



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

“ความสัมพันธ์ระหว่างสารหลังจากแบคทีเรียในรอยโรคปริทันต์
กับการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2”

โดย

ประสิทธิ์ ภาวสันต์ และคณะ

พฤษภาคม 2545

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

“ความสัมพันธ์ระหว่างสารหลังจากแบคทีเรีย
ในรอยโรคปริทันต์
กับการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2”

คณะผู้วิจัย

1. รศ. ทพ. ดร. ประสิทธิ์ ภาสสันต์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. รศ. ทพ. จินตกร คูวัฒนสุชาติ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
3. อ. ทญ. ดร. สุคนธา เจริญวิทย์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
4. รศ. ทญ. ทศนีย์ ดรงค์สุวรรณ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

โครงการ"ความสัมพันธ์ระหว่างสารหลังจากแบคทีเรียในรอยโรคปริทันต์
กับการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2"

สรุปรายงานวิจัย

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 พฤษภาคม 2543 ถึงวันที่ 31 พฤษภาคม 2545

ชื่อหัวหน้าโครงการ : ประสิทธิ์ ภาวนันต์

หน่วยงาน : คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. ผลของสารหลังจากแบคทีเรียชนิดที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต ที่เพาะเลี้ยงโดยตรงจากร่องลึกปริทันต์ ต่อการหลังและกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ในเซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อเหงือกของมนุษย์
2. เปรียบเทียบความรุนแรงของสารหลังจากแบคทีเรีย 4 ชนิดที่พบมากในรอยโรคปริทันต์ที่มีต่อการหลังและการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ในเซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อเหงือกของมนุษย์
3. ศึกษาความเกี่ยวข้องของ inflammatory cytokines ในกระบวนการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ในเซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อเหงือกของมนุษย์
4. ศึกษาอิทธิพลของฟลูออไรด์และคลอเฮกซิดีนที่มีผลต่อสารหลังจากแบคทีเรีย

รายละเอียดผลการดำเนินการของโครงการตามแผนงานโดยสรุป (พอสังเขป)

กิจกรรม (ตามแผน)	ผลที่คาดว่าจะได้รับ (ตามแผน)	ผลการดำเนินงาน	หมายเหตุ
1. การเพาะเลี้ยงเซลล์	สามารถเพาะเลี้ยงเซลล์จากเนื้อเยื่อของผู้ป่วยได้เพียงพอ	ดำเนินการได้ตามแผน	
2. การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย 2.1 เพาะเลี้ยง anaerobic bacteria จากร่องลึกปริทันต์	สามารถเพาะเลี้ยงแบคทีเรียจากร่องลึกปริทันต์ของผู้ป่วยภายใน	ดำเนินการได้ตามแผน	

	anaerobic chamber		
2.2 การเพาะเลี้ยง reference strains 4 species	สามารถจัดหาและเพาะเลี้ยง <i>P.gingivalis</i> , <i>P.intermedia</i> , <i>A.actinomycetemcomitans</i> และ <i>F.nucleatum</i>	ไม่สามารถเลี้ยง <i>P.intermedia</i> ได้สำเร็จ และได้รับอนุญาตให้ยกเลิกการทดลองในส่วนนี้	ยังไม่สามารถหาสาเหตุความผิดพลาดที่เกิดขึ้น
2.3 การแยกเชื้อทั้งสี่ species จากร่องลึกปริทันต์ของผู้ป่วย	แยกเชื้อทั้ง 4 species ได้จากร่องลึกปริทันต์ของผู้ป่วย (แต่เนื่องจากผลการทดลองแสดงว่า <i>F.nucleatum</i> ไม่ให้ผลในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 จึงขอตัดการแยกเชื้อตัวนี้ออกไป)	คงเหลือการแยก <i>P.intermedia</i>	
3. การศึกษาผลของสารหลังต่อการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ในเซลล์เพาะเลี้ยง	- ตรวจสอบผลการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 โดย zymography - ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ MMP-2, MT1-MMP, TIMP-2 โดย RT-PCR และ Western analysis	ดำเนินการได้ตามแผน (ยกเว้นเชื้อ <i>P. intermedia</i>) ดำเนินการได้ตามแผน (ยกเว้นเชื้อ <i>P. intermedia</i>)	
4. การศึกษากลไกการกระตุ้น MMP-2 โดยการใช้ protease inhibitors	ตรวจสอบกลไกการกระตุ้นโดยใช้ inhibitors ต่อ proteases กลุ่มต่างๆ	ดำเนินการได้ตามแผน (ยกเว้นเชื้อ <i>P. intermedia</i>)	
5. การเตรียม LPS	- สามารถแยก LPS มาใช้งาน - ศึกษาผลของ LPS ต่อ MMP-2	ดำเนินการได้ตามแผน (ยกเว้นเชื้อ <i>P. intermedia</i>)	
6. ความสัมพันธ์กับ inflammatory cytokines	- ศึกษาผลของ IL-1 และ TNF ในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 - ศึกษาผลของสารหลังจากแบคทีเรียในการกระตุ้นการแสดงออกของ IL-1 และ TNF - ศึกษาผลร่วมของสารหลังกับ IL-1 และ TNF ในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2	ดำเนินการได้ตามแผน (ยกเว้นเชื้อ <i>P. intermedia</i>)	

7. ผลของฟลูออไรด์ และคลอเฮกซิดีนในการยับยั้งการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 (แผนดำเนินการในระยะที่ 4)	- ศึกษาผลของฟลูออไรด์ คลอเฮกซิดีน สารสกัดจากใบชา หรือสารอื่นๆ เพื่อหาสารที่สามารถยับยั้งผลของสารหลังจากแบคทีเรีย	ดำเนินการได้ตามแผน	
--	---	---------------------------	--

รหัสโครงการ : RDG3/18/2543

ชื่อโครงการ : ความสัมพันธ์ระหว่างสารหลังจากแบคทีเรียในรอยโรคปริทันต์กับการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2

ชื่อนักวิจัย : ประสิทธิ์ ภาสันต์¹ จินตกร ภูวัฒนสุชาติ² ทศนีย์ ตรงศรีสุวรรณ¹ สุนธนา เจริญวิทย์¹
¹ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ ² ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

email address : prasit.pav@chula.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : พฤษภาคม 2543 – เมษายน 2545

บทคัดย่อ :

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยครั้งนี้ เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสารหลังจากแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงจากร่องลึกปริทันต์ โดยเฉพาะสารหลังจากเชื้อ *P.gingivalis* (Pg) และ *A.actinomycetemcomitans* (Aa) กับการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ในเซลล์เหงือกและเซลล์เอ็นยัดปริทันต์ของมนุษย์ เซลล์เหงือกและเซลล์เอ็นยัดปริทันต์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อเหงือกและเอ็นยัดปริทันต์ที่ได้จากฟันของผู้ป่วยที่ถอนด้วยเหตุผลทางทันตกรรมจัดฟัน เซลล์จะถูกกระตุ้นด้วยสารหลังจากแบคทีเรียทั้งที่เพาะเลี้ยงจากร่องลึกปริทันต์และจากสายพันธุ์อ้างอิงของ Pg และ Aa เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นจึงวิเคราะห์การกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ด้วยวิธี gelatin zymography ผลการทดลองแสดงว่าสารหลังทั้งจากเชื้อที่เพาะเลี้ยงจากร่องลึกปริทันต์และจากสายพันธุ์อ้างอิงสามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ในเซลล์ทั้งสองชนิด และจากการศึกษากลไกการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 พบว่าสารหลังจาก Pg สามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของ MT1-MMP ทั้งในระดับโปรตีนและ mRNA ในขณะที่สารหลังจาก Aa ลดการหลั่ง TIMP-2 เนื่องจาก MT1-MMP และ TIMP-2 ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ดังนั้น กลไกการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 จากผลของสารหลัง จึงเป็นกลไกแบบ MMP dependent เมื่อทำการศึกษาถึงบทบาทของ LPS จากทั้ง Pg และ Aa ในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 พบว่า LPS จากเชื้อทั้งสองชนิดสามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ได้โดยตรงโดยไม่ต้องผ่านเซลล์ และกลไกการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 โดย LPS จะต่างจากกลไกการกระตุ้นโดยสารหลัง และเกี่ยวข้องกับ serine protease activity ของ LPS นอกจากนี้ ผลการทดลองยังแสดงว่าทั้งสารหลังและ LPS สามารถเพิ่มระดับการแสดงออกของ IL-1 β และ TNF- α ในเซลล์เหงือกและเซลล์เอ็นยัดปริทันต์ แต่การทดลองเติม IL-1 β และ TNF- α ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์กลับไม่มีผลต่อการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ดังนั้น จึงอาจสรุปว่า IL-1 β และ TNF- α ไม่มีผลต่อการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 โดยสารหลังและ LPS ผลการทดลองครั้งนี้ แสดงว่า สารหลังและ LPS จากเชื้อ *P.gingivalis* และ *A.actinomycetemcomitans* สามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ในเซลล์เหงือกและเซลล์เอ็นยัดปริทันต์ และการเพิ่มขึ้นของ active MMP-2 นี้จะสัมพันธ์กับการเพิ่มการทำลายของเนื้อเยื่อปริทันต์ด้วย การศึกษาเพิ่มเติมถึงกลไกการควบคุมการทำงานของ MMP-2 จะเป็นประโยชน์ต่อการควบคุมความรุนแรงของรอยโรคปริทันต์ต่อไป

คำสำคัญ : Periodontal disease, MMP-2, *P.gingivalis*, *A.actinomycetemcomitans*

Project Code : RDG3/18/2543

Project Title : The relationship between secretion from bacteria in periodontal disease and activation of MMP-2.

Investigators : Prasit Pavasant¹, Jintakorn Coowattanasuchat² Tussanee Darongsuwan¹
Sucontha Chareonvit¹

¹Department of Anatomy, ²Department of Microbiology, Faculty of Dentistry,
Chulalongkorn University

email address : prasit.pav@chula.ac.th

Project Duration : May 2000 – April 2002

Abstract :

The purpose of this study is to investigate the relationship between the supernatant from anaerobic bacteria cultivated from periodontal pocket, especially the supernatant of *P.gingivalis* (Pg) and *A.actinomycetemcomitans* (Aa), and the activation of MMP-2 in human gingival fibroblasts (GF) and human periodontal ligament cells (PDL). Human GF and PDL cells were grown from the explants obtained from the teeth extracted for orthodontic reason. Cells were treated with the supernatant from bacteria cultivated either directly from periodontal pocket or from the reference strains of Pg and Aa for 48 hours and analyzed the activation of MMP-2 by gelatin zymography. The results indicated that supernatants from both pathogenic and reference strains of bacteria could activate MMP-2 from GF and PDL cells. Studies in detailed mechanism of MMP-2 activation revealed that the supernatant from Pg upregulated the expression of MT1-MMP in both transcription and translation levels while the supernatant from Aa decreased the secretion of TIMP-2. Thus, the activation of MMP-2 by bacterial supernatant was MMP-dependent mechanism since MT1-MMP and TIMP-2 are known to be involved in the activation of MMP-2. We also examined the effect of LPS from both Pg and Aa on the activation of MMP-2. The result suggested that LPS from both types of bacteria could activate MMP-2 in the medium directly via serine protease activity in LPS. Although both bacterial supernatant and LPS could induce the expression of IL-1 β and TNF- α in GF and PDL cells, addition of exogenous IL-1 β or TNF- α had no effect on the activation of MMP-2. The result indicated that there was no interaction between the presence of IL-1 β and TNF- α and the activation of MMP-2 in GF and PDL cells. In conclusion, these results showed that the activation of MMP-2 could be induced in both GF and PDL cells by the supernatant and LPS from Pg and Aa, suggesting that high level of active MMP-2 in periodontal tissue play a role in the periodontal tissue destruction. Further investigation about the regulation of MMP-2 activation may help in controlling the severity of periodontal disease.

Keywords : Periodontal disease, MMP-2, *P.gingivalis*, *A.actinomycetemcomitans*

บทนำ

โรคปริทันต์ (periodontal disease) เป็นโรคที่เกิดจากการทำลายอย่างเรื้อรังของเนื้อเยื่อปริทันต์ (periodontal tissue) ซึ่งประกอบด้วยกระดูกเบ้าฟัน (alveolar bone) เส้นใยยึดฟัน (periodontal ligament) เคลือบรากฟัน (cementum) และส่วนของเหงือกที่ยึดเกาะกับตัวฟัน (junctional epithelium of gingiva) (Lisgarten, 1986) สาเหตุของโรคนี้ส่วนใหญ่มาจากการสะสมของคราบจุลินทรีย์ (dental plaque) บริเวณใกล้ขอบเหงือกและในร่องเหงือก (gingival sulcus) โดยปรากฏหลักฐานว่าแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุหลักของโรคปริทันต์ คือแบคทีเรียกรัมลบ ชนิดแท่งที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต (gram negative anaerobic bacteria) (Moore et al., 1991; Haffajee and Socransky, 1994) และสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่เป็นที่ยอมรับกันว่าเป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรคปริทันต์ในปัจจุบัน ได้แก่ *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* และ *Bacteroides forsythus*. กระบวนการทำลายของเนื้อเยื่อจะเกิดจากการที่แบคทีเรียเหล่านี้ สามารถกระตุ้นให้เซลล์ในเนื้อเยื่อปริทันต์ของผู้ป่วยเองเพิ่มการสร้างและหลั่งเอนไซม์ โดยเฉพาะเอนไซม์ในกลุ่ม MMP ออกมาเป็นจำนวนมากในเนื้อเยื่อ ซึ่งเป็นผลให้เกิดการทำลายของเนื้อเยื่ออย่างกว้างขวางและเรื้อรัง (Birkedal-Hansen, 1993; DeCarlo et al., 1997)

กระบวนการของการทำลายเนื้อเยื่อปริทันต์ นอกจากจะเกิดโดยตรงจากเอนไซม์ที่แบคทีเรียสร้างและหลั่งออกมาแล้ว หลักฐานจากงานวิจัยในระยะหลังพบว่า สาเหตุใหญ่ของการทำลายเนื้อเยื่อ จะเป็นผลจากการตอบสนองของเซลล์ของเนื้อเยื่อปริทันต์ที่มีต่อแบคทีเรีย (Host response) (Sorsa et al., 1992; Birkedal-Hansen, 1993; DeCarlo et al., 1997) โดยแบคทีเรียจะเหนี่ยวนำให้เซลล์เม็ดเลือดขาว (โดยเฉพาะเม็ดเลือดขาวในกลุ่ม mononuclear cells) สร้างและหลั่งสาร cytokines โดยเฉพาะกลุ่มของ Interleukin (IL) และ Tumor necrosis factor (TNF) ซึ่งเป็น cytokines ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบของเนื้อเยื่อ (inflammatory cytokines) ออกมาเป็นจำนวนมาก (Garrison and Nichols, 1989; McFarland et al., 1990; Payne et al., 1993) และ cytokines เหล่านี้ จะมีผลในการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ของเนื้อเยื่อปริทันต์ ให้สร้างและหลั่งเอนไซม์ออกมาเป็นจำนวนมาก และนำไปสู่การทำลายของเนื้อเยื่อปริทันต์ (Gemmell et al., 1997)

เอนไซม์ที่มีบทบาทในการทำลายของเนื้อเยื่อปริทันต์ คือเอนไซม์ในกลุ่ม MMP (Matrix Metalloproteinases) (Birkedal-Hansen, 1993) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยโปรตีนในเมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix) ได้ทุกชนิดรวมทั้งเส้นใยคอลลาเจน (collagen fibers) (Amies and Quigley 1995; Creemers et al., 1998; Shapiro, 1998) ที่เป็นโปรตีนหลักในเมทริกซ์นอกเซลล์ของเนื้อเยื่อปริทันต์ ลักษณะเฉพาะของเอนไซม์กลุ่มนี้ คือตำแหน่งของ catalytic domain ของเอนไซม์ ต้องการอิออนของสังกะสี (zinc ion) ในการทำงาน ซึ่งเป็นที่มาของชื่อ metalloproteinase เอนไซม์ในกลุ่ม MMP จะทำหน้าที่เป็นเอนไซม์หลักในการย่อยสลายโปรตีนในเมทริกซ์นอกเซลล์(extracellular matrix) โดยเอนไซม์กลุ่มนี้ จะสามารถย่อยสลายโปรตีนในเมทริกซ์นอกเซลล์ได้ทุกชนิดรวมทั้งเส้นใยคอลลาเจน (collagen fiber) ซึ่งเป็นโปรตีนหลักของเนื้อเยื่อปริทันต์ด้วย

ในปัจจุบัน มีรายงานการค้นพบเอนไซม์ในกลุ่มนี้แล้ว ถึง 26 ชนิด และสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ๆ ตามโครงสร้างของเอนไซม์ ได้อย่างน้อย 2 กลุ่ม (Woessner and Nagase, 2000) คือ

1. กลุ่มที่เกาะอยู่ที่ผิวเซลล์ หรือ membrane type MMP (MT-MMP) ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ 4 ตัว คือ MT1 ถึง MT4-MMP

2. กลุ่มที่ถูกหลั่งออกมานอกเซลล์ (secreted enzyme) ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็นกลุ่มย่อยๆ อีกหลายกลุ่ม ตามโครงสร้างและชนิดของโปรตีนที่เอนไซม์เหล่านี้ย่อยได้ เช่น กลุ่ม collagenases ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยเส้นใยคอลลาเจน หรือ คอลลาเจนชนิดที่ I ได้ โดยเอนไซม์ในกลุ่มนี้ประกอบด้วย MMP-1, -8, และ MMP-13 หรือ collagenase 1, 2 และ 3 ตามลำดับ กลุ่ม gelatinases หรือ Type IV collagenases ที่มีสมาชิกเพียง 2 ตัวคือ MMP-2, -9 หรือ gelatinase A และ B ที่สามารถย่อยคอลลาเจนชนิดที่ IV ได้ และ กลุ่ม stromelysin (MMP-3, -10, -11) ซึ่งสามารถย่อยโปรตีนใน extracellular matrix ที่ไม่ใช่คอลลาเจนได้หลายชนิด (Ellerbroek and Stack, 1999) เป็นต้น

ลักษณะเฉพาะประการหนึ่งของเอนไซม์ MMP คือเอนไซม์ในกลุ่มนี้ จะถูกหลั่งออกมาในรูปที่ไม่พร้อมจะทำงาน (latent form) และต้องการกลไกในการกระตุ้นเพื่อเปลี่ยนเอนไซม์เป็น active form ก่อน จึงจะสามารถทำหน้าที่ย่อยโปรตีนได้ (Ellerbroek and Stack, 1999) กลไกการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ จัดเป็นขั้นตอนที่สำคัญประการหนึ่งในการควบคุมการทำงานของ MMP และพบว่าการสูญเสียสมดุลของการกระตุ้นการทำงานของ

MMP เป็นสาเหตุประการหนึ่งของการเกิดโรค ที่นำไปสู่การทำลายของเนื้อเยื่อ (Shapiro, 1998; Ellerbroek and Stack, 1999)

เนื่องจากเอนไซม์ MMP มีความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนในเมทริกซ์นอกเซลล์ทุกชนิด ดังนั้นบทบาทหน้าที่ของเอนไซม์กลุ่มนี้ จึงสัมพันธ์กับกระบวนการต่างๆมากมายในเนื้อเยื่อ ตั้งแต่กระบวนการย่อยสลายเพื่อปรับเปลี่ยนโครงสร้างของเนื้อเยื่อให้เหมาะสมกับการทำงาน (matrix modulation) การย่อยสลายเนื้อเยื่อในสภาวะปกติ (normal turnover) การซ่อมแซมเนื้อเยื่อ (repair) และการทำลายเนื้อเยื่อจากผลของพยาธิสภาพ (Alexander and Werb, 1989; Shapiro, 1998) ซึ่งรวมทั้งการทำลายของเนื้อเยื่อปริทันต์ (Sorsa et al., 1988; Kubota et al., 1996; Romanelli et al., 1999; Kerkvliet et al., 1999)

ในกรณีของโรคปริทันต์ ผลการตรวจวัดระดับของ MMP ในเนื้อเยื่อปริทันต์ เปรียบเทียบระหว่างในรอยโรคกับในเนื้อเยื่อปกติ พบว่าระดับของ MMP จะเพิ่มสูงขึ้นมากในรอยโรคเมื่อเทียบกับระดับในเนื้อเยื่อปกติ และเอนไซม์ที่พบมากในรอยโรคปริทันต์ได้แก่เอนไซม์ในกลุ่ม collagenase คือ MMP-1 หรือ interstitial collagenase และ MMP-8 ซึ่งเป็น collagenase ที่สร้างและหลั่งจากเซลล์เม็ดเลือดขาวพวก polymorphonuclear cells (Birkedal-Hensen, 1993; Sorsa et al., 1988; Kubota et al., 1996; Romanelli et al., 1999) นอกจากนี้ ยังพบการเพิ่มขึ้นของ MMP-2 หรือ type IV collagenase (gelatinase A) (Makela et al., 1994; Ingman et al., 1994) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถการย่อยคอลลาเจนชนิดที่ IV ได้ (Woessner, 1991)

MMP-2 เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการทำลายเนื้อเยื่อทั้งในสภาวะปกติ หรือใน normal turnover และในพยาธิสภาพ และยังมีรายงานว่าเอนไซม์หลักในการย่อยสลายโปรตีนในเนื้อเยื่อยึดต่อของช่องปากด้วย (Creemers et al., 1998) แม้ว่าชื่อของเอนไซม์ type IV collagenase จะตั้งขึ้นจากความสามารถของเอนไซม์ตัวนี้ในการย่อยคอลลาเจนชนิดที่ IV ในเบสเมนเมมเบรน แต่รายงานเมื่อเร็วๆนี้ พบว่า MMP-2 ยังสามารถย่อยคอลลาเจนชนิดที่ I หรือเส้นใยคอลลาเจน ซึ่งเป็นโปรตีนหลักในรอยโรคปริทันต์ได้ (Amies and Quigley, 1995) รวมทั้งยังพบว่าระดับของ MMP-2 ทั้ง latent และ active form จะเพิ่มสูงขึ้นในเนื้อเยื่อที่พบรอยโรคปริทันต์ด้วย (Makela et al., 1994; Ingman et al., 1994; Korostoff et al., 2000) หลักฐานเหล่านี้บ่งชี้ว่า MMP-2 น่าจะมีบทบาทสำคัญใน

กระบวนการทำลายของเนื้อเยื่อปริทันต์ อย่างไรก็ตามก็ดี กลไกการเพิ่มขึ้นของ MMP-2 ทั้ง latent และ active form ใน รอยโรคปริทันต์นั้นยังคงไม่มีความชัดเจน

งานวิจัยครั้งนี้ ต้องการศึกษความสัมพันธ์ระหว่าง สารหลังจากแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงจากร่องลึกปริทันต์ ของผู้ป่วย รวมทั้งสารหลังจากเชื้อ *P.gingivalis* และ *A.actinomycescomitans* กับความสามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ในเซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ โดยเฉพาะกลไกการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ที่เกิดขึ้น เนื่องจากกลไกการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 นั้น จะต่างจากการกระตุ้นการทำงานของ MMP ตัวอื่นๆ เนื่องจากการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 จะเกิดขึ้นที่ผิวเซลล์ โดยอาศัยเอนไซม์ MT-MMP ที่ผิวเซลล์เป็นตัวกระตุ้น (Ellerbroek and Stack, 1999; Bode et al., 1999)

แม้ว่ารายงานการพบ MMP-2 ในน้ำร่องเหงือกยังไม่มีความชัดเจน (Birkedal-Hansen, 1993; Ingman et al., 1994) แต่จากรายงานเมื่อเร็วๆนี้ ที่แสดงว่าระดับของ active MMP-2 จะมีความสัมพันธ์กับระดับการทำลายของเนื้อเยื่อมากกว่าระดับของ MMP-1 (Kerkvliet et al., 1999) รวมทั้งรายงานที่แสดงถึงการเพิ่มปริมาณของ MMP-2 ในเนื้อเยื่อเหงือกของผู้ป่วยโรคปริทันต์ (Makela et al., 1994) และความสามารถของเซลล์สร้างเส้นใยของเนื้อเยื่อปริทันต์ในการสร้างและหลั่งเอนไซม์ MMP-2 (Makela et al., 1994; Heikinheimo and Sato, 1995) ตลอดจนความสามารถของ MMP-2 ในการย่อยคอลลาเจนชนิดที่ I และชนิดที่ IV (Woessner, 1991; Amies et al., 1995; Ellerbroek and Stack, 1999) ทำให้น่าเชื่อว่าเอนไซม์นี้ จะมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการทำลายของเนื้อเยื่อปริทันต์ การศึกษาเพิ่มเติมถึงความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียและ MMP-2 ตลอดจนกลไกที่เกิดขึ้น จะเป็นประโยชน์ต่อการทำงานเข้าใจอันจะนำไปสู่การป้องกันและรักษาโรคปริทันต์ในอนาคตต่อไป

วิธีการทดลอง

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์

1.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์สร้างเส้นใยจากเนื้อเยื่อเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์

เซลล์สร้างเส้นใยจากเนื้อเยื่อเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ เตรียมจากชิ้นเนื้อเหงือกและเนื้อเยื่อเอ็นยึดปริทันต์ ของฟัน ที่ได้จากผู้ป่วยที่มาถอนฟันกรามล่างซี่สุดท้ายที่ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยได้รับความยินยอมจากผู้ป่วย และฟันซี่นั้นๆ ถูกถอนเนื่องจากการจัดฟันหรือเป็นฟันคุดโดยที่ไม่มีการผูกหรือการอักเสบของฟันและเหงือก

เซลล์จากเนื้อเยื่อเหงือก จะเตรียมขึ้นจากชิ้นเนื้อเหงือกที่ติดอยู่กับคอฟันที่ถูกถอน และเพาะเลี้ยงตามวิธีที่ได้เคยรายงานไว้แล้ว (Darongsuwan and Pavasant, 1997) ตามวิธีการดังนี้ คือ ชิ้นเนื้อเหงือกที่ได้มาจะถูกล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซอลายด์ (phosphate buffer saline) ที่ปราศจากเชื้อหลายครั้ง จากนั้นจึงตัดออกเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร วางในจานเลี้ยงเซลล์ (Nunc) และเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) ที่ประกอบด้วยซีรัมวัวร้อยละ 10 (10% fetal calf serum) กลูตามีน 2 มิลลิโมลาร์ (2 mM Glutamine) เพนนิซิลลิน 100 ยูนิต/มิลลิลิตร (100 IU/ml penicillin) สเตربتโตมัยซินซัลเฟต 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (100 µg/ml streptomycin sulfate) และแอมโฟเทอริซินบี 0.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (0.25 µg/ml amphotericin B) อาหารเลี้ยงเซลล์และสารประกอบทั้งหมดมาจากบริษัท Gibco BRL

ส่วนเซลล์จากเนื้อเยื่อเอ็นยึดปริทันต์ ซึ่งต่อไปจะเรียกว่าเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ จะเตรียมจากเนื้อเยื่อเอ็นยึดปริทันต์บริเวณรากฟันกรามซี่ที่ 3 ของผู้ป่วยในเงื่อนไขเดียวกับเซลล์เหงือก ตามวิธีการที่ได้เคยรายงานไว้แล้ว (Darongsuwan and Pavasant, 1999) วิธีการโดยย่อคือ ฟันจะถูกล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซอลายด์ ที่ปราศจากเชื้อหลายครั้ง จากนั้นจึงใช้มีดผ่าตัดขูดเนื้อเยื่อออกจากผิวฟันบริเวณตอนกลางของรากฟัน (Middle third) เพื่อหลีกเลี่ยงเนื้อเยื่อเหงือกและเนื้อเยื่อจากปลายรากฟัน เนื้อเยื่อที่ได้จะถูกนำไปเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 35 มิลลิเมตรในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM เช่นเดียวกับเซลล์เหงือก

ชิ้นเนื้อทั้งสองชนิดจะถูกเลี้ยงในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีระดับคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนวันเว้นวัน จนกระทั่งเซลล์เริ่มคลานออกจากชิ้นเนื้อ ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 7-10 วัน

เซลล์จะเจริญเต็มจานเลี้ยงเซลล์ภายใน 2 สัปดาห์ จากนั้นจะถูกถ่าย (Subculture) ลงจานเลี้ยงเซลล์ใหม่ และเริ่มนับเป็นเซลล์รุ่นที่ 1 การขยายจำนวนเซลล์จะทำการถ่ายเซลล์ที่เจริญเต็มจานเลี้ยงลงสู่จานเลี้ยงเซลล์ใหม่ในอัตราส่วน 1:3 (หว่านเซลล์ 1 ใน 3 ของเซลล์ทั้งหมดต่อจานเลี้ยงเซลล์ใหม่ 1 จาน) โดยใช้เอนไซม์ทริปซิน-อีดีทีเอ (Trypsin-EDTA) สัปดาห์ละ 1 ครั้ง

