

บทที่ 1

บทนำ

1.ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคปริทันต์อักเสบเป็นโรคที่มีกระบวนการเกิดที่ซับซ้อนโดยจะพบมีการทำลายของอวัยวะปริทันต์เช่นเอ็นยึดปริทันต์ (periodontal ligament) และกระดูกเบ้าฟัน (alveolar bone) จนอาจทำให้มีการสูญเสียฟันไปในที่สุด การเกิดพยาธิสภาพของโรคเกี่ยวข้องกับปัจจัยหลายอย่าง ซึ่งปัจจัยสำคัญได้แก่ เชื้อก่อโรคปริทันต์ (periodontal pathogens) ที่อยู่ในร่องลึกปริทันต์ และการตอบสนองของภูมิคุ้มกันของร่างกาย (host-mediated immune response)¹ เชื้อแบคทีเรียที่สัมพันธ์กับโรคปริทันต์มีหลายชนิดเช่น เชื้อพอร์ไฟโรโมนัส จิงจิวัลิส (*Porphyromonas gingivalis*) เชื้อแอคทริเกรติแบคเตอร์ แอคทีโนมัยซีเทมคอมิตานส์ (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) เชื้อแทนเนอเรลลา ฟอร์ไซเทีย (*Tannerella forsythia*) และเชื้อพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย (*Prevotella intermedia*) เป็นต้น²⁻⁵

เชื้อพอร์ไฟโรโมนัส จิงจิวัลิส เป็นเชื้อก่อโรคปริทันต์ที่ได้รับความสนใจศึกษากันมากเนื่องจากตรวจพบได้บ่อยในร่องลึกปริทันต์โดยมีปัจจัยในการก่อโรค (virulence factor) หลายชนิดเช่นไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide, LPS) ฟิมเบรีย (fimbriae) แคปซูล (capsule) ซีสทีนโปรติเอส (cysteine proteases)⁶ และมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนหลายชนิด ซึ่งปัจจัยก่อโรคเหล่านี้เป็นสาเหตุหลักในการก่อโรคปริทันต์ ผลจากแบคทีเรียและสารที่ผลิตจากเชื้อ เช่นไลโปโพลีแซคคาไรด์สามารถกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยทำให้เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน เช่นโมโนไซต์ (monocyte) มาโครฟาจ (macrophage) เพิ่มการผลิตและหลั่งสารอักเสบ (inflammatory mediators) ต่างๆเช่น อินเตอร์ลิวคิน (interleukin; IL) ทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์ (Tumor necrosis factor; TNF) และโพรสตาแกลนดิน (Prostaglandins; PG) ซึ่งสารอักเสบเหล่านี้สามารถก่อให้เกิดการทำลายอวัยวะปริทันต์ตามมา²

เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกของมนุษย์ (human gingival fibroblast; HGFs) เป็นเซลล์ที่มีบทบาทในการควบคุมการสร้างเซลล์สลายกระดูก (osteoclast formation) โดยอาศัยกลไกการกระตุ้นและยับยั้งการสร้างไซโตไคน์⁷ เมื่อได้รับการกระตุ้นจากเชื้อก่อโรคปริทันต์ จะพบว่ามี การแสดงออกของไซโตไคน์ ที่สัมพันธ์กับการอักเสบและการทำลายของกระดูกหลายชนิด เช่นอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า (IL-1 β) อินเตอร์ลิวคิน-6 (IL-6) อินเตอร์ลิวคิน-8 (IL-8) โพรสตาแกลนดินอี 2 (PGE₂) ซึ่งเป็นสารสำคัญที่พบว่ามีระดับสูงขึ้นในอวัยวะปริทันต์หรือในน้ำเหลืองเหงือกบริเวณที่เป็นโรคเมื่อเทียบกับบริเวณที่ไม่เป็นโรค⁸⁻¹⁰

โพรสตาแกลนดินอี 2 เป็นสารอักเสบสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคปริทันต์อักเสบโดยทำให้มีการเพิ่มอุณหภูมิของบริเวณที่มีการอักเสบ สามารถกระตุ้นให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือด (vasodilatation) และปลดปล่อยสารออกจากหลอดเลือด (vasopermeability) ส่งผลให้เกิดการบวมแดงของเนื้อเยื่อบริเวณที่เกิด

การอักเสบ¹¹ และสามารถกระตุ้นให้มีการผลิตและหลั่งเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส (matrix metalloproteinases; MMPs) จากเซลล์เป้าหมายเช่นเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกของมนุษย์ โมโนไซต์ มาโครฟาจ ซึ่งสารนี้เป็นตัวการสำคัญที่ก่อให้เกิดการย่อยสลายของเนื้อเยื่อยึดต่อในอวัยวะปริทันต์และกระดูก เบ้าฟัน¹² โพรستاแกลนดินอี 2 ยังสามารถเสริมการออกฤทธิ์ (synergistic function) ของอินเตอร์ลิวคิน-1 และ ทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์-อัลฟา ในการกระตุ้นการทำงานของเซลล์สลายกระดูก¹³ จากการศึกษาเพื่อตรวจหา ปริมาณโพรستاแกลนดินอี 2 จากเนื้อเยื่อเหงือกของผู้ป่วยที่มีอวัยวะปริทันต์ปกติ เนื้อเยื่อเหงือกผู้ป่วยที่เป็น โรคเหงือกอักเสบและเนื้อเยื่อเหงือกจากผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ พบว่าค่าเฉลี่ยของปริมาณโพรستاแกลนดิน อี 2 ในเนื้อเยื่อเหงือกของผู้ป่วยโรคเหงือกอักเสบและปริทันต์อักเสบมีค่าสูงกว่าในผู้ป่วยที่มีอวัยวะปริทันต์ ปกติ¹⁴ และการศึกษาระยะยาวในมนุษย์ที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบโดยวัดปริมาณโพรستاแกลนดินอี 2 ใน น้ำเหลืองร่องเหงือกและวัดค่าทางคลินิกทุก 3 เดือนพบว่าค่าเฉลี่ยของปริมาณโพรستاแกลนดินอี 2 ใน น้ำเหลืองร่องเหงือกสูงขึ้นในช่วงที่มีการสูญเสียการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์¹¹ การศึกษาความสัมพันธ์ของ ปริมาณโพรستاแกลนดินอี 2 ในน้ำเหลืองร่องเหงือกของผู้ป่วยที่มีอวัยวะปริทันต์ปกติ ผู้ป่วยโรคเหงือก อักเสบและผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังโดยเก็บน้ำเหลืองเหงือกในตำแหน่งที่มีอวัยวะปริทันต์ปกติ เปรียบเทียบกับตำแหน่งที่มีภาวะเหงือกอักเสบและตำแหน่งที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ พบว่าปริมาณโพรستا แกลนดินอี 2 ที่ตรวจพบในตำแหน่งที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบจะสูงกว่าตำแหน่งที่มีอวัยวะปริทันต์ปกติและ ตำแหน่งที่มีภาวะเหงือกอักเสบ โดยสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคเมื่อใช้การตรวจวัดค่าทางคลินิกคือค่า ความลึกของร่องลึกปริทันต์ (pocket depth; PD) และค่าดัชนีการอักเสบของเหงือก (gingival index; GI) เป็น เกณฑ์ กล่าวคือโพรستاแกลนดินอี 2 ที่ตรวจพบจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อค่าความลึกของร่องลึกปริทันต์และค่า ดัชนีการอักเสบของเหงือกเพิ่มขึ้น¹⁵ นอกจากนั้นยังมีการศึกษาระยะยาวในผู้ป่วยปริทันต์อักเสบโดยการวัด ปริมาณโพรستاแกลนดินอี 2 ในน้ำเหลืองร่องเหงือกและวัดค่าทางคลินิกเปรียบเทียบก่อนและหลังได้รับการ รักษาโรคปริทันต์ พบว่าปริมาณโพรستاแกลนดินอี 2 ในน้ำเหลืองร่องเหงือกของผู้ป่วยหลังได้รับการรักษา ลดลงร้อยละ 35¹⁶

อินเตอร์ลิวคิน-6 เป็นไซโตไคน์ที่ถูกสร้างจากเซลล์ของร่างกายหลายชนิดรวมไปถึงเซลล์สร้างเส้น ใยเหงือก¹⁷ ไซโตไคน์ชนิดนี้มีบทบาทสำคัญในการตอบสนองต่อการอักเสบจากการติดเชื้อ¹⁸ จากการศึกษา ระดับของอินเตอร์ลิวคิน-6 พบว่าจะสูงขึ้นในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเมื่อเทียบกับคนที่ไม่เป็นโรค¹⁹⁻²¹ และ สัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคเมื่อใช้การตรวจวัดทางคลินิกเป็นเกณฑ์ได้แก่ค่าความลึกของร่องลึกปริทันต์ ค่าดัชนีการบวมอักเสบ (plaque index; PI) ค่าดัชนีการมีเลือดออก (bleeding index; BI) โดยตรวจพบว่า อินเตอร์ลิวคิน-6 มีปริมาณมากขึ้นเมื่อค่าความลึกของร่องลึกปริทันต์และค่าดัชนีการมีเลือดออกเพิ่มขึ้น²⁰ การศึกษาในผู้ป่วยปริทันต์อักเสบบรรเทาโดยการวัดปริมาณอินเตอร์ลิวคิน-6 จากการเก็บตัวอย่างเลือดในผู้ป่วย และวัดค่าทางคลินิกเปรียบเทียบก่อนและหลังได้รับการรักษาโรคปริทันต์ พบว่าปริมาณอินเตอร์ลิวคิน-6 ของ ผู้ป่วยหลังได้รับการรักษาลดลง²² และนอกจากนี้ยังพบว่าอินเตอร์ลิวคิน-6 เป็นไซโตไคน์ที่สามารถชักนำให้

เกิดการสร้างเซลล์สลายกระดูกได้^{23, 24} ส่งผลต่อการสูญสลายและสูญเสียกระดูก²⁵ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า อินเตอร์ลิวคิน-6 สามารถทำให้เกิดการสูญสลายของกระดูกในโรคปริทันต์อักเสบได้

อินเตอร์ลิวคิน-8 จัดเป็นไซโตไคน์กลุ่มที่เรียกว่าคีโมไคน์ (chemokine) ซึ่งมีหน้าที่ในการเหนี่ยวนำ เม็ดเลือดขาว (polymorphonuclear neutrophils) โมโนไซต์ มาโครฟาจ ให้เข้ามาในบริเวณที่มีการติดเชื้อ จาก การศึกษาระดับของอินเตอร์ลิวคิน-8 ในน้ำเหลืองเหงือกของฟันที่เป็น โรคปริทันต์อักเสบพบว่า มีในปริมาณ สูงกว่าฟันที่มีเหงือกปกติ^{10, 26-27} การศึกษาในผู้ป่วยปริทันต์อักเสบโดยการวัดปริมาณอินเตอร์ลิวคิน-8 ใน น้ำเหลืองช่องเหงือก และจำนวนเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันเช่น ที ลิมโฟไซต์ (T lymphocyte) บี ลิมโฟไซต์ (B lymphocyte) โมโนไซต์ และมาโครฟาจ โดยการการตัดเนื้อเยื่อเหงือกออกตรวจ (gingival biopsy) เปรียบเทียบก่อนและหลังได้รับการรักษาโรคปริทันต์ ในสภาวะที่มีการอักเสบของอวัยวะปริทันต์มากจะมี ปริมาณอินเตอร์ลิวคิน-8 และจำนวนเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันมาก แต่เมื่อได้รับการรักษาโรคปริทันต์พบว่า ระดับของอินเตอร์ลิวคิน-8 และจำนวนเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันลดลง²⁷ ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีความสัมพันธ์ ระหว่างคีโมไคน์ กับสภาวะของอวัยวะปริทันต์ โดยคีโมไคน์มีผลต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์ในระบบ ภูมิคุ้มกันมายังบริเวณที่มีการอักเสบ²⁸ ดังนั้น อินเตอร์ลิวคิน-6 อินเตอร์ลิวคิน-8 โพรสตาแกลนดินอี 2 จึง เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพ (biomarker) ซึ่งสามารถบ่งชี้ถึงภาวะการอักเสบ และบอกสภาวะของอวัยวะปริทันต์ ได้

โรคปริทันต์อักเสบมีสาเหตุสำคัญมาจากเชื้อก่อโรคปริทันต์สัมพันธ์กับภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดย ปัจจัยการก่อโรคของเชื้อจะกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายเหนี่ยวนำให้มีการสร้างและหลั่งสารอักเสบ ออกมา ซึ่งสารเหล่านี้มีผลให้เกิดการอักเสบและการทำลายอวัยวะปริทันต์รวมถึงการละลายตัวของกระดูก เบ้าฟัน โดยพบว่าสารอักเสบและไซโตไคน์ในเนื้อเยื่อปริทันต์และน้ำเหลืองเหงือกในผู้ป่วยโรคปริทันต์ อักเสบมีปริมาณที่สูงขึ้นเมื่อเทียบกับคนที่ไม่เป็นโรคและมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคปริทันต์อักเสบ^{8-10, 12, 14, 17, 19-21} นอกจากนั้นยังพบความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคเมื่อใช้การตรวจวัดทางคลินิกเป็น เกณฑ์^{15, 20} มีรายงานการศึกษาในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบว่า หลังจากได้รับการรักษาโรคปริทันต์ระดับการ หลั่งของสารอักเสบและไซโตไคน์จะลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับก่อนรักษา^{16, 22, 27} และเมื่อใช้ยาแก้อักเสบใน กลุ่มที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (non-steroidal anti-inflammatory drug) ซึ่งสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ไซโคลออกซีจีเนส และลดการสังเคราะห์โพรสตาแกลนดิน พบว่าสามารถลดการสูญเสียกระดูกได้อย่างมี นัยสำคัญ²⁹ ซึ่งหากสามารถยับยั้งหรือลดปริมาณการหลั่งของสารอักเสบและไซโตไคน์เหล่านี้ได้น่าจะมีผล ต่อการลดการทำลายอวัยวะปริทันต์และความรุนแรงของโรคปริทันต์ได้

เนื่องจากเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกเป็นเซลล์ที่พบมากที่สุดในเนื้อเยื่อยึดต่อของอวัยวะปริทันต์³⁰ ใน สภาวะปกติเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก มีบทบาทในการผลิตโปรตีนโครงสร้างและทำหน้าที่เป็นตัวป้องกันทาง กายภาพ เมื่อถูกกระตุ้นด้วยเชื้อก่อโรคปริทันต์ ปัจจัยการก่อโรคของเชื้อจะกระตุ้นเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกัน ของร่างกายเหนี่ยวนำให้มีการสร้างไซโตไคน์ และสารอักเสบต่างๆหลายชนิด สารอักเสบเหล่านี้เอง จะมีผล

เหนียวและกระตุ้นให้เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกผลิตและหลั่งสารที่มีผลทำให้เกิดการทำลายอวัยวะปริทันต์ตามมา^{7, 31}

นอกจากนี้ยังพบว่าในสถานะที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อก่อโรคปริทันต์เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกจะหลั่งไซโตไคน์และสารอักเสบในระดับสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะปกติ^{7, 32} ดังนั้นเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกจึงส่งผลให้เกิดการทำลายอวัยวะปริทันต์ทั้งโดยตรงและโดยอ้อมจึงมีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดโรคปริทันต์อักเสบ ดังนั้นการควบคุมปฏิกิริยาตอบสนองต่อการอักเสบของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกจึงอาจเป็นอีกวิธีการหนึ่งในการควบคุมและป้องกันโรคปริทันต์อักเสบ ได้³³

ข้อนี้เป็นพืชสมุนไพรที่นำมาใช้ประโยชน์มานาน จากการศึกษาคุณสมบัติของข้อพบว่า มีฤทธิ์ในการต้านจุลชีพโดยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่ในคลองรากฟันและเชื้อก่อโรคปริทันต์³⁴⁻³⁵ และเมื่อทำการทดสอบในอาสาสมัครพบว่ามีความปลอดภัยทางคลินิก สามารถลดการอักเสบของเหงือกและลดเชื้อฟอร์โฟโรโมแนส จึงจิวาลิสซึ่งเป็นเชื้อสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคปริทันต์อักเสบได้³⁶ นอกจากนี้ยังสามารถลดการอักเสบของเหงือกเมื่อวัดจากค่าดัชนีการอักเสบของเหงือกในทางคลินิกได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ³⁷

จากรายงานการศึกษาดังกล่าวข้างต้น แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากใบข้อสามารถฆ่าเชื้อได้โดยไม่ทำลายสมดุลของเชื้อในระบบนิเวศน์ในช่องปาก นอกจากนี้ในการศึกษาระดับโมเลกุลยังพบว่าสารสกัดจากใบข้อมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก เมื่อดูจากระดับการแสดงออกของอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า และไซโคลออกซีจีเนส- 2 (Cyclooxygenase 2; COX-2)³⁸ ซึ่งในกระบวนการตอบสนองต่อการอักเสบ สารอักเสบและไซโตไคน์มีการทำงานแบบเป็นเครือข่ายเชื่อมโยงกัน จึงได้มาซึ่งสมมติฐานที่ว่าสารสกัดจากใบข้อน่าจะมีผลต่อการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-6 อินเตอร์ลิวคิน-8 และโปรสตาแกลนดินอี 2 ซึ่งเป็นสารที่มีบทบาทสำคัญในการตอบสนองต่อการอักเสบด้วย

แม้ว่าจะมีการศึกษาฤทธิ์ในการต้านการอักเสบจากการแสดงออกของอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า และไซโคลออกซีจีเนส-2 แต่ยังไม่มีการศึกษาถึงผลต่อการสร้างและหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-6 อินเตอร์ลิวคิน-8 โปรสตาแกลนดินอี 2 ซึ่งเป็นสารสำคัญที่มีผลต่อการทำลายอวัยวะปริทันต์ด้วยเช่นกัน การศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งหวังเพื่อจะศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบข้อต่อการสร้างและหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-6 อินเตอร์ลิวคิน-8 และโปรสตาแกลนดินอี 2 จากเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกที่ได้รับการกระตุ้นจากชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อฟอร์โฟโรโมแนส จินจิวาลิส โดยเลือกใช้เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกจากมนุษย์มาศึกษา ซึ่งผลจากการศึกษานี้จะสามารถทำให้ทราบถึงคุณสมบัติของสารสกัดจากสมุนไพรข้อมากขึ้นเพื่อเป็นแนวทางการประยุกต์ใช้สมุนไพรไทยในทางคลินิกร่วมกับการรักษาโรคปริทันต์อักเสบเพื่อลดการอักเสบและลดการกลับเป็นซ้ำของโรคต่อไป

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากใบข่อยต่อการสร้างอินเตอร์ลิวคิน-6 อินเตอร์ลิวคิน-8 และ โพรสตาแกลนดินอี 2 โดยเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นด้วยชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจีวาลิส (sonicated *P.gingivalis*)

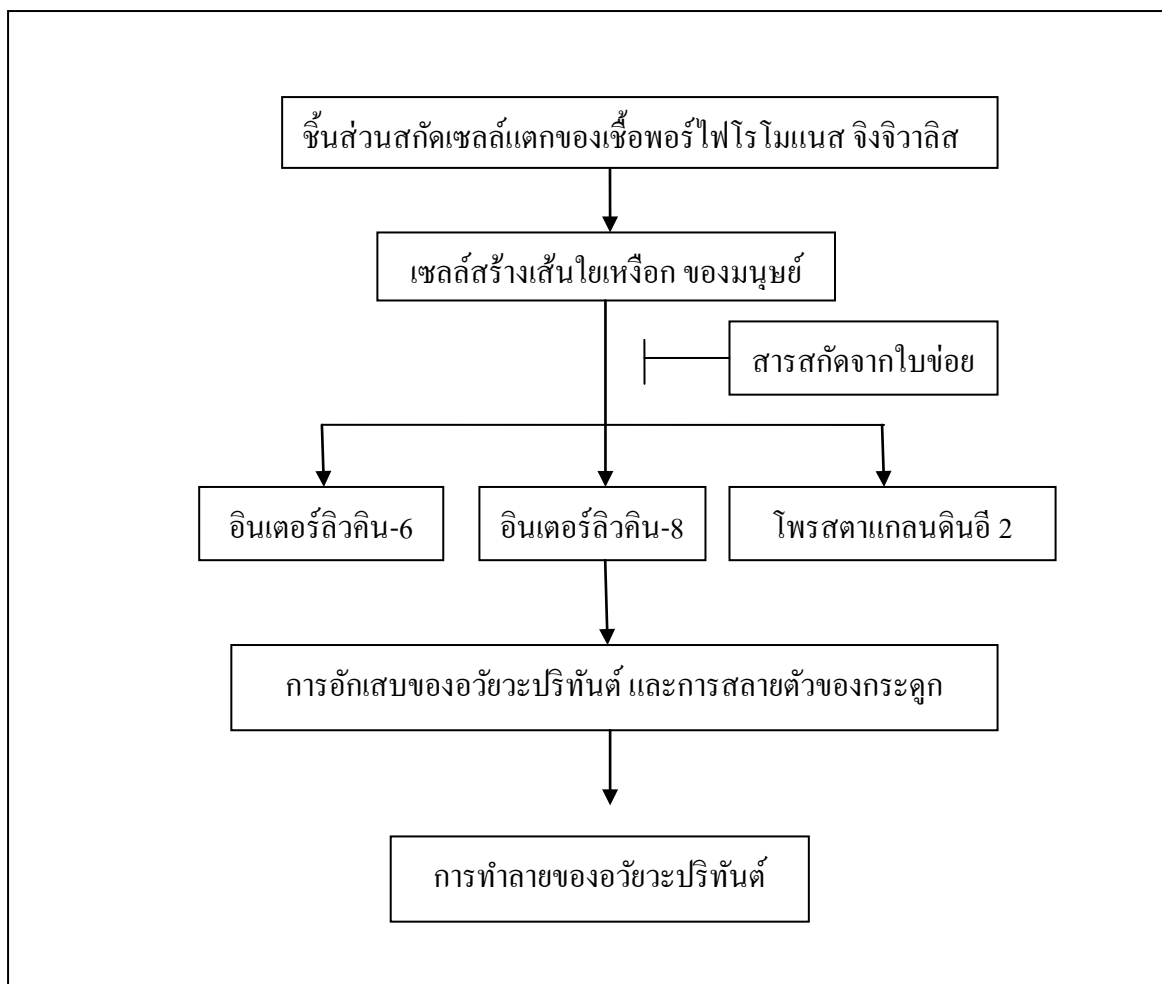
3. ขอบเขตการวิจัย

เป็นการศึกษาผลของสารสกัดจากใบข่อยต่อการสร้างสารอักเสบรวมทั้งไซโตไคน์ที่แสดงออกใน เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกของมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นด้วยชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจีวาลิส โดยการศึกษาในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

4. สมมติฐานงานวิจัย

สารสกัดจากใบข่อยมีผลการสร้างอินเตอร์ลิวคิน-6 อินเตอร์ลิวคิน-8 และ โพรสตาแกลนดิน อี 2 ใน เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นด้วยชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโร-โมแนส จิงจีวาลิส เมื่อเปรียบเทียบกับสถานะที่ไม่มีสารสกัดจากใบข่อย

5. กรอบแนวคิดการวิจัย



6. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบข่อยต่อการสร้างอินเตอร์ลิวคิน-6 อินเตอร์ลิวคิน-8 โพรสตา แกลนดินอี 2 ในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกที่ได้รับการกระตุ้นจากชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส

2. นำความรู้ที่ได้มาประยุกต์ใช้เป็นแนวทางการรักษาโรคปริทันต์อักเสบจากสารสกัดจากใบข่อย โดยมุ่งเน้นไปที่การยับยั้งการอักเสบและการละลายตัวของกระดูกรองรับรากฟันหากสามารถยับยั้งการผลิตและการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-6 อินเตอร์ลิวคิน-8 โพรสตาแกลนดินอี 2 ซึ่งจะทำให้ลดการอักเสบของอวัยวะปริทันต์และลดการละลายตัวของกระดูกได้

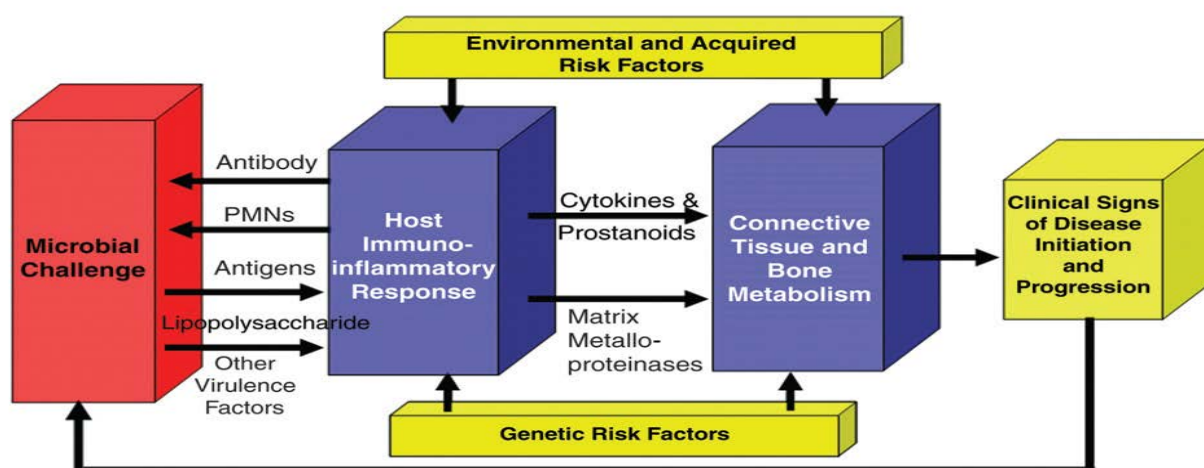
3. เผยแพร่องค์ความรู้ที่ได้รับจากโครงการวิจัยสู่สาธารณชน

บทที่ 2

วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. พยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์อักเสบ (pathogenesis of periodontitis) และเชื้อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง

โรคปริทันต์อักเสบเป็นโรคติดเชื้อที่ทำให้มีการอักเสบของเหงือกและมีการทำลายอวัยวะปริทันต์ในกรณีที่มีความรุนแรงของโรคมก จะทำให้มีการทำลายกระดูกรองรับรากฟันจนทำให้มีการสูญเสียฟันไปในที่สุด สาเหตุหลักของโรคปริทันต์อักเสบคือเชื้อก่อโรคในแผ่นคราบจุลินทรีย์ซึ่งชักนำให้เกิดการอักเสบและนำไปสู่การทำลายอวัยวะปริทันต์ ในช่องปากสามารถตรวจพบเชื้อมากกว่า 400 สายพันธุ์ แต่พบว่ามีบางสายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถก่อโรคปริทันต์ได้เมื่อมีจำนวนมากพอ ประกอบกับมีความผิดปกติในการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย³⁹



รูปที่ 1 แสดงแบบจำลองการเกิดโรคปริทันต์อักเสบ⁴⁰

เชื้อแบคทีเรียที่สัมพันธ์กับโรคปริทันต์มีหลายชนิด การศึกษาว่าเชื้อแบคทีเรียชนิดใดหรือกลุ่มใดที่เป็นสาเหตุแท้จริงของโรคปริทันต์ Socransky⁴¹ ได้กำหนดลักษณะของเชื้อก่อโรคปริทันต์ไว้ดังนี้คือ

1. เชื้อก่อโรคปริทันต์ต้องมีจำนวนมาก สัมพันธ์กับตำแหน่งที่เกิดโรคในแต่ละคนและไม่พบในบริเวณที่ไม่เป็นโรค
2. ในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบที่มีการติดเชื้อก่อโรคปริทันต์จะต้องตรวจพบว่ามีระดับแอนติบอดีในซีรัม น้ำลายและในน้ำเหลืองเหงือกสูงขึ้น และมีการตอบสนองภูมิคุ้มกันของร่างกายแบบเฉพาะเจาะจง (cellular or humoral immune response) ต่อเชื้อดังกล่าว
3. มีปัจจัยก่อโรคที่สามารถทำลายอวัยวะปริทันต์และสัมพันธ์กับลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของการเกิดโรค

4. สามารถกระตุ้นให้เกิดโรคปริทันต์อักเสบในสัตว์ทดลองที่ไม่เป็นโรคได้

5. เมื่อรักษาโรคปริทันต์อักเสบโดยการกำจัดเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวในตำแหน่งที่เกิดโรคพบว่าเมื่อจำนวนเชื้อลดลงทำให้ลักษณะอาการทางคลินิกของผู้ป่วยดีขึ้น

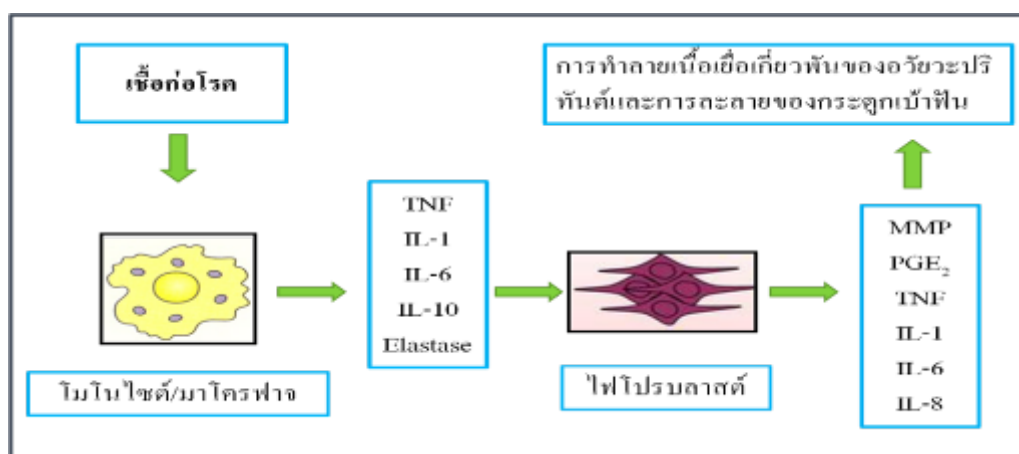
เชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสเป็นเชื้อชนิดแกรมลบที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต (gram-negative anaerobic bacteria)^{7, 42} อยู่ในกลุ่มแบคทีเรียที่ผลิตเม็ดสีดำ (black pigmented bacteroides) เป็นเชื้อที่มีการศึกษากันมากเนื่องจากมีหลักฐานว่าเป็นเชื้อจำเพาะต่อการเกิดโรคปริทันต์อักเสบได้ตามหลักเกณฑ์ดังกล่าว โดยตรวจพบในร่องลึกปริทันต์ของผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ โดยเฉพาะบริเวณที่กำลังมีการดำเนินของโรค⁴³ มีรายงานการศึกษาว่าเมื่อมีการตรวจระดับแอนติบอดีในซีรัมและในน้ำเหลืองเหงือกต่อเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบพบว่ามีค่ามากกว่าในคนไม่เป็นโรค⁴⁴ ในผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบจะมีระดับของอิมมูโนโกลบูลินจี (immunoglobulin G; IgG) ต่อเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส มากกว่าในกลุ่มควบคุม และเมื่อนำเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสใส่ในหนูทดลองพบว่าเชื้อสามารถกระตุ้นให้สัตว์ทดลองมีการละลายกระดูกเบ้าฟันและแสดงอาการของโรค ปริทันต์อักเสบได้⁴⁵

เชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส มีปัจจัยก่อโรคและส่งเสริมให้โรครุนแรงขึ้นหลายปัจจัย เช่นไลโปโพลีแซคคาไรด์ ฟิมเบรีย ฮีแมกกลูตินิน (hemagglutinin) เอ็นไซม์คอลลาจิเนส (collagenase enzyme) เอ็นไซม์โปรตีนเอส (proteinase enzyme) เอ็นไซม์ที่มีลักษณะคล้ายทริปซิน (trypsin like enzyme) แคปซูลาร์โพลีแซคคาไรด์ (capsular polysaccharide) ชีวพิษภายในตัว (endotoxin) โปรตีนแอนติเจน (protein antigen)⁶ ปัจจัยก่อโรคเหล่านี้จะมีผลกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายเมื่อเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันถูกกระตุ้นจะมีผลชักนำให้เกิดการหลั่งสารอักเสบ และไซโตไคน์ต่างๆเช่น โพรสตาแกลนดิน อินเตอร์ลิวคิน ทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์ จากเซลล์ของร่างกายที่อยู่บริเวณที่มีการอักเสบเช่น มาโครฟาจ โมโนไซต์ และไฟโบรบลาสต์ นอกจากนั้นยังพบว่าเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสมีผลต่อการทำลายคอลลาเจน โดยกระตุ้นเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกให้มีการสร้างเอนไซม์เมทริกซ์เมทาโลโปรตีนเอสซึ่งก่อให้เกิดการย่อยสลายของเนื้อเยื่อยึดต่อในอวัยวะปริทันต์และกระดูกเบ้าฟัน^{2, 46}

เชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส ที่ถูกทำให้แตกตัวจะมีองค์ประกอบที่สำคัญที่คล้ายคลึงกับสภาวะของเชื้อตามธรรมชาติ⁴⁷ กล่าวคือมีส่วนประกอบต่างๆของผิวเซลล์ (cell-surface components) เช่นไลโปโพลีแซคคาไรด์ โปรตีนของเยื่อชั้นนอก (outer-membrane protein) โพลีแซคคาไรด์ ฟิมเบรีย ซึ่งจากการศึกษาพบว่าเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส ที่ถูกทำให้แตกตัวมีความสามารถในการกระตุ้นการตอบสนองภูมิคุ้มกันของร่างกายได้ โดยจะกระตุ้นเซลล์ต่างๆเช่น เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกของมนุษย์ โมโนไซต์ และมาโครฟาจ ให้มีการผลิตและหลั่งสารอักเสบ เนื่องจากยังคงมีส่วนประกอบที่มีบทบาทสำคัญในการก่อโรคของเชื้ออยู่ ได้แก่ไลโปโพลีแซคคาไรด์ โปรตีนของเยื่อชั้นนอก และโพลีแซคคาไรด์^{38, 47-48}

2. เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกของมนุษย์

เซลล์สร้างเส้นใยเหงือก เป็นเซลล์ที่พบมากที่สุดในเนื้อเยื่อยึดต่อ (connective tissue) ของอวัยวะปริทันต์³⁰ มีบทบาทในการผลิตโปรตีนโครงสร้างเช่น คอลลาเจน อิลาสติน และโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเนื้อเยื่อยึดต่อในอวัยวะปริทันต์เช่น ไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ไกลโคสอะมิโนไกลแคน (glycosaminoglycan)^{30, 49} ในภาวะปกติ เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกจะทำหน้าที่ผลิตและรักษาภาวะสมดุลของเมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix) และเนื้อเยื่อโดยการย่อยสลายและสังเคราะห์เนื้อเยื่อยึดต่อ แม้ว่าโดยปกติเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกจะทำหน้าที่เป็นตัวป้องกันทางกายภาพ (physical barrier) แต่เมื่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกได้รับการกระตุ้นจากเชื้อก่อโรคปริทันต์ก็จะสามารถทำให้เกิดการอักเสบและการทำลายของกระดูกรองรับรากฟันได้เช่นกัน โดยเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกจะเหนี่ยวนำเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายทั้งเซลล์ที่อยู่ในบริเวณที่มีการอักเสบและเซลล์จากระบบภูมิคุ้มกันจากแหล่งอื่นๆเช่น โมโนไซต์ มาโครฟาจ ให้มายังบริเวณเนื้อเยื่อปริทันต์ที่มีการติดเชื้อทำให้มีการตอบสนองต่อเชื้อด้วยการหลั่งไซโตไคน์และสารอักเสบต่างๆ นอกจากนั้นเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกยังสามารถหลั่งไซโตไคน์และสารอักเสบต่างๆหลายชนิดได้ด้วยตัวเอง^{2, 31, 32}



รูปที่ 2 แสดงการตอบสนองของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกเมื่อได้รับการกระตุ้นจากเชื้อก่อโรคปริทันต์³¹

3. สารอักเสบและไซโตไคน์ที่สัมพันธ์กับโรคปริทันต์อักเสบและโรคทางระบบ

การศึกษาในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบจะพบว่ามีความเข้มข้นของไซโตไคน์และสารอักเสบต่างๆเช่น อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า ทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์ ไซโคลออกซีจีเนส-2 ในอวัยวะปริทันต์หรือน้ำเหลืองเหงือกบริเวณที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบพบว่ามีความเข้มข้น^{8-10, 12} นอกจากไซโตไคน์และสารอักเสบต่างๆดังที่กล่าวมาแล้วยังมีรายงานว่า เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกสามารถผลิตและหลั่งสารอินเตอร์ลิวคิน-6 อินเตอร์ลิวคิน-8 โพรสตาแกลนดินอี 2 เพิ่มขึ้นเมื่อถูกกระตุ้นจากเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวัลิส^{42, 50-51} ซึ่งสารเหล่านี้มีผลต่อการทำลายอวัยวะปริทันต์และกระดูกรองรับรากฟันเช่นเดียวกัน โดยอินเตอร์ลิวคิน-6

สามารถชักนำให้เกิดการสร้างเซลล์สลายกระดูกได้²³ และยังเสริมการออกฤทธิ์ร่วมกับอินเตอร์ลิวคิน-1 ในการกระตุ้นการทำงานของเซลล์สลายกระดูก²⁵

มีการศึกษาซึ่งแสดงให้เห็นว่าอินเตอร์ลิวคิน-6 มีบทบาทในการทำให้เกิดพยาธิสภาพ เกิดการอักเสบ สูญสลายของกระดูกสัมพันธ์กับโรคทางระบบหลายโรค พบว่าระดับอินเตอร์ลิวคิน-6 ในซีรัมเพิ่มสูงขึ้นในผู้ป่วยที่เป็นโรค เช่น โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (rhumatoid arthritis)⁵² โรคสะเก็ดเงิน (psoriasis)⁵³ โรคกระดูกของพาเก้ท (Paget's disease)⁵⁴ และในผู้ป่วยที่มีภาวะการปฏิเสธสิ่งปลูกถ่าย (organ transplant rejection)⁵⁵ โดยอินเตอร์ลิวคิน-6 จะชักนำให้เกิดการสร้างเซลล์สลายกระดูกและตอบสนองต่อการอักเสบเพิ่มมากขึ้น²³

จากการศึกษาบทบาทของอินเตอร์ลิวคิน-8 ต่อโรคทางระบบแสดงให้เห็นว่าอินเตอร์ลิวคิน-8 มีความสัมพันธ์กับโรคทางระบบเช่นเดียวกัน เช่นในกลุ่มอาการคุชชิง(cushing's syndrome) โดยทำให้เกิดการสร้างกระดูกลดลงและมีการสูญสลายของกระดูกเพิ่มมากขึ้น⁵⁶ และยังสัมพันธ์กับโรคทางระบบที่มีการอักเสบเช่น โรคหลอดเลือดแดงแข็ง (atherosclerosis)⁵⁷ กระดูกอักเสบ (osteomyelitis)⁵⁸ โรคทากายาสู (Takayasu's arteritis)⁵⁹ โดยตรวจพบว่าระดับอินเตอร์-ลิวคิน-8 ในซีรัมจะเพิ่มสูงขึ้นในผู้ป่วยโรคเหล่านี้

นอกจากไซโตไคน์ที่กล่าวมาแล้วยังมีรายงานการศึกษาที่พบว่าโปรสตาแกลนดินอี 2 มีความสัมพันธ์กับโรคต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ และในโรคที่มีการทำลายและสูญสลายของกระดูกเช่นเดียวกัน โดยมีการตรวจพบระดับโปรสตาแกลนดินอี 2 ในซีรัมหรือสารคัดหลั่งที่ตรวจเพิ่มสูงขึ้น เช่น ในโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์⁶⁰⁻⁶¹ ลูปัสอีริทีมาโตซัสทั่วร่าง (systemic lupus erythematosus;SLE)⁶² ต่อมลูกหมากอักเสบ (prostatitis)⁶³ โรคปลอกประสาทอักเสบ (multiple sclerosis)⁶⁴ โรคลำไส้อักเสบโครห์น (Crohn's disease)⁶⁵ เป็นต้น

ดังนั้นนอกจากอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า ทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์ ไซโคลออกซีจีเนส- 2 แล้วอินเตอร์ลิวคิน-6 อินเตอร์ลิวคิน-8 โปรสตาแกลนดินอี 2 จึงเป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพซึ่งสามารถบ่งชี้ถึงภาวะการอักเสบ และความสัมพันธ์ต่อการสลายของกระดูกได้

5. สมุนไพรข่อย

ข่อยเป็นพืชในตระกูลโมราชีอี (Moraceae) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่าสเตรบลัส แอสเปอร (Streblus asper Lour) ข่อยเป็นไม้ต้นขนาดกลาง เป็นไม้ผลัดใบสูงประมาณ 5-10 เมตร แตกกิ่งก้านเป็นพุ่มทึบ กิ่งก้านคดง เปลือกต้นบางขรุขระเล็กน้อยสีเทาอมเขียว มียางสีขาวข้น ใบเป็นใบเดี่ยวออกเรียงเวียนรูปรี กว้าง 2-4 เซนติเมตร ยาว 4-8 เซนติเมตร โคนใบสอบปลายใบแหลมขอบใบหยัก แผ่นใบสีเขียวสากมือเนื้อใบหนาค่อนข้างกรอบ ออกดอกเป็นช่อสั้นตามซอกใบ ดอกย่อยเล็กมาก ดอกแยกเพศ ดอกเพศผู้รวมกันเป็นช่อกลม ก้านดอกสั้น ดอกเพศเมียช่อหนึ่งมีดอกย่อย 2 ดอก ก้านดอกยาว ผลรูปทรงกลมผลมีเนื้อ ผนังผลชั้นในแข็งเมื่ออ่อนสีเขียว สุกเป็นสีเหลืองใส เมล็ดเดี่ยวแข็งกลม ข่อยพบได้ทั่ว ๆ ไปตามพื้นที่ราบ ป่าเบญจพรรณ ป่าเต็งรัง เจริญได้ดีในดินทุกชนิด ชอบแดดจัด มีถิ่นกำเนิดตั้งแต่อินเดีย ประเทศจีนได้ ตะวันออกของหมู่เกาะฟิลิปปินส์ มาเลเซีย พม่า ไทย⁶⁶

ข่อยเป็นพืชที่นำมาใช้ประโยชน์ในด้านสมุนไพร เช่น อินเดียใช้น้ำต้มจากเปลือกข่อยเป็นยาแก้ไข้ โรคบิด ท้องร่วง รักษาไข้หวัด และแก้พิษงู ยางจากต้นข่อยสามารถฆ่าเชื้อได้ รากใช้เป็นยาแก้บิดและใช้พอกบริเวณที่เกิดฝี ชาวอินโดจีนใช้กิ่งข่อยขบสีฟันทำให้ฟันทนทานและใช้ฆ่าแมลง น้ำต้มจากเปลือกใช้ทำความสะอาดแผลและรักษาโรคผิวหนัง ยางจากต้นข่อยใช้เป็นยาระงับประสาทและแก้ปวดบวม เมล็ดใช้แก้ท้องร่วง ริดสีดวง และเลือดกำเดา รากใช้แก้ลมบ้าหมู น้ำสกัดจากข่อยใช้เป็นยาฆ่าเชื้อและช่วยกระตุ้นการหดตัวของกล้ามเนื้อ นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติยับยั้งการเกิดมะเร็งอีกด้วย ในภาคเหนือของไทยใช้ใบข่อยอบไฟให้เหลืองกรอบ ชงน้ำต่างใบชา เพื่อใช้เป็นยาระบายท้องอ่อน ๆ ขับปัสสาวะ แก้ไตพิการและเป็นยาบำรุงหัวใจ เมล็ดรับประทานเป็นยาอายุวัฒนะ บำรุงธาตุ เจริญอาหาร แก้ท้องอืดท้องเฟ้อและขับลม เปลือกต้นข่อยแก้พิษในกระดูกและเส้นเอ็น โรคผิวหนังและริดสีดวงทวาร เนื้อต้นข่อยแก้ริดสีดวงจมูก รากต้นข่อยช่วยรักษาบาดแผลให้แห้ง นอกจากนี้ น้ำยางต้นข่อยผสมเกลือใส่ฟันหรือถูบริเวณที่ปวดฟันหรือเหงือกบวม จะแก้อาการเจ็บปวดนี้ได้⁶⁷⁻⁶⁸

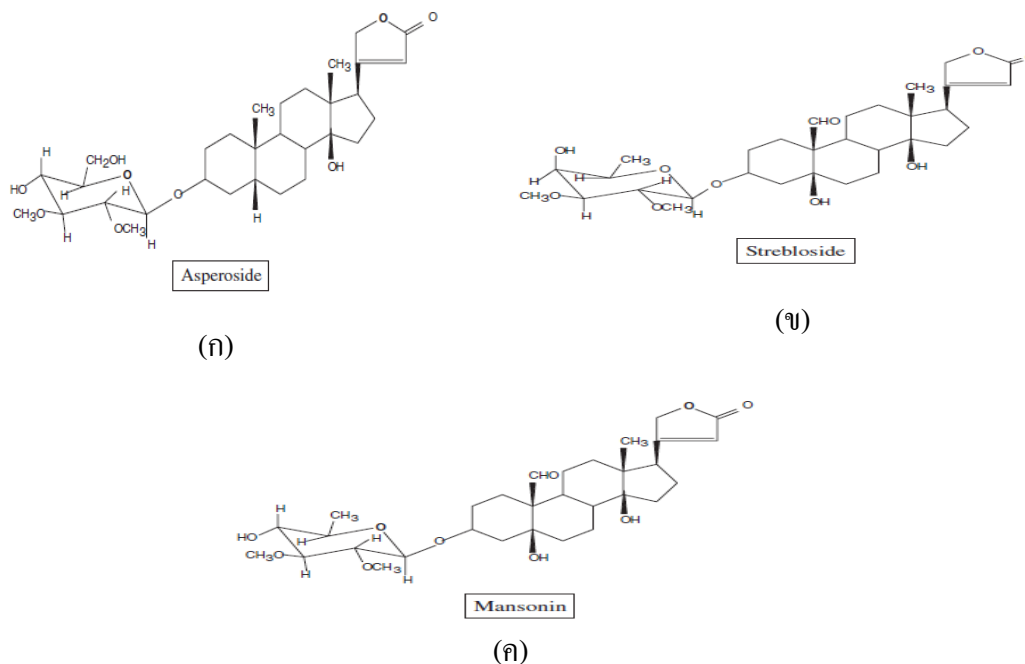


รูปที่ 3 แสดง (ก) ใบข่อย และ (ข) สารสกัดจากใบข่อย

สารเคมีสำคัญที่พบในข่อยจะแตกต่างกันไปตามวิธีสกัดในใบข่อยที่ทำการสกัดด้วยได-เอทิลอีเทอร์และโครมาโตกราฟี สารเคมีที่พบได้แก่⁶⁹

1. แอสเปอร์โรไซด์ (asperoside) สูตรโมเลกุล $C_{31}H_{48}O_9$ มีชื่อทางเคมีว่า 3-digitocigennin-2, 3-di-O-methy-D-glycopyranoside
2. สเตรปโบลไซด์ (strebloside) สูตรโมเลกุล $C_{31}H_{46}O_{10}$ มีชื่อทางเคมีว่า 3-strophanhidin-2, 3-di-O-methy-D-fucopyranoside
3. คาลาโลไซด์ สูตรโมเลกุล $C_{31}H_{48}O_{10}$
4. อินโดโรไซด์ สูตรโมเลกุล $C_{31}H_{48}O_{10}$
5. ลักคิโนไซด์ สูตรโมเลกุล $C_{31}H_{48}O_{10}$

นอกจากนี้ยังมีสารที่ยังวิเคราะห์ไม่ได้อีกหลายชนิด ซึ่งมีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{31}H_{48}O_{10}$, $C_{31}H_{46}O_{10}$



รูปที่ 4 แสดงโครงสร้างส่วนประกอบสำคัญในสารสกัดจากข่อย⁷⁰

ก. แอสเปอร์โรไซด์ ข. สเตรปโทโลไซด์ ค. แมนโซนิน

จากการศึกษาคุณสมบัติของข่อยในการยับยั้งเชื้อพบว่าสารสกัดจากใบข่อยซึ่งสกัดในเอทานอลร้อยละ 100 สามารถยับยั้งการเจริญและทำลายเชื้อในกลุ่มสเตรปโตคอคคัสพีชีส์ (*Streptococcus species*) ได้แก่ เชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ (*Streptococcus mutans*) และเชื้อสเตรปโตคอคคัส ซาลิวาเรียส (*Streptococcus salivarius*) ซึ่งเป็นเชื้อที่มีบทบาทสำคัญต่อการเกิดโรคฟันผุ⁷¹ สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อในคลองรากฟันทั้งชนิดที่ใช้และไม่ใช้ออกซิเจนในการดำรงชีวิต รวมถึงเชื้อก่อโรคปริทันต์อักเสบในช่องปากได้แก่ เชื้อฟอร์โฟโรโมแนส จิงจิวัลิส และแอคทริเกติแบคเตอร์ แอกทิโนมัยซิเทม โคมิแทนส์ โดยไม่มีฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์หรือเป็น พิษ³⁴⁻³⁵ เมื่อเปรียบเทียบกับข่อยกับพืชอื่นๆเช่นใบฝรั่ง ใบชาจีนที่มีรายงานการใช้เพื่อลดแบคทีเรียในช่องปากพบว่าข่อยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ อย่างมีนัยสำคัญและลดการเจริญของเชื้อนี้ได้มากกว่าพืชชนิดอื่น⁷² สามารถลดการยึดเกาะของเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ (*Candida albicans*) ต่อเซลล์เยื่อผิวกระพุ้งแก้มและฟันปลอมชนิดอะคริลิก (denture acrylic) ได้⁷³⁻⁷⁴

การศึกษาผลของสารสกัดจากใบข่อยในรูปน้ำยาบ้วนปากช่วยลดการอักเสบของโรคเหงือกอักเสบ แต่ไม่มีผลลดการเพิ่มของแผ่นคราบจุลินทรีย์⁷⁵ และเมื่อศึกษาผลของยาสีฟันผสมสารสกัดจากใบข่อยต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ในช่องปาก โดยใช้ยาสีฟันผสมสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และ 0.2 โดยน้ำหนัก แปรงฟันวันละ 2 ครั้ง พบว่าสามารถลดจำนวนเชื้อได้อย่างมีนัยสำคัญในสัปดาห์ที่ 1 และ 3⁷⁶ และเมื่อนำสารสกัดจากใบข่อยรูปเจลมาทดสอบความปลอดภัยทางคลินิก

โดยทำการทดสอบการเกิดปฏิกิริยาของเจลผสมสารสกัดจากใบข่อยกับผิวหนัง (skin irritation test) พบว่าค่าความแดงของผิวหนังบริเวณที่ทดสอบเปรียบเทียบกับผิวหนังปกติพบความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติและไม่พบความผิดปกติหรืออาการไม่พึงประสงค์ใดๆ เกิดขึ้นกับอาสาสมัคร เมื่อทดสอบโดยการใส่เจลผสมสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้นร้อยละ 24 ลงในร่องเหงือกของอาสาสมัครที่ไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบและมีสุขภาพแข็งแรงภายในช่วงเวลา 6 สัปดาห์ไม่พบอาการข้างเคียงหรืออาการไม่พึงประสงค์ใดๆ ในผู้ป่วย⁶⁹ เมื่อใช้เจลผสมสารสกัดจากใบข่อยใส่ในร่องลึกปริทันต์ของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังร่วมกับการขูดหินน้ำลายแลเกลารากฟัน พบว่ามีความปลอดภัยไม่มีอาการข้างเคียงใดๆ และสามารถลดเชื้อพอร์ไฟโรโมนเนส จึงจิวาลิสได้อย่างมีนัยสำคัญที่สัปดาห์ที่ 6 และ 12⁶⁶

ด้านความสามารถในการลดการอักเสบของเหงือกทางคลินิก ผลการศึกษาเมื่อใช้สารสกัดจากใบข่อยในรูปแบบการฉีดล้างในร่องลึกปริทันต์ร่วมกับการขูดหินปูนเกลารากฟันในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังในระยะคงสภาพ มีค่าดัชนีเหงือกอักเสบลดลงอย่างมีนัยสำคัญ³⁷ และการศึกษาในระดับโมเลกุลพบว่าสารสกัดจากใบข่อยมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกเมื่อดูจากระดับการแสดงออกของอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า และไซโตไคน์ออกซิจีเนส-2 พบว่ามีระดับการแสดงออกลดลงอย่างมีนัยสำคัญเช่นเดียวกัน³⁸ ในกระบวนการอักเสบนั้น มักมีการผลิตและหลั่งสารอักเสบรวมทั้งไซโตไคน์หลายชนิด เช่น อินเตอร์ลิวคิน ทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์ และโปรสตาแกลนดิน แม้ว่าจะมีการศึกษาถึงฤทธิ์ในการต้านการอักเสบของสารสกัดจากใบข่อยต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก โดยศึกษาการแสดงออกของอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า และไซโตไคน์ออกซิจีเนส-2 แล้ว อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาผลของสารสกัดจากใบข่อยต่อการสร้าง อินเตอร์ลิวคิน-6 อินเตอร์ลิวคิน-8 โปรสตาแกลนดินอี 2 ซึ่งสารเหล่านี้มีผลต่อการอักเสบของอวัยวะปริทันต์ รวมทั้งส่งผลต่อการละลายตัวของกระดูกด้วยเช่นกัน เนื่องจากมีรายงานการศึกษาว่าเมื่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกได้รับการกระตุ้นจากเชื้อก่อโรคปริทันต์ จะสามารถผลิตและหลั่งสารอินเตอร์ลิวคิน-6 อินเตอร์ลิวคิน-8 โปรสตาแกลนดินอี 2 เพิ่มขึ้น⁸⁻¹⁰ ดังนั้นเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบข่อยต่อการต้านการทำลายเนื้อเยื่อและกระดูก การศึกษาผลของสารสกัดจากใบข่อยต่อการสร้างอินเตอร์ลิวคิน-6 อินเตอร์ลิวคิน-8 โปรสตาแกลนดินอี 2 ในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกของมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อพอร์ไฟโรโมนเนส จึงจิวาลิส จึงน่าจะสามารถอธิบายกลไกการออกฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากใบข่อยในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกได้ และข้อมูลที่ได้จากการวิจัยนี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะนำไปสู่การพัฒนาผลิตภัณฑ์ทางทันตกรรมจากสารสกัดจากใบข่อยต่อไป

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 การออกแบบการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยเชิงทดลอง (experimental research) เป็นการศึกษาในห้องปฏิบัติการ โดยแบ่งการศึกษาออกเป็นขั้นตอนต่างๆดังนี้คือ

ขั้นตอนที่ 1 การทดสอบความเป็นพิษของชิ้นส่วนสีกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกของมนุษย์

ขั้นตอนที่ 2 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากไบออกซีต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกของมนุษย์

ขั้นตอนที่ 3 ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากไบออกซีร่วมกับชิ้นส่วนสีกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส

ขั้นตอนที่ 4 ศึกษาผลของสารสกัดจากไบออกซีต่อปริมาณการสร้างอินเตอร์ลิวคิน-6 อินเตอร์ลิวคิน-8 โพรสตา แกลนดินอี 2 ในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกที่ได้รับการกระตุ้นจากชิ้นส่วนสีกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสด้วยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

3.2 กลุ่มตัวอย่าง

เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกของมนุษย์ที่ใช้ในการศึกษานำมาจากอาสาสมัครคนไทยจำนวน 5 คนที่มารับบริการการรักษาที่คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.2.1 ข้อกำหนดในการคัดเลือกอาสาสมัคร (inclusion criteria)

3.2.1.1 อาสาสมัครมีสุขภาพแข็งแรง ปฏิเสธโรคทางระบบ

3.2.1.2 มีแผนการรักษาที่จะได้รับการผ่าตัดศัลยกรรมปริทันต์เพื่อเพิ่มความยาวของตัวฟัน (crown lengthening procedure)

3.2.1.3 บริเวณที่จะเก็บชิ้นเนื้อจะต้องมีสภาวะอวัยวะปริทันต์ที่ปกติ และไม่มีร่องลึกปริทันต์มากกว่า 4 มิลลิเมตร (normal periodontal support and no pocket depth >4 mm.)

3.2.1.4 เข้าร่วมโครงการด้วยความสมัครใจ

3.2.2 ข้อกำหนดในการคัดออกของอาสาสมัคร (exclusion criteria)

3.2.2.1 ได้รับยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ทั่วร่างกาย ยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่กลุ่มส-เตียรอยด์ (NSAIDS) ยาต้านมะเร็งในช่วง 3 เดือนที่ผ่านมา

3.2.2.2 อยู่ในระหว่างตั้งครรภ์ ระยะเวลาให้นมบุตร หรือรับประทานยาคุมกำเนิด

3.2.2.3 ผู้ที่สูบบุหรี่

3.3 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการวิจัย

เชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส สายพันธุ์ ดับเบิลยู 50 (W50 strain)

3.4 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.4.1 สารเคมี

3.4.1.1 อาหารเลี้ยงเซลล์ D-MEM (Dulbecco's modified Eagle Medium, GIBCO[®])

3.4.1.2 ซีรัมจากตัวอ่อนของวัว (10% fetal bovine serum, GIBCO[®])

3.4.1.3 สารละลายยาปฏิชีวนะ (เพนนิซิลิน 100 ยูนิตต่อมิลลิเมตร และสเตรปโตมัยซิน 100 ไมโครกรัม/มิลลิเมตร และแอมพิเทอริซินบี 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร, GIBCO[®])

3.4.1.4 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลาไลน์ (Phosphate buffer saline; PBS)

3.4.1.5 เอนไซม์ย่อยโปรตีนทริปซินและเอสด้า (Trypsin with ethylene diamine tetraacetic acid; trypsin/EDTA)

3.4.1.6 อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งผสมเลือด (Blood agar base, Becton, Dickinson and Company, Le Pont de Claix, France)

3.4.1.7 อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดทริพิเคส ซอย บรอก (Trypticase soy broth)

3.4.1.8 ฮีมิน (Hemin), วิตามิน เค (Vitamin K), โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (NaHCO_3)

3.4.1.9 สารสกัดจากใบชอย

3.4.1.10 เมทิลไทอาโซลเตตราโซเลียมโบรไมด์ (Methyl thiazol tetrazolium bromide; MTT)

3.4.1.11 ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethylsulfoxide; DMSO)

3.4.1.12 สีย้อมเซลล์ ทริปแทนบลู (Trypan blue)

3.4.1.13 ชุดตรวจอีไลซ่าสำหรับตรวจอินเตอร์ลิวคิน-6 (IL-6 Human ELISA kit, sandwich technique, Invitrogen., USA.) อินเตอร์ลิวคิน-8 (IL-8 Human ELISA kit, sandwich technique, R&D Systems Inc., USA.) และโพรสตาแกลนดิน อี 2 ของมนุษย์ (PGE_2 Human ELISA kit, competitive technique, Invitrogen., USA.)

3.4.2 วัสดุอุปกรณ์

3.4.2.1 ชุดตรวจฟัน ประกอบด้วย กระจกส่องปาก (mouth mirror) ที่จับสำคัญ (forcep) เครื่องมือตรวจฟัน (explorer) EXD11-12 (Hu-friedy, Chicago, Illinois, USA) เครื่องมือตรวจปริทันต์หรือโพรบชนิด PCPUNC 15 (Hu-friedy, Chicago, Illinois, USA.)

