพื่อไปก่อให้เกิดการเรืองแสงของผลผลิตพีซีอาร์และส่วนตรวจวัดการเรืองแสงที่เกิดจากผลผลิตพีซีอาร์ในหลอดปฏิกิริยา ดังนั้นการทำเรียล ไทม์ พีซีอาร์ จึงเป็นการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอ โดยที่เราสามารถตรวจวัดปริมาณผลผลิตพีซีอาร์ที่เกิดขึ้นจริง ณ เวลานั้นๆ ซึ่งเป็นเทคนิคที่ให้ความรวดเร็ว แม่นยำ และใช้เวลาน้อย และยังสามารถแยกความแตกต่างของตัวอย่างที่แตกต่างกัน 2 เท่าขึ้นไป (83) กรรมวิธีในการตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นที่ระยะเวลาต่างๆนั้นทำได้หลายวิธี ได้แก่

8.1 การตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้สีไซเบอร์กรีน 1 (SYBR Green I Dye) (86, 87)

สีไซเบอร์กรีน 1 เป็นสารเรืองแสง (Fluorochrome) ประเภทหนึ่งที่สามารถเข้าจับกับร่องขนาดเล็ก (minor groove) ของดีเอ็นเอสายคู่เท่านั้น โดยขั้นตอนของการคลายเกลียวของสายดีเอ็นเอสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยวนั้นสีไซเบอร์กรีน 1 จะไม่สามารถจับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวนั้นได้ เมื่อเริ่มมีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ สีไซเบอร์กรีน 1 จะแทรกตัวเข้าไปในดีเอ็นเอสายคู่ เมื่อสีไซเบอร์กรีน 1 เกาะกับดีเอ็นเอสายคู่และถูกกระตุ้นด้วยแสงยูวี จะมีการคายพลังงาน (emission) ออกมาในรูปของแสงในช่วงคลื่นยาวขึ้น และเมื่อรอบของปฏิกิริยากลับมาถึงช่วงการคลายเกลียวอีกครั้ง สีไซเบอร์กรีน 1 จะหลุดออกจากสายดีเอ็นเอทำให้การเรืองแสงลดลงอีกครั้ง (ดังภาพที่ 6) การวัดการเรืองแสงสามารถตรวจจับได้ด้วยตัวรับสัญญาณแสง (optical filter) ที่ติดตั้งอยู่กับเครื่องปรับเปลี่ยนอุณหภูมิอัตโนมัติแบบเรียล ไทม์โดยจะทำเมื่อสิ้นสุดการเพิ่มปริมาณในแต่ละรอบ ซึ่งการเรืองแสงที่เพิ่มขึ้นนี้บ่งบอกปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้น แม้ว่าการจับของสีไซเบอร์กรีน 1 กับดีเอ็นเอสายคู่เป็นแบบไม่จำเพาะ เราสามารถแยกสัญญาณการเรืองแสง (fluorescence signal) ที่เกิดจากไพเมอร์ไดเมอร์ และ/หรือ ผลผลิตที่ไม่เฉพาะอื่น ๆ (primer-dimer, non-specific products) ออกจากผลผลิตที่เฉพาะ (specific amplified product) ได้ด้วยการเปรียบเทียบค่า T_m โดยค่า T_m เป็นคุณสมบัติเฉพาะของดีเอ็นเอสายคู่แต่ละสายแปรผันโดยตรงกับร้อยละปริมาณของเบส G และ C และความยาวของ

ดีเอ็นเอสายคู่ การหาค่า T_m จากเครื่องปรับเปลี่ยนอุณหภูมิอัตโนมัติแบบเรียล ไทม์ สามารถวิเคราะห์ได้จาก Melting curve (88) โดยสัญญาณการเรืองแสงที่ลดลงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง พวกไพเมอร์ไคเมอร์ และ/หรือ ผลผลิตที่ไม่เฉพาะ จะมีค่า T_m แตกต่างจากผลผลิตที่เฉพาะ เช่น T_m ของพวก ไพเมอร์ไคเมอร์ จะมีค่าต่ำ เนื่องจากมีขนาดสั้น (15-30 bp) ต่างจากผลผลิตของสายดีเอ็นเอ (amplified DNA) ซึ่งจะมีขนาดยาวกว่า (>100 bp) และมีค่า T_m ที่สูงกว่า

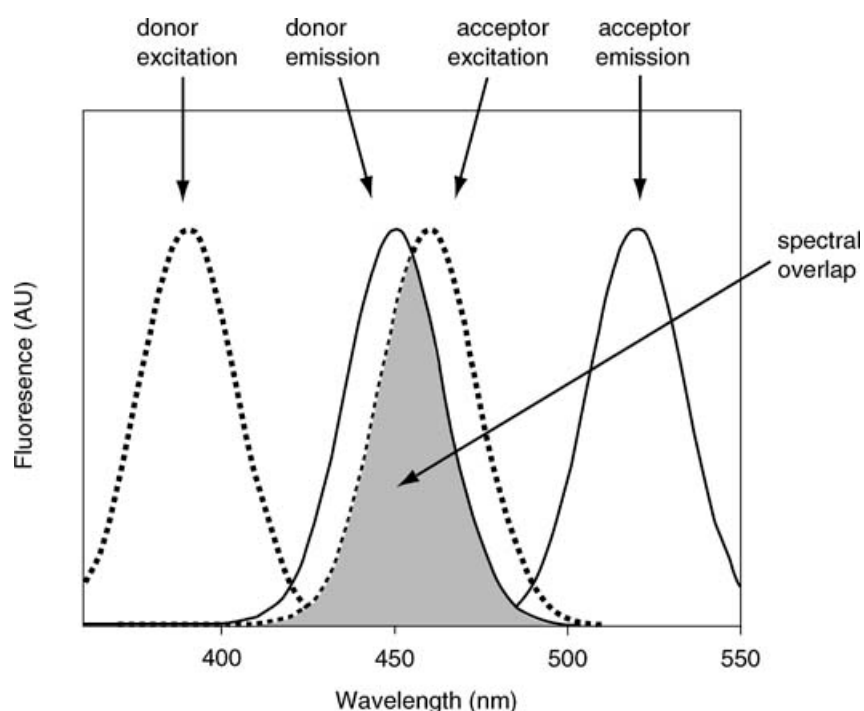


ภาพที่ 6 การตรวจวัดผลผลิตพีซีอาร์ด้วยสีเขียวเบอร์กรีน 1 ในช่วงของการดีเนเจอร์ชัน เพื่อสายดีเอ็นเอสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยวสีเขียวเบอร์กรีน 1 ยังไม่สามารถเข้าไปจับกับสายดีเอ็นเอสายเดี่ยวได้ เมื่อไพเมอร์เข้าจับและสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ สีเขียวเบอร์กรีน 1 จะเริ่มสอดแทรกเข้าสู่สายคู่ของดีเอ็นเอ และจะมีการเรืองแสง (emission) เมื่อถูกกระตุ้น (excite) ด้วยแสง ในช่วง DNA elongation จะมี สีเขียวเบอร์กรีน 1 เข้าแทรกในดีเอ็นเอสายเป็นจำนวนมาก เราสามารถตรวจจับการเรืองแสงอย่างต่อเนื่องแบบเรียลไทม์ได้ และเมื่อรอบพีซีอาร์เวียนกลับมาสู่ช่วงของการดีเนเจอร์ชัน สีเขียวเบอร์กรีน 1 จะหลุดออกจากสายดีเอ็นเอ การเรืองแสงจะลดลง (89, 90)

8.2 การตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้โพรบติดฉลากสารเรืองแสง (fluorochrome probe)

เป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูงอาศัยเทคโนโลยีของ Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) (91) โดยวิธีนี้เป็นการถ่ายทอดพลังงานจากสี (dye) ที่มีพลังงานสูงไปสู่โมเลกุลสีใกล้เคียงที่มีพลังงานต่ำกว่า จึงนำโพรบซึ่งมีความจำเพาะ (specific Probe) กับดีเอ็นเอแม่แบบมาติดฉลากสารเรืองแสง โดยนำสารเรืองแสง 2 ประเภทติดฉลากเข้ากับสายของโพรบ เมื่อสารเรืองแสงทั้ง 2 อยู่ใกล้กันในระยะ 2-5 เบสเพอร์ (basepair) จะสามารถถ่ายเทพลังงานจาก donor มาสู่ acceptor โดย

ไม่สูญเสียพลังงานออกมสู่ระบบภายนอกในรูปของพลังงานแสงหรือความร้อน เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงพลังงานสูง สารเรืองแสงตัวแรกที่เรียกว่า Quencher dye จะดูดซับพลังงานเอาไว้ และถ่ายทอดพลังงานให้สารเรืองแสงตัวที่สองที่เรียกว่า Reporter dye เมื่อ reporter molecule ได้รับพลังงานจาก Quencher dye จะปลดปล่อยพลังงานออกมสู่ระบบภายนอกในรูปของแสง ซึ่งเราสามารถตรวจวัดได้ ดังภาพที่ 7

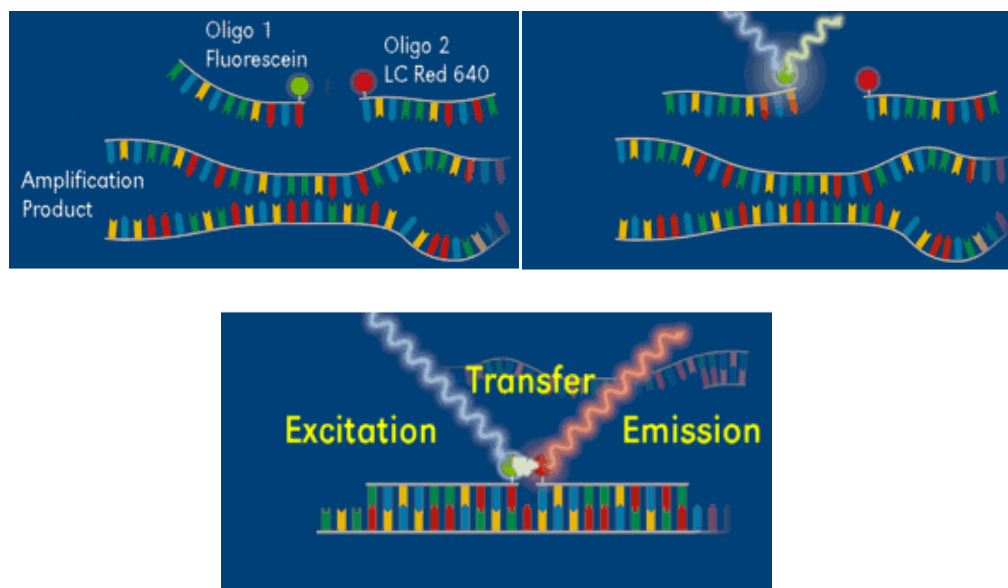


ภาพที่ 7 Fluorescent Resonance Energy Transfer (FRET) Fluorochrome ตัวแรกเราจะเรียกว่า Quencher fluorochrome (donor) จะดูดซับพลังงานเอาไว้ และถ่ายทอดพลังงานให้ Reporter fluorochrome (acceptor) โดยไม่สูญเสียพลังงานออกมสู่ระบบภายนอก เมื่อ reporter molecule ได้รับพลังงานจาก Quencher จะปลดปล่อยพลังงานออกมสู่ระบบภายนอกในรูปของแสง ซึ่งเราสามารถตรวจวัดได้ (90)

การติดฉลากสารเรืองแสงเข้ากับโปรบ เพื่อให้เครื่องปรับเปลี่ยนอุณหภูมิอัตโนมัติแบบเรียล ไทม์สามารถตรวจจับสัญญาณเรืองแสง (fluorescence signal) อันเกิดจากปฏิกิริยา FRET สามารถกระทำได้ในหลายลักษณะ ดังนี้

8.2.1 ตรวจสอบด้วยโพรบติดฉลากแบบไฮบริดไคเซชัน (Hybridization) (92)

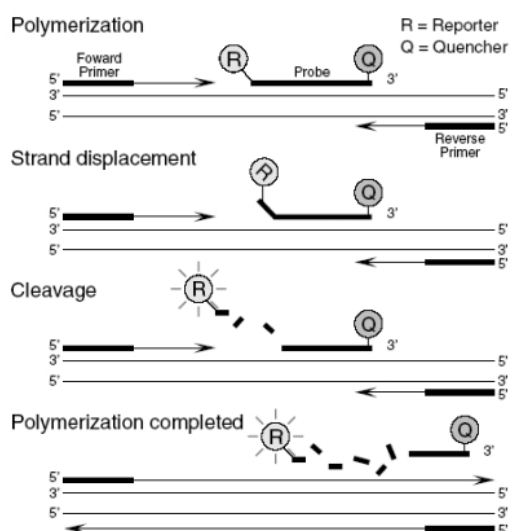
วิธีนี้ใช้โพรบ (Oligonucleotide Probe) สายสั้น 2 สาย สายแรกติดฉลากที่ปลาย 3' ด้วย Fluorescein ทำหน้าที่เป็น Quencher และสายที่สองติดฉลากที่ปลาย 5' ด้วย Red 640 หรือ Red 705 ทำหน้าที่เป็น Reporter dye โดยที่ปลาย 3' ของโพรบสายที่สองจะถูกปิดด้วยหมู่ฟอสเฟต (Phosphate Group) เพื่อไม่ให้สามารถทำหน้าที่เป็นไพรเมอร์ได้ เมื่อถึงขั้นตอนการอะนัลลิซิงในกระบวนการพีซีอาร์ โพรบทั้ง 2 สายจะเข้าจับคู่แบบหัวชนหาง (head-to-tail arrangement) เมื่อโพรบทั้งสองวางตัวใกล้กัน โพรบตัวแรกจะถ่ายเทพลังงานให้กับโพรบตัวที่สอง ทำให้โพรบตัวที่สองสามารถปล่อยแสงฟลูออเรสเซนส์สีแดงออกมาที่ความยาวคลื่นสูงขึ้น ซึ่งสามารถวัดปริมาณการเรืองแสงที่เปล่งออกมาได้ โดยปริมาณแสงดังกล่าวจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณดีเอ็นเอที่ถูกสร้างขึ้นในแต่ละรอบของปฏิกิริยา สัญญาณที่เกิดจากโพรบที่ไปจับคู่กับเป้าหมายที่ถูกต้องเท่านั้นที่จะทำให้เกิดการเรืองแสงที่ความยาวคลื่นที่ตรวจวัด ทำให้มีความจำเพาะมาก ดังแสดงในภาพที่ 8 โพรบติดฉลากแบบไฮบริดไคเซชันสามารถนำมาตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์เพื่อบ่งชี้ single point mutation หรือ single nucleotide polymorphism (SNP) ได้เป็นอย่างดี โดยเมื่อเพิ่มความร้อนขึ้นอย่างต่อเนื่อง โพรบที่จับกับดีเอ็นเอแม่แบบซึ่งมีเบสบางตำแหน่งไม่คู่สม (mismatch) จะหลุดตัวออกมาก่อนในช่วงอุณหภูมิที่ต่ำกว่า ในขณะที่โพรบซึ่งจับกับดีเอ็นเอแม่แบบที่มีเบสคู่สมกันทั้งหมด (perfect match) โพรบดังกล่าวจะหลุดตัวออกจากดีเอ็นเอแม่แบบในช่วงอุณหภูมิที่สูงกว่า



ภาพที่ 8 การใช้โพรบติดฉลากแบบไฮบริดไดเซชัน เพื่อตรวจวัดผลผลิตพีซีอาร์ในช่วงดีเนเจอร์ชัน จะไม่เกิด FRET ขึ้น เมื่อปฏิกิริยาดำเนินถึงช่วงอะนัลลิง (annealing) จะเกิด FRET ขึ้น สามารถตรวจวัดสัญญาณการเรืองแสงได้ (90)

8.2.2 ตรวจสอบด้วยโพรบติดฉลากแบบไฮโดรไลซิสหรือแทกแมน (Hydrolysis probe, Tagman probe) (93)

เป็นวิธีที่ใช้โพรบเส้นเดียว โดยปลาย 5' ของโพรบจะติดฉลาก Reporter dye ที่มีแสงฟลูออเรสเซนต์และภายในสายโพรบห่างจาก Reporter dye ไม่เกิน 5 เบสแพร์จะติดฉลากด้วย Quencher dye ซึ่ง Quencher dye นี้ ทำให้ Reporter dye ไม่สามารถเรืองแสงได้ เมื่อเกิดการไฮบริดไดเซชัน และ Reporter dye ถูกกระตุ้นด้วยแสง จะถ่ายเทพลังงานผ่านไปให้ Quencher dye (FRET) และเมื่อปฏิกิริยาถูกโพลีเมอเรสเข้าสู่ช่วงสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ให้ยาวขึ้น (elongation) เอนไซม์แทก โพลีเมอเรส จะทำการสร้างสายดีเอ็นเอมาจนถึงบริเวณที่ โพรบแทกแมนเกาะอยู่ โดยปลาย 5' ของเอนไซม์แทก โพลีเมอเรส ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น exonuclease ก็จะย่อยโพรบ ทำให้ Reporter dye หลุดออกจาก Quencher dye และคายพลังงานออกมาในรูปแสงได้เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงพลังงานสูง เอนไซม์แทก โพลีเมอเรสจะย่อยเฉพาะโพรบที่สามารถเข้าจับคู่แบบคู่สมกับดีเอ็นเอแม่แบบเท่านั้น ดังนั้นวิธีนี้จึงมีความจำเพาะสูงมาก อย่างไรก็ตามอุณหภูมิในปฏิกิริยาต้องมีความเหมาะสมเพื่อยืนยันการจับระหว่างโพรบกับดีเอ็นเอแม่แบบ โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับโพรบแทกแมน ในช่วงอะนัลลิงและโพลีเมอเรส คือ 70 องศาเซลเซียสและ 60-62 องศาเซลเซียสตามลำดับ กรณีหลังนั้นเพื่อยืนยันการจับระหว่างโพรบกับดีเอ็นเอแม่แบบระหว่างขั้นเอ็กเทนชัน ดังแสดงในภาพที่ 8



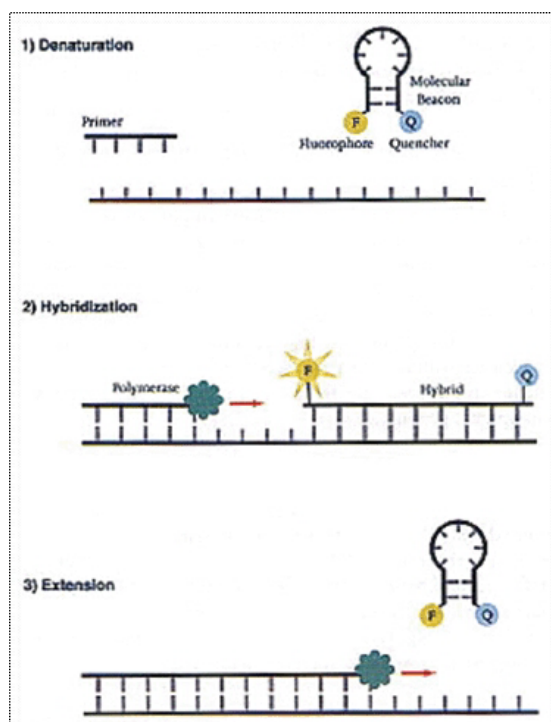
ภาพที่ 8 โพรบติดฉลากแบบไฮโดรไลซิสหรือแตกแขนง เป็นโพรบติดฉลาก fluorochrome 2 ชนิด คือ Reporter dye และ Quencher dye เมื่อสายโพรบถูกย่อย (hydrolyse) ด้วยเอนไซม์แทค ดีเอ็นเอ โพลีเมอเรส (Taq DNA polymerase) Reporter dye จะถูกปลดปล่อยให้เป็นอิสระและสามารถถูกกระตุ้นให้คายพลังงานออกมาในรูปของแสง fluorescence ได้

8.2.3 ตรวจสอบด้วยโพรบติดฉลากแบบโมเลกุลบีคอน (Molecular Beacons)

(94)

โมเลกุลบีคอนเป็นโพรบที่มีลักษณะโค้งงอคล้ายกับหนีบผม (hair pin loop) ประกอบด้วย ส่วนก้าน (stem) และส่วนวง (loop structure) ส่วนของวงมีเบสคู่สมกับดีเอ็นเอแม่แบบ ส่วนของ ก้านจะยึดติดกันด้วยพันธะไฮโดรเจนประมาณ 5-7 นิวคลีโอไทด์ และมีคู่เบส G และ C มาก ปลาย ส่วน 5' จะมี reporter dye ที่มีแสงฟลูออเรสเซนส์ และ 3' มี Quencher dye ติดอยู่ การสร้างพันธะ ไฮโดรเจนระหว่างเบสเป็นผลให้ปลาย 3' และ 5' เข้าใกล้กันมาก ดังนั้น reporter dye จึงเกิดการ ถ่ายทอดพลังงานให้กับ Quencher dye (FRET) จึงไม่เกิดการเรืองแสง เมื่อโมเลกุลบีคอนส่วนวง จับคู่แบบคู่สมกับดีเอ็นเอแม่แบบ ส่วนก้านจะถูกคลายไปทำให้ส่วนของ reporter dye แยกออกจาก ส่วนของ Quencher dye จึงเกิดการเรืองแสงขึ้นได้เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงพลังงานสูงดังแสดงใน ภาพที่ 9 หากดีเอ็นเอแม่แบบไม่มีคู่เบสที่สามารถจับโมเลกุลบีคอนได้ ก็จะไม่เกิดการไฮบริดใด เซชันขึ้น เนื่องจากคุณสมบัติทางจลศาสตร์ของโมเลกุลบีคอนทำให้ชอบอยู่ในรูปโค้งงอมากกว่า ดังนั้นปัญหาของโมเลกุลบีคอนคือการออกแบบโพรบที่เหมาะสมโดยเฉพาะบริเวณก้านจะต้องมี ความแข็งแรงเพื่อให้มั่นใจว่าทั้ง reporter dye และ Quencher dye อยู่ในตำแหน่งที่ใกล้กันและ สามารถถ่ายทอดพลังงานให้แก่กันได้ การจับคู่ของโมเลกุลบีคอนและดีเอ็นเอแม่แบบสามารถ

เกิดขึ้นใหม่ในทุกรอบของอะนาลิติกและปริมาณการเรืองแสงที่เกิดขึ้นเป็นการบ่งบอกถึงปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นในแต่ละรอบของปฏิกิริยานั้นเอง



ภาพที่ 9 โมเลกุลบีคอน เมื่อโมเลกุลบีคอนยังไม่เกาะกับดีเอ็นเอเป้าหมาย ปลาย 5' และ 3' ที่ติดฉลากด้วย reporter และ quencher dye จะอยู่ชิดกันจน quencher dye สามารถดูดพลังงานจาก reporter dye แต่เมื่อเกิดการไฮบริดไลเซชันขึ้น reporter และ quencher dye จะอยู่ห่างกันทำให้ reporter dye สามารถเรืองแสงได้

หลังจากการทำ รีล ไทม์ โพลีเมอเรส เช่น รีแอกชัน เสร็จสิ้นข้อมูลจะถูกนำไปประมวลผลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ของเครื่อง และแสดงผลออกมา โดยทั่วไปจะมีการแสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในแต่ละรอบ (cycle) รวมถึงกราฟแสดงระดับความเข้มแสงที่เปลี่ยนแปลงในแต่ละรอบพีซีอาร์แบบเรียล ไทม์ การคำนวณหาปริมาณตั้งต้นของดีเอ็นเอเป้าหมายจากตัวอย่าง สามารถทำได้โดยใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบปริมาณ มาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมควบคู่กับดีเอ็นเอเป้าหมาย นำข้อมูลที่ได้จากกลุ่มของดีเอ็นเอมาตรฐานไปสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน (calibration curve) เพื่อคำนวณหาปริมาณของดีเอ็นเอเป้าหมายตั้งต้น ซึ่งวิธีนี้เป็นการวัดผลเชิงปริมาณแบบ absolute quantification ซึ่งความน่าเชื่อถือจะขึ้นกับประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ถูกต้อง (identical amplification efficiency) ของดีเอ็นเอเป้าหมายและดีเอ็นเอมาตรฐาน ส่วนการวัดผลเชิงปริมาณแบบ relative quantification จะวัดการ

เปลี่ยนแปลงการแสดงออกของดีเอ็นเอเป้าหมายเปรียบเทียบกับ housekeeping gene (reference, control gene) โดยไม่ต้องมีกราฟมาตรฐาน ในปัจจุบันการตรวจหาปริมาณตั้งต้นของดีเอ็นเอเป้าหมาย ด้วยวิธีพีซีอาร์แบบเรียล ไทม์ เป็นเทคโนโลยีที่มี Dynamic range และความไว (sensitivity) สูง โดยสามารถตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายปริมาณไม่กี่โมเลกุลไปจนถึงระดับล้านโมเลกุลได้โดยไม่ต้องเพิ่มความเข้มข้น (concentration) หรือเจือจางดีเอ็นเอตั้งต้น ทำให้มีความสะดวกและประหยัดเวลาในการทำการวิเคราะห์ (95)

9. วิธีเอ็มทีที (MTT assay)

วิธีเอ็มทีที (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,3-diphenyl tetrazolium bromide) มีหลักการคือเป็นการวัดจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิต (96, 97) โดยวัดจากการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการหายใจระดับเซลล์ในไมโทคอนเดรีย (mitochondrial succinic dehydrogenase activity) ซึ่งเซลล์ที่มีชีวิตจะมีการทำงานของวัฏจักรเครบส์ (Krebs cycle) ในไมโทคอนเดรียโดยผ่านการเมตาบอลิซึม (metabolic pathway) เพื่อสังเคราะห์อะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (adenosine triphosphate, ATP) จากคาร์โบไฮเดรต โปรตีนและไขมัน โดยการเปลี่ยนจากซักซิเนต (succinate) ไปเป็นฟูมาเรต (fumarate) ด้วยเอนไซม์ซักซิเนต ดีไฮโดรจีเนส (succinic dehydrogenase, SDH) และฟลาวิน นิวคลีโอไทด์ (flavin adenine dinucleotide, FAD) เป็นตัวที่ทำให้ปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) นี้สมบูรณ์โดยเมื่อรับโปรตอนและอิเล็กตรอนจะอยู่ในรูป FADH₂ ซึ่ง FADH₂ สามารถเปลี่ยนเกลือเตตราโซเลียม (tetrazolium salt) ไปเป็นฟอร์มazan ที่มีสีน้ำเงินหรือสีม่วง และตกตะกอนในไมโทคอนเดรีย ซึ่งการทดสอบนี้ต้องการซักซิเนตเป็นตัวตั้งต้น เมื่อปฏิกิริยาสมบูรณ์มีผลทำให้มีการเปลี่ยนจากสีเหลืองของเอ็มทีทีไปเป็นสีน้ำเงินหรือสีม่วงของฟอร์มazan และระดับของการเปลี่ยนสีเป็นสัดส่วนโดยตรงกับการทำปฏิกิริยารีดักชันของเอนไซม์ของเกลือเตตราโซเลียม ซึ่งตะกอนหรือผลึกของฟอร์มazanสามารถละลายในไดเมทิล ซัลฟอกไซด์หรือดีเอ็มเอสโอ (dimethyl sulfoxide, DMSO) หลังจากนั้นจึงทำการวัดหาปริมาณฟอร์มazanที่เกิดขึ้นโดยการวัดค่าดูดกลืนแสงหรือโอดี (optical density, OD) ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ค่าที่อ่านได้จะบอกการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการหายใจระดับเซลล์ในไมโทคอนเดรียและเซลล์ที่มีชีวิต

10. การวัดปริมาณโปรตีนโดย Lowry-Folin Method (98)

การวัดปริมาณโปรตีนโดย Lowry-Folin Method เป็นการวัดปริมาณโปรตีนที่ใช้อย่างแพร่หลาย มีหลักการ คือ โปรตีนประกอบด้วย กรดอะมิโนต่อกันด้วยพันธะเปปไทด์ ดังนั้นการวัดจำนวนของพันธะเปปไทด์ จึงสะท้อนปริมาณของโปรตีนโดยตรง โดยโปรตีนจะละลายในสารละลายอัลคาไล (alkali) ซึ่งมีคอปเปอร์ ไอออน (Copper ion) และเกิดเป็น อโรมาติก อะมิโน

แอซิด (aromatic amino acids) และปฏิกิริยาที่ 2 เกิดขึ้นเมื่อเติมสารละลายโฟลีน (folin) จะได้ฟอสโฟโมลิบดีเตทฟอสโฟทังสติก แอซิด (phosphomolybdatephosphotungstic acid) ซึ่งสีที่เกิดขึ้นเป็นสีน้ำเงิน วัดที่ความยาวคลื่น 750 nm และนำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโปรตีนที่ต้องการรู้ ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยแกนของกราฟ คือ ความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน โดยใช้ โบวาย ซีรัม อัลบูมิน (Bovine serum albumin) บริสุทธิ์ และแกนตั้งคือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโปรตีน

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การออกแบบการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยเชิงทดลอง (experimental research) เป็นการศึกษาในห้องปฏิบัติการ โดยแบ่งการศึกษาเป็น 2 กลุ่มดังนี้

1.1 กลุ่มทดลอง

- 1.1.1 ศึกษาผลการแสดงออกของยีนแรงค์แอลและโอพีจีในเซลล์สร้างกระดูก ปฐมภูมิของมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นด้วยส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส
- 1.1.2 ศึกษาผลการแสดงออกของยีนแรงค์แอลและโอพีจีในเซลล์สร้างกระดูก ปฐมภูมิของมนุษย์ เมื่อใส่สารสกัดจากไขข้อ
- 1.1.3 ศึกษาผลการแสดงออกของยีนแรงค์แอลและโอพีจีในเซลล์สร้างกระดูก ปฐมภูมิของมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นด้วยส่วนผสมของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส และสารสกัดจากไขข้อ

1.2 กลุ่มควบคุม

- 1.2.1 ศึกษาผลการแสดงออกของยีนแรงค์แอลและโอพีจีในเซลล์สร้างกระดูก ปฐมภูมิของมนุษย์

ตัวแปรต้นคือไขข้อ ส่วนตัวแปรตาม คือปริมาณการแสดงออกของยีนแรงค์แอลและยีนโอพีจีในเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์

2. กลุ่มตัวอย่าง

เซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์ที่ใช้ในการศึกษานี้ นำมาจากอาสาสมัคร 4 คน โดยอาสาสมัครเป็นผู้ที่เข้ารับการรักษาคือการทำศัลยกรรมกระดูกขากรรไกรร่วมกับการจัดฟัน โดยนำกระดูกพรุน (cancellous bone) มาจากกระดูกขากรรไกรล่างในบริเวณที่เป็นตำแหน่งผ่าตัด (osteomy) มีขนาดประมาณ 1x1x1 เซนติเมตร

ข้อพิจารณาในการคัดเลือกอาสาสมัคร (inclusion criteria)

1. สุขภาพแข็งแรง (ASA class I)

2. อายุระหว่าง 18-40 ปี ที่ทำศัลยกรรมกระดูกขากรรไกรร่วมกับการจัดฟัน
3. ยินยอมเข้าร่วมโครงการ

ข้อพิจารณาในการคัดออกของอาสาสมัคร (exclusion criteria)

1. มีโรคทางระบบ มีความพิการบนใบหน้าและขากรรไกรที่เกิดจากโรคทางพันธุกรรม เช่น ปากแหว่งเพดานโหว่
2. มีพยาธิสภาพของกระดูกขากรรไกรบนหรือล่าง เช่น การติดเชื้อ
3. ได้รับยาปฏิชีวนะภายใน 1 เดือน เช่น ยาเตตราซัยคลิน (tetracycline)

3. เครื่องมือและอุปกรณ์ในการวิจัย

3.1 สารเคมี

- 3.1.1 อาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็ม (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM) (Gibco, NY, USA.)
- 3.1.2 ยาปฏิชีวนะ ได้แก่ 10,000 ยูนิตของเพนนิซิลลิน (penicillin) /สเตรปโตไมซิน และซิโปรฟลอกซาซิน (ciprofloxacin) (Sigma chemical Co., MO, USA)
- 3.1.3 แอล กลูตามีน (L-glutamine) (Gibco, NY, U.S.A.)
- 3.1.4 ฟีตัล โบวาย ซีรัม หรือเอฟบีเอส (Fetal bovine serum, FBS) (Sigma chemical Co., MO, USA)
- 3.1.5 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน หรือพีบีเอส (phosphate buffer saline, PBS)
- 3.1.6 ทริปซินและเอ็ดต้า (Trypsin with ethylene diamine tetraacetic acid; EDTA) (Biochrom AG, Berlin, Germany)
- 3.1.7 อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งผสมเลือด (Blood agar base) (Becton, Dickinson and company, Le Pont de Claix, France)
- 3.1.8 อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวไทโอไกลิโคเลต (Thioglycollate medium without indicator) (Hispanlab, S.A., Madrid, Spain)
- 3.1.9 ฮีมิน (Hemin), วิตามิน เค(vitamin K), โซเดียม ไฮโดรเจน คาร์บอเนต (NaHCO_3)
- 3.1.10 สารสกัดจากใบช่อย
- 3.1.11 เมทิลไทอาโซลเตตราโซเลียมโบรไมด์ หรือเอ็มทีที (methyl thiazol tetrazolium bromide, MTT) (Gibco, NY, .SA)

- 3.1.12 ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ หรือดีเอ็มเอสโอ (Dimethyl sulphoxide, DMSO)
- 3.1.13 ไตรโซล (Trizol) (Gibco, NY, USA)
- 3.1.14 คลอโรฟอร์ม (Chloroform) (Sigma chemical Co., MO, USA)
- 3.1.15 ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์ (Isopropyl alcohol) (Sigma chemical Co., MO, USA)
- 3.1.16 ไดเอทิลไพโรคาร์บอเนต หรือดีเฟซี (Diethylpyrocarbonate, DEPC) (Sigma chemical Co., MO, USA)
- 3.1.17 เจลอะกาโรส (Agarose gel) (Bio-rad, Spain)
- 3.1.18 ชุดทำ RT รุ่น Improm-IITM Reverse transcription system (promega corporation, Madison, USA)
- 3.1.19 ชุดทำ PCR รุ่น Go Taq® Green Master Mix (promega corporation, Madison, USA) และ Taqman® (life technologies, USA)
- 3.1.20 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ (Oligonucleotide primers) ที่ใช้ได้แก่ อินเตอร์ลิวคิน 1 เบต้า (IL-1 β) รันซ์ 2 (RUNX2) จินจีเอพีดีเอส (*GAPDH*)
- 3.1.21 ลีวามิโซล (levamisole) (Sigma chemical Co., MO, USA)
- 3.1.22 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)
- 3.1.23 ทริส โพรแทสเซียมคลอไรด์ (Tris KCl)
- 3.1.24 แมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl₂)
- 3.1.25 ทวิน 20 (Tween 20)
- 3.1.26 NBT/BCIP (Sigma chemical Co., MO, USA)

3.2 วัสดุอุปกรณ์

- 3.2.1 หลอดทดลอง (test tube) ขนาด 1.5 (eppendorf), 15, 20, 50 มิลลิลิตร และ พีซีอาร์ทิวบ์ (PCR Tube)
- 3.2.2 กระดาษกรอง 0.45 ไมโครเมตร
- 3.2.3 จานเพาะเชื้อ (petridishes)
- 3.2.4 ขวดทดลองขนาด 1,000 มิลลิลิตร
- 3.2.5 ผ้ากรอง
- 3.2.6 ฟลาสก์ (Flask) ขนาด 25, 75 ตารางเซนติเมตร
- 3.2.7 ถาดหลุม (well plate) ขนาด 6, 24, 96 หลุมในหนึ่งเพลท