ในแต่ละการทดลอง จะใช้เซลล์ที่เพาะเลี้ยงจากผู้ป่วย 3 คน โดยใช้เซลล์ในรุ่นที่ 3-5 นอกจากจะระบุไว้เป็นอย่างอื่น

1.2. การกระตุ้นเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยสารหลังจากแบคทีเรียหรือ LPS

เซลล์เพาะเลี้ยงจะถูกถ่ายลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม (Nunc) ที่ความหนาแน่น 50,000 เซลล์/หลุม/มิลลิลิตร เป็นเวลาหนึ่งวัน จากนั้นอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนเป็นชนิดที่ไม่มีซีรัม แต่ประกอบด้วยสารประกอบต่อไปนี้ คือ ITS, Sodium pyruvate, non-essential amino acid, vitamin mixture และ bovine serum albumin (Yu et al., 1995) เป็นเวลาอีก 1 คืน ก่อนที่จะเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์อีกครั้งโดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัมเหมือนข้างต้น พร้อมทั้งเติมสารหลังจากแบคทีเรีย หรือ LPS ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ ในปริมาณต่าง ๆ กัน แล้วเลี้ยงต่อไปอีกเป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง ในกลุ่มควบคุม น้ำเลี้ยงเชื้อหรือตัวทำละลายของ LPS จะถูกเติมลงในอาหารเลี้ยงเซลล์แทนสารหลังจากแบคทีเรียในปริมาณที่เท่ากัน

ในการศึกษาผลของความร้อนที่มีต่อสารหลังจากแบคทีเรีย สารหลังจะถูกต้มเป็นเวลา 15 นาที เพื่อทำลายโครงสร้างของโปรตีนหรือเอนไซม์ในสารหลังก่อนที่จะนำมากระตุ้นเซลล์เหมือนข้างต้น (Uitto et al., 1989; Johansson et al., 1996; Wang et al., 1999)

1.3 การใช้ protease inhibitors และ APDC ในการยับยั้งผลของสารหลังจากแบคทีเรีย

เซลล์ถูกกระตุ้นด้วยสารหลังจากแบคทีเรียเช่นเดียวกับข้างต้น ในสภาวะที่มีหรือไม่มี protease inhibitors ต่อไปนี้ คือ

Aprotinin (ละลายใน serum free medium) ความเข้มข้นสุดท้าย 0.25 TIU

PMSF (phenylmethane sulfonyl fluoride) (ละลายใน ethanol) ความเข้มข้นสุดท้าย 0.2 mM

EDTA (ละลายใน serum free medium) ความเข้มข้นสุดท้าย 2 mM

Phenanthroline (ละลายใน ethanol) ความเข้มข้นสุดท้าย 10 μ M

Leupeptin (ละลายใน serum free medium) ความเข้มข้นสุดท้าย 50 μ g/ml

โดยจะเติม protease inhibitors ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 30 นาทีก่อนเติมสารหลังจากแบคทีเรีย และศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ MMP-2 ด้วย zymography หลังครบเวลา 48 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของ protease inhibitors แต่ละชนิด และ APDC ได้รับการตรวจสอบความเป็นพิษด้วยเทคนิค MTT (ดูวิธีทดลอง 3.1) แล้ว แต่ไม่ได้แสดงผลไว้

1.4 ผลของ IL-1 β และ TNF- α ต่อการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2

เซลล์เพาะเลี้ยงถูกกระตุ้นด้วย IL-1 β และ TNF- α (Sigma, USA) ที่ความเข้มข้นต่างกัน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะที่ไม่มีซีรัมในอาหารเลี้ยงเซลล์เหมือนกับการทดลองกระตุ้นด้วยสารหลังจากแบคทีเรีย จากนั้นจึงวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของ MMP-2 ด้วยเทคนิค zymography

เพื่อเป็นการตรวจสอบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงรับรู้ หรือตอบสนองต่อ IL-1 β และ TNF- α เซลล์จะถูกกระตุ้นด้วยสารทั้งสองที่ความเข้มข้นเดียวกับข้างต้นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วจึงตรวจสอบการแสดงออกของ IL-1 β ด้วยเทคนิค RT-PCR จากผลของสารกระตุ้นทั้งสองชนิด (ดูวิธีทดลอง 3.5)

ในการศึกษาผลร่วมระหว่าง IL-1 β และ TNF- α กับสารหลังจากแบคทีเรีย หรือ LPS จะทำโดยการกระตุ้นเซลล์ด้วย IL-1 β และ TNF- α ในสภาวะที่มี และไม่มีสารหลัง หรือ LPS จากแบคทีเรียร่วมด้วย เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เหมือนข้างต้น

1.5 ผลของฟลูออไรด์และคลอเฮกซิดีนต่อการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2

เซลล์ถูกหว่านเหมือนการทดลองข้างต้น จากนั้น จึงกระตุ้นเซลล์ด้วยฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้น 0-100 ส่วนในล้านส่วน (ppm) หรือด้วยคลอเฮกซิดีนที่ความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับการวัดความเป็นพิษ และ 48 ชั่วโมง สำหรับการวิเคราะห์ MMP-2

ในการศึกษาผลของฟลูออไรด์และคลอเฮกซิดีน กับสารหลังจากแบคทีเรีย เซลล์ถูกกระตุ้นด้วยสารหลังจากแบคทีเรียในสภาวะที่มีและไม่มีฟลูออไรด์และคลอเฮกซิดีนในความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนจะนำอาหารเลี้ยงเซลล์ไปวิเคราะห์ MMP-2 ต่อไป

2. การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

2.1 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียชนิดที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต

แบคทีเรียชนิดที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโตเพาะเลี้ยงจากน้ำในร่องลึกปริทันต์ของผู้ป่วยโรคปริทันต์ ที่มารับการรักษาที่คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยเก็บจากผู้ป่วยโรคปริทันต์ที่ไม่มีโรคทางระบบ ซึ่งอาจมีผลกระทบต่อสภาวะของโรคปริทันต์ รวมทั้งไม่ได้รับยาปฏิชีวนะและยังไม่เคยได้รับการรักษามาก่อน การเก็บจะเริ่มจากการกำจัดคราบจุลินทรีย์บริเวณเหนือขอบเหงือก จากนั้นสอดแท่งกระดาษ (paper point) ที่ปราศจากเชื้อลงในร่องลึกปริทันต์จนถึงส่วนก้นของร่อง แล้วทิ้งไว้ประมาณ 10 วินาที จากนั้นจึงนำใส่แท่งกระดาษใส่ในสารละลาย RTF (Reduced transport fluid) ซึ่งมีสารรีดิวซ์เป็นองค์ประกอบเพื่อทำลายออกซิเจนในสารละลาย (Syed et al., 1972; Loesche et al., 1972; Coowattanasuchat and Laousrisin, 1998)

สารละลาย RTF ที่ได้จะนำไปเพาะเลี้ยงในน้ำเลี้ยงเชื้อชนิด Tryptic Soy Broth (TSB) ที่มี hemin 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ vitamin K1 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจนใน anaerobic jar และใช้ GasPak™ (Becton Dickinson, USA) ในการสร้างสภาวะที่ปราศจากออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน และในตลอดการทดลองเมื่อระบุน้ำเลี้ยงเชื้อ หรือ TSB จะหมายถึง TSB ที่มี hemin และ vitamin k ตามความเข้มข้นที่ระบุข้างต้นเสมอ ยกเว้นจะระบุเป็นอย่างอื่น

เมื่อเลี้ยงไปเป็นเวลา 5 วัน จะทำการวัดปริมาณของแบคทีเรียที่เลี้ยงได้โดยการนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่เพาะเลี้ยงไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย Spectrophotometer ที่ค่าความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร จากนั้นปรับปริมาณของน้ำเลี้ยงเชื้อให้มีจำนวนแบคทีเรียที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1 ในทุกการทดลอง แล้วจึงนำน้ำเลี้ยงเชื้อไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลางที่ระดับความเร็ว 6000g เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อแยกส่วนของเชื้อออกจากส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อ น้ำเลี้ยงเชื้อที่เก็บได้จะถูกนำไปกรองด้วยแผ่นกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.2 ไมครอนเพื่อกำจัดเอาส่วนของเชื้อที่ยังหลงเหลืออยู่ออกให้หมด น้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้นี้จะประกอบด้วยสารหลังจากแบคทีเรีย และต่อไปจะเรียกว่า สารหลังจากแบคทีเรีย (Johansson et al., 1996)

สารหลังจากแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองจะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะถูกนำมาใช้ในการทดลอง

2.2 การแยกเชื้อ *P.gingivalis* และ *A.actinomycetemcomitans* จากร่องลึกปริทันต์ของผู้ป่วย

ในการแยกเชื้อจากร่องลึกปริทันต์ของผู้ป่วย จะเริ่มจากการเก็บน้ำจากร่องลึกปริทันต์ตามที่อธิบายไว้ข้างต้น สำหรับการแยก *P.gingivalis* นำสารละลาย RTF ที่เก็บได้มาหยดลงบน blood agar ที่มีกานามัยซินซัลเฟต (kanamycin sulfate) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร hemin 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ vitamin K1 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (Loesche, 1971) แล้วปาดด้วยแท่งแก้วให้สารละลาย RTF กระจายออกโดยรอบ แบคทีเรียถูกเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจนเหมือนที่กล่าวแล้วข้างต้น ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7-10 วัน จากนั้นคัดเลือกแบคทีเรียเฉพาะโคโลนีเดี่ยวที่มีสีดำ ลักษณะครึ่งทรงกลมคว่ำ ขอบเรียบ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-2 มิลลิเมตรเพื่อเพาะเลี้ยงต่อไป

สำหรับการแยกเชื้อ *A.actinomycetemcomitans* จะนำสารละลาย RTF มาเพาะเลี้ยงบน TSBV agar ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 (Slots, 1982) และคัดเลือกแบคทีเรียเฉพาะโคโลนีที่มีสีขาวครีม ลักษณะครึ่งทรงกลมคว่ำ ขอบเรียบ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2-3 มิลลิเมตร เพื่อเพาะเลี้ยงต่อไป

เมื่อแยกโคโลนีที่ต้องการจากแต่ละสายพันธุ์ที่ต้องการ โดยไม่มีโคโลนีแปลกปลอมแล้ว Isolated colony บน agar จะถูกนำมาเลี้ยงใน TSB (*P.gingivalis*) หรือ Brain heart infusion (BHI สำหรับ

A.actinomycetemcomitans) ประมาณ 3-5 วัน แล้วจึงนำกลับไปเลี้ยงบน agar plate อีกครั้ง เพื่อตรวจสอบว่ามี การปนเปื้อนหรือไม่ เมื่อแน่ใจว่าไม่มีการปนเปื้อนของเชื้ออื่นๆแล้ว จึงแยกเอาเฉพาะโคโลนีเดี่ยวจาก agar plate ไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้ออีกครั้ง แล้วตรวจสอบด้วย gram stain, chemical tests และ PCR เปรียบเทียบกับ สายพันธุ์มาตรฐานคือ *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 53978; W50) และ *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (ATCC 43718)

2.3 การเพาะเลี้ยง *P.gingivalis*, *A.actinomycetemcomitans* และ *F.nucleatum*

แบคทีเรียสายพันธุ์ *P.gingivalis* (W50) และ *F.nucleatum* (ATCC 25586) ได้รับความอนุเคราะห์จาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ส่วนสายพันธุ์ *A.actinomycetemcomitans* (ATCC 43718) ได้รับความอนุเคราะห์จาก อ. ทญ. ดร. รังสิณี มหานนท์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แบคทีเรีย *A.actinomycetemcomitans* (Aa) ถูกเพาะเลี้ยงใน BHI broth (Difco, USA) ในสภาวะที่มีก๊าซ คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส *F.nucleatum* (Fn) ถูกเลี้ยงใน TSB และ *P.gingivalis* (Pg) ถูกเลี้ยงใน TSB ที่เติม hemin และ vitamin K ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 0.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และเลี้ยงใน anaerobic jar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้ GasPak™ เช่นเดียวกับข้างต้น แบคทีเรียจะถูกถ่ายใหม่ทุกๆ 3-4 วัน และในการเตรียมสารหลังจากแบคทีเรีย จะนำเชื้อที่ได้ไปวัด ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร และพยายามปรับให้ค่า OD ของเชื้อเท่ากัน โดยอิงค่า OD = 1 จากนั้นจึงนำไปปั่นแยกเอาส่วน supernatant ออกมา นำไปผ่าน filter membrane ได้เป็นสารหลังจาก แบคทีเรียเช่นเดียวกับข้างต้น

2.4 การวิเคราะห์สายพันธุ์แบคทีเรียด้วยเทคนิค PCR

การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *P.gingivallis* และ *A.actinomycetemcomitans* ที่แยกได้จากผู้ป่วย โรคปริทันต์ที่ได้รับการรักษาที่คลินิกปริทันต์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จะใช้เทคนิคพีซีอาร์ โดยเริ่มจาก การสกัดสารพันธุกรรม (DNA) จากแบคทีเรีย ตามวิธีที่ประยุกต์จาก Murmer (1961) และ Sambrook

และคณะ (1989) โดยมีวิธีการโดยย่อคือ ย่อยผนังเซลล์ของแบคทีเรียด้วยไลโซไซม์ (lysozyme) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย SDS ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 0.5 แล้วเติมเอนไซม์ proteinase K ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย sodium acetate pH 5.2 ความเข้มข้น 3 โมลาร์ ด้วยปริมาตร 1/10 ของปริมาตรที่มีอยู่เดิม แล้วเติมสารละลาย phenol-chloroform ในปริมาตรที่เท่ากัน ปั่นด้วยความเร็ว 12000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นดูด aqueous phase ออกใส่หลอดใหม่ แล้วเติมอัลกอฮอล์ ในปริมาตร 2 เท่าของ aqueous phase ที่ได้ และปั่นด้วยความเร็ว 12000 รอบ/นาที อีก 10 นาที ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 75% เอทิลแอลกอฮอล์ แล้วจึงละลายตะกอนที่ได้ด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ปริมาณของ DNA ที่ได้ จะอ่านด้วย UV spectrophotometer

ในการวิเคราะห์ จะสังเคราะห์ primers ที่มีความจำเพาะต่อลำดับคู่เบสของ 16S ribosomal RNA (GI 509140 สำหรับ *P.gingivalis* และ GI 173678 สำหรับ *A.actinomycetemcomitans*) ดังนี้

P.gingivalis

sense strand 5' AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG 3'

antisense strand 5' ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT 3'

A.actinomycetemcomitans

sense strand 5' AAA CCC ATC TCT GAG TTC TTC TTC 3'

antisense strand 5' ATG CCA AAT TGA CGT TAA AT 3'

ปฏิกิริยาพีซีอาร์ จะเริ่มที่ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 2 นาที 1 ครั้ง ตามด้วย อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 45 วินาที จำนวน 32 รอบ และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที อีก 1 รอบ ผลผลิตที่ได้จะถูกนำมาแยกใน agarose gel ที่ความเข้มข้นของ agarose ร้อยละ 1.5 แลเปรียบเทียบผลของแบคทีเรียที่แยกจากคนไข้ กับผลของพีซีอาร์ที่ได้จากสายพันธุ์มาตรฐาน

2.5 การสกัด LPS (หรือ endotoxin) จากแบคทีเรีย

วิธีการสกัด LPS ทำตามวิธีที่รายงานไว้โดย Al-Hendy และคณะ (1991) โดยมีวิธีการโดยย่อดังนี้ แบคทีเรียถูกเพาะเลี้ยงเป็นเวลาประมาณ 5 วัน จากนั้นจึงถ่ายแบคทีเรียที่เลี้ยงได้ลงในหลอด หลอดละ 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 16000g เป็นเวลา 1 นาที ส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อจะถูกดูดทิ้ง แล้วละลายตะกอนที่ได้ด้วย TAE buffer (40mM Tris-acetate, pH 8.5, 2mM EDTA) 100 ไมโครลิตรและ alkaline solution (3 gm SDS, 0.6 g Tris, 6.4 ml ของ 2N NaOH ใน 100 ml ของน้ำ) 200 ไมโครลิตร จากนั้นจึงนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 70 นาที

เมื่อครบเวลาการปั่น เติม preheated phenol- chloroform 300 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลอด และปั่นต่อที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส อีก 15 นาที ก่อนนำไปปั่นที่ความเร็ว 16000g เป็นเวลา 10 นาที ส่วนของ aqueous phase ตอนบนถูกเก็บและนำมาย่อยด้วย proteinase K (60 ไมโครกรัม/หลอด) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส อีก 60 นาที

ภายหลังการย่อย เติมน้ำ 200 ไมโครลิตร และสารละลาย sodium acetate pH 5.2 ความเข้มข้น 3 โมลาร์ 50 ไมโครลิตร จากนั้นเติมอัลกอฮอล์ในปริมาณ 2 เท่าของสารละลายที่ได้ในแต่ละหลอด และปั่นบนน้ำแข็งประมาณ 30 นาที ก่อนที่จะนำไปปั่นที่ 16000 รอบ/นาที อีก 10 นาที ละลายตะกอนที่ได้ ด้วยสารละลาย Tris-HCl pH 8.0 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ และสารละลาย sodium acetate ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ในปริมาณ 200 ไมโครลิตร/หลอด เสร็จแล้วเติมอัลกอฮอล์ 400 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลอด และปั่นบนน้ำแข็งอีก 30 นาที ก่อนนำไปปั่นที่ความเร็ว 16000g อีก 10 นาที ตะกอนที่ได้ในแต่ละหลอด จะถูกละลายในน้ำ 50 ไมโครลิตร และเก็บที่ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปใช้

ปริมาณของ LPS หรือเอนโดทอกซิน (Endotoxin) ที่เตรียมได้ จะถูกวัดด้วยชุดวัด E-TOXATE (Sigma, USA) โดยเทียบกับค่ามาตรฐานของเอนโดทอกซินที่ได้จาก *E. coli* 0.55:B5 lipopolysaccharide (4000 Endotoxin unit/vial) จากนั้นปรับค่าของ LPS ที่เตรียมได้เป็น 1 Endotoxin unit (EU)/มิลลิลิตร

2.6 การวิเคราะห์ LPS โดยการย้อมด้วย silver stain

การย้อม silver แบบ nondiamine ทำตามวิธีของ Merrill และคณะ (1994) โดยการแยก LPS ด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยใช้ gel ที่มี acrylamide ความเข้มข้นร้อยละ 14 โดยผสม LPS ใน sample buffer ที่ประกอบด้วย Tris-HCl pH 6.8 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ SDS ความเข้มข้นร้อยละ 2 ทูโครส ความเข้มข้นร้อยละ 20 mercaptoethanol ความเข้มข้นร้อยละ 1 และ bromophenol blue ความเข้มข้นร้อยละ 0.001 เมื่อแยกด้วยไฟฟ้าเสร็จสิ้นแล้ว นำแผ่น gel ที่ได้มาตรึง (fixation) ในสารละลาย methanol ความเข้มข้นร้อยละ 50 (v/v) และ acetic acid ความเข้มข้นร้อยละ 10 (v/v) เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง (หรืออาจแช่ไว้นานข้ามคืนได้) จากนั้นแช่ในสารละลายของ methanol ความเข้มข้นร้อยละ 10 (v/v) และ acetic acid ความเข้มข้นร้อยละ 5 (v/v) อีก 10 นาที เพื่อกำจัดน้ำในแผ่น gel (rehydration)

จากนั้น แช่แผ่น gel ในสารละลาย glutaraldehyde ความเข้มข้นร้อยละ 2 (v/v) นาน 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำสะอาดชนิดที่ปราศจากไอออน นาน 15 นาที ก่อนนำไปแช่ในสารละลายของ potassium dichromate ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (w/v) อีก 5 นาที ในขั้นสุดท้ายจึงย้อมด้วยสารละลาย silver nitrate ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 (w/v) นาน 25 นาที

หลังการย้อม แช่แผ่น gel ในสารละลายรีดิวส์ (Sodium carbonate 0.283 M และ formaldehyde 0.007 M) จนกระทั่งเริ่มสังเกตเห็นแถบสีน้ำตาล-ดำปรากฏ (ประมาณ 1-3 นาที) แล้วย้ายไปแช่ในสารละลาย acetic acid ความเข้มข้นร้อยละ 3 (v/v) เป็นเวลา 5 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยาการเกิดสี ก่อนนำมาล้างด้วยน้ำสะอาดชนิดที่ปราศจากไอออนอีก 2 รอบ ๆ ละ 10 นาที

3. วิธีการตรวจสอบการตอบสนองของเซลล์

3.1 การวัดความเป็นพิษด้วยเทคนิค MTT assay

ความเป็นพิษของสารหลังจากแบคทีเรีย จะวัดโดย MTT assay ตามวิธีที่ได้เคยรายงานไว้แล้ว (Charoonpatrapong and Pattamapun, 2000) โดยเซลล์ถูกถ่ายลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุมเช่นเดียวกับข้างต้น และกระตุ้นด้วยสารหลังจากแบคทีเรียในปริมาณต่างๆกันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูก

เปลี่ยนเป็นชนิดที่ไม่มี phenol red และมี MTT ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรใน 4 ชั่วโมงสุดท้ายของการกระตุ้น

เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมง อาหารเลี้ยงเซลล์ถูกดูดออก แล้วเติม DMSO 1 มิลลิลิตรลงในแต่ละหลุมของจานเลี้ยงเซลล์เพื่อละลายผลึก formazan ที่เซลล์สร้างขึ้นจากสารละลาย MTT จากนั้นจึงนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 570 นาโนเมตร

3.2 การวัดจำนวนเซลล์ด้วยวิธีย้อมด้วยสีเมทิลีนบลู (methylene blue assay)

เมื่อครบเวลาในการกระตุ้นเซลล์ อาหารเลี้ยงเซลล์ อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเก็บเพื่อนำไปวิเคราะห์เอนไซม์ MMP-2 ในขณะที่เซลล์บนจานเลี้ยงจะถูกตรึงด้วย formaldehyde ความเข้มข้นร้อยละ 4 ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลล์เป็นเวลา 30 นาทีก่อนที่จะทำการวัดจำนวนเซลล์โดยการย้อมด้วยสีเมทิลีนบลูตามวิธีที่ได้เคยรายงานไว้แล้ว (Darongsuwan and Pavasant, 1999) โดยมีวิธีการคือ เซลล์ที่ถูกตรึงแล้วจะถูกล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลล์ 1 ครั้งแล้วล้างด้วย borate buffer ที่มีค่าความเป็นกรดเบส (pH) 8.5 และมีความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ 1 ครั้ง จากนั้นจึงย้อมด้วยสีเมทิลีนบลูความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาแล้วจึงล้างสีส่วนเกินด้วย borate buffer อย่างน้อย 4 ครั้ง ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วทำละลายด้วย สารละลายอัลกอฮอล์กับกรดไฮโดรคลอริก สัดส่วน 1:1 หลุมละ 1 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 667 นาโนเมตร

3.3 การวิเคราะห์เอนไซม์ MMP-2 ด้วยวิธี Zymography

อาหารเลี้ยงเซลล์ที่เก็บได้จากการทดลองจะถูกนำมาวิเคราะห์หาเอนไซม์ MMP-2 ด้วยวิธี zymography ตามวิธีที่ได้เคยรายงานไว้แล้ว (Dhanesuan and Pavasant, 1998) ซึ่งมีวิธีการโดยย่อคือ อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกผสมกับ Leammli buffer (Leammli, 1970) แล้วนำไปแยกด้วยไฟฟ้าใน polyacrylamide gel ที่มีความเข้มข้นของ acrylamide ร้อยละ 10 และมีส่วนผสมของ gelatin ในปริมาณ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดย gelatin จะเป็น substrate

สำหรับเอนไซม์ MMP-2 และปริมาณของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้จะเปรียบเทียบกับปริมาณเซลล์ที่เท่ากันโดยใช้ค่าจำนวนเซลล์จากการวัดด้วยสีเมทิลีนบลูข้างต้น

เมื่อเสร็จสิ้นการแยกด้วยไฟฟ้าแล้ว gel จะถูกล้างด้วยสารละลาย TritonX-100 ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 สามรอบ รอบละ 10 นาที ก่อนนำไปบ่มด้วยสารละลาย developing buffer (0.15M NaCl, 10mM CaCl₂, 50mM Tris-HCl pH7.5, 0.1% Brij35) เป็นเวลา 1 คืนที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงย้อมด้วย Coomassie Blue R250 ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ในสารละลายเมทิลแอลกอฮอล์และกรดอะซิติก (ความเข้มข้นร้อยละ 40 และร้อยละ 7 ตามลำดับ) ล้างด้วย low methanol destain (25% methanol, 7% acetic acid) บริเวณที่มีเอนไซม์ MMP-2 จะปรากฏเป็นแถบใสบน gel สีน้ำเงิน

3.4 การวิเคราะห์ปริมาณ MMP-2, MT1-MMP และ TIMP-2 ด้วยวิธี Western blot analysis

ระดับของ MMP-2 จะถูกวิเคราะห์จากอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยนำมาแยกด้วยไฟฟ้าในอะคริลามายด์เจล (polyacrylamide gel electrophoresis) โดยใช้ความเข้มข้นของอะคริลามายด์ร้อยละ 7.5 จากนั้นโปรตีนจะถูกถ่ายลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (Nitrocellulose, Bio-Rad) แล้วย้อมด้วย affinity-purified antibody rabbit anti-MMP-2 (antibody ต่อ aminoterminal ของ MMP-2, Sigma, USA) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ต่อด้วยการย้อมด้วย biotinylated goat anti rabbit 30 นาที และ horseradish peroxidase labeled streptavidin อีก 30 นาที จากนั้นแผ่นไนโตรเซลลูโลสจะถูกบ่มใน chemiluminescence reagent (Renaissance Western blot chemiluminescence reagent, NEN) และตรวจสอบปริมาณของ MMP-2 ด้วยวิธี auto-fluorography โดยตรวจจับสัญญาณด้วยแผ่นฟิล์มเอกซเรย์ (CL-X-posure, Pierce)

ระดับของ MT1-MMP ถูกวิเคราะห์จาก cell extracted โดยใช้ extraction buffer (M-per; Pierce, USA) ในขณะที่ระดับ TIMP-2 จะถูกวิเคราะห์จากอาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งไปทำให้เข้มข้นขึ้นประมาณ 25 เท่า ด้วยการปั่นใน Nanosep (Gelman, USA) Nanosep เป็นเครื่องมือที่ช่วยในการเพิ่มความเข้มข้นของสาร ลักษณะของเครื่องมือประกอบด้วย chamber บนและล่าง แยกจากกันด้วย แผ่นmembrane ที่มีช่องขนาดต่างๆ ซึ่งในที่นี้ใช้ช่องที่ยอมให้โมเลกุลที่มีขนาดเล็กกว่า 3 กิโลดาลตันเท่านั้นผ่านได้ เมื่อใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ลงใน upper chamber แล้วนำไปปั่น

ที่ความเร็วสูง องค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีน้ำหนักต่ำกว่า 3 กิโลดาลตันจะผ่าน membrane ลงมาใน lower chamber รวมทั้งน้ำ ซึ่งทำให้ปริมาณสารใน upper chamber ลดลงแต่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น

เมื่อได้ตัวอย่างของ cell extracted และ อาหารเลี้ยงเซลล์ที่เข้มข้นขึ้นแล้ว นำไปวัดโปรตีนด้วยชุดวัดโปรตีน BCA (Pierce, USA) นำโปรตีนจำนวนเท่าๆกัน มาแยกด้วยไฟฟ้าใน gel ที่มี acrylamide ที่ความเข้มข้นร้อยละ 12 จากนั้นจึงนำไปย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ MT1-MMP และ TIMP-2 โดยมีวิธีการย้อมและการตรวจจับสัญญาณเหมือน การตรวจหา MMP-2 ที่กล่าวแล้วข้างต้น แอนติบอดีที่ใช้จะเป็น rabbit anti-human.MT1-MMP (affinity-purified antibody ต่อ hinge region, Sigma, USA) และ rabbit anti-human TIMP-2 (affinity-purified antibody ต่อ carboxyterminal)

3.5 การวิเคราะห์ระดับของอาร์เอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์ที-พีซีอาร์ (RT-PCR)

RNA ทั้งหมดจากเซลล์จะถูกสกัดด้วย TRIzol (GibcoBRL) ตามวิธีการที่แนะนำโดยบริษัทผู้ผลิต RNA ที่ได้จะถูกนำไปผ่านกระบวนการ reverse transcription ด้วยเอนไซม์ AMV (Avian myeloblastosis virus, Promega) และ oligodT primer(Promega) เพื่อสังเคราะห์ cDNA ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง

cDNA ที่ได้จะถูกนำไปเพิ่มจำนวนด้วยกระบวนการ PCR โดยใช้เครื่อง Hybaid Omn- E (Hybaid, UK) การเพิ่มจำนวนจะทำโดยใช้สาย primer ที่จำเพาะต่อโปรตีนที่ต้องการศึกษา และใช้สาย primer ที่จำเพาะต่อ GAPDH (glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase) ควบคู่กันไป เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุมภายใน (internal control) ของการทดลอง Primers ต่อ human MMP-2, MT1-MMP, TIMP-2 และ GAPDH ถูกออกแบบจากลำดับของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence) ที่มีรายงานไว้แล้ว (Collier et al., 1988; Will and Hinzmann, 1995) และสังเคราะห์ผ่านบริษัทกิ๊ปไทย ส่วน Primers ของ IL-1, TNF และ CD14 ถูกออกแบบจากลำดับของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence) ที่มีรายงานใน GENBANK ใน website ของ NIH และสังเคราะห์ผ่านบริษัท GENSET