3.4.2.2 หลอดทดลอง (Test tube) ขนาด 15, 50 มิลลิเมตร

- 3.4.2.3 แอปเพนดอร์ฟ (eppendorf) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- 3.4.2.4 ถาดหลุม (well plate) ขนาด 6,24,96 หลุม
- 3.4.2.5 ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ (Tissue culture flask) ขนาด 25,75 ตารางเซนติเมตร
- 3.4.2.6 ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด 1,000, 100, 1-10 ไมโครลิตรและไมโครทิป (microtip)
- 3.4.2.7 หลอดเซนติฟิวจ์ (centrifuge tube)
- 3.4.2.8 จานเพาะเชื้อ (petridishes)
- 3.4.2.9 ตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂ incubator, Sheldon Manufactory Inc., Oregon, Australia)
- 3.4.2.10 เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (MPW.Med.Instrument, Warsaw, Poland)
- 3.4.2.11 กล้องจุลทรรศน์ (Light microscope, Nikon, NY, USA)
- 3.4.2.12 เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotar evaporator, Tokyo.Rikakikai Co., Ltd, Tokyo, Japan)
- 3.4.2.13 เครื่องอบแห้งด้วยความเย็น (Lyophiliser, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Germany)
- 3.4.2.14 กล้องจุลทรรศน์แบบอินเวอร์เทด (Inverted Microscope, Carl Zeiss Microscopy, Oberkochen, Germany)
- 3.4.2.15 ถังทำความเย็นด้วยไนโตรเจนเหลว (Liquid Nitrogen Freezer)
- 3.4.2.16 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave, Sturdy industrial Co., Ltd, Taipei, Taiwan)
- 3.4.2.17 ฮีโมไซโตมิเตอร์ (Hemocytometer)
- 3.4.2.18 เครื่องชั่งสารไฟฟ้า (Balance, Ohaus Corporation, NY, USA)
- 3.4.2.19 เครื่องเขย่า (Vortex, Daigger & company, Illinois, USA)
- 3.4.2.20 เครื่องเขย่าสาร (Shaker, Daigger & company, Illinois, USA)
- 3.4.2.21 เครื่องยูวีสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV spectrophotometer, Beckman Coulter, Inc., California, USA) 352. Labsystem, Finland)
- 3.4.2.22 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer, Thermo fisher Scientific Oy Microplate Instrumentation, Vantaa, Finland)
- 3.4.2.23 เครื่องทำให้แตกสลายด้วยคลื่นความถี่สูง (ultrasonic disintegrator, MSE Ltd., London, UK)
- 3.4.2.24 ตู้กรองอากาศบริสุทธิ์แบบ Biohazard Class II (Lamina flow hood, AES Environmental Pty.Ltd, Australia)

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 ขั้นตอนการเตรียมการ

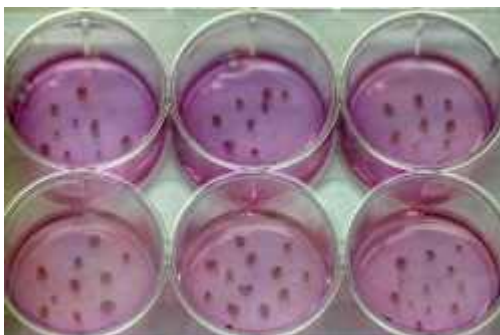
3.5.1.1 การเก็บข้อมูลในอาสาสมัคร และการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อเหงือก

อธิบายขั้นตอนและวิธีการดำเนินการวิจัยแก่อาสาสมัคร ให้อาสาสมัครลงชื่อในแบบยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย อาสาสมัครจะได้รับการตรวจสถานะปริทันต์ตามแบบฟอร์มของคณะ ทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ทำการซักประวัติเกี่ยวกับโรคทางระบบ ประวัติการใช้ยาปฏิชีวนะ ทั้งแบบออกฤทธิ์เฉพาะที่และชนิดที่ออกฤทธิ์ทั่วร่างกาย ทำการตรวจช่องปากและบันทึกข้อมูลสถานะอวัยวะปริทันต์ และดัชนีการมีเลือดออก จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อปริทันต์ระหว่างที่มีการผ่าตัดเหงือกเพื่อเพิ่มความยาวตัวฟัน หรือมีการถอนฟัน ภายใต้ยาชาเฉพาะที่ซึ่งตัวอย่างชิ้นเนื้อจะมีขนาดประมาณ 10x2x2 มิลลิเมตรนำไปใส่ในแอฟเพนดอร์ฟที่บรรจุอาหารเลี้ยงเซลล์ D-MEM เพื่อนำไปแยกเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก

3.5.1.2 การเลี้ยงเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก

เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกจะถูกแยกจากชิ้นเนื้อเยื่อเหงือกตัวอย่างตามวิธีการที่เคยมีการศึกษา^{77,78} โดยทำการตัดชิ้นเนื้อเยื่อปริทันต์ตัวอย่างเป็นชิ้นเล็กๆ ด้วยใบมีดผ่าตัดในถาดหลุม 6 หลุม และเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ D-MEM 1 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วยกลูโคส 4.5 กรัมต่อลิตรและโซเดียมไบคาร์บอเนต 3.7 กรัมต่อลิตร ที่เติมซีรัมจากตัวอ่อนของวัวร้อยละ 10 เพนนิซิลิน 100 หน่วยต่อมิลลิเมตร สเตอพโตมัยซิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรและแอมโฟเทอริซินบี 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรในตู้บคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนใกล้เต็มถาดหลุม จากนั้นแยกเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกออกมาจากชิ้นเนื้อมาเพาะเลี้ยง (Subculture) ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ ขนาด 25 และ 75 ตารางเซนติเมตรโดยเลือกใช้เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกที่เลี้ยงในครั้งที่ 3-7 (passage 3th-7th) และตรวจสอบลักษณะรูปร่างของเซลล์ (cell morphology) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

(ก)



(ข)



รูปที่ 5 (ก) แสดงการแยกเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกจากชิ้นเนื้อเยื่อเหงือกในถาดหลุม 6 หลุมและ

(ข) เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกเจริญแยกออกมาจากชิ้นเนื้อเยื่อเหงือก

3.5.2 การเตรียมสารสกัดจากใบข่อย

เตรียมสารสกัดจากใบข่อยตามวิธีที่รายงานโดย สุวิมล ทวีชัยสุกพงษ์ และคณะ⁷⁹ โดยมีวิธีเตรียมดังนี้

1. ล้างใบข่อยที่เก็บใหม่ให้สะอาด และตากให้แห้งในที่ร่มที่อุณหภูมิห้อง
2. นำใบข่อยที่แห้งสนิทแล้วมาบดให้ละเอียดแล้วนำไปแช่ในเอทานอลร้อยละ 50 ในอัตราส่วนข่อย 1 กิโลกรัมต่อสารละลายเอทานอล 5 ลิตร เป็นเวลา 10 วัน กวนเป็นระยะ
3. กรองด้วยผ้าขาวบาง 4-6 ชั้นเพื่อแยกส่วนที่ไม่ละลายและส่วนกากออก
4. นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาทีเพื่อกำจัดตะกอน
5. กำจัดเอทานอลในส่วนที่เป็นสารละลายโดยการระเหยในเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุนที่อุณหภูมิ 55-62 องศาเซลเซียส
6. ระเหิดให้แห้งด้วยเครื่องอบแห้งด้วยความเย็น และทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

เตรียมสารละลายจากสารสกัดใบข่อยโดยการละลายสารสกัดข่อยในน้ำกลั่นนำสารละลายที่ได้ผ่านเครื่องความถี่สูงเป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้การละลายสมบูรณ์ขึ้น จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,400 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำสารละลายที่ได้กรองแบบหยาบด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วผ่านเครื่องกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร เพื่อให้ปลอดเชื้อ เก็บสารละลายนี้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.5.3 การเตรียมส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อฟอร์โฟโรโมแนส จิงจิवालิส

เลี้ยงเชื้อฟอร์โฟโรโมแนส จิงจิवालิส สายพันธุ์ ดับเบิลยู 50 บน anaerobic basal agar ที่เติมเลือดร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้ไรรีออกซิเจนเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นตรวจดูลักษณะเชื้อและย้อมสีแกรม (gram stain) เพื่อยืนยันชนิดของเชื้อ ทำการเตรียมชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกตามขั้นตอนดังนี้

1. นำเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อย้ายไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดทริพิตเคส ซอย บรอก ที่เติมฮีมิน, วิตามิน เค และ โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตแล้ว ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้ไรรีออกซิเจนเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำเชื้อร้อยละ 2 ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว หลอดใหม่เลี้ยงในภาวะที่ไม่มีออกซิเจนต่ออีก 3 วันจนอาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น
2. ทำการเก็บเชื้อโดยการปั่นล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาโลน ที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานครั้งละ 15 นาที
3. ดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาโลน ให้วัดค่าการดูดกลืนแสง (OD)

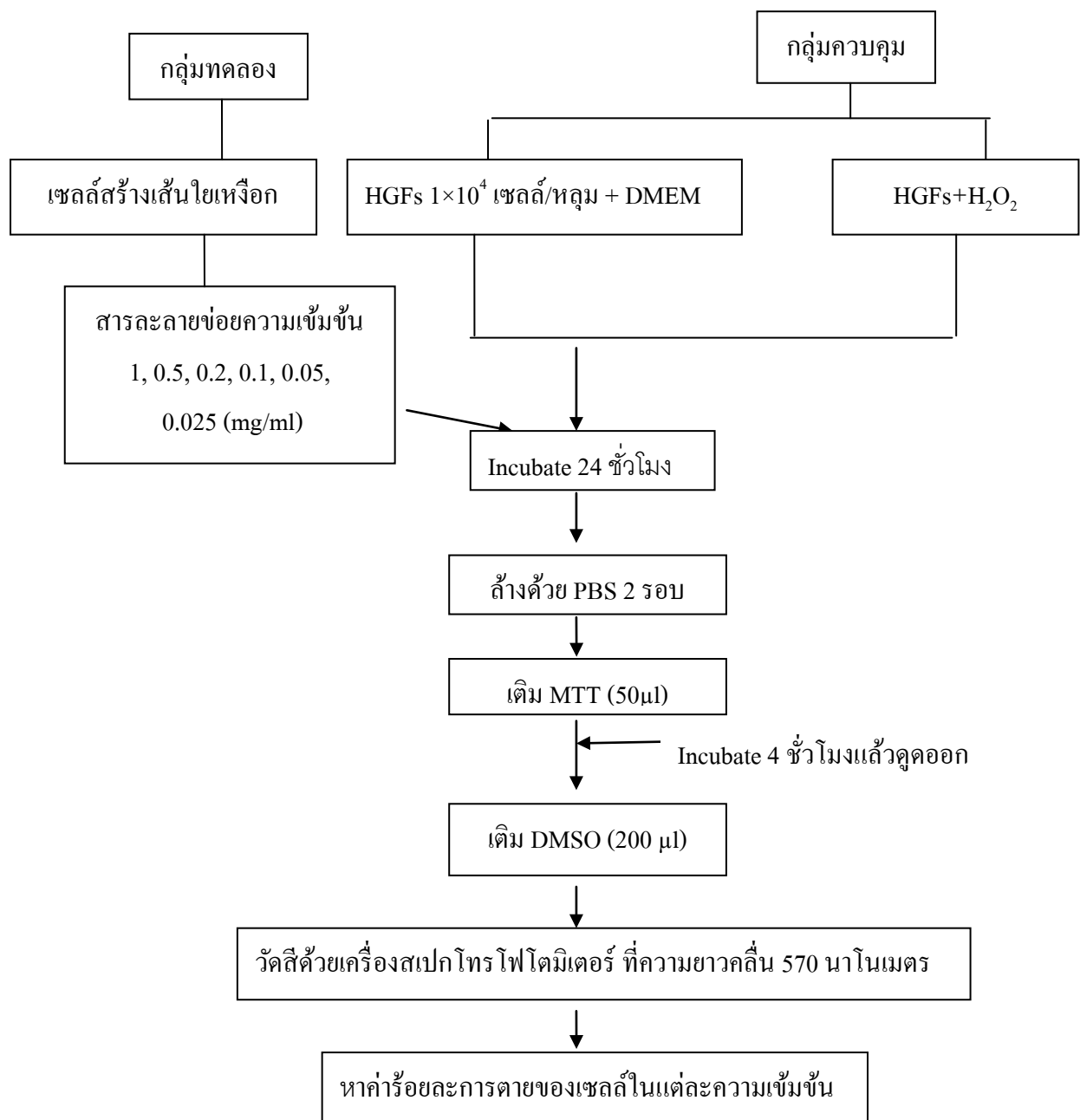
ใกล้เคียง 1

4. ย้อมแกรมและตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อคุณลักษณะเชื้อ แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 10 มิลลิลิตร
5. นำไปทำให้เซลล์แตกโดยใช้เครื่องทำให้แตกสลายด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง เป็นเวลา 15 นาที (ปั่น 2 นาที พัก 1 นาที) โดย แช่เซลล์ไว้ในน้ำแข็งตลอดเวลา
6. ตรวจสอบการแตกตัวของเซลล์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ โดยเซลล์ที่จะนำไปใช้ต้องมีปริมาณการแตกตัวของเซลล์ประมาณร้อยละ 80
7. นำเซลล์ที่แตกตัวไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที
8. นำส่วนน้ำใส มากรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.45 ไมโครเมตร และทำการหาความเข้มข้นของโปรตีนตามวิธีของ Lowry⁸⁰
9. เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ทดสอบ

3.5.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธีเอ็มทีที

3.5.4.1 ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากใบข่อย

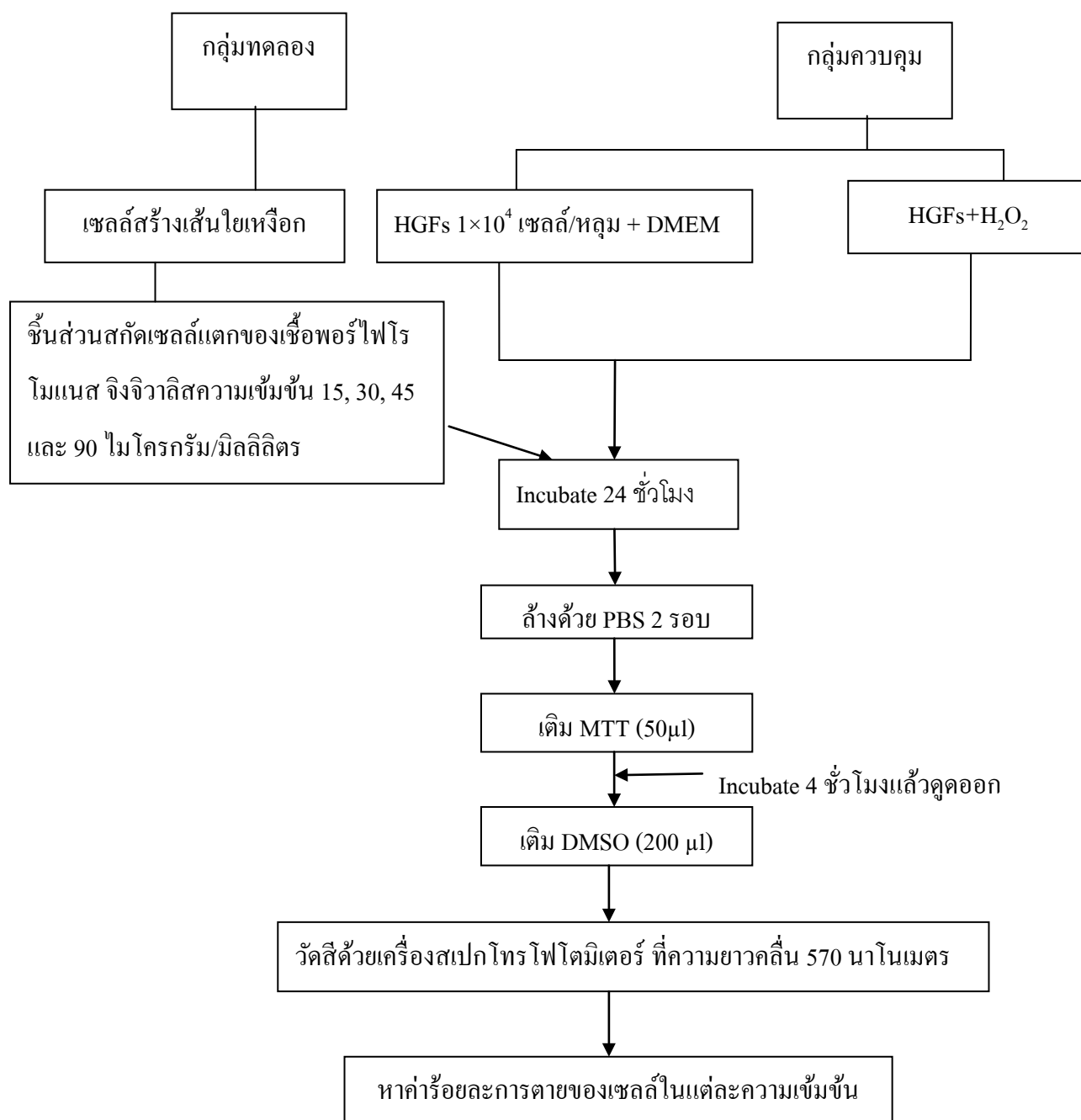
ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากใบข่อยต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกโดยวิธี MTT assay⁸¹ ซึ่งเป็นการวัดการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการหายใจระดับเซลล์ในไมโทคอนเดรีย (mitochondrial dehydrogenase) โดยการเลี้ยงเซลล์ที่มีความหนาแน่น 1×10^4 เซลล์ต่อหลุม ในภาชนะ 96 หลุม และเพาะบ่มในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แบ่งกลุ่มการทดลองเป็นกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง โดยกลุ่มควบคุมบวก (positive control) เป็นกลุ่มเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกที่ไม่ได้รับการกระตุ้นใดๆ และกลุ่มควบคุมลบ (negative control) เป็นกลุ่มเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกที่สัมผัสกับสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide; H_2O_2) ส่วนกลุ่มทดลองจะทำการกระตุ้นเซลล์ด้วยสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้น 0.025 - 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายหลังการกระตุ้นเซลล์ ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ D-MEM 150 ไมโครลิตรและเติมเมทิลไทอาโซลเตตราโซเลียมโบรไมด์ 50 ไมโครลิตร ทำการเพาะบ่มต่อไปอีกเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารเลี้ยงเซลล์ออกและเติมโดเมทิลซัลฟอกไซด์ 200 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลุมของจานเลี้ยงเซลล์เพื่อละลายสีของผลิตภัณฑ์ฟอมาซาน ทำการวัดสีของฟอมาซานที่เกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการหายใจระดับเซลล์โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ไมโครเพลท รีดเดอร์ ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร และเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตายโดยคำนวณเป็นค่าร้อยละ (รูปที่ 10) และแผนผังแสดงรายละเอียดการตรวจดังแสดงในภาคผนวก ก



รูปที่ 6 แสดงแผนผังการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากใบข่อยต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกของมนุษย์

3.5.4.2 ทดสอบความเป็นพิษของชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อฟอร์ไฟโรโมเนส จิงจิวาลิส

ทำการทดสอบโดยแบ่งกลุ่มการทดลองเป็นกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง กลุ่มควบคุมบวกเป็นกลุ่มเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกที่ไม่ได้รับการกระตุ้นใดๆ และกลุ่มควบคุมลบ เป็นกลุ่มเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกที่สัมผัสกับสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ส่วนกลุ่มทดลองจะทำการกระตุ้นเซลล์เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกของมนุษย์ด้วยชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อฟอร์ไฟโรโมเนส จิงจิวาลิส ความเข้มข้น 15, 30, 45 และ 90 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีวิธีทดสอบเช่นเดียวกันกับทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากใบข่อยต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกดังที่กล่าวมาข้างต้น (รูปที่ 11) และแผนผังแสดงรายละเอียดการตรวจดังแสดงในภาคผนวก ข



รูปที่ 7 แสดงแผนผังการทดสอบความเป็นพิษของขึ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อฟอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิสต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกของมนุษย์

3.5.4.3 ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากใบช่อร่วมกับขึ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อฟอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิส

จากผลการทดสอบในข้อ 3.5.4.2 ขึ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อฟอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิส ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรทำให้เซลล์ตายน้อยกว่าร้อยละ 20 และไม่ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงสภาพ

ของเซลล์ จึงเลือกความเข้มข้นดังกล่าวมาทดสอบในขั้นตอนต่อไปร่วมกับสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้น 0.025-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรโดยมีวิธีทดสอบเช่นเดียวกันกับทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากใบข่อยต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกดังที่กล่าวมาข้างต้นจากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่าร้อยละการตายของเซลล์ในแต่ละความเข้มข้นเพื่อคัดเลือกความเข้มข้นของสารสกัดจากใบข่อย และชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อฟอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิสที่จะนำมาศึกษาต่อโดยมีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ไม่เกินร้อยละ 20 แผนผังแสดงรายละเอียดการตรวจดังแสดงในภาคผนวก ก

3.5.5 การกระตุ้นเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกด้วยชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อฟอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส และสารสกัดจากใบข่อยเพื่อตรวจวัดปริมาณอินเทอร์ลิวคิน -6 อินเทอร์ลิวคิน - 8 และโปรสตาแกลนดินอี 2

จากผลการทดสอบในข้อ 3.5.4.3 พบว่าชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อฟอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรร่วมกับสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้น 0.025, 0.05 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรทำให้เซลล์ตายน้อยกว่าร้อยละ 20 จึงได้เลือกความเข้มข้นดังกล่าวมาทำการทดสอบต่อโดยกระตุ้นเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกด้วยชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของฟอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส และสารสกัดจากใบข่อย โดยแบ่งเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกออกเป็น 8 กลุ่มทดลองในถาดหลุม 24 หลุม ที่มีความหนาแน่น 7×10^4 เซลล์ต่อหลุม (แผนผังแสดงรายละเอียดการตรวจดังแสดงในภาคผนวก ง) โดยแบ่งกลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มเซลล์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้น

กลุ่มที่ 2 กลุ่มเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อฟอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

กลุ่มที่ 3 กลุ่มเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยข่อยความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

กลุ่มที่ 4 กลุ่มเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อฟอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรร่วมกับข่อยความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

กลุ่มที่ 5 กลุ่มเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยข่อยความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

กลุ่มที่ 6 กลุ่มเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อฟอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรร่วมกับข่อยความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

กลุ่มที่ 7 กลุ่มเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยข้อความเข้มข้น 0.025 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร

กลุ่มที่ 8 กลุ่มเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อฟอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวา
ลิส 30 ไมโครกรัม/มิลลิตรร่วมกับข้อความเข้มข้น 0.025 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร

จากนั้นบ่มเพาะเซลล์ในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
เมื่อครบกำหนดเก็บส่วนน้ำที่ได้จากการกระตุ้นเซลล์แต่ละกลุ่มในแอฟเฟนดอร์ฟและเก็บไว้ที่ -20 องศา
เซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ทดสอบขั้นตอนต่อไป

3.5.5.1 การตรวจวัดปริมาณอินเตอร์ลิวคิน-6 อินเตอร์ลิวคิน-8 และโปรสตาแกลนดิน อี 2

3.5.5.1.1 การตรวจวัดปริมาณอินเตอร์ลิวคิน-6 อินเตอร์ลิวคิน-8

1. ใช้ชุดตรวจอีไลซ่าสำหรับ อินเตอร์ลิวคิน-6 อินเตอร์ลิวคิน-8 ของมนุษย์
2. เติมน้ำ assay diluent ในหลุมทดสอบหลุมละ 100 ไมโครลิตร
3. ใส่สารที่ต้องการทดสอบลงในหลุมทดสอบหลุมละ 100 ไมโครลิตรจากนั้นปิดฝาภาชนะหลุม
ทดสอบด้วยเทปกาวพลาสติกที่แนบมากับชุดเพื่อป้องกันการระเหยและปนเปื้อนระหว่างกัน (แผนผังดัง
แสดงในภาคผนวก จ)
4. นำภาชนะหลุมทดสอบไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นแกะเทปกาวพลาสติกออก
ดูดสารละลายที่ได้ทำปฏิกิริยาแล้วออกทั้งหมด ล้างภาชนะหลุมทดสอบด้วยสารละลายสำหรับล้าง (washing
buffer) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม เติมน้ำให้แห้งบนกระดาษซับ และล้างซ้ำจนครบ 4 ครั้ง
5. ใส่ conjugate ลงในหลุมทดสอบหลุมละ 200 ไมโครลิตรจากนั้นปิดฝาแผงทดสอบด้วยเทปกาว
พลาสติกที่แนบมากับชุด
6. นำแผงทดสอบไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างตามขั้นตอนเหมือนข้อ 4
7. เติมน้ำ TMB (tetra methyl – benzidine substrate solution) ปริมาตร 200 ไมโครลิตรทุกหลุมบน
แผงทดสอบ แล้วปิดด้วยภาชนะที่บ่มแสง บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นใส่ stop solution
ปริมาตร 50 ไมโครลิตรทุกหลุม ตรวจสอบโดยการนำแผงทดสอบไปอ่านผลที่เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์
ไมโครเพลทรีดเดอร์ ที่ระดับความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

3.5.5.1.2 การตรวจวัดปริมาณโปรสตาแกลนดิน อี 2

1. ใช้ชุดตรวจอีไลซ่าสำหรับโปรสตาแกลนดิน อี 2 ของมนุษย์
2. ใส่ Tris buffer ในหลุม NSB (non specific binding) หลุมละ 150 ไมโครลิตรในหลุม Bo
(maximum binding) หลุมละ 100 ไมโครลิตร

3. สารที่ต้องการทดสอบลงในหลุมทดสอบหลุมละ 100 ไมโครลิตร
4. ใส่ PGE₂ Tracer 50 ไมโครลิตร ทุกหลุม ยกเว้น ในหลุม Blank และ TA (total activity)
5. ใส่ PGE₂ Antibody 50 ไมโครลิตร ทุกหลุม ยกเว้น ในหลุม Blank, TA และ NSB จากนั้นปิดฝา
แผงทดสอบด้วยเทปกาวพลาสติกที่แนบมา กับชุดเพื่อป้องกันการระเหยและปนเปื้อนระหว่างกัน (แผนผังดัง
แสดงในภาคผนวก จ)
6. นำแผงทดสอบไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง
7. ล้างแผงทดสอบด้วยสารละลายสำหรับล้าง (washing buffer) ปริมาตร 400 ไมโครลิตรต่อหลุม
ทิ้งไว้ 15- 30 วินาที เติมน้ำให้แห้งบนกระดาษซับ และล้างซ้ำจนครบ 5 ครั้ง
8. เติม สารละลาย pNPP (*para*-nitrophenyl phosphate) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ทุกหลุมบนแผง
ทดสอบ รวมทั้ง หลุม blank และ TA
9. ใส่ Tracer 5 ไมโครลิตร ใน หลุม TA จากนั้นปิดฝาแผงทดสอบด้วยเทปกาวพลาสติก ปิดไม่ให้
โดนแสง บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60-90 นาที
10. ตรวจสอบโดยการนำแผงทดสอบไปอ่านผลที่เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ไมโครเพลทรีด
เดอร์ ที่ระดับความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

4. การวิเคราะห์ทางสถิติ

สถิติเชิงวิเคราะห์ (Analytical statistics) เปรียบเทียบปริมาณของอินเตอร์ลิวคิน-6 อินเตอร์ลิวคิน-8
โพรสตาแกลนดินอี 2 ระหว่างกลุ่มทดลองในการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบ (โดยใช้สถิติ One-way
analysis of variance (ANOVA) และใช้การเปรียบเทียบของ post HOC Multiple Comparisons เป็น Tukey's
HSD test

5. สถานที่ทำการวิจัย

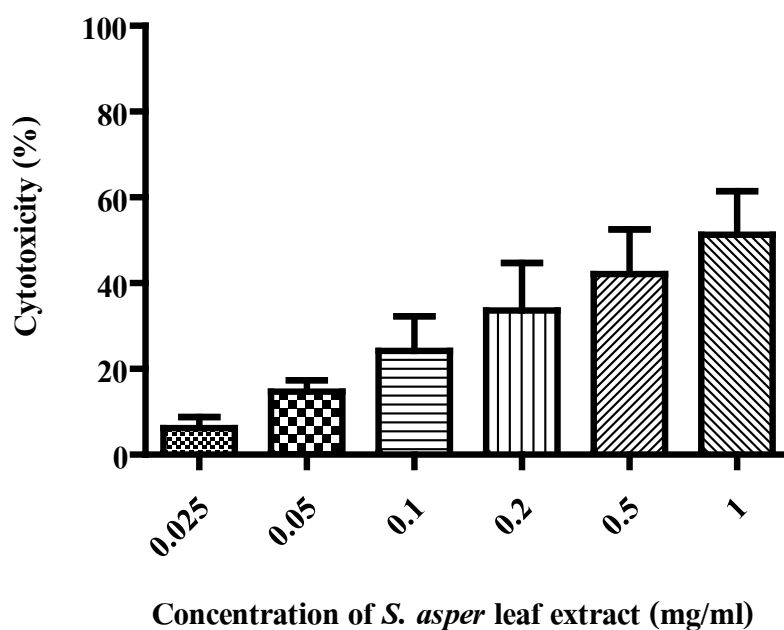
คลินิกศัลยกรรมปริทันต์ ห้องปฏิบัติการวิจัยเซลล์พันธุศาสตร์ และห้องปฏิบัติการอนุชีววิทยา คณะ
ทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทที่ 4