- 3.2.8 ไมโครปิเปต (micro pipette) ขนาด 1,000 100 และ 1-10 ไมโครลิตร
- 3.2.9 ตู้บ่ม (incubator) (Sheldon Manufactory Inc., Oregon, Australia)
- 3.2.10 เครื่องทำให้แตกสลายด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (Ultrasonic disintegrator) (MSE Ltd., London, UK)
- 3.2.11 กล้องจุลทรรศน์ (light microscope) (Nikon, NY, USA)
- 3.2.12 โรตารี อีแวปอเรเตอร์ (Rotar evaporator) (Tokyo.Rikakikai Co.,Ltd, Tokyo, Japan)
- 3.2.13 เครื่องอบแห้งด้วยความเย็น (lyophilizer) (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Germany)
- 3.2.14 ถังทำความเย็นด้วยไนโตรเจนเหลว (Liquid Nitrogen Freezer)
- 3.2.15 กล้องจุลทรรศน์แบบอินเวอร์เทด (Inverted Microscope) (Carl Zeiss Microscopy, Oberkochen, Germany)
- 3.2.16 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) (Sturdy industrial Co., Ltd, Taipei, Taiwan)
- 3.2.17 เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (MPW. Med. Instrument, Warsaw, Poland)
- 3.2.18 ฮีโมไซโตมิเตอร์ (hemocytometer)
- 3.2.19 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) (Thermo fisher Scientific Microplate Instrumentation, Vantaa, Finland)
- 3.2.20 เครื่องยูวี สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV spectrophotometer) (Beckman Coulter, Inc., California, U.S.A.)
- 3.2.21 เครื่องชั่งสารไฟฟ้า (balance) (Ohaus Corporation, N.Y., U.S.A.)
- 3.2.22 เครื่องเขย่า (vortex) (Daigger & company, Illinois, USA)
- 3.2.23 เครื่องเขย่าสาร (shaker) (Daigger & company, Illinois, USA)
- 3.2.24 ตู้กรองอากาศบริสุทธิ์แบบ Biohazard Class II (Lamina flow hood) (AES Environmental Pty.Ltd, Australia)

4. วิธีการวิจัย

4.1 ขั้นตอนการเตรียมการ

4.1.1 การเตรียมเซลล์สร้างกระดูกปฐมนิยามของมนุษย์

ในการเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูกปฐมนิยามของมนุษย์ในการศึกษานี้ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์มาตรฐาน ที่มีส่วนผสมดังต่อไปนี้ คือ อาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มซึ่งผสมยาปฏิชีวนะ (เพนนิซิลิน/สเตรปโตไมซินร้อยละ 4) และแอล-กลูตามีนร้อยละ 1 และฟีคัล โบวาย ชีรัม หรือเอฟบีเอสร้อยละ 15 (ดูรายละเอียดในภาคผนวก ก) สำหรับอาหารเลี้ยงเซลล์สูตรแยกเซลล์สร้างกระดูก ผสมโดยมีอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็ม และยาปฏิชีวนะ (เพนนิซิลิน/สเตรปโตไมซินร้อยละ 4 และชิปโปรฟอกซาซินร้อยละ 2) และแอล-กลูตามีนร้อยละ 1 และฟีคัล โบวาย ชีรัม หรือเอฟบีเอสร้อยละ 15 ส่วนสูตรอื่นๆ จะได้แจ้งรายละเอียดตามแต่ละขั้นตอน

นำกระดูกพรุนที่ได้จากอาสาสมัครแช่ในอาหารเลี้ยงเซลล์สูตรแยกเซลล์สร้างกระดูก และเริ่มขั้นตอนการแยกเซลล์ภายใน 24 ชั่วโมง ในห้องปฏิบัติการ

กระบวนการเตรียมเซลล์สร้างกระดูกทำดังต่อไปนี้

1. ล้างกระดูกพรุนในหลอดทดลองด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลินหรือพีบีเอส (phosphate buffer saline, PBS) ที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะ (เพนนิซิลิน/สเตรปโตไมซินร้อยละ 4 และชิปโปรฟอกซาซินร้อยละ 2) 3 ครั้ง
2. เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์สูตรย่อยกระดูก 1 มิลลิลิตร ซึ่งมีส่วนผสม คือ อาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็ม คอลลาจีเนส (collagenase) 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และดิสเปส 2 (dispase II) 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำใส่ในตู้บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสซึ่งมีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 นาน 30 นาที
3. เมื่อครบ 30 นาทีแล้วดูดส่วนน้ำใส (supernatant) แรกทิ้ง
4. ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์สูตรย่อยกระดูก 1 มิลลิลิตรอีกครั้ง นำเข้าตู้บ่มอีก 30 นาที
5. เมื่อครบ 30 นาทีดูดน้ำใสส่วนที่ 2 ใส่อีกหลอดทดลองหนึ่งซึ่งมีขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 250 g อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที จะพบเซลล์ตกตะกอนที่ก้นหลอดทดลอง
6. ดูดสารละลายในหลอดทดลองส่วนบนออก แล้วเติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์สูตรแยกเซลล์สร้างกระดูก 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการดูดขึ้น-ลง
7. นำเซลล์ทั้งหมดในหลอดทดลองไปหว่านใส่ในถาดหลุมขนาด 24 หลุม (24 well plate)
8. ส่วนชิ้นกระดูกพรุนที่เหลือในหลอดทดลองในข้อ 5 จะถูกนำมาย่อยต่อเพื่อให้ได้เซลล์สร้างกระดูกเพิ่มขึ้นโดยใส่น้ำอาหารเลี้ยงเซลล์สูตรย่อยกระดูก 1 มิลลิลิตร ทำซ้ำตามกระบวนการในข้อ 4-7 อีก 5 ครั้ง

9. เมื่อหว่านเซลล์จากหลอดทดลองในแต่ละครั้งใส่ในถาดหลุมจนกระทั่งครบทั้ง 6 หลุม แล้วนำถาดหลุมใส่ในตู้บ่ม เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์สูตรแยกเซลล์ สร้างกระดุกทุกๆ 2 วัน เป็นเวลา 8 วัน จากนั้นเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรฐานทุก 3 วัน

ติดตามการเจริญเติบโตของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบอินเวอร์เทด (Inverted Microscope) เมื่อเซลล์สร้างกระดุกในถาดหลุมมีปริมาณร้อยละ 90 ทำการแยกเซลล์ออกจากภาชนะเดิมโดยใช้เอนไซม์ทริปซิน (trypsinization) (ดูรายละเอียดในภาคผนวก ข) การคำนวณจำนวนเซลล์ทำโดยนำเซลล์ที่แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเซลล์มานับจำนวนเซลล์บนฮีโมไซโตมิเตอร์ (ดูรายละเอียดในภาคผนวก ค) ก่อนนำเซลล์เลี้ยงในภาชนะใหม่โดยให้มีเซลล์จำนวน 50,000 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร ใช้เซลล์ในพาสเชงที่ 3-7 เท่านั้น ในการทดลองขึ้นไปเพื่อควบคุมให้เซลล์มีการเจริญเติบโตและพัฒนาที่อยู่ในช่วงเดียวกันตลอดการทดลอง

4.1.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของเซลล์สร้างกระดุกปฐมภูมิของมนุษย์

แม้ว่าอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ในการศึกษานี้ จะมีความจำเพาะต่อการเจริญเติบโตของเซลล์สร้างกระดุก แต่เนื่องจากการแยกเซลล์จากเนื้อเยื่อมนุษย์เป็นครั้งแรกในห้องปฏิบัติการ จึงควรทำการพิสูจน์เอกลักษณ์เพื่อยืนยันชนิดของเซลล์ที่แยกได้ และเป็นการแสดงว่าเซลล์สร้างกระดุกที่แยกได้สามารถมีพัฒนาการปกติในสภาวะจำลองที่เพาะเลี้ยง การพิสูจน์ว่าเป็นเซลล์สร้างกระดุกทำได้โดยการกระตุ้นพัฒนาการในระยะต่างๆ ของการ differentiation ได้แก่

1. การแสดงออกของจิ้นรันซ์ 2 (*RUNX2*)

เซลล์สร้างกระดุกมีการแสดงออกของจิ้นจำเพาะต่อการสร้างกระดุก ได้แก่ จิ้นรันซ์ 2 ซึ่งเป็นระยะเริ่มต้นของการพัฒนา (early differentiation) ในการตรวจหาการแสดงออกของจิ้นรันซ์ 2 ทำโดยเลี้ยงเซลล์ความหนาแน่น 5×10^5 เซลล์ในถาดหลุมขนาด 6 หลุมเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารที่กระตุ้นให้เซลล์พัฒนา ได้แก่ แอล-แอสคอบิก แอซิด 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเบต้า กลีเซอโรฟอสเฟต 10 มิลลิโมลาร์ แล้วเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 6 วัน (49) บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งมีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เปลี่ยนอาหารทุกๆ 3 วัน จากนั้นทดสอบโดยแยกอาร์เอ็นเอจากเซลล์โดยวิธีฟีนอล-คลอโรฟอร์ม (ดูรายละเอียดในภาคผนวก ง) แล้วนำอาร์เอ็นเอที่ได้ไปผ่านกระบวนการรีเวอร์สทรานสคริปชันโดยวิธี เอนไซม์รีเวอร์สทรานสคริปเทส จาก เอ็มเอ็มแอลวี (Moloney Murine Leukemia Virus; MMLV) และใช้ไพรเมอร์ เฮกซะเมอร์ (hexamer) เพื่อให้ได้ซีดีเอ็นเอ (ดูรายละเอียดในภาคผนวก จ) จากนั้นจึงนำซีดีเอ็นเอไปหาการแสดงออกของจิ้นรันซ์ 2 โดยวิธีพีซีอาร์ (ดูรายละเอียดในภาคผนวก ฉ) และมีจิ้นจีเอพีดีเอส

(*GAPDH*) เป็นตัวควบคุมภายใน โดยใช้อุณหภูมิ annealing 62 องศาเซลเซียส 30 รอบ (cycle)(99) ลำดับเบสของไพรเมอร์แสดงดังตารางที่ 1 และรายละเอียดของกระบวนการที่ใช้ในการหาการแสดงออกของยีนดังตารางที่ 2

2. การสร้างอัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส (Alkaline phosphatase)

เซลล์สร้างกระดูกมีการสร้างอัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส แสดงถึงระยะเริ่มต้นของการพัฒนา (early differentiation) ในการตรวจหาอัลคาไลน์ ฟอสฟาเตสทำได้โดยเลี้ยงเซลล์ความหนาแน่น 1.2×10^5 เซลล์ในถาดหลุมขนาด 24 หลุมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมสารกระตุ้นได้แก่ แอล-แอสคอบิก แอซิด 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เบต้า กลีเซอรอโรฟอสเฟต 10 มิลลิโมลาร์แล้วเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อเป็นเวลา 7 วัน(49) ทดสอบโดยใช้สารตั้งต้น nitro-blue tetrazolium and 5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate (NBT-BCIP) ซึ่งทำปฏิกิริยากับเอ็นไซม์ อัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส ได้เป็นสารสีม่วงภายในเซลล์

วิธีการทดสอบ

- 1) เตรียมอัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส บัฟเฟอร์ (Alkaline phosphatase buffer, NTMT buffer) 20 มิลลิลิตร โดยให้มีส่วนประกอบของสารต่างๆ ดังนี้

5M NaCl	400 ไมโครลิตร
Tris KCl pH 9.5	1 มิลลิลิตร
2M MgCl ₂	500 ไมโครลิตร
Tween 20	100 ไมโครลิตร
dH ₂ O	18 มิลลิลิตร
- 2) ทำการ fix เซลล์ในถาดหลุมซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 วันแล้ว โดยใช้สารละลายเมทานอล ต่อ อะซิโตนในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
- 3) ดูดสาร fix เซลล์ออก เติมสารละลาย NTMT buffer ในกลุ่มทดลองเป็นเวลา 10 นาที สำหรับกลุ่มควบคุมเติมสารละลาย levamisole เข้มข้น 0.0048 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายใน NTMT buffer เป็นเวลา 10 นาที
- 4) ดูดสารละลาย buffer ออก เติมสารละลาย NBT/BCIP บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็น 20 นาที จนเห็นเซลล์ติดเป็นสีม่วง
- 5) ดูดสารละลาย NBT/BCIP ออก เติมน้ำเพื่อหยุดปฏิกิริยาก่อนนำไปถ่ายภาพ

4.1.3 การเตรียมส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อ *พอร์ไฟโร โมแนส* จิงจิवालิส

นำเชื้อ *ฟอร์โฟโรโมแนส* จิงจิवालิส สายพันธุ์ W50 เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งผสมเลือด (blood agar) ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (anaerobic jar) โดยลักษณะโคโลนีมีสีดำมันและเหมือนกันทั้งงานเพาะเลี้ยง ทำการเตรียมส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อ *ฟอร์โฟโรโมแนส* จิงจิवालิส ตามขั้นตอนดังนี้

1. นำเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อมา 1 โคโลนี ใส่ในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวไทโอไกลโคเลต (Thioglycollate medium without indicator) ซึ่งเติมฮีมินและวิตามิน เค
2. นำหลอดทดลองไปบ่มในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำเชื้อร้อยละ 2 ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวหลอดใหม่เลี้ยงต่ออีก 3 วันให้ขุ่นในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน
3. หลังจาก 3 วันเก็บเชื้อด้วยการปั่นเหวี่ยงในพีบีเอสที่ 10,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
4. นำสารละลายส่วนบนทิ้ง เติมพีบีเอสเข้าไปใหม่ให้มีค่าดูดกลืนแสงหรือโอดี (OD) ใกล้เคียง 1
5. นำสารละลายไปย้อมแกรมและดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อสังเกตลักษณะเชื้อ ก่อนทำให้เชื้อแตก แล้วแบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 10 มิลลิลิตร
6. ทำให้เชื้อแตกด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงที่ดั่งแอมพิจูด (Amplitude) เป็น 20 ไมครอน นาน 2 นาที พัก 1 นาทีในแต่ละรอบ โดยขณะทำให้ทำบนน้ำแข็งเมื่อครบ 15 นาที นำสารละลายของเชื้อในหลอดไปย้อมสีแกรมเพื่อดูปริมาณการแตกของเซลล์ โดยเซลล์ของเชื้อที่นำไปใช้ต้องมีปริมาณการแตกของเซลล์ประมาณร้อยละ 80
7. นำเชื้อที่มีปริมาณการแตกประมาณร้อยละ 80 ไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
8. นำเฉพาะส่วนน้ำใสมากรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร
9. หาความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry (98)
10. นำสารละลายของเชื้อที่ถูกทำให้แตกตัวเก็บที่ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาทดสอบ

4.1.4 การทดสอบคุณภาพของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อ *ฟอร์โฟโรโมแนส* จิงจิवालิส

นำส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส ไปทดสอบกับเซลล์โมโนไซต์ (THP-1) เพื่อการแสดงออกของยีนอินเตอร์ลิวคิน-1เบต้า โดยแบ่งกลุ่มการทดลองเป็น 2 กลุ่ม มีขั้นตอนดังนี้

ก. กลุ่มทดลอง: เซลล์โมโนไซต์ที่เติมส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส

ข. กลุ่มควบคุม: เซลล์โมโนไซต์

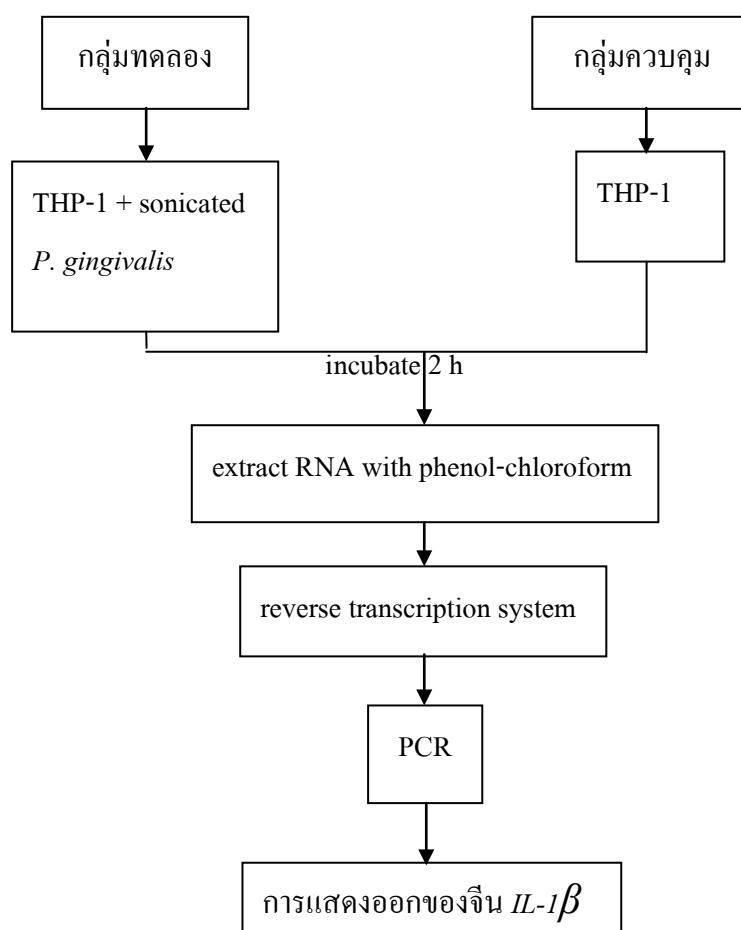
นำเซลล์นำเซลล์โมโนไซต์จำนวน 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตรใส่ในภาชนะที่มีจำนวน 6 หลุม จำนวน 2 มิลลิลิตรและบ่มในตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 นาน 16 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดังกล่าวกลุ่มทดลองเติมส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส เข้มข้น 0.36 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรและบ่มในตู้ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ต่ออีก 2 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเซลล์ทั้งสองกลุ่มทดลองเพื่อแยกอาร์เอ็นเอจากเซลล์โดยวิธีฟิโนล-คลอโรฟอร์ม (ดูรายละเอียดในภาคผนวก ง) แล้วนำอาร์เอ็นเอที่ได้ไปผ่านกระบวนการรีเวอร์สทรานสคริปชันโดยวิธี เอนไซม์รีเวอร์สทรานสคริปเทส จาก เอ็มเอ็มแอลวี (Moloney Murine Leukemia Virus; MMLV) และใช้ไพรเมอร์ เฮกซาเมอร์ (hexamer) เพื่อให้ได้ซีดีเอ็นเอ (ดูรายละเอียดในภาคผนวก จ) จากนั้นจึงนำซีดีเอ็นเอไปหาการแสดงออกของยีนอินเตอร์ลิวคิน-1เบต้า โดยวิธีพีซีอาร์ (ดูรายละเอียดในภาคผนวก ฉ) และมียีนจีเอพีดีเอส (GAPDH) เป็นตัวควบคุมภายใน (ภาพที่ 10) โดยใช้อุณหภูมิ annealing 56 องศาเซลเซียส 34 รอบ (22) ลำดับเบสของไพรเมอร์แสดงดังตารางที่ 1 และรายละเอียดของกระบวนการที่ใช้ในการหาการแสดงออกของยีนดังตารางที่ 2

ตารางที่ 1 แสดงโอลิโกนิวคลีโอไทด์ ไพรเมอร์ที่ใช้ในกระบวนการพีซีอาร์

Target mRNA	Primer (5'-3')	Product size (bp)	Annealing/ cycle	Genbank accession number
<i>IL-1β</i> (22)	F:GACCTTCCAGGAGAATGACC R:GGCTTATCATCTTTCAACACG	332	56 °C/33	NM 000576.2
<i>GAPDH</i> (22)	F:GTCATCATCTCTGCCCCCTCT R:CAGCCCCAGCGTCAAAGGTG	544	59 °C/34	NM 002046.3
<i>RUNX2/</i> <i>CBFA1</i> (99)	F:CCCCACGACAACCGCACCAT R:CACTCCGGCCCACAAATC	270	64 °C /30	NM 004348.3

ตารางที่ 2 รายละเอียดของกระบวนการที่ใช้ในการหาการแสดงออกของจีน

Process	<i>IL-1β</i>	<i>GAPDH</i>	<i>RUNX2</i>
Initial PCR activation	94 °C 3m	94 °C 3m	94 °C 3m
3-step cycling:			
Denaturation	94 °C 35s	95 °C 20s	95 °C 30s
Annealing	56 °C 35s	59 °C 30s	62 °C 30s
Extension	72 °C 45s	68 °C 30s	68 °C 30s
Number of cycles	34	34	30
Final extension	72 °C 10m	68 °C 10m	72 °C 10m



ภาพที่ 10 แผนผังแสดงการทดสอบคุณภาพของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิ วาลิส

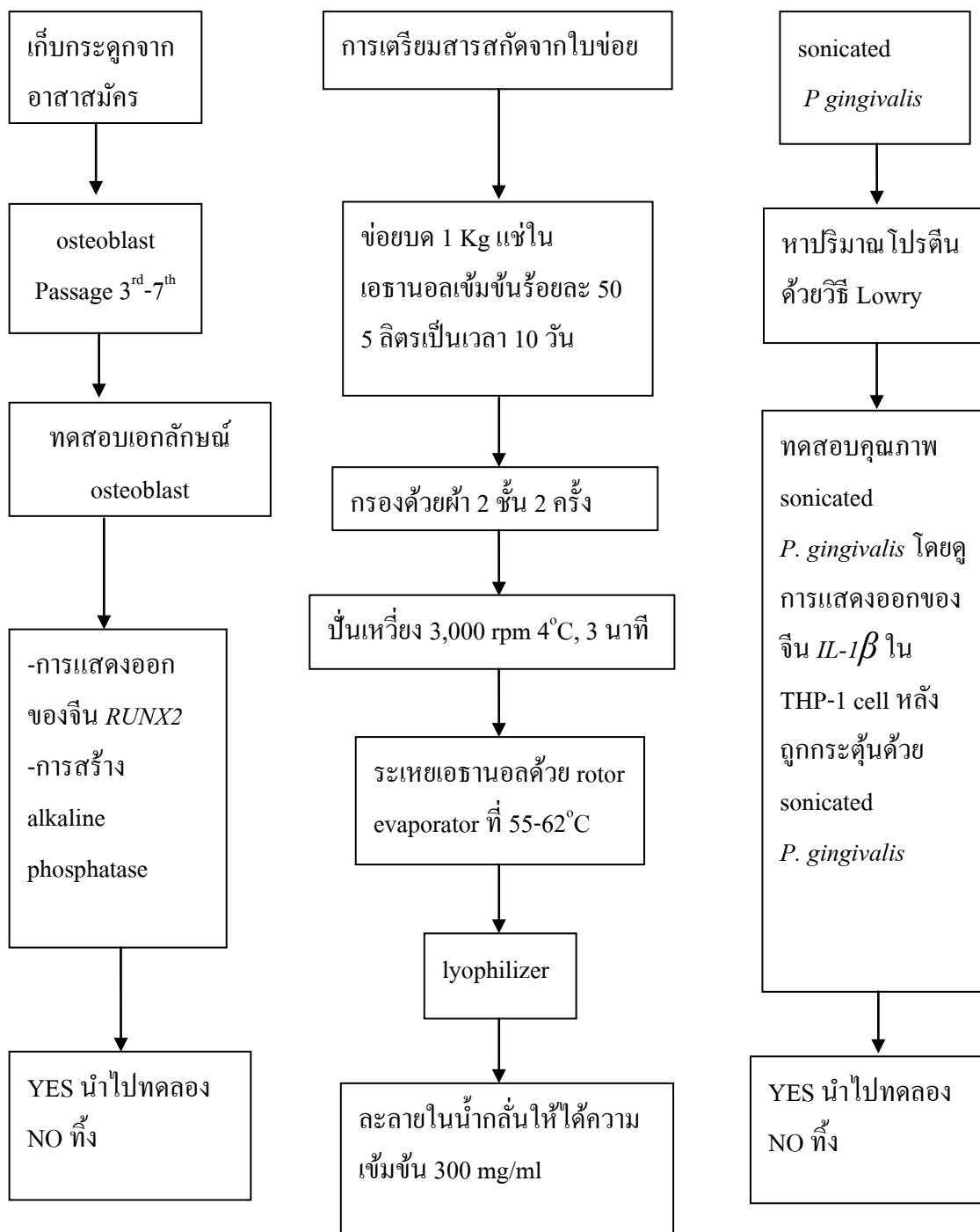
4.1.5 การเตรียมสารสกัดจากไขข้อ

เตรียมสารสกัดจากไขข้อโดย

1. ล้างไขข้อที่เก็บใหม่ให้สะอาด และตากให้แห้งในที่อุณหภูมิห้อง
2. เมื่อแห้งสนิทนำไขข้อบดให้ละเอียด
3. แช่ไขข้อบดในเอทานอลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 50 ในอัตราส่วนข้อต่อ สารละลายเอทานอล 1 กิโลกรัมต่อ 5 ลิตร เป็นเวลา 10 วัน กวนส่วนผสมนี้ 3 ครั้งต่อวัน

4. เมื่อครบ 10 วัน กรองส่วนผสมดังกล่าว เพื่อนำส่วนกากและส่วนไม่ละลาย
ออกด้วยผ้ากรอง 2 ชั้น จำนวน 2 รอบ
 5. นำสารละลายที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
เป็นเวลา 3 นาทีเพื่อกำจัดตะกอน
 6. หลังจากนั้นระเหยเอทานอลด้วยเครื่องกลั่นระเหยสาร (rotar evaporator) ที่
อุณหภูมิ 55-62 องศาเซลเซียส
 7. ระเหิดแห้งโดยเครื่องไลโอไฟไลเซอร์ (lyophilizer) ซึ่งจะได้สารสกัดสีเขียว
เข้มเกือบดำเป็นผง
 8. นำสารสกัดจากใบช่อยไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
- เมื่อต้องการใช้สารละลายจากสารสกัดใบช่อยนำมาเตรียมตามขั้นตอนดังนี้
1. ละลายสารสกัดช่อยในน้ำกลั่นให้เข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรคนให้เข้า
กันเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
 2. นำสารละลายที่ได้ผ่านเครื่องเสียงความถี่สูงเป็นเวลา 15 นาทีเพื่อให้การ
ละลายสมบูรณ์ขึ้น
 3. จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็น
เวลา 20 นาที
 4. นำสารละลายที่ได้กรองแบบหยาบในกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วผ่านเครื่อง
กรองขนาด 0.2 ไมครอนเพื่อให้ปลอดเชื้อ
 5. เก็บสารละลายนี้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

แผนผังการเตรียมเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์ สารสกัดจากใบช่อย และส่วนสกัดเซลล์แตก
ของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส แสดงดังภาพที่ 11



ภาพที่ 11 แผนผังแสดงการเตรียมการทดลองเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์ สารสกัดจากไขข้อ และส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อฟอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวัลลิส

4.2 การทดลอง

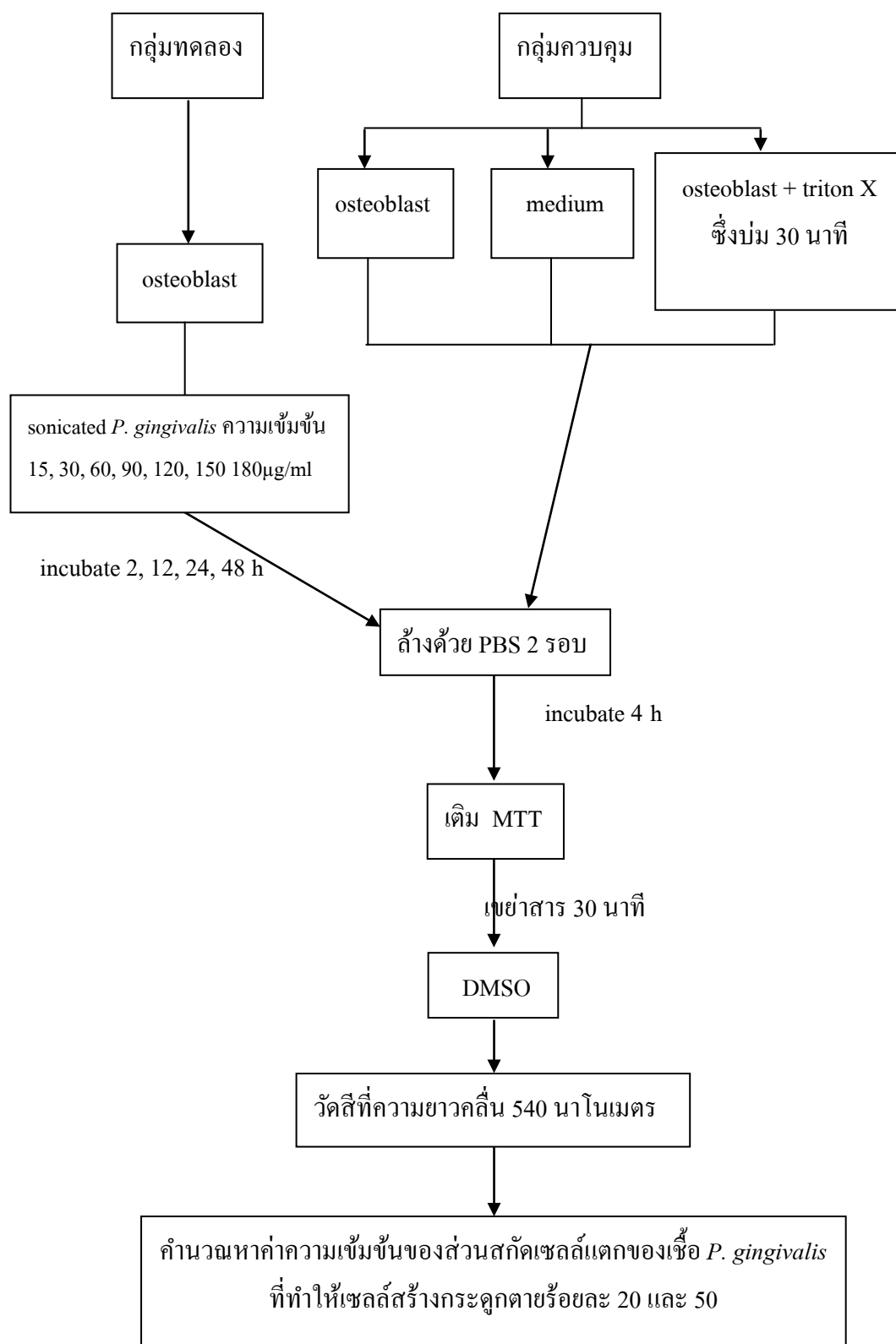
4.2.1 การทดสอบความเป็นพิษของสารต่อเซลล์สร้างกระดูกปฐมนิคมของมนุษย์
สารที่ต้องการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างกระดูกปฐมนิคมของมนุษย์แบ่งเป็น 3 กลุ่ม
คือ

4.2.1.1 การทดสอบความเป็นพิษของเซลล์สร้างกระดูกปฐมนิคมของมนุษย์
เมื่อสัมผัสส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อ *พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวัลิส*

โดยแบ่งกลุ่มเป็น

- ก. กลุ่มทดลอง: เซลล์สร้างกระดูกปฐมนิคมของมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นด้วยส่วนสกัด
เซลล์แตกของเชื้อ *พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวัลิส* ซึ่งมีความเข้มข้น 15, 30, 60,
90, 120, 150, 180 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- ข. กลุ่มควบคุม:
 - เซลล์สร้างกระดูกปฐมนิคมของมนุษย์
 - อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีเซลล์สร้างกระดูกปฐมนิคมของมนุษย์
 - เซลล์สร้างกระดูกปฐมนิคมของมนุษย์ซึ่งถูกทำให้ตายด้วยไตรตัน เอ็กซ์
(Triton X) ร้อยละ 10 เป็นเวลา 30 นาที

ทดสอบความเป็นพิษของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อ *พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวัลิส* ต่อเซลล์สร้าง
กระดูกปฐมนิคมของมนุษย์ โดยนำเซลล์ความหนาแน่น 2×10^4 เซลล์ต่อหลุมในถาดหลุมที่มี 96 หลุม
ซึ่งอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้เป็นแบบที่มีเอฟพีเอสร้อยละ 0.1 บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
มีการบ่อนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการกระตุ้นเซลล์ในกลุ่มทดลองเป็น
เวลา 2, 12, 24, 48 ชั่วโมง ด้วยส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อ *พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวัลิส* ในความ
เข้มข้นต่างๆ กลุ่มควบคุมที่มีเซลล์สร้างกระดูกปฐมนิคมของมนุษย์ถูกทำให้ตายด้วยไตรตัน เอ็กซ์
(Triton X) ร้อยละ 10 เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบตามเวลาในทุกกลุ่มการทดลองล้างด้วยฟิเบส 2
ครั้ง และเติมสารละลายเอ็มทีทีเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ดูรายละเอียดในภาคผนวก ข) และ
บ่มต่ออีก 4 ชั่วโมงที่ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นดูดเอ็มทีทีที่ออกและเติมดีเอ็มเอสโอ แล้วเขย่า 30
นาทีด้วยเครื่องเขย่าสาร เพื่อละลายสีของผลิตภัณฑ์ฟอร์มาซาน (formazan) แล้วจึงวัดสีของฟอร์มาซานที่
เกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการหายใจระดับเซลล์โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์
ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และคำนวณหาความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์สร้างกระดูกตายร้อยละ
20 และ 50 (ภาพที่ 12)



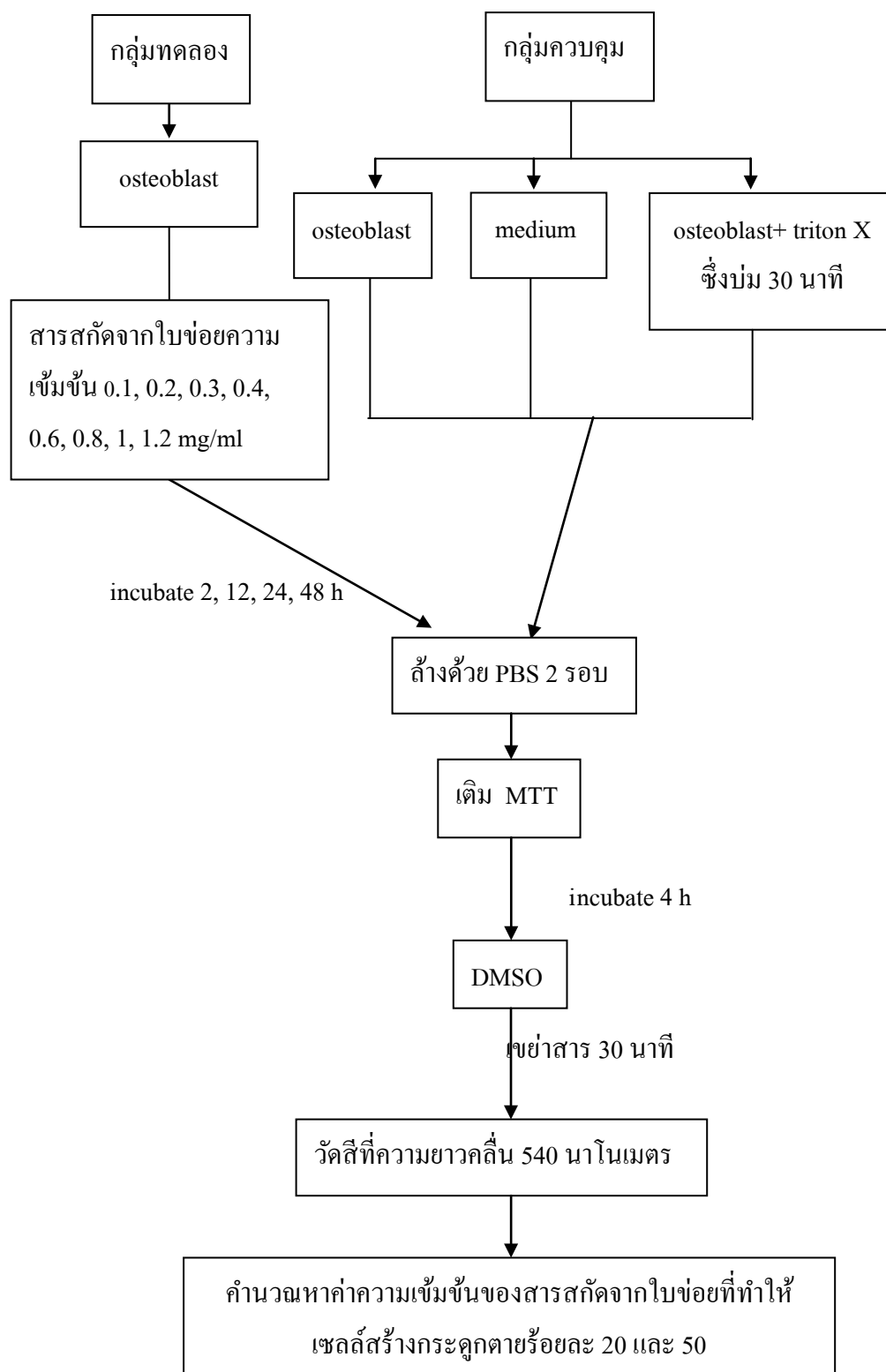
ภาพที่ 12 แผนผังแสดงการทดสอบความเป็นพิษของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อฟอร์โฟโรโมแนส
 จิงจิवालิส ต่อเซลล์สร้างกระดูกปฐภูมิของมนุษย์