ลำดับของนิวคลีโอไทด์ ของ primers ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ คือ

MMP-2	sense	5' CAAGAAGTATGGCTTCTGCC 3'
	antisense	5' GCACCCTTGAAGAAGTAGCT 3'
MT1-MMP	sense	5' GTCATCATCGGGCAGCAC 3'
	antisense	5' CATCGCTGCCATGCAGAAAGT 3'
TIMP-2	sense	5' GGAAGTGGACTCTGGAAACGACATT 3'
	antisense	5' CTCGATGTCGAGAACTCCTGCTTG 3'
IL1- β	sense	5' GGAGCAACAAGTGGTGTCT 3'
	antisense	5' AAAGTCCAGGCTATAGCCGT 3'
TNF- α	sense	5' ACACCATGAGCACTGAAAGC 3'
	antisense	5' TTATCTCTCAGCTCCACGCC 3'
CD14	sense	5' ACCTAGAGCCGTTTCTAAAGCG 3'
	antisense	5' ATCTCGGAGCGCTAGGGTTTA 3'
GAPDH	sense	5' TGAAGGTCGGAGTCAACGGAT 3'
	antisense	5' TCACACCCATGACGAACATGG 3'

โดยตั้งระดับของอุณหภูมิในการเพิ่มจำนวนดังนี้ คือ อุณหภูมิ 94 เซลเซียส 2 นาที 1 ครั้ง ตามด้วย อุณหภูมิ 94 เซลเซียส 1 นาที 60 เซลเซียส 1 นาที 72 เซลเซียส 1 นาที 45 วินาที อีก 26 รอบ สำหรับ GAPDH 28 รอบสำหรับ TIMP-2 และ MMP-2 และ 32 รอบสำหรับ MT1-MMP และที่ 72 เซลเซียส 10 นาที อีก 1 รอบ และเมื่อสิ้นสุดกระบวนการ PCR แล้ว สายพันธุกรรมที่ได้จะถูกวิเคราะห์โดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าใน agarose gel ที่มีความเข้มข้นของ agarose ร้อยละ 2 และถ่ายภาพด้วยฟิล์มโพลาไรซ์บนเครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ต (ultraviolet)

3.6 ผลของฟลูออไรด์และสารสกัดจากใบชาต่อการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2

เซลล์ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีโซเดียมฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 1 และ 10 ppm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใน serum free condition เหมือนกับการทดลองกระตุ้นด้วยสารหลังจากแบคทีเรีย การเปลี่ยนแปลงของ MMP-1, MMP-2 และ MMP-3 ถูกวิเคราะห์จากอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยตรวจสอบ MMP-1 ด้วยเทคนิค Western analysis และตรวจสอบ MMP-2 และ MMP-3 ด้วย zymography

ในการทดลองต่อมา เซลล์ถูกกระตุ้นด้วยสารหลังจากแบคทีเรียในสภาวะที่มีและไม่มี fluoride ความเข้มข้น 10 ppm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใน serum free condition จากนั้นวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของ MMP-2 ด้วยเทคนิค zymography

การเตรียมสารสกัดจากใบชาเขียวและผลต่อ MMP-2

การเตรียมทำตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Ooshima และคณะ (1993) ตามวิธีการต่อไปนี้ คือ ละลายใบชาด้วย ethanol ความเข้มข้นร้อยละ 45 ในน้ำ (v/v) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 วัน ด้วยสัดส่วนของใบชาต่อสารละลายเท่ากับ 1 กิโลกรัมต่อ 10 ลิตร จากนั้นจึงกรองด้วยกระดาษกรอง แล้วปั่นให้แห้งด้วย Speed-vacuum centrifuge นำส่วนของสารละลายที่แห้งไปซึ่งเพื่อทราบน้ำหนักแล้วจึงนำมาละลายน้ำให้ได้ความเข้มข้น 10 กรัม/มิลลิลิตร

เซลล์เอ็นอีบีปริทันต์ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดจากใบชาที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 25, 50, 100 และ 200 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เพื่อดูผลของสารสกัดจากใบชา ที่มีต่อ MMP-2 จากนั้นเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมมาใช้ในการทดลองถัดมา คือ การกระตุ้นเซลล์ด้วยสารหลังจากแบคทีเรียในสภาวะที่มีหรือไม่มีสารสกัดจากใบชาเขียว เป็นเวลา 48 ชั่วโมงแล้วจึงศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ MMP-2 ด้วยเทคนิค zymography

ผลการทดลอง

ตอนที่ 1 ผลของสารหลังจากแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงจากร่องลึกปริทันต์ของผู้ป่วย ต่อการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2

สารหลังจากแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงจากร่องลึกปริทันต์ของผู้ป่วย สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ในเซลล์เพาะเลี้ยงจากเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ของมนุษย์

สารหลังจากแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงจากร่องลึกปริทันต์ของผู้ป่วย เตรียมขึ้นตามวิธีที่อธิบายไว้ในวิธีการทดลอง และสารหลังในแต่ละชุดที่เตรียมได้ จะถูกนำมาทดสอบหาความเป็นพิษต่อทั้งเซลล์เหงือกด้วยวิธี MTT พบว่าที่ความเข้มข้น 20 และน้อยกว่า 20 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร ลงไป ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (รูปที่ 1.1A) จากนั้นจึงเลือกปริมาณของสารหลังที่ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ มาใช้ในการกระตุ้นเซลล์ ปริมาณของสารหลังที่ใช้จะระบุไว้เป็นไมโครลิตรของสารหลังที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเซลล์

เซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อเหงือก ถูกกระตุ้นด้วยสารหลังจากแบคทีเรียในปริมาณต่างๆ กันที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (รูปที่ 1.1B) จากนั้น นำอาหารเลี้ยงเซลล์มาวิเคราะห์การกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ด้วยวิธี zymography การตรวจสอบด้วยวิธีนี้ ใช้หลักการของการแยกเอนไซม์ด้วยกระแสไฟฟ้า (electrophoresis) ในอคริลามายด์เจล โดยผสมเจลาติน ซึ่งเป็น substrate ของเอนไซม์ MMP-2 ลงในอคริลามายด์เจลด้วย ภายหลังการแยกเอนไซม์ด้วยแล้ว จึงบ่มเจลในบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ซึ่งสามารถเปลี่ยนสถานะของเอนไซม์ทั้ง active และ latent MMP-2 ให้สามารถย่อยเจลาตินในตำแหน่งที่เอนไซม์อยู่บนแผ่นเจล ซึ่งโดยปกติแล้ว latent MMP-2 จะอยู่ที่ตำแหน่ง 72 กิโลดาลตัน ในขณะที่ active MMP-2 อยู่ที่ 62 กิโลดาลตัน และเมื่อนำแผ่นเจลไปย้อมสี บริเวณที่มีเอนไซม์ จะปรากฏเป็นแถบใส เนื่องจากเจลาตินในบริเวณนั้นถูกย่อย โดยทั่วไป เซลล์ fibroblast จะหลัง latent MMP-2 โดยไม่พบ active MMP-2 หากไม่มีการกระตุ้นที่เหมาะสม ดังนั้น แถบใสที่ปรากฏจะเกิดขึ้นแถบเดียวที่ 72 กิโลดาลตัน หากมีการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ก็จะมีแถบใสปรากฏขึ้นที่ตำแหน่ง 62 กิโลดาลตันด้วย

ผลการทดลองในรูปที่ 1.1 B แสดงว่าเซลล์เหงือกสามารถหลั่งเอนไซม์ MMP-2 ในรูป latent MMP-2 ออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยพบแถบใสบนแผ่นเจลในตำแหน่ง 72 กิโลดาลตันในกลุ่มควบคุม (กลุ่มควบคุมจะได้รับน้ำเลี้ยงเชื้อในปริมาณเท่ากับปริมาณสูงสุดของสารหลังที่ใช้กระตุ้นเซลล์ในการทดลองนั้นๆ) ในกลุ่มทดลองที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสารหลังจากแบคทีเรีย จะพบแถบใสเพิ่มขึ้นเป็นสองแถบ คือทั้งที่ตำแหน่ง 72 กิโลดาลตัน และที่ 62 กิโลดาลตัน ซึ่งตรงกับตำแหน่งของ latent และ active MMP-2 แสดงให้เห็นว่า สารหลังจากแบคทีเรียชนิดที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต สามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ได้ และเมื่อทำการทดสอบว่าสารหลัง

ที่เตรียมในแต่ละชุด สามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ที่ปริมาณสารหลังเท่าใด หรือที่ความเข้มข้นใด เป็นความเข้มข้นแรกแล้ว ก็จะใช้ความเข้มข้นนั้นๆ ในการกระตุ้นเซลล์ในการทดลองต่อไป

ในการทดลองถัดมา สารหลังจากแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงจากร่องลึกปริทันต์ ถูกนำมากระตุ้นทั้งเซลล์เหงือกและเซลล์เอ็นยัดปริทันต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ดังแสดงผลในรูปที่ 1.2 โดยปริมาณของสารหลังที่ใช้ได้ผ่านการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เช่นเดียวกับในรูป 1.1A แล้ว (ไม่ได้แสดงผลไว้) ในรูปที่ 1.2 แสดงว่าเซลล์เอ็นยัดปริทันต์ (PDL) สามารถหลั่งเอนไซม์ MMP-2 ในรูป latent MMP-2 ออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้เช่นเดียวกับเซลล์เหงือก (GF) โดยพบแถบใสบนแผ่นเจลในตำแหน่ง 72 กิโลดาลตันเช่นเดียวกัน และในกลุ่มทดลองที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสารหลังจากแบคทีเรีย จะพบแถบใสเพิ่มขึ้นเป็นสองแถบ คือทั้งที่ตำแหน่ง 72 กิโลดาลตัน และที่ 62 กิโลดาลตัน ซึ่งตรงกับตำแหน่งของ latent และ active MMP-2 เช่นเดียวกับผลในรูปที่ 1.1B

อย่างไรก็ดี ผลการทดลองในรูปที่ 1.2 เป็นการกระตุ้นเซลล์ด้วยสารหลังเพียง 48 ชั่วโมง และระดับการตอบสนองของเซลล์เหงือกจะไม่ชัดเจนเหมือนผลที่ 72 ชั่วโมงในรูปที่ 1.1B ในขณะที่ผลการตอบสนองของเซลล์เอ็นยัดปริทันต์นั้น จะมีความชัดเจนกว่า และในการทดลองต่อไป ผลที่แสดงจะมาจากเซลล์เอ็นยัดปริทันต์ นอกจากจะระบุไว้เป็นอย่างอื่น

ข้อสังเกตประการหนึ่งจากผลการทดลองที่ได้ คือความเข้มของแถบใสที่พบนั้น ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง ซึ่งสะท้อนว่า ระดับของ MMP-2 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ไม่มีความแตกต่างกันมากนัก และเพื่อเป็นการยืนยันข้อสังเกตนี้ คณะผู้วิจัยได้ตรวจสอบระดับการหลั่งเอนไซม์ MMP-2 ด้วยวิธี Western analysis ร่วมกับการตรวจสอบระดับการแสดงออกของ mRNA ของ MMP-2 ด้วยวิธี RT-PCR ดังแสดงผลในรูปที่ 1.3 โดยจะเห็นว่า ปริมาณของเอนไซม์ MMP-2 ที่ตรวจสอบได้ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองไม่มีความแตกต่างกันนัก รวมทั้งจะพบเอนไซม์ที่ตำแหน่ง 62 กิโลดาลตันเฉพาะในกลุ่มทดลองด้วย ซึ่งยืนยันผลของ zymography ที่แสดงว่าสารหลังจากแบคทีเรียสามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 นอกจากนี้ ผลจาก RT-PCR ก็ไม่พบความแตกต่างในการแสดงออกของ mRNA ของ MMP-2 ผลการทดลองนี้ แสดงว่าสารหลังจากแบคทีเรีย ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณการหลั่งเอนไซม์ MMP-2 จากเซลล์เหงือก และเซลล์เอ็นยัดปริทันต์

ในรูปที่ 1.4 แสดงผลของสารหลังจากแบคทีเรียที่เตรียมจากผู้ป่วย 3 คนถูกนำมาทดสอบกับเซลล์เพาะเลี้ยงจากเหงือก และพบว่าสารหลังจากแบคทีเรียทั้งหมดมีความสามารถในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ได้

คล้ายคลึงกัน โดยอาจแตกต่างกันที่ปริมาณที่ใช้กระตุ้นเล็กน้อย สารหลังเหล่านี้ยังสามารถกระตุ้นเซลล์เพาะเลี้ยงที่เตรียมจากผู้ป่วยคนอื่นๆ อีก 2 คนด้วย (ไม่ได้แสดงผลไว้ เนื่องจากเหมือนกับผลในรูปที่ 1.4)

การกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 โดยสารหลังจากแบคทีเรีย เกิดจากสารที่ทนทานต่อความร้อน

เพื่อเป็นการตรวจสอบเบื้องต้นถึงคุณสมบัติของสารในสารหลังที่มีผลต่อการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 สารหลังจากแบคทีเรียถูกนำไปต้มเป็นเวลา 15 นาที เพื่อทำลายคุณสมบัติของสารในสารหลังที่ไวต่อความร้อน ผลการทดลองในรูปที่ 1.5 แสดงให้เห็นว่าการต้มสารหลังด้วยความร้อนเป็นเวลา 15 นาที ไม่สามารถยับยั้งผลของสารหลัง ในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ได้ แสดงว่าการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 น่าจะเกิดจากสารที่มีความทนทานต่อความร้อน

การกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 โดยสารหลังจากแบคทีเรียเป็นกลไกชนิด MMP-dependent

เซลล์เพาะเลี้ยงถูกกระตุ้นด้วยสารหลังจากแบคทีเรีย ในสภาวะที่มี aprotinin 0.1 TIU หรือ EGTA 0.1 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการทำงานของ serine protease และ MMP protease ตามลำดับ เพื่อเป็นการศึกษาในเบื้องต้นว่า กลไกการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 โดยสารหลังจากแบคทีเรีย เป็นกระบวนการที่ต้องการ proteases หรือไม่ และต้องการ proteases กลุ่มใด

ผลการทดลองในรูปที่ 1.6 แสดงให้เห็นว่าผลของสารหลังในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ถูกยับยั้งได้ด้วย EGTA หรือ MMP inhibitor แสดงว่าการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 โดยสารหลังจากแบคทีเรียนั้น ต้องการการทำงานของเอนไซม์ MMP ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับโมเดลที่เสนอโดย Strongin และคณะ (1993) ว่า กลไกการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 นั้น ต้องการเอนไซม์ MT-MMP บนผิวเซลล์

และเมื่อทำการตรวจสอบระดับการแสดงออกของเอนไซม์ MT-MMP ของเซลล์เพาะเลี้ยงจากเซลล์เอ็นยัดปริทันต์ ในสภาวะที่ได้รับหรือไม่ได้รับการกระตุ้นด้วยสารหลังจากแบคทีเรีย ด้วยเทคนิค RT-PCR ดังแสดงไว้ในรูปที่ 1.7 ผลการทดลองพบว่า ระดับการแสดงออกของ MT-MMP ในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารหลังจากแบคทีเรียจะสูงกว่าระดับการแสดงออกในกลุ่มควบคุม โดยในการทดลองจะใช้ระดับของการแสดงออกของ GAPDH เป็น internal control

สารหลังจาก *P.gingivalis* และ *A.actinomycetemcomitans* สามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2

เพื่อเป็นการตรวจสอบว่าแบคทีเรียชนิดใดที่สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 คณะผู้วิจัยได้ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียชนิดที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโตขึ้น 3 สายพันธุ์ คือ *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* และ *Fusobacterium nucleatum* จากนั้นเตรียมสารหลังจากแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์ และนำมากระตุ้นเซลล์เอ็นดोทีทนต์ ผลการทดลองแสดงว่า สารหลังจาก *P.gingivalis* และ *A.actinomycetemcomitans* สามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ได้ ในขณะที่สารหลังจาก *F.nucleatum* ไม่มีผลในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 (รูปที่ 1.8A)

ในรูปที่ 1.8B แสดงความเป็นพิษของสารหลังจาก *P.gingivalis* และ *A.actinomycetemcomitans* ที่มีต่อเซลล์เอ็นดोทีทนต์ ในความเข้มข้นที่ใช้กระตุ้นเซลล์ในรูปที่ 1.8A ผลการทดลองแสดงว่าระดับของสารหลังที่สามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 คือที่ 5 และ 10 ไมโครลิตรของสารหลัง/มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเซลล์ ใน *P.gingivalis* และที่ 25-50 ไมโครลิตรของสารหลัง/มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเซลล์ของ *A.actinomycetemcomitans* ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์

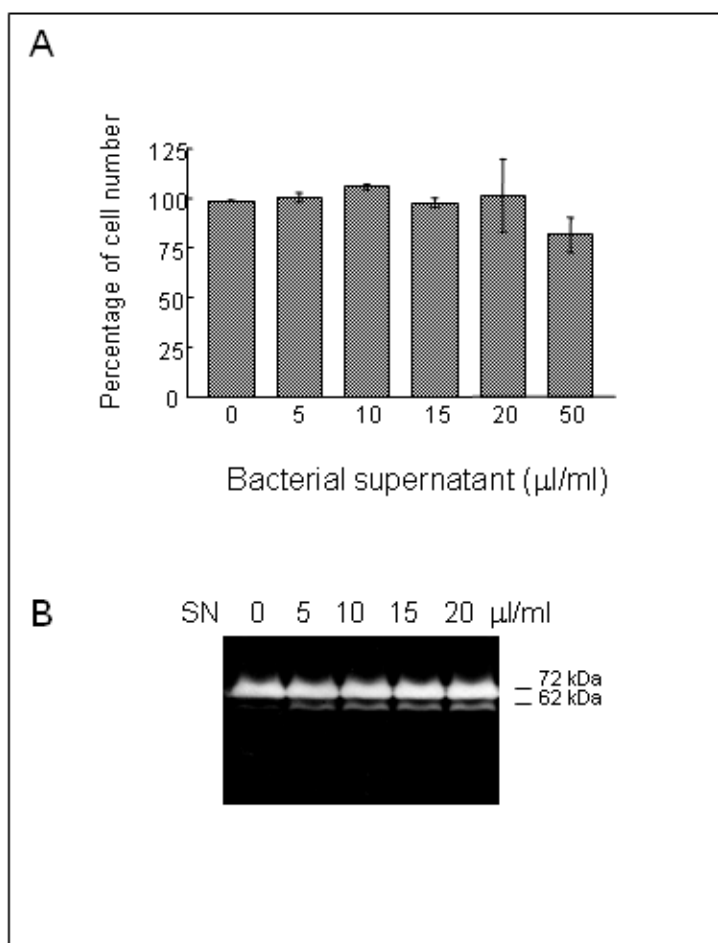


Figure 1.1

รูปที่ 1.1 การทดสอบความเป็นพิษของสารหลังจากแบคทีเรีย

สารหลังจากแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงจากร่องลึกปริทันต์ของผู้ป่วย ถูกนำมาทดสอบความเป็นพิษด้วย MTT assay โดยใช้ความเข้มข้นที่ 5, 10, 15, 20 และ 50 ไมโครลิตร/มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเซลล์ กระตุ้นเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงว่า ความเข้มข้นที่ 0-20 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ (รูป A) และเมื่อนำสารหลัง (SN) ไปกระตุ้นเซลล์เพาะเลี้ยงจากเหงือกเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าสารหลังสามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 โดยเปลี่ยนจาก latent (72 kDa) เป็น active (62 kDa) MMP-2 (รูป B)

กราฟในรูป A แสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลองซ้ำสาม โดยใช้เซลล์ที่เตรียมจากผู้ป่วย 3 คน

ภาพของไซโมแกรมในรูป B และในรูปอื่นๆที่เหลือเป็นการแสดงผลของการทดลองหนึ่งจากการทดลองทั้งหมดสามครั้ง

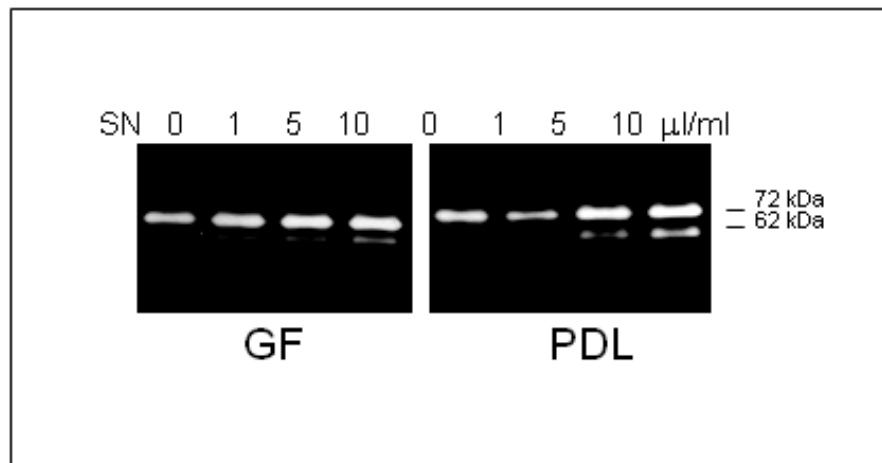


Figure 1.2

รูปที่ 1.2 สารหลังจากแบคทีเรียสามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ในเซลล์เหงือกและเซลล์เอ็นดอปรีตันต์

สารหลังจากแบคทีเรีย (SN) ถูกนำมากระตุ้นเซลล์เพาะเลี้ยงจากเหงือกและจากเอ็นดอปรีตันต์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าสารหลังนี้สามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 (สังเกตการปรากฏขึ้นของ 62 kDa MMP-2) ทั้งในเซลล์เหงือกและเซลล์เอ็นดอปรีตันต์

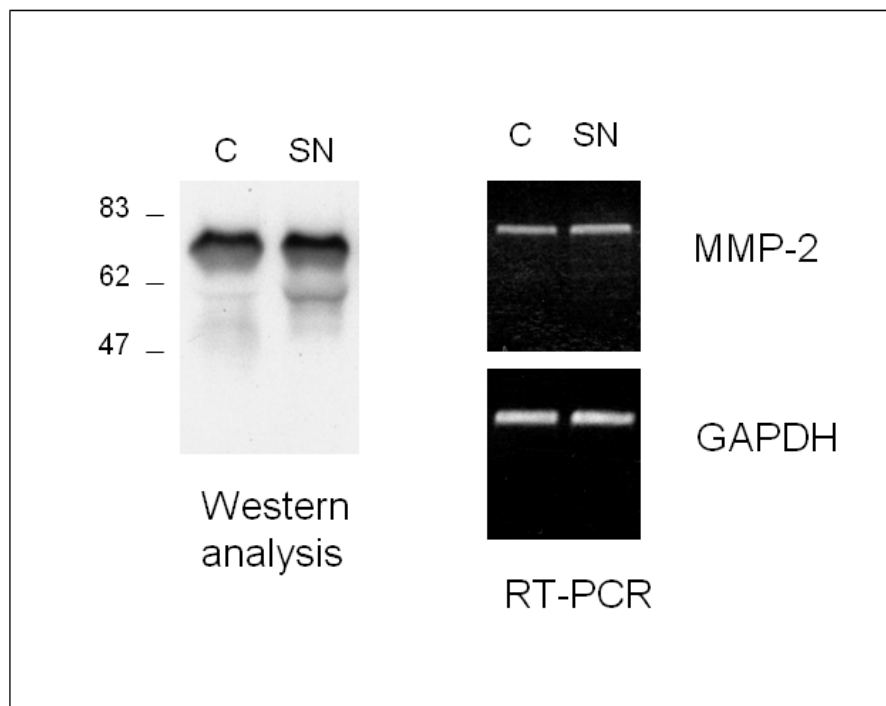


Figure 1.3

รูปที่ 1.3 การตรวจสอบระดับของ MMP-2 ด้วย Western และ RT-PCR analysis

ระดับโปรตีน MMP-2 ในอาหารเลี้ยงเซลล์เอ็นโดปริทันต์ ถูกนำมาวิเคราะห์ระดับ MMP-2 ด้วยวิธี Western analysis ผลการทดลองสนับสนุนผลจากเทคนิค zymography ว่าสารหลังจากแบคทีเรีย (SN) มีผลในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ในระดับโปรตีน แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงปริมาณที่ชัดเจน และเมื่อวิเคราะห์ในระดับของ mRNA ด้วย RT-PCR ก็พบว่าสารหลังไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับ mRNA ของ MMP-2 โดยเปรียบเทียบต่อระดับการแสดงออกของ GAPDH ที่เท่ากัน

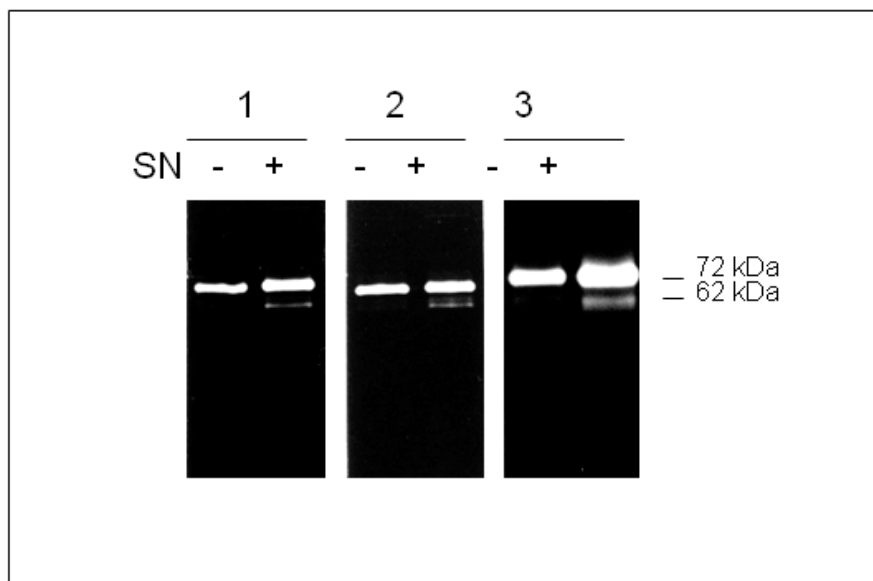


Figure 1.4

รูปที่ 1.4 ผลของสารหลังจากแบคทีเรียในกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ในเซลล์เหงือก

เซลล์เพาะเลี้ยงจากเหงือก ถูกกระตุ้นด้วยสารหลังของแบคทีเรีย (SN) จากผู้ป่วย 3 ราย (1,2,3) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และวิเคราะห์การกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ด้วยเทคนิค zymography ผลการทดลองแสดงว่า สารหลังของแบคทีเรียจากผู้ป่วยทั้งสามราย (SN+) สามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 (พบ 62 kDa MMP-2) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (SN-) ตำแหน่งของ pro-MMP-2 คือที่ 72 กิโลดาลตัน (72 kDa)

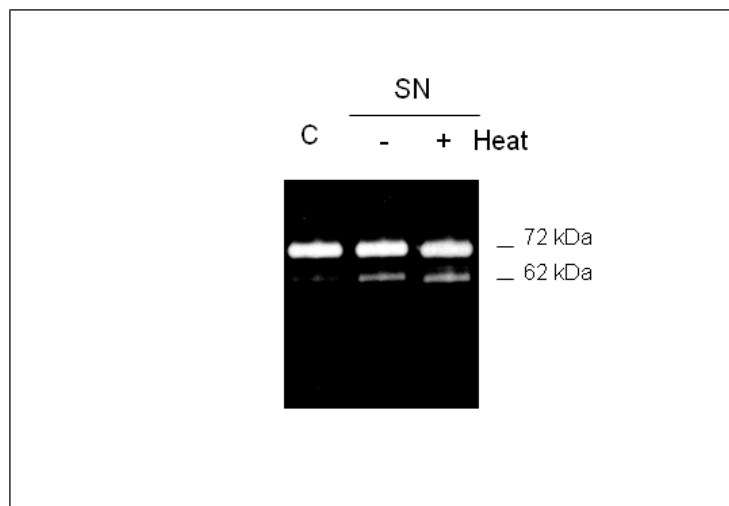


Figure 1.5

รูปที่ 1.5 ความร้อนไม่สามารถทำลายการกระตุ้น MMP-2 ที่เกิดจากสารหลังจากแบคทีเรีย

สารหลังจากแบคทีเรียที่ผ่านการต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที (Heat +) ถูกนำไปกระตุ้นเซลล์เพื่อเปรียบเทียบกับผลของสารหลังที่ไม่ผ่านความร้อน (Heat -) ผลปรากฏว่าความร้อนไม่สามารถทำลายความสามารถในการกระตุ้น MMP-2 (62 kDa MMP-2) ของสารหลังได้