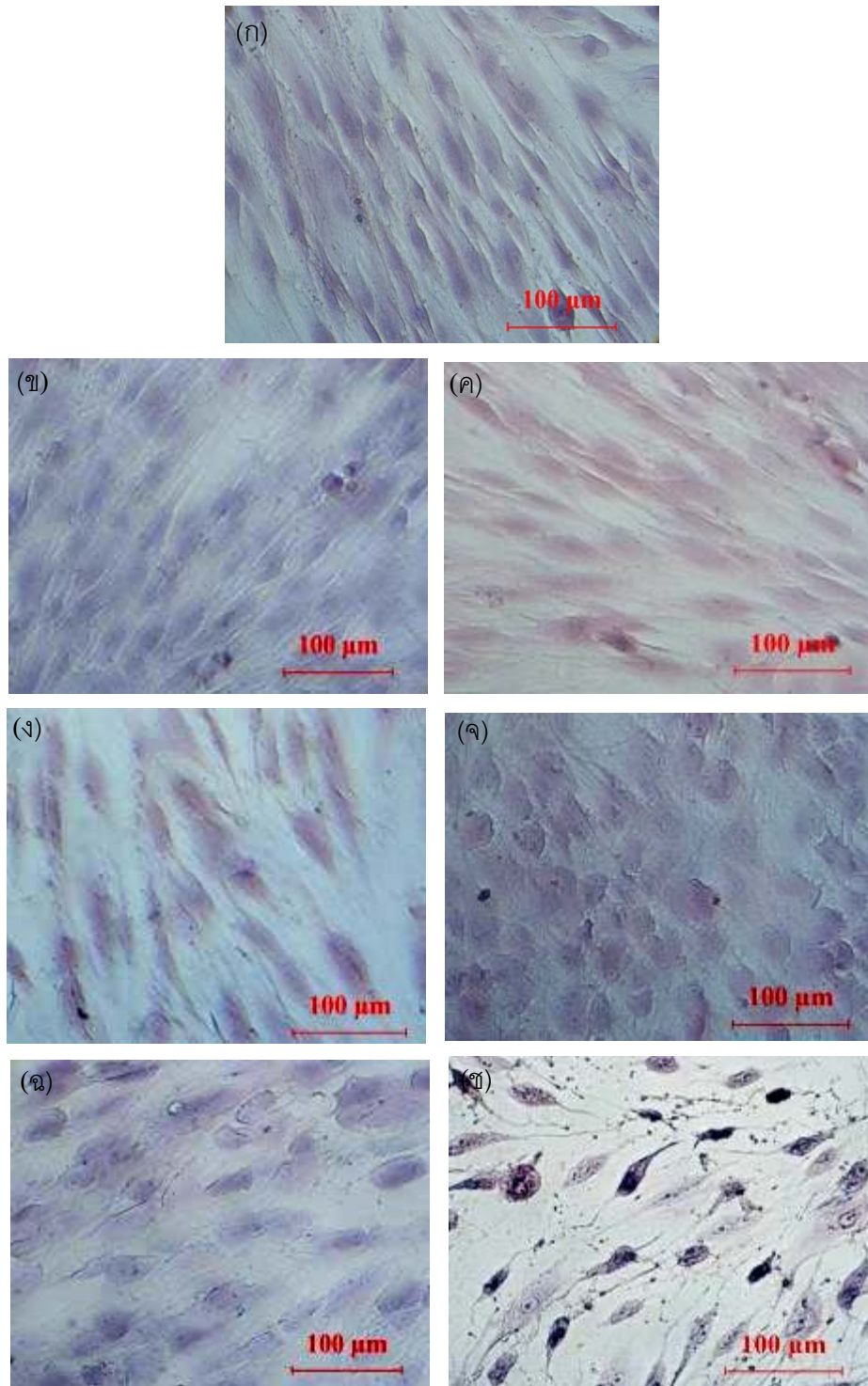
ผลการศึกษา

1. ความเป็นพิษของสารสกัดจากใบข่อยต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก

เมื่อทำการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากใบข่อยต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกโดยการบ่มเพาะเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกร่วมกับสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดจากใบข่อยที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นจะทำให้เซลล์ตายเพิ่มขึ้น โดยสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้น 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ยความเป็นพิษต่อเซลล์ร้อยละ 6.2, 14.7, 24.2, 33.6, 42.1 และ 51.3 ตามลำดับ (รูปที่ 12) เมื่อนำเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกที่สัมผัสกับสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์โดยเซลล์มีการหดตัวเล็กลง เปรียบเทียบกับเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกที่ไม่สัมผัสกับสาร (รูปที่ 13)



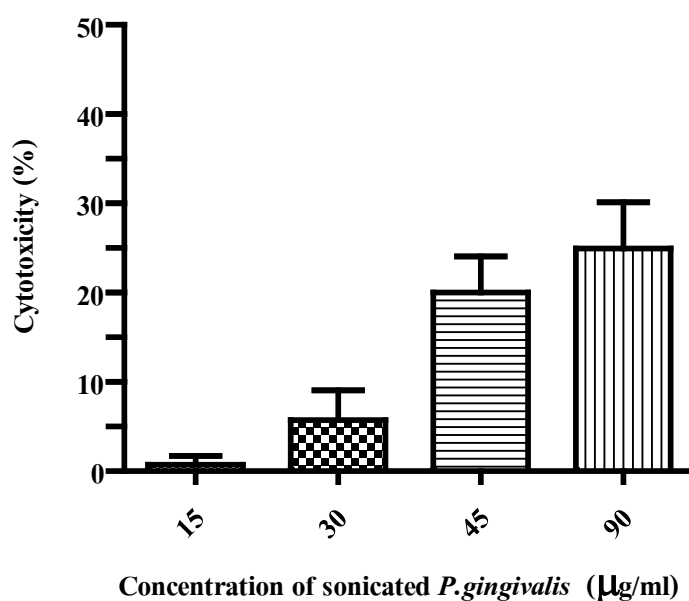
รูปที่ 8 ค่าความเป็นพิษของสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้นต่างๆต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกเมื่อเซลล์สัมผัสกับสารเป็นเวลา 24 ชั่วโมง



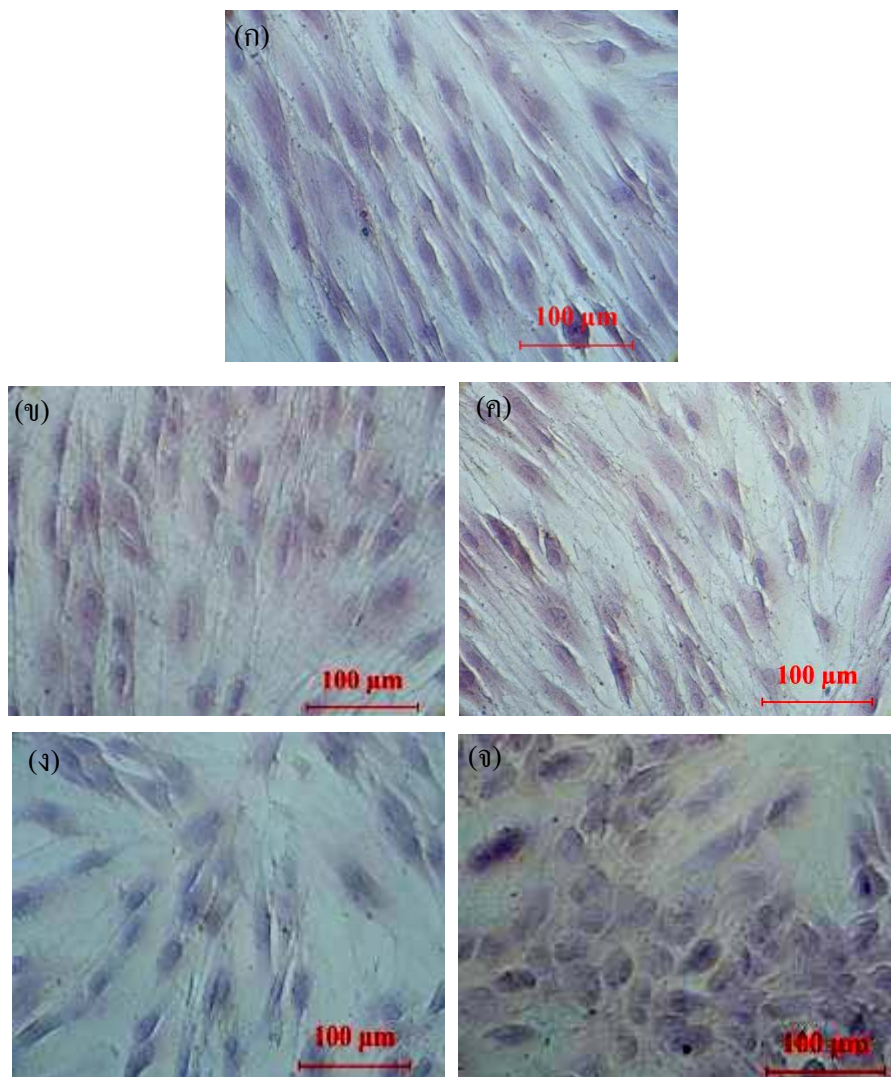
รูปที่ 9 ลักษณะเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกที่ไม่ถูกกระตุ้น (ก) และ ลักษณะเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกที่สัมผัสกับ สารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้น 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ข-ซ ตามลำดับ) (กำลังขยาย 400 เท่า)

2. ความเป็นพิษของชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก

ทำการทดสอบโดยบ่มเพาะเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกพร้อมกับชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส ความเข้มข้น 15, 30, 45 และ 90 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ยความเป็นพิษต่อเซลล์ร้อยละ 0.7, 5.7, 20 และ 24.9 ตามลำดับ จากผลการทดลองจะเห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส สูงขึ้นจะทำให้เกิดพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกเพิ่มขึ้น (รูปที่ 14) เมื่อนำเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกที่สัมผัสกับชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส ความเข้มข้น 45 และ 90 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์โดยเซลล์มีการหดตัวเล็กน้อย เปรียบเทียบกับเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกที่ไม่สัมผัสกับสาร (รูปที่ 15)



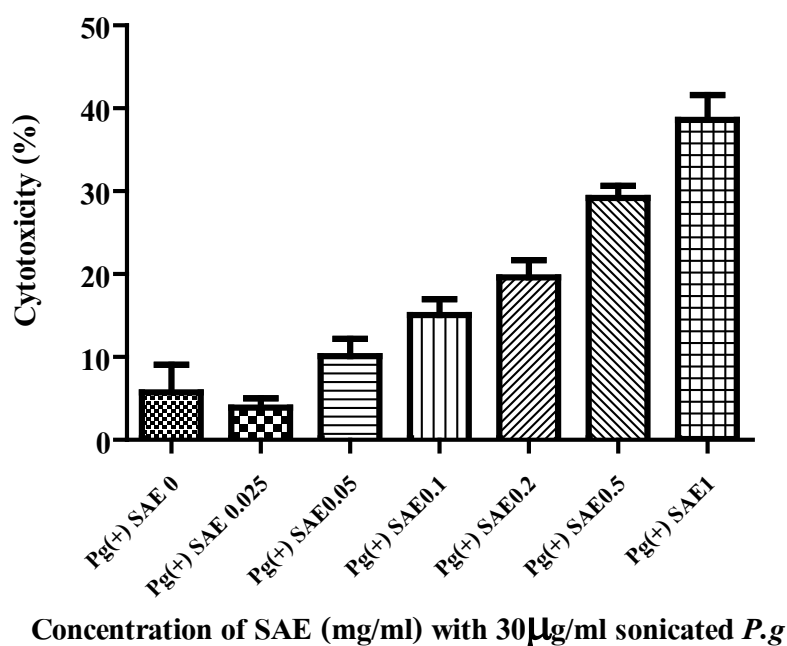
รูปที่ 10 ค่าความเป็นพิษของชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส ความเข้มข้นต่างๆ ต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกเมื่อเซลล์สัมผัสกับสารเป็นเวลา 24 ชั่วโมง



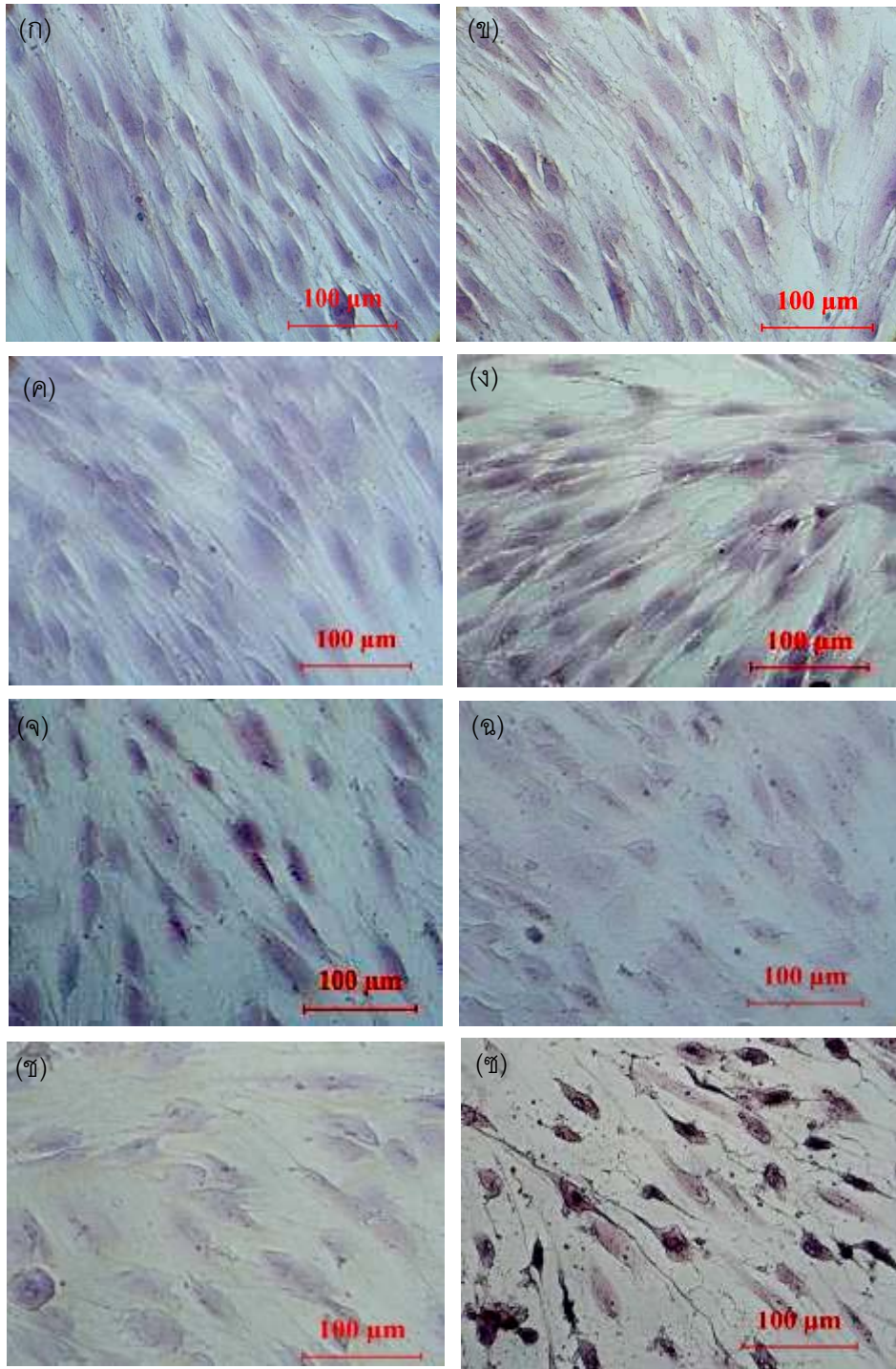
รูปที่ 11 (ก) ลักษณะเซลล์สร้างเส้นใยเหวี่ยงที่ไม่ถูกกระตุ้นและ ลักษณะเซลล์สร้างเส้นใยเหวี่ยงที่สัมผัสกับ
 ชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อฟอร์ไฟโรโมนเนส จึงจิวาลิสความเข้มข้น 15, 30, 45 และ 90 ไมโครกรัมต่อ
 มิลลิลิตร (ข-จ ตามลำดับ) (กำลังขยาย 400 เท่า)

3. ความเป็นพิษของสารสกัดจากใบข่อยร่วมกับชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อฟอร์ไฟโร-โมแนส จิงจิ วาลิสต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก

เมื่อทำการบ่มเพาะเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกกับชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อฟอร์ไฟโร-โมแนส จิงจิ วาลิส ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรร่วมกับสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อฟอร์ไฟโร-โมแนส จิงจิ วาลิส ร่วมกับสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้น 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ยความเป็นพิษต่อเซลล์ร้อยละ 3.9, 10, 15, 19.6, 29.2 และ 38.6 ตามลำดับ (รูปที่ 16) เมื่อนำเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกที่สัมผัสกับชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อฟอร์ไฟโร-โมแนส จิงจิ วาลิส ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรร่วมกับสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้น 0.2, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์โดยเซลล์มีการหดตัวเล็กน้อย เปรียบเทียบกับเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกที่ไม่สัมผัสกับสาร (รูปที่ 17)



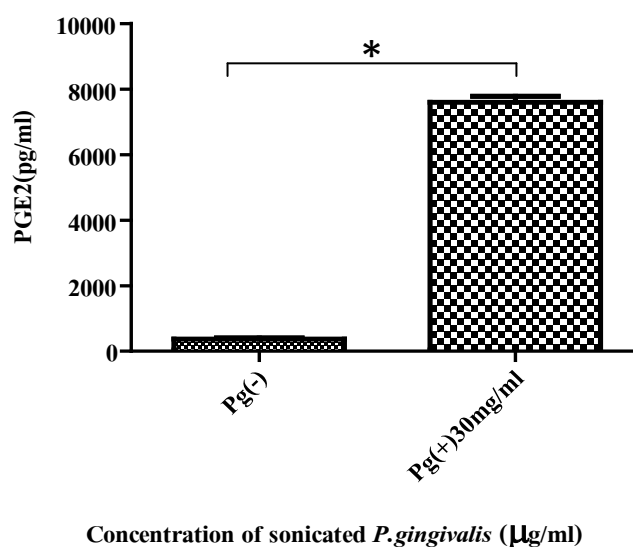
รูปที่ 12 ค่าความเป็นพิษของชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อฟอร์ไฟโร-โมแนส จิงจิ วาลิส ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรร่วมกับสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้นต่างๆ ต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกเมื่อเซลล์สัมผัสกับสารเป็นเวลา 24 ชั่วโมง



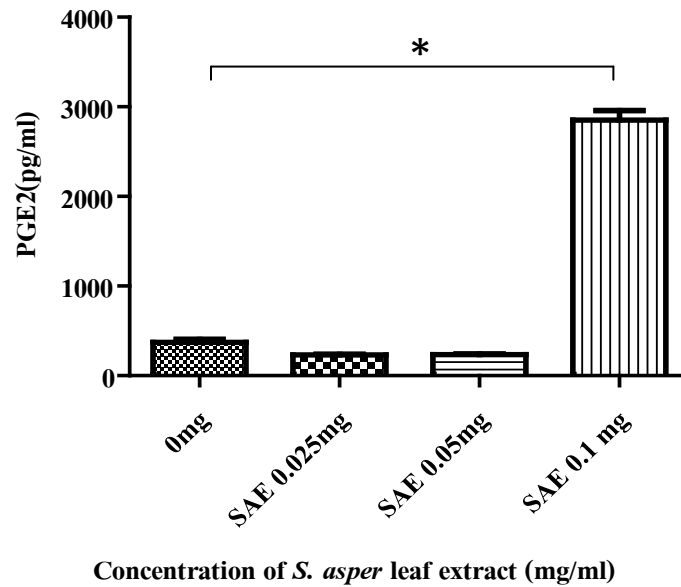
รูปภาพที่ 13 (ก) ลักษณะเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกที่ไม่ถูกกระตุ้น (ข) เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกที่สัมผัสกับชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อฟอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม และเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกที่สัมผัสกับชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อฟอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรร่วมกับสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้น 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ค-ฮ ตามลำดับ) (กำลังขยาย 400 เท่า)

4. ผลของสารสกัดจากใบช่อยต่อปริมาณโพस्ताกลนดิน อี 2

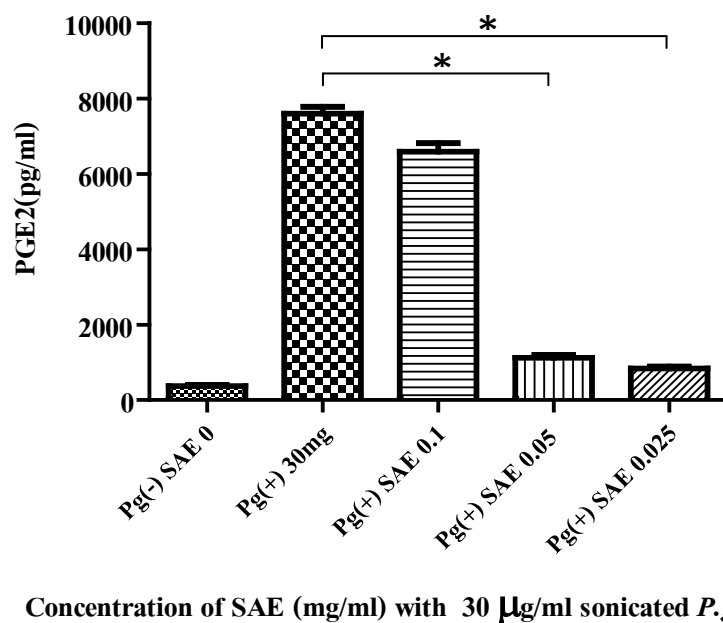
เมื่อกระตุ้นเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกด้วยชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालิสความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีปริมาณการหลั่งโพस्ताกลนดิน อี 2 สูงขึ้นจากสถานะที่ไม่มีการกระตุ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยปริมาณการหลั่งที่เพิ่มขึ้นเป็น 23 เท่าจากสถานะที่ไม่มีการกระตุ้น (รูปที่ 18) และสารสกัดจากใบช่อยที่ความเข้มข้น 0.025 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงปริมาณการหลั่งโพस्ताกลนดิน อี 2 ในขณะที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงปริมาณการหลั่งโพस्ताกลนดิน อี 2 เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสถานะที่ไม่มีการกระตุ้น (รูปที่ 19) แต่ในสถานะที่เซลล์ถูกกระตุ้นด้วยชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालิส ร่วมกับการใส่สารสกัดจากใบช่อยความเข้มข้น 0.025 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสามารถทำให้ปริมาณการหลั่งโพस्ताกลนดิน อี 2 ลดลงจากสถานะที่เซลล์ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालิสเพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยปริมาณการหลั่งโพस्ताกลนดิน อี 2 ลดลงสู่ระดับใกล้เคียงกับกลุ่มเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นโดยเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालิส แต่ไม่มีสารสกัดจากใบช่อย ส่วนความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้ปริมาณการหลั่งโพस्ताกลนดิน อี 2 ลดลงเช่นเดียวกันแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 20)



รูปที่ 14 สัดส่วนการหลั่งโพस्ताกลนดิน อี 2 ในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกที่ถูกกระตุ้นด้วยชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालิส ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเมื่อเซลล์สัมผัสกับสารเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกที่ไม่ถูกกระตุ้น (* $p<0.05$)



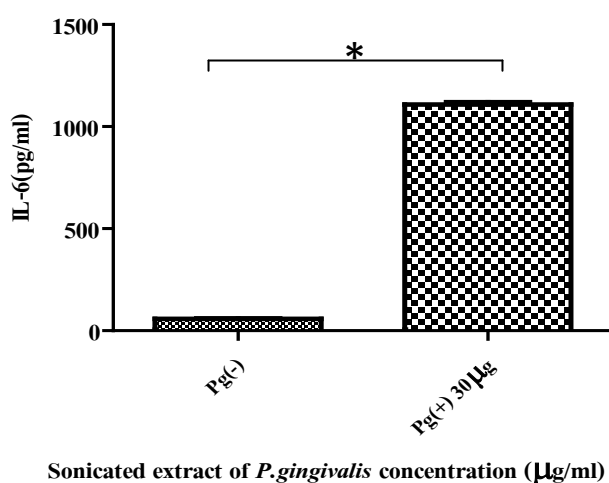
รูปที่ 15 สัดส่วนการหลั่งโปรสตาแกลนดิน อี 2 ในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเซลล์สัมผัสกับสารเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น (* $p < 0.05$)



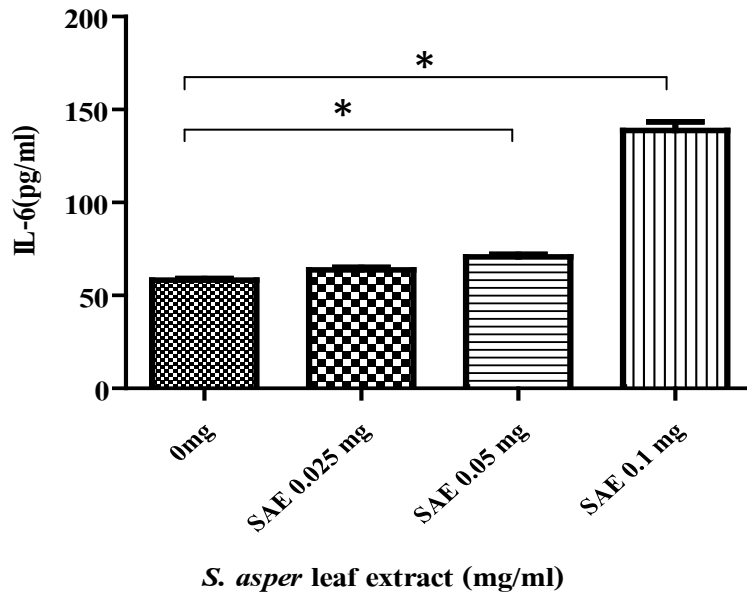
รูปที่ 16 สัดส่วนการหลั่งโปรสตาแกลนดิน อี 2 ในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกที่ถูกกระตุ้นด้วยชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อฟอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรร่วมกับสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเซลล์สัมผัสกับสารเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อฟอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสเพียงอย่างเดียว (* $p < 0.05$)

5. ผลของสารสกัดจากใบข่อยต่อปริมาณอินเตอร์ลิวคิน-6

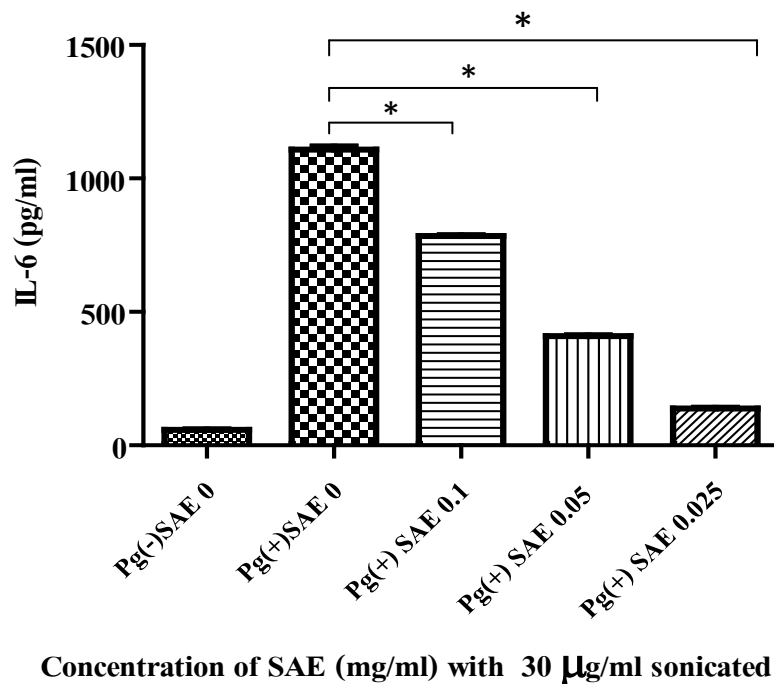
เมื่อกระตุ้นเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกด้วยชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีปริมาณการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-6 สูงขึ้นจากสภาวะที่ไม่มีการกระตุ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยปริมาณการหลั่งที่เพิ่มขึ้นเป็น 19 เท่าจากสภาวะที่ไม่มีการกระตุ้น (รูปที่ 21) และสารสกัดจากใบข่อยที่ความเข้มข้น 0.025 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรไม่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงปริมาณการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-6 ในขณะที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงปริมาณการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-6 เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่ไม่มีการกระตุ้น (รูปที่ 22) แต่ในสภาวะที่เซลล์ถูกกระตุ้นด้วยชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส ร่วมกับการใส่สารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้น 0.025, 0.05 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสามารถทำให้ปริมาณการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-6 ลดลงจากสภาวะที่เซลล์ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสเพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยปริมาณการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-6 ลดลงสู่ระดับใกล้เคียงกับกลุ่มเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น (รูปที่ 23)



รูปที่ 17 สัดส่วนการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-6 ในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกที่ถูกกระตุ้นด้วยชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเซลล์สัมผัสกับสารเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเปรียบเทียบกับเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกที่ไม่ถูกกระตุ้น (* $p < 0.05$)



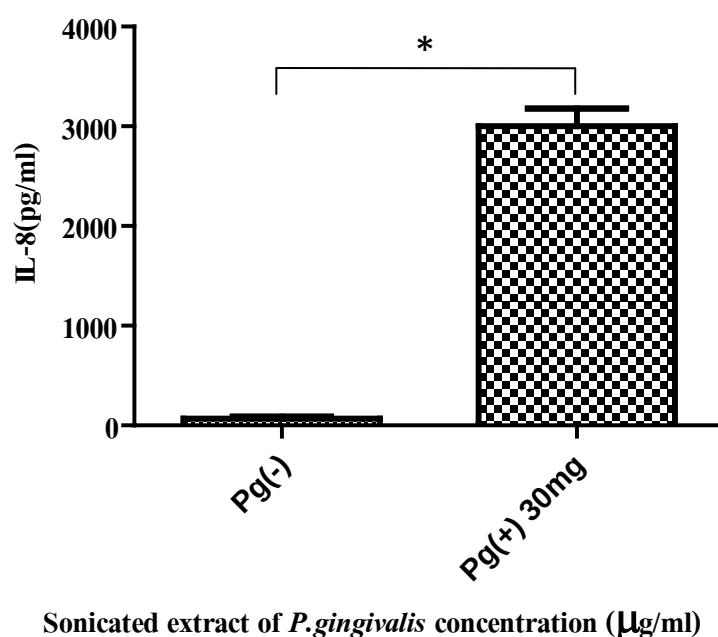
รูปที่ 18 สัดส่วนการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-6 ในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดจากใบข่อย ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเซลล์สัมผัสกับสารเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น (* $p<0.05$)