4.2.1.2 การทดสอบความเป็นพิษของเซลล์สร้างกระดูกปฐมนิยามของมนุษย์ เมื่อสัมผัสสารสกัดจากใบข่อย

โดยแบ่งกลุ่มเป็น

- ก. กลุ่มทดลอง: เซลล์สร้างกระดูกปฐมนิยามของมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
- ข. กลุ่มควบคุม:
 - เซลล์สร้างกระดูกปฐมนิยามของมนุษย์
 - อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีเซลล์สร้างกระดูกปฐมนิยามของมนุษย์
 - เซลล์สร้างกระดูกปฐมนิยามของมนุษย์ซึ่งถูกทำให้ตายด้วยไตรตัน เอ็กซ์ ร้อยละ 10 เป็นเวลา 30 นาที

ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากใบข่อยต่อเซลล์สร้างกระดูกปฐมนิยามของมนุษย์โดยนำเซลล์ความหนาแน่น 2×10^4 เซลล์ต่อหลุมในถาดหลุมที่มี 96 หลุม ซึ่งอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้เป็นแบบที่มีเอฟพีเอสร้อยละ 0.1 บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการกระตุ้นเซลล์ในกลุ่มทดลองเป็นเวลา 2, 12, 24, 48 ชั่วโมง ด้วยสารสกัดจากใบข่อยในความเข้มข้นต่างๆ และกลุ่มควบคุมที่มีเซลล์สร้างกระดูกปฐมนิยามของมนุษย์ซึ่งถูกทำให้ตายด้วยไตรตัน เอ็กซ์ (Triton X) ร้อยละ 10 เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบตามเวลาในทุกกลุ่ม การทดลองล้างด้วยฟิเบส 2 ครั้ง และเติมสารละลายเอ็มทีทีที่เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ดูรายละเอียดในภาคผนวก ข) และบ่มต่ออีก 4 ชั่วโมงที่ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นดูดเอ็มทีทีที่ออกและเติมดีเอ็มเอสโอ แล้วเขย่า 30 นาทีด้วยเครื่องเขย่าสาร เพื่อละลายสีของผลิตภัณฑ์ฟอร์มาซาน (formazan) แล้วจึงวัดสีของฟอร์มาซานที่เกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการหายใจระดับเซลล์โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และคำนวณหาค่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตายร้อยละ 20 และ 50 (ภาพที่ 13)



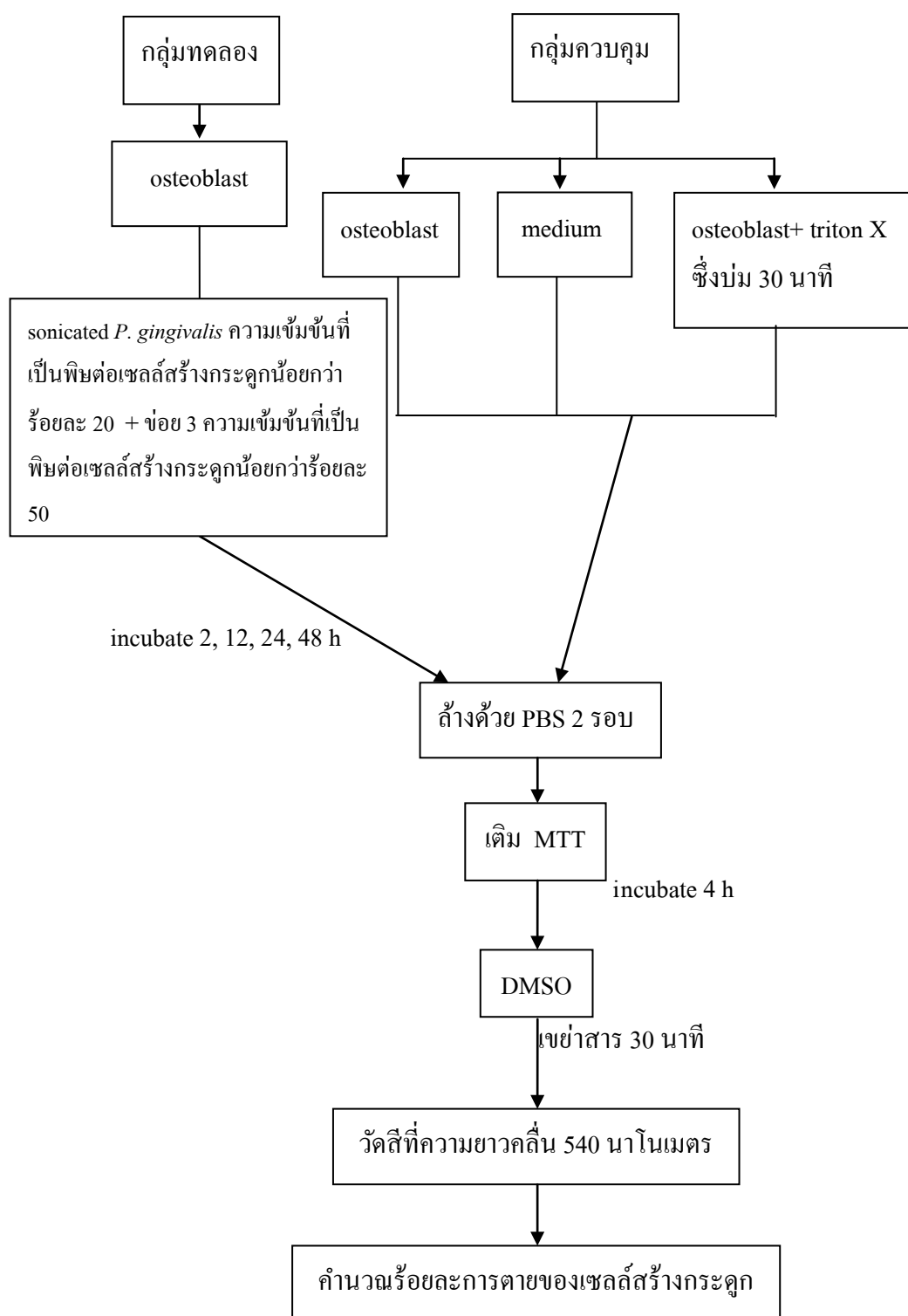
ภาพที่ 13 แผนผังแสดงการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากไขข้อต่อเซลล์สร้างกระดูกปฐภูมิของมนุษย์

4.2.1.3 การทดสอบความเป็นพิษของเซลล์สร้างกระดูกปฐมนิของมนุษย์ เมื่อสัมผัสส่วนผสมของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโร โมแนส จิงจิवालิส และสารสกัดจากใบข่อย

โดยแบ่งกลุ่มเป็น

- ก. กลุ่มทดลอง: เซลล์สร้างกระดูกปฐมนิของมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นด้วยส่วนผสมของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโร โมแนส จิงจิवालิส ที่ความเข้มข้นที่เป็นพิษน้อยกว่าร้อยละ 20 ผสมกับสารสกัดจากใบข่อย 3 ความเข้มข้นที่เป็นพิษน้อยกว่าร้อยละ 50
- ข. กลุ่มควบคุม:
 - เซลล์สร้างกระดูกปฐมนิของมนุษย์
 - อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีเซลล์สร้างกระดูกปฐมนิของมนุษย์
 - เซลล์สร้างกระดูกปฐมนิของมนุษย์ซึ่งถูกทำให้ตายด้วยไตรตัน เอ็กซ์ร้อยละ 10 เป็นเวลา 30 นาที

ทดสอบโดยนำเซลล์สร้างกระดูกความหนาแน่น 2×10^4 เซลล์ต่อหลุมในถาดหลุมที่มี 96 หลุม ซึ่งอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้เป็นแบบที่มีเอฟบีเอสร้อยละ 0.1 บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการกระตุ้นเซลล์ในกลุ่มทดลองเป็นเวลา 2, 12, 24, 48 ชั่วโมง ด้วยส่วนผสมของสารทั้ง 2 ชนิด และกลุ่มควบคุมที่มีเซลล์สร้างกระดูกปฐมนิของมนุษย์ซึ่งถูกทำให้ตายด้วยไตรตัน เอ็กซ์ (Triton X) ร้อยละ 10 เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบตามเวลาในทุกกลุ่มการทดลองล้างด้วยฟิเบส 2 ครั้ง และเติมสารละลายเอ็มทีทีเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ดูรายละเอียดในภาคผนวก ข) และบ่มต่ออีก 4 ชั่วโมงที่ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นดูดเอ็มทีทีออกและเติมดีเอ็มเอสโอ แล้วเขย่า 30 นาทีด้วยเครื่องเขย่าสาร เพื่อละลายสีของผลิตภัณฑ์ฟอร์มาซาน (formazan) แล้วจึงวัดสีของฟอร์มาซานที่เกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการหายใจระดับเซลล์โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และคำนวณหาร้อยละการตายของเซลล์ (ภาพที่ 14)



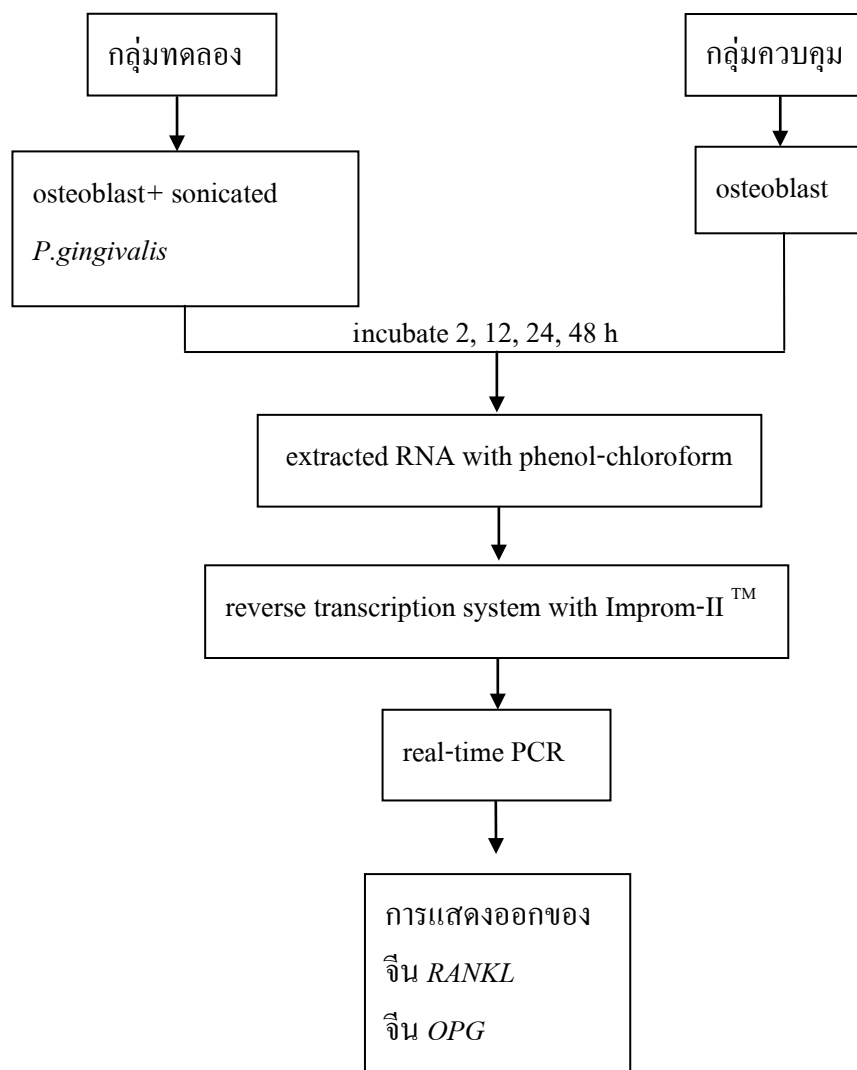
ภาพที่ 14 แผนผังแสดงการทดสอบความเป็นพิษของสารทดสอบทั้ง 2 ชนิดต่อเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์

4.2.2 การศึกษาการแสดงออกของยีนแรงค์แอลและโอพีจีของเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์ซึ่งถูกกระตุ้นด้วยส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส ในเวลาที่แตกต่างกัน

ทำการศึกษาโดยแบ่งกลุ่มทดลองเป็น 2 กลุ่มดังนี้

- ก. กลุ่มทดลอง: เซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นด้วยส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส ในเวลา 2, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง
- ข. กลุ่มควบคุม: เซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์ซึ่งเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 2, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง

เริ่มต้นนำเซลล์จำนวน 5×10^5 เซลล์ต่อหลอดใส่ในหลอดที่มีจำนวน 6 หลอดเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารที่กระตุ้นให้เซลล์เปลี่ยนแปลงรูปร่าง (differentiation) โดยเติมแอล-แอสคอบิก แอซิด 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเบต้า กลีเซอรอล 10 มิลลิโมลาร์ทุกวัน บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งมีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เปลี่ยนอาหารเลี้ยงวันเว้นวัน เป็นเวลา 6 วัน (49) จากนั้นทำการกระตุ้นเซลล์ในกลุ่มทดลองเป็นเวลา 2, 12, 24, 48 ชั่วโมง ด้วยส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส โดยเลือกความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์น้อยกว่าร้อยละ 20 จากนั้นชุดเซลล์ใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตรเก็บที่ -20 องศาเซลเซียสก่อนนำเซลล์ไปแยกอาร์เอ็นเอ (ดูรายละเอียดในภาคผนวก ง) แล้วนำอาร์เอ็นเอที่ได้ไปผ่านกระบวนการรีเวอร์สทรานสคริปชัน (ดูรายละเอียดในภาคผนวก จ) เพื่อให้ได้ซีดีเอ็นเอ จากนั้นจึงนำซีดีเอ็นเอไปหาการแสดงออกของยีนแรงค์แอลและยีนโอพีจีโดยวิธีเรียลไทม์พีซีอาร์ โดยมีเงิน 18 เอสเป็นกลุ่มควบคุมภายใน ซึ่งใช้ชุดของ Taqman® (life technologies, USA) (ภาพที่ 15)



ภาพที่ 15 แผนผังแสดงวิธีการทดลองการแสดงผลของยีนเรงก์แอลและยีนโอพีจีของเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์ซึ่งถูกกระตุ้นด้วยส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส ในเวลาที่ต่างกัน

4.2.3 การศึกษาผลของส่วนผสมของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส และสารสกัดจากใบข่อย ต่อการแสดงออกของยีนแรงค์แอลและโอพีจีในเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์

ทำการศึกษาโดยแบ่งกลุ่มดังนี้

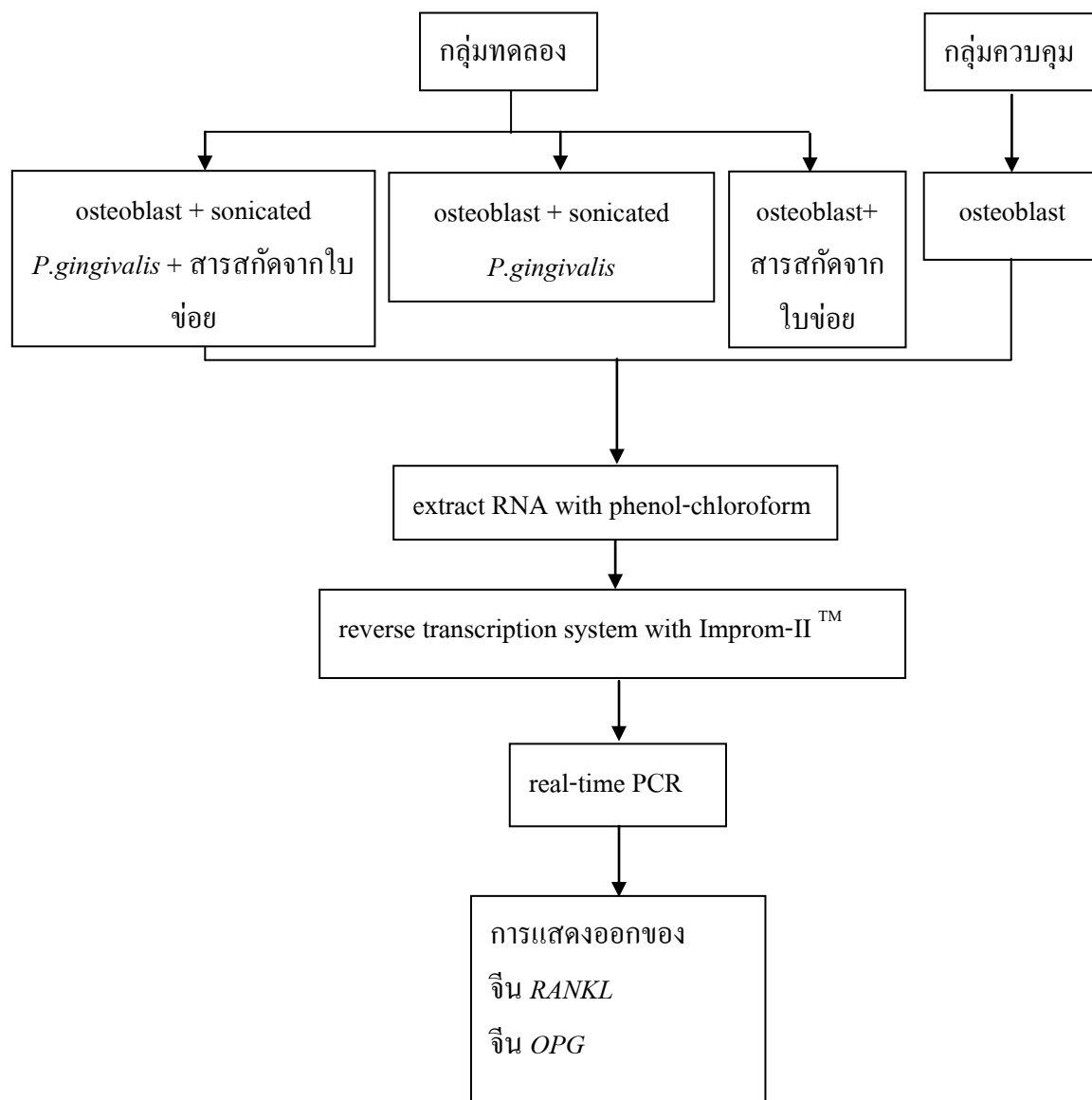
ก. กลุ่มทดลอง:

- เซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์ที่สัมผัสส่วนผสมของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส และสารสกัดจากใบข่อย
- เซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นด้วยส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส
- เซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดจากใบข่อย

ข. กลุ่มควบคุม:

- เซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์

เริ่มต้นนำเซลล์จำนวน 5×10^5 เซลล์ต่อหลุมใส่ในถาดหลุมที่มีจำนวน 6 หลุมเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารที่กระตุ้นให้เซลล์เปลี่ยนแปลงรูปร่าง(differentiation) โดยเติมแอล-แอสคอบิก แอซิด 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเบต้า กลีเซอรอล 10 มิลลิโมลาร์ทุกวัน บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งมีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เปลี่ยนอาหารเลี้ยงวันเว้นวัน เป็นเวลา 6 วัน จากนั้นกระตุ้นเซลล์ด้วยสารทดสอบทั้ง 2 ชนิด โดยใช้ความเข้มข้นของสารที่เหมาะสม (จากผลของการทดสอบข้อ 4.2.1.3) และให้เซลล์สัมผัสกับสารตามเวลาที่เหมาะสม (ซึ่งทราบจากผลการทดสอบข้อ 4.2.2) จากนั้นชุดเซลล์ใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตรเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำเซลล์ไปแยกอาร์เอ็น แล้วนำอาร์เอ็นเอที่ได้ไปผ่านกระบวนการรีเวอร์สทรานสคริปชัน เพื่อให้ได้ซีดีเอ็นเอ จากนั้นจึงนำซีดีเอ็นเอไปหาการแสดงออกของยีนแรงค์แอลและโอพีจีโดยวิธีเรียลไทม์พีซีอาร์โดยมีเงิน 18 เอสเป็นกลุ่มควบคุมภายใน ซึ่งใช้ชุดของTaqman® (life technologies, USA) (ภาพที่ 16)



ภาพที่ 16 แผนผังแสดงวิธีการทดลองการแสดงออกของยีนเรงก์แอลและโอพีจีเมื่อเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์ถูกกระตุ้นด้วยส่วนผสมของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालีส และสารสกัดจากใบข่อย

5. วิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์เปรียบเทียบผลร้อยละที่ทำให้เซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์ตาย และวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของยีนแรงค์แอลและยีนโอพีจีระหว่างกลุ่ม โดยใช้โปรแกรม Graphpad prism version 5.01 กำหนดค่าระดับนัยสำคัญ (α) เท่ากับ 0.05 ใช้สถิติ Kruskal-Wallis เนื่องจากข้อมูลมีการแจกแจงไม่ปกติ

บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. ขั้นตอนเตรียมการ

1.1. ข้อมูลพื้นฐานของอาสาสมัครที่ได้รับการเก็บตัวอย่างกระดูก

ตัวอย่างกระดูกได้จากอาสาสมัครจำนวน 4 คน ซึ่งเป็นผู้ที่เข้ารับการรักษาดูแลการทำศัลยกรรมกระดูกขากรรไกรร่วมกับการจัดฟัน โดยนำกระดูกพรุนมาจากกระดูกขากรรไกรล่างในบริเวณที่เป็นตำแหน่งผ่าตัด ข้อมูลพื้นฐานของอาสาสมัครที่ได้รับการเก็บตัวอย่างกระดูกแสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ข้อมูลพื้นฐานของอาสาสมัคร

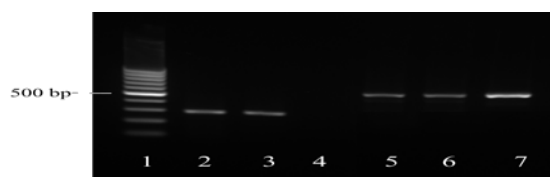
คนที่	เพศ	อายุ
1	ชาย	22
2	ชาย	24
3	ชาย	29
4	หญิง	22

1.2. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์

1.2.1. การแสดงออกของยีนรันช์ 2 (*RUNX2*)

ผลการทดสอบการแสดงออกของยีนรันช์ 2 ซึ่งเป็นยีนที่มีการแสดงออกอย่างจำเพาะในเซลล์สร้างกระดูก พบว่าในกลุ่มทดลองซึ่งเป็นเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากอาสาสมัครมีการแสดงออกของยีนรันช์ 2 เช่นเดียวกับกลุ่มควบคุมบวกซึ่งเป็นเซลล์ hFOB1.19 (ATCC CRL-11372™) แต่เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมลบที่เป็นเนื้อเยื่อเหงือกไม่มีการแสดงออก ส่วนการแสดงออก

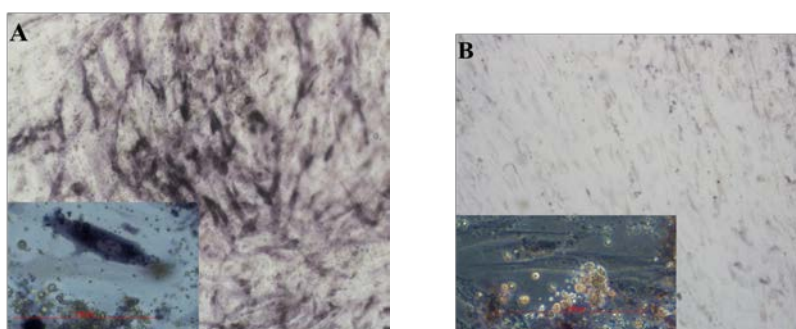
ของจีนจีเอพีดีเอส (*GAPDH*) ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุมภายใน (internal control) มีการแสดงออกทั้งสามกลุ่มแม้ว่าในเซลล์สร้างกระดูกมีระดับการแสดงออกน้อยกว่า (ภาพที่ 17)



ภาพที่ 17 การแสดงออกของจีนรันช์ 2 โดยเลน 1:ladder, เลน 2:กลุ่มควบคุมบวกซึ่งเป็นเซลล์สร้างกระดูก hFOB1.19 (ATCC CRL-11372TM), เลน 3:กลุ่มทดลอง, เลน 4:กลุ่มควบคุมลบที่เป็นเนื้อเยื่อเหงือก, เลน 5: การแสดงออกของจีนจีเอพีดีเอส (*GAPDH*)ของกลุ่มควบคุมบวก, เลน 6:การแสดงออกของจีนจีเอพีดีเอส (*GAPDH*)ของกลุ่มทดลอง, เลน 7:การแสดงออกของจีนจีเอพีดีเอส (*GAPDH*)ของกลุ่มควบคุมลบ

1.2.2. การสร้างอัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส (Alkaline phosphatase)

ผลการทดสอบการสร้างอัลคาไลน์ ฟอสฟาเตสของเซลล์ที่แยกจากอาสาสมัคร พบสารติดสีม่วงในไซโตพลาสซึมของเซลล์ (ภาพที่ 18A) แต่เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ (ภาพที่ 18B) ซึ่งเป็นเซลล์ที่แยกจากอาสาสมัครซึ่งบ่มในสารละลาย levamisol ก่อนเดิมสารตั้งต้น จะไม่พบการติด



ภาพที่ 18 การทดสอบการสร้างอัลคาไลน์ ฟอสฟาเตสของเซลล์สร้างกระดูก เซลล์ที่แยกจากอาสาสมัครในกลุ่มทดสอบ (A) พบมีการติดสีม่วง ในขณะที่เซลล์สร้างกระดูกในกลุ่มควบคุม (B) ไม่พบการติดสี โดยในภาพขนาดใหญ่เป็นกำลังขยาย 100 เท่า และภาพเล็กเป็นกำลังขยาย 400 เท่า

1.3. การหาปริมาณโปรตีนและตรวจสอบคุณภาพทางชีววิทยาของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อ *พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส*

1.3.1. การหาปริมาณโปรตีนส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อ *พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส*

ในการหาปริมาณโปรตีนของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อด้วยวิธี Lowry ได้ทำการทดสอบซ้ำ 4 ครั้ง โดยแต่ละครั้งได้กราฟมาตรฐานและสมการเพื่อคำนวณค่าปริมาณโปรตีน

จากกราฟมาตรฐานครั้งที่ 1 ให้สมการเป็น $Y=0.553X+0.021$ และมีค่าสัมประสิทธิ์กำหนด (R^2) เป็น 0.987 และวัดค่าดูดกลืนแสงหรือโอดีของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อ ที่ 750 นาโนเมตร มีค่าเป็น 0.239 จึงคำนวณค่าปริมาณโปรตีนของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อได้ 0.39 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จากกราฟมาตรฐานครั้งที่ 2 ได้สมการเป็น $Y=0.406X+0.002$ และมีค่าสัมประสิทธิ์กำหนด (R^2) เป็น 0.998 และวัดค่าโอดีของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อ ที่ 750 นาโนเมตร มีค่าเป็น 0.224 จึงคำนวณค่าปริมาณโปรตีนของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อได้ 0.55 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

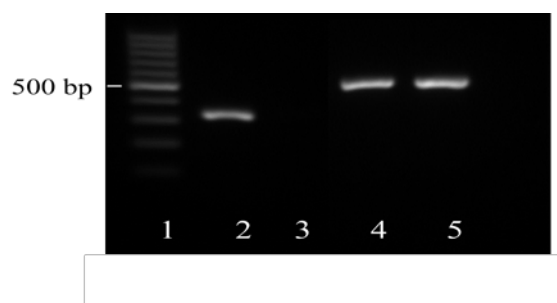
จากกราฟมาตรฐานครั้งที่ 3 ให้สมการเป็น $Y=0.823X+0.022$ และมีค่าสัมประสิทธิ์กำหนด (R^2) เป็น 0.996 และวัดค่าโอดีของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อ ที่ 750 นาโนเมตร มีค่าเป็น 0.233 จึงคำนวณค่าปริมาณโปรตีนของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อได้ 0.26 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จากกราฟมาตรฐานครั้งที่ 4 ได้สมการเป็น $Y=0.681X+0.022$ และมีค่าสัมประสิทธิ์กำหนด (R^2) เป็น 0.991 และวัดค่าโอดีของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อ ที่ 750 นาโนเมตร มีค่าเป็น 0.241 จึงคำนวณค่าปริมาณโปรตีนของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อได้ 0.32 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

หาค่าเฉลี่ยจากค่าปริมาณโปรตีนทั้ง 4 ครั้งได้ค่าปริมาณโปรตีนเฉลี่ยเป็น 380 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

1.3.2. การทดสอบคุณภาพทางชีววิทยาของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อ *พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส*

ผลการตรวจสอบการแสดงออกของจินอินเตอร์ลิวคิน-1เบต้า เมื่อเซลล์โมโนไซด์ ชนิด THP-1ถูกกระตุ้นด้วยส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อ *พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส* ที่ความเข้มข้น 0.36 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่าในกลุ่มทดลองมีการแสดงออกของจินอินเตอร์ลิวคิน-1เบต้า ส่วนกลุ่มควบคุมเป็นเซลล์โมโนไซด์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วยส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อ ไม่พบการแสดงออกของจิน



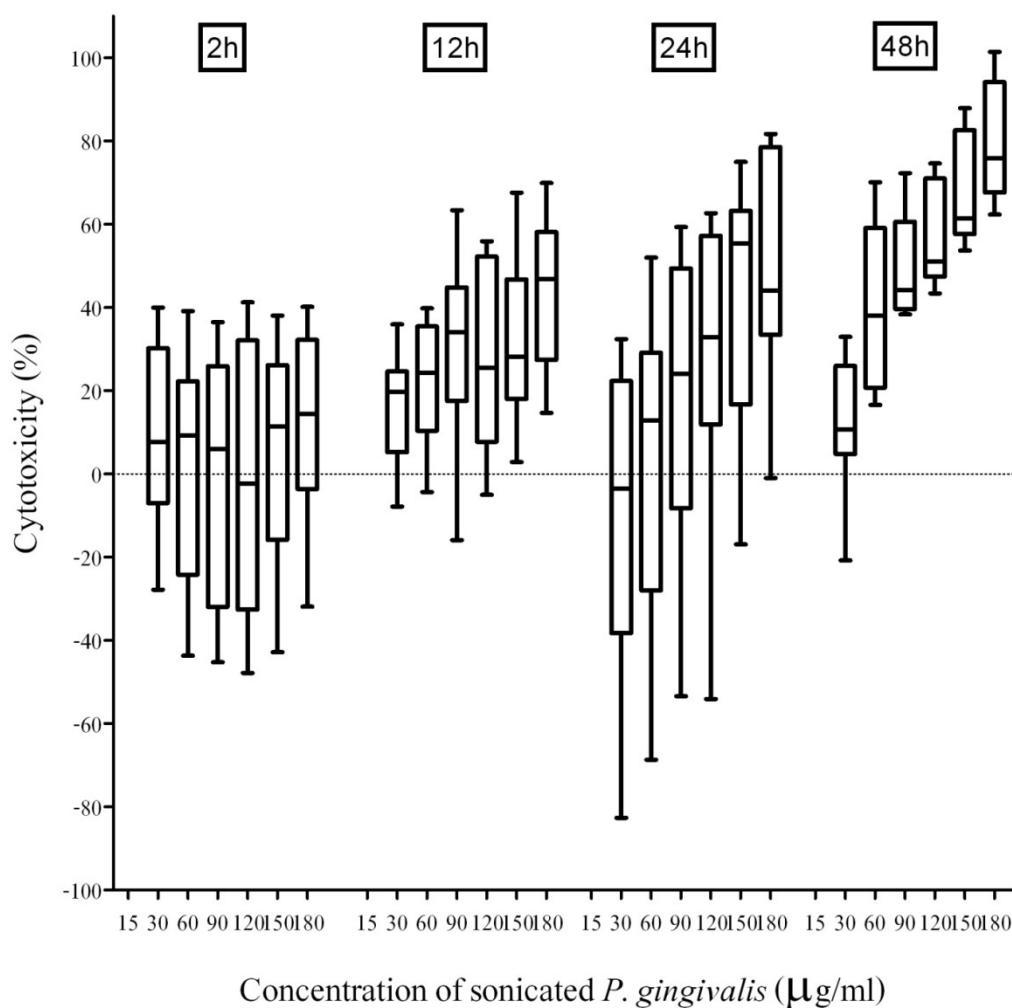
ภาพที่ 23 การแสดงออกของจีนอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้าในเซลล์โมนาไฮด์โดยเลน 1:ladder, เลน 2: กลุ่มทดลองเป็นเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อฟอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालีส, เลน 3:กลุ่มควบคุมเป็นเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น, เลน 4: การแสดงออกของจีนจีเอพีดีเอส (*GAPDH*)ของ กลุ่มทดลอง, เลน 5:การแสดงออกของจีนจีเอพีดีเอส (*GAPDH*) ของกลุ่มควบคุม

2. ขั้นตอนการทดลอง

2.1. ความเป็นพิษของสารต่อเซลล์สร้างกระดูกปฐมนิของมนุษย์

2.1.1. ความเป็นพิษของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวัลิส ต่อเซลล์สร้างกระดูกปฐมนิของมนุษย์