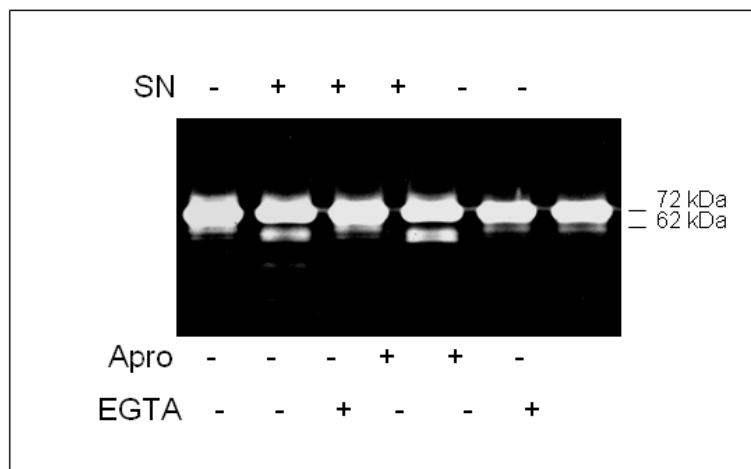


Figure 1.6

รูปที่ 1.6 ผลของสารหลังในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ถูกยับยั้งได้ด้วย EGTA

เซลล์เพาะเลี้ยงถูกกระตุ้นด้วยสารหลังจากแบคทีเรียเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับสารหลังที่มี Aprotinin 0.1 TIU (Apro) หรือ EGTA 0.1 มิลลิโมลาร์ร่วมด้วย ผลแสดงว่าการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ถูกยับยั้งได้ด้วย EGTA (แถวที่ 3) ซึ่งเป็น MMP inhibitor แต่ไม่สามารถถูกยับยั้งได้ด้วย Aprotinin (แถวที่ 4) โดยที่ EGTA และ Aprotinin ไม่มีผลต่อ MMP-2 (แถวที่ 5 และ 6)

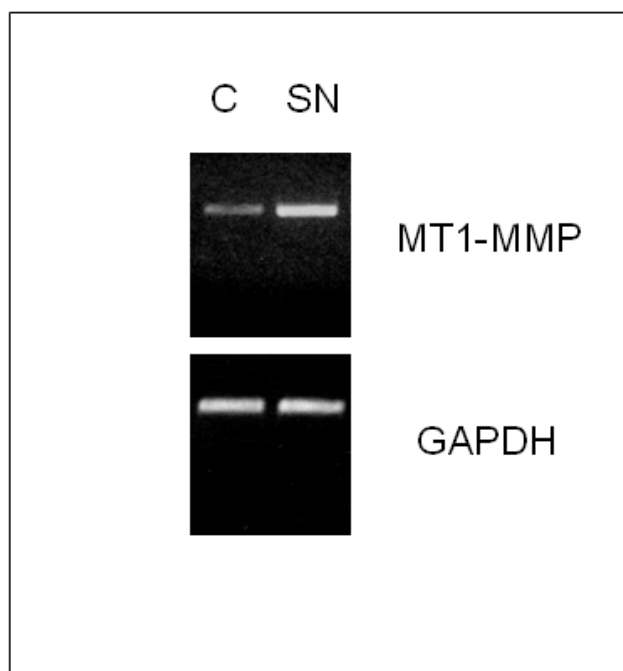


Figure 1.7

รูปที่ 1.7 สารหลังจากแบคทีเรียเพิ่มระดับการแสดงออกของ MT1-MMP

RNA จากเซลล์เอ็นโดพริทนต์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสารหลังจากแบคทีเรีย (SN) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ถูกนำมาวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ MT1-MMP ด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่าระดับของ mRNA ของ MT1-MMP เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (C) และใช้ระดับของ GAPDH เป็น internal control

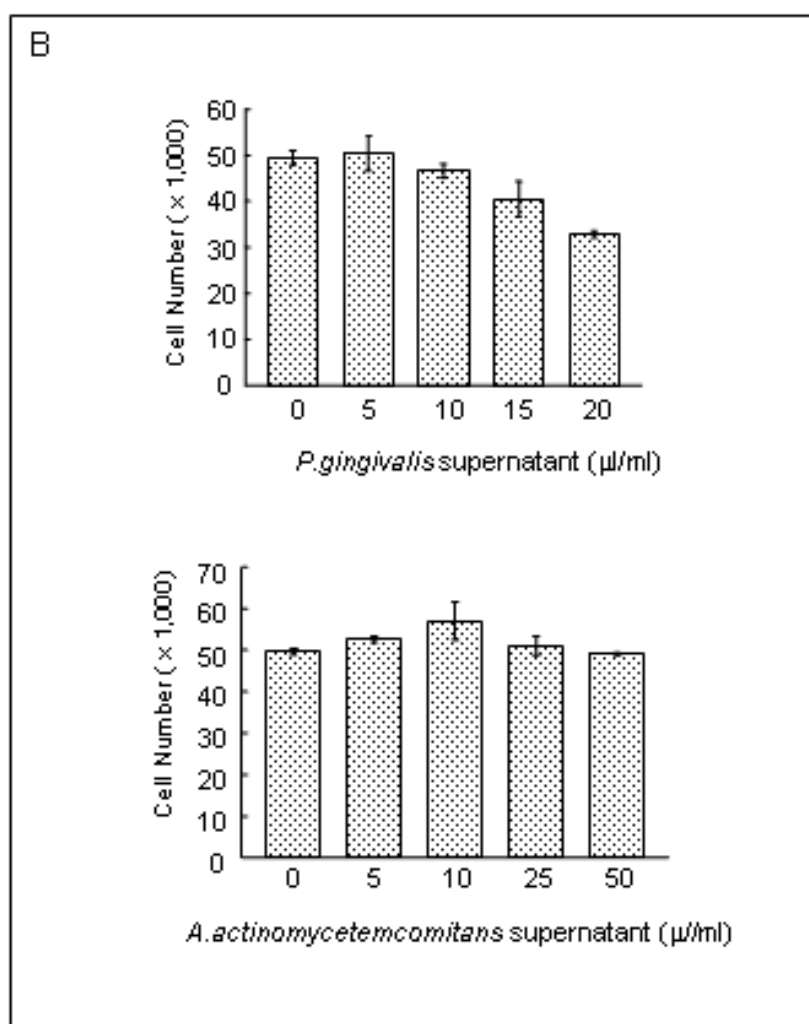
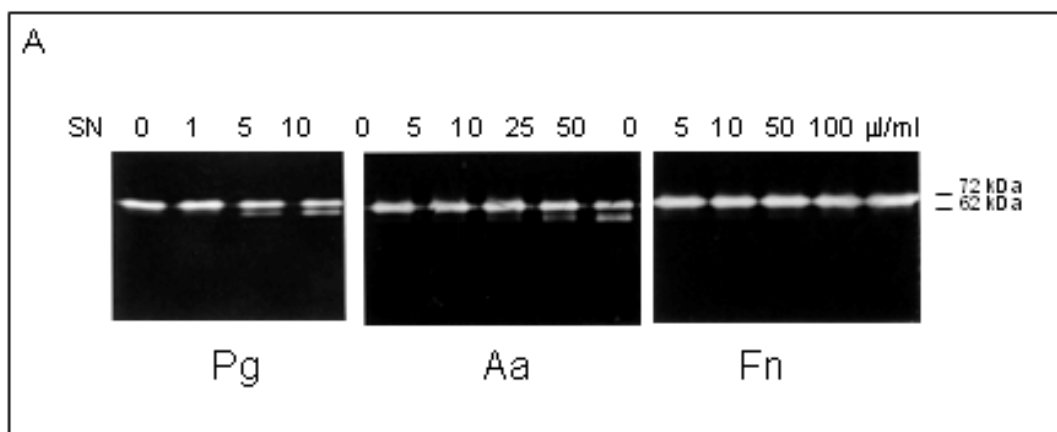


Figure 1.8

รูปที่ 1.8 ผลของสารหลังจากแบคทีเรียชนิด *P.gingivalis*, *A.actinomycetemcomitans* และ *F.nucleatum* ในกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ในเซลล์เอ็นโดปริทันต์

เซลล์เอ็นโดปริทันต์ ถูกกระตุ้นด้วยสารหลังจากเชื้อมาตรฐาน 3 ชนิด คือ *P.gingivalis* (Pg) สายพันธุ์ ATCC 53978, *A.actinomycetemcomitans* (Aa) สายพันธุ์ ATCC 43718 และ *F.nucleatum* (Fn) สายพันธุ์ ATCC 25586 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อใช้สารหลัง (SN) จาก Pg, Aa และ Fn ด้วยความเข้มข้นต่างๆ กันในหน่วยไมโครลิตร/มิลลิลิตร การกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ถูกวิเคราะห์ด้วยเทคนิค zymography พบว่าสารหลังจาก Pg และ Aa สามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 (62 kDa) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (0) และผลของการกระตุ้นจะแปรผันตามความเข้มข้นของสารหลังที่ใช้กระตุ้น ในขณะที่สารหลังจาก Fn ไม่ให้ผลในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ตำแหน่งของ pro-MMP-2 ที่ 72 kDa (รูป A)

รูป B เป็นกราฟทดสอบความเป็นพิษของสารหลังที่เตรียมจาก Pg และ Aa ในความเข้มข้นเดียวกับที่ใช้ในรูป A ผลแสดงว่า ความเข้มข้นของสารหลังจาก Pg และ Aa ที่ให้ผลในการกระตุ้นนั้น ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ผลการทดลองแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลองซ้ำสาม โดยใช้เซลล์ที่เตรียมจากผู้ป่วย 3 คน

ตอนที่ 2 ผลของสารหลังจาก *P.gingivalis* (W50 ATCC 53978) ต่อการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2

สารหลังจาก *P.gingivalis* สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ในเซลล์เอ็นอีดีปริทันต์

ดังแสดงในตอนท้ายของการทดลองตอนที่ 1 ว่าสารหลังจากเชื้อ *P.gingivalis* สามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ได้ การทดลองในตอนนี้ จะศึกษารายละเอียดเพิ่มเติมเกี่ยวกับกลไกการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 โดยสารหลังจาก *P.gingivalis*

สารหลังจากเชื้อ *P.gingivalis* เตรียมขึ้นด้วยวิธีการเดียวกับสารหลังจากเชื้อที่เพาะเลี้ยงจากร่องลึกปริทันต์ของผู้ป่วย ก่อนจะศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสารหลังจาก *P.gingivalis* กับเอนไซม์ MMP-2 สารหลังที่เตรียมได้ถูกนำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เอ็นอีดีปริทันต์ก่อนด้วยวิธี MTT assay ดังแสดงผลในรูปที่ 2.1A และสารหลังที่เตรียมได้ในแต่ละครั้ง จะต้องนำมาทดสอบความเป็นพิษก่อนที่จะแบ่งเก็บ (aliquot) เป็น stock สำหรับนำไปทดสอบกับเซลล์ทุกครั้ง

ผลการทดลองในรูปที่ 2.1B แสดงว่า สารหลังจาก *P.gingivalis* สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 จากเซลล์เอ็นอีดีปริทันต์ได้ เมื่อกระตุ้นเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เช่นเดียวกับสารหลังที่เตรียมได้จากเชื้อที่เพาะเลี้ยงจากร่องลึกปริทันต์ของผู้ป่วย

เพื่อเป็นการยืนยันผลของ zymography คณะผู้วิจัยได้ตรวจสอบเอนไซม์ MMP-2 ด้วยวิธี Western analysis ควบคู่กับ gelatin zymography ผลการทดลองในรูปที่ 2.2A แสดงว่าสารหลังจาก *P.gingivalis* สามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค zymography และเมื่อนำอาหารเลี้ยงเซลล์นั้นไปตรวจสอบเอนไซม์ MMP-2 ด้วยเทคนิค Western analysis (รูป 2.2B) จะพบ active MMP-2 ที่ตำแหน่ง 62 กิโลดาลตันในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสารหลัง โดยไม่พบในกลุ่มควบคุม ซึ่งยืนยันความสามารถของสารหลังจาก *P.gingivalis* ในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2

เพื่อเป็นการตรวจสอบว่าผลการทดลองที่ได้นี้ เกิดขึ้นเฉพาะในเซลล์เอ็นอีดีปริทันต์หรือไม่ เซลล์จากเนื้อเยื่อเหงือก และจากเนื้อเยื่อโพรงฟันของมนุษย์ถูกเพาะเลี้ยงขึ้นด้วยวิธีที่คล้ายกับการเพาะเลี้ยงเซลล์เอ็นอีดีปริทันต์ และกระตุ้นด้วยสารหลังจาก *P.gingivalis* เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผลการทดลองในรูปที่ 2.2C แสดงว่าสารหลังจาก *P.gingivalis* สามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ในเซลล์เหงือกและเซลล์โพรงฟันได้เช่นเดียวกับเซลล์เอ็นอีดีปริทันต์ ซึ่งสะท้อนว่าผลของสารหลังนั้นไม่ได้มีความจำเพาะต่อเซลล์ชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น

ในการทดลองตอนที่ 1 นั้น ผลการทดลองแสดงว่าสารในสารหลัที่สามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 นั้น มีความทนทานต่อความร้อน เพื่อตรวจสอบผลดังกล่าว สารหลังจาก *P.gingivalis* ถูกนำไปต้มเป็นเวลา 15 นาทีก่อนนำไปกระตุ้นเซลล์ ผลการทดลองในรูปที่ 2.2D แสดงว่าการต้มนั้นสามารถทำลายความสามารถในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ได้ ซึ่งแตกต่างจากผลของสารหลัที่เพาะเลี้ยงจากร่องลึกปริทันต์ของผู้ป่วย และน่าจะเป็นไปได้ว่าสารในสารหลัของ *P.gingivalis* ที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 นั้นเป็นสารในกลุ่มของโปรตีนที่ถูกทำลายได้ด้วยความร้อน

การกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 โดยสารหลังจาก *P.gingivalis* เกิดจากการเพิ่มระดับของ MT1-MMP ในเซลล์เอ็นโดปริทันต์

เมื่อทดลองกระตุ้นเซลล์ด้วยสารหลังจากเชื้อ *P.gingivalis* เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะที่มี protease inhibitors 3 กลุ่มคือ Phenanthroline และ EDTA ซึ่งเป็น MMP inhibitors, Aprotinin และ PMSF ซึ่งเป็น serine protease inhibitors และ Leupeptin ซึ่งเป็น cysteine protease inhibitor ผลการทดสอบในรูปที่ 2.3 แสดงว่า Phenanthroline และ EDTA สามารถยับยั้งผลของสารหลัในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ในขณะที่ Aprotinin, PMSF และ Leupeptin ไม่มีผลในการยับยั้ง ซึ่งสะท้อนว่ากลไกการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 โดยสารหลังจาก *P.gingivalis* นั้น น่าจะเป็น MMP-dependent mechanism คล้ายกับที่พบในการทดลองตอนที่ 1

ในการทดลองต่อมา คณะผู้วิจัยได้ตรวจสอบระดับของเอนไซม์ MT1-MMP ซึ่งมีรายงานว่าเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ในเซลล์เอ็นโดปริทันต์ เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับสารหลังจาก *P.gingivalis* ผลการทดลองในรูปที่ 2.4 แสดงระดับการแสดงออกของ MT1-MMP เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี RT-PCR และจะพบว่า เมื่อเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของ GAPDH ซึ่งเป็น house keeping gene ที่เท่ากัน ระดับการแสดงออกของ MT1-MMP ในเซลล์กลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสารหลังจาก *P.gingivalis* จะมีระดับการแสดงออกของ MT1-MMP ที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างชัดเจน

การตรวจสอบ MT1-MMP ในระดับโปรตีนแสดงไว้ในรูปที่ 2.5 โดยโปรตีน MT1-MMP จะมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 60 กิโลดาลตัน และเมื่อทำการกระตุ้น MMP-2 แล้ว เอนไซม์ MT1-MMP เองจะถูกตัดให้สั้นลงเหลือประมาณ 45 กิโลดาลตัน ในรูปที่ 2.5 แสดง positive control คือเซลล์ HT1080 ซึ่งเป็น human fibrosarcoma cell

line ที่จะพบการแสดงออกของ MT1-MMP ทั้งที่ 60 และ 45 กิโลดาลตัน ส่วนเซลล์ MCF-7 ซึ่งเป็น human breast cancer cell line จะไม่พบการแสดงออกของ MT1-MMP และใช้เป็น negative control

ผลการทดลองในรูปที่ 2.5 แสดงว่า เซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสารหลังจาก *P.gingivalis* จะมีระดับของ MT1-MMP สูงกว่าเซลล์ในกลุ่มควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับผลจากการวิเคราะห์ด้วย RT-PCR ในรูปที่ 2.4 และการเพิ่มขึ้นของ MT1-MMP นี้ และโดยหน้าที่หนึ่งของ MT1-MMP คือการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ดังนั้นผลการทดลองในรูปที่ 2.4 และ 2.5 จึงเป็นไปในทิศทางเดียวกับผลในรูปที่ 2.1 และ 2.3

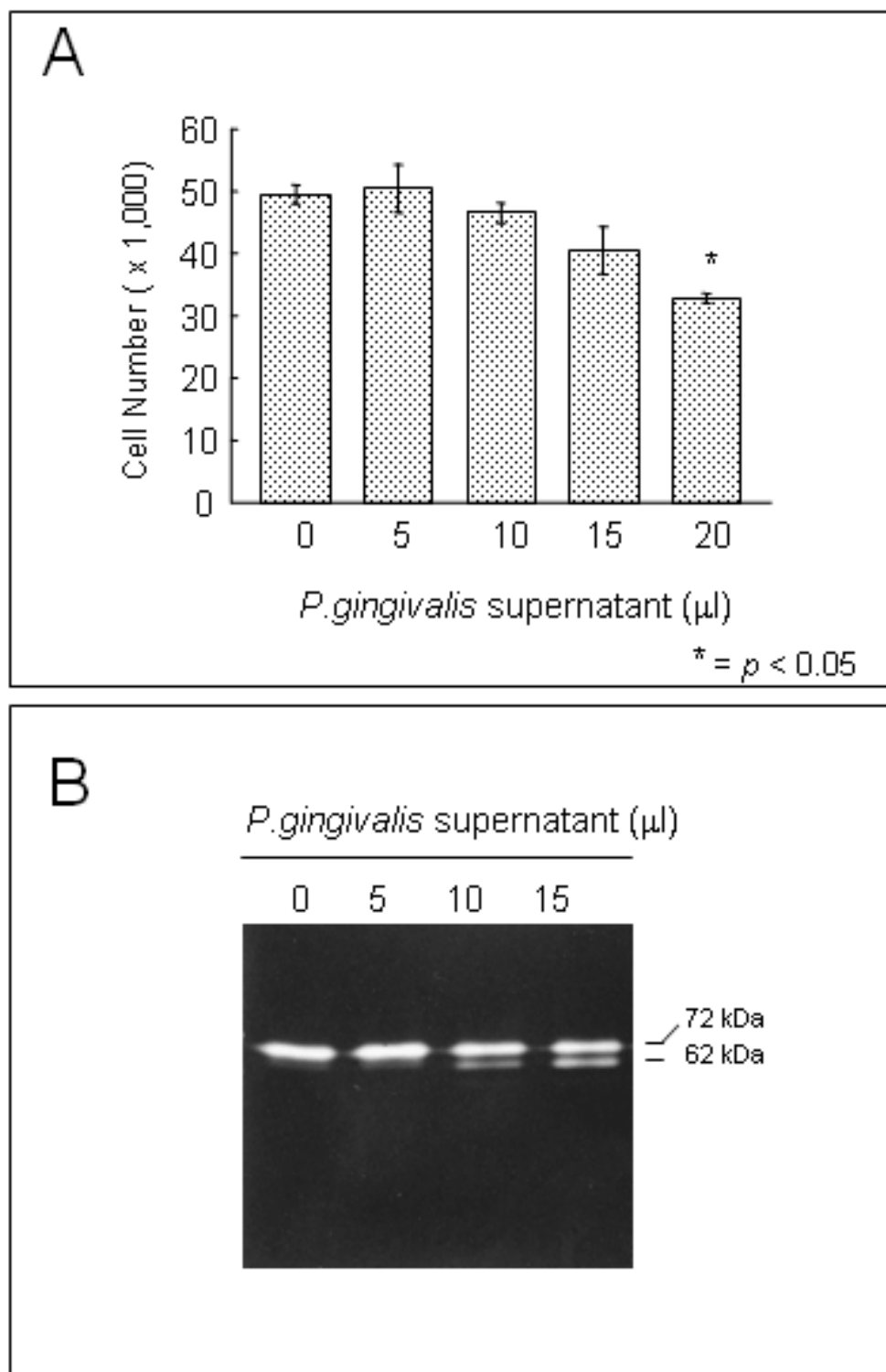


Figure 2.1

รูปที่ 2.1 สารหลังจาก *P.gingivalis* สามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 โดยไม่เป็นพิษต่อเซลล์

สารหลังที่เตรียมจาก *P.gingivalis* ถูกนำไปทดสอบความเป็นพิษกับเซลล์เอนโดทีลียัล พบว่าที่ความเข้มข้น 5-15 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร ไม่แสดงความเป็นพิษ (รูป A) และเมื่อนำสารหลังนี้ไปกระตุ้นเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะเห็นว่าการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 (62 kDa) โดยการกระตุ้นเพิ่มขึ้นผันแปรตามความเข้มข้นของสารหลังดังแสดงในรูป B

กราฟในรูป A แสดงค่าเฉลี่ย + ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลองซ้ำสาม โดยใช้เซลล์ที่เตรียมจากผู้ป่วยสามคน

* แสดงระดับความเป็นพิษของสารหลังเมื่อทดสอบด้วย one way ANOVA ($p < 0.05$) และตำแหน่ง 72 kDa และ 62 kDa ทางขวามือ แสดงตำแหน่งของ latent และ active MMP-2 ใน zymography

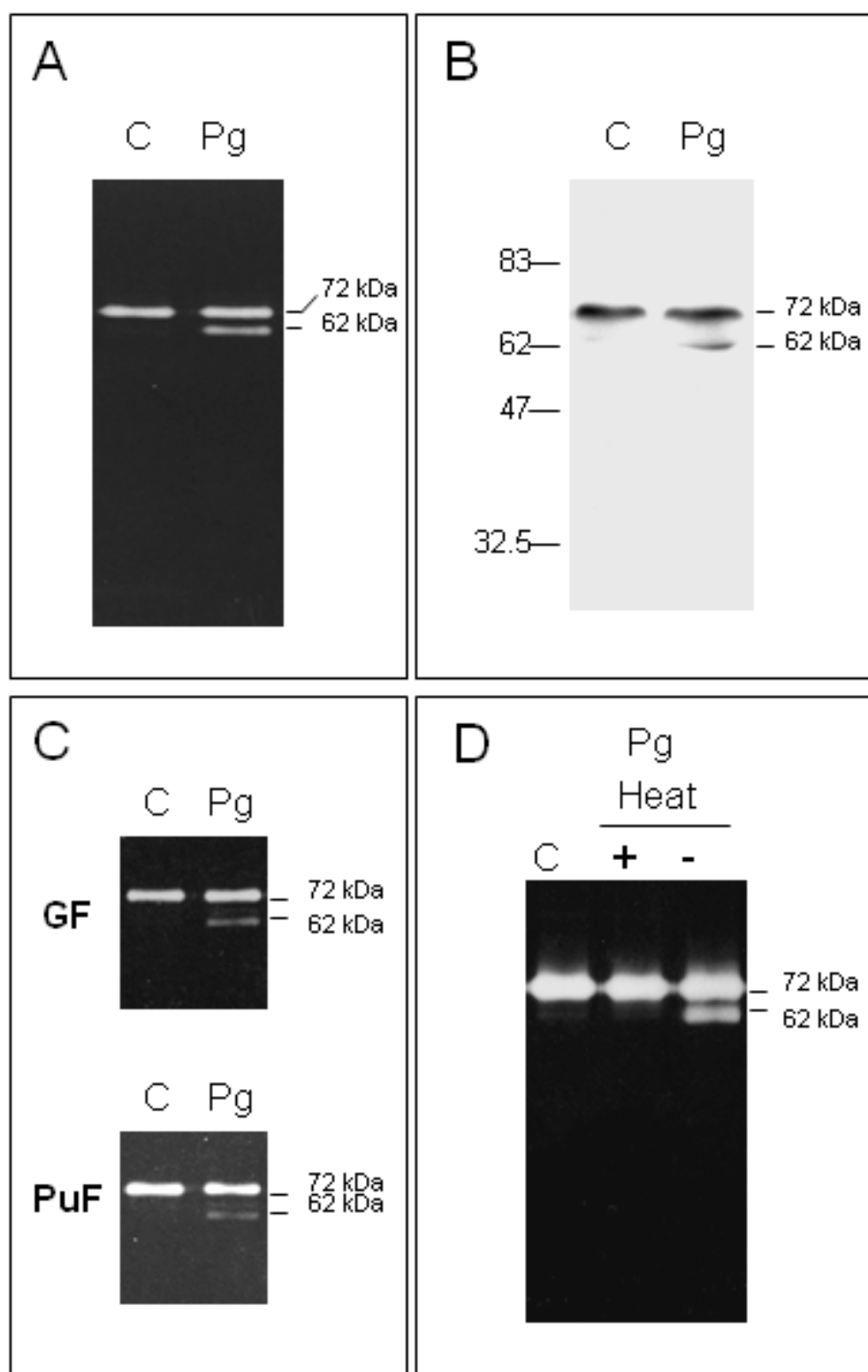


Figure 2.2

รูปที่ 2.2 สารหลังจาก *P. gingivalis* มีผลต่อเซลล์เหงือกและเซลล์โพรงฟันเช่นเดียวกับเซลล์เอ็นดอทีลียัล

รูป A และ B เป็นการทดสอบในเซลล์เอ็นดอทีลียัลที่ยืนยันว่าสารหลังจาก *P. gingivalis* มีผลกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 (62 kDa) เมื่อตรวจสอบด้วย zymography (A) และ Western analysis (B)

รูป C เป็นภาพ zymography ที่แสดงให้เห็นว่า สารหลังมีผลต่อเซลล์เหงือกและเซลล์โพรงฟันด้วยเช่นกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบผลของสารหลังนี้ที่ผ่าน (Heat +) และไม่ผ่าน (Heat -) ความร้อน โดยมีเซลล์ที่ไม่ได้รับสารหลังเป็นกลุ่มควบคุม (C) ปรากฏว่าความร้อนสามารถทำลายอิทธิพลของสารหลังจาก *P. gingivalis* ได้ ตำแหน่ง 72 kDa และ 62 kDa ทางขวามือ แสดงตำแหน่งของ latent และ active MMP-2 ใน zymography

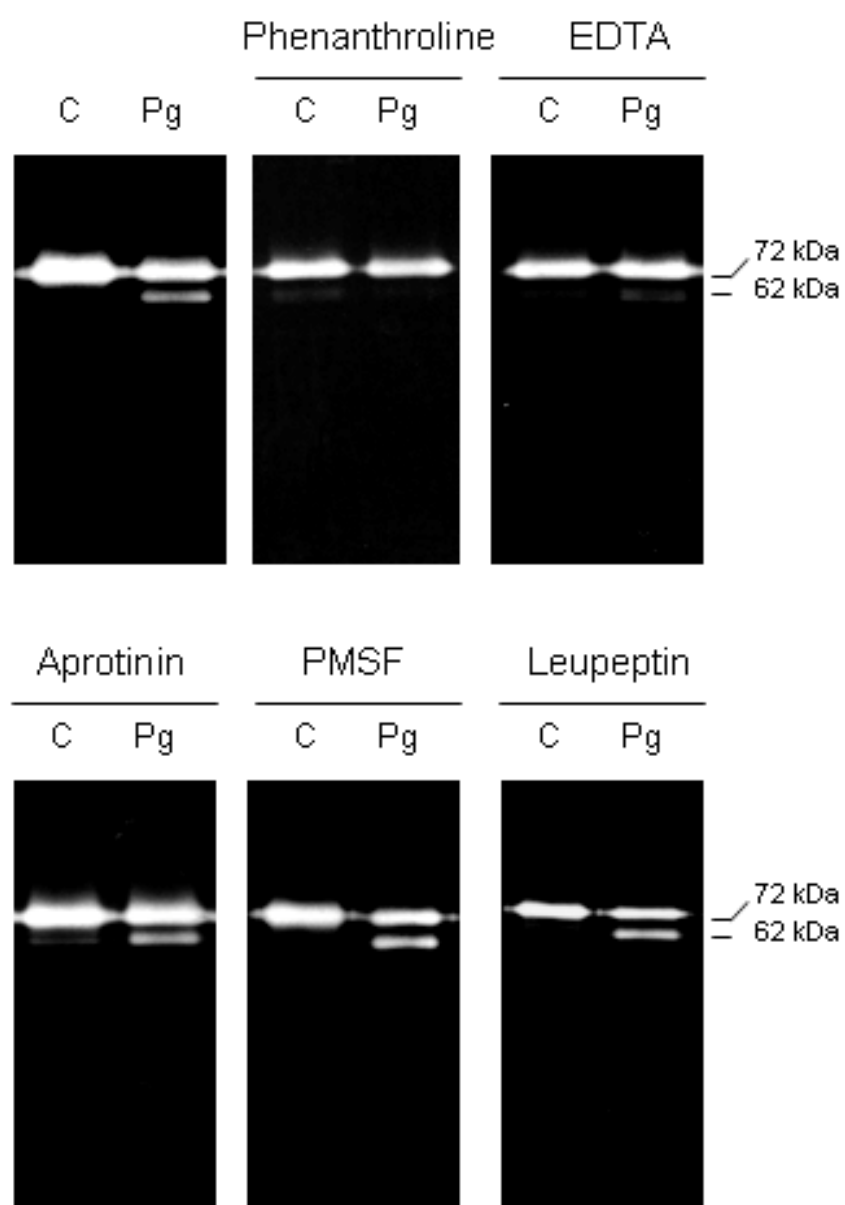


Figure 2.3

รูปที่ 2.3 ภาพ Zymography แสดงการยับยั้งการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ด้วย protease inhibitors