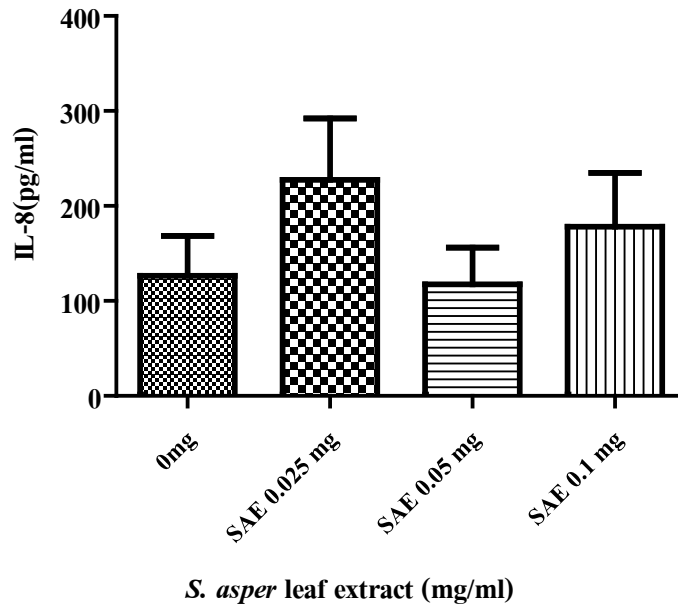
รูปที่ 19 สัดส่วนการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-6 ในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกที่ถูกกระตุ้นด้วยชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อฟอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรร่วมกับสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเซลล์สัมผัสกับสารเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อฟอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสเพียงอย่างเดียว (* $p<0.05$)

6. ผลของสารสกัดจากใบช่อดอประติมอินเตอร์ลิวคิน-8

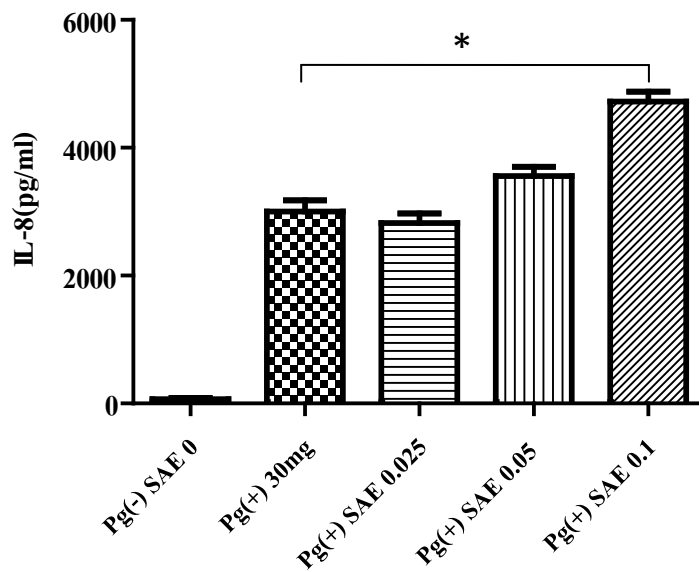
เมื่อทำการบ่มเพาะเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกกับชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิ วาลิส ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรพบว่าปริมาณการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-8 สูงขึ้นจากสภาวะที่ไม่มีการกระตุ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยปริมาณการหลั่งที่เพิ่มขึ้นเป็น 1,400 เท่าจากสภาวะที่ไม่มีการกระตุ้น (รูปที่ 24) ในขณะที่วัดกันสารสกัดจากใบช่อดอประติมอินเตอร์ลิวคิน-8 อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่ไม่มีการกระตุ้น (รูปที่ 25) และในสภาวะที่เซลล์ถูกกระตุ้นด้วยชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิ วาลิส ร่วมกับการใส่สารสกัดจากใบช่อดอประติมอินเตอร์ลิวคิน-8 อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับจากสภาวะที่เซลล์ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิ วาลิส เพียงอย่างเดียว (รูปที่ 26)



รูปที่ 20 สัดส่วนการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-8 ในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกที่ถูกกระตุ้นด้วยชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิ วาลิส ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเซลล์สัมผัสกับสารเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเปรียบเทียบกับเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกที่ไม่ถูกกระตุ้น (* $p < 0.05$)



รูปที่ 21 สัดส่วนการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-8 ในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดจากใบข่อย ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเซลล์สัมผัสกับสารเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น(* $p<0.05$)



รูปที่ 22 สัดส่วนการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-8 ในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกที่ถูกกระตุ้นด้วยชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวัลิส ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรร่วมกับสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเซลล์สัมผัสกับสารเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวัลิสเพียงอย่างเดียว (* $p<0.05$)

บทที่ 5

อภิปรายผล

การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อเชื้อก่อโรคปริทันต์จะส่งผลให้ร่างกายสร้างและหลั่งสารอักเสบซึ่งจะส่งผลให้มีการทำลายอวัยวะปริทันต์ ซึ่งมีรายงานการตรวจพบปริมาณสารอักเสบเป็นจำนวนมากในอวัยวะปริทันต์และในน้ำเหลืองเหงือกในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ^{17, 82}

กระบวนการเกิดการอักเสบและละลายตัวของกระดูกเบ้าฟันจากโรคปริทันต์อักเสบเกิดจากการกระตุ้นจากเชื้อก่อโรคปริทันต์โดยตรงและผลทางอ้อมจากการตอบสนองภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยเชื้อแบคทีเรียและเชื้อก่อโรคปริทันต์จะอยู่ร่วมกันในรูปแบบของแผ่นคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือกซึ่งมีทั้งเชื้อมีชีวิตและเชื้อที่ไม่มีชีวิต เมื่อเซลล์เนื้อเยื่อปริทันต์ในช่องปากซึ่งประกอบไปด้วยเซลล์หลายชนิดได้แก่เซลล์สร้างเส้นใยเหงือก เซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์ เซลล์เยื่อผิวเหงือก และเซลล์ภูมิคุ้มกันของร่างกายถูกกระตุ้นด้วยเชื้อก่อโรคปริทันต์ทั้งเชื้อที่มีชีวิตและเชื้อที่ไม่มีชีวิตอยู่ตลอดเวลา พบว่าในสภาวะที่มีการอักเสบเซลล์ต่างๆในเนื้อเยื่อปริทันต์จะมีการสร้างและหลั่ง ไซโตไคน์และสารอักเสบออกมาเป็นจำนวนมาก หลายการศึกษาพบว่าเชื้อก่อโรคปริทันต์ที่ไม่มีชีวิตหรือส่วนประกอบของเชื้อเช่นเชื้อที่ถูกทำให้แตกตัวและไลโปโพลีแซคคาไรด์ สามารถกระตุ้นเซลล์ของเนื้อเยื่อปริทันต์และเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันให้มีการหลั่งสารอักเสบและไซโต-ไคน์ออกมาได้^{32, 38}

เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกเป็นเซลล์ที่พบมากที่สุดในเนื้อเยื่อปริทันต์³⁰ โดยปกติแล้วเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกจะทำหน้าที่ผลิตและรักษาภาวะสมดุลของเมทริกซ์นอกเซลล์ และเนื้อเยื่อโดยการย่อยสลายและสังเคราะห์เนื้อเยื่อยึดต่อ และทำหน้าที่เป็นตัวป้องกันทางกายภาพในสภาวะปกติ แต่จากการศึกษาพบว่าเมื่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกได้รับการกระตุ้นจากเชื้อก่อโรคปริทันต์ เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกสามารถหลั่งไซโตไคน์และสารอักเสบต่างๆหลายชนิดได้ด้วยตัวเอง³¹ นอกจากนั้นยังสามารถเหนี่ยวนำเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายทั้งเซลล์ที่อยู่ในบริเวณที่มีการอักเสบและเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันจากแหล่งอื่นๆ ให้มายังบริเวณเนื้อเยื่อปริทันต์ที่มีการติดเชื้อทำให้มีการตอบสนองต่อเชื้อด้วยการหลั่งไซโตไคน์และสารอักเสบต่างๆทำให้เกิดการอักเสบและการละลายตัวของกระดูกตามมา^{83, 84} โดยไซโตไคน์ ที่สัมพันธ์กับการอักเสบและการทำลายของกระดูกมีหลายชนิด เช่นอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า อินเตอร์ลิวคิน-6 อินเตอร์ลิวคิน-8 โพรสตา-แกลนดินอี 2 ซึ่งเป็นสารสำคัญที่พบว่ามีระดับสูงขึ้นในอวัยวะปริทันต์หรือในน้ำเหลืองเหงือกบริเวณที่เป็นโรคเมื่อเทียบกับบริเวณที่ไม่เป็นโรค⁸⁻¹⁰

จากเหตุผลดังกล่าวมาทำให้การรักษาโรคปริทันต์ในปัจจุบันนอกจากการรักษาทางกลซึ่งได้แก่การขูดหินปูนและเกลารากฟันแล้วยังได้มีการพัฒนาการรักษาที่มีจุดมุ่งหมายเพื่อยับยั้งกระบวนการอักเสบและการละลายตัวของกระดูก เช่นวิธีการยับยั้งการทำงานของสารอักเสบเพื่อลดการทำลายของเนื้อเยื่อและการสลายตัวของกระดูกเบ้าฟันด้วยการใช้เอนติบอดีต้านไซโตไคน์^{33, 85} และยาต้านการทำงานของไซโคลออกซีจีเนส-2 (COX-2 inhibitor)⁸⁶⁻⁸⁷

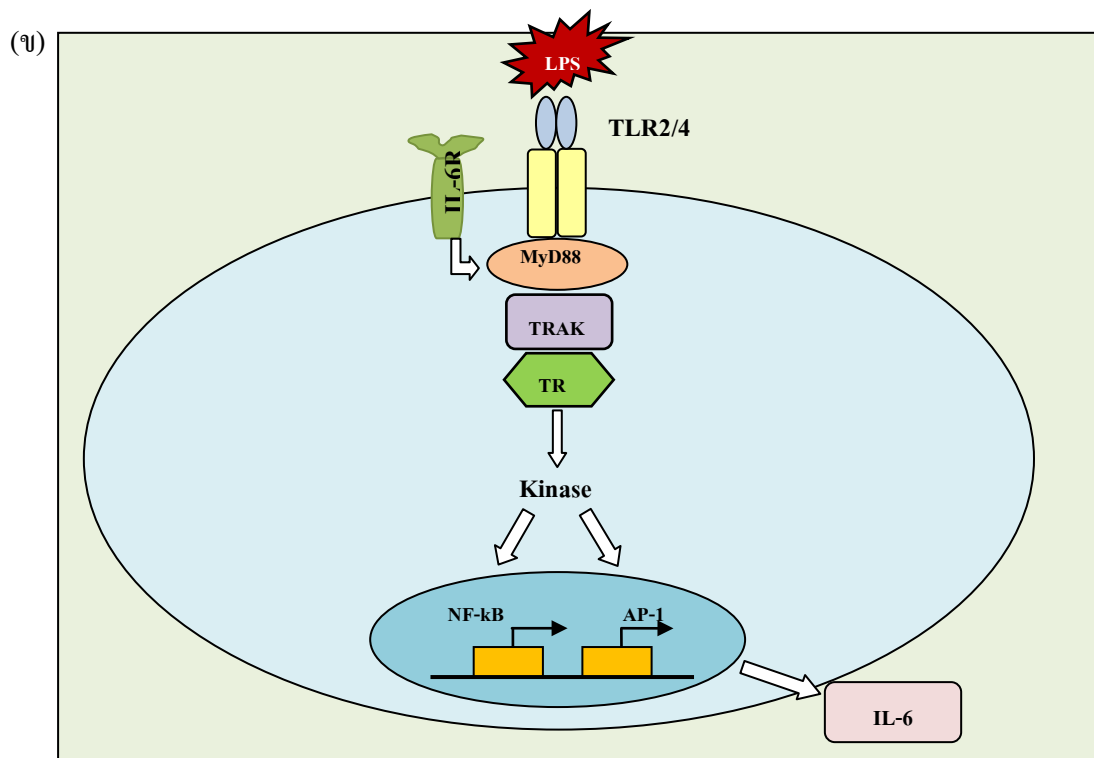
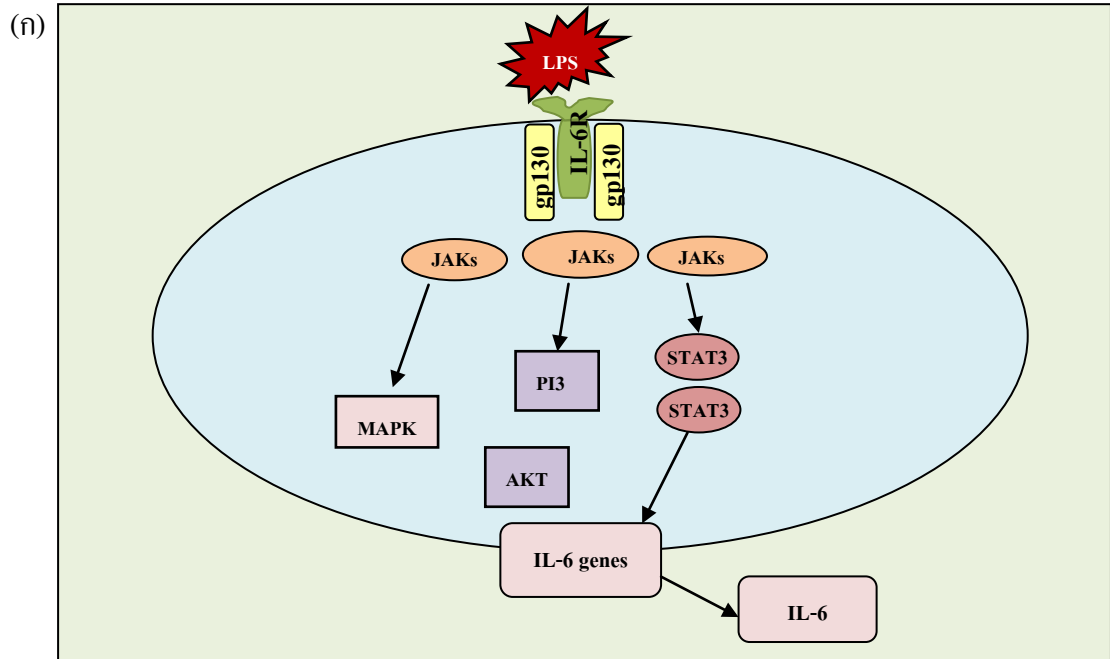
ปัจจุบันได้มีการนำสมุนไพรมาใช้ในทางทันตกรรมมากขึ้น โดยผลการศึกษาเมื่อใช้สารสกัดจากใบข่อยในรูปแบบการฉีดลงในร่องลึกปริทันต์ร่วมกับการขูดหินปูนเกลารากฟันในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังในระยะคงสภาพ มีค่าดัชนีเหงือกอักเสบลดลงอย่างมีนัยสำคัญ³⁷ และการศึกษาในระดับโมเลกุลพบว่าสารสกัดจากใบข่อยมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบในเซลล์โมโนไซต์และเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกเมื่อดูจากระดับการแสดงออกของอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า และไซโตไคน์ออกซิเจเนส-2 พบว่ามีระดับการแสดงออกลดลงอย่างมีนัยสำคัญเช่นเดียวกัน³⁸ ซึ่งในกระบวนการอักเสบนั้น มักมีการผลิตและหลั่งสารอักเสบรวมทั้งไซโตไคน์หลายชนิดเช่น อินเตอร์ลิวคิน ทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์ และโปรสตาแกลนดิน การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาผลของสารสกัดจากใบข่อยโดยศึกษาปริมาณการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-6 อินเตอร์ลิวคิน-8 และโปรสตาแกลนดิน อี 2 ในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกที่ได้รับการกระตุ้นจากชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อ พอร์ไฟโรโมนัส จิงจิवालิส แม้ว่าการศึกษาจะใช้ส่วนสกัดจากเชื้อพอร์ไฟโรโมนัส จิงจิवालิสที่ถูกทำให้แตกตัวโดยไม่ได้ใช้ตัวกระตุ้นที่เป็นสารบริสุทธิ์เพียงชนิดใดชนิดหนึ่งที่สกัดจากเชื้อมาทำการศึกษา แต่อย่างไรก็ตามการศึกษานี้สามารถเทียบเคียงได้กับการเกิดพยาธิสภาพของโรค ปริทันต์อักเสบที่เกิดขึ้นจริงในร่างกายได้มากกว่าใช้ตัวกระตุ้นที่เป็นสารบริสุทธิ์เพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง

การศึกษานี้ได้ทำการศึกษาผลของสารสกัดจากใบข่อยโดยศึกษาปริมาณการหลั่งโปรสตาแกลนดิน อี 2 อินเตอร์-ลิวคิน-6 และอินเตอร์ลิวคิน-8 ในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกที่ได้รับการกระตุ้นจากชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมนัส จิงจิवालิส พบว่าสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้น 0.05 และ 0.025 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถลดปริมาณการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-6 จากสถานะที่เซลล์ถูกกระตุ้นได้ 2.7 และ 8 เท่าตามลำดับ และลดการหลั่งโปรสตาแกลนดิน อี 2 จากสถานะที่เซลล์ถูกกระตุ้นได้ประมาณ 7 และ 9 เท่าตามลำดับเช่นเดียวกัน ส่วนสารสกัดจากใบข่อยที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรทำให้ปริมาณการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-8 เพิ่มขึ้นประมาณ 1.5 เท่า ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าสารสกัดจากใบข่อยมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบในเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันโดยลดปริมาณการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-6 และโปรสตาแกลนดิน อี 2 แต่ไม่มีผลลดปริมาณการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-8

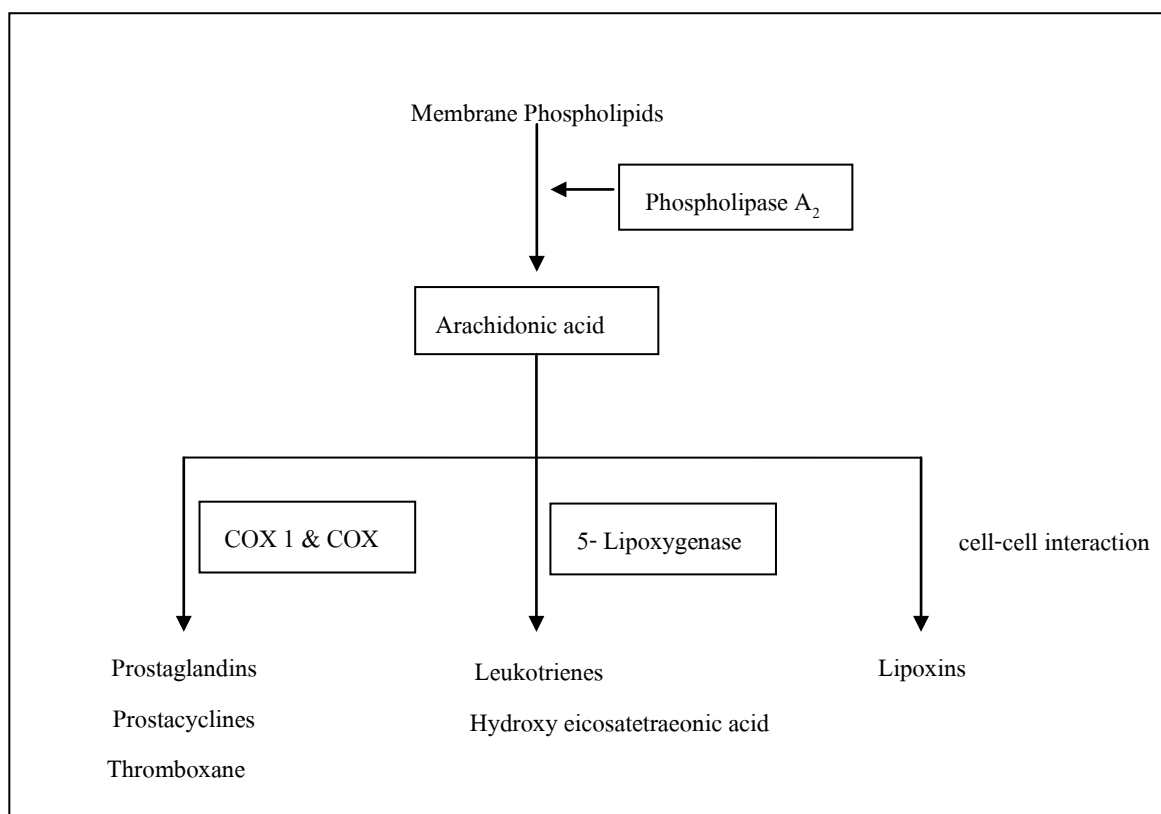
กลไกที่สารสกัดจากใบข่อยใช้ในการยับยั้งการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-6 และโปรสตาแกลน-ดิน อี 2 ในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกที่ได้รับการกระตุ้นจากชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมนัส จิงจิवालิส ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด การที่สารสกัดจากใบข่อยสามารถลดปริมาณการหลั่งโปรสตาแกลนดิน อี 2 ในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกนั้น อาจเป็นไปได้ว่าสารสกัดจากใบข่อยมีผลต่อเอนไซม์ไซโคลออกซีจีเนส และส่งผลให้ลดการสังเคราะห์โปรสตาแกลนดิน เนื่องจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสารสกัดจากใบข่อยมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก เมื่อดูจากระดับการแสดงออกของไซโคลออกซีจีเนส- 2³⁸ ซึ่งการสร้างและหลั่งโปรสตาแกลนดิน อี 2 เกิดขึ้นเมื่อเชื้อแบคทีเรียและปัจจัยจากภูมิคุ้มกันของร่างกายทำให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อและการทำลายนี้ทำให้ฟอสโฟไลปิด (phospholipid) ในเยื่อหุ้มเซลล์ถูกเปลี่ยนแปลงโดย ฟอสโฟไลเปสเอสอง (phospholipase A₂) ไปเป็นกรดเอราคิโดนิกอิสระ (free arachidonic acid) กรดเอราคิโดนิกจะถูกเปลี่ยนโดยเอนไซม์ไซโคลออกซีจีเนส หรือไลพอกซีจีเนส

(lipoxygenase) ให้เป็นผลิตภัณฑ์อื่นต่อ ซึ่งโปรสตาแกลนดิน อี 2 เป็นผลิตภัณฑ์ท้ายสุดของวิถีไซโคลออกซีจีเนส (รูปที่ 29) นอกจากนั้นยังพบว่ามียูบิลิวินและทรานสคริปชันแฟกเตอร์อื่นที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างโปรสตาแกลนดิน อี 2³¹

การสร้างและหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-6 เกิดขึ้นเมื่อปัจจัยการก่อโรคจับกับตัวรับบนผิวเซลล์ (ligand-binding receptor; IL-6R) และตัวรับที่ละลาย (soluble receptor) ได้แก่ โกลโคโลโปรตีน จีพี 130 (glycoprotein chain; gp130) ทำให้เกิดการส่งสัญญาณ (signal pathway) เข้าไปในเซลล์เริ่มจากการกระตุ้นยูบิลิวินเจเนส ไคเนส (Janus-associated kinases - signal transducer and activator of transcription; JAKs-STAT) และไมโทเจน-แอคทีเวตโปรตีนไคเนส (Mitogen-activated protein kinase; MAPK) โดยอาศัยโมเลกุลสัญญาณ (signaling molecule) ทำให้เกิดการแสดงออกของยีน ซึ่งทำให้มีการเพิ่มการผลิตไซโตไคน์จากเซลล์ (รูปที่ 23 ก) และจากการศึกษาก่อนหน้าพบว่าชิ้นส่วนสักดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจีวาลิส และไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมีการแสดงออกของตัวรับทอล-ไลค์ 2 และ 4 (Toll-like receptor; TLR) เพิ่มขึ้น⁸⁸ การจับของสารจากเชื้อแบคทีเรียกับตัวรับทอล-ไลค์บนเยื่อหุ้มเซลล์ โดยผ่านทางโมเลกุลต่างๆ เช่น เอ็มวายดี 88 (myeloid differentiation primary response gene 88; MyD88) ไลเรค (interleukin-1 receptor-associated kinase; IRAK) ทราฟ 6 (TNF receptor-associated factor; TRAF 6) ทำให้เกิดการกระตุ้นไคเนส (kinase) และทรานสคริปชัน แฟกเตอร์ (transcription factor) ที่สำคัญได้แก่ เอพี-1 (activating protein-1; AP-1) และนิวเคลียร์ แฟกเตอร์- แคปบีบี (nuclear factor-kB; NF-kB) ทำให้เกิดการแสดงออกของยีนของสารอักเสบและไซโตไคน์ (รูปที่ 23 ข) ซึ่งทำให้มีการเพิ่มการผลิตสารอักเสบและไซโตไคน์หลายชนิดจากเซลล์ ได้แก่ อินเตอร์ลิวคิน-1 อินเตอร์ลิวคิน-6 อินเตอร์ลิวคิน-8 นอกจากนั้นผลการศึกษาโดย Tabeta⁸⁹ เมื่อใช้ไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจีวาลิสกระตุ้นเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกของมนุษย์ ได้เสนอแนะว่าไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจีวาลิส กระตุ้นเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกของมนุษย์ผ่านทางตัวรับทอล-ไลค์ 4 และแอนติบอดีต่อตัวรับทอล-ไลค์ 4 สามารถยับยั้งการกระตุ้นเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกได้โดยทำให้มีการแสดงออกของยีนอินเตอร์ลิวคิน-6 ลดลง



รูปที่ 23 แสดงวิถีสัญญาณที่มีผลต่อการสร้างอินเตอร์ลิวคิน-6 (ก) ผ่าน STAT3 และ MAPK⁷ และ (ข) ผ่านตัวรับทอล-ไลค์³¹



รูปที่ 24 แสดงการสร้างผลิตภัณฑ์ จากกรดเอราคิโนอิก³¹

ดังนั้นการที่สารสกัดจากใบข่อยมีผลลดปริมาณการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-6 และโปรสตาแกลนดิน อี 2 จากสถานะที่เซลล์ถูกกระตุ้นนั้น อาจมีกลไกที่เป็นไปได้หลายประการดังนี้

1. มีผลต่อตัวกระตุ้นได้แก่ ขึ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อฟอร์ไฟโร โมแนส จิงจิवालิส ทำให้ไม่สามารถจับกับตัวรับหรือจับกับตัวรับได้น้อยลง
2. มีผลต่อตัวรับได้แก่ โทล-ไลค์ และตัวรับอินเตอร์ลิวคิน-6 ทำให้ไม่สามารถจับกับตัวรับได้ หรือจับได้น้อยลง
3. มีผลต่อโมเลกุลส่งสัญญาณ หรือทรานสคริปชัน แฟกเตอร์ ตัวใดตัวหนึ่งทำให้ขัดขวางการส่งสัญญาณเข้าไปในเซลล์
4. มีผลให้เกิดการสร้างสารใดๆซึ่งมีผลไปขัดขวางการสร้างอินเตอร์ลิวคิน-6 และโปรสตาแกลนดิน อี 2

เมื่อทดสอบโดยกระตุ้นเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกด้วยขึ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อฟอร์ไฟโร โมแนส จิงจิवालิส พบว่ามีปริมาณการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-8 สูงขึ้นจากสถานะที่ไม่มีการกระตุ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับหลายการศึกษา^{47, 32} อาจเป็นไปได้ว่าเวลาที่ใช้ในการกระตุ้นเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกด้วยขึ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อฟอร์ไฟโร โมแนส จิงจิवालิสในการศึกษาครั้งนี้อยู่ในระยะ

การตอบสนองการติดเชื้อเฉียบพลัน (acute inflammation phase) ทำให้เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมีการหลั่งสารอักเสบต่างๆที่เกี่ยวข้องรวมทั้งอินเทอร์ลิวคิน-8 ในปริมาณที่สูงเพื่อเหนี่ยวนำเม็ดเลือดขาว โมโนไซต์ มาโครฟาจ ให้เข้ามากำจัดและทำลายเชื้อโรคในบริเวณที่มีการติดเชื้อ^{90, 91} เมื่อเปรียบเทียบปริมาณการหลั่งอินเทอร์ลิวคิน-8 ในสถานะที่มีสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรร่วมกับชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส พบว่ามีปริมาณการหลั่งสูงขึ้นจากสถานะที่ถูกกระตุ้นด้วยชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส เพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยพบว่ามีปริมาณสูงกว่า 1.7 เท่าซึ่งอาจเป็นไปได้ว่ามีสารประกอบในสารสกัดจากใบข่อยเช่นเอนไซม์ต่างๆ^{92,93} สามารถกระตุ้นเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกให้หลั่งอินเทอร์ลิวคิน-8 ได้มากขึ้นจึงพบแนวโน้มปริมาณการหลั่งอินเทอร์ลิวคิน-8 ที่สูงขึ้น อย่างไรก็ตามการศึกษากครั้งนี้ใช้สารสกัดหยาบของใบข่อย (crude extract) ซึ่งมีสารประกอบหลายชนิด⁷⁰ จึงไม่สามารถระบุได้ชัดเจนว่าสารประกอบ หรือเอนไซม์ชนิดใดทำให้เกิดผลดังกล่าว ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

แม้ว่าหลายการศึกษาจะพบว่าระดับของอินเทอร์ลิวคิน-8 ในฟันที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังจะมีปริมาณสูงกว่าบริเวณที่มีเหงือกปกติ^{10, 27} อย่างไรก็ตามการที่สารสกัดจากใบข่อยมีผลให้เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกหลั่งอินเทอร์ลิวคิน-8 ปริมาณสูงในระหว่างการตอบสนองการติดเชื้อเฉียบพลันอาจให้ผลดีในแง่การส่งเสริมให้เกิดการเคลื่อนที่ของนิวโทรฟิลจำนวนมากมารวมกันที่เนื้อเยื่อที่มีการติดเชื้ออักเสบเพื่อผลในการทำลายและต่อต้านเชื้อก่อโรคได้ แต่ในทางตรงกันข้าม อินเทอร์ลิวคิน-8 ปริมาณสูงก็ส่งผลทำให้เกิดการอักเสบของอวัยวะปริทันต์ได้เช่นเดียวกัน ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปทั้งการศึกษาในห้องปฏิบัติการและทางคลินิกเกี่ยวกับผลของสารสกัดจากใบข่อยต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อไป

บทที่ 6

สรุปและข้อเสนอแนะ

1. สรุปผลการวิจัย

1.1 สารสกัดจากใบข่อยมีผลต่อการต้านการอักเสบในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกของมนุษย์เมื่อดูจากปริมาณการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-6 และ โพรสตาแกลนดิน อี 2 โดยผลการศึกษาพบว่าสารสกัดจากใบข่อยมีผลลดปริมาณการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-6 และ โพรสตาแกลนดิน อี 2 ลงจากสภาวะที่เซลล์ถูกกระตุ้นด้วยชิ้นส่วนสีกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

1.2 สารสกัดจากใบข่อยไม่มีผลลดปริมาณการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-8 ในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกของมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นด้วยชิ้นส่วนสีกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส

2. ข้อเสนอแนะ

การศึกษาเพื่อยืนยันผลถึงฤทธิ์ของสารสกัดจากใบข่อยในการต้านการอักเสบและการละลายตัวของกระดูกควรทำการศึกษาในกลุ่มตัวอย่างที่มีขนาดใหญ่ขึ้น และศึกษาถึงผลต่อสารอักเสบชนิดอื่นๆที่มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการการอักเสบและการละลายตัวของกระดูกเพื่อให้ทราบกลไกในการต้านการอักเสบและละลายตัวของกระดูก

นอกจากนั้นการศึกษากครั้งนี้ใช้สารสกัดหยาบของใบข่อย (crude extract) ซึ่งมีสารประกอบหลายชนิด จึงไม่สามารถระบุได้ชัดเจนว่าสารประกอบ หรือเอนไซม์ชนิดใดทำให้เกิดผลดังกล่าว ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Darveau RP, Tanner A, Page RC. The microbial challenge in periodontitis. *Periodontol 2000* 1997; 14: 12-32.
2. Feng Z, Weinberg A. Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. *Periodontol 2000* 2006; 40: 50-76.
3. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998; 25: 134-144.
4. Slots J, Ting M. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease: occurrence and treatment. *Periodontol 2000* 1999; 20: 82-121.
5. Van Winkelhoff AJ, Loos BG, Van der Reijden WA, Van der Velden U. *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *J Clin Periodontol* 2002; 29: 1023-1028.
6. Holt, S. C., L. Kesavalu, S. Walker, and C. A. Genco. Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol 2000* 1999; 20: 168-238.
7. Takashiba S, Naruishi K, Murayama Y. Perspective of cytokine regulation for periodontal treatment: fibroblast biology. *J Periodontol* 2003; 74: 103-110.
8. Masada MP, Persson R, Kenney JS, Lee SW, Page RC, Allison AC. Measurement of interleukin-1 α and -1 β in gingival crevicular fluid: Implications for the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res* 1990; 25: 156-163.
9. Stashenko P, Jandinski JJ, Fujiyoshi P, Rynar J, Socransky SS. Tissue levels of bone resorptive cytokines in periodontal disease. *J Periodontol* 1991; 62: 504-509.
10. Tsai C, Ho Y, Chen C. Levels of interleukin-1 β and interleukin-8 in gingival crevicular fluids in adult periodontitis. *J Periodontol* 1995; 66: 852-859.
11. Offenbacher S, Odle BM, Van dyke TF. The use of crevicular fluid prostaglandin E₂ levels as a predictor of periodontal attachment loss. *J Periodontal Res* 1986; 21: 101-112.
12. Noguchi K, Ishikawa I. The role of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E₂ in periodontal disease. *Periodontol 2000* 2007; 43: 85-101.