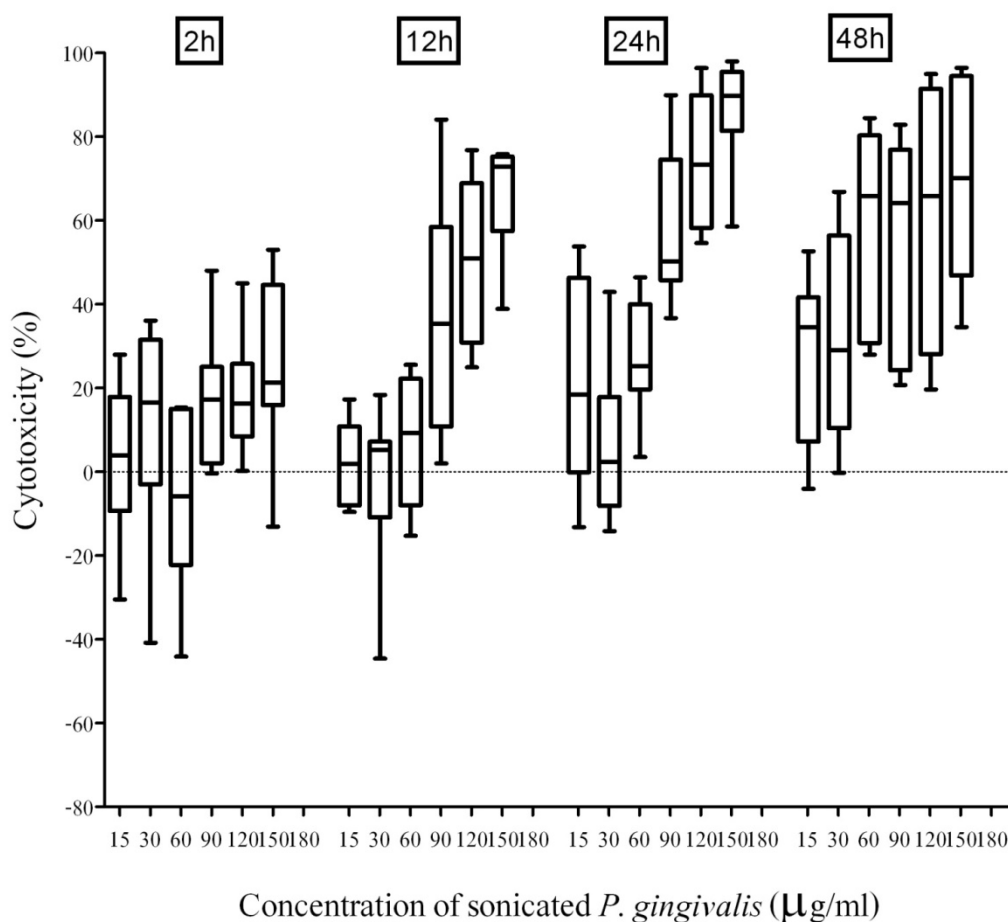
เซลล์สร้างกระดูกปฐมนิของมนุษย์นำมาจากอาสาสมัครเพศชาย 3 คน และเพศหญิง 1 คน เมื่อสัมผัสกับส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวัลิส พบว่ามีร้อยละการตายของเซลล์แตกต่างกันในแต่ละคน โดยเซลล์สร้างกระดูกจากอาสาสมัครคนที่ 1 เมื่อสัมผัสกับส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อด้วยความเข้มข้น 30 – 180 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบร้อยละการตายของเซลล์สร้างกระดูกเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารมากขึ้นในช่วงเวลา 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ยกเว้นช่วงเวลา 2 ชั่วโมงแม้ความเข้มข้นจะเพิ่มขึ้นถึง 180 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรร้อยละการตายก็ใกล้เคียงกับความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในแต่ละช่วงเวลา คือ 2, 12, 24 และ 48 ชั่วโมงพบว่าร้อยละการตายของเซลล์สร้างกระดูกจะเพิ่มขึ้นเมื่อสัมผัสสารนานขึ้น (ภาพที่ 24)



ภาพที่ 24 ความเป็นพิษของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อ *พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาไลส* ที่ความเข้มข้น 30 – 180 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเซลล์สร้างกระดูกปฐภูมิของมนุษย์จากอาสาสมัครคนที่ 1 ณ เวลาต่างๆ เส้นกึ่งกลางของ box plot แสดงค่ามัธยฐาน ขอบล่างและขอบบนของ box คือ ค่าสูงสุดและต่ำสุดของข้อมูล

เซลล์สร้างกระดูกจากอาสาสมัครคนที่ 2 เมื่อสัมผัสกับส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อด้วยความเข้มข้น 15 – 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบร้อยละการตายของเซลล์สร้างกระดูกเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารมากขึ้นในช่วงเวลา 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ยกเว้นช่วงเวลา 2 ชั่วโมงแม้ความเข้มข้นจะเพิ่มขึ้นถึง 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรร้อยละการตายก็ใกล้เคียงกับความเข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในแต่ละ

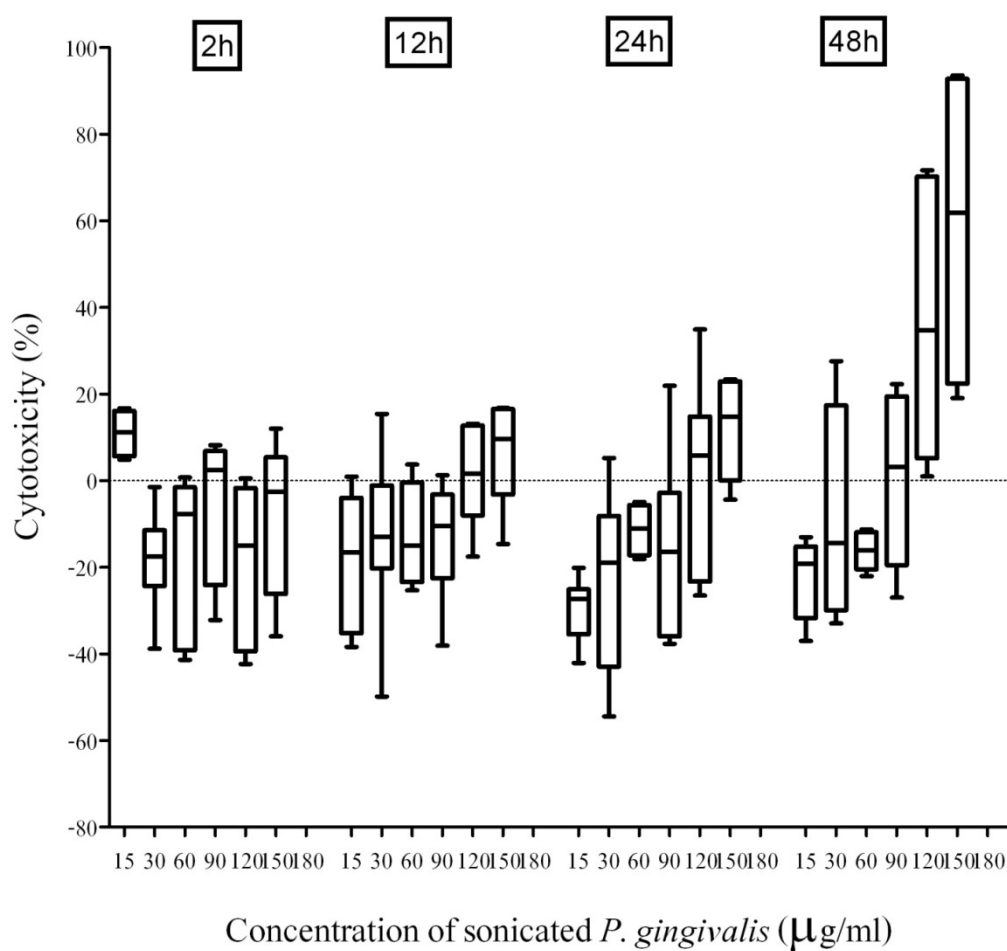
ช่วงเวลา คือ 2, 12, 24 และ 48 ชั่วโมงพบว่าร้อยละการตายของเซลล์สร้างกระดูกจะเพิ่มขึ้นเมื่อสัมผัสสารนานขึ้น (ภาพที่ 25)



ภาพที่ 25 ความเป็นพิษของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อฟอร์โฟโรโมแนส จิงจิวัลิส ที่ความเข้มข้น 15 – 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ต่อเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์จากอาสาสมัครคนที่ 2 ณ เวลาต่างๆ เส้นกึ่งกลางของ box plot แสดงค่ามัธยฐาน ขอบล่างและขอบบนของ box คือ ค่าสูงสุดและต่ำสุดของข้อมูล

เซลล์สร้างกระดูกจากอาสาสมัครคนที่ 3 เมื่อสัมผัสกับส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อด้วยความเข้มข้น 15 – 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร พบว่าที่ 2 ชั่วโมง ส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อมีผลต่อการตายของเซลล์สร้างกระดูกน้อยกว่าร้อยละ 16 แต่ร้อยละการตายของเซลล์สร้างกระดูกเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารมากขึ้นในช่วงเวลา 12, 24 และ 48 ชั่วโมง โดยความเข้มข้น 120 และ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง จะมีร้อยละการตายของเซลล์สร้างกระดูกสูงสุดถึง 71 และ 93 ตามลำดับ นอกจากนี้ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 90 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรในแต่ละ

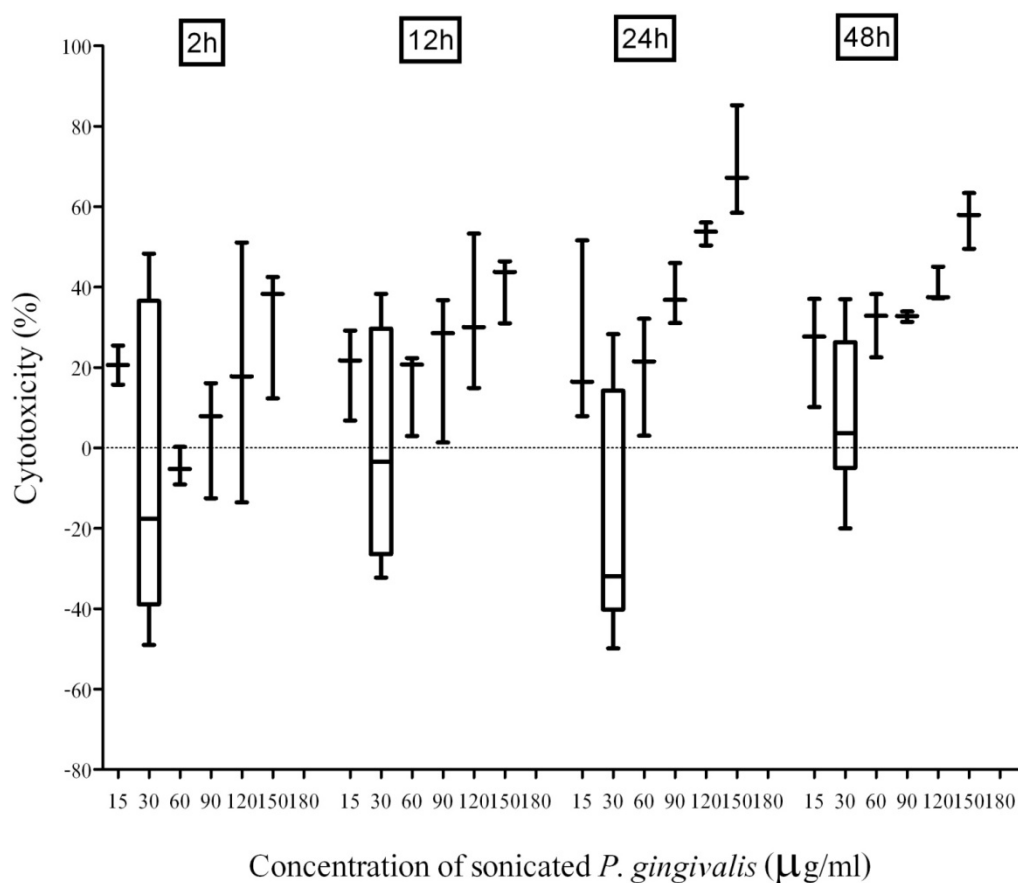
ช่วงเวลา คือ 2, 12, 24 และ 48 ชั่วโมงพบว่าร้อยละการตายของเซลล์สร้างกระดูกจะเพิ่มขึ้นเมื่อสัมผัสสารนานขึ้น (ภาพที่ 26)



ภาพที่ 26 ความเป็นพิษของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจีวาลิส ที่ความเข้มข้น 15 – 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเซลล์สร้างกระดูกปฐมนิของมนุษย์จากอาสาสมัครคนที่ 3 ณ เวลาต่างๆ เส้นกึ่งกลางของ box plot แสดงค่ามัธยฐาน ขอบล่างและขอบบนของ box คือ ค่าสูงสุดและต่ำสุดของข้อมูล

เซลล์สร้างกระดูกจากอาสาสมัครคนที่ 4 เมื่อสัมผัสกับส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อด้วยความเข้มข้น 15 – 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบร้อยละการตายของเซลล์สร้างกระดูกเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารมากขึ้นในช่วงเวลา 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ยกเว้นช่วงเวลา 2 ชั่วโมงแม้ความเข้มข้นจะเพิ่มขึ้นถึง 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรร้อยละการตายก็ใกล้เคียงกับความเข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 27)

ความเข้มข้นของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อซึ่งทำให้เซลล์สร้างกระดูกตายร้อยละ 20 และ 50 แสดงดังตารางที่ 4



ภาพที่ 27 ความเป็นพิษของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อ *พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวัลิส* ที่ความเข้มข้น 15 – 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์จากอาสาสมัครคนที่ 4 ณ เวลาต่างๆ เส้นกึ่งกลางของ box plot แสดงค่ามัธยฐาน ขอบล่างและขอบบนของ box คือ ค่าสูงสุดและต่ำสุดของข้อมูล

ตารางที่ 4 ค่าความเข้มข้นของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อ *พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาไลส* ที่ทำให้เซลล์สร้างกระดูกปฐุมภูมิของมนุษย์ตายร้อยละ 20 และ 50 ในแต่ละช่วงเวลา

ชั่วโมง	คนที่	<i>P. gingivalis</i> (µg/ml)	
		IC ₂₀	IC ₅₀
2	1	ND	ND
	2	134.02	> 180
	3	ND	ND
	4	ND	ND
12	1	50.18	>180
	2	64.96	120.66
	3	>180	>180
	4	70.10	>180
24	1	99.36	174.49
	2	33.10	85.01
	3	>180	>180
	4	54.77	115.28
48	1	28.05	102.97
	2	<15	76.05
	3	98.13	150.20
	4	30.06	142.72

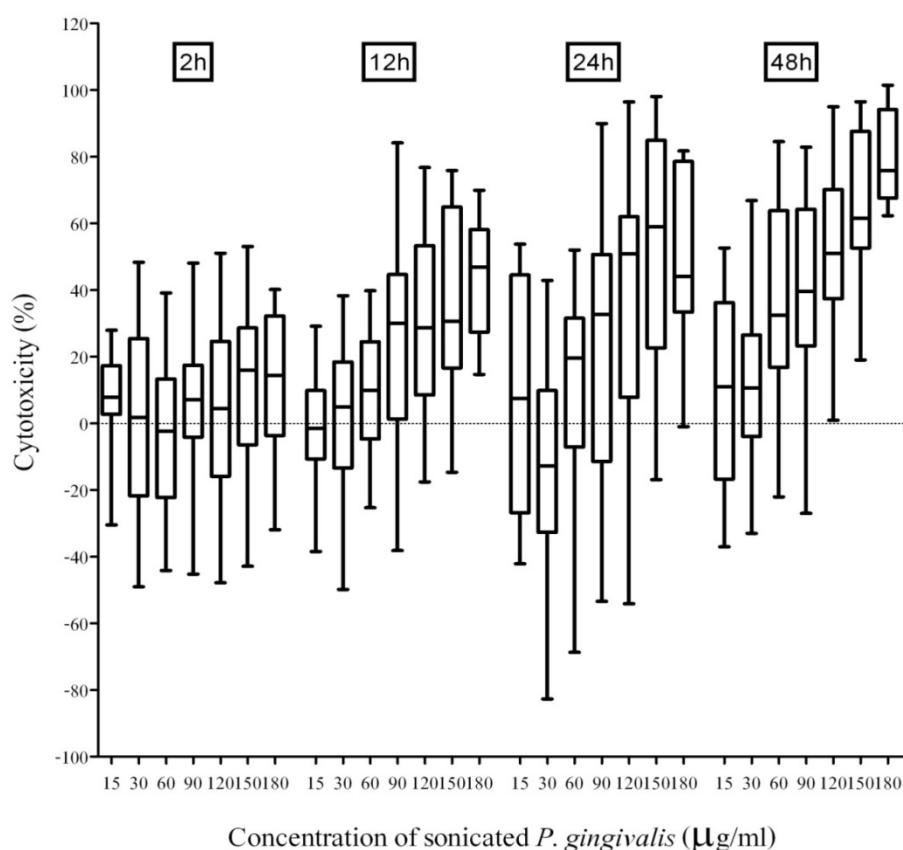
ND = not determine

IC₂₀ = ความเข้มข้นของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อซึ่งทำให้เซลล์สร้างกระดูกตายร้อยละ 20

IC₅₀ = ความเข้มข้นของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อซึ่งทำให้เซลล์สร้างกระดูกตายร้อยละ 50

จากข้อมูลรวมของอาสาสมัครทั้ง 4 คน เมื่อเซลล์สร้างกระดูกสัมผัสกับส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อด้วยความเข้มข้น 15 – 180 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบร้อยละการตายของเซลล์สร้างกระดูกเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารมากขึ้นในช่วงเวลา 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ยกเว้นช่วงเวลา 2 ชั่วโมงแม้ความเข้มข้นจะเพิ่มขึ้นถึง 180 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรร้อยละการตายก็ใกล้เคียงกับความเข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในแต่ละช่วงเวลา คือ 2, 12, 24 และ 48 ชั่วโมงพบว่าร้อยละการตายของเซลล์สร้างกระดูกจะเพิ่มขึ้นเมื่อสัมผัสสารนานขึ้น (ภาพที่ 28)

ความเข้มข้นของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อซึ่งทำให้เซลล์สร้างกระดูกตายร้อยละ 20 และ 50 แสดงดังตารางที่ 5



ภาพที่ 28 ความเป็นพิษของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อ *พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวัลิส* ที่ความเข้มข้น 150 – 180 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์ ของอาสาสมัครรวมทั้ง 4 คน ณ เวลาต่างๆ เส้นกึ่งกลางของ box plot แสดงค่ามัธยฐาน ขอบล่างและขอบบนของ box คือ ค่าสูงสุดและต่ำสุดของข้อมูล

ตารางที่ 5 ค่าความเข้มข้นของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อ *พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาไลส* ที่ทำให้เซลล์สร้างกระดูกปฐุมภูมิของมนุษย์ตายร้อยละ 20 และ 50 ในแต่ละช่วงเวลา โดยใช้ข้อมูลรวมของอาสาสมัครทั้ง 4 คน

ชั่วโมง	<i>P. gingivalis</i> ($\mu\text{g/ml}$)	
	IC ₂₀	IC ₅₀
2	ND	ND
12	89.91	>180
24	78.98	159.63
48	40.64	112.24

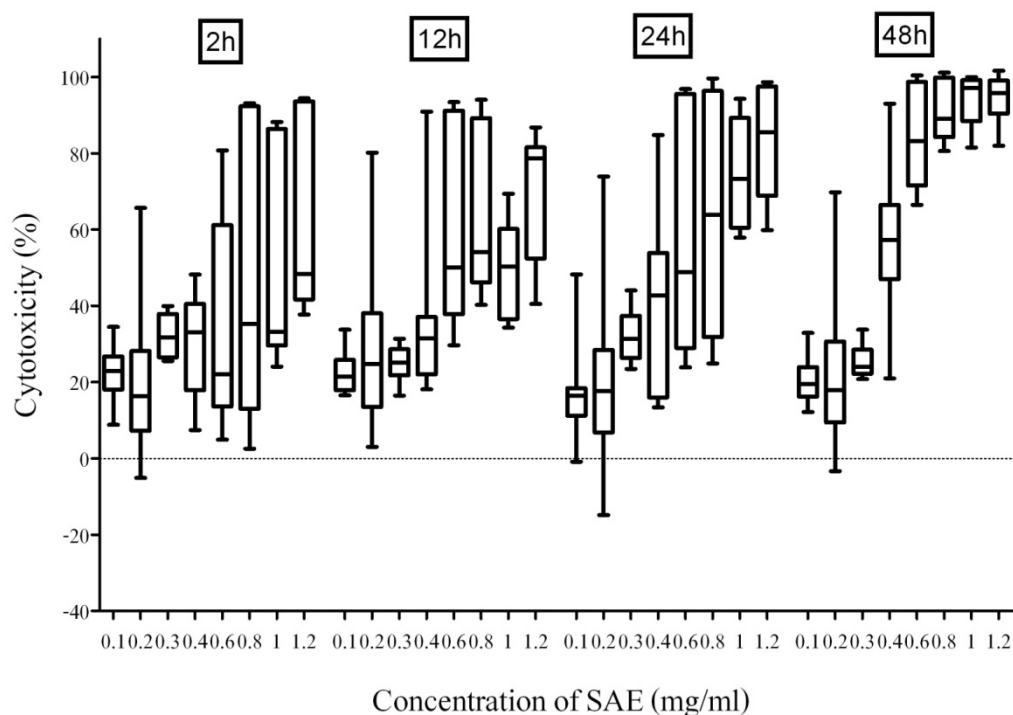
ND = not determine

IC₂₀ = ความเข้มข้นของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อซึ่งทำให้เซลล์สร้างกระดูกตายร้อยละ 20

IC₅₀ = ความเข้มข้นของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อซึ่งทำให้เซลล์สร้างกระดูกตายร้อยละ 50

2.1.2. ความเป็นพิษของสารสกัดจากใบช่อยต่อเซลล์สร้างกระดูกปฐุมภูมิของมนุษย์

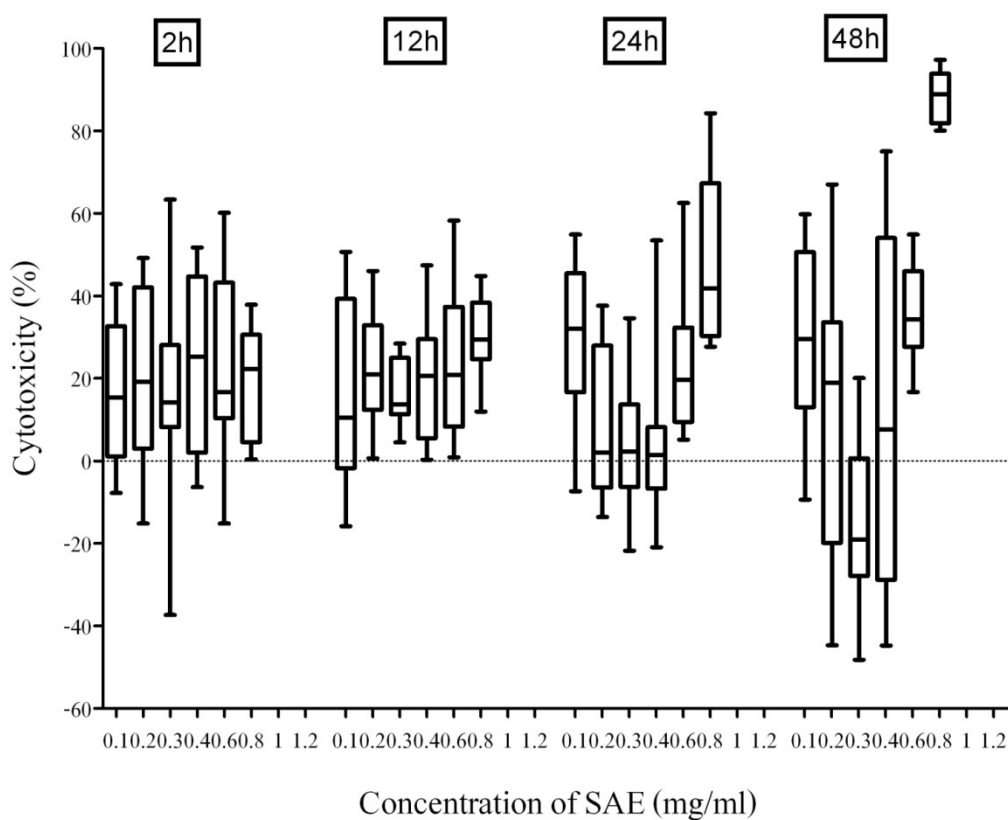
เซลล์สร้างกระดูกปฐุมภูมิของมนุษย์นำมาจากอาสาสมัครเพศชาย 3 คน และเพศหญิง 1 คน เมื่อสัมผัสกับสารสกัดจากใบช่อยพบว่าร้อยละการตายของเซลล์สร้างกระดูกแตกต่างกันในแต่ละคน โดยเซลล์สร้างกระดูกจากอาสาสมัครคนที่ 1 เมื่อนำมาทดสอบกับสารสกัดจากใบช่อยความเข้มข้น 0.1-1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร พบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารมากขึ้นร้อยละการตายของเซลล์สร้างกระดูกจะเพิ่มขึ้นในทุกช่วงเวลาคือ 2, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง นอกจากนี้ที่ความเข้มข้นของสารสกัดจากใบช่อยตั้งแต่ 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิตรในแต่ละช่วงเวลา คือ 2, 12, 24 และ 48 ชั่วโมงมีร้อยละการตายของเซลล์สร้างกระดูกจะเพิ่มขึ้นเมื่อสัมผัสสารนานขึ้น (ภาพที่ 29)



ภาพที่ 29 ความเป็นพิษของสารสกัดจากใบข่อยที่ความเข้มข้น 0.1 – 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อ เซลล์สร้างกระดูกปฐมนิของมนุษย์จากอาสาสมัครคนที่ 1 ณ เวลาต่างๆ เส้นกึ่งกลางของ box plot แสดงค่ามัธยฐาน ขอบล่างและขอบบนของ box คือ ค่าสูงสุดและต่ำสุดของข้อมูล

SAE = สารสกัดจากใบข่อย (*Streblus asper* leaf extract)

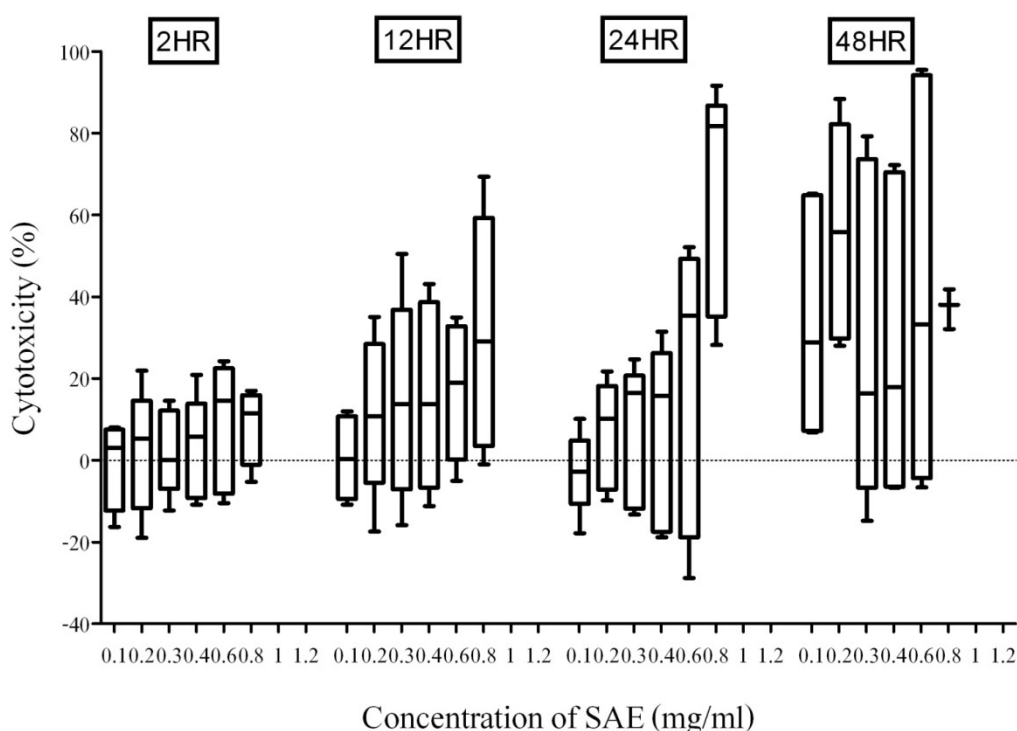
เซลล์สร้างกระดูกจากอาสาสมัครคนที่ 2 เมื่อนำมาทดสอบกับสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้น 0.1-0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าร้อยละการตายของเซลล์สร้างกระดูกปฐมนิของมนุษย์จะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารมากขึ้นที่ 12 ชั่วโมง แต่ที่เวลา 2 ชั่วโมงแม้ความเข้มข้นของสารสกัดจากใบข่อยจะเพิ่มขึ้นถึง 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ร้อยละการตายก็ใกล้เคียงกับความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงต้องมีความเข้มข้นของสารสกัดจากใบข่อยตั้งแต่ 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรจึงทำให้เซลล์ตายเพิ่มขึ้น นอกจากนี้เมื่อพิจารณาที่ความเข้มข้นของสารตั้งแต่ 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในแต่ละช่วงเวลา คือ 2, 12, 24 และ 48 ชั่วโมงพบว่าร้อยละการตายของเซลล์สร้างกระดูกจะเพิ่มขึ้นเมื่อสัมผัสสารนานขึ้น (ภาพที่ 30)



ภาพที่ 30 ความเป็นพิษของสารสกัดจากใบข่อยที่ความเข้มข้น 0.1 – 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเซลล์สร้างกระดูกปฐมนิของมนุษย์จากอาสาสมัครคนที่ 2 ณ เวลาต่างๆ เส้นกึ่งกลางของ box plot แสดงค่ามัธยฐาน ขอบล่างและขอบบนของ box คือ ค่าสูงสุดและต่ำสุดของข้อมูล

SAE = สารสกัดจากใบข่อย (*Streblus asper* leaf extract)

เซลล์สร้างกระดูกจากอาสาสมัครคนที่ 3 เมื่อนำมาทดสอบกับสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้น 0.1-0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าร้อยละการตายของเซลล์สร้างกระดูกปฐมนิของมนุษย์จะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารมากขึ้นในช่วงเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง แต่ที่เวลา 2 และ 48 ชั่วโมงแม้ความเข้มข้นจะเพิ่มขึ้นถึง 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ร้อยละการตายก็ใกล้เคียงกับความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 31)

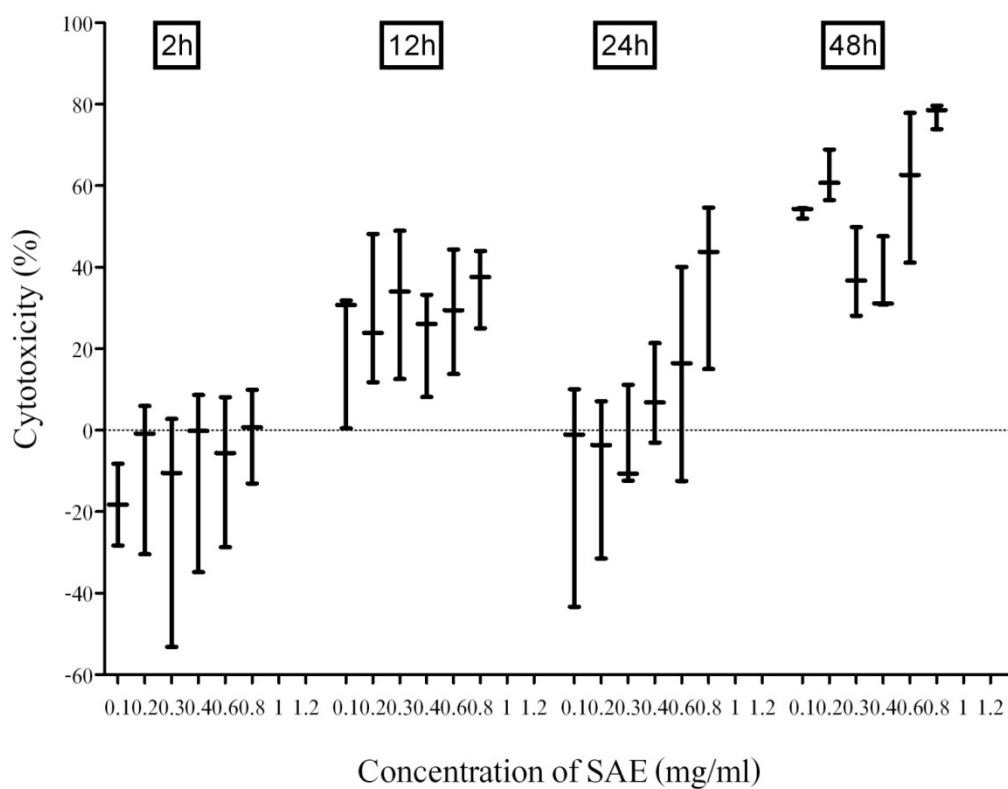


ภาพที่ 31 ความเป็นพิษของสารสกัดจากใบข่อยที่ความเข้มข้น 0.1 – 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อ เซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์จากอาสาสมัครคนที่ 3 ณ เวลาต่างๆ เส้นกึ่งกลางของ box plot แสดงค่ามัธยฐาน ขอบล่างและขอบบนของ box คือ ค่าสูงสุดและต่ำสุดของข้อมูล

SAE = สารสกัดจากใบข่อย (*Streblus asper* leaf extract)

เซลล์สร้างกระดูกจากอาสาสมัครคนที่ 4 เมื่อนำมาทดสอบกับสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้น 0.1-0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าร้อยละการตายของเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์จะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารมากขึ้นที่เวลา 24 ชั่วโมง แต่ที่เวลา 2 และ 12 ชั่วโมงแม้ความเข้มข้นจะเพิ่มขึ้นถึง 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ร้อยละการตายก็ใกล้เคียงกับความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และที่เวลา 48 ชั่วโมงพบว่าความเข้มข้นของสารสกัดจากใบข่อย 0.3 และ 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรทำให้เซลล์ตายลดลงกว่าความเข้มข้นอื่น จะเห็นว่าการตายของเซลล์สร้างกระดูกที่ 2 ชั่วโมงตายน้อยกว่าร้อยละ 9 นอกจากนี้ที่ความเข้มข้นของสารสกัดจากใบข่อย 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในแต่ละช่วงเวลา คือ 2, 12, 24 และ 48 ชั่วโมงพบว่าร้อยละการตายของเซลล์สร้างกระดูกจะเพิ่มขึ้นเมื่อสัมผัสสารนานขึ้น (ภาพที่ 32)

ความเข้มข้นของสารสกัดจากใบข่อยที่ทำให้เซลล์สร้างกระดูกตายร้อยละ 20 และ 50
ตารางที่ 6



ภาพที่ 32 ความเป็นพิษของสารสกัดจากใบข่อยที่ความเข้มข้น 0.1 – 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อ เซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์จากอาสาสมัครคนที่ 4 ณ เวลาต่างๆ เส้นกึ่งกลางของ box plot แสดงค่ามัธยฐาน ขอบล่างและขอบบนของ box คือ ค่าสูงสุดและต่ำสุดของข้อมูล

SAE = สารสกัดจากใบข่อย (*Streblus asper* leaf extract)

ตารางที่ 6 ค่าความเข้มข้นของสารสกัดจากใบข่อยที่ทำให้เซลล์สร้างกระดูกปฏิกิริยาของมนุษย์ตาย ร้อยละ 20 และ 50 ในแต่ละช่วงเวลา

ชั่วโมง	คนที่	<i>Streblus asper</i> leaf extract (mg/ml)	
		IC ₂₀	IC ₅₀
2	1	<0.1	0.94
	2	ND	ND
	3	>1.2	>1.2
	4	>1.2	>1.2
12	1	<0.1	0.70
	2	0.32	>1.2
	3	0.54	>1.2
	4	<0.1	>1.2
24	1	<0.1	0.58
	2	0.41	1.19
	3	0.44	0.79
	4	0.60	1.03
48	1	<0.1	0.43
	2	0.42	0.62
	3	<0.1	1.19
	4	<0.1	0.25