เซลล์เอ็นไนด์ปริทันต์ถูกกระตุ้นด้วยสารหลังจาก *P.gingivalis* (Pg) ในสภาวะที่มีหรือไม่มี protease inhibitors 5 ชนิด คือ Phenanthroline, EDTA, Aprotinin, PMSF และ Leupeptin เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงว่าสารหลังจาก Pg สามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 (62 kDa) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (C) การเติม Phenanthroline และ EDTA สามารถยับยั้งการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ได้ในขณะที่การใช้ Aprotinin, PMSF และ Leupeptin ไม่สามารถยับยั้งการทำงานของ MMP-2, 72 kDa คือตำแหน่งของ pro-MMP-2

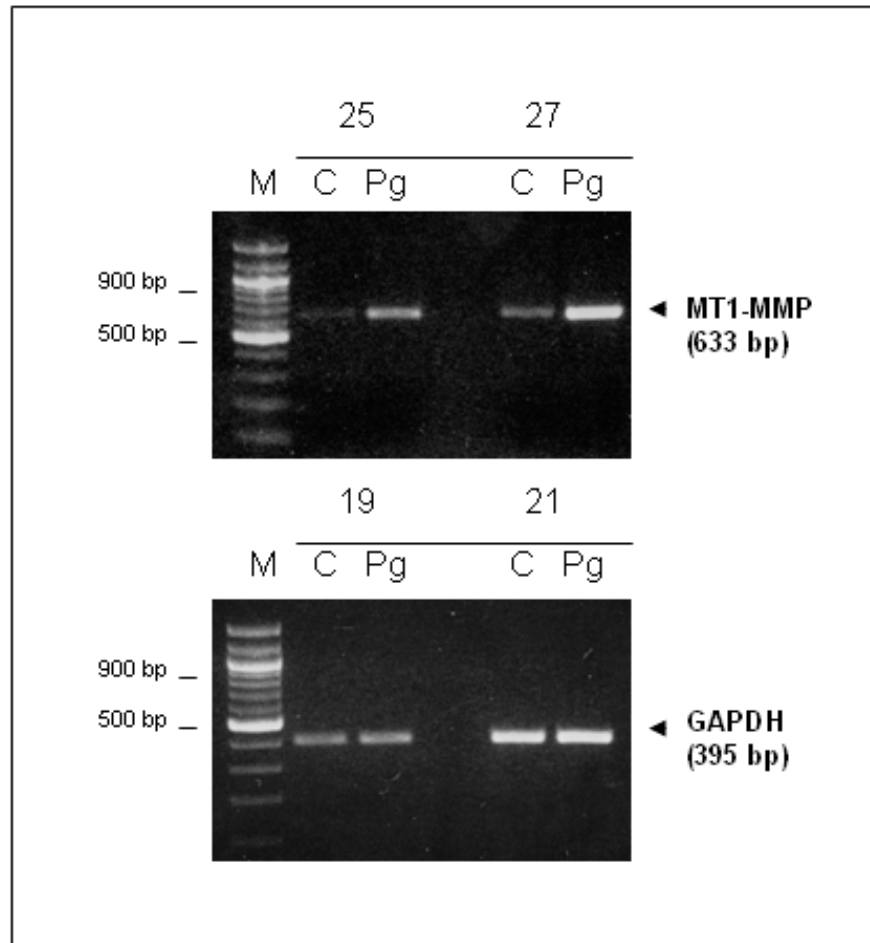


Figure 2.4

รูปที่ 2.4 สารหลังจาก *P. gingivalis* เพิ่มระดับการแสดงออกของ MT1-MMP

RNA ถูกสกัดจากเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *P. gingivalis* เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ถูกนำมาวิเคราะห์ด้วย RT-PCR โดยวิเคราะห์ผลของ PCR product ที่ผ่านการขยายสัญญาณ 25 และ 27 รอบ เปรียบเทียบบน GAPDH ที่เท่ากัน ผลการทดลองยืนยันว่าเซลล์มีการตอบสนองต่อสารหลัง (Pg) โดยมีระดับ mRNA ของ MT1-MMP เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (C)

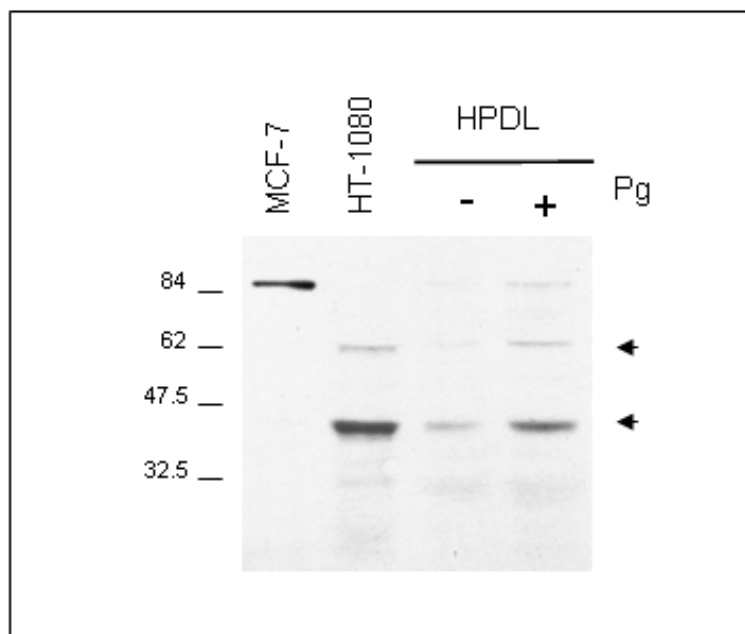


Figure 2.5

รูปที่ 2.5 แสดง Western analysis ของ MT1-MMP

Cell extracts จากเซลล์เอ็นดोทีเธลิอัล (HPDL) ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสารหลังของ Pg ถูกนำมาวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี Western analysis ผลการทดลองแสดงว่า เซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสารหลัง (Pg +) มีระดับของ MT1-MMP เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Pg -) การตรวจสอบนี้ได้ใช้เซลล์ MCF-7 และ HT-1080 เป็น negative และ positive control ของ MT1-MMP ตามลำดับ

ตอนที่ 3 ผลของสารหลังจากเชื้อ *A.actinomycetemcomitans* (ATCC 43718) ต่อการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2

สารหลังจากเชื้อ *A.actinomycetemcomitans* สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2

การทดลองในส่วนนี้ เป็นการตรวจสอบผลของสารหลังจาก *A.actinomycetemcomitans* ในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ผลการทดลองในรูปที่ 3.1 แสดงว่า สารหลังจาก *A.actinomycetemcomitans* สามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ในเซลล์เอ็นดอทีลียัลได้เช่นเดียวกับสารหลังจาก *P.gingivalis* เมื่อกระตุ้นเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เมื่อทำการเปรียบเทียบผลการกระตุ้นในเซลล์ human foreskin fibroblast (HFF) และเซลล์ U2OS ซึ่งเป็น human osteosarcoma cell line และสามารถหลังทั้งเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 92 กิโลดาลตัน (รูปที่ 3.1) ผลการทดลองแสดงว่าสารหลังจากทั้ง *P.gingivalis* และ *A.actinomycetemcomitans* สามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ในเซลล์ HFF แต่ไม่มีผลต่อทั้งเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 ในเซลล์ U2OS

การทดลองต่อมาเป็นการตรวจสอบว่า สารหลังจากแบคทีเรียชนิดอื่นๆ จะมีความสามารถในการกระตุ้น MMP-2 ได้เช่นเดียวกับสารหลังจาก *P.gingivalis* และ *A.actinomycetemcomitans* หรือไม่ โดยคณะผู้วิจัยได้เลือกเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสามสายพันธุ์ คือ *F.nucleatum* ซึ่งเป็นแบคทีเรียชนิดที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต และ *E.coli* กับ *S.salivarius* ซึ่งเป็น normal flora ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเพาะเลี้ยงและสร้างสายพันธุ์ขึ้นจากผู้ป่วยที่มาทำการรักษาในคณะทันตแพทยศาสตร์ ผลการทดลองในรูปที่ 3.2 แสดงว่าสารหลังจากแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์นี้ ไม่สามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ได้

ผลของ protease inhibitors กับสารหลังจาก *A.actinomycetemcomitans*

เซลล์เอ็นดอทีลียัลถูกกระตุ้นด้วยสารหลังจาก *A.actinomycetemcomitans* ในสภาวะที่มีหรือไม่มี protease inhibitors เพื่อทำการทดสอบกลไกการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นจึงตรวจสอบผลการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ด้วยวิธี zymography (รูปที่ 3.3 medium) ผลการทดลองที่ได้คล้ายกับผลของสารหลังจาก *P.gingivalis* โดยพบว่า Phenanthroline สามารถยับยั้งผลของสารหลังจาก *A.actinomycetemcomitans* ได้ ในขณะที่ protease inhibitors อื่นๆ ได้แก่ aprotinin, PMSF และ Leupeptin ไม่มีผล

เมื่อตรวจสอบ MMP-2 ที่จับอยู่บนผิวเซลล์ โดยการทำลายเซลล์ด้วย Leammli buffer และนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค zymography (รูปที่ 3.3 cell extract) ปรากฏว่าสารหลังจากทั้ง *P.gingivalis* และ *A.actinomycescomitans* สามารถเพิ่มระดับของ active MMP-2 บนผิวเซลล์ได้ ซึ่งแสดงว่าการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 โดยอิทธิพลของสารเหล่านั้น น่าจะทำให้เซลล์สามารถนำเอา active MMP-2 ไปใช้ในการทำลายเนื้อเยื่อได้มากขึ้น และในสภาวะที่มี Phenanthroline จะสามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของ active MMP-2 บนผิวเซลล์ได้

สารหลังจาก *A.actinomycescomitans* มีผลต่อ TIMP-2 แต่ไม่มีผลต่อ MT1-MMP

เพื่อเป็นการตรวจสอบว่า สารหลังจาก *A.actinomycescomitans* สามารถเพิ่มระดับของ MT1-MMP ในเซลล์เอ็นไธดปริทันต์ได้เช่นเดียวกับสารหลังจาก *P.gingivalis* หรือไม่ ระดับของ MT1-MMP ถูกตรวจสอบด้วยเทคนิค Western analysis และ RT-PCR เช่นเดียวกับการทดลองในตอนี่ 2

ผลการทดลองในรูปที่ 3.4 แสดงว่าสารหลังจาก *A.actinomycescomitans* ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ MT1-MMP ทั้งในระดับโปรตีนและ mRNA .ในขณะที่สารหลังจาก *P.gingivalis* สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ MT1-MMP ได้ คณะผู้วิจัยได้ศึกษาเพิ่มเติมถึงระดับของ TIMP-2 ซึ่งเป็นองค์ประกอบอีกส่วนหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 เนื่องจาก TIMP-2 จะทำหน้าที่เป็น bridging molecule ในการเชื่อม MMP-2 เข้ากับ MT1-MMP บนผิวเซลล์ก่อนที่ MMP-2 จะถูกกระตุ้น ผลการทดลองในรูปเดียวกัน (รูปที่ 3.4) แสดงว่าสารหลังจาก *A.actinomycescomitans* สามารถลดระดับของ TIMP-2 ในระดับโปรตีนอย่างชัดเจน แต่ไม่มีผลต่อระดับ mRNA ของ TIMP-2 โดยในรูปที่ 3.4A นั้น จะแสดงปริมาณของ TIMP-2 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ เมื่อวิเคราะห์ด้วย Western analysis และใช้เซลล์ BT-549 ซึ่งเป็น human breast cancer cell line เป็น positive control และโปรตีนของ TIMP-2 จะมีน้ำหนักประมาณ 21 กิโลดาลตัน

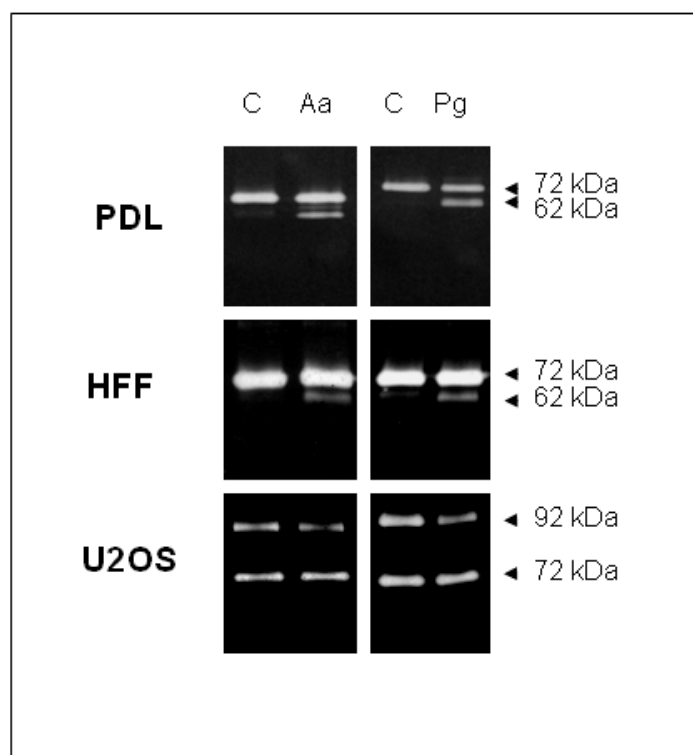


Figure 3.1

รูปที่ 3.1 สารหลังจาก *A.actinomycetemcomitans* สามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ในเซลล์สร้างเส้นใย

เซลล์เอ็นดอทีเลียล (PDL) ถูกกระตุ้นด้วยสารหลังจาก *A.actinomycetemcomitans* (Aa) เปรียบเทียบกับผลของสารหลังจาก Pg การวิเคราะห์ด้วย zymography แสดงว่า สารหลังจาก Aa ให้ผลกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 (62 kDa) ได้เช่นเดียวกับ Pg และเมื่อทดสอบกับเซลล์สร้างเส้นใยของผิวหนัง (HFF) ปรากฏว่าเซลล์มีการตอบสนองต่อสารหลังได้เช่นเดียวกัน ในขณะที่เซลล์ไลน์กระดูก (U2OS) ไม่พบการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 (72 kDa, latent) หรือ MMP-9 (92 kDa, latent) โดยสารหลังทั้งของ Aa และ Pg

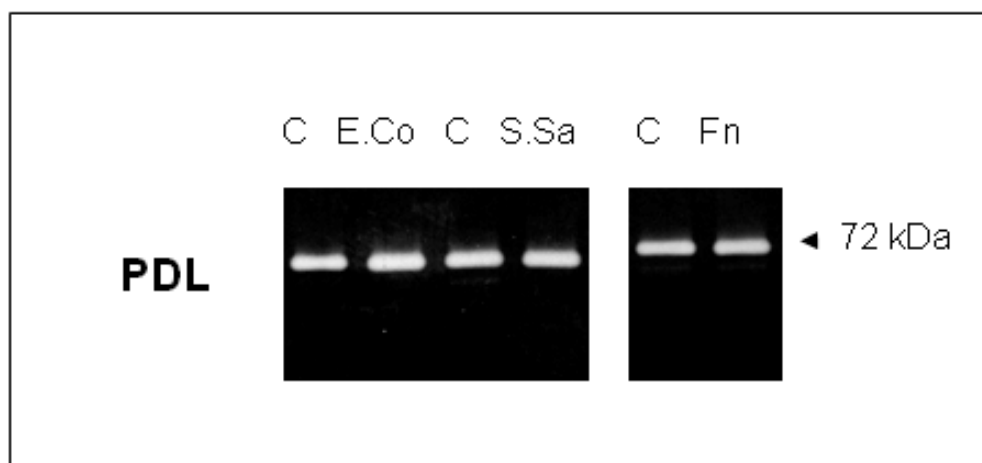


Figure 3.2

รูปที่ 3.2 สารหลังจาก *E.Coli*, *S.salivarius* และ *F.nucleatum* ไม่มีผลในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2

ในการทดสอบความจำเพาะของสารหลัง เซลล์เอ็นอีตปริทันต์ (PDL) ถูกกระตุ้นด้วยสารหลังจาก *E.Coli* (E.Co), *S.salivarius* (S.Sa) และ *F.nucleatum* (Fn) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปรากฏว่าสารหลังจากแบคทีเรียดังกล่าวไม่สามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ได้ ดังจะเห็นว่าปรากฏเฉพาะแต่ latent form (72 kDa)

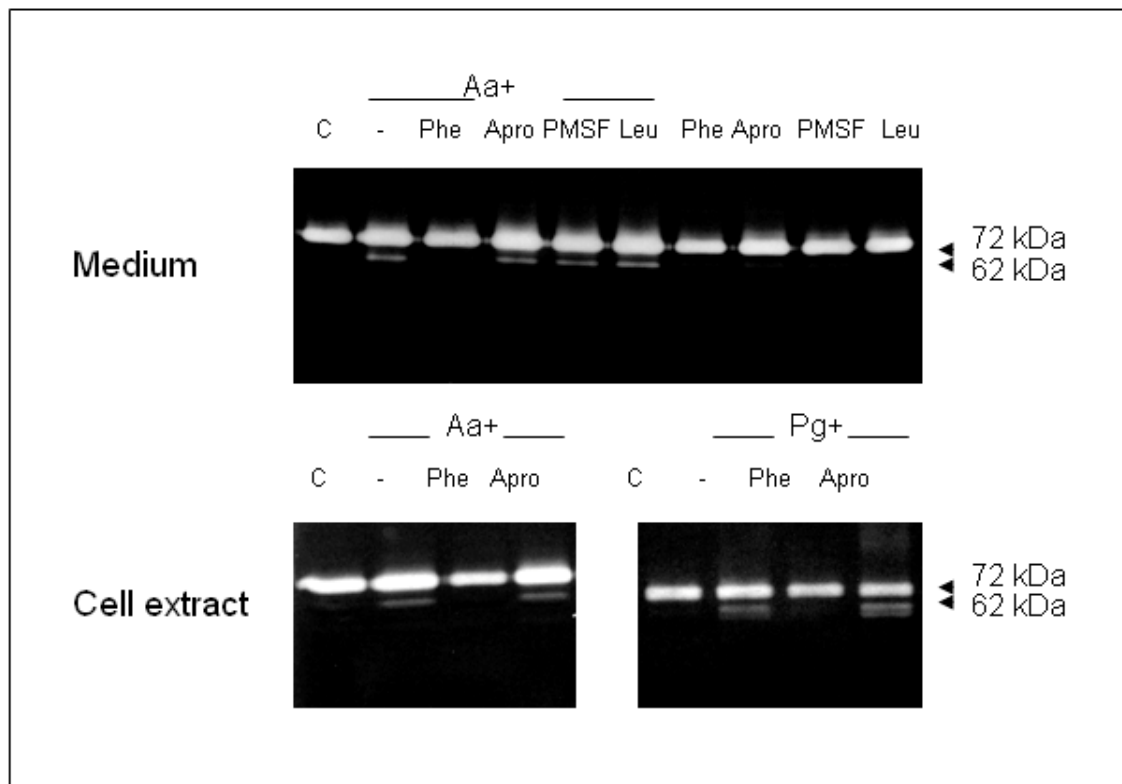


Figure 3.3

รูปที่ 3.3 Phenanthroline สามารถยับยั้งการกระตุ้นที่เกิดจากสารหลั่งของ *A.actinomycetemcomitans*

เซลล์เอ็นอีคปริพันธ์ถูกกระตุ้นด้วยสารหลั่งจาก Aa ในสภาวะที่มีหรือไม่มี protease inhibitors เป็นเวลา 48 ชั่วโมง MMP-2 ทั้งในอาหารเลี้ยงเซลล์ (Medium) และจาก cell extract ถูกวิเคราะห์ด้วย zymography ผลการทดลองแสดงว่า Phenanthroline (Phe) สามารถยับยั้งผลการกระตุ้นได้ ในขณะที่ Aprotinin (Apro), PMSF และ Leupeptin (Leu) ไม่มีผลยับยั้ง นอกจากนี้ ยังพบการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 (62 kDa) โดยสารหลั่งจากทั้ง Aa และ Pg ใน cell extract และยับยั้งได้ด้วย Phenanthroline เช่นเดียวกัน

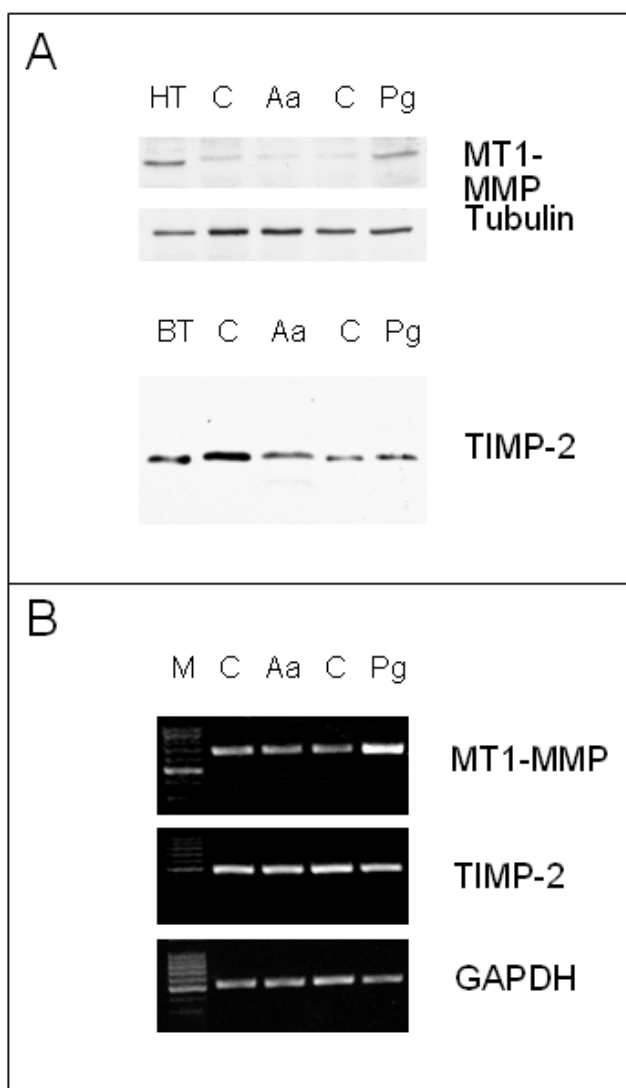


Figure 3.4

รูปที่ 3.4 ผลของสารหลังต่อการแสดงออกและระดับโปรตีนของ MT1-MMP และ TIMP-2

เซลล์เอ็นไคม์ปริทันต์ถูกกระตุ้นด้วยสารหลังจาก *P.gingivalis* (Pg) และ *A.actinomycescomitans* (Aa) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบระดับการแสดงออกของ MT1-MMP (จาก cell extract) และ TIMP-2 (จาก medium) ด้วยวิธี RT-PCR และ Western analysis

ผลในรูป A แสดงว่าสารหลังจาก Pg มีผลในการเพิ่มโปรตีนของ MT1-MMP โดยไม่มีผลต่อ TIMP-2 ในขณะที่สารหลังจาก Aa มีผลในการลดระดับของ TIMP-2 แต่ไม่เพิ่มระดับของ MT1-MMP เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (C) การเปรียบเทียบนี้ได้ใช้โปรตีน Tubulin เป็น internal control และใช้เซลล์ HT1080 และ BT549 เป็น positive control สำหรับ MT1-MMP และ TIMP-2 ตามลำดับ

รูป B แสดงให้เห็นว่า เฉพาะสารหลังจาก Pg ที่มีผลในการเพิ่ม mRNA ของ MT1-MMP ในขณะที่สารหลังจาก Aa ไม่มีผลต่อ mRNA ของ MT1-MMP และ TIMP-2 โดยใช้ GAPDH เป็น internal control

ตอนที่ 4 ผลของเชื้อ *P.gingivalis* และ *A.actinomycetemcomitans* ที่แยกจากร่องลึกปริทันต์ของผู้ป่วย

การแยกเชื้อ *P.gingivalis* และ *A.actinomycetemcomitans* จากร่องลึกปริทันต์ของผู้ป่วย

การแยกเชื้อ *P.gingivalis* และ *A.actinomycetemcomitans* จะเริ่มจากการเก็บน้ำร่องลึกปริทันต์ของผู้ป่วยเช่นเดียวกับการทดลองตอนที่ 1 จากนั้นนำน้ำร่องลึกปริทันต์ที่เก็บได้ ไปเกลี่ยบน selective agars สำหรับ *P.gingivalis* และ *A.actinomycetemcomitans* และเลี้ยงในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจนเป็นเวลาประมาณ 5-7 วัน โคโลนีเดี่ยว (isolated colony) ที่เจริญบน selective agar ที่มีลักษณะของโคโลนีเหมือนกับโคโลนีของ reference strains จะถูกแยกออกมาเพาะเลี้ยง 2-3 รอบ จนกว่าโคโลนีที่ขึ้นทั้งหมดจะมีลักษณะเหมือนกันทั้งหมด การตรวจสอบ จะทำโดยการย้อม gram stain ในลำดับแรก ตามด้วยการสกัด DNA จากเชื้อไปทำ PCR เพื่อตรวจสอบความเป็น *P.gingivalis* หรือ *A.actinomycetemcomitans* อีกครั้งหนึ่ง ผลของ PCR จากโคโลนีที่แยกจากผู้ป่วย 5 คน แสดงไว้ในรูปที่ 4.1

แม้เชื้อทั้งหมดในแต่ละกลุ่มจะให้ผลของ gram stain เหมือนกัน แต่จากผลการวิเคราะห์ด้วย PCR คณะผู้วิจัยได้คัดเลือกเชื้อ Pg จากผู้ป่วยลำดับที่ 1, 3 และ 5 และเชื้อ Aa จากผู้ป่วย หมายเลข 2, 3 และ 5 ซึ่งให้สัญญาณของ PCR ที่ชัดเจน เพื่อนำมาทดสอบในขั้นต่อไป โดยหมายเลข 1-5 ของ Pg และ Aa แสดงลำดับของเชื้อที่คัดเลือก และเพาะเลี้ยง เพื่อความสะดวกในการสื่อสารเท่านั้น ไม่ได้เกี่ยวข้องกับหมายเลขของผู้ป่วยแต่อย่างใด

ผลของสารหลังจากเชื้อที่แยกจากผู้ป่วยในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2

สารหลังจากเชื้อที่เพาะเลี้ยงได้จากผู้ป่วย เตรียมขึ้นเช่นเดียวกับการทดลองข้างต้น จากนั้นจึงนำไปทดสอบผลในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ที่หลังจากเซลล์เอ็นไนด์ปริทันต์ ผลการทดลองพบว่า สารหลังจากเชื้อทั้งหมดที่เตรียมได้ สามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ภายในเวลา 48 ชั่วโมงเช่นเดียวกับผลของสารหลังจาก reference strains (รูปที่ 4.2) นอกจากนี้ ยังพบว่าสารหลังจาก *P.gingivalis* จะให้ผลในการกระตุ้น MT1-MMP และสารหลังจาก *A.actinomycetemcomitans* จะให้ผลในการลด TIMP-2 เช่นเดียวกับ reference strains (ไม่ได้แสดงรูปไว้)