13. Yucel-Linberg T, Ahola H, Nillson S, Modeer T. Signal transduction pathways involved in the synergistic stimulation of prostaglandin production by interleukin-1 β and tumor necrosis factor in human gingival fibroblasts. *J Dent Res* 1999; 78: 61-68.
14. Ohm K, Albers HK, Lisboa BP. Measurement of eight prostaglandins in human gingival and periodontal disease using high pressure liquid chromatography and radioimmunoassay. *J Perio Res* 1984; 19: 501-511.
15. Nakashima K, Roehrich N, Cimasoni G. Osteocalcin, prostaglandin E2 and alkaline phosphatase in gingival crevicular fluid: their relations to periodontal status. *J clin Periodontal* 1994; 21: 327-333.
16. Sengupta S, Fine J, Wu-Wang CY, Gordon J, Murty VL, Slomiany A, et al. The relationship of prostaglandins to cAMP, IgG, IgM and alpha-2-macroglobulin in gingival crevicular fluid in chronic adult periodontitis. *Arch Oral Biol* 1990; 35: 158-172.
17. Okada H, Murakami S. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998; 9: 248-266.
18. Gabay C. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther.* 2006; 8 Suppl 2: S3.
19. Takahashi K, Takashiba S, Nagai A, Takigawa M, Myoukai F, Kurihara H, Murayama Y. Assessment of interleukin-6 in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol* 1994; 65: 147-153.
20. Geivelis M, Turner DW, Pederson ED, Lamberts BL. Measurements of interleukin-6 in gingival crevicular fluid from adults with destructive periodontal disease. *J Periodontol.* 1993; 64: 980-983.
21. Mogi M, Ootogoto J, Ota N, Inagaki H, Minami M, Kojima K. Interleukin 1b, interleukin 6, b2-microglobulin, and transforming growth factor-a in gingival crevicular fluid from human periodontal. *Arch Oral Biol* 1999; 44: 535-539.
22. Vidal F, Figueredo C, Cordovil I, Fischer R. Periodontal therapy reduces plasma levels of interleukin-6, C-reactive protein, and fibrinogen in patients with severe periodontitis and refractory arterial hypertension. *J Periodontol* 2009; 186-791.
23. Kurihara N, Bertolini D, Suda T, Akiyama Y, Roodman GD. IL-6 stimulates osteoclast-like multinucleated cell formation in long term human marrow cultures by inducing IL-1 release. *J Immunol.* 1990; 144: 4226-4230.

24. Irwin CR, Myrillas TT. The role of IL-6 in the pathogenesis of periodontal disease. *Oral Dis* 1998; 4: 43–47.
25. Ishimi Y, Miyaura C, Jin CH, Akatsu T, Abe E, Nakamura Y, Yamaguchi A, Yoshiki S, Matsuda T, Hirano T. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *J Immunol* 1990; 145: 3297-3303.
26. Mathur A, Michalowicz B, Castillo M, Aeppli D. Interleukin- 1 alpha, interleukin-8 and interferon-alpha levels in gingival crevicular fluid. *J Periodontal Res* 1996; 31: 489-495.
27. Jin LJ, Leung WK, Corbet EF, Soder B. Relationship of changes in interleukin-8 levels and granulocyte elastase activity in gingival crevicular fluid to subgingival periodontopathogens following non-surgical periodontal therapy in subjects with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2002; 29: 604-614.
28. Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A. Characterization of cellular infiltrate, detection of chemokine receptor CCR5 and interleukin-8 and RANTES chemokines in adult periodontitis. *J Periodontal Res* 2001; 36: 194-203.
29. Reddy MS, Geurs NC, Gunsolley JC. Periodontal host modulation with antiproteinase, anti-inflammatory, and bone sparing agents. A systematic review. *Ann Periodontol* 2003; 8: 12-37.
30. Hassell TM .Tissue and cells of the periodontium. *Periodontology* 2000; 1993: 3:9-38.
31. นวรัตน์ วราอัสวปดิ เจริญ. เอกสารคำสอนการตอบสนองของภูมิคุ้มกันในโรคปริทันต์อักเสบ.ขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2546.
32. Steffen J, Holt S, Ebersole L. *Porphyromonas gingivalis* induction of mediator and cytokine secretion by human gingival fibroblasts. *Oral Microbial Immunol* 2000; 15: 172-180.
33. Takashiba, S., Naruishi, K., Murayama, Y. (2003). Perspective of cytokine regulation for periodontal treatment: fibroblast biology. *J Periodontol* 2003; 74: 103-110.
34. Taweechaisupamong S, Leela-aphiradee N, Laoprom P, Khamenkhan P. Effects of Koi (*Streblus asper*) on root canal bacteria. *KDJ* 2000; 3:41-47.
35. Taweechaisupamong S, Singhara S, Choopan T. Antimicrobial effect of *Streblus asper* leaf extract on selected anaerobic bacteria. *J Dent Assoc Thai* 2002; 52: 227-234.
36. อรวรรณ อภินทนาพงศ์. ความปลอดภัยทางคลินิก ผลทางคลินิกและทางจุลชีววิทยาของการใช้เจลผสมสารสกัดจากใบข่อยใส่ลงไปนึ่งร่องลึกปริทันต์ร่วมกับการขูดหินน้ำลายและเกลารากฟันในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรัง [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาปริทันตวิทยา]. ขอนแก่น: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2550.

37. กรรรัตน อินทรหนองไผ่. ผลทางคลินิกและทางจุลชีววิทยาของการใช้สารสกัดจากใบข่อยฉีดล้างในร่อง
 ลึกปริทันต์ร่วมกับการขูดหินน้ำลายและเกลารากฟันในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังในระยะคง
 สภาพ [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาปริทันวิทยา]. ขอนแก่น: บัณฑิตวิทยาลัย
 มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2547.
38. พิษญา สุทินฤกษ์. ผลการด้านการอักเสบและการละลายตัวของกระดูกของสารสกัดจากใบข่อยในเซลล์
 สร้างเส้นใยเนื้อเยื่อกระดูกต่อการกระตุ้นด้วยเชื้อก่อโรคปริทันต์ [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร
 มหาบัณฑิต สาขาปริทันวิทยา]. ขอนแก่น: บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2552.
39. Socransky S, Haffajee A. Microbial mechanisms in the pathogenesis of destructive periodontal
 diseases:a critical assessment. *J Periodontol Res* 1991; 26 (3 Pt 2): 195-212.
40. Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: An introduction. *Periodontol* 2000
 1997; 14: 9-11.
41. Socransky SS, Haffajee AD. Criteria for the infectious agents in dental caries and periodontal disease.
J Clin Periodontol 1979; 6(7): 16-21.
42. O'Brien-Simpson NM, Veith PD , Dashper SG, Reynolds EC. Antigens of bacteria associated with
 periodontitis. *Periodontol* 2000 1997; 35: 101-134.
43. Gmur R, Srub JR, Guggenheim B. Prevalence of *Bacteroides forsythus* and *Bacteroides gingivalis* in
 subgingival plaque of prosthodontically treated patients on short recall. *J periodontal Res* 1989;
 24: 113-120.
44. Mouton C, Hammond PG, Slots J, Genco RJ . Serum antibodies to oral *Bacteroides asaccharolyticus*
 (*Bacteroides gingivalis*): relationship to age and periodontal disease. *Infect Immun* 1981; 31: 182-
 192.
45. Chen PB, Neiders ME, Millar SJ, Reynolds HS, Zambon JJ. Effect of immunization on experimental
Bacteroides gingivalis infection in a murine model. *Infect Immun* 1987; 55: 2534-2537.
46. Al-Shibani N, Windsor LJ. Effect of *Porphyromonas gingivalis* on human gingival fibroblasts from
 healthy and inflamed tissues. *J Periodont Res* 2008; 43: 465-470.
47. Imatani T, Kato K ,Okuda K. Production of inflammatory cytokines by human gingival fibroblasts
 stimulated by cell-surface preparations of *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbial Immunol*
 2001; 16: 65-72.

48. Aroonrerk N, Pichyangkul S, Yongvanitchit K, Wisetchang M, Sa-Ard-Iam N, Sirisinha S, et al. Generation of gingival T cell lines 2 clones specific with *Porphyromonas gingivalis* pulsed dendritic cells from periodontitis patients. *J Periodont Res* 2003; 38: 262-268.
49. Hefti AF . Aspects of cell biology of the normal periodontium. *Periodontology* 2000 1993; 3: 64-75.
50. Takada H, Mihara J, Morisaki I, Hamada S. Induction of interleukin-1 and -6 in human gingival fibroblast cultures stimulated with *Bacteroides* lipopolysaccharides. *Infect Immun* 1991a ;59: 295-301.
51. Tamura M, Tokuda M, Nagaoka S, Takada H. Lipopolysaccharides of *Bacteroides intermedius* (*Prevotella intermedia*) and *Bacteroides* (*Porphyromonas*) *gingivalis* induce interleukin-8 gene expression in human gingival fibroblast cultures. *Infect Immun* 1992; 60: 4932-4937.
52. Miltenburg AMM, J. Vanlaar JM, Dekuiper R, Daha DAHA MR, Breedveld FC. Interleukin -6 activity in paired samples of synovial fluid interleukin-6 level with clinical and laboratory parameters of inflammation. *Br J Rheumatol* 1991; 30: 186-189.
53. Grossman RM, Krueger J et al. Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989; 86: 6367-6371.
54. Roodman GD, Kunhara N, Ohsaki Y, Kukita A, Hosking D, Demulder A, Smith JF, Singer FR. Interleukin-6 a potential autocrine/paracrine factor in Paget's disease of bone. *J. Clin. Invest* 1992; 89: 46-52.
55. Van Oers MHJ, Van den Heyden A. Aarden LA. Interleukin 6 (IL-6) in serum and urine of renal transplant recipients. *Clin. exp. Immunol* 1988; 71: 314-319.
56. Kristo C , Godang K et al. Raised serum levels of interleukin-8 and interleukin-18 in relation to bone metabolism in endogenous Cushing's syndrome. *Eur J of Endocrinol* 2002; 146: 389-395.
57. Apostolakis S, Vogiatzi K, Amanatidou V, Spandidos DA. Interleukin-8 and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 2009; 84: 353–360.
58. Gratz S, Rennen H, Boerman O, Oyen W, Burma P, Corstens F. 99 m Tc-Interleukin-8 for Imaging acute osteomyelitis. *J Nucl Med* 2001; 42: 1257–1264.
59. Tripathy NK, Sinha N, Nityanand S. Interleukin-8 in Takayasu's arteritis: Plasma levels and relationship with disease activity. *Clin Exp Rheumatol* 2004; 22 (Suppl. 36): 27-30.
60. McCoy J, Wicks JR, Audoly L. The role of prostaglandin E2 receptors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest* 2002; 110: 651-658.

61. Robinson DR, Tashjian AH, Levine L, Levine JR. Prostaglandin-stimulated bone resorption by rheumatoid synovia. A possible mechanism for bone destruction in rheumatoid arthritis. *J.Clin. Invest* 1975; 56:1181-1188.
62. Seitz M ,Hunstein W. Enhanced prostanoid release from monocytes of patients with rheumatoid arthritis and active systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 1985; 44: 438-445.
63. Shahed AR, Shoskes D. Correlation of endorphin and prostaglandin E2 in prostatitis . *The J Of Urology* 2001; 166: 1738-1741.
64. Mattsson N, Yaong M et al. Elevated cerebrospinal fluid levels of prostaglandin E2 and 15-(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid in multiple sclerosis. *J Intern Med* 2009; 265: 459–464.
65. Zifroni A, Treves AJ, Sachar DB, Rachmilewitz D.Prostanoid synthesis by cultured intestinal epithelial and mononuclear cells in inflammatory bowel disease. *Gut* 1983; 24: 659-664.
66. เต็ม สมิตินันท์ ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม พ.ศ. 2544. ประชาชน จำกัด; 2544.
67. บัญญัติ สุขศรีงาม. สมุนไพรเพื่อสุขภาพดีถ้วนหน้าก่อนปี 2543. ไกล่หมอ 2540; 70-72.
68. วุฒิ วุฒิธรรมเวช. เกษตรกรรมไทย. กรุงเทพฯ: โอ เอส พรีนติ้งเฮาส์; 2540.
69. อัญชนา ลุนพรม. การพัฒนาตำรับเจลผสมสารสกัดจากใบข่อยเพื่อใช้ร่วมกับการรักษาโรคปริทันต์อักเสบและการทดสอบความปลอดภัยทางคลินิก [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาปริทันวิทยา]. ขอนแก่น: บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2548.
70. 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; 3(2): 217-222.
71. เทิดพงษ์ ตรีรัตน์และบุญนิตย์ ทวีบุรณ์. การทดลองประสิทธิภาพส่วนสกัดของข่อยต่อเชื้อสแตฟโตคอคคัส มีวแทนส์และเชื้อสเตรปโตคอคคัส ซาโลวาเรียส.ว.ทันต 2530; 37(37(3): 119-124.
72. Limsong J, Benjavongkulchai J. Inhibitory effect of some herbal extracts on adherence of *Streptococcus mutans*. *J Ethnopharmacol* 2004; 92(2-3): 281-289.
73. 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; 96(1-2): 221-226.
74. Taweechaisupapong S, Klanrit P, Pitipat W, Singhara S, Wongkham S. Inhibitory effect of *Streblus asper* leaf-extract on adhesion of *Candida albicans* to denture acrylic. *J Ethnopharmacol* 2006; 106(3): 414-417.

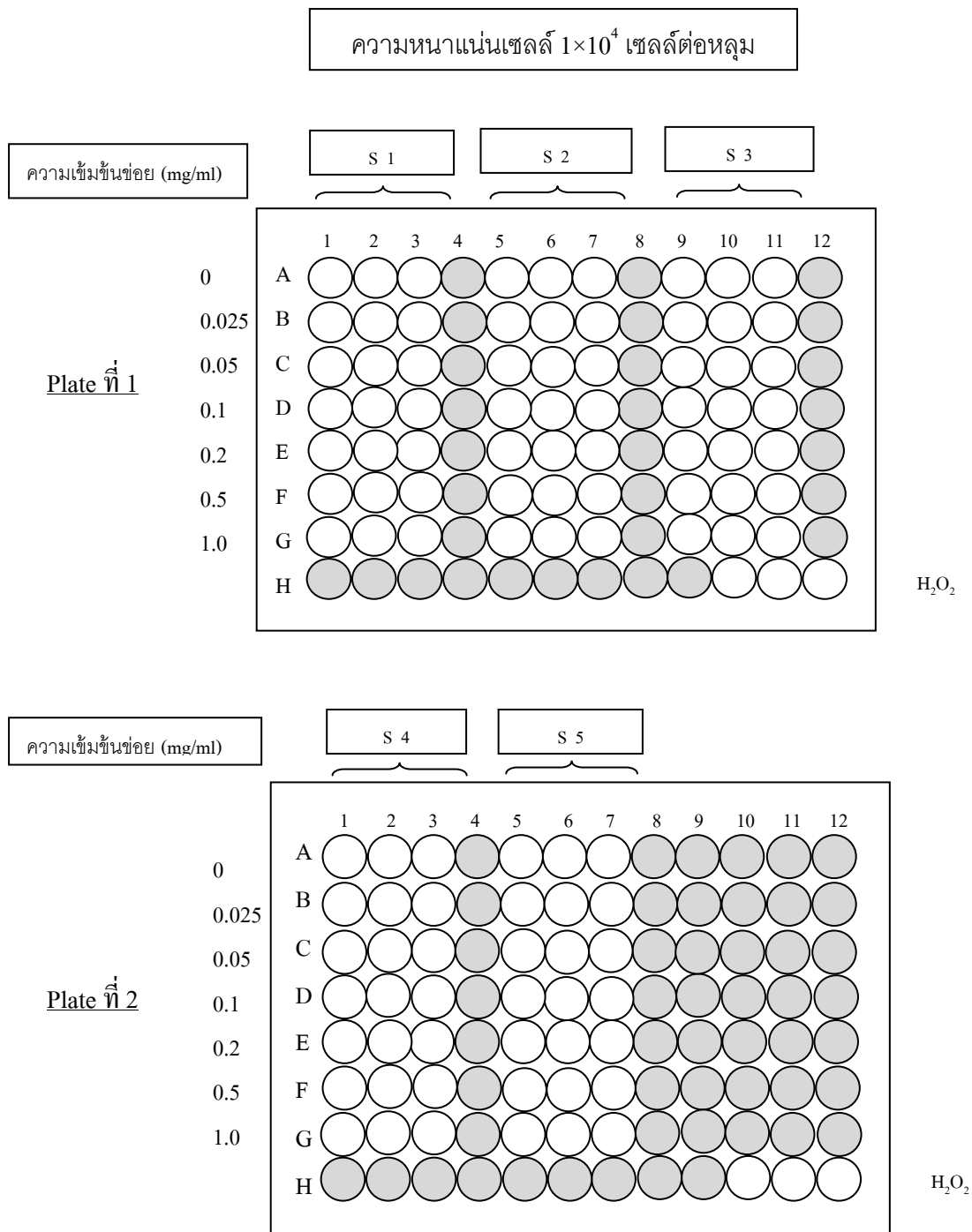
75. Taweechaisupapong S, Wongkham S, Rattanathongkom A, Singhara S, Choopan T, Suparee S. Effect of mouth rinse containing *Streblus asper* leaf extract on gingivitis and plaque formation. *J Dent Assoc Thai* 2002; 52: 383-391.
76. สมเกียรติ เหลืองไพรินทร์, สุรัตน์ ลิณะศิริมานะกุล. ผลของยาสีฟันผสมสารสกัดจากใบข่อยต่อการยับยั้งเชื้อสแตฟโดคอคัส มีวแทนส์ ในน้ำลาย [รายงานการวิจัยระดับปริญญา ภาควิชาชีววิทยาช่องปาก]. ขอนแก่น: คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2534.
77. Hormdee D, Nagasawa T, Kiji M, Yashiro R, Kobayashi H, Koshy G, Noguchi K, Nitta H, Ishikawa I. Protein kinase-A-dependent osteoprotegerin production on interleukin-1 stimulation in human gingival fibroblasts is distinct from periodontal ligament fibroblasts. *Clin Exp Immunol* 2005; 142: 490-497.
78. ณรงค์ศักดิ์ เหล่าศรีสิน, ศรีนทิพย์ อังสุโกไคย, สิริลักษณ์ ธีรธนากุล (2552). การแสดงออกของพาร์-2 ในเซลล์เอ็น อีคปริทันต์ของมนุษย์เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อก่อโรคปริทันต์.ว ปริทันต 2552; 1: 20-36.
79. Taweechaisupapong S, Wongkham S, Chareonsuk S, Suparee S, Srilalai P, Chaiyarak S. Selective activity of *Streblus asper* on *Mutans streptococci*. *J Ethnopharmacol* 2000; 70: 73-79.
80. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
81. Sripanidkulchaia B, Junlatata J, Wara-aswapati N, Hormdee D. Anti-inflammatory effect of *Streblus asper* leaf extract in rats and its modulation on inflammation-associated genes expression in RAW264.7 macrophage cells. *J Ethnopharmacol* 2009; 124: 566-570.
82. Birkedal-Hansen H. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *J Periodontal Res* 1993; 28: 500-510.
83. Genco R. Host responses in periodontal disease: current concepts. *J Periodontol* 1992; 63(Suppl.): 338-355.
84. Van Dyke TE, Lester MA, Shapira L. The role of host response in periodontal disease progression: implications of future treatment strategies. *J Periodontol* 1993; 64(8 Suppl.): 792-806.
85. Grave DT, Delima AJ, Assuma R, Amar S, Oates T, Cochran D. Interleukin -1 and tumor necrosis factor antagonists inhibit the progression of inflammatory cell infiltration toward alveolar bone in experimental periodontitis. *J Periodontol* 1998; 69: 1419-1425.
86. Howell TH, William RC. Nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of periodontal disease progression. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993; 4: 177-196.

87. Bezerra M, de Lima V, Alencar V, Viera I, Brito G, Ribeiro R, et al . Selective Cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol* 2000; 71: 9-14.
88. Chayasadam A. Toll-like receptors gene expression in periodontal disease [Ph.D Thesis in oral Biology]. Bangkok: The Graduate School, Mahidol university; 2008
89. Tabeta K, Yamazaki K, Akashi S, Miyake K, Kumada H, Umetoto T, et al .Toll-like receptors confer responsiveness to lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* in human gingival fibroblasts. *Infect Immun* 2000; 68: 3731-3735.
90. Harada A, Sekido N, Akahoshi T, Wada T, Mukaida N, Matsushima K. Essential involvement of Interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *J. Leukoc Bio* 1994; 56: 559-564.
91. Feghali C, Wright T. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Frontiers in Bioscience* 1997; 1: 12-26.
92. Amid M, Zaidul I.S, Yazid A.M. Heat-treatment aqueous two phase system for purification of serine protease from Kesinai (*Streblus asper*) leaves. *Molecules* 2011; 16: 10202-10213.
93. Idris, Y. MA., Sipat, A.B., Shuhaimi, M., Yazid, A.M. Inhibition of enzymatic browning during the extraction of milk coagulating protease from *Streblus asper* (Kesinai). *Pak J Biol Sci* 1999; 2: 378-381.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

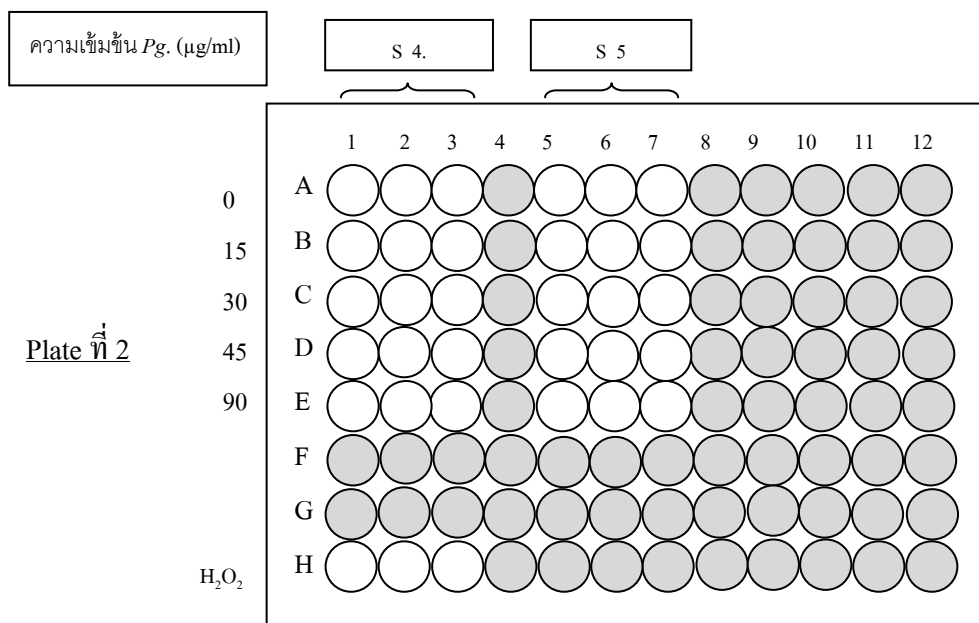
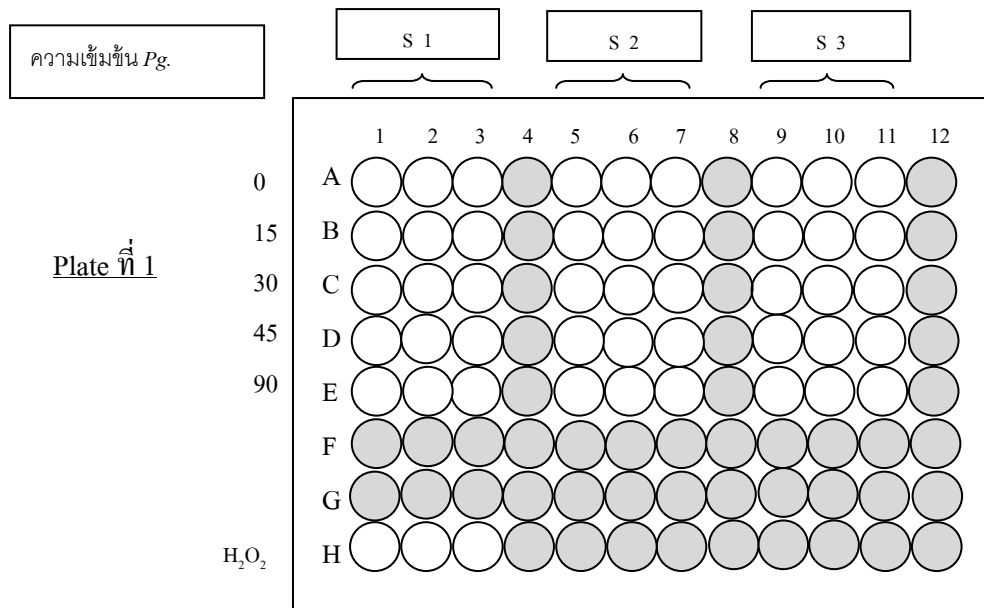
แสดงแผนผังการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากใบข่อยต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกของมนุษย์



- แสดงการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากใบข่อยต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกของมนุษย์
- S1-S5 แสดงเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกจากอาสาสมัคร รายที่ 1-5 โดยแต่ละตัวอย่างตรวจซ้ำ 3 ครั้ง
 - ○ แสดงหลุมทดสอบที่มีการใช้ทดสอบ
 - ● แสดงหลุมทดสอบที่ไม่ได้ใช้ทดสอบ

ภาคผนวก ข

แสดงแผนผังการทดสอบความเป็นพิษของชิ้นส่วนสกัดเซลล์เตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมนัส จิงจิवालิส
ต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกของมนุษย์