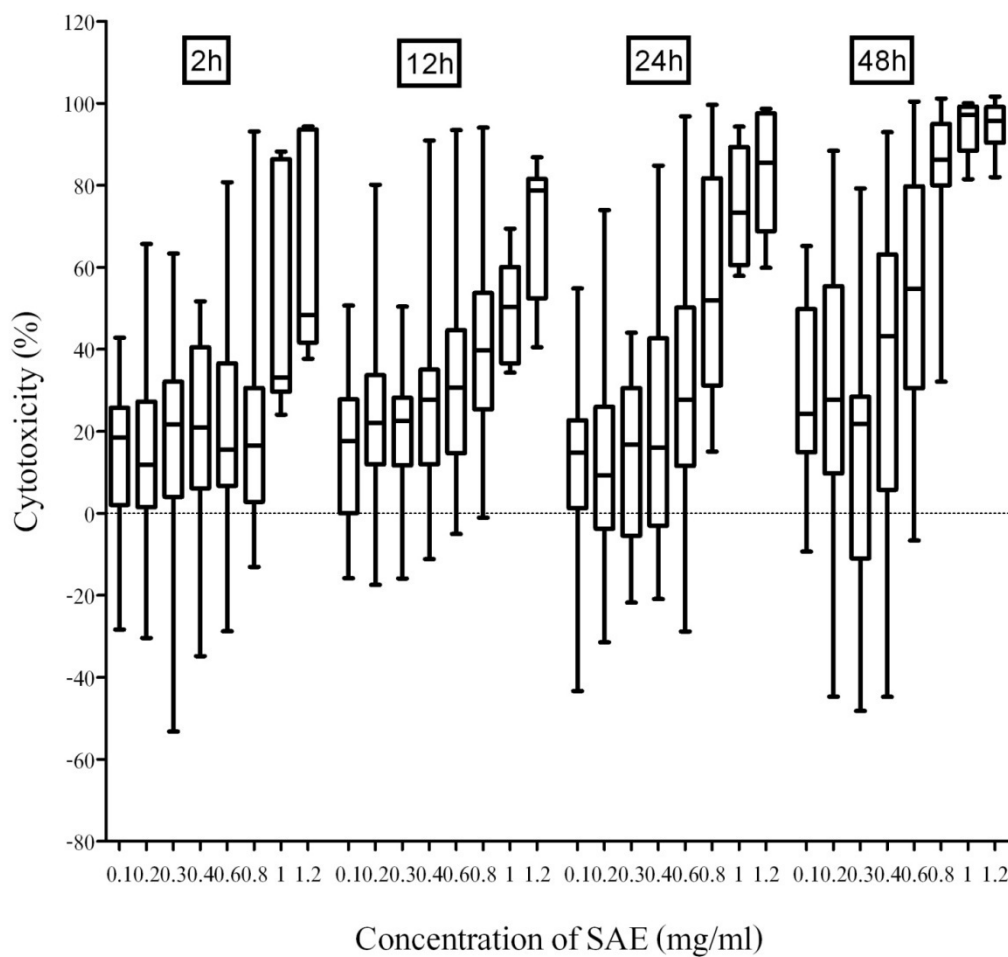
ND = not determine

IC₂₀ = ความเข้มข้นของสารสกัดจากใบข่อยซึ่งทำให้เซลล์สร้างกระดูกตายร้อยละ 20

IC₅₀ = ความเข้มข้นของสารสกัดจากใบข่อยซึ่งทำให้เซลล์สร้างกระดูกตายร้อยละ 50

จากข้อมูลรวมของอาสาสมัครทั้ง 4 คน เมื่อทดสอบกับสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้น 0.1-1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารมากขึ้นร้อยละการตายของเซลล์สร้างกระดูกจะเพิ่มขึ้นทุกช่วงเวลา 2, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง นอกจากนี้ที่ความเข้มข้นของสารสกัดจากใบข่อยตั้งแต่ 0.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในแต่ละช่วงเวลา คือ 2, 12, 24 และ 48 ชั่วโมงพบว่าร้อยละการตายของเซลล์สร้างกระดูกจะเพิ่มขึ้นเมื่อสัมผัสสารนานขึ้น (ภาพที่ 33)

ความเข้มข้นของสารสกัดจากใบข่อยที่ทำให้เซลล์สร้างกระดูกตายร้อยละ 20 และ 50 แสดงดังตารางที่ 7)



ภาพที่ 33 แสดงความเป็นพิษของสารสกัดจากใบข่อยที่ความเข้มข้น 0.1 – 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ต่อเซลล์สร้างกระดูกปฐมนิของมนุษย์ ของอาสาสมัครรวมทั้ง 4 คน ณ เวลาต่างๆ เส้นกึ่งกลางของ box plot แสดงค่ามัธยฐาน ขอบล่างและขอบบนของ box คือ ค่าสูงสุดและต่ำสุดของข้อมูล

SAE = สารสกัดจากใบข่อย (*Streblus asper* leaf extract)

ตารางที่ 7 ค่าความเข้มข้นของสารสกัดจากใบข่อยที่ทำให้เซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์ตายร้อยละ 20 และ 50 ในแต่ละช่วงเวลาโดยใช้ข้อมูลรวมของอาสาสมัครทั้ง 4 คน

ชั่วโมง	<i>Streblus asper</i> leaf extract (mg/ml)	
	IC ₂₀	IC ₅₀
2	0.39	1.12
12	0.22	0.92
24	0.31	0.74
48	0.14	0.53

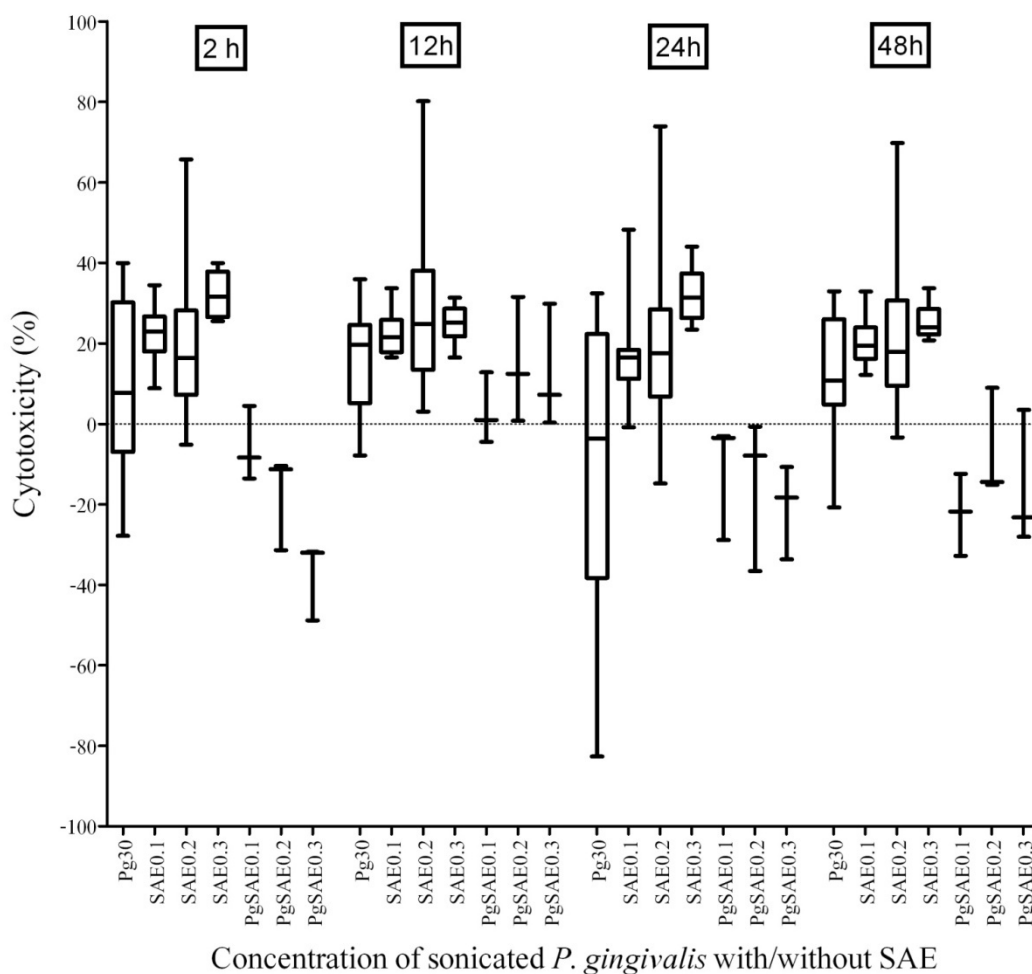
ND = not determine

IC₂₀ = ความเข้มข้นของสารที่ทดสอบซึ่งทำให้เซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์ตายร้อยละ 20

IC₅₀ = ความเข้มข้นของสารที่ทดสอบซึ่งทำให้เซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์ตายร้อยละ 50

2.1.3. ความเป็นพิษของส่วนผสมของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส และสารสกัดจากใบข่อยต่อเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์

ในการทดสอบนี้ได้พิจารณาเลือกความเข้มข้นของสารที่ทดสอบซึ่งทำให้เซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์ตายในช่วงร้อยละ 20 - 50 เมื่อสัมผัสสารนาน 48 ชั่วโมง ซึ่งในอาสาสมัครแต่ละคนให้ผลที่แตกต่างกันโดยพิจารณาเซลล์สร้างกระดูกจากอาสาสมัครคนที่ 1 เมื่อนำส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมาผสมกับสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้น 0.1, 0.2 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ มาทำการทดสอบซึ่งผลการศึกษาพบว่าเมื่อเซลล์สร้างกระดูกสัมผัสสารทั้ง 2 ชนิดร้อยละการตายลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับการใส่สารที่ทดสอบชนิดเดียวในทุกช่วงเวลา (ภาพที่ 34) และเมื่อเซลล์สร้างกระดูกสัมผัสสารทั้ง 2 ชนิดนาน 2 และ 24 ชั่วโมง พบว่าร้อยละการตายของเซลล์ลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดจากใบข่อยเพิ่มขึ้นจาก 0.1 - 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ที่ 12 และ 48 ชั่วโมงพบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดจากใบข่อยเพิ่มขึ้น ร้อยละการตายของเซลล์มีค่าใกล้เคียงกัน

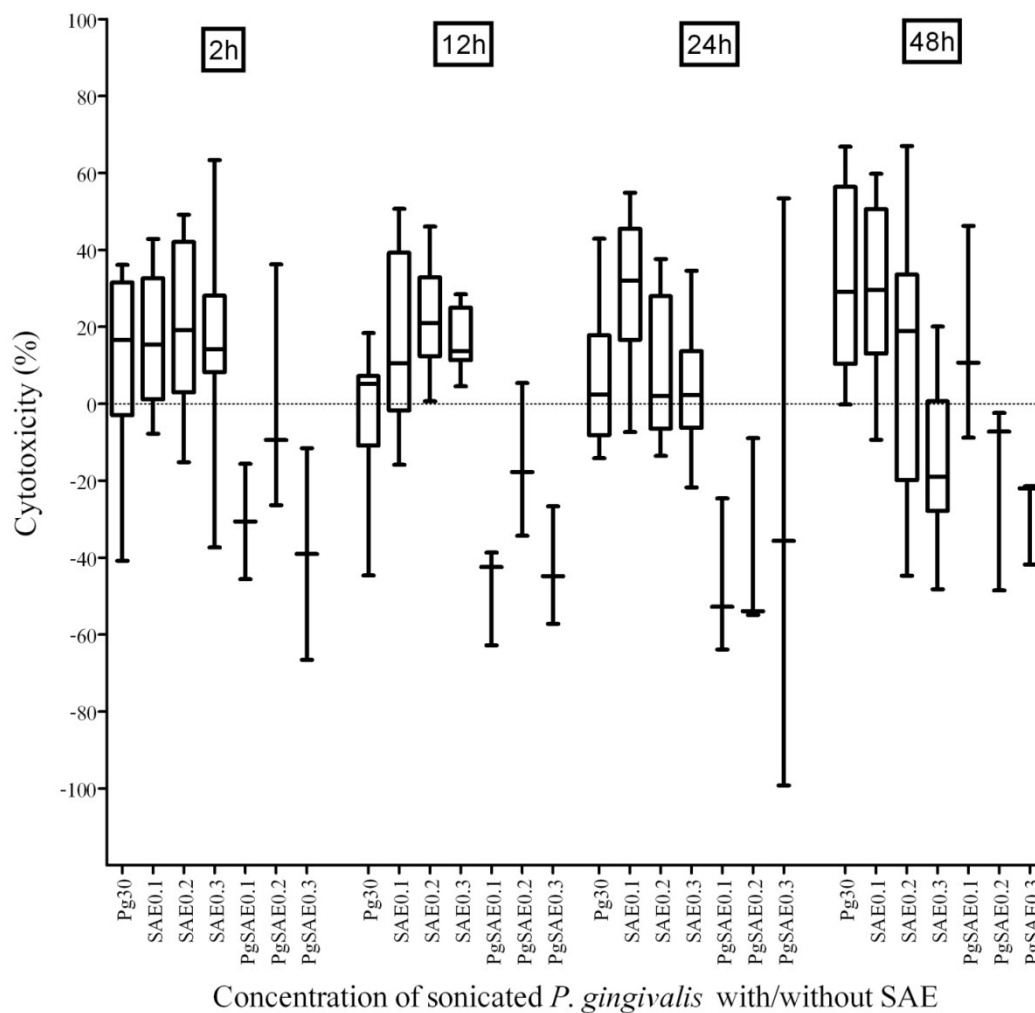


ภาพที่ 34 ความเป็นพิษของส่วนผสมของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Pg30) และสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้นต่างๆต่อเซลล์สร้างกระดูก ปฐมภูมิของมนุษย์จากอาสาสมัครคนที่ 1 ณ เวลาต่างๆ

SAE0.1, 0.2, 0.3 = สารสกัดจากใบข่อยที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

PgSAE0.1, PgSAE0.2, PgSAE0.3 = ส่วนผสมของสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส ขนาด 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งใส่ร่วมกับสารสกัดจากใบข่อยที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

เซลล์สร้างกระดูกของอาสาสมัครคนที่ 2 เมื่อนำส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมาผสมกับสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้น 0.1, 0.2 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ มาทำการทดสอบซึ่งผลการศึกษาพบว่าร้อยละการตายของเซลล์สร้างกระดูกเมื่อสัมผัสสารทั้ง 2 ชนิดลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับการใส่สารที่ทดสอบชนิดเดียวในช่วงเวลา 2, 12 และ 24 ชั่วโมง โดยที่เวลา 12 ชั่วโมงมีร้อยละการตายของเซลล์น้อยกว่า 5 (ภาพที่ 35) และเมื่อเซลล์สร้างกระดูกสัมผัสสารทั้ง 2 ชนิดนาน 48 ชั่วโมง พบว่าร้อยละการตายของเซลล์ลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดจากใบข่อยเพิ่มขึ้นจาก 0.1 - 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

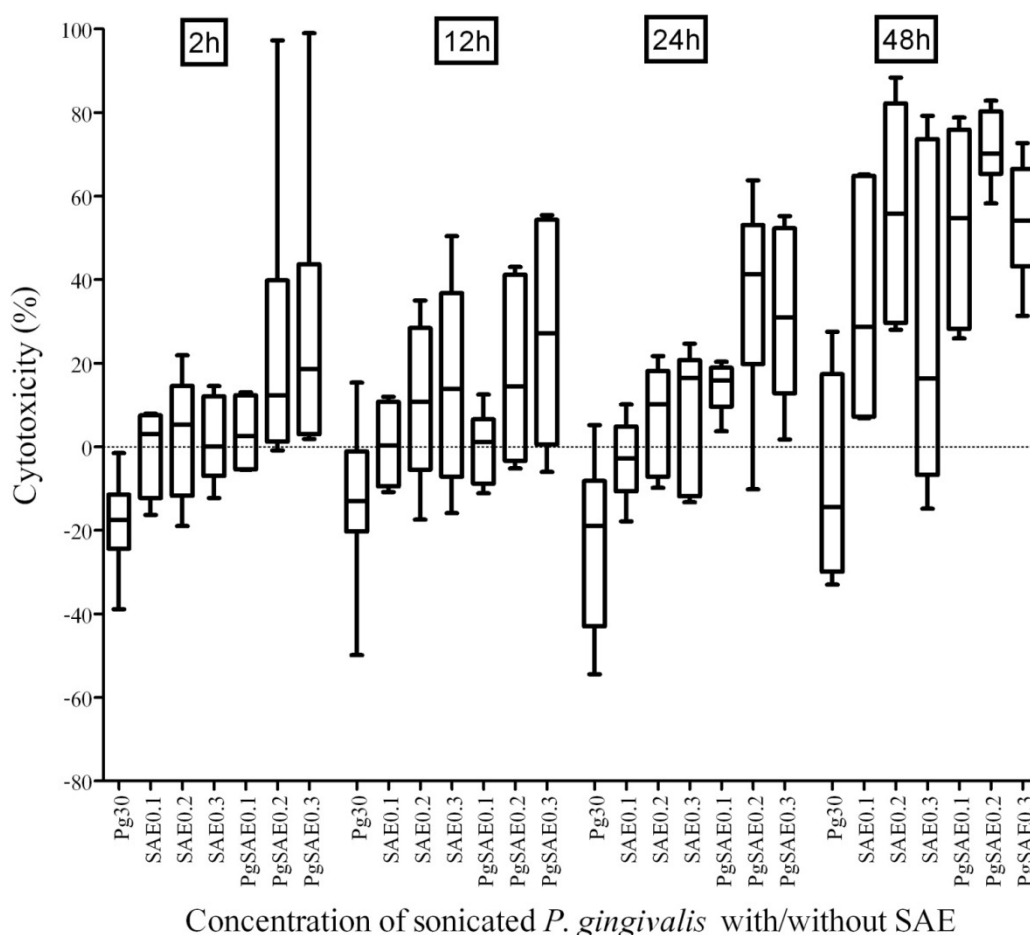


ภาพที่ 35 ความเป็นพิษของส่วนผสมของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจีวาลิส 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Pg30) และสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้นต่างๆต่อเซลล์สร้างกระดูก ปฐมภูมิของมนุษย์จากอาสาสมัครคนที่ 2 ณ เวลาต่างๆ

SAE0.1, 0.2, 0.3 = สารสกัดจากใบข่อยที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

PgSAE0.1, PgSAE0.2, PgSAE0.3 = ส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจีวาลิส ขนาด 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งใส่ร่วมกับสารสกัดจากใบข่อยที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

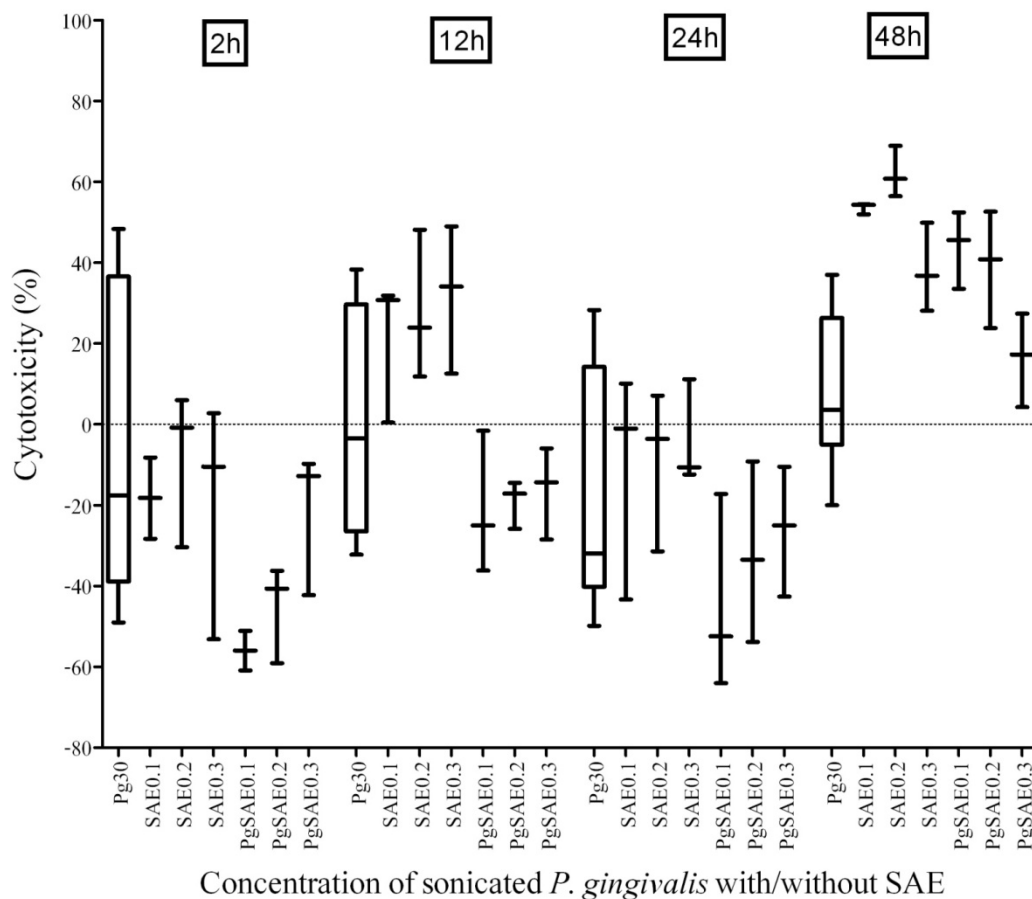
เซลล์สร้างกระดูกจากอาสาสมัครคนที่ 3 เมื่อนำส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมาผสมกับสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้น 0.1, 0.2 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ มาทำการทดสอบซึ่งผลการศึกษพบว่าร้อยละการตายของเซลล์สร้างกระดูกเมื่อสัมผัสสารทั้ง 2 ชนิดเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการใส่สารที่ทดสอบชนิดเดียวในช่วงเวลา 2, 12 และ 24 ชั่วโมง แต่ที่ 48 ชั่วโมงพบว่าร้อยละการตายของเซลล์เมื่อสัมผัสสารทั้ง 2 ชนิดมีค่าใกล้เคียงกับการใส่สารสกัดจากใบข่อยชนิดเดียว แต่เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อเพียงชนิดเดียวพบว่ามีร้อยละการตายมากกว่า และเมื่อเซลล์สร้างกระดูกสัมผัสสารทั้ง 2 ชนิดนาน 2, 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่าร้อยละการตายของเซลล์เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดจากใบข่อยเพิ่มขึ้นจาก 0.1 - 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 36)



ภาพที่ 36 ความเป็นพิษของส่วนผสมของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Pg 30) และสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้นต่างๆต่อเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์จากอาสาสมัครคนที่ 3 ณ เวลาต่างๆ

SAE0.1, 0.2, 0.3 = สารสกัดจากใบข่อยที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
 PgSAE0.1, PgSAE0.2, PgSAE0.3 = ส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อ *พอร์ไฟโรโมแนส* จิงจิवालีส ขนาด 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งใส่ร่วมกับสารสกัดจากใบข่อยที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

เซลล์สร้างกระดูกจากอาสาสมัครคนที่ 4 เมื่อนำส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมาผสมกับสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้น 0.1, 0.2 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ มาทำการทดสอบซึ่งผลการศึกษพบว่าร้อยละการตายของเซลล์สร้างกระดูกเมื่อสัมผัสสารทั้ง 2 ชนิดลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับการใส่สารที่ทดสอบชนิดเดียวในช่วงเวลา 12 ชั่วโมง แต่ที่เวลา 2, 24 และ 48 ชั่วโมง มีร้อยละการตายของเซลล์ใกล้เคียงกับเมื่อใส่สารที่ทดสอบชนิดเดียว และที่เวลา 48 ชั่วโมงพบว่าเมื่อเซลล์สัมผัสสารทั้ง 2 ชนิดร้อยละการตายของเซลล์ลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดจากใบข่อยเพิ่มขึ้นจาก 0.1 - 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อเซลล์สัมผัสสารนาน 2, 12 และ 24 ชั่วโมง ร้อยละการตายของเซลล์เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดจากใบข่อยเพิ่มขึ้นจาก 0.1 - 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งทั้ง 3 ช่วงเวลานี้ส่วนผสมของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อและสารสกัดจากใบข่อยไม่มีผลต่อการตายของเซลล์ (ภาพที่ 37)

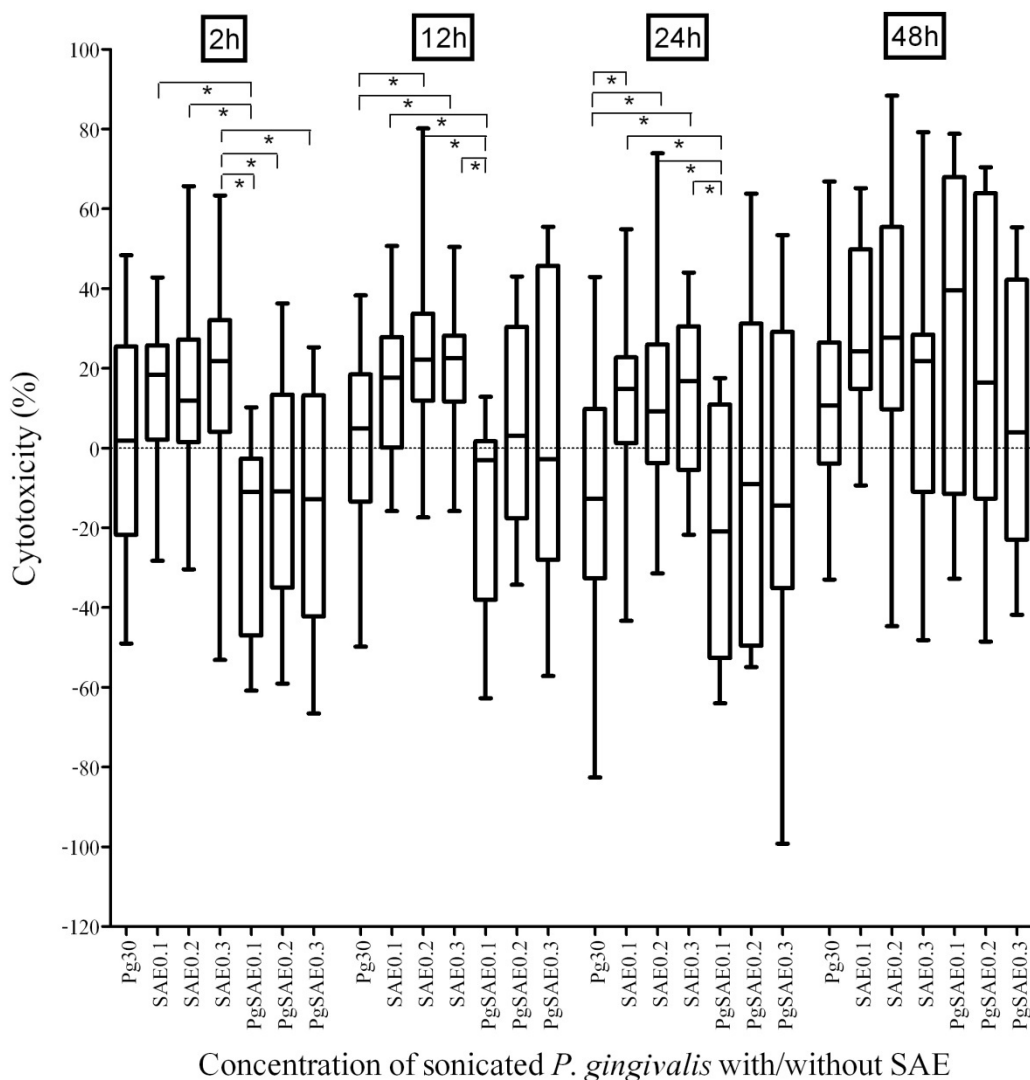


ภาพที่ 37 ความเป็นพิษของส่วนผสมของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Pg 30) และสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้นต่างๆต่อเซลล์สร้างกระดูกปฐมนุขของมนุษย์จากอาสาสมัครคนที่ 4 ณ เวลาต่างๆ

SAE0.1, 0.2, 0.3 = สารสกัดจากใบข่อยที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

PgSAE0.1, PgSAE0.2, PgSAE0.3 = ส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส ขนาด 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งใส่ร่วมกับสารสกัดจากใบข่อยที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

จากข้อมูลรวมของอาสาสมัครทั้ง 4 คน เมื่อนำส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมาผสมกับสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้น 0.1, 0.2 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ มาทำการทดสอบซึ่งผลการศึกษพบว่าร้อยละการตายของเซลล์สร้างกระดูกเมื่อสัมผัสสารทั้ง 2 ชนิดลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับการใส่สารที่ทดสอบชนิดเดียวในช่วงเวลา 2, 12 และ 24 ชั่วโมง ส่วนที่ 48 ชั่วโมงร้อยละการตายของเซลล์สร้างกระดูกเมื่อสัมผัสสารทั้ง 2 ชนิดมีค่าใกล้เคียงเมื่อเปรียบเทียบกับการใส่สารที่ทดสอบชนิดเดียว อย่างไรก็ตามเมื่อทำการทดสอบทางสถิติ พบว่าที่เวลา 2 ชั่วโมง ส่วนผสมของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อและสารสกัดจากใบข่อยที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าร้อยละการตายของเซลล์ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และเมื่อเซลล์สัมผัสสาร 2 ชนิดโดยที่สารสกัดจากใบข่อยมีความเข้มข้น 0.1, 0.2 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าร้อยละการตายลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ที่เวลา 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่าส่วนผสมของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อและสารสกัดจากใบข่อยที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าร้อยละการตายของเซลล์ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้น 0.1, 0.2 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนที่เวลา 48 ชั่วโมงร้อยละการตายของเซลล์สร้างกระดูกเมื่อสัมผัสสารทั้ง 2 ชนิดมีค่าแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับการใส่สารที่ทดสอบชนิดเดียว ดังภาพที่ 38 และตารางที่ 8



ภาพที่ 38 ความเป็นพิษของส่วนผสมของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจีวาลิส 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Pg 30) และสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้นต่างๆต่อเซลล์สร้างกระดูกปฐมนุญของมนุษย์จากอาสาสมัครรวมทั้ง 4 คน ณ เวลาต่างๆ

SAE0.1, 0.2, 0.3 = สารสกัดจากใบข่อยที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

PgSAE0.1, PgSAE0.2, PgSAE0.3 = ส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจีวาลิส ขนาด 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งใส่ร่วมกับสารสกัดจากใบข่อยที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

ตารางที่ 8 แสดงการวิเคราะห์โดยใช้ Dunn's multiple comparison test เพื่อเปรียบเทียบความเป็นพิษของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อ *ฟอร์ไฟโรโมแนส* จิงจิवालีส สารสกัดจากใบข่อย ส่วนผสมของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อกับสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้นต่างๆต่อเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์จากอาสาสมัครรวมทั้ง 4 คน ที่ 2 ชั่วโมง

listing	difference in rank sum	p-value<0.05
Pg30 vs SAE0.1	-23.01	ns
Pg30 vs SAE0.2	-21.84	ns
Pg30 vs SAE0.3	-29.78	ns
Pg30 vs PgSAE0.1	33.92	ns
Pg30 vs PgSAE0.2	20.31	ns
Pg30 vs PgSAE0.3	27.04	ns
SAE0.1 vs SAE0.2	1.172	ns
SAE0.1 vs SAE0.3	-6.769	ns
SAE0.1 vs PgSAE0.1	56.93	*
SAE0.1 vs PgSAE0.2	43.31	ns
SAE0.1 vs PgSAE0.3	50.05	ns
SAE0.2 vs SAE0.3	-7.941	ns
SAE0.2 vs PgSAE0.1	55.76	*
SAE0.2 vs PgSAE0.2	42.14	ns
SAE0.2 vs PgSAE0.3	48.88	ns
SAE0.3 vs PgSAE0.1	63.70	*
SAE0.3 vs PgSAE0.2	50.08	*
SAE0.3 vs PgSAE0.3	56.82	*
PgSAE0.1 vs PgSAE0.2	-13.62	ns
PgSAE0.1 vs PgSAE0.3	-6.882	ns
PgSAE0.2 vs PgSAE0.3	6.735	ns

ตารางที่ 9 แสดงการวิเคราะห์โดยใช้ Dunn's multiple comparison test เพื่อเปรียบเทียบความเป็นพิษของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวัลิส สารสกัดจากใบข่อย ส่วนผสมของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อกับสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้นต่างๆต่อเซลล์สร้างกระดูกปฐุมภูมิของมนุษย์จากอาสาสมัครรวมทั้ง 4 คน ที่ 12 ชั่วโมง

listing	difference in rank sum	p-value<0.05
Pg30 vs SAE0.1	-32.08	ns
Pg30 vs SAE0.2	-46.95	*
Pg30 vs SAE0.3	-44.96	*
Pg30 vs PgSAE0.1	27.60	ns
Pg30 vs PgSAE0.2	-9.981	ns
Pg30 vs PgSAE0.3	-7.564	ns
SAE0.1 vs SAE0.2	-14.87	ns
SAE0.1 vs SAE0.3	-12.88	ns
SAE0.1 vs PgSAE0.1	59.68	*
SAE0.1 vs PgSAE0.2	22.10	ns
SAE0.1 vs PgSAE0.3	24.52	ns
SAE0.2 vs SAE0.3	1.995	ns
SAE0.2 vs PgSAE0.1	74.56	*
SAE0.2 vs PgSAE0.2	36.97	ns
SAE0.2 vs PgSAE0.3	39.39	ns
SAE0.3 vs PgSAE0.1	72.56	*
SAE0.3 vs PgSAE0.2	34.98	ns
SAE0.3 vs PgSAE0.3	37.39	ns
PgSAE0.1 vs PgSAE0.2	-37.58	ns
PgSAE0.1 vs PgSAE0.3	-35.17	ns
PgSAE0.2 vs PgSAE0.3	2.417	ns

ตารางที่ 10 แสดงการวิเคราะห์โดยใช้ Dunn's multiple comparison test เพื่อเปรียบเทียบความเป็นพิษของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวัลิส สารสกัดจากใบข่อย ส่วนผสมของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อกับสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้นต่างๆต่อเซลล์สร้างกระดูกปฐมนิของมนุษย์จากอาสาสมัครรวมทั้ง 4 คน ที่ 24 ชั่วโมง

listing	difference in rank sum	p-value<0.05
Pg30 vs SAE0.1	-44.07	*
Pg30 vs SAE0.2	-37.92	*
Pg30 vs SAE0.3	-42.66	*
Pg30 vs PgSAE0.1	14.08	ns
Pg30 vs PgSAE0.2	-2.756	ns
Pg30 vs PgSAE0.3	-5.423	ns
SAE0.1 vs SAE0.2	6.146	ns
SAE0.1 vs SAE0.3	1.406	ns
SAE0.1 vs PgSAE0.1	58.15	*
SAE0.1 vs PgSAE0.2	41.31	ns
SAE0.1 vs PgSAE0.3	38.65	ns
SAE0.2 vs SAE0.3	-4.740	ns
SAE0.2 vs PgSAE0.1	52.00	*
SAE0.2 vs PgSAE0.2	35.17	ns
SAE0.2 vs PgSAE0.3	32.50	ns
SAE0.3 vs PgSAE0.1	56.74	*
SAE0.3 vs PgSAE0.2	39.91	ns
SAE0.3 vs PgSAE0.3	37.24	ns
PgSAE0.1 vs PgSAE0.2	-16.83	ns
PgSAE0.1 vs PgSAE0.3	-19.50	ns
PgSAE0.2 vs PgSAE0.3	-2.667	ns