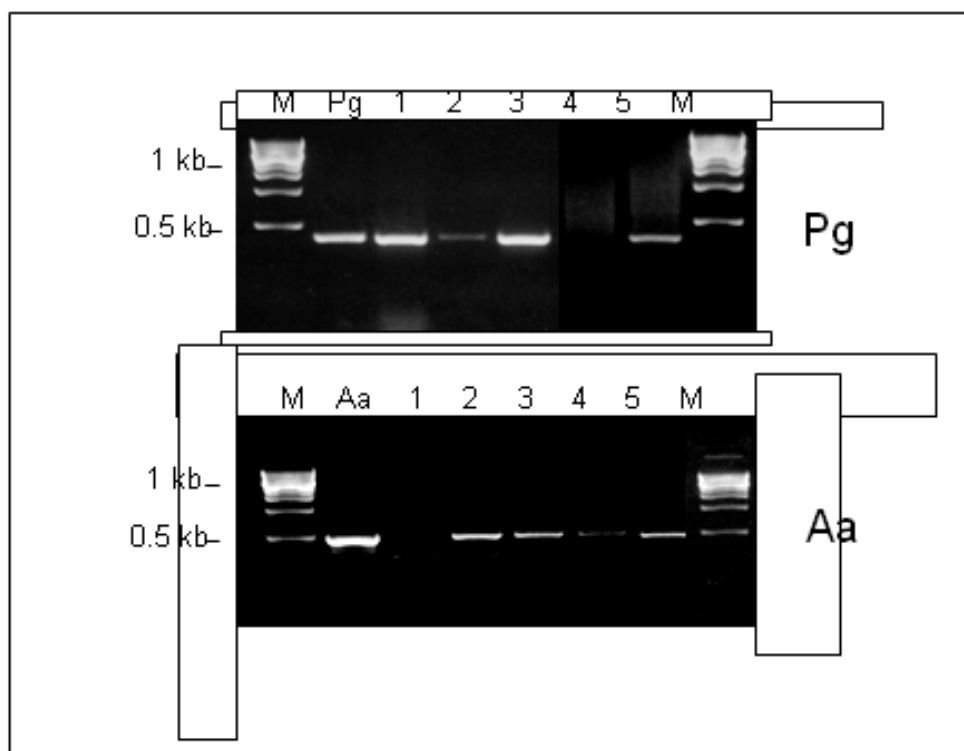


Figure 4.1 A

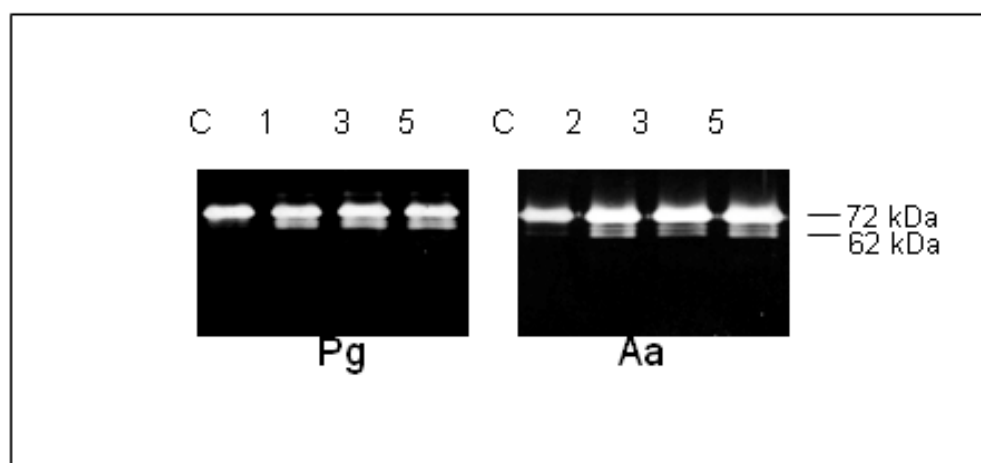


Figure 4.1 B

รูปที่ 4.1 การตรวจสอบเชื้อ *P.gingivalis* และ *A.actinomycetemcomitans* ที่แยกจากร่องลึกปริทันต์ของผู้ป่วย

เชื้อ *P.gingivalis* และ *A.actinomycetemcomitans* ได้จากการแยกเชื้อที่เพาะเลี้ยงจากน้ำร่องลึกปริทันต์ที่เก็บมาจากผู้ป่วย จากนั้นสกัด DNA ของเชื้อแต่ละชนิดและตรวจสอบด้วย PCR โดยเทียบ PCR product กับเชื้ออ้างอิง Pg หรือ Aa ผลการวิเคราะห์พบว่า เชื้อ Pg ที่เตรียมจากผู้ป่วยรายที่ 1, 3, 5 และ Aa ที่เตรียมจากผู้ป่วยรายที่ 2, 3, 5 ให้ PCR product ที่ชัดเจน (รูป A)

รูป B เป็นการวิเคราะห์ด้วย zymography แสดงให้เห็นว่า สารหลังที่เตรียมจากเชื้อ Pg และ Aa ที่แยกจากผู้ป่วยแต่ละรายดังกล่าวนั้นในรูป A ยังคงมีความสามารถในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 (62 kDa) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (C) ตำแหน่ง 72 kDa และ 62 kDa ทางขวามือ แสดงตำแหน่งของ latent และ active MMP-2 ใน zymography

5. ผลของ LPS ต่อการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2

ผลของ LPS ในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2

คำถามประการหนึ่งที่เกิดขึ้นในระหว่างการทดลองคือ การปนเปื้อนของ lipopolysaccharide (LPS หรือ endotoxin) ในสารหลังจากแบคทีเรีย ซึ่งนำไปสู่ข้อสงสัยที่ว่า ผลการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 จะเกิดจาก LPS ด้วยหรือไม่ โดยเฉพาะผลจากการทดลองในตอนที่ 1 ซึ่งแสดงว่า สารในสารหลังที่สามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 น่าจะมีคุณสมบัติ heat stable ซึ่งชี้ว่า สารในสารหลังที่มีคุณสมบัตินี้อาจจะเป็นสารในกลุ่ม LPS แต่การทดลองตอนที่ 2 และ 3 ซึ่งใช้สารหลังจากเชื้อ *P.gingivalis* และ *A.actinomycetemcomitans* นั้น กลับมีคุณสมบัติที่ต่างไป คือสารในสารหลังที่ให้ผลนั้นกลับถูกทำลายได้ด้วยความร้อน ซึ่งกลับบ่งชี้ว่า ไม่น่าจะเป็น LPS ดังนั้นความแตกต่างนี้ ยังคงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

อย่างไรก็ดี เพื่อเป็นการศึกษาเพิ่มเติมว่า LPS จะมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 หรือไม่ คณะผู้วิจัยได้ทำการสกัด LPS จากเชื้อ *P.gingivalis* และ *A.actinomycetemcomitans* และนำมาทดสอบกับเซลล์เอ็นดोทีบริตันต์ ผลการทดลองในรูปที่ 5.1A แสดง LPS ที่เตรียมจาก *P.gingivalis* และ *A.actinomycetemcomitans* และนำมาแยกด้วยไฟฟ้าแล้วย้อมด้วยเกลือเงิน เปรียบเทียบกับ LPS ของ *E.coli*

ในรูปที่ 5.1B แสดงผลของ LPS ของทั้ง *P.gingivalis* และ *A.actinomycetemcomitans* ในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 โดยจะพบว่า LPS ที่เตรียมได้จากเชื้อทั้งสองชนิดนั้นสามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ในเซลล์เอ็นดोทีบริตันต์ได้

ผลของ LPS ในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ไม่ต้องเกิดผ่านเซลล์

ในการทดลองถัดมา เป็นการตรวจสอบกลไกการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 โดยการกระตุ้นเซลล์ด้วย LPS ในสภาวะที่มีหรือไม่มี protease inhibitors เช่นเดียวกับการทดลองด้วยสารหลัง รูปที่ 5.2A แสดงว่าการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 โดย LPS นั้น สามารถยับยั้งได้ด้วย aprotinin แต่ไม่สามารถยับยั้งได้ด้วย phenathroline ซึ่งตรงกันข้ามกับผลของสารหลังจากแบคทีเรีย และแสดงว่าการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 โดย LPS นั้น เป็นกลไกที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ serine protease

เนื่องจากกลไกการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ที่เกิดผ่านเซลล์นั้น เท่าที่มีรายงานนั้น ไม่เกี่ยวข้องกับ serine protease ดังนั้น เพื่อตรวจสอบว่า LPS ที่เตรียมได้นั้น อาจมี serine protease activity ที่สามารถกระตุ้นการ

ทำงานของ MMP-2 คณะผู้วิจัยได้ใช้ conditioned medium ที่เก็บจากเซลล์เอ็นโดพริทันต์ ซึ่งจะมี latent MMP-2 มาบ่มร่วมกับ LPS ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดังแสดงผลในรูปที่ 5.2B ผลการทดลองแสดงว่า LPS สามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ได้โดยไม่ต้องมีเซลล์ และการกระตุ้นนี้ยับยั้งได้ด้วย aprotinin เช่นเดียวกับการทดลองในรูปที่ 5.2A

LPS และสารหลังจากแบคทีเรียสามารถเหนี่ยวนำการแสดงออก IL-1 β และ TNF- α ในเซลล์เอ็นโดพริทันต์

เพื่อเป็นการตรวจสอบว่าเซลล์เอ็นโดพริทันต์สามารถตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย LPS ได้โดยตรงหรือไม่ คณะผู้วิจัยได้ตรวจสอบการแสดงออกของ CD14 ซึ่งเป็นเสมือน LPS receptor ด้วยวิธี RT-PCR ผลการทดลองในรูป 5.3A แสดงว่าเซลล์เอ็นโดพริทันต์มีการแสดงออกของ mRNA ของ CD14 ในระดับหนึ่ง ซึ่งสะท้อนว่าเซลล์เหล่านี้ อาจตอบสนองต่อ LPS ได้ทาง CD14 บนผิวเซลล์ อย่างไรก็ดี การได้รับการกระตุ้นด้วย LPS ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของ CD14 ดังผลในรูป 5.3A

การทดลองถัดมา เป็นการตรวจสอบว่าเซลล์เอ็นโดพริทันต์สามารถรับรู้ต่อการกระตุ้นด้วย LPS และสารหลังโดยตรงหรือไม่ เนื่องจากมีรายงานว่าแบคทีเรียและสารหลังจากแบคทีเรียสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ของเนื้อเยื่อหลัง inflammatory cytokines ได้ (Kent et al., 1998; Matsushita et al., 1999) คณะผู้วิจัยได้ทำการตรวจสอบอิทธิพลของสารหลัง และ LPS จากเชื้อ *P.gingivalis* และ *A.actinomycetemcomitans* ต่อการแสดงออกของ IL-1 β และ TNF- α ในเซลล์เอ็นโดพริทันต์

ผลการทดลองในรูปที่ 5.3B แสดงว่าเซลล์เอ็นโดพริทันต์สามารถตอบสนองโดยตรงได้ต่อทั้งสารหลัง และ LPS ของเชื้อทั้งสองชนิด โดยสามารถกระตุ้นให้เซลล์มีระดับการแสดงออกของ IL-1 β เพิ่มขึ้น แต่มีผลเพียงเล็กน้อยต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ TNF- α โดยมีเพียง LPS ของ *P.gingivalis* เท่านั้น ที่มีผลในการเพิ่มการแสดงออกของ TNF- α

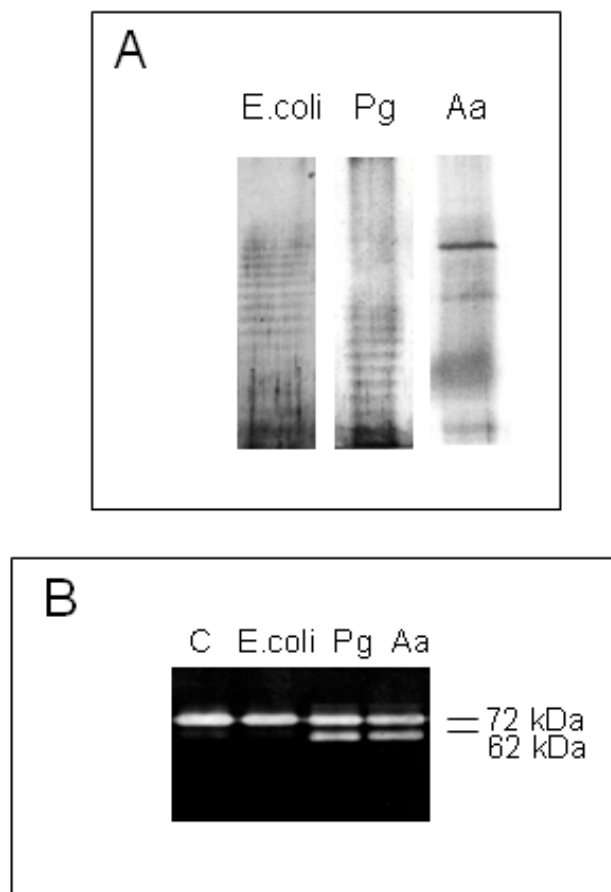


Figure 5.1

รูปที่ 5.1 แสดงการย้อม LPS ด้วยเกลือเงิน และการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 จาก LPS

LPS ที่เตรียมได้จากเชื้อมาตรฐาน *P.gingivalis* (Pg) และ *A.actinomycetemcomitans* (Aa) ถูกนำมาแยกด้วยไฟฟ้า แล้วย้อมด้วยเกลือเงิน เปรียบเทียบกับ commercial LPS ของ *E.coli* รูป A แสดงให้เห็น ladder pattern ของ *E.Coli* และ Pg ได้ชัดเจนกว่าของ Aa ส่วนรูป B แสดงผลของ LPS ที่เตรียมได้ในการกระตุ้นเซลล์ ผลการตรวจสอบพบว่า LPS ที่เตรียมได้จากเชื้อทั้งสองชนิดสามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 (62 kDa) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้น (C) หรือกลุ่มที่กระตุ้นด้วย LPS ของ *E.coli* ปริมาณของ LPS ที่ใช้ในการกระตุ้นคือ 10 มิลลิอียู (mEU) โดยใช้ปริมาณ Endotoxin Unit (EU) ของ LPS จากเชื้อทั้งสองชนิดเท่ากับของ *E.Coli* (รูป B)

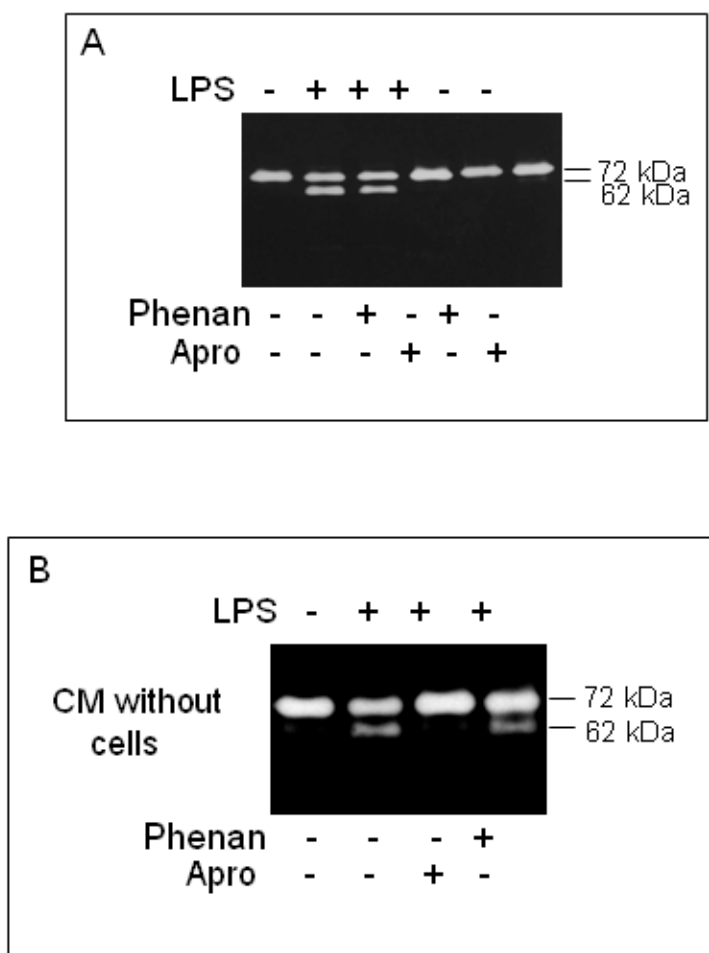


Figure 5.2

รูป 5.2 LPS สามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ในภาวะที่ไม่มีเซลล์

รูป A แสดงว่า เมื่อเซลล์เอ็นโดทีเลียตถูกกระตุ้นด้วย LPS (10 mEU) และในภาวะที่มี Phenanthroline (Phenan) หรือ Aprotinin (Apro) ร่วมด้วย เป็นเวลา 48 ชั่วโมง LPS สามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ดังปรากฏแถบขาวของ active MMP-2 ที่ 62 kDa อย่างชัดเจน ผลการกระตุ้นนี้ถูกยับยั้งได้ด้วย Aprotinin แต่ไม่ถูกยับยั้งด้วย Phenanthroline ในขณะที่สารยับยั้งทั้งสองตัวไม่มีผลต่อ MMP-2 แต่อย่างใด

รูป B แสดงว่า LPS สามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ได้โดยไม่ต้องมีเซลล์ ซึ่งพบการกระตุ้นใน conditioned medium (CM) ที่เก็บจากเซลล์เอ็นโดทีเลียตที่ ซึ่งจะ มี latent MMP-2 (72 kDa) และบ่มกับ LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภาพ zymography แสดงให้เห็น active MMP-2 ที่ 62 kDa และการกระตุ้นนี้ถูกยับยั้งได้ด้วย Aprotinin เช่นเดียวกับรูป A

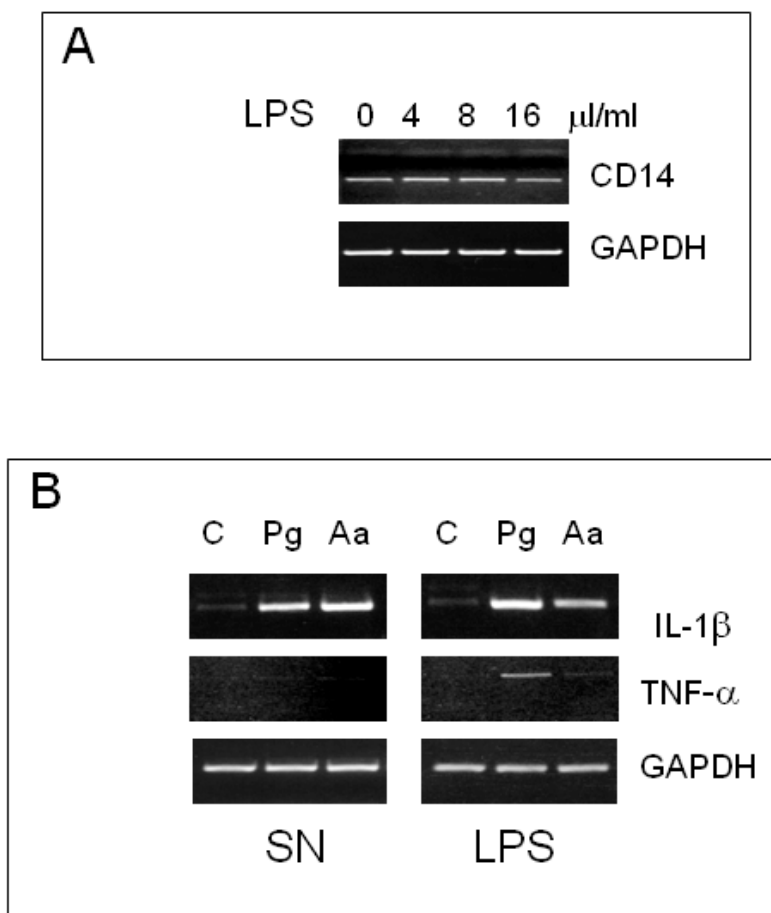


Figure 5.3

รูป 5.3 เซลล์เอ็นอีคปริพันธ์มี CD14 และมีการตอบสนองต่อ LPS เช่นเดียวกับสารหลังจาก *P.gingivalis* และ

A.actinomycescomitans

เซลล์เอ็นอีคปริพันธ์ถูกกระตุ้นด้วย LPS ในความเข้มข้นที่ 4, 8, 16 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร (4 µl=10 mEU) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบการแสดงออกของ CD14 ด้วย RT-PCR พบว่า เซลล์มีการแสดงออกของ CD14 แต่ระดับการแสดงออกไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อได้รับการกระตุ้นจาก LPS (รูป A)

อย่างไรก็ตาม เซลล์มีการตอบสนองต่อ LPS ได้เช่นเดียวกับการตอบสนองต่อสารหลัง (SN) ของ Pg และ Aa ดังจะเห็นในรูป B ว่า เซลล์มีระดับการแสดงออกของ IL-1 β เพิ่มขึ้น เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยสารหลังและ LPS ของแบคทีเรียทั้งสองชนิด และมีการแสดงออกของ TNF- α เพิ่มขึ้น เมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS ของ Pg, GAPDH เป็น internal control

ตอนที่ 6 ผลของ IL-1 β และ TNF- α ร่วมกับสารหลังจากแบคทีเรีย ในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ในเซลล์เอ็นโดทีเลียล

เซลล์เอ็นโดทีเลียลตอบสนองต่อ IL-1 β และ TNF- α โดยเพิ่มการแสดงออกของ IL-1 β

จากผลการทดลองในตอนต้นที่ 5 ซึ่งแสดงว่าทั้ง LPS และสารหลังจากแบคทีเรียสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มีการแสดงออกของ inflammatory cytokines อย่างน้อย 2 ชนิดคือ IL-1 β และ TNF- α เพิ่มขึ้น เพื่อเป็นการตรวจสอบว่า การเพิ่มขึ้นของ cytokines ทั้งสองชนิดนี้ เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 หรือไม่ คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาถึงบทบาทของ cytokines ทั้งสองชนิดนี้ต่อการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 โดยตรง

เซลล์เอ็นโดทีเลียลถูกถ่ายลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 6 หลุมเหมือนการทดลองข้างต้น จากนั้นกระตุ้นด้วย IL-1 β และ TNF- α ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 1 และ 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อหาความเข้มข้นที่เซลล์เอ็นโดทีเลียลสามารถตอบสนองต่อสารกระตุ้นทั้งสองชนิด การตรวจสอบการตอบสนองจะทำการสกัด RNA เพื่อตรวจสอบระดับการแสดงออกของ IL-1 β โดยวิธี RT-PCR ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 6.1 โดยพบว่าทั้ง IL-1 β และ TNF- α ตั้งแต่ที่ความเข้มข้น 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตรเป็นต้นไป สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เอ็นโดทีเลียลเพิ่มระดับการแสดงออกของ IL-1 β อย่างชัดเจน

ในการทดลองถัดมา เซลล์เอ็นโดทีเลียลถูกกระตุ้นด้วย IL-1 β และ TNF- α ในช่วงความเข้มข้น 0.1 – 50 นาโนกรัม/มิลลิลิตรเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นจึงตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของ MMP-2 ด้วยวิธี zymography ผลการทดลองในรูปที่ 6.2A แสดงให้เห็นว่า IL-1 β และ TNF- α ในช่วงความเข้มข้นดังกล่าว ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงหรือการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ในเซลล์เอ็นโดทีเลียล ทั้งในแง่ของปริมาณของเอนไซม์ และการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์

เมื่อนำ IL-1 β และ TNF- α ไปทดสอบร่วมกับสารหลังจาก *P.gingivalis* อีกผลการทดลองในรูปที่ 6.1C พบว่าทั้ง IL-1 β และ TNF- α ไม่มีผลในการเพิ่มหรือลดอิทธิพลของสารหลังจาก *P.gingivalis* ในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2

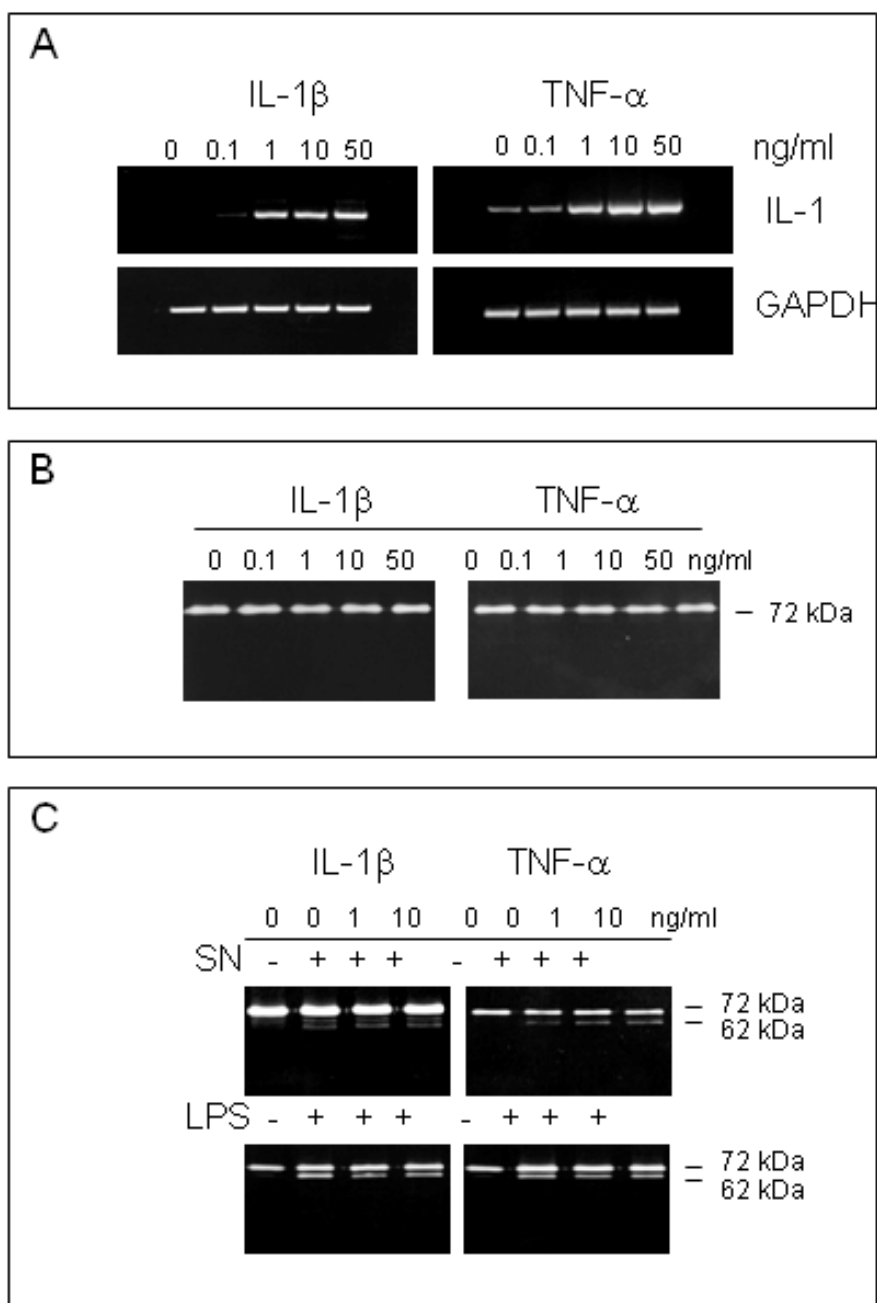


Figure 6.1

รูปที่ 6.1 ผลของ IL-1 β และ TNF- α ร่วมกับสารหลังจาก *P. gingivalis* ในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 และการแสดงออกของ IL-1 β

รูป A แสดงผลการตอบสนองของเซลล์เอ็นไธดปริทันต์ ต่อการกระตุ้นด้วย IL-1 β หรือ TNF- α ที่ความเข้มข้น 0.1, 1, 10 และ 50 นาโนกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ IL-1 β ด้วย RT-PCR ผลของการกระตุ้นด้วย IL-1 β และ TNF- α จะทำให้ระดับการแสดงออกของ IL-1 β เพิ่มขึ้น และการเปลี่ยนแปลงนี้ผันแปรตามความเข้มข้นของสารกระตุ้น

อย่างไรก็ดี เมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย IL-1 β และ TNF- α ในความเข้มข้นเช่นเดียวกับรูป A เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปรากฏว่าสารทั้งสองไม่สามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ซึ่งมีตำแหน่งของ pro-form อยู่ที่ 72 kDa ดังแสดงในรูป B

เพื่อเป็นการตรวจสอบว่า IL-1 β และ TNF- α มีผลในการเสริมฤทธิ์ของสารหลังจากแบคทีเรียหรือไม่ เซลล์เอ็นไธดปริทันต์ถูกกระตุ้นด้วย IL-1 β หรือ TNF- α ที่ความเข้มข้น 1 และ 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ร่วมกับสารหลังของ Pg (SN) หรือร่วมกับ LPS เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผลปรากฏว่าทั้ง IL-1 β และ TNF- α ไม่มีผลในการเสริมฤทธิ์การกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 (62 kDa) ให้เพิ่มมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกระตุ้นด้วยสารหลังหรือ LPS เพียงอย่างเดียว (รูป C)

7. ผลของฟลูออไรด์และคลอเฮกซิดีนต่อการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2