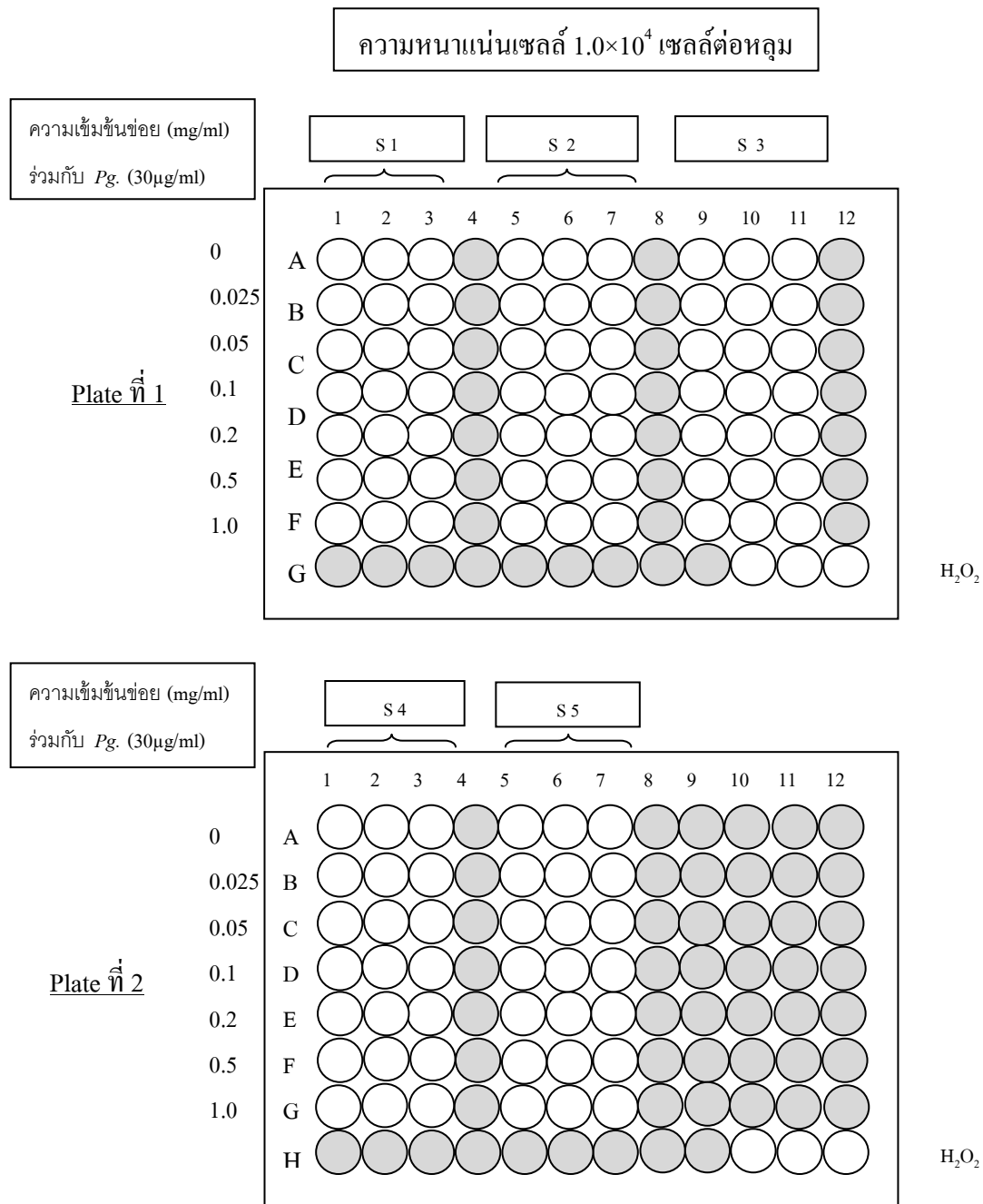


แสดงการทดสอบความเป็นพิษของชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อฟอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส ต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหืองของมนุษย์

- S1-S5 แสดงเซลล์สร้างเส้นใยเหืองจากอาสาสมัคร รายที่ 1-5 โดยแต่ละตัวอย่างตรวจซ้ำ 3 ครั้ง
- ○ แสดงหลุมทดสอบที่มีการใช้ทดสอบ
- ● แสดงหลุมทดสอบที่ไม่ได้ใช้ทดสอบ

ภาคผนวก ค

แสดงแผนผังการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากใบช่อยร่วมกับชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตก
ของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส ต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกของมนุษย์



แสดงการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากใบข่อยร่วมกับชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อฟอร์
ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส

- S1-S5 แสดงเซลล์สร้างเส้นใยเหืองจากอาสาสมัคร รายที่ 1-5 โดยแต่ละตัวอย่างตรวจซ้ำ 3 ครั้ง
- ○ แสดงหลุมทดสอบที่มีการใช้ทดสอบ
- ● แสดงหลุมทดสอบที่ไม่ได้ใช้ทดสอบ

ภาคผนวก ง

การกระตุ้นเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกด้วยชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส
และสารสกัดจากใบข่อย

	1	2	3	4	5	6
A	1.1	1.2	1.3	2.1	2.2	2.3
B	3.1	3.2	3.3	4.1	4.2	4.3
C	5.1	5.2	5.3	6.1	6.2	6.3
D	7.1	7.2	7.3	8.1	8.2	8.3

แสดงการกระตุ้นเซลล์สร้างเส้นใยเหนือกด้วยชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวา
 ลิส และสารสกัดจากใบข่อยโดยแบ่งกลุ่มทดสอบเป็น 8 กลุ่ม

กลุ่ม 1. HGFs แฉว A1-A3

กลุ่ม 2. HGFs +Pg. (30 µg/ml) แฉว A4-A6

กลุ่ม 3. HGFs + ข่อย 0.1 mg/ml แฉว B1-B3

กลุ่ม 4 HGFs +Pg. (30 µg/ml) + ข่อย 0.1 mg/ml แฉว B4-B6

กลุ่ม 5. HGFs + ข่อย 0.05 mg/ml แฉว C1-C6

กลุ่ม 6. HGFs +Pg. (30 µg/ml) + ข่อย 0.05 mg/ml แฉว C4-C6

กลุ่ม 7. HGFs + ข่อย 0.025 mg/ml แฉว D1-D3

กลุ่ม 8. HGFs +Pg. (30 µg/ml) + ข่อย 0.025 mg/ml แฉว D4-D6

ภาคผนวก จ

แผนผังการตรวจสำหรับ อินเตอร์ลิวคิน-6 และอินเตอร์ลิวคิน-8 ด้วยวิธีอไลซ่า

Plate ที่ 1

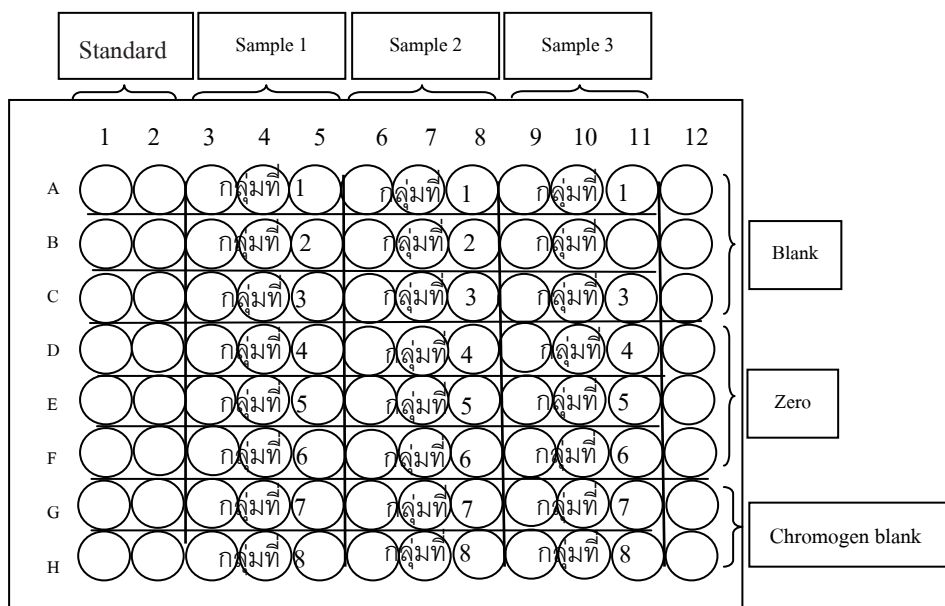
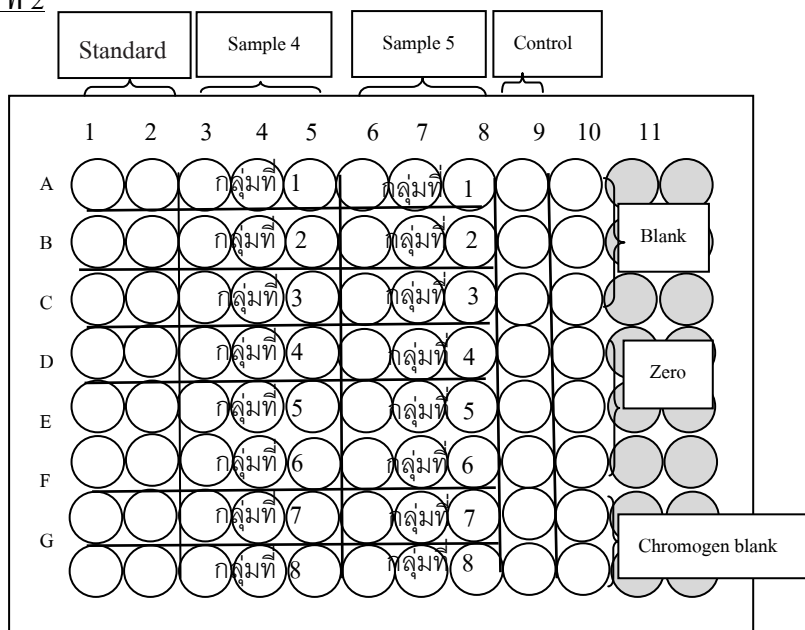


Plate ที่ 2



แสดงการตรวจสำหรับ อินเตอร์ลิวคิน-6 และอินเตอร์ลิวคิน-8 ด้วยวิธีอิลูซ่า

- Sample 1-5 แสดงเซลล์สร้างเส้นใยเหือกจากอาสาสมัครรายที่ 1-5 โดยแต่ละตัวอย่างตรวจซ้ำ 3 ครั้งโดยแบ่งกลุ่มทดสอบเป็น 8 กลุ่มดังนี้

Plate ที่ 1Sample ที่ 1

- | | |
|--|--|
| กลุ่ม 1. HGFs แฉว A3-A5 | กลุ่ม 2. HGFs +Pg. (30 µg/ml) แฉว B3-B5 |
| กลุ่ม 3. HGFs + ไข่ย 0.1 mg/ml แฉว C3-B5 | กลุ่ม 4 HGFs +Pg. (30 µg/ml) + ไข่ย 0.1 mg/ml แฉว D3-D5 |
| กลุ่ม 5. HGFs + ไข่ย 0.05 mg/ml แฉว E3-E5 | กลุ่ม 6. HGFs +Pg. (30 µg/ml) + ไข่ย 0.05 mg/ml แฉว F3-F5 |
| กลุ่ม 7. HGFs + ไข่ย 0.025 mg/ml แฉว G3-G5 | กลุ่ม 8. HGFs +Pg. (30 µg/ml) + ไข่ย 0.025 mg/ml แฉว H3-H5 |

Sample ที่ 2

- | | |
|--|--|
| กลุ่ม 1. HGFs แฉว A6-A8 | กลุ่ม 2. HGFs +Pg. (30 µg/ml) แฉว B6-B8 |
| กลุ่ม 3. HGFs + ไข่ย 0.1 mg/ml แฉว C6-C8 | กลุ่ม 4 HGFs +Pg. (30 µg/ml) + ไข่ย 0.1 mg/ml แฉว D6-D8 |
| กลุ่ม 5. HGFs + ไข่ย 0.05 mg/ml แฉว E6-E8 | กลุ่ม 6. HGFs +Pg. (30 µg/ml) + ไข่ย 0.05 mg/ml แฉว F6-F8 |
| กลุ่ม 7. HGFs + ไข่ย 0.025 mg/ml แฉว G6-G8 | กลุ่ม 8. HGFs +Pg. (30 µg/ml) + ไข่ย 0.025 mg/ml แฉว H6-H8 |

Sample ที่ 3

- | | |
|---|---|
| กลุ่ม 1. HGFs แฉว A9-A11 | กลุ่ม 2. HGFs +Pg. (30 µg/ml) แฉว B9-B11 |
| กลุ่ม 3. HGFs + ไข่ย 0.1 mg/ml แฉว C9-C11 | กลุ่ม 4. HGFs +Pg. (30 µg/ml) + ไข่ย 0.1 mg/ml แฉว D9-D11 |
| กลุ่ม 5. HGFs + ไข่ย 0.05 mg/ml แฉว E9-E11 | กลุ่ม 6. HGFs +Pg. (30 µg/ml) + ไข่ย 0.05 mg/ml แฉว F9-F11 |
| กลุ่ม 7. HGFs + ไข่ย 0.025 mg/ml แฉว G9-G11 | กลุ่ม 8. HGFs +Pg. (30 µg/ml) + ไข่ย 0.025 mg/ml แฉว H9-H11 |

- กลุ่ม Standard แฉว 1 แลละ แฉว 2 (A-H)
- กลุ่ม Blank แฉว 12 (A-H)

Plate ที่ 2Sample ที่ 4

- | | |
|--|--|
| กลุ่ม 1. HGFs แฉว A3-A5 | กลุ่ม 2. HGFs +Pg. (30 µg/ml) แฉว B3-B5 |
| กลุ่ม 3. HGFs + ไข่ย 0.1 mg/ml แฉว C3-B5 | กลุ่ม 4. HGFs +Pg. (30 µg/ml) + ไข่ย 0.1 mg/ml แฉว D3-D5 |
| กลุ่ม 5. HGFs + ไข่ย 0.05 mg/ml แฉว E3-E5 | กลุ่ม 6. HGFs +Pg. (30 µg/ml) + ไข่ย 0.05 mg/ml แฉว F3-F5 |
| กลุ่ม 7. HGFs + ไข่ย 0.025 mg/ml แฉว G3-G5 | กลุ่ม 8. HGFs +Pg. (30 µg/ml) + ไข่ย 0.025 mg/ml แฉว H3-H5 |

Sample ที่ 5

- | | |
|--|--|
| กลุ่ม 1. HGFs แฉว A6-A8 | กลุ่ม 2. HGFs +Pg. (30 µg/ml) แฉว B6-B8 |
| กลุ่ม 3. HGFs + ไข่ย 0.1 mg/ml แฉว C6-C8 | กลุ่ม 4. HGFs +Pg. (30 µg/ml) + ไข่ย 0.1 mg/ml แฉว D6-D8 |
| กลุ่ม 5. HGFs + ไข่ย 0.05 mg/ml แฉว E6-E8 | กลุ่ม 6. HGFs +Pg. (30 µg/ml) + ไข่ย 0.05 mg/ml แฉว F6-F8 |
| กลุ่ม 7. HGFs + ไข่ย 0.025 mg/ml แฉว G6-G8 | กลุ่ม 8. HGFs +Pg. (30 µg/ml) + ไข่ย 0.025 mg/ml แฉว H6-H8 |

- กลุ่ม Standard แฉว 1 แลละ แฉว 2 (A-H)
- กลุ่ม Blank แฉว 10 (A-H)

ภาคผนวก จ

แผนผังการตรวจสำหรับโพรตาเกลนดิน อี 2 ด้วยวิธีอีไลซ่า

Plate ที่ 1

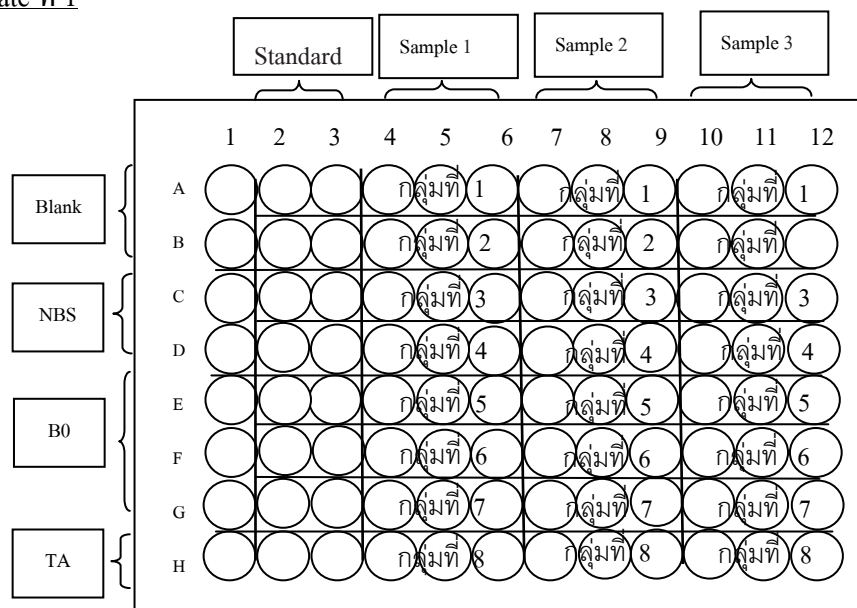
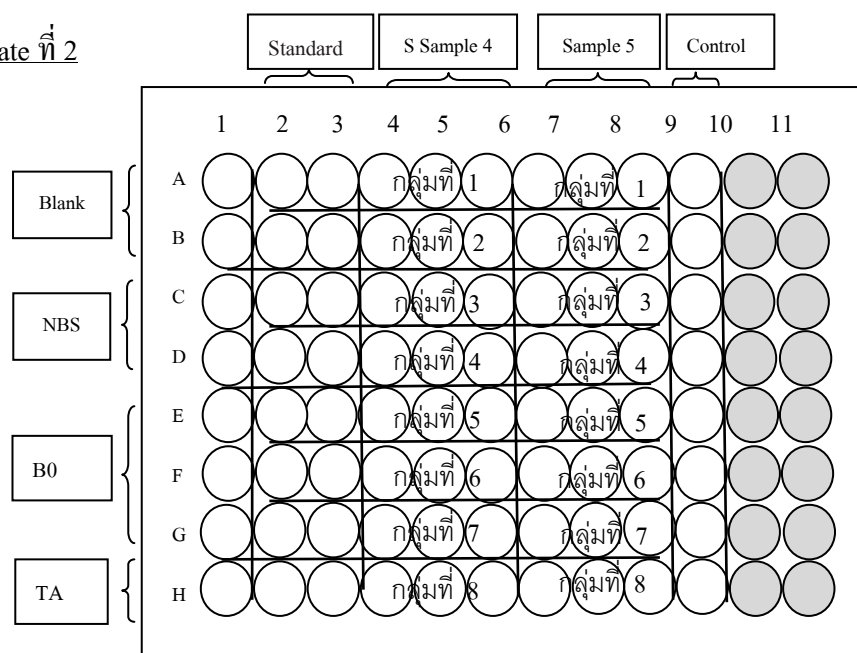


Plate ที่ 2



รูปที่ 13 แสดงการตรวจสำหรับ โปรตีนกลั่นชนิด อี 2 ด้วยวิธีอิลิซา

Subject 1-5 แสดงเซลล์สร้างเส้นใยเหืองจากอาสาสมัครรายที่ 1-5 โดยแต่ละตัวอย่างตรวจซ้ำ 3 ครั้ง

- NBS = non specific binding
- B0 = maximum binding
- TA = total activity

โดยแบ่งกลุ่มทดสอบเป็น 8 กลุ่มดังนี้

Plate ที่ 1

Sample ที่ 1

กลุ่ม 1. HGFs แถว A4-A6

กลุ่ม 3. HGFs + ไข่ขาว 0.1 mg/ml แถว B1-B3

กลุ่ม 5. HGFs + ไข่ขาว 0.05 mg/ml แถว C1-C6

กลุ่ม 7. HGFs + ไข่ขาว 0.025 mg/ml แถว D1-D3

กลุ่ม 2. HGFs +Pg. (30 µg/ml) แถว A4-A6

กลุ่ม 4 HGFs +Pg. (30 µg/ml) + ไข่ขาว 0.1 mg/ml แถว B4-B6

กลุ่ม 6. HGFs +Pg. (30 µg/ml) + ไข่ขาว 0.05 mg/ml แถว C4-C6

กลุ่ม 8. HGFs +Pg. (30 µg/ml) + ไข่ขาว 0.025 mg/ml แถว D4-D6

Sample ที่ 2

กลุ่ม 1. HGFs แถว A7-A9

กลุ่ม 3. HGFs + ไข่ขาว 0.1 mg/ml แถว B1-B3

กลุ่ม 5. HGFs + ไข่ขาว 0.05 mg/ml แถว C1-C6

กลุ่ม 7. HGFs + ไข่ขาว 0.025 mg/ml แถว D1-D3

กลุ่ม 2. HGFs +Pg. (30 µg/ml) แถว A4-A6

กลุ่ม 4 HGFs +Pg. (30 µg/ml) + ไข่ขาว 0.1 mg/ml แถว B4-B6

กลุ่ม 6. HGFs +Pg. (30 µg/ml) + ไข่ขาว 0.05 mg/ml แถว C4-C6

กลุ่ม 8. HGFs +Pg. (30 µg/ml) + ไข่ขาว 0.025 mg/ml แถว D4-D6

Sample ที่ 3

กลุ่ม 1. HGFs แถว A1-A3

กลุ่ม 3. HGFs + ไข่ขาว 0.1 mg/ml แถว B1-B3

กลุ่ม 5. HGFs + ไข่ขาว 0.05 mg/ml แถว C1-C6

กลุ่ม 7. HGFs + ไข่ขาว 0.025 mg/ml แถว D1-D3

กลุ่ม 2. HGFs +Pg. (30 µg/ml) แถว A4-A6

กลุ่ม 4 HGFs +Pg. (30 µg/ml) + ไข่ขาว 0.1 mg/ml แถว B4-B6

กลุ่ม 6. HGFs +Pg. (30 µg/ml) + ไข่ขาว 0.05 mg/ml แถว C4-C6

กลุ่ม 8. HGFs +Pg. (30 µg/ml) + ไข่ขาว 0.025 mg/ml แถว D4-D6

- กลุ่ม Standard แถว 3 และ แถว 3 (A-H)

- กลุ่ม Blank แถว 1 (A-B) , NBS แถว 1 (C-D) ,B0 แถว 1 (E-G) , TA แถว 1 H

Plate ที่ 2

Sample ที่ 4

กลุ่ม 1. HGFs แถว A10-A12

กลุ่ม 3. HGFs + ไข่ขาว 0.1 mg/ml แถว B1-B3

กลุ่ม 5. HGFs + ไข่ขาว 0.05 mg/ml แถว C1-C6

กลุ่ม 7. HGFs + ไข่ขาว 0.025 mg/ml แถว D1-D3

กลุ่ม 2. HGFs +Pg. (30 µg/ml) แถว A4-A6

กลุ่ม 4 HGFs +Pg. (30 µg/ml) + ไข่ขาว 0.1 mg/ml แถว B4-B6

กลุ่ม 6. HGFs +Pg. (30 µg/ml) + ไข่ขาว 0.05 mg/ml แถว C4-C6

กลุ่ม 8. HGFs +Pg. (30 µg/ml) + ไข่ขาว 0.025 mg/ml แถว D4-D6

Sample ที่ 5

กลุ่ม 1. HGFs แถว A1-A3

กลุ่ม 3. HGFs + ไข่ขาว 0.1 mg/ml แถว B1-B3

กลุ่ม 5. HGFs + ไข่ขาว 0.05 mg/ml แถว C1-C6

กลุ่ม 7. HGFs + ไข่ขาว 0.025 mg/ml แถว D1-D3

กลุ่ม 2. HGFs +Pg. (30 µg/ml) แถว A4-A6

กลุ่ม 4 HGFs +Pg. (30 µg/ml) + ไข่ขาว 0.1 mg/ml แถว B4-B6

กลุ่ม 6. HGFs +Pg. (30 µg/ml) + ไข่ขาว 0.05 mg/ml แถว C4-C6

กลุ่ม 8. HGFs +Pg. (30 µg/ml) + ไข่ขาว 0.025 mg/ml แถว D4-D6

- กลุ่ม Standard แถว 3 และ แถว 3 (A-H)

- กลุ่ม Blank แถว 1 (A-B) , NBS แถว 1 (C-D) ,B0 แถว 1 (E-G) , TA แถว 1 H

ภาคผนวก ข

หนังสือรับรองจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์



มหาวิทยาลัยขอนแก่น
หนังสือฉบับนี้ให้ไว้เพื่อแสดงว่า

โครงการวิจัยเรื่อง: ผลของสารสกัดจากใบข่อยต่อการตอบสนองของการอักเสบ โดยเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก
ของมนุษย์ ที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อพอร์ไฟโร โมแนส จิงจิวาไลส
Effect of *Streblus asper* leaf extract on the inflammatory responses in *Porphyromonas*
gingivalis – stimulated human gingival fibroblasts

ผู้วิจัย: 1. ทันตแพทย์หญิงวสุรี รุ่งพลกล้า
คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
2. รองศาสตราจารย์ ดร. สุวิมล ทวีชัยคุภพงษ์
คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
3. ทันตแพทย์หญิงจุติพร พนมบัวเลิศ
คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
4. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. คุณวุฒิ หอมดี
คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สำหรับเอกสาร:

1. แบบเสนอเพื่อขอรับการพิจารณาด้านจริยธรรมของการวิจัยในมนุษย์ เวอร์ชัน 1.1 ฉบับวันที่ 30 กันยายน พ.ศ. 2554
2. โครงการวิจัยฉบับสมบูรณ์ ฉบับภาษาไทย เวอร์ชัน 1.1 ฉบับวันที่ 30 กันยายน พ.ศ. 2554
3. แบบคำชี้แจงอาสาสมัคร ฉบับภาษาไทย เวอร์ชัน 1.1 ฉบับวันที่ 30 กันยายน พ.ศ. 2554
4. แบบยินยอมอาสาสมัคร ฉบับภาษาไทย เวอร์ชัน 1.1 ฉบับวันที่ 30 กันยายน พ.ศ. 2554
5. แบบบันทึกข้อมูล เวอร์ชัน 1.0 ฉบับวันที่ 5 สิงหาคม พ.ศ. 2554
6. ประวัติผู้วิจัย

ลำดับที่ : 4.2.02: 23/2554

เลขที่ : HE542171

วันหมดอายุ : 4 กันยายน พ.ศ. 2555

คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Institutional Review Board Number; IRB00001189

สำนักงาน: อาคารสมเด็จพระศรีนครินทราบรมราชชนนี อนุตต 1 (ชั้น 17)

Federal Wide Assurance; FWA00003418

โทร. (043) 366616, (043) 366617 โทรสาร (043) 366617

ได้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยยึดหลักเกณฑ์
ตามคำประกาศเฮลซิงกิ (Declaration of Helsinki) และแนวทางการปฏิบัติการวิจัยทางคลินิกที่ดี (ICH GCP)
โดยขอให้รายงานความก้าวหน้าของโครงการวิจัยทุก 12 เดือน

ให้ไว้ ณ วันที่ 11 ตุลาคม พ.ศ. 2554



(นายแพทย์เกรียงศักดิ์ เวทีวุฒาจารย์)

ประธานคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ลำดับที่ : 4.2.02: 23/2554

เลขที่ : HE542171

วันหมดอายุ : 4 กันยายน พ.ศ. 2555

คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Institutional Review Board Number; IRB00001189

สำนักงาน: อาคารสมเด็จพระศรีนครินทราบรมราชชนนี อุสุวณ 1 (ชั้น 17)

Federal Wide Assurance; FWA00003418

โทร. (043) 366616, (043) 366617 โทรสาร (043) 366617

ภาคผนวก ข

เอกสารคำชี้แจงสำหรับอาสาสมัครและแบบยินยอมอาสาสมัคร

เอกสารคำชี้แจงสำหรับอาสาสมัคร

ชื่อโครงการวิจัย

“ผลของสารสกัดจากใบข่อยต่อการตอบสนองการอักเสบโดยเซลล์สร้างเส้นใยเหนือกของมนุษย์ ที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อฟอร์โฟโรโมแนส จิงจิवालิส”

หัวหน้าโครงการวิจัย

ทพญ.วสุรี จุมพลหล้า ภาควิชาปริทันตวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

หัวหน้าโครงการวิจัยร่วม

ผศ.ทพญ.ดร.คุณฤ หอมดี ภาควิชาปริทันตวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

รศ.ทพญ.ดร.สุวิมล ทวีชัยสุภพงษ์ ภาควิชาวินิจฉัยช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

อ.ทพญ. จุติพร พนมบัวเลิศ ภาควิชาปริทันตวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

โรคปริทันต์อักเสบเกิดจากปัจจัยสำคัญคือเชื้อก่อโรคปริทันต์และการตอบสนองของภูมิคุ้มกันของร่างกาย ซึ่งจะผลิตสารอักเสบชนิดต่างๆตอบสนองต่อการเกิดโรคและเป็นผลให้มีการทำลายอวัยวะปริทันต์ตามมา ดังนั้นหากสามารถยับยั้งหรือลดการสร้างสารอักเสบจะสามารถลดหรือยับยั้งการทำลายของอวัยวะปริทันต์ได้ โครงการวิจัยนี้จะศึกษาฤทธิ์ในการต้านการอักเสบจากสารสกัดจากใบข่อยในเซลล์สร้างเส้นใยเหนือก ที่ได้รับการกระตุ้นจากเชื้อก่อโรคปริทันต์ซึ่งผลจากการศึกษานี้จะสามารถประยุกต์ใช้เป็นแนวทางในการคิดค้นหาวิธีการรักษาโรคปริทันต์อักเสบ ร่วมกับการใช้สมุนไพรไทยในทางคลินิกต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อจะศึกษาฤทธิ์ในการต้านการอักเสบจากสารสกัดจากใบข่อยในเซลล์สร้างเส้นใยเหนือก ที่ได้รับการกระตุ้นจากเชื้อ

ฟอร์โฟโรโมแนส จิงจิवालิส

การเข้าร่วมโครงการวิจัย

การเข้าร่วมในโครงการนี้เป็นไปด้วยความสมัครใจและไม่เสียค่าใช้จ่ายแต่อย่างใด หากไม่ยินดีเข้าร่วมจะไม่มีผลกระทบใดๆทั้งในปัจจุบันและอนาคตในด้านการได้รับบริการจากสถานบริการใดๆทั้งสิ้น