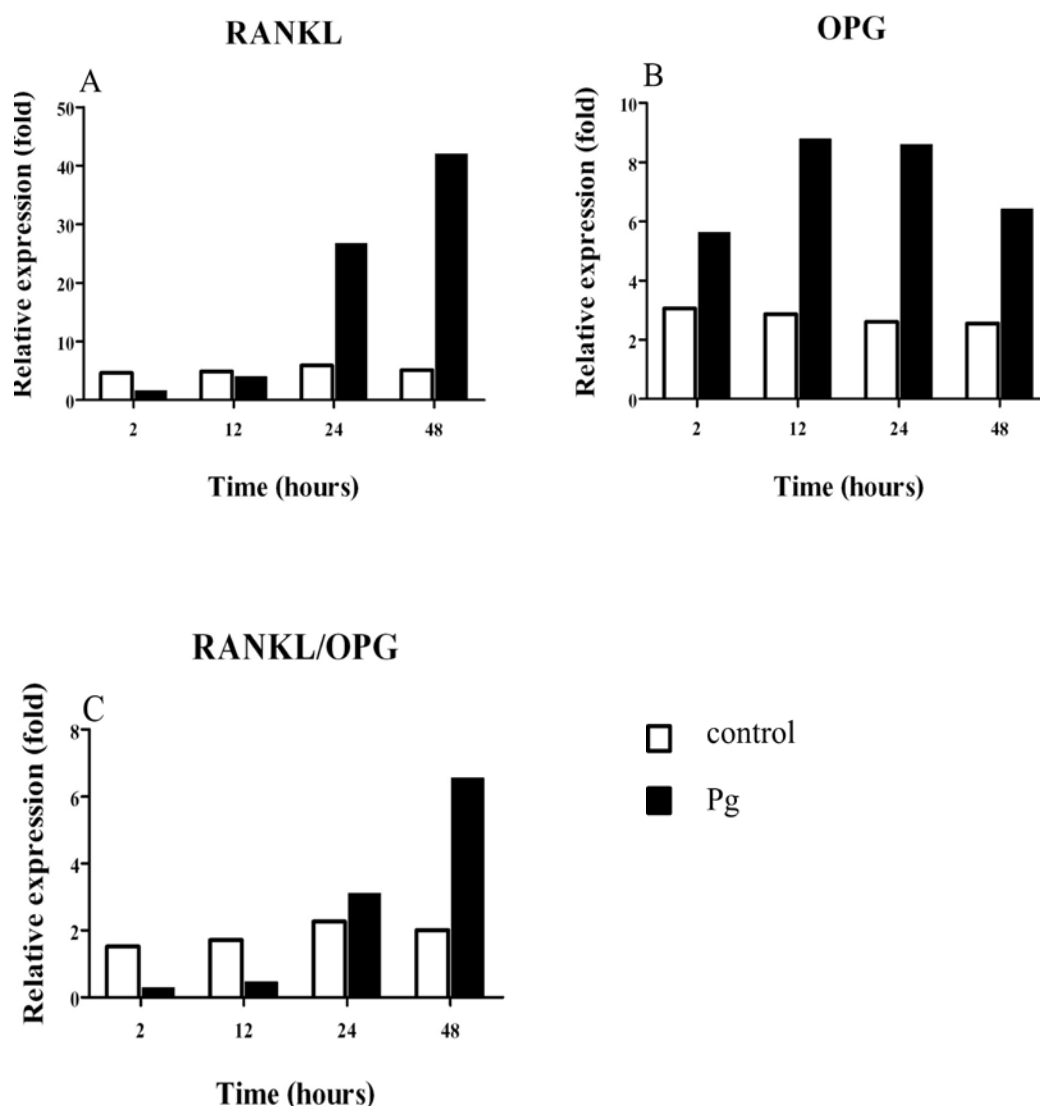
ตารางที่ 11 แสดงการวิเคราะห์โดยใช้ Dunn's multiple comparison test เพื่อเปรียบเทียบความเป็นพิษของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวัลิส สารสกัดจากใบข่อย ส่วนผสมของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อกับสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้นต่างๆต่อเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์จากอาสาสมัครรวมทั้ง 4 คน ที่ 48 ชั่วโมง

listing	difference in rank sum	p-value<0.05
Pg30 vs SAE0.1	-31.51	ns
Pg30 vs SAE0.2	-27.79	ns
Pg30 vs SAE0.3	-4.508	ns
Pg30 vs PgSAE0.1	-28.46	ns
Pg30 vs PgSAE0.2	-15.79	ns
Pg30 vs PgSAE0.3	7.295	ns
SAE0.1 vs SAE0.2	3.720	ns
SAE0.1 vs SAE0.3	27.00	ns
SAE0.1 vs PgSAE0.1	3.053	ns
SAE0.1 vs PgSAE0.2	15.72	ns
SAE0.1 vs PgSAE0.3	38.80	ns
SAE0.2 vs SAE0.3	23.28	ns
SAE0.2 vs PgSAE0.1	-0.667	ns
SAE0.2 vs PgSAE0.2	12.00	ns
SAE0.2 vs PgSAE0.3	35.08	ns
SAE0.3 vs PgSAE0.1	-23.95	ns
SAE0.3 vs PgSAE0.2	-11.28	ns
SAE0.3 vs PgSAE0.3	11.80	ns
PgSAE0.1 vs PgSAE0.2	12.67	ns
PgSAE0.1 vs PgSAE0.3	35.75	ns
PgSAE0.2 vs PgSAE0.3	23.08	ns

2.2. การแสดงออกของเงินแรงค์แอลและ โอฟีจี

ทำการศึกษา นำร่อง โดยเลือกความเข้มข้นของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อ *พอร์ไฟโรโมแนส* จิง *จิवालิส* 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาทดสอบกับเซลล์สร้างกระดูกเพื่อดูการแสดงออกของเงินแรงค์แอลและโอฟีจีที่เวลา 2, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง โดยทำการทดลองกับเซลล์สร้างกระดูกของอาสาสมัครคนที่ 2 เพื่อเลือกช่วงเวลาที่มีการแสดงออกของเงินแรงค์แอลและโอฟีจีซึ่งเพิ่มขึ้นชัดเจนไปทำการศึกษาต่อไป

ผลการศึกษาพบว่าเซลล์สร้างกระดูกของอาสาสมัครคนที่ 2 หลังจากกระตุ้นด้วยส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อ *พอร์ไฟโรโมแนส* จิง *จิवालิส* ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีการแสดงออกของเงินแรงค์แอลเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน ณ เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์สร้างกระดูกที่ไม่ได้ถูกกระตุ้น (control) โดยคิดเป็น 4.52 และ 8.18 เท่าตามลำดับ (ภาพที่ 39A) แต่การแสดงออกของเงินโอฟีจีจะเพิ่มขึ้นทุกช่วงเวลาเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์สร้างกระดูกที่ไม่ได้ถูกกระตุ้น โดยคิดเป็น 1.84, 3.06, 3.29 และ 2.51 เท่าตามลำดับจากเวลาน้อยไปมาก (ภาพที่ 39B) และเมื่อพิจารณาสัดส่วนการแสดงออกของเงินแรงค์แอลต่อเงินโอฟีจี พบว่าสัดส่วนการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อเซลล์สร้างกระดูกถูกกระตุ้นด้วยส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อนาน 24 และ 48 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบกับเซลล์สร้างกระดูกที่ไม่ได้ถูกกระตุ้น โดยคิดเป็น 1.37 และ 3.26 เท่าตามลำดับ (ภาพที่ 39C)



ภาพที่ 39 การแสดงออกของจิ้นเรงค์แอล (A) และโอพีจี (B) และสัดส่วนการแสดงออกของจิ้นเรงค์แอลต่อจิ้นโอพีจี (C) ภายหลังจากเซลล์สร้างกระดูก (control) ของอาสาสมัครคนที่ 2 สัมผัสกับส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालีส (Pg) ณ เวลาต่างๆ

จากผลการศึกษาดังกล่าวจึงเลือกช่วงเวลา 24 และ 48 ชั่วโมงไปทำการศึกษาผลของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालีสความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเมื่อผสมกับสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้น 0.1, 0.2 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการแสดงออกของจิ้นเรงค์แอลและโอพีจีเพื่อจะเลือกความเข้มข้นของสารสกัดจากใบข่อยที่เหมาะสมไปศึกษาต่อในเซลล์สร้างกระดูกของอาสาสมัครคนอื่นๆต่อไป

การแสดงออกของเงินแรงค์แอลที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงของเซลล์สร้างกระดูกที่ไม่ได้ถูกกระตุ้น (control) เซลล์ที่สัมผัสส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และเซลล์ที่สัมผัสสารทดสอบทั้ง 2 ชนิดพบว่ามีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) เมื่อคิดเป็นจำนวนเท่าโดยเปรียบเทียบกับเซลล์สร้างกระดูกที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นพบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเซลล์สัมผัสส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อ สัมผัสสารทดสอบทั้ง 2 ชนิดที่มีสารสกัดจากใบข่อยเข้มข้น 0.1, 0.2 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร มีการแสดงออกของเงินแรงค์แอลเป็น 1.64, 0.85, 1.26 และ 1.09 เท่าตามลำดับ และที่เวลา 48 ชั่วโมงพบว่าการแสดงออกของเงินแรงค์แอลเป็น 11.19, 14.90, 7.58 และ 36.55 เท่าตามลำดับ (ภาพที่ 40A)

การแสดงออกของเงินโอพีจีที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงของเซลล์สร้างกระดูกที่ไม่ได้ถูกกระตุ้น (control) เซลล์ที่สัมผัสส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และเซลล์ที่สัมผัสสารทดสอบทั้ง 2 ชนิดพบว่ามีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) เมื่อคิดเป็นจำนวนเท่าโดยเปรียบเทียบกับเซลล์สร้างกระดูกที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นพบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเซลล์สัมผัสส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อ สัมผัสสารทดสอบทั้ง 2 ชนิดที่มีสารสกัดจากใบข่อยเข้มข้น 0.1, 0.2 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร มีการแสดงออกของเงินโอพีจีเป็น 1.31, 1.41, 0.84 และ 0.44 เท่าตามลำดับ และที่เวลา 48 ชั่วโมงพบว่าการแสดงออกของเงินโอพีจีเป็น 2.61, 4.41, 1.64 และ 14.07 เท่าตามลำดับ (ภาพที่ 40B)

สัดส่วนการแสดงออกของเงินแรงค์แอลต่อเงินโอพีจีที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงของเซลล์สร้างกระดูกที่ไม่ได้ถูกกระตุ้น (control) เซลล์ที่สัมผัสส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และเซลล์ที่สัมผัสสารทดสอบทั้ง 2 ชนิดพบว่ามีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) เมื่อคิดเป็นจำนวนเท่าโดยเปรียบเทียบกับเซลล์สร้างกระดูกที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นพบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเซลล์สัมผัสส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อ สัมผัสสารทดสอบทั้ง 2 ชนิดที่มีสารสกัดจากใบข่อยเข้มข้น 0.1, 0.2 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร มีการแสดงออกของสัดส่วนเป็น 1.26, 0.59, 1.57 และ 2.36 เท่าตามลำดับ และที่เวลา 48 ชั่วโมงพบว่าการแสดงออกของเงินโอพีจีเป็น 4.29, 3.38, 4.63 และ 2.59 เท่าตามลำดับ (ภาพที่ 40C)

จากข้อมูลสัดส่วนการแสดงออกของเงินแรงค์แอลต่อเงินโอพีจี เมื่อเซลล์สัมผัสกับสารทดสอบทั้ง 2 ชนิดที่มีสารสกัดจากใบข่อยเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตรที่เวลา 24 ชั่วโมงพบว่าการแสดงออกสัดส่วนน้อยที่สุดคือ 0.59 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์สร้างกระดูกที่ไม่ได้ถูกกระตุ้น จึงเลือกศึกษาที่ช่วงเวลา 24 ชั่วโมง และทดสอบในสารทดสอบ 2 ชนิดโดยใช้ความเข้มข้นของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรผสมกับสารสกัดจากใบข่อยเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตรเพื่อศึกษากับเซลล์สร้างกระดูกของอาสาสมัครทั้ง 4 คนต่อไป

ตารางที่12 แสดงการวิเคราะห์โดยใช้ Dunn's multiple comparison test เพื่อเปรียบเทียบการ
แสดงออกของยีนแรงกิ้งแอลของเซลล์สร้างกระดูกจากอาสาสมัครคนที่ 2 ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง

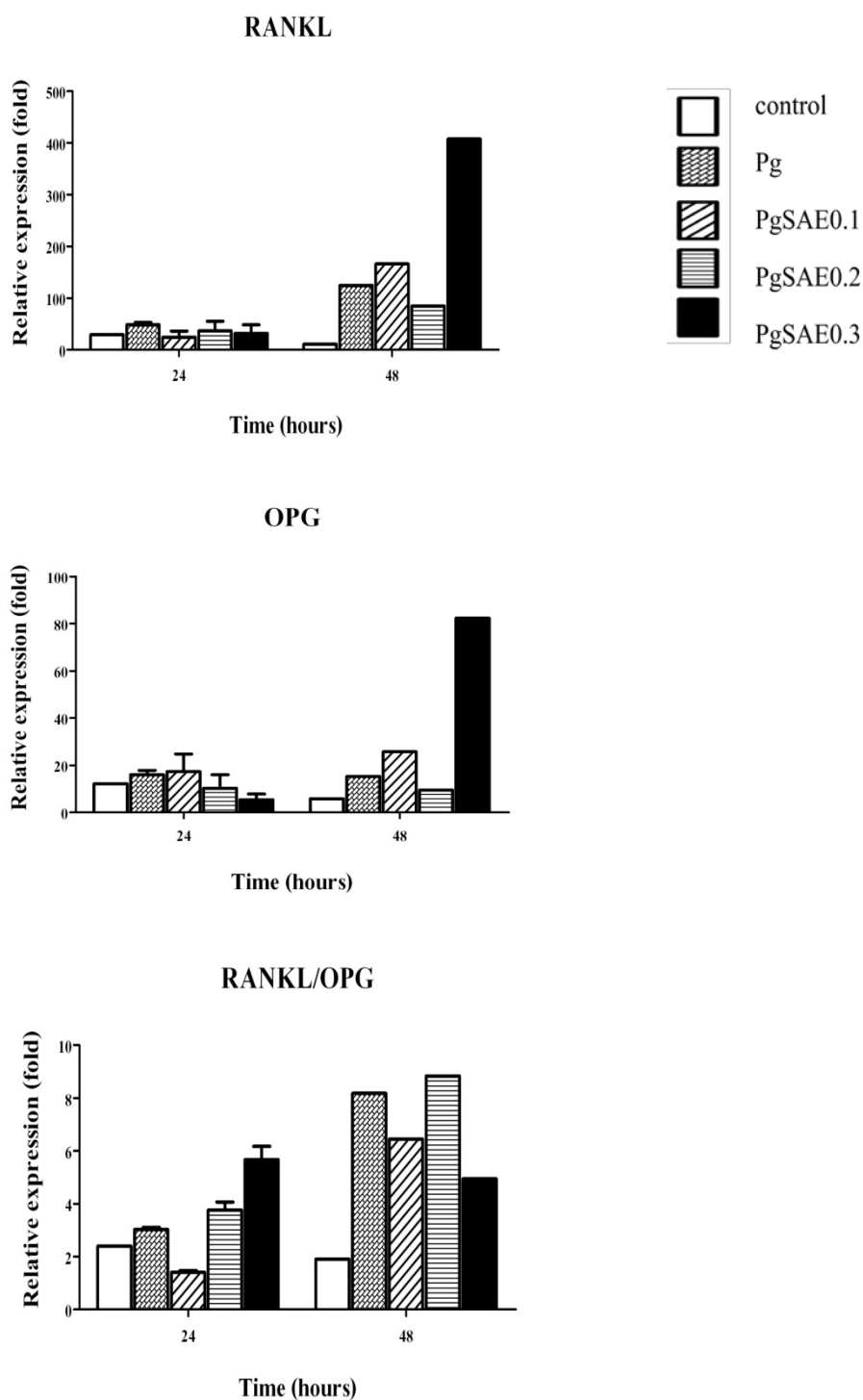
time	listing	difference in rank sum	p-value<0.05
24	control vs Pg30	-3.000	ns
	control vs PgSAE0.1	1.000	ns
	control vs PgSAE0.2	-2.000	ns
	control vs PgSAE0.3	-0.500	ns
	Pg30 vs PgSAE0.1	4.000	ns
	Pg30 vs PgSAE0.2	1.000	ns
	Pg30 vs PgSAE0.3	2.500	ns
	PgSAE0.1 vs PgSAE0.2	-3.000	ns
	PgSAE0.1 vs PgSAE0.3	-1.500	ns
	PgSAE0.2 vs PgSAE0.3	1.500	ns
48	control vs Pg30	-2.000	ns
	control vs PgSAE0.1	-3.000	ns
	control vs PgSAE0.2	-1.000	ns
	control vs PgSAE0.3	-4.000	ns
	Pg30 vs PgSAE0.1	-1.000	ns
	Pg30 vs PgSAE0.2	1.000	ns
	Pg30 vs PgSAE0.3	-2.000	ns
	PgSAE0.1 vs PgSAE0.2	2.000	ns
	PgSAE0.1 vs PgSAE0.3	-1.000	ns
	PgSAE0.2 vs PgSAE0.3	-3.000	ns

ตารางที่ 12 แสดงการวิเคราะห์โดยใช้ Dunn's multiple comparison test เพื่อเปรียบเทียบการ
แสดงออกของยีน ไอพีจีของเซลล์สร้างกระดูกจากอาสาสมัครคนที่ 2 ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง

time	listing	difference in rank sum	p-value<0.05
24	control vs Pg30	-2.000	ns
	control vs PgSAE0.1	-1.500	ns
	control vs PgSAE0.2	0.500	ns
	control vs PgSAE0.3	3.000	ns
	Pg30 vs PgSAE0.1	0.500	ns
	Pg30 vs PgSAE0.2	2.500	ns
	Pg30 vs PgSAE0.3	5.000	ns
	PgSAE0.1 vs PgSAE0.2	2.000	ns
	PgSAE0.1 vs PgSAE0.3	4.500	ns
	PgSAE0.2 vs PgSAE0.3	2.500	ns
48	control vs Pg30	-2.000	ns
	control vs PgSAE0.1	-3.000	ns
	control vs PgSAE0.2	-1.000	ns
	control vs PgSAE0.3	-4.000	ns
	Pg30 vs PgSAE0.1	-1.000	ns
	Pg30 vs PgSAE0.2	1.000	ns
	Pg30 vs PgSAE0.3	-2.000	ns
	PgSAE0.1 vs PgSAE0.2	2.000	ns
	PgSAE0.1 vs PgSAE0.3	-1.000	ns
	PgSAE0.2 vs PgSAE0.3	-3.000	ns

ตารางที่ 13 แสดงการวิเคราะห์โดยใช้ Dunn's multiple comparison test เพื่อเปรียบเทียบสัดส่วนการแสดงออกของยีนแรงค์แอลต่อยีน โอพีจีของเซลล์สร้างกระดูกจากอาสาสมัครคนที่ 2 ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง

time	listing	difference in rank sum	p-value<0.05
24	control vs Pg30	-1.500	ns
	control vs PgSAE0.1	1.500	ns
	control vs PgSAE0.2	-3.500	ns
	control vs PgSAE0.3	-5.500	ns
	Pg30 vs PgSAE0.1	3.000	ns
	Pg30 vs PgSAE0.2	-2.000	ns
	Pg30 vs PgSAE0.3	-4.000	ns
	PgSAE0.1 vs PgSAE0.2	-5.000	ns
	PgSAE0.1 vs PgSAE0.3	-7.000	ns
	PgSAE0.2 vs PgSAE0.3	-2.000	ns
48	control vs Pg30	-3.000	ns
	control vs PgSAE0.1	-2.000	ns
	control vs PgSAE0.2	-4.000	ns
	control vs PgSAE0.3	-1.000	ns
	Pg30 vs PgSAE0.1	1.000	ns
	Pg30 vs PgSAE0.2	-1.000	ns
	Pg30 vs PgSAE0.3	2.000	ns
	PgSAE0.1 vs PgSAE0.2	-2.000	ns
	PgSAE0.1 vs PgSAE0.3	1.000	ns
	PgSAE0.2 vs PgSAE0.3	3.000	ns



ภาพที่ 40 การแสดงออกของยีนเรงก์แอล (A) และโอพีจี (B) และสัดส่วนการแสดงออกของยีนเรงก์แอลต่อยีนโอพีจี (C) ภายหลังจากเซลล์สร้างกระดูก (control) ของอาสาสมัครคนที่ 2 สัมผัสส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालีส (Pg) ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งผสมกับสารสกัดจากใบข่อย (SAE) เพิ่มขึ้น 0.1, 0.2 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ณ เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

การแสดงออกของเงินแรงค์แอลจากเซลล์สร้างกระดูกในอาสาสมัครแต่ละคนทั้ง 4 คน ที่เวลา 24 ชั่วโมงเมื่อเซลล์สร้างกระดูกที่ไม่ได้ถูกกระตุ้น (control) เซลล์ที่สัมผัสส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เซลล์ที่สัมผัสสารสกัดจากใบข่อยเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเซลล์ที่สัมผัสสารทดสอบทั้ง 2 ชนิดพบว่ามีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) เมื่อคิดเป็นจำนวนเท่าโดยเปรียบเทียบกับเซลล์สร้างกระดูกที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นพบว่า เซลล์สร้างกระดูกจากอาสาสมัครคนที่ 1 เมื่อเซลล์สัมผัสส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อ สัมผัสสารสกัดจากใบข่อยเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สัมผัสสารทดสอบทั้ง 2 ชนิด มีการแสดงออกของเงินแรงค์แอลเป็น 50.21, 1.65 และ 88.00 เท่าตามลำดับ เซลล์สร้างกระดูกจากอาสาสมัครคนที่ 2 มีการแสดงออกของเงินแรงค์แอลเป็น 1.42, 0.88 และ 5.41 เท่าตามลำดับ เซลล์สร้างกระดูกจากอาสาสมัครคนที่ 3 มีการแสดงออกของเงินแรงค์แอลเป็น 0.38, 0.09 และ 6.49 เท่าตามลำดับ เซลล์สร้างกระดูกจากอาสาสมัครคนที่ 4 มีการแสดงออกของเงินแรงค์แอลเป็น 1.78, 1.43 และ 38.74 เท่าตามลำดับ (ภาพที่ 41, 42, 43, 44)

การแสดงออกของเงินโอพีจีจากเซลล์สร้างกระดูกในอาสาสมัครแต่ละคนทั้ง 4 คน ที่เวลา 24 ชั่วโมงเมื่อเซลล์สร้างกระดูกที่ไม่ได้ถูกกระตุ้น (control) เซลล์ที่สัมผัสส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เซลล์ที่สัมผัสสารสกัดจากใบข่อยเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเซลล์ที่สัมผัสสารทดสอบทั้ง 2 ชนิดพบว่ามีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) เมื่อคิดเป็นจำนวนเท่าโดยเปรียบเทียบกับเซลล์สร้างกระดูกที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นพบว่า เซลล์สร้างกระดูกจากอาสาสมัครคนที่ 1 เมื่อเซลล์สัมผัสส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อ สัมผัสสารสกัดจากใบข่อยเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สัมผัสสารทดสอบทั้ง 2 ชนิด มีการแสดงออกของเงินโอพีจีเป็น 0.49, 1.91 และ 0.37 เท่าตามลำดับ เซลล์สร้างกระดูกจากอาสาสมัครคนที่ 2 มีการแสดงออกของเงินโอพีจีเป็น 1.34, 0.63 และ 10.10 เท่าตามลำดับ เซลล์สร้างกระดูกจากอาสาสมัครคนที่ 3 มีการแสดงออกของเงินโอพีจีเป็น 0.06, 0.13 และ 0.36 เท่าตามลำดับ เซลล์สร้างกระดูกจากอาสาสมัครคนที่ 4 มีการแสดงออกของเงินโอพีจีเป็น 0.35, 0.97 และ 0.87 เท่าตามลำดับ (ภาพที่ 41, 42, 43, 44)

สัดส่วนการแสดงออกของเงินแรงค์แอลต่อเงินโอพีจีจากเซลล์สร้างกระดูกในอาสาสมัครแต่ละคนทั้ง 4 คน ที่เวลา 24 ชั่วโมงเมื่อเซลล์สร้างกระดูกที่ไม่ได้ถูกกระตุ้น (control) เซลล์ที่สัมผัสส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เซลล์ที่สัมผัสสารสกัดจากใบข่อยเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเซลล์ที่สัมผัสสารทดสอบทั้ง 2 ชนิดพบว่ามีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ยกเว้นในอาสาสมัครคนที่ 3 พบว่าสัดส่วนการแสดงออกของ

เงินแรงค์แอลต่อเงินไอพีจีเมื่อเซลล์สัมผัสสารสกัดจากใบข่อยเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับเซลล์ที่สัมผัสสารทดสอบทั้ง 2 ชนิด เมื่อคิดเป็นจำนวนเท่าโดยเปรียบเทียบกับเซลล์สร้างกระดูกที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นพบว่า เซลล์สร้างกระดูกจากอาสาสมัครคนที่ 1 เมื่อเซลล์สัมผัสส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อ สัมผัสสารสกัดจากใบข่อยเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สัมผัสสารทดสอบทั้ง 2 ชนิด มีสัดส่วนการแสดงออกของเงินแรงค์แอลต่อเงินไอพีจีเป็น 101.64, 0.87 และ 237.38 เท่าตามลำดับ เซลล์สร้างกระดูกจากอาสาสมัครคนที่ 2 มีสัดส่วนการแสดงออกของเงินแรงค์แอลต่อเงินไอพีจีเป็น 1.06, 1.41 และ 0.54 เท่าตามลำดับ เซลล์สร้างกระดูกจากอาสาสมัครคนที่ 3 มีสัดส่วนการแสดงออกของเงินแรงค์แอลต่อเงินไอพีจีเป็น 6.71, 0.70 และ 18.11 เท่าตามลำดับ เซลล์สร้างกระดูกจากอาสาสมัครคนที่ 4 มีสัดส่วนการแสดงออกของเงินแรงค์แอลต่อเงินไอพีจีเป็น 5.05, 1.48 และ 44.71 เท่าตามลำดับ (ภาพที่ 41, 42, 43, 44)

ตารางที่ 14 แสดงการวิเคราะห์โดยใช้ Dunn's multiple comparison test เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของเงินแรงค์แอลของเซลล์สร้างกระดูกจากอาสาสมัครแต่ละคน ที่ 24 ชั่วโมง

time	listing	difference in rank sum	p-value<0.05
1	control vs Pg30	-4.000	ns
	control vs SAE0.1	-3.000	ns
	control vs PgSAE0.1	-5.000	ns
	Pg30 vs SAE0.1	1.000	ns
	Pg30 vs PgSAE0.1	-1.000	ns
	SAE0.1 vs PgSAE0.1	-2.000	ns
2	control vs Pg30	-0.500	ns
	control vs SAE0.1	0.500	ns
	control vs PgSAE0.1	-4.000	ns
	Pg30 vs SAE0.1	1.000	ns
	Pg30 vs PgSAE0.1	-3.500	ns
	SAE0.1 vs PgSAE0.1	-4.500	ns

3	control vs Pg30	1.667	ns
	control vs SAE0.1	6.000	ns
	control vs PgSAE0.1	-0.333	ns
	Pg30 vs SAE0.1	4.333	ns
	Pg30 vs PgSAE0.1	-2.000	ns
	SAE0.1 vs PgSAE0.1	6.333	ns
4	control vs Pg30	-1.500	ns
	control vs SAE0.1	-1.500	ns
	control vs PgSAE0.1	-5.000	ns
	Pg30 vs SAE0.1	0.000	ns
	Pg30 vs PgSAE0.1	-3.500	ns
	SAE0.1 vs PgSAE0.1	-3.500	ns

ตารางที่ 15 แสดงการวิเคราะห์โดยใช้ Dunn's multiple comparison test เพื่อเปรียบเทียบการ
แสดงออกของยีน ไอพีจีของเซลล์สร้างกระดูกจากอาสาสมัครแต่ละคน ที่ 24 ชั่วโมง

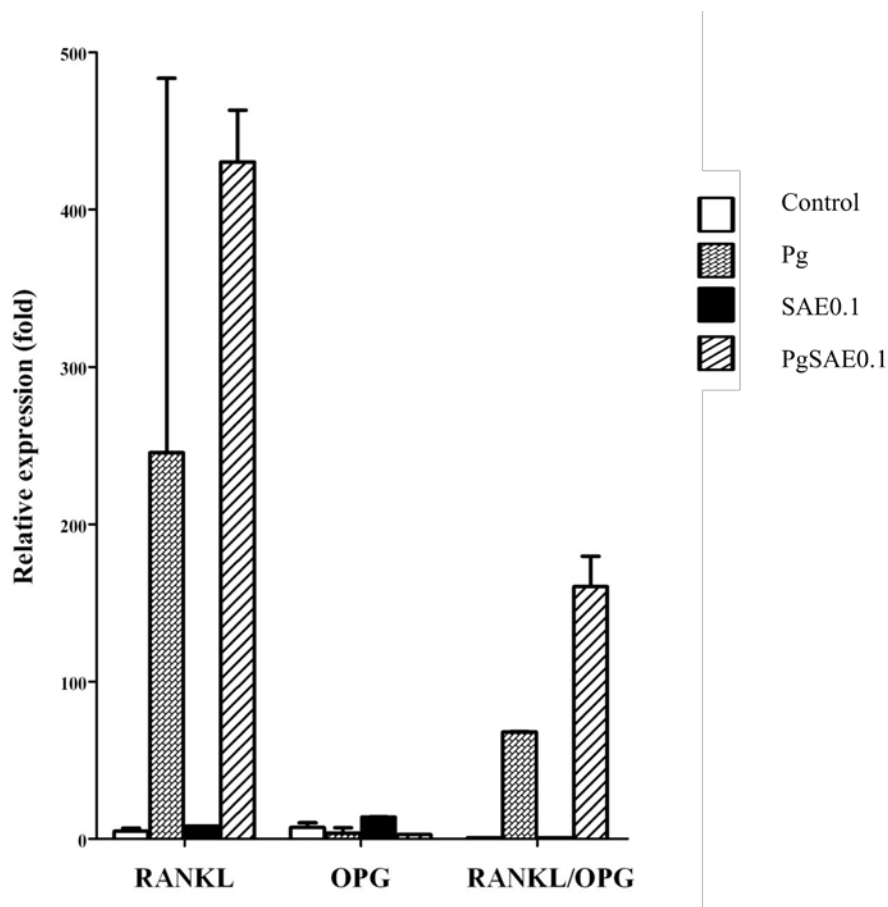
time	listing	difference in rank sum	p-value<0.05
1	control vs Pg30	2.000	ns
	control vs SAE0.1	-2.500	ns
	control vs PgSAE0.1	2.500	ns
	Pg30 vs SAE0.1	-4.500	ns
	Pg30 vs PgSAE0.1	0.500	ns
	SAE0.1 vs PgSAE0.1	5.000	ns
2	control vs Pg30	0.000	ns
	control vs SAE0.1	1.500	ns
	control vs PgSAE0.1	-3.500	ns
	Pg30 vs SAE0.1	1.500	ns
	Pg30 vs PgSAE0.1	-3.500	ns
	SAE0.1 vs PgSAE0.1	-5.000	ns

3	control vs Pg30	4.667	ns
	control vs SAE0.1	5.667	ns
	control vs PgSAE0.1	3.667	ns
	Pg30 vs SAE0.1	1.000	ns
	Pg30 vs PgSAE0.1	-1.000	ns
	SAE0.1 vs PgSAE0.1	-2.000	ns
4	control vs Pg30	4.000	ns
	control vs SAE0.1	0.500	ns
	control vs PgSAE0.1	1.500	ns
	Pg30 vs SAE0.1	-3.500	ns
	Pg30 vs PgSAE0.1	-2.500	ns
	SAE0.1 vs PgSAE0.1	1.000	ns

ตารางที่16 แสดงการวิเคราะห์โดยใช้ Dunn's multiple comparison test เพื่อเปรียบเทียบสัดส่วนการแสดงออกของเงินแรงค์แอลต่อเงิน โอฟีจีของเซลล์สร้างกระดูกจากอาสาสมัครแต่ละคน ที่ 24 ชั่วโมง

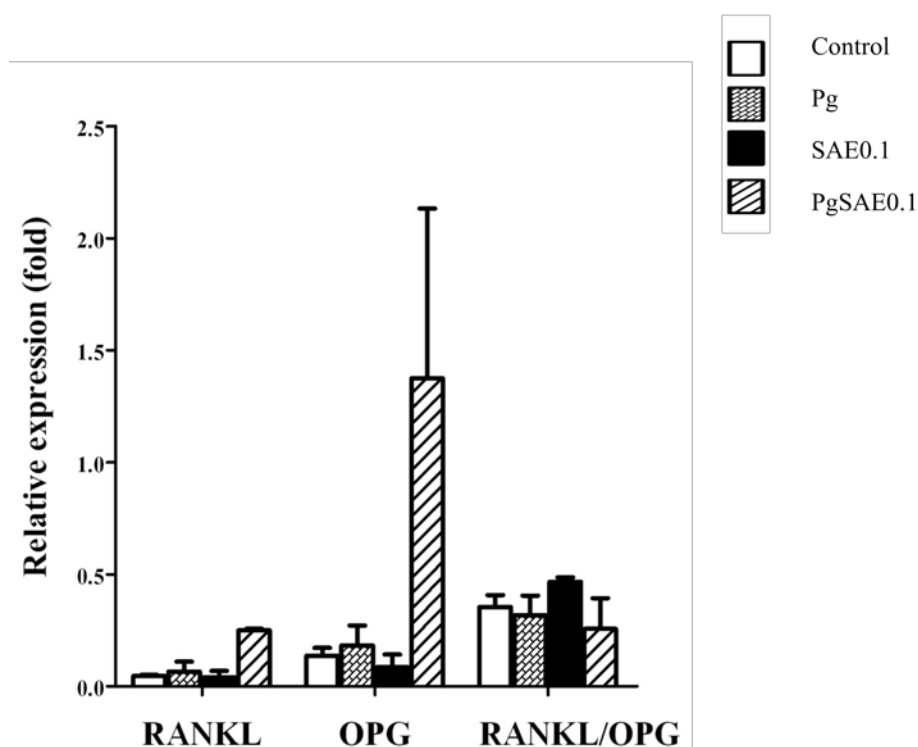
time	listing	difference in rank sum	p-value<0.05
1	control vs Pg30	-2.000	ns
	control vs SAE0.1	2.000	ns
	control vs PgSAE0.1	-4.000	ns
	Pg30 vs SAE0.1	4.000	ns
	Pg30 vs PgSAE0.1	-2.000	ns
	SAE0.1 vs PgSAE0.1	-6.000	ns

2	control vs Pg30	1.000	ns
	control vs SAE0.1	-3.000	ns
	control vs PgSAE0.1	2.000	ns
	Pg30 vs SAE0.1	-4.000	ns
	Pg30 vs PgSAE0.1	1.000	ns
	SAE0.1 vs PgSAE0.1	5.000	ns
3	control vs Pg30	-3.000	ns
	control vs SAE0.1	3.000	ns
	control vs PgSAE0.1	-6.000	ns
	Pg30 vs SAE0.1	6.000	ns
	Pg30 vs PgSAE0.1	-3.000	ns
	SAE0.1 vs PgSAE0.1	-9.000	ns
4	control vs Pg30	-4.000	ns
	control vs SAE0.1	-2.000	ns
	control vs PgSAE0.1	-6.000	ns
	Pg30 vs SAE0.1	2.000	ns
	Pg30 vs PgSAE0.1	-2.000	ns
	SAE0.1 vs PgSAE0.1	-4.000	ns



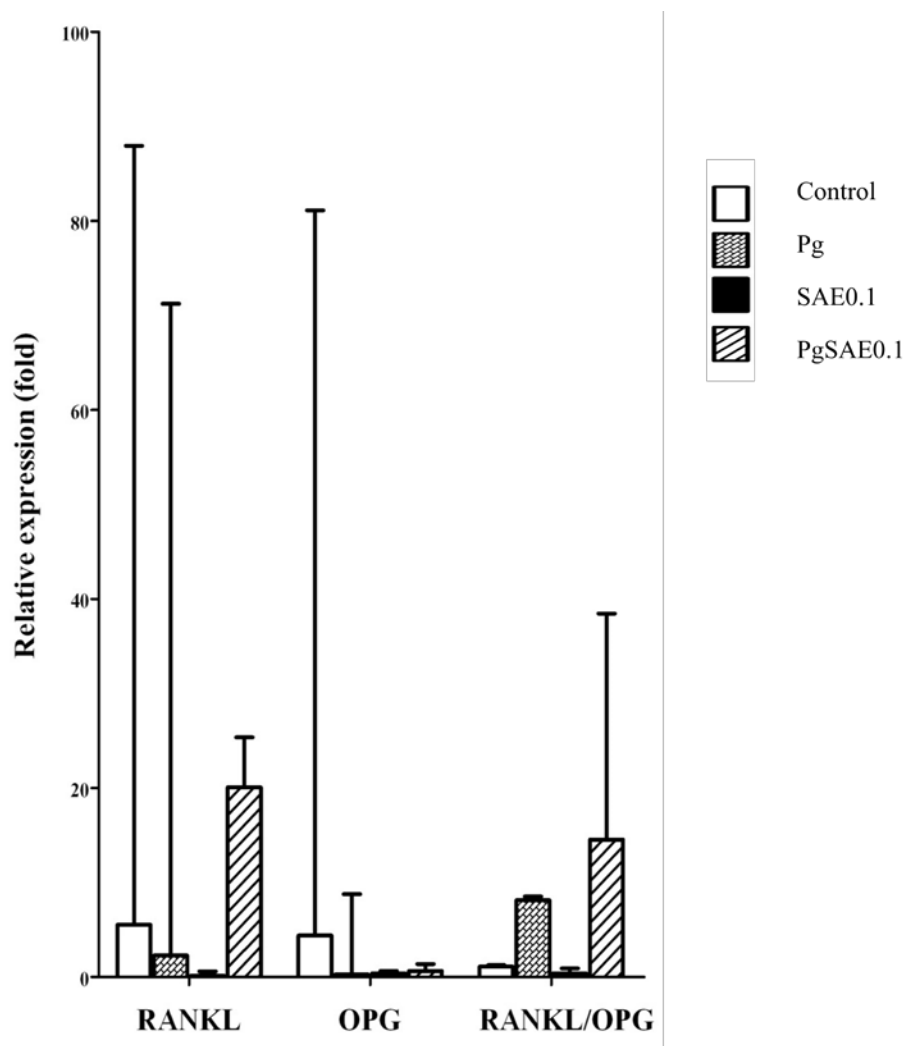
ภาพที่ 41 การแสดงออกของยีนเรงก์แอลและโอพีจีเมื่อเซลล์สร้างกระดูก (control) ของอาสาสมัครคนที่ 1 สัมผัสส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิสความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Pg30) และสารสกัดจากใบข่อยเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (SAE0.1) ณ เวลา 24 ชั่วโมง