การตรวจสอบความเป็นพิษของฟลูออไรด์และคลอเฮกซิดีน

ในรูปที่ 7.1 แสดงระดับความเป็นพิษของฟลูออไรด์และคลอเฮกซิดีนที่มีต่อเซลล์เอ็นไอดีปริทันต์ โดยเซลล์ถูกกระตุ้นด้วยสารทั้งสองชนิด ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 1, 10 และ 100 ส่วนในล้านส่วน (ppm) สำหรับฟลูออไรด์ และ 0, 0.1, 1, 10 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สำหรับคลอเฮกซิดีน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงวัดจำนวนเซลล์วิธี MTT assay ผลการทดลองแสดงว่า ระดับของฟลูออไรด์ตั้งแต่ 10 ส่วนในล้านส่วนลงมาไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ และระดับของคลอเฮกซิดีนที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรลงมาไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์เช่นเดียวกัน

เมื่อทำการกระตุ้นด้วยฟลูออไรด์และคลอเฮกซิดีน ในระดับที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และทำการตรวจสอบระดับ MMP-2 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ดังแสดงผลในรูปที่ 7.2A ปรากฏว่าทั้งฟลูออไรด์และคลอเฮกซิดีน ไม่มีผลต่อการหลั่งและการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2

ในการทดลองถัดมา เซลล์เอ็นไอดีปริทันต์ถูกกระตุ้นด้วยสารหลังจาก P.gingivalis ในสถานะที่มีหรือไม่มีฟลูออไรด์หรือคลอเฮกซิดีนเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผลการทดลองในรูปที่ 7.2B แสดงว่า ทั้งฟลูออไรด์และคลอเฮกซิดีน ไม่มีผลทั้งในการยับยั้งหรือยับยั้งผลของสารหลังจาก P.gingivalis ในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ในขณะที่ฟลูออไรด์สามารถยับยั้งการหลั่ง MMP-1 และ MMP-3 ได้ ที่ความเข้มข้น 1 และ 10 ppm

ผลของสารสกัดจากใบชาเขียวต่อการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2

เนื่องจากชาเขียวเป็นเครื่องดื่มที่มีรายงานว่าสามารถยับยั้งทั้งการเกิดและการแพร่กระจายของโรคมะเร็งบางชนิดได้ รวมทั้งมีรายงานว่าสารสกัดบางตัวจากชาเขียวมีผลต่อเอนไซม์ MMP-2 คณะผู้วิจัย ได้ทำการทดลองนำร่องโดยการสกัดใบชาเขียวด้วยแอลกอฮอล์ แลนำมาทดสอบกับเซลล์เอ็นไอดีปริทันต์ ผลปรากฏว่า สารสกัดจากใบชาเขียวแบบหยาบ (crude extract) สามารถยับยั้งการหลั่ง MMP-2 ได้ในสถานะที่มีสารหลังจากแบคทีเรีย ดังแสดงในรูปที่ 7.3 การทดลองในส่วนนี้กำลังดำเนินการเพิ่มเติมอยู่ในห้องปฏิบัติการ

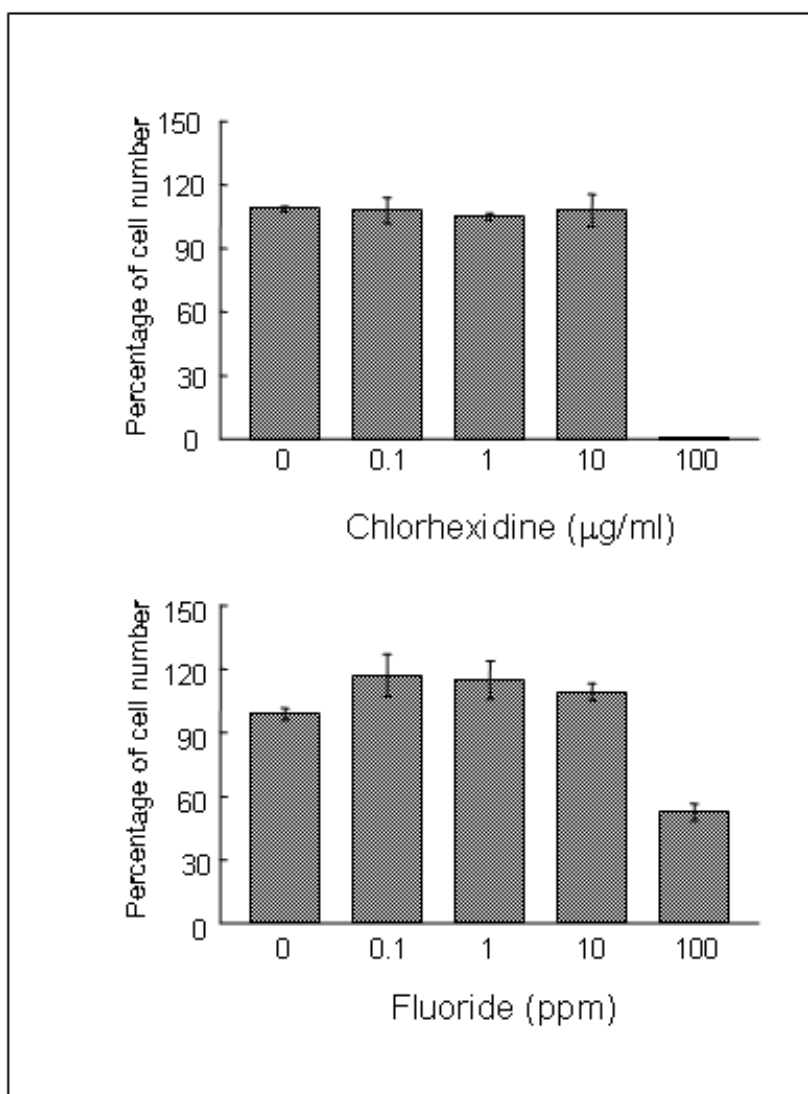


Figure 7.1

รูปที่ 7.1 กราฟแสดงความเป็นพิษของ Chlorhexidine และ Fluoride

เซลล์เอ็นอีคปริพันธ์ถูกกระตุ้นด้วย Chlorhexidine และ Fluoride ที่ความเข้มข้น 0.1, 1, 10, 100 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร และ 0.1, 1, 10, 100 ppm ตามลำดับ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และวิเคราะห์ความเป็นพิษด้วย MTT assay พบว่า Chlorhexidine ที่ความเข้มข้น 10 หรือน้อยกว่า 10 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร และ Fluoride ที่ความเข้มข้น 10 หรือน้อยกว่า 10 ppm ลงมาไม่เป็นพิษต่อเซลล์ แท่งกราฟแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลองซ้ำสาม โดยใช้เซลล์ที่เตรียมจากผู้ป่วยสามคน

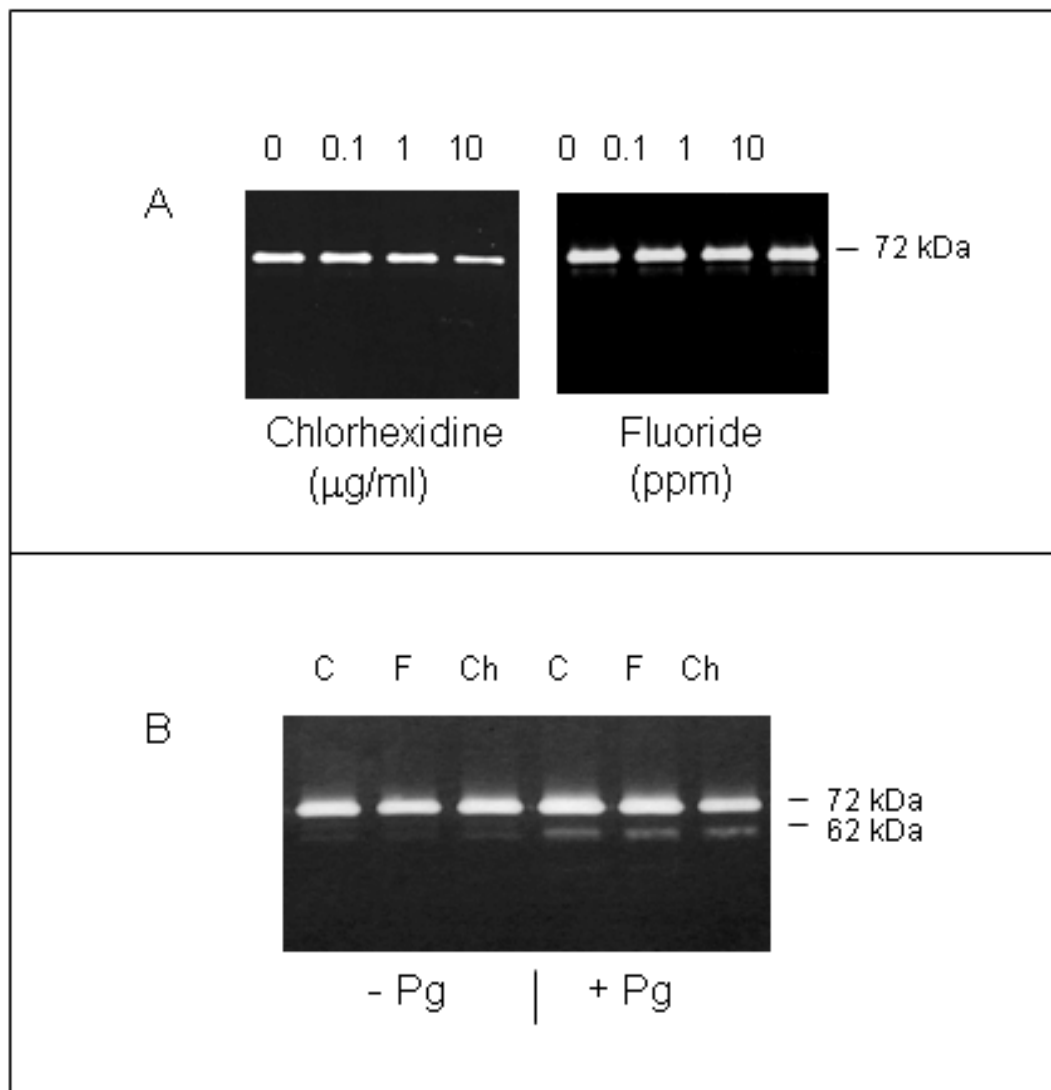


Figure 7.2

รูปที่ 7.2 Chlorhexidine และ Fluoride ไม่สามารถยับยั้งการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 โดยสารหลังจาก Pg เซลล์เอ็นโดปริทันต์ถูกเลี้ยงในสภาวะที่มี Chlorhexidine, Fluoride หรือสารหลังจาก Pg (+Pg) ที่มี Chlorhexidine (Ch) หรือ Fluoride (F) ร่วมด้วย พบว่าสารทั้งสองชนิดไม่สามารถยับยั้งการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ได้ (รูป B) โดยที่สารทั้งสองชนิดไม่มีผลต่อการกระตุ้น MMP-2 (รูป A)

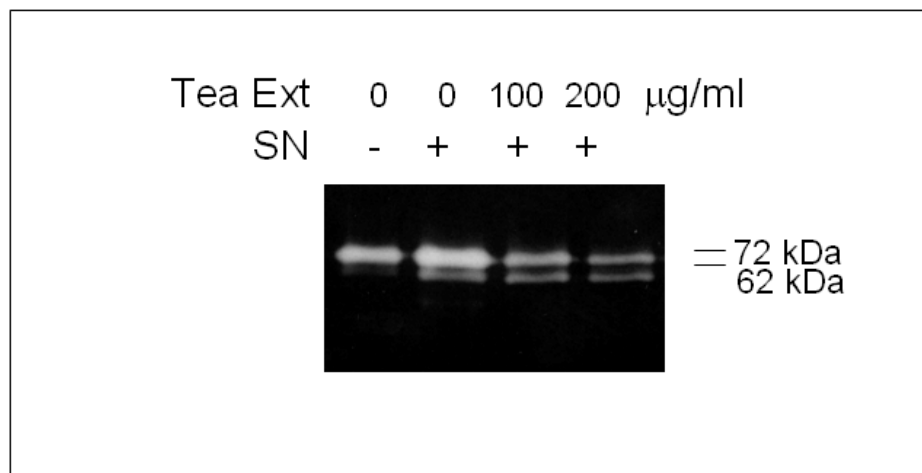


Figure 7.3

รูปที่ 7.3 สารสกัดจากใบชาเขียวลดการหลั่ง MMP-2 ในเซลล์เอ็นดอทีลียัล

เซลล์เอ็นดอทีลียัลถูกกระตุ้นสารหลังจากแบคทีเรีย (SN) ในสภาวะที่มีหรือไม่มีสารสกัดจากใบชาเขียวแบบหยาบ (Tea Ext) ที่ความเข้มข้น 0, 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่า สารสกัดจากใบชาเขียว สามารถยับยั้งการหลั่ง MMP-2 ได้ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัด ซึ่งจะเห็นปริมาณของ MMP-2 ลดลงทั้งส่วนที่เป็น latent (72 kDa) และ active form (62 kDa)

บทวิจารณ์

สารหลังจากแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงจากร่องลึกปริทันต์กับการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2

ผลการศึกษาครั้งนี้ สอดคล้องกับแนวความคิดที่ว่า การตอบสนองของเซลล์ของผู้ป่วยต่อเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคปริทันต์เป็นปัจจัยหลักในการกำหนดความรุนแรงของการทำลายของเนื้อเยื่อปริทันต์ของผู้ป่วย โดยจะพบว่าแบคทีเรียชนิดที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโตที่เพาะเลี้ยงจากร่องลึกปริทันต์ สามารถหลั่งสารที่มีความสามารถในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 จากเซลล์เหงือกและเซลล์เอ็นยึดปริทันต์

ผลการทดลองครั้งนี้ ยังสอดคล้องกับรายงานที่แสดงการเพิ่มขึ้นของ active MMP-2 ในเนื้อเยื่อของรอยโรคปริทันต์ (Korostoff et al., 2000) อย่างไรก็ตาม คณะผู้วิจัยไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างสารหลังจากแบคทีเรียในการเพิ่มปริมาณของ latent MMP-2 ที่หลั่งออกมาจากเซลล์อย่างชัดเจน ในขณะที่มีรายงานการเพิ่มขึ้นของ MMP-2 ในเนื้อเยื่อปริทันต์ของผู้ป่วย (Makela et al., 1994) แต่ก็ยังไม่อาจปฏิเสธได้ว่า ผลของการเพิ่มระดับของเอนไซม์ อาจมาจากการเหนี่ยวนำของแบคทีเรียด้วยเช่นกัน

นอกจากความสามารถในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 แล้ว ยังมีรายงานที่แสดงว่าสารหลังจากแบคทีเรียจำพวกเอนไซม์ สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP ชนิดอื่นๆ เช่น MMP-1 ในเซลล์เพาะเลี้ยงจากเหงือก (Uitto et al., 1989) หรือ MMP-9 จากเซลล์บุผิวจากเหงือก (gingival epithelium) (Ding et al., 1995; Firth et al., 1997) ได้ด้วย ซึ่งน่าจะส่งผลให้การทำลายของเนื้อเยื่อปริทันต์รุนแรงขึ้น

การเพิ่มปริมาณของ active MMP-2 จะทำให้ระดับการทำลายของเนื้อเยื่อโดยเฉพาะการทำลายของเส้นใยคอลลาเจน และ basement membrane เพิ่มขึ้น หรือรุนแรงขึ้น เช่นเดียวกับที่มีรายงานในรอยโรคของมะเร็งหลายชนิด ที่พบการเพิ่มขึ้นของ active MMP-2 ที่สัมพันธ์กับการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (Ueno et al., 1997; Cowell et al., 1998; Morgunova et al., 1999; Nakamura et al., 1999) หรือในกรณีของกระดูก มีรายงานว่า การเพิ่มการหลั่ง MMP-2 โดยเซลล์กระดูก ยังเป็นจุดเริ่มต้นของการละลายของกระดูกในบริเวณนั้นๆ ด้วย (Kusano et al., 1998; Liao and Luo 2001) ซึ่งสะท้อนว่าการเปลี่ยนแปลงระดับของเอนไซม์ โดยเฉพาะ active MMP-2 นั้น น่าจะเป็นดรชนีสำคัญในการบ่งชี้อัตราการทำลายของเนื้อเยื่อ และในกรณีของโรคปริทันต์ การเพิ่มขึ้นของ active MMP-2 นี้ ก็น่าจะสอดคล้องกับการรุกรานและแพร่กระจายของเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค

การกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 โดยสารหลังจากแบคทีเรียเป็นกลไกที่อาศัยเอนไซม์ MMP

การตรวจสอบกลไกการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 โดยการใช้ protease inhibitors บ่งชี้ว่า กลไกที่เกิดขึ้นน่าจะต้องอาศัยการทำงานของ MMP เนื่องจากการทำงานของ MMP-2 สามารถยับยั้งได้ด้วย MMP inhibitor อย่างไรก็ดี inhibitors ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ทั้งหมดเป็น general inhibitors คือยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มนั้นๆทุกตัว ดังนั้นจึงไม่สามารถบ่งชี้ได้อย่างชัดเจนว่าเกิดขึ้นจากเอนไซม์จำเพาะตัวใดตัวหนึ่ง

แม้จะไม่สามารถบ่งชี้ได้ชัดเจน แต่กลไกการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ที่มีรายงาน และเป็นที่ยอมรับกันทั่วไป คือกลไกการทำงานของเอนไซม์ MMP กลุ่มที่พบบนผิวเซลล์ หรือ membrane type MMP (MT-MMP) โดยเฉพาะเอนไซม์ตัวแรกในกลุ่มนี้ หรือ MT1-MMP ซึ่งสามารถตัดส่วน pro-peptide ของ latent MMP-2 ให้เกิดเป็น active MMP-2 ได้

กลไกนี้ รายงานโดย Strongin และคณะในปี 1993 และ 1995 ที่แสดงว่า MT1-MMP จะทำหน้าที่เป็น receptor ของ MMP-2 การจับกันระหว่าง MMP-2 และ MT1-MMP โดยมี TIMP-2 หรือ tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 เป็นตัวเชื่อม เกิดเป็น trimolecular complex จากนั้น MT1-MMP อีกโมเลกุลหนึ่งจะเคลื่อนมาประชิดกับ complex นี้ และทำหน้าที่ตัด pro-peptide ของ MMP-2 เกิดเป็น active MMP-2

ในการตรวจสอบระดับการแสดงออกของ MT1-MMP พบว่า เซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสารหลังจากแบคทีเรียจะมีระดับการแสดงออกของ MT1-MMP เพิ่มขึ้นสูงกว่าเซลล์ในกลุ่มควบคุม เมื่อประกอบกับระดับของ active MMP-2 ที่เพิ่มขึ้นจากการกระตุ้นด้วยสารหลังแล้ว จึงมีความเป็นไปได้มากที่การเพิ่มการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 จะเกิดจากการเพิ่มขึ้นของระดับ MT1-MMP

ความร้อนไม่มีผลต่อความสามารถในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2

คำถามที่ยังคงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมคือ สารในสารหลังจากแบคทีเรียที่สามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ผลจากการตรวจสอบเบื้องต้นพบว่า การต้มสารหลังเป็นเวลา 15 นาทีก่อนนำไปกระตุ้นเซลล์เพาะเลี้ยงนั้นไม่สามารถทำลายความสามารถของสารหลังในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ได้ อย่างไรก็ตามผลการทดลองที่ได้จากสารหลังจากเชื้อที่เพาะเลี้ยงจากร่องลึกปริทันต์ (ไม่ได้แยกเชื้อ) จะต่างจากผลที่ได้จากเชื้อ *P.gingivalis* ทำให้คณะผู้วิจัยเชื่อว่า สารในสารหลังที่มีอิทธิพลต่อการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 นั้น ไม่น่าจะเป็นเอนไซม์ที่หลังจากแบคทีเรียดังที่เคยมีรายงานไว้ (Ding et al., 1995; Firth et al., 1997) แต่ก็ไม่สามารถปฏิเสธว่า การกระตุ้นที่

พบนั้นอาจเกิดจากผลของโครงสร้างของเอนไซม์ที่คงอยู่ภายหลังการผ่านความร้อน โดยไม่ได้เกิดจาก enzymatic activity

สารหลังจาก *P.gingivalis* และ *A.actinomycetemcomitans* สามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2

P.gingivalis และ *A.actinomycetemcomitans* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่เป็นที่ยอมรับกันว่าเป็นสาเหตุหลักในการก่อให้เกิดโรคปริทันต์ ผลการกระตุ้นเซลล์เอ็นไดยด์ปริทันต์ด้วยสารหลังจากที่เตรียมจากแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ ไม่ว่าจะเป็สายพันธุ์อ้างอิง หรือจากสายพันธุ์ที่แยกโดยตรงจากน้ำร่องลึกปริทันต์ของผู้ป่วย แสดงว่าแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ได้ เช่นเดียวกับผลของสารหลังจากเชื้อที่เพาะเลี้ยงจากร่องลึกปริทันต์โดยรวม และน่าจะแปลความว่า ส่วนหนึ่งของผลที่เกิดจากสารหลังจากเชื้อโดยรวมนั้น มาจากสารที่หลังจากเชื้อสองสายพันธุ์นี้

ส่วนในการตอบคำถามที่ว่า มีสารหลังจากเชื้อชนิดอื่นๆ เกี่ยวข้องด้วยหรือไม่นั้น แม้ว่าจะยังตอบได้ไม่ชัดเจน เนื่องจากยังไม่ได้ทดสอบกับแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ ได้ครบถ้วน แต่จากผลการทดลองที่ได้ โดยเฉพาะผลในตอนที 3 แสดงให้เห็นว่าคุณสมบัติในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 นั้น ไม่ใช่คุณสมบัติของแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ เนื่องจากการทดสอบด้วยสารหลังจากเชื้อ *F.nucleatum* ซึ่งเป็นแบคทีเรียชนิดที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต รวมทั้งสารหลังจาก *E.coli* และ *S.salivarius* นั้น ไม่สามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ในเซลล์เอ็นไดยด์ปริทันต์ได้

นอกจากนี้ ผลจากการทดสอบสารหลังในเซลล์ชนิดต่างๆ ยังแสดงว่า เซลล์ในกลุ่ม fibroblasts คือ เซลล์เหงือก เซลล์เอ็นไดยด์ปริทันต์ เซลล์โพรงฟัน และเซลล์ Human foreskin fibroblasts สามารถตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยสารหลัง และเกิด active MMP-2 ได้คล้ายกัน แต่เมื่อทดสอบในเซลล์ไลน์ของกระดูก คือ U2OS นั้น กลับไม่พบการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ซึ่งผลการทดลองนี้ ชี้ว่าการตอบสนองของเซลล์ต่อสารหลังนั้น ในประการหนึ่งจะขึ้นกับชนิดของเซลล์ และในอีกประการหนึ่ง ชี้ว่าเซลล์ในกลุ่มที่มีรูปร่างคล้ายไฟโบรบลาสต์จะตอบสนองต่อสารหลังได้คล้ายคลึงกันในแง่ของ MMP-2

สิ่งที่น่าสนใจคือกลไกในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 โดยสารหลังจาก *P.gingivalis* และ *A.actinomycetemcomitans* มีความแตกต่างกัน โดยจะพบว่า แม้พื้นฐานของกระบวนการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 นั้นจะเป็น MMP dependent เหมือนกัน แต่ในขณะที่สารหลังจาก *P.gingivalis* มีผลในการเพิ่มระดับของ

MT1-MMP ทั้งในระดับโปรตีนและ mRNA สารหลังจาก *A.actinomycetemcomitans* กลับไม่มีผลต่อ MT1-MMP แต่มีผลในการลดระดับโปรตีน TIMP-2 เท่านั้น ซึ่งผลการทดลองนี้ สะท้อนถึงความแตกต่างของสารในสารหลังจาก แบคทีเรียทั้งสองชนิด ที่ให้ผลในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2

การเพิ่มขึ้นของ MT1-MMP เมื่ออธิบายในแง่ความสัมพันธ์กับการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 นั้น น่าจะเป็นส่วนที่ตรงไปตรงมา คือเมื่อระดับของ MT1-MMP เพิ่มขึ้น การเกิด trimolecular complex (MT1-MMP – TIMP-2 – MMP-2) ก็ควรจะเพิ่มขึ้น รวมทั้งปริมาณ free MT1-MMP ที่จะมากระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ใน trimolecular complex ก็ควรจะเพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน และส่งผลให้ระดับการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 เพิ่มขึ้น ความสัมพันธ์ในลักษณะนี้ สามารถพบในเซลล์มะเร็งเช่นกัน คือเซลล์ที่มีระดับการแสดงออกของ MT1-MMP สูง ก็จะมีความสามารถในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 เพิ่มขึ้นด้วย (Ueno et al., 1997; Nakamura et al., 1999)

การลดลงของ TIMP-2 ก็อาจจะอธิบายได้ในลักษณะเดียวกัน กล่าวคือ การที่มี TIMP-2 ลดลง ก็จะทำให้การเกิด trimolecular complex ลดลงด้วยเช่นกัน ซึ่งผลการลดลงของ TIMP-2 ที่สัมพันธ์กับการลดระดับการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ก็มีรายงานในเซลล์บางชนิดเช่นกัน (Gilles et al., 1998)

อย่างไรก็ดี แม้ว่าเราไม่สามารถเปรียบเทียบความรุนแรงของสารหลังจาก *P.gingivalis* และ *A.actinomycetemcomitans* ในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ได้โดยตรง เนื่องจากเราไม่ทราบว่าสารใดในสารหลังที่เป็นตัวกระตุ้น ทำให้ไม่ทราบความเข้มข้นของสารนั้นๆ ในสารหลังด้วย ดังนั้นหากทำการเปรียบเทียบผลของสารหลังสองชนิดนี้ ก็อาจจะทำให้เกิดความผิดพลาดได้ แต่จากกลไกการกระตุ้น MMP-2 ของสารหลังจาก *A.actinomycetemcomitans* ซึ่งมีผลเฉพาะในระดับโปรตีนของ TIMP-2 โดยไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของ mRNA ทำให้คิดไปได้ว่า ความรุนแรงของสารหลังจาก *P.gingivalis* ซึ่งให้ผลเพิ่ม MT1-MMP ทั้งในระดับโปรตีนและ mRNA น่าจะมีความรุนแรงกว่าสารหลังจาก *A.actinomycetemcomitans* ซึ่งข้อสันนิษฐานนี้สอดคล้องไปกับปริมาณของสารหลังจาก *A.actinomycetemcomitans* ที่ต้องใช้ในระดับที่สูงกว่าสารหลังจาก *P.gingivalis*

ข้อสังเกตอีกประการหนึ่งคือ ความสามารถในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ของสารหลังจาก *P.gingivalis* และ *A.actinomycetemcomitans* นั้น จะหายไปเมื่อนำสารหลังไปต้ม หรืออาจกล่าวได้ว่าถูกทำลายด้วยความร้อน ผลดังกล่าวนี้ ทำให้เกิดข้อสันนิษฐานว่าสารที่เกี่ยวข้องมีคุณสมบัติเป็นโปรตีน คณะผู้วิจัยตั้งสมมติฐาน

ว่า เอนไซม์จากแบคทีเรียในสารหลังจะเป็นตัวกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ได้หรือไม่ โดยอาศัยข้อสังเกต 2 ประการคือ ในประการแรก มีรายงานว่า *P.gingivalis* สามารถหลั่งเอนไซม์ออกมาเป็นจำนวนมาก และในประการที่ 2 การกระตุ้นเซลล์ด้วยสารหลังจาก *P.gingivalis* นั้น หากใช้ปริมาณของสารหลังที่มากพอ จะมีผลทำให้เซลล์เปลี่ยนรูปร่างเป็นทรงกลม หรือหลุดออกจากจานเลี้ยง คล้ายกับผลของการทำลายเซลล์ด้วยเอนไซม์ทริปซิน การที่เซลล์เปลี่ยนรูปร่างเป็นทรงกลม หรือร่อนจากจานเลี้ยงนั้น น่าจะเกิดจากการที่เอนไซม์ในสารหลังไปย่อยโปรตีนผิวเซลล์ที่ทำหน้าที่ยึดเกาะกับจานเลี้ยง การเปลี่ยนแปลงรูปร่างเซลล์นี้ จะทำให้โครงสร้าง cytoskeleton เปลี่ยนไปด้วย และมีรายงานว่า การเปลี่ยนแปลงของ actin ซึ่งเป็น cytoskeleton ในเซลล์ อาจเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการแสดงออกของ MT1-MMP (Tomasek et al., 1997)

อย่างไรก็ดี ผลในส่วนนี้ ขัดแย้งกับผลของสารหลังในตอนที่ 1 ซึ่งเป็นสารหลังของเชื้อทั้งหมดที่เพาะเลี้ยงจากร่องลึกปริทันต์ โดยพบว่าคุณสมบัติของสารหลังจากเชื้อโดยรวมในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 นั้น ทนทานต่อความร้อน ความแตกต่างนี้ อาจเกิดขึ้นเนื่องจากสารจำนวนมากในสารหลังของเชื้อทั้งหมดนั้น เมื่ออยู่ร่วมกันแล้ว จะสามารถช่วยปกป้องซึ่งกันและกัน ทำให้มีความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมได้ดีกว่า หรืออาจจะเป็นสารคนละชนิดกันจริงๆ ก็ได้ อย่างไรก็ดี คณะผู้วิจัยมีความเห็นว่าน่าจะศึกษาในสารหลังของเชื้อชนิดเดียวก่อน จะง่ายต่อการศึกษาและแปลผลมากกว่า