ขั้นตอนการปฏิบัติตัวหากท่านเข้าร่วมโครงการวิจัย

เมื่อท่านตัดสินใจเข้าร่วมการวิจัยและเซ็นชื่อเป็นหลักฐานในแบบยินยอมอาสาสมัครแล้ว ท่านจะได้รับการซักประวัติเกี่ยวกับประวัติทางการแพทย์ ประวัติการใช้ยา และได้รับการตรวจช่องปากและประเมินสภาพช่องปากก่อนเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อปริทันต์ ขนาด 10 มม.×2 มม.×2 มม. ในระหว่างที่มีการผ่าตัดเหงือกเพื่อเพิ่มความยาวตัวฟันซึ่งเหมือนการเข้ารับการรักษาดมปกติคือการเก็บส่วนเนื้อเยื่อเหงือกที่ได้รับการตัดทิ้งจากขั้นตอนการผ่าตัดศัลยกรรมปริทันต์ เพื่อเพิ่มความยาวของตัวฟัน ซึ่งต้องทำการตัดส่วนเนื้อเยื่อเหงือกของผู้ป่วยออกอยู่แล้ว ขั้นตอนการทำจะทำภายใต้ยาชาเฉพาะที่ขนาดเหมาะสมตามปกติซึ่งจะไม่ก่อให้เกิดความเจ็บปวดหรืออันตรายเพิ่มขึ้นต่อผู้ป่วย รวมทั้งขนาดเนื้อเยื่อที่ได้มาเป็นขนาดปกติที่ต้องได้รับการตัดทิ้งจากขั้นตอนการผ่าตัดตามที่วางแผนการรักษาไว้ และไม่มีมีการขอเก็บชิ้นเนื้อเยื่อเพิ่มความเสี่ยงและ/หรือความไม่สบายที่อาจเกิดขึ้น

เป็นการเก็บส่วนเนื้อเยื่อเหงือกที่ได้รับการตัดทิ้งจากขั้นตอนการผ่าตัดศัลยกรรมปริทันต์เพื่อเพิ่มความยาวของตัวฟัน ขั้นตอนการทำจะทำภายใต้ยาชาเฉพาะที่ขนาดเหมาะสมตามปกติรวมทั้งขนาดเนื้อเยื่อที่ได้มาเป็นขนาดปกติที่ต้องได้รับการตัดทิ้งจากขั้นตอนการผ่าตัด ดังนั้นจะไม่ก่อให้เกิดความเจ็บปวดหรืออันตรายต่อผู้ป่วยเพิ่มขึ้นแต่อย่างใด

ประโยชน์ที่อาสาสมัครจะได้รับ

ชั้นเนื้อเยื่อเหงือกที่ได้รับการตัดทิ้งในขั้นตอนการผ่าตัดศัลยกรรมปริทันต์เพื่อเพิ่มความยาวของตัวฟันจะถูกนำไปเพาะเลี้ยงเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกเพื่อนำไปทดสอบศึกษาฤทธิ์ในการด้านการอักเสบจากสารสกัดจากใบข่อยในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก ที่ได้รับการกระตุ้นจากเชื้อก่อโรคปริทันต์ ซึ่งความรู้ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นแนวทางสำหรับคิดค้นวิธีการป้องกันและรักษาโรคปริทันต์อักเสบจากสารสกัดใบข่อย

การรักษาความลับ

ข้อมูลทั้งหมดที่ได้จากการตรวจวินิจฉัยสภาวะปริทันต์ และตัวอย่างเนื้อเยื่อปริทันต์ รวมทั้งข้อมูลต่างๆ เกี่ยวกับตัวท่านจะถูกเก็บเป็นความลับและจะไม่ปรากฏชื่อท่านในสิ่งพิมพ์หรือการเผยแพร่ใดๆ

ชื่อ/ที่อยู่/โทรศัพท์ของผู้รับผิดชอบโครงการวิจัยที่ติดต่อได้สะดวก

ทพญ.วยุรี จุมพลหล้า ภาควิชาปริทันตวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จังหวัดขอนแก่น รหัสไปรษณีย์ 40002 โทรศัพท์ 043-20-2405 โทรศัพท์มือถือ 080-0083322 โทรสาร 043-202862
Email mywayuree@yahoo.co.th

แหล่งให้ข้อมูลหากมีข้อสงสัยเกี่ยวกับสิทธิของอาสาสมัคร

สำนักงานคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ชั้น 17 อาคารสมเด็จพระศรีนครินทราบรมราชชนนี คณะแพทยศาสตร์ โทรศัพท์ 0-4336-6616-7 เบอร์ภายใน 66616, 66617 โทรสาร 0-4336-6617

แบบยินยอมอาสาสมัคร

ข้าพเจ้า (นาย/นางสาว).....นามสกุล.....อายุ.....ปี.....เดือน
 อยู่บ้านเลขที่.....หมู่ที่.....ซอย.....ถนน.....
 แขวง/ตำบล.....เขต/อำเภอ.....จังหวัด.....
 รหัสไปรษณีย์.....บัตรประชาชนเลขที่.....

ได้รับฟังคำอธิบายด้วยวาจาจาก นางสาว ปณิดา ชันระเกษ และ ได้รับเอกสารคำชี้แจงเกี่ยวกับการเป็นอาสาสมัครใน
 โครงการวิจัยเรื่อง “ผลของสารสกัดจากใบข่อยต่อการตอบสนองการอักเสบ โดยเซลล์สร้างเส้นใยเหนียวของมนุษย์ ที่ถูก
 กระตุ้นด้วยเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวัลิส” และได้รับทราบถึงรายละเอียดของโครงการวิจัยเกี่ยวกับ

- วัตถุประสงค์และระยะเวลาที่ทำการวิจัย
- ขั้นตอนและวิธีการปฏิบัติตัวที่ข้าพเจ้าต้องปฏิบัติ
- ผลประโยชน์ที่ข้าพเจ้าจะได้รับ รวมทั้งผลประโยชน์ที่เกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด
- ผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นจากการเข้าร่วมโครงการ

- การที่ข้าพเจ้าสามารถถอนตัวจากการศึกษานี้เมื่อใดก็ได้ถ้าข้าพเจ้าปรารถนา โดยไม่เสียสิทธิ์ใดๆ ในการรับการ
 รักษาพยาบาลที่จะเกิดขึ้นตามมาในโอกาสต่อไปทั้งในปัจจุบันและอนาคต ณ สถานพยาบาลแห่งนี้หรือสถานพยาบาลอื่น
 และหากเกิดมีอาการข้างเคียงขึ้น ข้าพเจ้าจะรายงานให้ผู้วิจัยหรืออาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยทราบทันที

- ผู้วิจัยและ/หรือผู้ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยขอให้รับรองว่าจะเก็บข้อมูลเกี่ยวกับข้าพเจ้าเป็นความลับและจะ
 เปิดเผยเฉพาะในรูปที่เป็นการสรุปการวิจัย โดยไม่ระบุตัวบุคคลผู้เป็นเจ้าของข้อมูล

ข้าพเจ้าได้อ่านและเข้าใจคำอธิบายข้างต้นแล้ว จึงได้ลงนามยินยอมเป็นอาสาสมัครของโครงการวิจัยดังกล่าว

ลายมือชื่ออาสาสมัคร

(.....)

ลายมือชื่อผู้ให้ข้อมูล

.....

(นางสาว ปณิดา ชันระเกษ)

พยาน

(ไม่ใช่ผู้อธิบาย)

.....

(.....)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

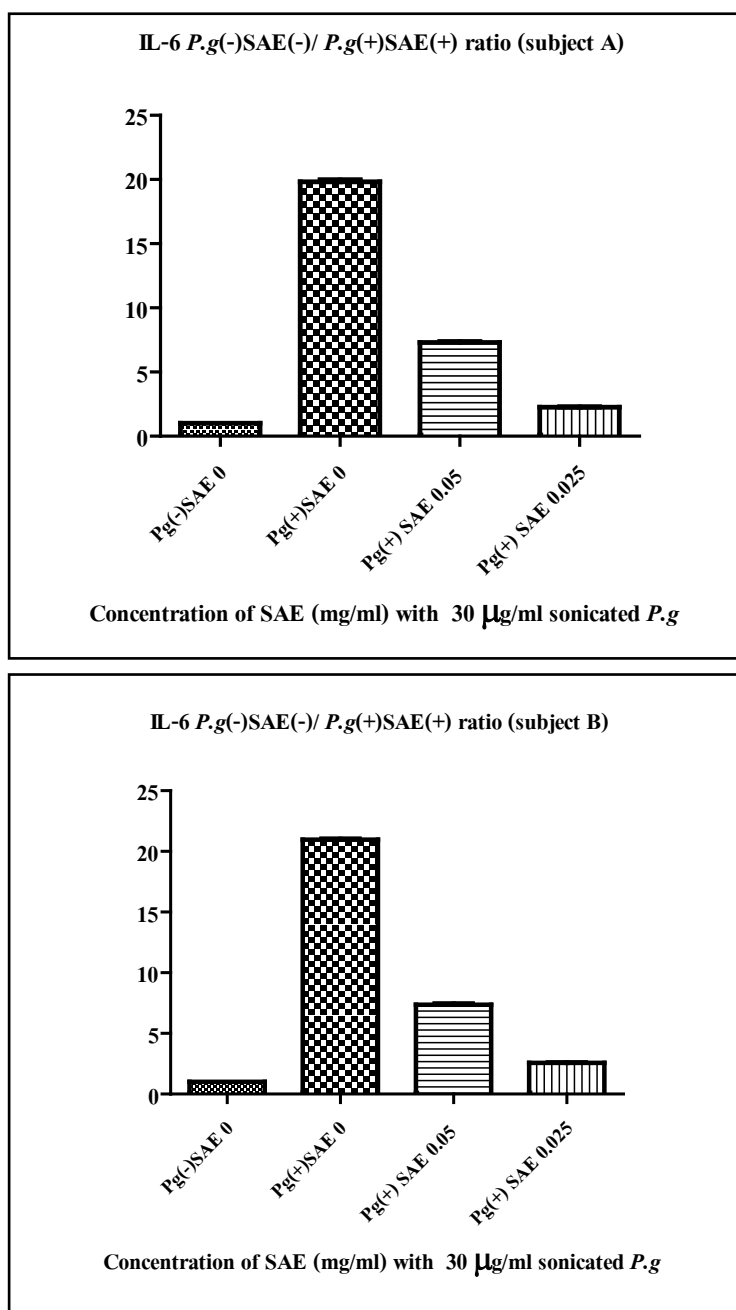
หมายเหตุ:

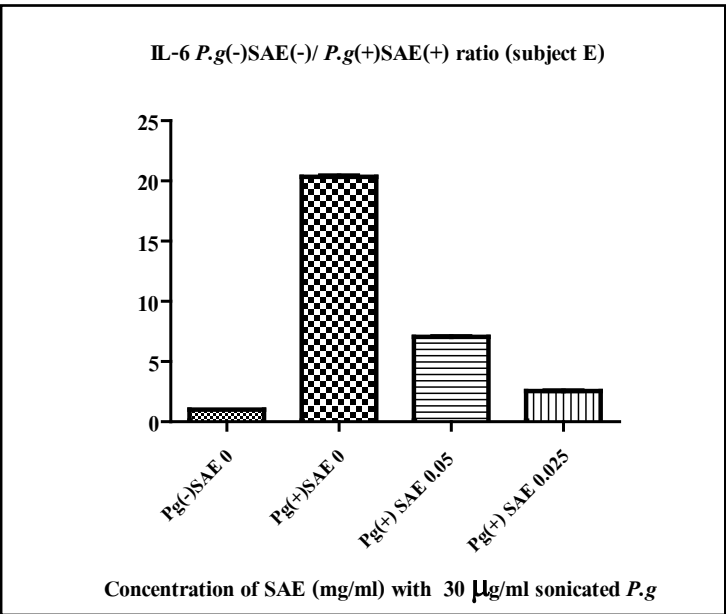
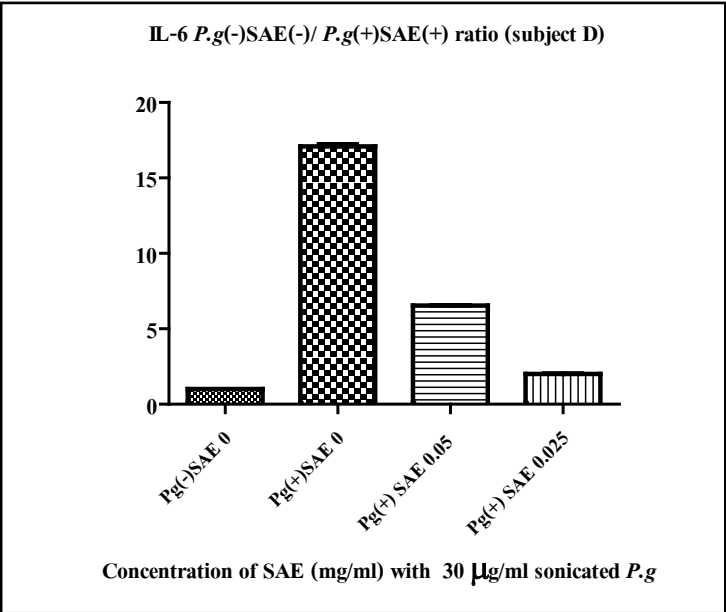
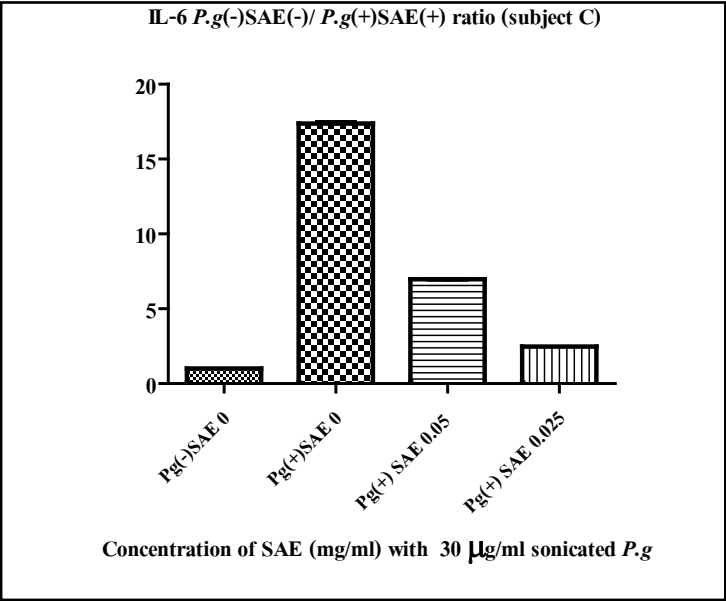
- (1) พยานต้องไม่ใช่ทันตแพทย์หรือผู้วิจัย
- (2) ผู้ให้ข้อมูล/คำอธิบายชัดเจนต้องไม่เป็นอาจารย์ เพื่อป้องกันการเข้าร่วมโครงการด้วยความเกรงใจ

ภาคผนวก ฅ

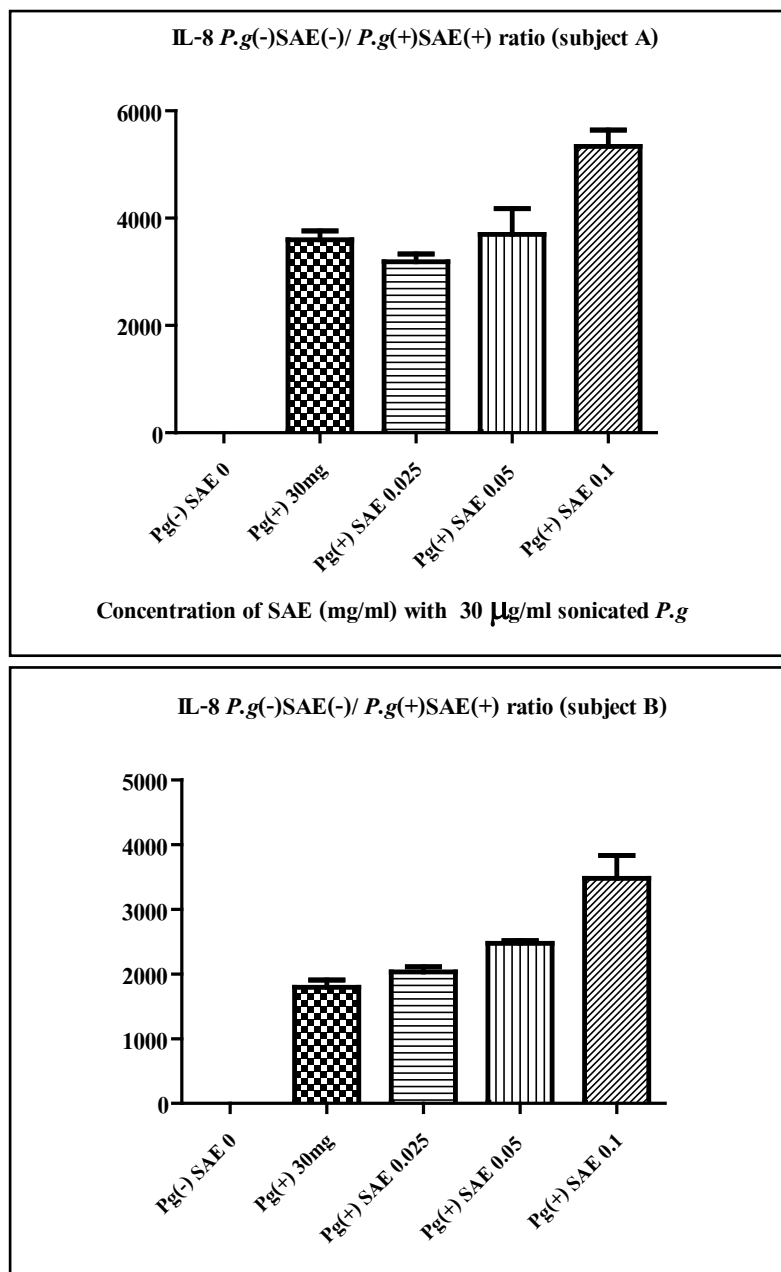
ข้อมูลทางห้องปฏิบัติการ และข้อมูลทางคลินิก

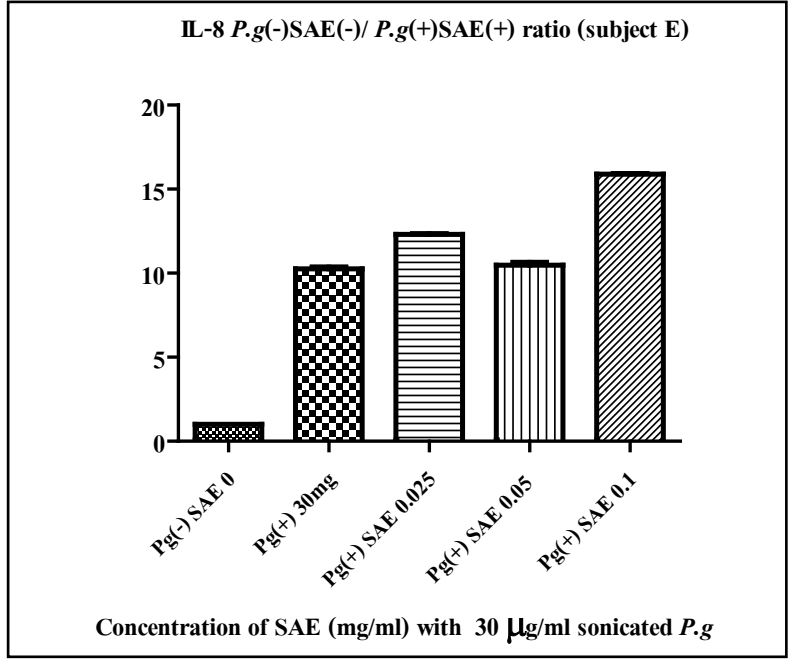
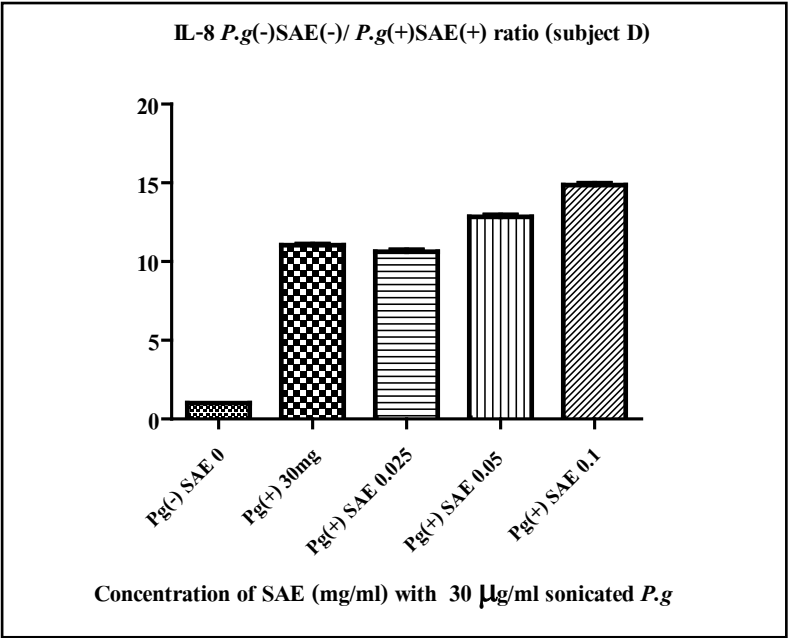
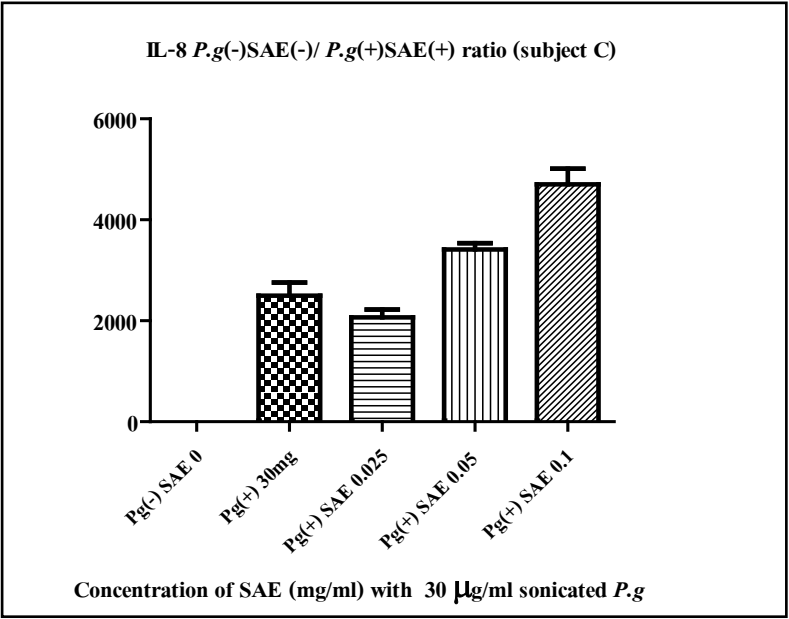
ข้อมูลสัดส่วนปริมาณการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-6 จากเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกของอาสาสมัครแต่ละคน



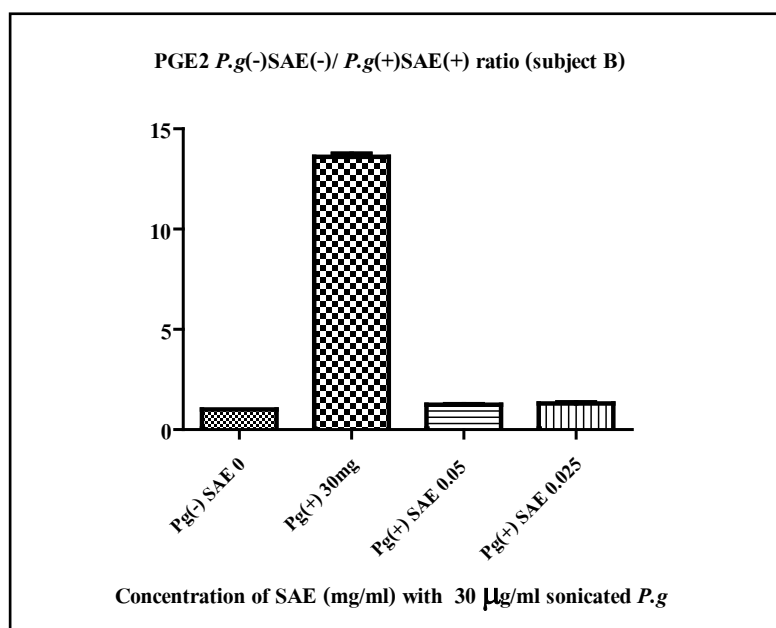
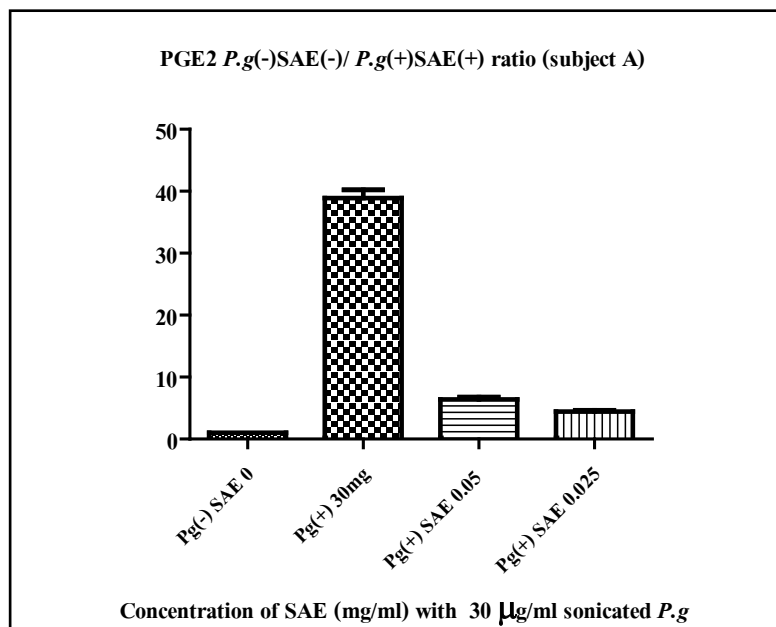


ข้อมูลสัดส่วนปริมาณการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-8 จากเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกของอาสาสมัครแต่ละคน

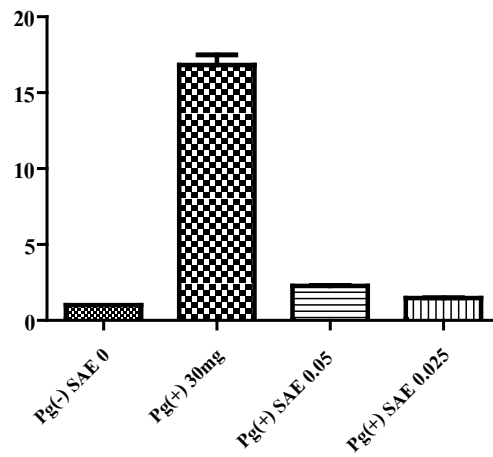




ข้อมูลสัดส่วนปริมาณการหลั่งโปรสตาแกลนดิน อี 2 จากเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกของอาสาสมัครแต่ละคน

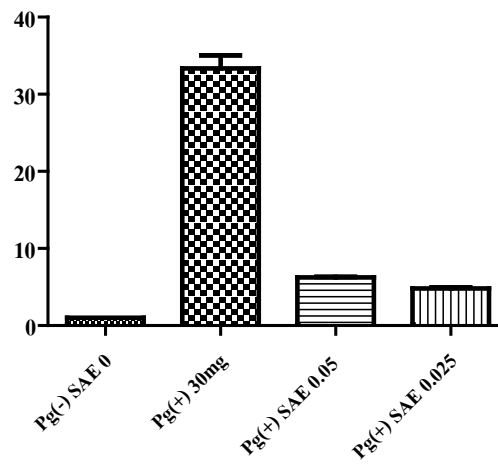


PGE2 *P.g*(-)SAE(-)/ *P.g*(+)SAE(+) ratio (subject C)



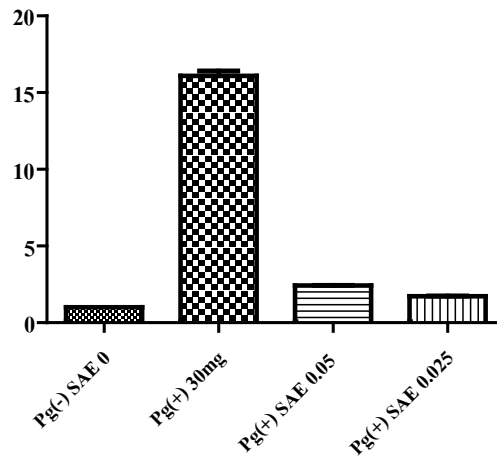
Concentration of SAE (mg/ml) with 30 μ g/ml sonicated *P.g*

PGE2 *P.g*(-)SAE(-)/ *P.g*(+)SAE(+) ratio (subject D)



Concentration of SAE (mg/ml) with 30 μ g/ml sonicated *P.g*

PGE2 *P.g*(-)SAE(-)/ *P.g*(+)SAE(+) ratio (subject E)



Concentration of SAE (mg/ml) with 30 μ g/ml sonicated *P.g*

หมายเหตุ: Pg (-) SAE 0 คือ กลุ่มเซลล์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้น

Pg (+) คือ กลุ่มเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อ
พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส 30ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

Pg (-) SAE 0.05 คือ กลุ่มเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อ
พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส 30ไมโครกรัม/มิลลิลิตรร่วมกับข้อความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัม/
มิลลิลิตร

Pg (-) SAE 0.025 คือ กลุ่มเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยชิ้นส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อ
พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส 30ไมโครกรัม/มิลลิลิตรร่วมกับข้อความเข้มข้น 0.025 มิลลิกรัม/
มิลลิลิตร

ตารางที่ ข้อมูลอาสาสมัครและตำแหน่งที่เก็บเนื้อเยื่อตัวอย่าง

อาสาสมัคร	เพศ	อายุ	หัตถการ
A	หญิง	35	#26 Crown lengthening
B	หญิง	35	#44 Crown lengthening
C	ชาย	38	#35 Crown lengthening
D	ชาย	31	#25 Crown lengthening
E	หญิง	31	#47 Crown lengthening