PgSAE0.1= ส่วนผสมของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิส ขนาด 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและสารสกัดจากใบข่อยที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



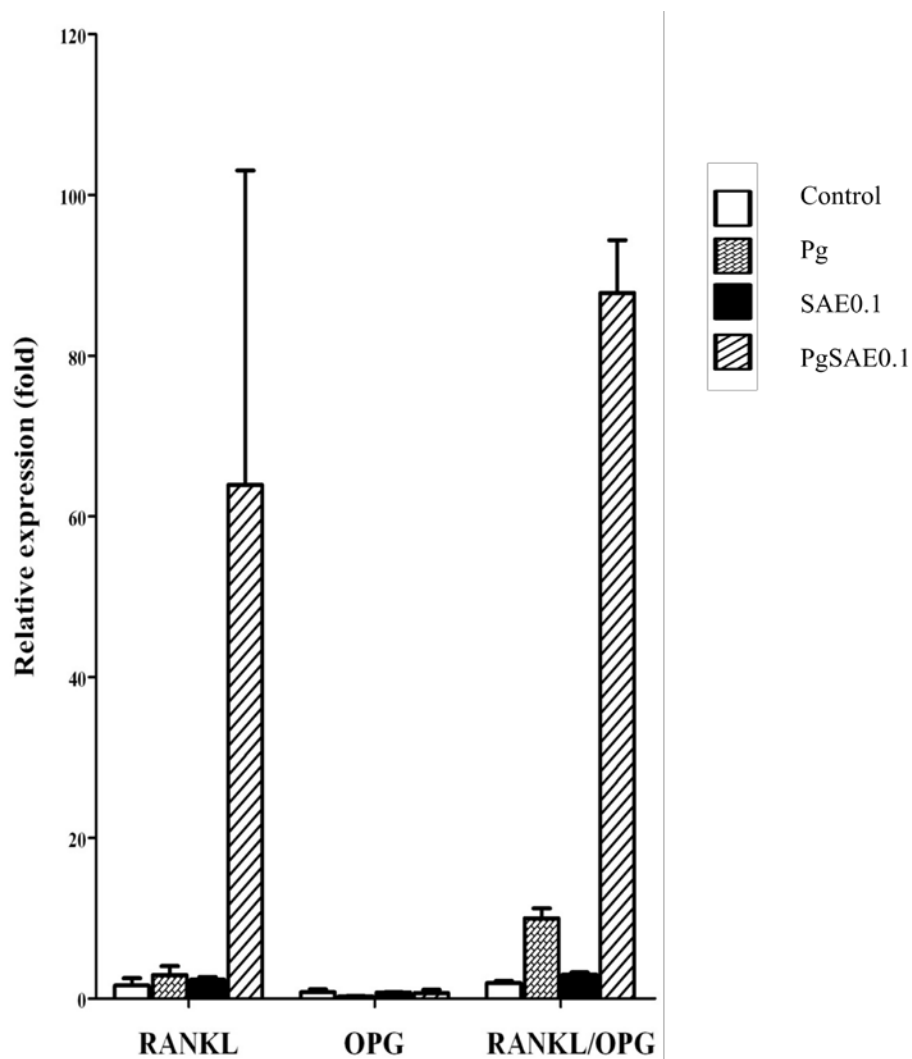
ภาพที่ 42 การแสดงออกของยีนเรงก์แอลและโอพีจีเมื่อเซลล์สร้างกระดูก (control) ของอาสาสมัครคนที่ 2 สัมผัสส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิสความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Pg30) และสารสกัดจากใบข่อยเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (SAE0.1) ณ เวลา 24 ชั่วโมง

PgSAE0.1= ส่วนผสมของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิส ขนาด 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและสารสกัดจากใบข่อยที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 43 การแสดงออกของยีนแรงค์แอลและโอพีจีเมื่อเซลล์สร้างกระดูก (control) ของอาสาสมัครคนที่ 3 สัมผัสส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิสความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Pg30) และสารสกัดจากใบข่อยเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (SAE0.1) ณ เวลา 24 ชั่วโมง

PgSAE0.1= ส่วนผสมของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิส ขนาด 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและสารสกัดจากใบข่อยที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 44 การแสดงออกของจีนแรงค์แอลและโอพีจีเมื่อเซลล์สร้างกระดูก (control) ของอาสาสมัครคนที่ 4 สัมผัสส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อฟอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิสความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Pg30) และสารสกัดจากใบข่อยเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (SAE0.1) ณ เวลา 24 ชั่วโมง

PgSAE0.1= ส่วนผสมของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อฟอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิส ขนาด 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและสารสกัดจากใบข่อยที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

บทที่ 5

อภิปรายผล

ตัวอย่างกระดูกซึ่งใช้ในการศึกษานี้ได้จากอาสาสมัครจำนวน 4 คน เป็นชาย 3 คนและหญิง 1 คน เป็นการเลือกตัวอย่างแบบ convenience sampling อายุของอาสาสมัครอยู่ในช่วง 22-29 ปี ซึ่งเป็นอายุที่ใกล้เคียงกัน และกระดูกพุนนำมาจากตำแหน่งเดียวกันคือกระดูกขากรรไกรล่างของอาสาสมัครทั้ง 4 คน แม้ว่าเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์จะสามารถนำมาใช้ทดลองในห้องปฏิบัติการได้สะดวกและได้ผลการทดลองเป็นที่น่าเชื่อถือ แต่เซลล์ปฐมภูมิมีข้อจำกัดในการแบ่งตัวและความคงตัวของลักษณะพันธุกรรม โดยข้อจำกัดดังกล่าวขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์และอายุของผู้บริจาคโดยพบว่าเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์สามารถแบ่งตัวได้ประมาณ 50 รุ่น (generation) หรือถ้าคิดเป็นจำนวนพาสเซจ (passage) จะมีค่าเท่ากับจำนวนรุ่นเมื่อเปลี่ยนภาชนะในอัตราส่วน 1:2(48) ซึ่งในการศึกษานี้ใช้เซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์พาสเซจที่ 3-7 เท่านั้น เพื่อให้เซลล์มีความคล้ายกันและแบ่งตัวอย่างปกติ

การเปลี่ยนแปลงและการพัฒนาของเซลล์ในระยะต่างๆ รวมทั้งการสร้างสารเมทริกซ์และการสะสมแร่ธาตุมีกลไกควบคุมอย่างเป็นลำดับ โดยผ่านการหลั่งสารหรือโมเลกุลกระตุ้นสัญญาณต่างๆ (molecular signaling) ที่มีความจำเพาะต่อการสร้างกระดูกในระยะนั้นๆ (49, 50) ดังนั้นการตรวจหาโมเลกุลจำเพาะต่อเซลล์สร้างกระดูก หรือการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับโมเลกุลจำเพาะเหล่านี้ เช่น การแสดงออกของยีนรันซ์ 2 (*RUNX 2*) และลักษณะทางกายภาพ ได้แก่ การสร้างอัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase) จึงสามารถใช้เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของเซลล์ที่แยกได้ว่าเป็นเซลล์สร้างกระดูก

การแสดงออกของเมซเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอของรันซ์ 2 อยู่ในระดับคงที่ในเซลล์สร้างกระดูก แต่ในระยะหลังเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์หรือเริ่มสะสมแร่ธาตุจะมีการแสดงออกเพิ่มขึ้น(56) ซึ่งในการทดสอบเป็นระยะเริ่มต้นของการพัฒนา (early differentiation) โดยการทดสอบในห้องปฏิบัติการในระยะดังกล่าวจำเป็นต้องเพิ่มสารที่ช่วยในการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์เพื่อจำลองภาวะในร่างกายตามธรรมชาติ ซึ่งได้แก่แอล-แอสคอบิก แอซิด (L-ascorbic acid) และเบต้ากลีเซอโรฟอสเฟต (β -glycerophosphate) (49) ในการศึกษานี้ได้เติมสารดังกล่าวลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ ภายหลังจากการเติมสารตรวจพบการแสดงออกของยีนรันซ์ 2 ในเซลล์ที่แยกจากอาสาสมัคร และกลุ่มควบคุมบวกซึ่งเป็นเซลล์สร้างกระดูก hFOB1.19 (ATCC CRL-11372™) ทั้งนี้ไม่พบการ

แสดงออกของจีนนี้ในกลุ่มควบคุมที่เป็นเนื้อเยื่อเหงือก ส่วนการแสดงออกของจีนจีเอพีดีเอส (GAPDH) ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุมภายใน (internal control) มีการแสดงออกทั้งสามกลุ่ม

การสร้างอัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เซลล์สร้างกระดูกตั้งกระดูกขึ้นในระยะเริ่มต้นของการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและระยะสะสมแร่ธาตุที่หลังออกนอกผิวเซลล์(49) โดยเป็นปัจจัยหนึ่งที่ช่วยกระตุ้นให้เกิดการสะสมผลึกของแคลเซียม ฟอสเฟตเป็น vesicle ในเซลล์ จากนั้นจึงหลั่งออกนอกเซลล์เป็นออสติอยด์ (59) การทดสอบในห้องปฏิบัติการในระยะดังกล่าว จำเป็นต้องเพิ่มสารที่ช่วยในการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์เพื่อจำลองภาวะในร่างกายตามธรรมชาติได้แก่ แอล-แอสคอร์บิก แอซิด 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เบต้า กลีเซอรอโรฟอสเฟต 10 มิลลิโมลาร์เป็นเวลา 7 วัน การวัดการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส ใช้สารตั้งต้น (substrate) ที่ทำปฏิกิริยาเฉพาะต่อเอนไซม์ดังกล่าว NBT-BCIP (49) ซึ่งสารตั้งต้น NBT/BCIP ซึ่งหลังทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ อัลคาไลน์ ฟอสฟาเตสได้เป็นสารสีม่วงภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ ส่วนในกลุ่มควบคุมที่เป็นเซลล์สร้างกระดูกที่บ่มในสารละลาย levamisol ก่อนเติมสารตั้งต้นไม่พบสารสีม่วงเนื่องจาก levamisol จะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส (100)

จากผลการทดลองด้านการแสดงออกของจีนและเอนไซม์ที่จำเพาะต่อเซลล์สร้างกระดูกดังกล่าวข้างต้นเป็นการยืนยันว่า เซลล์ปฐมภูมิที่แยกได้จากอาสาสมัครในการศึกษานี้เป็นเซลล์สร้างกระดูกที่มีการพัฒนาการเลียนแบบสภาวะในสิ่งมีชีวิต (*in vivo*) เมื่อได้รับสารกระตุ้นการสร้างกระดูก

การหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry เป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย (96, 101) ในการศึกษานี้จึงได้ใช้วิธีการดังกล่าวในการหาปริมาณโปรตีนของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อฟอร์ไฟโรโมแนส จึงจีวาลิส และตรวจสอบคุณภาพของส่วนสกัดเซลล์แตกโดยนำไปทดสอบกับเซลล์โมโนไคลด์ THP-1 เนื่องจากมีการศึกษามากมายที่เชื่อว่าส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อฟอร์ไฟโรโมแนส จึงจีวาลิส สามารถกระตุ้นให้เซลล์โมโนไคลด์ THP-1 มีการแสดงออกของจีนอินเตอร์ลิวคิน-1เบต้าได้

จากผลของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อ การทดสอบคุณภาพทางชีววิทยาพบว่าส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อมีคุณภาพดีเหมาะที่จะนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

นอกจากการตรวจสอบคุณภาพของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อฟอร์ไฟโรโมแนส จึงจีวาลิส แล้วผู้วิจัยยังได้ตรวจสอบคุณภาพของสารสกัดจากไบออกซ์โดยทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากไบออกซ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแอกกริเกติแบกเทอร์ แอกติโนมัยซิเทมคอมมิแทนส์ เพื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาก่อนหน้านี้ ผลการทดสอบพบว่าความเข้มข้นของสารสกัดจากไบออกซ์ที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแอกกริเกติแบกเทอร์ แอกติโนมัยซิเทมคอมมิแทนส์ มีค่า

เป็น 1.18 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นของสารสกัดจากใบข่อยที่น้อยที่สุดที่สามารถทำลายเชื้อ มีค่า 18.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งให้ผลใกล้เคียงกับการศึกษาที่ผ่านมาซึ่งความเข้มข้นที่ยับยั้งเชื้อมีค่า 7.81 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและความเข้มข้นที่ทำลายเชื้อมีค่าเป็น 15.62 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร(20) นั่นคือสารสกัดจากใบข่อยที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีเดียวกันแต่คนละครั้งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกัน

การทดสอบความเป็นพิษของสารต่อเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์ในการวิจัยนี้ใช้วิธีเอ็มทีที (MTT assay) ในการวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทางอ้อมโดยการวัดค่าดูดกลืนแสงหรือออดิ (optical density, OD) ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว เป็นที่ยอมรับถึงความแม่นยำ และมีการใช้อย่างแพร่หลาย (96, 101) ซึ่งหลักการเป็นการวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตจากการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการหายใจระดับเซลล์ในไมโทคอนเดรีย (mitochondrial succinic dehydrogenase activity) ในเซลล์ที่มีชีวิตเอนไซม์จะไปเปลี่ยนสีของเอ็มทีทีซึ่งเป็นเกลือเตตราโซเลียม (tetrazolium salt) จากสีเหลืองไปเป็นฟอร์มาซาน (formazan) ที่มีสีน้ำตาลหรือสีม่วง และตกตะกอนในไมโทคอนเดรีย ซึ่งตะกอนหรือผลึกของฟอร์มาซาน สามารถละลายในดีเอ็มเอสโอ (DMSO) ระดับของการเปลี่ยนสีเป็นสัดส่วนโดยตรงกับการทำปฏิกิริยารีดักชันของเอนไซม์ (enzymatic reduction) ของเกลือเตตราโซเลียม หลังจากนั้นจึงทำการวัดหาปริมาณฟอร์มาซานที่เกิดขึ้นโดยวัดค่าออดิ ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ซึ่งในการศึกษานี้ใช้เอ็มทีทีเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยได้ทดลองหว่านเซลล์ปริมาณต่างๆ ในถาดหลุมที่มี 96 หลุม พบว่าปริมาณเซลล์มากขึ้นค่าออดิของเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์ก็มากขึ้น แสดงว่าค่าออดิของเซลล์สามารถใช้ในการประมาณปริมาณเซลล์ได้

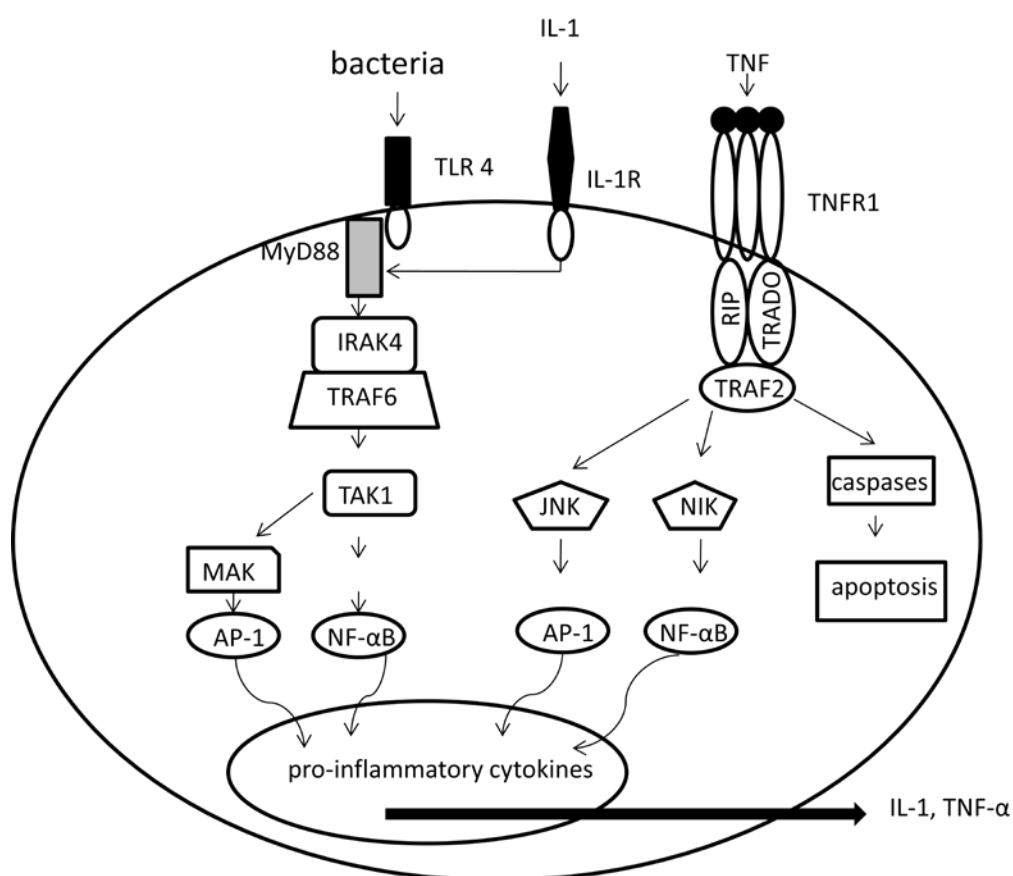
เชื้อ*พอร์ไฟโรโมแนส* *อิงจิวัลิส* มีการนำมาศึกษาในหลายรูปแบบเนื่องจากมีปัจจัยก่อโรคได้แก่ ส่วนประกอบต่างๆ ของเชื้อและเอนไซม์ที่ถูกสร้างออกมานอกเซลล์ โดยรูปแบบที่นำมาศึกษา เช่น น้ำที่ใช้เลี้ยงเชื้อ ตัวเชื้อ เชื้อที่ถูกทำให้แตกตัว ซึ่งเชื้อที่ทำให้แตกตัวจะมีส่วนประกอบต่างๆ ของเชื้อและเอนไซม์ที่ถูกสร้างในเซลล์ ซึ่งในการศึกษานี้พบว่าความเข้มข้นของเชื้อที่แตกตัวทำให้เซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์ตายร้อยละ 5 คือ 38.66, 4.84 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเซลล์สัมผัสเชือนาน 24, 48 ชั่วโมง แต่การศึกษาของ Reddi และคณะ ใช้ความเข้มข้นของเชื้อ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (102) ความแตกต่างนี้อาจเนื่องจากสายพันธุ์ของเชื้อ วิธีการเตรียมเชื้อเซลล์ที่นำมาทดลอง และวิธีการวัดผล โดยการศึกษาของ Reddi และคณะ ใช้เชื้อ*พอร์ไฟโรโมแนส* *อิงจิวัลิส* สายพันธุ์ K1A และ E8 และศึกษาน้ำที่ใช้เลี้ยงเชื้อ ซึ่งเซลล์ที่นำมาศึกษาเป็นเซลล์สร้างกระดูกที่นำมาจากหนู (osteogenic murine boone marrow stromal cell line) โดยวิธีการวัดเซลล์ตายใช้การวัดปริมาณแลคเตท ดีไฮโดรจีเนส (lactate dehydrogenase, LDH) ส่วนการศึกษานี้ใช้เชื้อสาย

พันธุ์ W50 โดยนำเชื้อมาทำให้แตกตัวและนำมาทดสอบกับเซลล์สร้างกระดูกปฐมนุญของมนุษย์ซึ่งวัดผลโดยวิธีเอ็มทีที

เซลล์สร้างกระดูกปฐมนุญของมนุษย์เมื่อสัมผัสกับส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อ *พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส* พบว่ามีผลทำให้เซลล์ตายได้แตกต่างกันในแต่ละราย โดยเมื่อเซลล์สร้างกระดูกสัมผัสกับส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อ *พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส* ด้วยความเข้มข้น 15 – 180 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร พบว่าร้อยละการตายของเซลล์สร้างกระดูกปฐมนุญของมนุษย์จะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารมากขึ้นในช่วงเวลา 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ยกเว้นช่วงเวลา 2 ชั่วโมงไม่พบความสัมพัทธ์ดังกล่าวที่ชัดเจนแม้ความเข้มข้นจะเพิ่มขึ้นถึง 180 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร แนวโน้มดังกล่าวพบได้ทั้งในข้อมูลของอาสาสมัครแต่ละคนและในข้อมูลรวมของอาสาสมัครทั้ง 4 คน นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อเซลล์สร้างกระดูกปฐมนุญของมนุษย์สัมผัสสารที่ทดสอบในความเข้มข้นเดียวกันในแต่ละช่วงเวลา คือ 2, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง จะพบว่าร้อยละการตายของเซลล์สร้างกระดูกปฐมนุญของมนุษย์จะเพิ่มขึ้นเมื่อสัมผัสสารนานขึ้นซึ่งความสัมพัทธ์ดังกล่าวจะเห็นได้ชัดเจนเมื่อความเข้มข้นของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อมากกว่า 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร (ในอาสาสมัครคนที่ 1, 2 และในข้อมูลรวมของอาสาสมัครทุกคน) นั่นคือสารที่ทดสอบมีความเข้มข้นไม่มากพอให้เห็นความเป็นพิษที่ชัดเจน อาจเป็นไปได้ว่าถ้าเพิ่มความเข้มข้นของเชื้อให้มากขึ้นอีกจึงจะมีรูปแบบความเป็นพิษเช่นเดียวกับเวลา 12 24 และ 48 ชั่วโมงหรือเวลาที่สัมผัสสารไม่นานพอที่ส่วนประกอบของเชื้อที่แตกตัวเข้าไปทำปฏิกิริยาต่อเซลล์สร้างกระดูกปฐมนุญของมนุษย์ ซึ่งมีการศึกษาในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกซึ่งวัดผลโดยวิธีเอ็มทีที พบว่าเมื่อเซลล์สัมผัสเชื้อนาน 4 ชั่วโมงจะเห็นความสัมพัทธ์ดังกล่าวที่ชัดเจนและสามารถหาร้อยละการตายของเซลล์ได้โดยใช้ความเข้มข้นของเชื้อที่ศึกษาสูงที่สุด 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร(22) นั่นคือถ้าปรับเวลาในการให้เซลล์สร้างกระดูกสัมผัสกับสารที่ทดสอบในช่วงเวลามากกว่า 2 ถึง 12 ชั่วโมง และใช้ความเข้มข้นเดิมศึกษาอาจจะพบความสัมพัทธ์ดังกล่าวที่ชัดเจน

กลไกในการที่เชื้อ *พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส* หรือหรือไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อทำให้เกิดการตายของเซลล์ อาจเกิดจากเมื่อเซลล์สร้างกระดูกสัมผัสกับเชื้อ *พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส* หรือไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของตัวรับทอล ไลค์ 1, 4, 5, 6 และ 9 (toll-like receptors, TLRs) (103, 104, 105) ซึ่งตัวรับทอล ไลค์ เป็นตัวกลางเชื่อมระหว่างเชื้อกับการตอบสนองภายในเซลล์ เมื่อเชื้อจับกับตัวรับทอล ไลค์ที่เยื่อหุ้มเซลล์จะเกิดการส่งสัญญาณเข้าไปในเซลล์ผ่านโมเลกุลต่างๆ เช่น เอ็มวายดี 88 (MyD88), ไอแรค (IRAK), ทราฟ6 (TRAF6) และไคเนส (kinase) เป็นลำดับ ทำให้กระตุ้นทรานสคริปชันแฟกเตอร์ในเซลล์(105)ทำให้เซลล์สร้างไซโตไคน์เพิ่มขึ้น เช่น อินเตอร์ลิวคิน-1 ทีเอ็นเอฟ-อัลฟา ซึ่งเป็นสารอักเสบที่ส่งผลต่อการละลายตัวของ

กระดูก(106, 107)ซึ่งปริมาณไซโตไคน์ที่ผลิตออกมาส่งผลกลับมาที่เซลล์สร้างกระดูก (Autocrine) ทำให้เซลล์ตายได้ผ่านกลไก apoptosis โดยมีการศึกษาพบว่าที่เอ็นเอฟ-อัลฟาทำให้เกิด apoptosis (108, 109)



ภาพที่ 45 กลไกโมเลกุลของปัจจัยที่เชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส หรือหรือไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อทำให้เกิดการตายของเซลล์

ในการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากใบข่อยต่อเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์ พบว่าเมื่อเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์จะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารมากขึ้นในช่วงเวลา 12, 24 และ 48 ชั่วโมงโดยแนวโน้มดังกล่าวพบได้ทั้งในข้อมูลของอาสาสมัครแต่ละคน (ภาพที่ 29-32) และในข้อมูลรวมของอาสาสมัครทั้ง 4 คน (ภาพที่ 33) ยกเว้นช่วงเวลา 2 ชั่วโมงไม่พบความสัมพันธ์ดังกล่าวที่ชัดเจน แต่พบว่าในอาสาสมัครคนที่ 1 เมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็น 1-1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรจะเห็นแนวโน้มว่าความเข้มข้นของสารสกัดจากใบข่อยที่เพิ่มมากขึ้นจะมีรูปแบบความเป็นพิษเช่นเดียวกับเวลา 12 24 และ 48 ชั่วโมง และการศึกษาในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกซึ่งวัดผลด้วยวิธีเอ็มทีทีที่เหมือนกันก็พบความสัมพันธ์ดังกล่าวที่ชัดเจนโดยศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดจากใบข่อย 1 - 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร(22) ดังนั้นถ้าเพิ่มความเข้มข้นของสารที่ทดสอบก็จะเห็นความสัมพันธ์ที่ชัดเจนขึ้นที่เวลา 2 ชั่วโมง หรืออาจต้องเพิ่มเวลาในการสัมผัสสารทดสอบ ซึ่งมีการศึกษาในเซลล์โมโนไซต์ที่วัดผลด้วยวิธีเอ็มทีที พบว่าเมื่อเซลล์สัมผัสสารที่ทดสอบนาน 4 และ 8 ชั่วโมงจะเห็นความสัมพันธ์ดังกล่าวที่ชัดเจนและสามารถหาร้อยละการตายได้โดยใช้ความเข้มข้นของสารที่ทดสอบสูงที่สุด 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร(21) นั่นคือถ้าปรับเวลาให้เซลล์สร้างกระดูกสัมผัสกับสารที่ทดสอบในช่วงเวลามากกว่า 2 ถึง 12 ชั่วโมง และใช้ความเข้มข้นเดิมศึกษาอาจจะพบความสัมพันธ์ดังกล่าวที่ชัดเจน

นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์สัมผัสสารที่ทดสอบในความเข้มข้นเดียวกันในแต่ละช่วงเวลา คือ 2, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง จะพบว่าร้อยละการตายของเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์จะเพิ่มขึ้นเมื่อสัมผัสสารนานขึ้น ซึ่งความสัมพันธ์ดังกล่าวจะเห็นได้ชัดเจนเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดจากใบข่อยมากกว่า 0.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรโดยโดยแนวโน้มดังกล่าวพบได้ทั้งในข้อมูลของอาสาสมัครแต่ละคน (ภาพที่ 29-32) และในข้อมูลรวมของอาสาสมัครทั้ง 4 คน (ภาพที่ 33)

ความเข้มข้นของสารสกัดจากใบข่อยที่ทำให้เซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์ตายร้อยละ 20 และ 50 แสดงดังตารางที่ 5 พบว่าเมื่อเซลล์สัมผัสสารนานขึ้น ความเข้มข้นของสารสกัดจากใบข่อยที่ทำให้เซลล์ตายร้อยละ 20 และ 50 จะลดลง ซึ่งจะให้ผลคล้ายกันกับการศึกษาในเซลล์โมโนไซต์ คือ ความเข้มข้นของสารสกัดจากใบข่อยที่ทำให้เซลล์ตายร้อยละ 50 จะลดลงเมื่อสัมผัสสารนานขึ้นจาก 4 ชั่วโมงเป็น 8 ชั่วโมง(21)

เมื่อพิจารณาข้อมูลรวมของอาสาสมัครทั้ง 4 คน พบว่าความเข้มข้นของสารสกัดจากใบข่อยซึ่งทำให้เซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์ตายร้อยละ 50 เมื่อสัมผัสสารนาน 2 ชั่วโมง คือ 0.39 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่การศึกษาในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกใช้ความเข้มข้นของสารสกัดจากใบ

ขอยที่สูงกว่า คือ 7.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรจึงทำให้เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกตายร้อยละ 50 (22) แสดงว่าเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมีความทนต่อสารสกัดจากใบข่อยมากกว่าเซลล์สร้างกระดูกปฐมนุญของมนุษย์

ในการทดสอบความเป็นพิษของส่วนผสมของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อ *พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส* และสารสกัดจากใบข่อยต่อเซลล์สร้างกระดูกปฐมนุญของมนุษย์ ได้พิจารณาเลือกความเข้มข้นของสารที่ทดสอบซึ่งทำให้เซลล์สร้างกระดูกปฐมนุญของมนุษย์ตายในช่วงร้อยละ 20 - 50 เมื่อสัมผัสสารนาน 48 ชั่วโมง จากตารางที่ 4 และ 5 จะเห็นว่าส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อ *พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส* ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรทำให้เซลล์สร้างกระดูกปฐมนุญของมนุษย์ตายน้อยกว่าร้อยละ 20 ส่วนสารสกัดจากใบข่อยเข้มข้น 0.14 - 0.53 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรทำให้เซลล์สร้างกระดูกปฐมนุญของมนุษย์ตายร้อยละ 20-50 โดยพิจารณาจากข้อมูลรวมของอาสาสมัครทั้ง 4 คน จึงเลือกความเข้มข้นของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรนำมาผสมกับสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้น 0.1, 0.2 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ พบว่าร้อยละการตายของเซลล์สร้างกระดูกปฐมนุญของมนุษย์เมื่อสัมผัสสารทั้ง 2 ชนิดลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับ การใส่สารทดสอบเพียงชนิดเดียวในทุกช่วงเวลาโดยสังเกตค่ามัธยฐานของแต่ละข้อมูล อย่างไรก็ตามเมื่อทำการทดสอบทางสถิติพบว่าความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารที่ทดสอบเพียงชนิดเดียวเมื่อเปรียบเทียบกับ การใส่สารที่ทดสอบ 2 ชนิดร่วมกันมีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ในแต่ละเวลา และยังพบว่าเซลล์สร้างกระดูกปฐมนุญของมนุษย์เมื่อสัมผัสสารทั้ง 2 ชนิดนาน 2, 12 และ 24 ชั่วโมง มีร้อยละการตายของเซลล์ใกล้เคียงกันแม้ความเข้มข้นของสารสกัดจากใบข่อยมากขึ้น แต่ที่ 48 ชั่วโมงกลับพบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดจากใบข่อยเพิ่มขึ้นร้อยละการตายของเซลล์ลดลงอาจเป็นไปได้ว่าส่วนประกอบในสารสกัดจากใบข่อยที่ได้จากการสกัดแบบหยาบมีหลายชนิด ซึ่งสารต่างๆเหล่านี้อาจไปจับส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อหรือไปจับกับตัวรับโทล-ไลค์ (tolk-like receptor) บนเซลล์สร้างกระดูก ทำให้ตัวรับของเซลล์ไม่สามารถจับกับส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อได้หรือจับได้น้อยลง หรือไปมีผลขัดขวางวิถีสัญญาณหรือทรานสคริปชันแฟกเตอร์ในเซลล์ทำให้เซลล์สร้างไซโตไคน์ได้น้อยลง หรืออาจไปเสริมฤทธิ์วิถีสัญญาณอื่นซึ่งส่งผลให้มีการยับยั้งการสร้างไซโตไคน์ ทำให้ปริมาณไซโตไคน์ที่ผลิตมีปริมาณไม่มากพอจะกลับมาทำให้เซลล์ตายได้ อย่างไรก็ตามข้อสันนิษฐานดังกล่าวต้องการการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อเซลล์สร้างกระดูกปฐมนุญของมนุษย์สัมผัสสารทั้ง 2 ชนิดที่ความเข้มข้นของสารสกัดจากใบข่อยเดียวกันในแต่ละช่วงเวลา คือ 2, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง จะพบว่า

ร้อยละการตายของเซลล์สร้างกระดูกปฏิกิริยาของมนุษย์จะเพิ่มขึ้นเมื่อสัมผัสสารนาซีน โดยเห็นชัดเจนที่เวลา 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 38)

จากผลการศึกษาในร่องในเซลล์สร้างกระดูกของอาสาสมัครคนที่ 2 เพื่อดูการแสดงออกของเงินแรงค์แอลและโอพีจี โดยเลือกความเข้มข้นของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อ *พอร์ไฟโรโมแนส* จิงจิ วาลิส 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง พบว่าหลังจากกระตุ้นเซลล์ด้วยส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อ *พอร์ไฟโรโมแนส* จิงจิ วาลิส ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร การแสดงออกของเงินแรงค์แอลจะเพิ่มขึ้นเมื่อเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 39A) สอดคล้องกับการศึกษาของ Reddi และคณะที่ศึกษาการแสดงออกของเงินแรงค์แอลที่ 6, 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าเงินแรงค์แอลจะเพิ่มขึ้นชัดเจนเมื่อกระตุ้นด้วยเชื้อ *พอร์ไฟโรโมแนส* จิงจิ วาลิส ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง (102) แต่การแสดงออกของเงินโอพีจีจากเซลล์สร้างกระดูกในอาสาสมัครคนที่ 2 จะเพิ่มขึ้นทุกช่วงเวลา คือ 2, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 39B) ให้ผลแตกต่างจากการศึกษาของ Reddi และคณะ หลังจากเซลล์สร้างกระดูกที่นำมาจากหนูกระตุ้นด้วยเชื้อ *พอร์ไฟโรโมแนส* จิงจิ วาลิส จะมีการแสดงออกของเงินโอพีจีน้อยลงที่เวลา 6 และ 24 ชั่วโมง แต่ที่เวลา 48 ชั่วโมงการแสดงออกไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมซึ่งความแตกต่างนี้น่าจะมาจากแหล่งที่มาของเซลล์สร้างกระดูก