แม้ว่าผลของสารหลังจากแบคทีเรียในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ในรายงานนี้ แม้จะยังไม่สามารถตอบคำถามว่าสารใดในสารหลังที่มีผลในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 แต่คณะผู้วิจัยได้เริ่มงานวิจัยนำร่องขึ้นโดยการแยกสารหลังจากแบคทีเรียด้วย gel filtration column chromatography เพื่อพยายามแยกสารที่มีความสามารถในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 และนำสารนั้นมาศึกษาเพิ่มเติม และขณะนี้กำลังอยู่ในระหว่างดำเนินการ

ผลของ LPS ต่อการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2

สารที่หลังจากแบคทีเรีย นอกจากสารจำพวกเอนไซม์แล้ว ยังประกอบด้วยสารในกลุ่มของ น้ำตาล (polysaccharide) หรือ lipopolysaccharide ซึ่งมีรายงานว่าแบคทีเรียกรัมลบชนิดแท่งจะหลั่ง LPS ออกมาในปริมาณที่ค่อนข้างสูง (Birkedal-Hansen, 1993; Wilaon et al., 1996) LPS เป็นสารที่สามารถกระตุ้นหรือเหนี่ยวนำการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมของเซลล์หลายชนิด (Wilson et al., 1996) รวมทั้งเซลล์สร้างเส้นใยจากเหงือก

(Tamura et al., 1992; Wilson et al., 1996) โดยสารในกลุ่มนี้ สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์สร้างและหลั่ง inflammatory cytokines โดยเฉพาะกลุ่มของ interleukin และ tumor necrosis factor รวมทั้งเพิ่มการสร้างและหลั่งสารในกลุ่ม prostaglandins ด้วย และเซลล์ที่สามารถตอบสนองต่อสารกลุ่มนี้ได้แก่ เซลล์เม็ดเลือดขาวจำพวก mononuclear cells เซลล์บุผนังหลอดเลือด (endothelial cells) และเซลล์สร้างเส้นใย (fibroblast) ผลของการเพิ่มการหลั่ง inflammatory cytokines และ prostaglandins จะมีผลต่อการกระตุ้นการสร้างและหลั่งเอนไซม์ MMP ในเนื้อเยื่อ และนำไปสู่การทำลายของเนื้อเยื่ออย่างกว้างขวาง (Wilson et al., 1996; Gemmell et al., 1997)

อย่างไรก็ดี ผลโดยตรงของ LPS ที่มีต่อ MMP นั้นยังไม่ชัดเจน โดยพบว่าความสัมพันธ์ดังกล่าวน่าจะเกิดผ่านอิทธิพลของ LPS ในการเหนี่ยวนำการแสดงออกของ inflammatory cytokines มากกว่าผลโดยตรงของ LPS เอง โดยพบว่า inflammatory cytokines และ prostaglandins สามารถกระตุ้นการหลั่งและการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มของ MMP หลายชนิด เช่น MMP-1, MMP-8 และ MMP-3 (Birkedal-Hansen, 1993; Gemmell et al., 1997)

แต่ในกรณีของ MMP-2 นั้น ยังไม่มีรายงานโดยตรงที่แสดงถึงผลของ inflammatory cytokines และ prostaglandins ในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 (ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยในครั้งนี้ ดูผลการทดลองในตอน ที่ 6) ดังนั้น ผลของ LPS ในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ในงานวิจัยครั้งนี้ จึงไม่น่าจะเป็นผลโดยอ้อม แต่น่าจะเป็นผลโดยตรงของ LPS เองที่มีต่อเซลล์ หรือต่อเอนไซม์ MMP-2 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยที่ดีพิมพ์ออกมาเมื่อเร็ว ๆ นี้ ที่แสดงว่า LPS ของ *E.coli* บางสายพันธุ์ สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ที่สร้างจากเซลล์สร้างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงจากมดลูก และจากเซลล์บุหลอดเลือด (Takeda et al., 2000; Kim and Koh, 2000)

อย่างไรก็ดี ผลของคณะผู้วิจัยเองกลับพบว่า LPS ของ *E.coli* ที่เลือกใช้นั้น ไม่มีความสามารถในการเหนี่ยวนำการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ในขณะที่ LPS ที่เตรียมจาก *P.gingivalis* และ *A.actinomycetemcomitans* นั้นสามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ได้อย่างชัดเจน ผลดังกล่าวนี้ แสดงถึงความแตกต่างในคุณสมบัติของ LPS ของเชื้อแต่ละชนิด และความแตกต่างอีกประการหนึ่งที่พบ คือ LPS ของทั้ง *P.gingivalis* และ *A.actinomycetemcomitans* นั้นสามารถกระตุ้น MMP-2 โดยการกระตุ้นที่ตัวเอนไซม์ MMP-2 โดยตรง ไม่จำเป็นต้องผ่านเซลล์เหมือนผลของสารหลั่ง การกระตุ้นที่ตัวเอนไซม์โดยตรงนี้ เห็นได้ชัดเจนจากการทดลองที่ LPS สามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ใน conditioned medium ที่ไม่มีเซลล์อยู่ด้วยได้ และระดับของ LPS ที่ใช้ในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ก็เป็นระดับที่สามารถกระตุ้นการตอบสนองของเซลล์เอ็นดोทีเลียลด้วย โดย

สามารถกระตุ้นให้เซลล์เพิ่มการแสดงออกของ IL-1 β และ TNF- α ผลการทดลองนี้ สอดคล้องกับรายงานของ Takeda และคณะ (2000) ที่พบว่า LPS ของ *E.coli* บางสายพันธุ์สามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 โดยไม่ต้องผ่านเซลล์เช่นกัน

นอกจากนี้ ผลการใช้ protease inhibitors เพื่อพยายามยับยั้งผลของ LPS ในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ยังแสดงว่ากลไกการกระตุ้น MMP-2 ที่เกิดขึ้นต่างจากกลไกในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ทั่วไป ด้วย จากรายงานเท่าที่มีในปัจจุบัน พบว่ากลไกการกระตุ้นการทำงานของ MMP เกือบทุกชนิด ยกเว้น MMP-2 จะเกิดจากการตัดส่วน pro-domain ออกโดยเอนไซม์ในกลุ่ม serine proteases (Ellerbroek and Stack, 1999) ในขณะที่ MMP-2 จะไม่สามารถถูกกระตุ้นการทำงานด้วย serine proteases เช่นเดียวกับ MMP ชนิดอื่นๆ แต่จะต้องอาศัยเอนไซม์ MMP บนผิวเซลล์ที่ชื่อว่า MT-MMP เป็นตัวกระตุ้นดังกล่าวแล้วข้างต้น (Strongin et al., 1993, 1995) แต่ผลการทดลองครั้งนี้ พบว่าการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 โดย LPS จะเป็น serine protease dependent mechanism ที่สามารถยับยั้งได้ด้วย serine protease inhibitor ซึ่งเป็นกลไกที่ต่างจากที่เคยมีรายงานมาก่อน

คณะผู้วิจัยได้ทำการวิเคราะห์เพื่อตรวจสอบว่า LPS สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ MT1-MMP ได้หรือไม่ ผลการทดลอง (ไม่ได้แสดงไว้) พบว่าระดับของ MT1-MMP ในเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ การใช้ serine protease inhibitors ยับยั้งผลของ LPS ในสภาวะที่มีเซลล์ ก็สามารถยับยั้งได้โดยสิ้นเชิง ซึ่งแสดงว่า ไม่เกี่ยวข้องกับ MT1-MMP เลย ต่างจากผลของ LPS ในรายงานของ Kim และ Koh (2000) ที่พบว่า LPS สามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ในเซลล์บุหลอดเลือดได้โดยกระตุ้นการทำงานของ MT-MMP บนผิวเซลล์ผ่านทาง NF- κ B ซึ่งเป็น transcription factor ที่ควบคุมการแสดงออกของยีน (gene) หลายชนิด ความแตกต่างนี้ น่าจะเกิดจากโครงสร้างของ LPS จากแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์

หากแปลผลการทดลองที่ได้ ก็น่าจะสรุปว่า โครงสร้างของ LPS มี serine protease activity ที่สามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ซึ่ง Takeda และคณะ (2000) ก็ได้สรุปไว้ในลักษณะเดียวกัน อย่างไรก็ตาม โดยที่โครงสร้างของ LPS นั้นไม่น่าจะมีโปรตีนอยู่ด้วย ดังนั้น จึงเป็นไปได้ว่าโปรตีนนั้นติดมากับ LPS ในระหว่างขั้นตอนการเตรียม LPS เอง แต่ไม่ว่าโปรตีนนั้นจะเรียกว่าเป็นส่วนหนึ่งของ LPS หรือจะเป็นเพียงโปรตีนผิวเซลล์ของแบคทีเรียที่ติดมาในขั้นตอนของการเตรียม ผลการทดลองก็ชี้ชัดว่าโปรตีนหรือเอนไซม์นี้ มีความสามารถในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 และเมื่อประกอบกับความสามารถของ LPS ในการเหนี่ยวนำการแสดงออกของ

inflammatory cytokines หลายชนิดที่มีผลในการเพิ่มการผลิต MMP เข้าสู่เนื้อเยื่อปริทันต์แล้ว กลไกการทำลายเนื้อเยื่อปริทันต์ของ LPS จึงต้องคำนึงถึงปัจจัยทั้งสองส่วนนี้ด้วย

ผลของ IL-1 β และ TNF- α ต่อการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2

เป็นที่ยอมรับกันว่า แบคทีเรียและสารหลังจากแบคทีเรียมีความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เซลล์ของเนื้อเยื่อผลิต inflammatory cytokines (Kent et al., 1998; Matsushita et al., 1999) และในกรณีของรอยโรคปริทันต์นั้น Inflammatory cytokines 2 ตัว คือ IL-1 β และ TNF- α เป็น cytokines หลักที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบของเนื้อเยื่อปริทันต์

ผลการศึกษาในตอนที 6 สอดคล้องกับรายงานดังกล่าว โดยพบว่าสารหลังจากทั้ง *P.gingivalis* และ *A.actinomycetemcomitans* สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เอนโดทีเลียตปริทันต์เพิ่มระดับการแสดงออกของ IL-1 β และ TNF- α ได้ อย่างไรก็ตาม ทั้ง IL-1 β และ TNF- α นั้นไม่ผลต่อการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ในช่วงความเข้มข้น 0.1-10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร แม้ว่า ความเข้มข้นในช่วงดังกล่าวนี้ สามารถกระตุ้นการตอบสนองด้านอื่นๆ ของเซลล์ได้ ซึ่งในที่นี้ คณะผู้วิจัยเลือกที่จะตรวจสอบการตอบสนองของ IL-1 β หลังการกระตุ้นด้วย IL-1 β หรือ TNF- α ซึ่งพบว่า เซลล์เอนโดทีเลียตปริทันต์ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย IL-1 β และ TNF- α โดยการเพิ่มระดับการแสดงออกของ IL-1 β อย่างชัดเจน แม้จะมีรายงานว่า การเพิ่มขึ้นของ IL-1 β และ TNF- α จะมีผลต่อการผลิต MMP ตัวอื่นๆ เช่น MMP-1 แต่ยังไม่เคยมีรายงานว่า cytokines ทั้งสองนี้ จะมีผลต่อ MMP-2 และตรงกันกับผลการศึกษาในครั้งนี้ ที่แสดงว่าการกระตุ้นด้วย IL-1 β และ TNF- α ไม่มีผลต่อ MMP-2 โดยไม่มีผลทั้งในสภาวะที่กระตุ้นด้วย IL-1 β และ TNF- α เพียงอย่างเดียว หรือกระตุ้นพร้อมกับสารหลังจากแบคทีเรีย

ผลของฟลูออไรด์ คลอเฮกซิดีน และสารสกัดจากชาเขียว

ในการทดลองเพื่อหาทางยับยั้งผลของสารหลังจากแบคทีเรียในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 นั้น ยังไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร จากความพยายามในการใช้ฟลูออไรด์ ซึ่งเป็นสารที่มีรายงานว่าสามารถยับยั้งการหลั่งเอนไซม์บางชนิดได้ พบว่า ฟลูออไรด์ในระดับที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ คือที่ระดับต่ำกว่า 10 พีพีเอ็มนั้นไม่มีผลต่อ MMP-2 เลย ในขณะที่ฟลูออไรด์ในระดับเดียวกันนี้ สามารถยับยั้งการหลั่งเอนไซม์ MMP-1 และ MMP-3 ในเซลล์

เห้งออกได้ (ผลการทดลองที่ได้จากห้องปฏิบัติการ และกำลังอยู่ในระหว่างเตรียมบทความตีพิมพ์) อย่างไรก็ตาม กลไกการทำงานของฟลูออไรด์ที่มีต่อการหลั่ง MMP นั้น ยังไม่เป็นที่เข้าใจอย่างชัดเจน

ในขณะเดียวกัน การใช้คลอเฮกซิดีนนั้น ก็ยังคงมีปัญหา สารคลอเฮกซิดีนเอง มีคุณสมบัติในการจับกับแคลเซียมได้ และสามารถยับยั้งการทำงานของ MMP ได้ในระดับหนึ่ง (Gendron et al., 1999) แต่จากผลการทดลองพบว่า ระดับที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์นั้น จะไม่มีผลต่อเอนไซม์ MMP-2 ในขณะที่ระดับของ borderline คือเริ่มพบความเป็นพิษต่อเซลล์ จะเห็นผลในการยับยั้งทั้งการหลั่งและการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 อย่างชัดเจน (ไม่ได้แสดงผลไว้) แต่เนื่องจากระดับที่แสดงผลนั้น เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างอย่างชัดเจน รวมทั้งมีจำนวนน้อยลง ซึ่งแสดงถึงความเป็นพิษต่อเซลล์ การเลือกใช้สารตัวนี้ จึงไม่น่าจะเหมาะสม

คณะผู้วิจัยได้ทดสอบเพิ่มเติมถึงผลของสารสกัดจากใบชาเขียว จากความรู้ที่ว่า ชาเขียวมีคุณสมบัติในการป้องกันการเกิดและการแพร่กระจายของโรคมะเร็งหลายชนิด ซึ่งเอนไซม์ MMP หลายชนิดรวมทั้ง MMP-2 เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทอย่างมากในการดำเนินโรคของมะเร็ง และมีความสมเหตุสมผลในการตั้งสมมติฐานว่าสารสกัดจากชาเขียวน่าจะมีคุณสมบัติยับยั้งการหลั่งหรือการทำงานของ MMP ผลการทดลองเบื้องต้นสอดคล้องกับสมมติฐานดังกล่าว และในปัจจุบันคณะผู้วิจัยกำลังดำเนินการเพื่อแยกสารโดยเฉพาะในกลุ่มของคาเทชิน ซึ่งเป็นสารกลุ่มโพลีฟีนอลจากชาเขียวเพื่อดำเนินการทดลองต่อไป

บทสรุป

ผลการทดลองครั้งนี้ แสดงว่าสารหลังจากแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต ที่เพาะเลี้ยงได้จากร่องลึกปริทันต์ของผู้ป่วย โดยเฉพาะสารหลังจากเชื้อ *P.gingivalis* และ *A.actinomycetemcomitans* สามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ที่หลังจากเซลล์เหงือกและเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ โดยกลไกการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 จากสารหลังของเชื้อทั้งสองชนิดนี้จะต่างกันเล็กน้อย คือสารหลังจาก *P.gingivais* จะเพิ่มระดับของ MT1-MMP ทั้งในระดับโปรตีนและ mRNA ในขณะที่สารหลังจาก *A.actinomycetemcomitans* จะมีผลในการลดระดับของโปรตีน TIMP-2 นอกจากนี้ ยังพบว่า LPS ที่สร้างจากแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้ สามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ได้โดยตรงผ่านทาง serine protease activity ของ LPS ด้วย นอกจากนี้ ผลการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 จากทั้งสารหลังและ LPS ไม่เกี่ยวข้องกับระดับของ inflammatory cytokines โดยเฉพาะ IL-1 β และ TNF- α ทั้งที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ หรือที่หลังจากเซลล์เอง และผลการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 นี้ไม่สามารถยับยั้งได้ด้วยฟลูออไรด์และคลอเฮกซิดีน

เอกสารอ้างอิง

- Alexander CM, Werb Z. Proteinases and extracellular matrix remodeling. *Curr Opin Cell Biol* 1989;1:974-82.
- Al-Hendy A, Toivanen P, Skurnik M. Rapid method for isolation and staining of bacterial lipopolysaccharide. *Micro Immunol* 1991;35:331-3.
- Amies RT, Quigley JP. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzymes catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific $\frac{3}{4}$ and $\frac{1}{4}$ length fragments. *J Biol Chem* 1995;270:5872-6.
- Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol* 1993;64:474-84.
- Bode W, Fernandez-Catalan C, Tschesche H, Grams F, Nagase H, Maskos K. Structural properties of matrix metalloproteinases. *Cell Mol Life Sci* 1999;55:639-52.
- Charoonpatrapong K, Pattamapun K. Comparison of two methods in measuring the cytotoxicity effects: Methylene blue assay and MTT assay. *CU Dent J* 2000;23:83-90.
- Collier IE, Wilhelm SM, Eisen AZ, Marmer BL, Grant GA, Seltzer JL, Kronberger A, He C, Bauer EA, Goldberg GI. H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement membrane collagen. *J Biol Chem* 1988;263:6579-87.
- Coowattanasuchat J, Laousrisin N. Identification of bacteria in periodontal pockets of Thai periodontitis patients. *CU Dent J* 1998;21:31-5.
- Cowell S, Knauper V, Stewart ML, d'Ortho MP, Stanton H, Hembry RM, Lopez- Otin C, Reynolds JJ, Murphy G. Induction of matrix metalloproteinase activation cascades based on membrane-type 1 matrix metalloproteinase-associated activation of gelatinase A, gelatinase B and collagenase 3. *Biochem J* 1998;331:453-8.
- Creemers LB, Jansen ID, Docherty AJP, Reynolds JJ, Beertsen W, Everts V. Gelatinase A (MMP-2) and cysteine proteinases are essential for the degradation of collagen in soft connective tissue. *Matrix Biol* 1998;17:35-46.
- Darongsuwan T, Pavasant P. *In vitro* effect of hydroxyapatite crystal on gingival and periodontal ligament fibroblasts. *CU Dent J* 1997;20:183-93.

- Darongsuwan T, Pavasant P. PDGF stimulates proliferation and matrices synthesis in cultured human PDL cells. J Dent Assoc Thai 1999;49:301-11.
- DeCarlo AA Jr., Windsor LJ, Bodden MK, Harber GL, Birkedal-Hansen B, Birkedal-Hansen H. Activation and noval processing of matrix metalloproteinases by a thiol-proteinase from the oral anaerobe *Porphyromonas gingivalis*. J Dent Res 1997;76:1260-70.
- Dhanesuan N, Pavasant P. Stimulation of MMP-3 (stromelysin-1) secretion in periodontal ligament fibroblasts by increasing level of intracellular calcium and cyclic AMP *in vitro*. CU Dent J 1998;21:147-155.
- Ding Y, Uitto V-J, Firth J, Salo T, Maapasalo M, Kontinen YT, et al. Modulation of host matrix metalloproteinase by bacterial virulence factors relevant in human periodontal disease. Oral Dis 1995;1:279-86.
- Ellerbroek SM, Stack MS. Membrane associated matrix metalloproteinases in metastasis. BioEssays 1999;21:940-9.
- Firth JD, Putnins EE, Larjava H, Uitto V-J. Bacterial phospholipase C upregulates matrix metalloproteinase expression by cultured epithelial cell. Infect Immun 1997;65:4931-6.
- Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. Periodontol 2000 1997;14:112-43.
- Gendron R, Grenier D, Sorsa T, Mayrand D Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. Clin Diagn Lab Immunol 1999;6:437-9.
- Gilles C, Bassuk JA, Pulyaeva H, Sage EH, Foidart JM, Thompson EW. SPARC/osteonectin induces matrix metalloproteinase 2 activation in human breast cancer cell lines. Cancer Res 1998;58:5529-36.
- Haffajee AD, Socransky S. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. Periodontol 2000 1994;5:78-111.
- Heikinheimo K, Sato T. Expression of basement membrane type IV collagen and type IV collagenases (MMP-2 and MMP-9) in human fetal teeth. J Dent Res 1995;74:1226-34.
- Ingman T, sorsa T, Lindy O, Koshi H, Kontinen YT. Multiple forms of gelatinases/type IV collagenases in saliva and gingival crevicular fluid of periodontitis patients. J Clin Periodontol 1994;21:26-31.
- Johansson A, Bergenholtz A, Holm SE. Strong cytotoxicity to human gingival fibroblasts by *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277. J Periodont Res 1996;31:477-82.
- Kent LW, Rahemtulla F, Hockett Jr RD, Gilleland RC, Michalek SM. Effect of lipopolysaccharide and inflammatory cytokines on interleukin-6 production by healthy human gingival fibroblasts. Infect and Immunity 1998;66:608-14.

- Kerkvliet EHM, Docherty AJP, Beertsen W, Everts V. Collagen breakdown in soft connective tissue explants is associated with the level of active gelatinase A (MMP-2) but not with collagenase. *Matrix Biol* 1999;17:373-80.
- Kim HG, Koh GY. Lipopolysaccharide activates matrix metalloproteinase-2 in endothelial cells through an NF-kB dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;269:401-5.
- Korostoff JM, Wang JF, Sarment DP, Stewart JC, Feldman RS, Billings PC. Analysis of in situ protease activity in chronic adult periodontitis patients: expression of activated MMP-2 and a 40 kDa serine protease. *J Periodontol* 2000;71:353-60.
- Kubota T, Nomura T, Takahashi T, Hara K. Expression of mRNA for matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in periodontitis-affected human gingival tissue. *Arch Oral Biol* 1996;41:253-62.
- Kusano K, Miyaura C, Inada M, Tamura T, Ito A, Nagase H, Kamoi K, Suda T. Regulation of matrix metalloproteinases (MMP-2, -3, -9, and -13) by interleukin-1 and interleukin-6 in mouse calvaria: association of MMP induction with bone resorption. *Endocrinology* 1998;139:1338-45.
- Liao EY, Luo XH. Effects of 17beta-estradiol on the expression of matrix metalloproteinase-1, -2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in human osteoblast-like cell cultures. *Endocrine* 2001;15:291-5.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685.
- Loesche WJ, Hockett RN, Syed SA. Evaluation of Kanamycin as an aid in the isolation of *Bacteroides melaninogenicus* from dental plaque. *Arch Oral Biol* 1971;16:813-15.
- Loesche WJ, Hockett RN, Syed SA. The predominant cultivable flora of tooth surface plaque removed from institutionalized subjects. *Arch Oral Biol* 1972;17:1311-25.
- Makela M, Salo T, Uitto V-J, Larjava H. Matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) of the oral cavity: cellular origin and relationship to periodontal status. *J Dent Res* 1994;73:1397-1406.
- Matsushita K, Tajima T, Tomita K, Takada H, Nagaoka S, Torii M. Inflammatory cytokine production and specific antibody responses to lipopolysaccharide from endodontopathic black-pigmented bacteria in patients with multilesional periapical periodontitis. *J Endod* 1999;25:795-9.
- McFarland CG, Reynolds JJ, Meikle MC. The release of interleukin-1 beta, tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma by cultured peripheral blood mononuclear cells from patients with periodontitis. *J Periodont Res* 1990;25:207-14.

- Merril C. R., Joy J. E. and Creed J. Ultrasensitive silver-based stains for protein detection. In Cell biology: A laboratory handbook. vol 3. Editor: Celis J. E. 1994 : 281-287
- Moore WEC, Moore LH, Ranney RR, Smibert RM, Burrmeister JA, Schenkein HA. The microflora of periodontal sites showing destructive progression. J Clin Periodontol 1991;18:729-39.
- Morgunova E, Tuuttila A, Bergmann U, Isupov M, Lindqvist Y, Schneider G, Tryggvason K. Structure of human pro-matrix metalloproteinase-2: Activation mechanism revealed. Science 1999;284:1667-70.
- Murmer J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. J Mol Biol 1961;3:208-18.
- Nakamura H, Ueno H, Yamashita K, Shimada T, Yamamoto E, Noguchi M, Fujimoto N, Sato H, Seiki M, Okada Y. Enhanced production and activation of progelatinase A mediated by membrane-type 1 matrix metalloproteinase in human papillary thyroid carcinomas. Cancer Res 1999;59:469-73.
- Ooshima T, Minami T, Aono W, Izumitani A, Sobue S, Fujiwara T, Kawabata S, Hamada S. Oolong tea polyphenols inhibit experimental dental caries in SPF rats infected with mutans streptococci. Caries Res. 1993;27:124-9
- Payne JB, Peluso JF Jr., Nichols FC. Longitudinal evaluation of peripheral blood monocyte secretory function in periodontitis-resistant and periodontitis-susceptible patients. Arch Oral Biol 1993;38:309-17.
- Romanelli R, Mancini S, Lashinger C, Overall CM, Sodek J, McCulloch CA. Activation of neutrophil collagenase in periodontitis. Infect Immun 1999;67:2319-26.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
- Shapiro SD. Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. Curr Opin Cell Biol 1998;10:602-8.
- Slots J. Selective medium for isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J Clin Micro 1982;15:606-9.
- Sorsa T, Ingman T, Suomalainen K, Haapasalo M, Kontinen YT, Lindy O, Saari H, Uitto VJ.. Identification of protease from periodontopathogenic bacteria as activators of latent human neutrophil and fibroblast-type interstitial collagenase. Infect Immun 1992;60:4491-5.
- Sorsa T, Uitto V-J, Suomalainen K, Vauhkonen M, Lindy S. Comparison of interstitial collagenases from human gingiva, sulcular fluid and polymorphonuclear leukocytes. J Periodont Res 1988;23:386-93.

- Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI. Mechanism of cell surface activation of 72 kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloproteinase. J Biol Chem 1995;270:5331-8.
- Strongin AY, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI. Plasma membrane-dependent activation of the 72kDa type IV collagenase is prevented by complex formation with TIMP-2. J Biol Chem 1993;268:14033-39.
- Syed SA, Loesche WJ, Pope HL, Grenier E. Predominant cultivable flora isolated from human root surface caries plaque. Infect Immun 1972;11:721-31.
- Takeda M, Imada K, Sato T, Ito A. Activation of human procollagenase A/ promatrix metallo-proteinase 2 by *Escherichia coli*-derived serine protease. Biochem Biophys Res Commun 2000;268:128-32.
- Tamura M, Tokuda M, Nagaoka S, Takada H. Lipopolysaccharides of *Bacteroides intermedius* (*Prevotella intermedia*) and *Bacteroides (Porphyromonas) gingivakis* induce interleukin-8 gene expression in human gingival fibroblast cultures. Infect Immun 1992;60:4932-7.
- Tomasek JJ, Halliday NL, Updike DL, Ahern-Moore JS, Vu TK, Liu RW, Howard EW. Gelatinase A activation is regulated by the organization of the polymerized actin cytoskeleton. J Biol Chem 1997;272:7482-7.
- Ueno H, Nakamura H, Inoue M, Imai K, Noguchi M, Sato H, Seiki M, Okada Y. Expression and tissue localization of membrane-types 1,2, and 3 matrix metalloproteinases in human invasive breast carcinomas. Cancer Res 1997;57:2055-60.
- Uitto V-J, Larjava H, Heino J, Sorsa T. A protease of *Bacteroides gingivalis* degrades cell surface and matrix glycoprotein of cultured gingival fibroblasts and induces secretion of collagenase and plasminogen activator. Infect Immun 1989;57:213-8.
- Wang PL, Shirasu S, Shinohara M, Daito M, Oido M, Kowashi Y, Ohura K. Induction of apoptosis in human gingival fibroblasts by a *Porphyromonas gingivalis* protease preparation. Arch Oral Biol 1999;44:337-42.
- Will H, Hinzmann B. cDNA sequence and mRNA tissue distribution of a novel human matrix metalloproteinase with a potential transmembrane segment. Eur J Biochem 1995;231:602-8.
- Wilson M, Reddi K, Henderson B. Cytokines-inducing components of periodontopathogenic bacteria. J Periodont Res 1996;31:393-407.
- Woessner JF Jr., Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodelling. FASEB J 1991;5:2145-54.
- Woessner JF, Nagase H. editors. Matrix metalloproteinases and TIMPs. 1st ed. New York: Oxford, 2000:pp 1-9.

Yu M, Sato H, Seiki M, Thompson EW. Complex regulation of membrane-type matrix metalloproteinase expression and matrix metalloproteinase-2 activation by concanavalin A in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Cancer Res* 1995;55:3272-7.