จากผลการศึกษาดังกล่าวจึงเลือกช่วงเวลา 24 และ 48 ชั่วโมงไปทำการศึกษาระดับการแสดงออกของเงินแรงค์แอลและโอพีจีของส่วนผสมระหว่างส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อ *พอร์ไฟโรโมแนส* จิงจิ วาลิส ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรและสารสกัดจากใบข่อยเข้มข้น 0.1, 0.2 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิตรตามลำดับ เพื่อจะเลือกความเข้มข้นของสารสกัดจากใบข่อยที่เหมาะสมต่อไป จากข้อมูลสัดส่วนการแสดงออกของเงินแรงค์แอลต่อเงินโอพีจี เมื่อเซลล์สัมผัสกับสารทดสอบทั้ง 2 ชนิดที่มีสารสกัดจากใบข่อยเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตรที่เวลา 24 ชั่วโมงพบว่ามีสัดส่วนการแสดงออกของเงินแรงค์แอลต่อโอพีจีน้อยที่สุดคือ 0.59 เท่า โดยมีการแสดงออกของเงินแรงค์แอลเป็น 0.85 เท่า และการแสดงออกของเงินโอพีจีเป็น 1.41 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์สร้างกระดูกที่ไม่ได้ถูกกระตุ้น จึงเลือกศึกษาที่ช่วงเวลา 24 ชั่วโมง และทดสอบในสารทดสอบ 2 ชนิดโดยใช้ความเข้มข้นของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรผสมกับสารสกัดจากใบข่อยเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตรเพื่อศึกษากับเซลล์สร้างกระดูกของอาสาสมัครทั้ง 4 คนต่อไป

เมื่อเซลล์สร้างกระดูกของอาสาสมัครทั้ง 4 คนได้รับการกระตุ้นด้วยส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อ *พอร์ไฟโรโมแนส* จิงจิ วาลิส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงพบว่าการแสดงออกของเงินแรงค์แอลเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เป็นเซลล์สร้างกระดูกซึ่งนำมาจากเซลล์สร้างกระดูกของอาสาสมัคร

3 คน คือ คนที่ 1, 2 และ 4 (ภาพที่ 41, 42, 44) ส่วนคนที่ 3 มีการแสดงออกลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 43) ซึ่งแนวโน้มการแสดงออกของเงินแรงค์แอลที่เพิ่มขึ้นสอดคล้องกับหลายการศึกษาก่อนหน้านี้ (40, 102) ส่วนการแสดงออกของเงินโอพีจีแสดงออกลดลงเมื่อสัมผัสส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อในอาสาสมัคร 3 คนคือ คนที่ 1, 3 และ 4 (ภาพที่ 41, 43, 44) ส่วนคนที่ 2 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 42) ซึ่งแนวโน้มการแสดงออกของเงินโอพีจีลดลงเมื่อสัมผัสส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อสอดคล้องกับการศึกษาของ Reddi และคณะ(102)

เมื่อเซลล์สร้างกระดูกของอาสาสมัครทั้ง 4 คนสัมผัสสารสกัดจากใบข่อยเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบการแสดงออกของเงินแรงค์แอลและเงินโอพีจีมีค่าใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมที่เป็นเซลล์สร้างกระดูกซึ่งไม่ถูกกระตุ้น รวมถึงสัดส่วนการแสดงออกของเงินแรงค์แอลต่อเงินโอพีจีก็ให้ผลใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมที่เป็นเซลล์สร้างกระดูกเช่นกัน (ภาพที่ 41, 42, 43, 44) นั่นคือสารสกัดจากใบข่อยไม่ได้มีผลต่อการแสดงออกของเงินทั้งสอง

เมื่อเซลล์สร้างกระดูกของอาสาสมัครทั้ง 4 คนสัมผัสสารทดสอบ 2 ชนิดโดยใช้ความเข้มข้นของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรผสมกับสารสกัดจากใบข่อยเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตรเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าการแสดงออกของเงินแรงค์แอลเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมในอาสาสมัครทั้ง 3 คน คือคนที่ 1, 3 และ 4 (ภาพที่ 41, 43, 44) ส่วนคนที่ 2 มีการแสดงออกใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 42) ส่วนการแสดงออกของเงินโอพีจีพบว่าลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมในอาสาสมัคร 2 คน คือคนที่ 1 และ 3 ในคนที่ 4 มีการแสดงออกของเงินเท่าเดิม และในคนที่ 2 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น เมื่อพิจารณาสัดส่วนการแสดงออกของเงินแรงค์แอลต่อเงินโอพีจี พบว่ามีค่าสัดส่วนเพิ่มสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่เป็นเซลล์สร้างกระดูกซึ่งไม่ถูกกระตุ้นและเพิ่มสูงกว่ากลุ่มเซลล์สร้างกระดูกที่ถูกกระตุ้นด้วยส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อในอาสาสมัคร 3 คน คือ คนที่ 1, 3 และ 4 ส่วนคนที่ 2 มีค่าสัดส่วนลดลง จะเห็นว่ารูปแบบการแสดงออกของเงินแรงค์แอล เงินโอพีจี และสัดส่วนการแสดงออกของเงินแรงค์แอลต่อเงินโอพีจี ในอาสาสมัคร 3 คน มีรูปแบบเหมือนกันแต่อีก 1 คนจะแตกต่างที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากการตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นในแต่ละคนไม่เหมือนกัน

รูปแบบการแสดงออกของสัดส่วนของเงินแรงค์แอลต่อเงินโอพีจีมีค่าสูงขึ้นเมื่อเซลล์สร้างกระดูกสัมผัสส่วนผสมของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อและสารสกัดจากใบข่อยโดยเปรียบเทียบกับกลุ่มเซลล์สร้างกระดูกและกลุ่มเซลล์สร้างกระดูกที่ถูกกระตุ้นด้วยส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อในอาสาสมัคร 3 คน โดยมีการแสดงออกของเงินแรงค์แอลเพิ่มขึ้นและลดการแสดงออกของเงินโอพีจี

ในขณะที่เซลล์สร้างกระดูกสัมผัสสารสกัดจากไขข้อทำให้สัดส่วนการแสดงออกของจีนทั้งสองแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติจากกลุ่มควบคุมที่เป็นเซลล์สร้างกระดูกแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากไขข้อเพียงชนิดเดียวไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนการแสดงออกของจีนอย่างชัดเจน แต่เมื่อเซลล์สร้างกระดูกสัมผัสสารทดสอบทั้ง 2 ชนิดกลับพบการแสดงออกของสัดส่วนที่สูงขึ้นดังกล่าว น่าจะเป็นไปได้ว่าส่วนผสมของสารทดสอบทั้ง 2 ชนิดอาจเกิดปฏิกิริยาต่อกันแล้วทำให้สารประกอบเหล่านั้นมีผลต่อกลไกใดกลไกหนึ่งดังนี้

- ไปจับกับตัวรับที่กระตุ้นการแสดงออกของจีนแรงค์แอลให้สูงขึ้น
- ไปจับกับตัวรับที่มีผลยับยั้งการแสดงออกของจีนแรงค์แอลโดยอาจไปทำให้ไม่สามารถจับกับตัวกระตุ้นได้หรือจับได้ลดลง
- มีผลขัดขวางการทำงานของตัวกระตุ้นที่มีผลยับยั้งการแสดงออกของจีนแรงค์แอล
- ไปจับกับตัวรับที่มีผลยับยั้งการแสดงออกของจีนโอพีจี
- มีผลขัดขวางตัวรับที่กระตุ้นการแสดงออกของจีนโอพีจี โดยอาจไปทำให้ไม่สามารถจับกันได้หรือจับได้ลดลง
- มีผลต่อวิถีสัญญาณที่ทำให้มีการแสดงออกของจีนแรงค์แอลและโอพีจี โดยการแสดงออกของจีนโอพีจีพบว่าตัวกระตุ้นต่างๆ เช่น อินเตอร์ลิวคิน-1 โกรทแฟคเตอร์ที่ได้จากเกล็ดเลือด และบีเอ็มพี-4 (bone morphogenetic protein-4, BMP-4) จะไปกระตุ้นเซลล์ผ่านทางวิถีแมพไคเนส โดยเฉพาะพี 38 แมพไคเนส (p38 MAPK) และโปรตีนไคเนสเอ (protein kinase A, PKA) ให้มีการแสดงออกของจีนโอพีจี(110-112) ส่วนการแสดงออกของจีนแรงค์แอลพบมีตัวกระตุ้นต่างๆ เช่น อินเตอร์ลิวคิน-1 ทีเอ็นเอฟ(113)จะไปกระตุ้นเซลล์ผ่านทางวิถีพี 38 แมพไคเนส (p38 MAPK)(114) และยังพบว่าการแสดงออกของจีนแรงค์แอลและโอพีจียังสามารถถูกควบคุมผ่านวิถีสัญญาณวินท์/เบต้า คาทีนิน ในวิถีเดียวกันกับการควบคุมกระบวนการสร้างกระดูกของเซลล์สร้างกระดูก โดยพบว่าวินท์ 3เอ จะไปกระตุ้นเซลล์ผ่านทางวิถีสัญญาณเบต้า คาทีนิน เพื่อไปกระตุ้นทรานสคริปชันแฟคเตอร์ คือ แอลอีเอฟ1/ทีซีเอฟ (lymphoid enhancer factor 1/T cell factor, Lef1/Tcf) ส่งผลให้เกิดการแสดงออกของจีนแรงค์แอลและโอพีจี นอกจากนี้ยังพบว่าบีเอ็มพี-2 สามารถเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของจีนจีนแรงค์แอลและโอพีจีผ่านวิถีสัญญาณเบต้า คาทีนินได้เช่นเดียวกัน (115-118)

เป็นที่ทราบกันอย่างแพร่หลายว่าการสร้างหรือการละลายกระดูก จะขึ้นกับสัดส่วนการแสดงออกของจีนแรงค์แอลต่อจีนโอพีจี (2) ซึ่งสัดส่วนการแสดงออกของจีนดังกล่าวจะเพิ่มขึ้นเมื่อเซลล์สร้างกระดูกสัมผัสสารทดสอบทั้ง 2 ชนิด แต่ก็ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าสารสกัดจากไขข้อมี

ผลละลายกระดูก เนื่องจากการแสดงออกของยีนแรงค์แอลของเซลล์สร้างกระดูกจะส่งผลให้ให้เกิดการละลายของกระดูกทางอ้อม แต่ถ้าแมคโคฟาจที่ถูกกระตุ้น ไปจับกับที ลิมโฟไซต์ทำให้ที ลิมโฟไซต์มีการแสดงออกของยีนแรงค์แอล จะส่งผลให้ให้เกิดการละลายของกระดูกโดยตรง (34) จึงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม ทั้งนี้การศึกษานี้ทดลองในเซลล์ ซึ่งเป็นผลเพียงด้านหนึ่งที่เกิดขึ้นจากเซลล์เพียงชนิดเดียวที่ถูกเลี้ยงในภาวะแวดล้อมจำลอง ในขณะที่ในสิ่งมีชีวิตมีเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ ทำงานร่วมกัน ดังนั้นการแปลผลการทดสอบที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์จึงมีข้อจำกัด โดยเฉพาะการปรับใช้ผลในทางคลินิก

บทที่ 6

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

1. สรุปผลการวิจัย

เซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์เมื่อถูกกระตุ้นด้วยส่วนผสมระหว่างส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อ *พอร์ไฟโรโมแนส* *จิงจิवालิส* และสารสกัดจากใบข่อย พบว่ามีการแสดงออกของยีน *แรงค์แอล* เพิ่มขึ้น การแสดงออกของยีน *โอพีจี* ลดลง และสัดส่วนการแสดงออกของยีน *แรงค์แอล* ต่อยีน *โอพีจี* สูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มเซลล์สร้างกระดูกที่ไม่ถูกกระตุ้น กลุ่มเซลล์สร้างกระดูกที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดจากใบข่อย และกลุ่มเซลล์สร้างกระดูกที่ถูกกระตุ้นด้วยส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อเพียงชนิดเดียว

2. ข้อเสนอแนะ

ควรมีการศึกษาในอนาคตเพื่อยืนยันผลการละลายตัวของกระดูกโดยตรง เช่น ศึกษาเพิ่มเติมในเซลล์สลายกระดูก หรือศึกษาในสัตว์ทดลอง

เอกสารอ้างอิง

1. กองทันตสาธารณสุข. รายงานผลการสำรวจทันตสุขภาพแห่งชาติ. 2550.
2. Cochran DL. Inflammation and bone loss in periodontal disease. **J Periodontol.** 2008 Aug;79(8 Suppl):1569-76.
3. Schenkein H. The pathogenesis of periodontal disease. **J Periodontol.** 1999 Apr;70(4):457-70
4. Zambon JJ. Periodontal diseases: microbial factors. **Ann Periodontol.** 1996 Nov;1(1):879-925.
5. Wara-aswapati N, Pitiphat W, Chanchaimongkon L, Taweechaisupapong S, Boch JA, Ishikawa I. Red bacterial complex is associated with the severity of chronic periodontitis in a Thai population. **Oral Dis.** 2009 Jul;15(5):354-9.
6. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. **J Clin Periodontol.** 1998 Feb;25(2):134-44.
7. Slots J. Bacterial specificity in adult periodontitis. A summary of recent work. **J Clin Periodontol.** 1986 Nov;13(10):912-7.
8. Socransky SS, Haffajee AD. Microbial mechanisms in the pathogenesis of destructive periodontal diseases: a critical assessment. **J Periodontal Res.** 1991 May;26(3 Pt 2):195-212.
9. Van Dyke TE, Offenbacher S, Place D, Dowell VR, Jones J. Refractory periodontitis: mixed infection with *Bacteroides gingivalis* and other unusual *Bacteroides* species. A case report. **J Periodontol.** 1988 Mar;59(3):184-9.
10. Holt SC, Ebersole J, Felton J, Brunsvold M, Kornman KS. Implantation of *Bacteroides gingivalis* in nonhuman primates initiates progression of periodontitis. **Science.** 1988 Jan 1;239(4835):55-7.
11. Holt SC, Kesavalu L, Walker S, Genco CA. Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. **Periodontol 2000.** 1999 Jun;20(1):168-238.
12. Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. **J Periodontol.** 2003 Mar;74(3):391-401.

13. นวรัตน์ วราอัสวปติ เจริญ. เอกสารคำสอนการตอบสนองของภูมิคุ้มกันในโรคปริทันต์อักเสบ. ขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2546.
14. Taweechaisupapong S, Singhara S, Choopan T. Antimicrobial effect of *Streblus asper* leaf extract on selected anaerobic bacteria. **J Dent Assoc Thai.** 2002;52(4):227-33.
15. สมเกียรติ เหลืองไพรินทร์, สุรัตน์ ลิณะศิริมากุล. ผลของยาสีฟันผสมสารสกัดจากใบข่อยต่อการยับยั้งเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ ในน้ำลาย. รายงานการวิจัย. ขอนแก่น: ภาควิชาชีววิทยาช่องปากคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 2534.
16. Taweechaisupapong S, Wongkham S, Chareonsuk S, Suparee S, Srilalai P, Chaiyarak S. Selective activity of *Streblus asper* on Mutans streptococci. **J Ethnopharmacol.** 2000 Apr;70(1):73-9.
17. Taweechaisupapong S, Wongkham S, Rattanathongkom A, Singhara S, Choopan T, Suparee S. Effect of mouth rinse containing *Streblus* leaf extract on gingivitis and plaque formation. **J Dent Assoc Thai.** 2002;52:383-91.
18. กรรณิณี อินทรหนองไผ่. ผลทางคลินิกและทางจุลชีววิทยาของการใช้สารสกัดจากใบข่อยฉีดล้างในร่องลึกปริทันต์ร่วมกับการขูดหินน้ำลายและเกลารากฟันในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังในระยะคงสภาพ [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาปริทันตวิทยา]. ขอนแก่น: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2547.
19. อรวรรณ อภินทนาพงศ์. ความปลอดภัยทางคลินิก ผลทางคลินิกและทางจุลชีววิทยาของการใช้เจลผสมสารสกัดจากใบข่อยลงไปร่องลึกปริทันต์ร่วมกับการขูดหินน้ำลายและเกลารากฟันในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรัง [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาปริทันตวิทยา]. ขอนแก่น: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2550.
20. อัญชนา ลุนพรม. การพัฒนาตำรับเจลผสมสารสกัดจากใบข่อยเพื่อใช้ร่วมกับการรักษาโรคปริทันต์อักเสบและการทดสอบความปลอดภัยทางคลินิก [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาปริทันตวิทยา]. ขอนแก่น: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2548.
21. จินตนา จุลทัศน์. ส่วนประกอบทางเคมีและฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดจากใบข่อย [วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ]. ขอนแก่น: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2550.
22. พิษญา สุทินฤกษ์. ผลการด้านการอักเสบและการละลายตัวของกระดูกของสารสกัดจากใบข่อยในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ต่อการกระตุ้นด้วยเชื้อก่อโรคปริทันต์ [วิทยานิพนธ์ปริญญา

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาปริทันตวิทยา]. ขอนแก่น: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2551.

23. Pathirana RD, O'Brien-Simpson NM, Reynolds EC. Host immune responses to *Porphyromonas gingivalis* antigens. **Periodontol** 2000. 2009 Feb;52(1):218-37.
24. **Porphyromonas**. 2011 jun 2 [updated 2010 Aug 6]; Available from: <http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Porphyromonas>.
25. Loesche WJ. Chemotherapy of dental plaque infections. **Oral Sci Rev**. 1976;9:65-107.
26. Socransky SS. Criteria for the infectious agents in dental caries and periodontal disease. **J Clin Periodontol**. 1979 Dec;6(7):16-21.
27. Kamma JJ, Nakou M, Manti FA. Predominant microflora of severe, moderate and minimal periodontal lesions in young adults with rapidly progressive periodontitis. **J Periodontal Res**. 1995 Jan;30(1):66-72.
28. Prajane S., Wongwajana S., Tantanapornkul V., Sriisarn R., Sirijarupan T., Samdaeng P. Search for specific antigens of *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis patients: An analysis of sonic extracted antigens of *P. gingivalis* by SDS-PAGE and Western blot. **KDJ**. 2004;7(2):97-105.
29. O'Brien-Simpson NM, Veith PD, Dashper SG, Reynolds EC. Antigens of bacteria associated with periodontitis. **Periodontol** 2000. 2004;35:101-34.
30. Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. **J Periodontol**. 1992 Apr;63(4 Suppl):322-31.
31. Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, Solovyev I, Colombero A, Timms E, et al. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1999 Mar 30;96(7):3540-5.
32. Nakagawa N, Kinoshita M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Yano K, et al. RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. **Biochem Biophys Res Commun**. 1998 Dec 18;253(2):395-400.
33. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, et al. OPG is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. **Nature**. 1999 Jan 28;397(6717):315-23.

34. Taubman MA, Valverde P, Han X, Kawai T. Immune response: the key to bone resorption in periodontal disease. **J Periodontol.** 2005 Nov;76(11 Suppl):2033-41.
35. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, et al. osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. **Genes Dev.** 1998 May 1;12(9):1260-8.
36. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. **Cell.** 1997 Apr 18;89(2):309-19.
37. Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. **Trends Mol Med.** 2006 Jan;12(1):17-25.
38. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. **Endocrinology.** 2001 Dec;142(12):5050-5.
39. Choi Y, Woo KM, Ko SH, Lee YJ, Park SJ, Kim HM, et al. Osteoclastogenesis is enhanced by activated B cells but suppressed by activated CD8(+) T cells. **Eur J Immunol.** 2001 Jul;31(7):2179-88.
40. Wara-aswapati N, Surarit R, Chayasadam A, Boch JA, Pitiphat W. RANKL upregulation associated with periodontitis and Porphyromonas gingivalis. **J Periodontol.** 2007 Jun;78(6):1062-9.
41. Crotti T, Smith MD, Hirsch R, Soukoulis S, Weedon H, Capone M, et al. Receptor activator NF kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. **J Periodontal Res.** 2003 Aug;38(4):380-7.
42. Mogi M, Otogoto J, Ota N, Togari A. Differential expression of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. **J Dent Res.** 2004 Feb;83(2):166-9.
43. Nagasawa T, Kobayashi H, Kiji M, Aramaki M, Mahanonda R, Kojima T, et al. LPS-stimulated human gingival fibroblasts inhibit the differentiation of monocytes into osteoclasts through the production of osteoprotegerin. **Clin Exp Immunol.** 2002 Nov;130(2):338-44.
44. Liu D, Xu JK, Figliomeni L, Huang L, Pavlos NJ, Rogers M, et al. Expression of RANKL and OPG mRNA in periodontal disease: possible involvement in bone destruction. **Int J Mol Med.** 2003 Jan;11(1):17-21.

45. Jin Q, Cirelli JA, Park CH, Sugai JV, Taba M, Jr., Kostenuik PJ, et al. RANKL inhibition through osteoprotegerin blocks bone loss in experimental periodontitis. **J Periodontol.** 2007 Jul;78(7):1300-8.
46. Chen R, Kanzaki H, Chiba M, Nishimura M, Kanzaki R, Igarashi K. Local osteoprotegerin gene transfer to periodontal tissue inhibits lipopolysaccharide-induced alveolar bone resorption. **J Periodontal Res.** 2008 Apr;43(2):237-45.
47. Hay E, Nouraud A, Marie PJ. N-cadherin negatively regulates osteoblast proliferation and survival by antagonizing Wnt, ERK and PI3K/Akt signalling. **PLoS One.** 2009;4(12):e8284.
48. David JM. **Basic Cell Culture.** 2nd ed. New York: Oxford University Press Inc.; 2002.
49. Aubin JE, Triffitt JT. Mesenchymal Stem Cells and Osteoblast Differentiation. In: John P. Bilezikian, Lawrence G. Raisz, Rodan GA, editors. **Principles of Bone Biology.** California: Academic press; 2002. p. 59-81.
50. Karsenty G. Minireview: transcriptional control of osteoblast differentiation. **Endocrinology.** 2001 Jul;142(7):2731-3.
51. Javed A, Gutierrez S, Montecino M, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, et al. Multiple Cbfa/AML sites in the rat osteocalcin promoter are required for basal and vitamin D-responsive transcription and contribute to chromatin organization. **Mol Cell Biol.** 1999 Nov;19(11):7491-500.
52. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. **Cell.** 1997 May 30;89(5):747-54.
53. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, et al. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. **Cell.** 1997 May 30;89(5):755-64.
54. Mundlos S, Otto F, Mundlos C, Mulliken JB, Aylsworth AS, Albright S, et al. Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. **Cell.** 1997 May 30;89(5):773-9.
55. Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, et al. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. **Cell.** 1997 May 30;89(5):765-71.

56. Prince M, Banerjee C, Javed A, Green J, Lian JB, Stein GS, et al. Expression and regulation of Runx2/Cbfa1 and osteoblast phenotypic markers during the growth and differentiation of human osteoblasts. **J Cell Biochem.** 2001;80(3):424-40.
57. Matsubara T, Kida K, Yamaguchi A, Hata K, Ichida F, Meguro H, et al. BMP2 regulates Osterix through Msx2 and Runx2 during osteoblast differentiation. **J Biol Chem.** 2008 Oct 24;283(43):29119-25.
58. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. **Cell.** 2002 Jan 11;108(1):17-29.
59. Hessle L, Johnson KA, Anderson HC, Narisawa S, Sali A, Goding JW, et al. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2002 Jul 9;99(14):9445-9.
60. งานสำรวจวิเคราะห์ข้อมูล. พืชสมุนไพรเล่มที่ 1: สำนักงานเกษตรและสหกรณ์ภาคกลาง, กรุงเทพฯ; 2528.
61. วิบูลย์ เข้มเฉลิม. ข่อย คุณค่าที่คนมองข้าม. **โลกดูสุขภาพ.** 2537;1(3):20-2.
62. บัญญัติ สุขศรีงาม. สมุนไพรเพื่อสุขภาพดีถ้วนหน้าก่อนปี 2543. **ใกล้หมอ.** 2540:70-2.
63. วุฒิ วุฒิชรรณเวช. เกษตรกรรมไทย. กรุงเทพฯ: โอ เอส พรีนติ้งเฮาส์; 2540.
64. Rastogi S, Kulshreshtha DK, Rawat AK. *Streblus asper* Lour. (Shakhotaka): A Review of its Chemical, Pharmacological and Ethnomedicinal Properties. **Evid Based Complement Alternat Med.** 2006 Jun;3(2):217-22.
65. Wongkham S, Laupattarakasaem P, Pienthaweechai K, Areejitranusorn P, Wongkham C, Techanitiswad T. Antimicrobial activity of *Streblus asper* leaf extract. **Phytother Res.** 2001 Mar;15(2):119-21.
66. เทอดพงษ์ ตรีรัตน์และบุญนิตย์ ทวีบุรณ์. การทดสอบประสิทธิภาพส่งนสกดของข่อยต่อเชื้อสเตรปโตคอกคัส มีวแทนส์ และสเตรปโตคอกคัส ซาไลวาเรียส. **วทันต.** 2530;37(3):119-24.
67. โสพิศ วงศ์คำ, เกษแก้ว เพียรวิชัย, พิสมัย เหล่าภัทรเกษม, เปรมใจ อารีจิตรานุสรณ์, ชัยศิริ วงศ์คำ, ทิพวัลย์ เดชะนิธิสวัสดิ์, et al. การศึกษาผลของสารสกัดจากใบข่อยต่อเชื้อจุลินทรีย์ในช่องปาก. รายงานการวิจัย. ขอนแก่น: คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2538.

68. สุวิมล ทวีชัยศุภพงษ์, ญัฐยา ลีลาอภิรดี, พรพิศ เหลาพรม, ปัญญา เขม้นการ. ผลของการสกัดจากใบข่อยต่อเชื้อจุลชีพในคลองรากฟันที่เจริญในสภาวะไร้ออกซิเจน. รายงานการวิจัย. ขอนแก่น: คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น2543.
69. Limsong J, Benjavongkulchai E, Kuvatanasuchati J. Inhibitory effect of some herbal extracts on adherence of Streptococcus mutans. **J Ethnopharmacol.** 2004 Jun;92(2-3):281-9.
70. Taweechaisupapong S, Choopan T, Singhara S, Chatrchaiwiwatana S, Wongkham S. In vitro inhibitory effect of Streblus asper leaf-extract on adhesion of Candida albicans to human buccal epithelial cells. **J Ethnopharmacol.** 2005 Jan 4;96(1-2):221-6.
71. Taweechaisupapong S, Klanrit P, Singhara S, Pitiphat W, Wongkham S. Inhibitory effect of Streblus asper leaf-extract on adhesion of Candida albicans to denture acrylic. **J Ethnopharmacol.** 2006 Jul 19;106(3):414-7.
72. Caton JG, Ciancio SG, Blieden TM, Bradshaw M, Crout RJ, Hefti AF, et al. Treatment with subantimicrobial dose doxycycline improves the efficacy of scaling and root planing in patients with adult periodontitis. **J Periodontol.** 2000 Apr;71(4):521-32.
73. Caton JG, Ciancio SG, Blieden TM, Bradshaw M, Crout RJ, Hefti AF, et al. Subantimicrobial dose doxycycline as an adjunct to scaling and root planing: post-treatment effects. **J Clin Periodontol.** 2001 Aug;28(8):782-9.
74. Williams RC. Non-steroidal anti-inflammatory drugs for altering periodontal bone loss. **J Dent Res.** 1999 Feb;78(2):638-42.
75. Takashiba S, Naruishi K, Murayama Y. Perspective of cytokine regulation for periodontal treatment: fibroblast biology. **J Periodontol.** 2003 Jan;74(1):103-10.
76. มนตรี จุฬวัฒน์ทล, ชัยณัฐร สวัสดิ์วัฒน์, ยงยุทธ ยุทวงศ์, และคณะ. ชีวเคมี. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล; 2542.
77. วสันต์ จันทราทิตย์, ปราณี ลิ้นะชัย, วาสนา ศิริรังษี, และคณะ. วิทยาการทันตกรรมในการตรวจวินิจฉัยโครโมโซมและยีน. เชียงใหม่: โรงพิมพ์พงษ์สวัสดิ์การพิมพ์; 2539.
78. พจน์ ทรบุญลือ, โสพิศ วงศ์คำ, พัชร บุญศิริ, และคณะ. ตำราชีวเคมี. 2 ed. ขอนแก่น: โรงพิมพ์คลังน่านวิทยาขอนแก่น; 2540.
79. จริยา ชมวารินทร์, ชาญวิทย์ ลีลาวัฒน์, เต็มดวง ล้อมไพบุรย์, และคณะ, editors. PCR technology and Applications[ไม่ได้ตีพิมพ์]. ขอนแก่น: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

2540.

80. วิกีพีเดียสารานุกรมเสรี. ปฏิบัติการลูกโซ่พอลิเมอร์. [9 ตุลาคม 2555]; Available from: <http://th.wikipedia.org/wiki/%E0%B8%9B%E0%B8%8F%E0%B8%B4%E0%B8%81%E0%B8%B4%E0%B8%A3%E0%B8%B4%E0%B8%A2%E0%B8%B2%E0%B8%A5%E0%B8%B9%E0%B8%81%E0%B9%82%E0%B8%8B%E0%B9%88%E0%B8%9E%E0%B8%AD%E0%B8%A5%E0%B8%B4%E0%B9%80%E0%B8%A1%E0%B8%AD%E0%B9%80%E0%B8%A3%E0%B8%AA>.
81. เอกฉนัย กอภิมพงษ์. Real-time PCR. **LAB TODAY**. 2548;4:63-8.
82. Reischl U, Kochanowski B. Quantitative PCR. In: Reischl U, Kochanowski B, editors. **Methods in Molecular Medicine**. Totowa: Humana Press; 1999. p. 3-30.
83. Applied Biosystem. **Real-Time PCR vs. traditional PCR**. [cited 2006 Jan 2]; Available from: http://www.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/rtPCR_vs_tradPCR.pdf.
84. Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. **Nature**. 1989;339(6221):237-8.
85. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. **Biotechnology (N Y)**. 1992;10(4):413-7.
86. Wittwer C, Herrmann M, Moss A, Rasmussen R. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. **Biotechniques**. 1997;22:130-8.
87. Wittwer C, Ririe K, Andrew R, David D, Gundry R, Balis U. The LightCycler: A microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. **Biotechniques**. 1997;22:176-81.
88. Ririe K, Rasmussen R, Wittwer C. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. **Anal Biochem**. 1997;245:154-60.
89. Applied Biosystem. **Introduction to real-time PCR and uses for gene expression analysis**. [cited 2008 Oct 9]; Available from: http://www.uoguelph.ca/~genomics/Genomics%20Facility%20_Seminar.pdf.
90. หน่วยไวรัสวิทยาและจุลชีววิทยาโมเลกุลโรงพยาบาลรามธิบดี. **Qualitative and Quantitative Real-Time PCR**. [cited 2008 Oct 9]; Available from: http://www.virusrama.org/real_time_pcr/real_time_PCR.htm.
91. Cardullo R, Agrawal S, Flores C, Zamecnik kP, Wolf D. Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. **Proc Natl Acad Sci USA**. 1998;85:8790-4.

92. Bernard PS, Wittwer CT. Real-time PCR technology for cancer diagnostics. **Clin Chem.** 2002;48(8):1178-85.
93. Lee LG, Connell CR, Bloch W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. **Nucleic Acids Res.** 1993 Aug 11;21(16):3761-6.
94. Tyagi S, Kramer F. Molecular Beacon: Probes that fluorescence upon hybridization. **Nature Biotechnology.** 1996; 14:303-8.
95. Bio sciences. **Strategy.gene-quantification.info.** [cited 2012 9 Oct]; Available from: <http://www.gene-quantification.de/strategy.html>.
96. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods.** 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.
97. อารยา ลิมากรณัณวิชย์. การปล่อยโปรตีนจากสารโคโคซานที่ผสมอยู่ในวัสดุกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพช่องปาก]. สงขลา: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์; 2549.
98. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem.** 1951 Nov;193(1):265-75.
99. Giuliani N, Colla S, Morandi F, Lazzaretti M, Sala R, Bonomini S, et al. Myeloma cells block RUNX2/CBFA1 activity in human bone marrow osteoblast progenitors and inhibit osteoblast formation and differentiation. **Blood.** 2005 Oct 1;106(7):2472-83.
100. Van Belle H. Alkaline phosphatase. I. Kinetics and inhibition by levamisole of purified isoenzymes from humans. **Clin Chem.** 1976 Jul;22(7):972-6.
101. Limapornvanich A, Jitpukdeebodintra S, Hengtrakool C, Kedjarune-Leggat U. Bovine serum albumin release from novel chitosan-fluoro-aluminosilicate glass ionomer cement: stability and cytotoxicity studies. **J Dent.** 2009 Sep;37(9):686-90.
102. Reddi D, Bostanci N, Hashim A, Aduse-Opoku J, Curtis MA, Hughes FJ, et al. Porphyromonas gingivalis regulates the RANKL-OPG system in bone marrow stromal cells. **Microbes Infect.** 2008 Nov-Dec;10(14-15):1459-68.
103. Thammasitboon K, Goldring SR, Boch JA. Role of macrophages in LPS-induced osteoblast and PDL cell apoptosis. **Bone.** 2006 Jun;38(6):845-52.
104. Ferrari D, Pizzirani C, Adinolfi E, Lemoli RM, Curti A, Idzko M, et al. The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. **J Immunol.** 2006 Apr 1;176(7):3877-83.

105. Hans M, Hans VM. Toll-like receptors and their dual role in periodontitis: a review. **J Oral Sci.** Sep;53(3):263-71.
106. Jandinski JJ. Osteoclast activating factor is now interleukin-1 beta: historical perspective and biological implications. **J Oral Pathol.** 1988 Apr;17(4):145-52.
107. Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, Smith DD, Mundy GR. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. **Nature.** 1986 Feb 6-12;319(6053):516-8.
108. Kitajima I, Nakajima T, Imamura T, Takasaki I, Kawahara K, Okano T, et al. Induction of apoptosis in murine clonal osteoblasts expressed by human T-cell leukemia virus type I tax by NF-kappa B and TNF-alpha. **J Bone Miner Res.** 1996 Feb;11(2):200-10.
109. Damoulis PD, Hauschka PV. Nitric oxide acts in conjunction with proinflammatory cytokines to promote cell death in osteoblasts. **J Bone Miner Res.** 1997 Mar;12(3):412-22.
110. Hormdee D, Nagasawa T, Kiji M, Yashiro R, Kobayashi H, Koshy G, et al. Protein kinase-A-dependent osteoprotegerin production on interleukin-1 stimulation in human gingival fibroblasts is distinct from periodontal ligament fibroblasts. **Clin Exp Immunol.** 2005 Dec;142(3):490-7.
111. Tazoe M, Mogi M, Goto S, Togari A. Involvement of p38MAP kinase in bone morphogenetic protein-4-induced osteoprotegerin in mouse bone-marrow-derived stromal cells. **Arch Oral Biol.** 2003 Aug;48(8):615-9.
112. Zhang J, Fu M, Myles D, Zhu X, Du J, Cao X, et al. PDGF induces osteoprotegerin expression in vascular smooth muscle cells by multiple signal pathways. **FEBS Lett.** 2002 Jun 19;521(1-3):180-4.
113. Wei S, Kitaura H, Zhou P, Ross FP, Teitelbaum SL. IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. **J Clin Invest.** 2005 Feb;115(2):282-90.
114. Kumar S, Votta BJ, Rieman DJ, Badger AM, Gowen M, Lee JC. IL-1- and TNF-induced bone resorption is mediated by p38 mitogen activated protein kinase. **J Cell Physiol.** 2001 Jun;187(3):294-303.
115. Boyce BF, Xing L, Chen D. Osteoprotegerin, the bone protector, is a surprising target for beta-catenin signaling. **Cell Metab.** 2005 Dec;2(6):344-5.

116. Sato M, Nakashima A, Nashimoto M, Yawaka Y, Tamura M. Regulation of osteoprotegerin and RANKL gene expression by Wnt/B-catenin and bone morphogenetic protein-2 in C2C12 cells. **Interface Oral Health Science**. 2007;173-78.
117. Spencer GJ, Utting JC, Etheridge SL, Arnett TR, Genever PG. Wnt signalling in osteoblasts regulates expression of the receptor activator of NFkappaB ligand and inhibits osteoclastogenesis in vitro. **J Cell Sci**. 2006 Apr 1;119(Pt 7):1283-96.
118. Fujita K, Janz S. Attenuation of WNT signaling by DKK-1 and -2 regulates BMP2-induced osteoblast differentiation and expression of OPG, RANKL and M-CSF. **Mol Cancer**. 2007;6:71.