การแสดงออกของเอชเอ็มจีบี-1 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อก่อโรคปริทันต์

ปริญญานิพนธ์

ของ

รุ่งทิวา ปันป่า

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาปริทันตวิทยา
มีนาคม 2552

การแสดงออกของเอชเอ็มจีบี-1 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อก่อโรคปริทันต์

ปริญญานิพนธ์
ของ
รุ่งทิวา ปันป่า

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาปริทันตวิทยา
มีนาคม 2552
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การแสดงออกของเอชเอ็มจีบี-1 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อก่อโรคปริทันต์

บทคัดย่อ

ของ

รุ่งทิวา ปันป่า

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาปริทันตวิทยา
มีนาคม 2552

รุ่งทิวา ปันป่า(2552) *การแสดงออกของเอชเอ็มจีบี-1ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์ เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อก่อโรคปริทันต์* ปริญญานิพนธ์ วท.ม.(ปริทันตวิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม: รองศาสตราจารย์ทันตแพทย์ ดร. ณรงค์ศักดิ์ เหล่าศรีสิน อาจารย์ทันตแพทย์หญิง ดร.นิรดา ธเนศวร

เอชเอ็มจีบี-1 เป็นนิวเคลียร์โปรตีนที่จัดว่าเป็นไซโตไคน์ที่หลั่งออกมาค่อนข้างช้ากว่าไซโตไคน์ชนิดอื่น ๆ แต่พบมีบทบาทสำคัญในโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบหลายโรค ซึ่งในการวิจัยก่อนหน้า พบมีการแสดงออกของเอชเอ็มจีบี-1 มากขึ้น เมื่อกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและของเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์ด้วยไลโพโปลีแซคคาไรค์ของอีโคไล

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาการแสดงออกของเอชเอ็มจีบี-1ทั้งในระดับ เมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอและโปรตีน ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและของเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อก่อโรคปริทันต์

วิธีดำเนินการวิจัย เลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและของเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์และกระตุ้นเซลล์ทั้งสองชนิดนี้ด้วยส่วนของเชื้อก่อโรคปริทันต์ 3 อย่าง ได้แก่ สารบริสุทธิ์ไลโพโปลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ส่วนสกัดเซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส และส่วนลอยของอาหารเลี้ยงแอคกริเกติแบคเตอร์แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ จากนั้นทำการตรวจการแสดงออกของเอชเอ็มจีบี-1 ในระดับเมสเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอและระดับโปรตีนด้วยวิธีอาร์ที-พีซีอาร์และวิธีเวสเทิร์นบลอทตามลำดับ

ผลการวิจัย พบการแสดงออกของเอชเอ็มจีบี-1 เพิ่มขึ้นทั้งในระดับเมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอและระดับโปรตีนในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือก ขณะที่ ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์พบการเพิ่มขึ้นในระดับโปรตีนเท่านั้นเมื่อกระตุ้นด้วยไลโพโปลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ในขณะที่เมื่อกระตุ้นเซลล์ทั้งสองด้วยส่วนลอยของอาหารเลี้ยงแอคกริเกติแบคเตอร์แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ และส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส กลับไม่พบการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนของเอชเอ็มจีบี-1 ทั้งในระดับเมสเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอและระดับโปรตีน

บทสรุป ภายใต้สภาวะของการวิจัยนี้ แสดงว่าสารบริสุทธิ์ไลโพโปลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสเท่านั้นที่สามารถกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและของเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์ ให้มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของเอชเอ็มจีบี-1

HMGB1 Expression in Human Gingival and PDL Fibroblast Activated by Periodontopathic Bacteria.

AN ABSTRACT

BY

RUNGTIWA PUNPA

Presented in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Master of Science Degree in Periodontology

at Srinakharinwirot University

March 2009

Rungtiwa Punpa. (2009). *HMGB1 Expression in Human Gingival and PDL Fibroblast Activated by Periodontopathic Bacteria*. Master thesis, M.S. (Periodontology). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Assoc. Prof. Dr. Narongsak Laosrisin, Dr. Nirada Dhanesuan .

High mobility group box1 (HMGB1) protein is nuclear protein which is recognized as late inflammatory cytokine but plays important roles in many inflammatory diseases. Our previous study showed highly expression of HMGB1 in both human gingival and PDL fibroblast after activated by *E. coli* 's lipopolysaccharide (LPS).

Objectives: To investigate the expression of HMGB1 in both human gingival and PDL fibroblasts after the activation of periodontopathic bacteria in mRNA and protein levels.

Materials and Methods: Human gingival and PDL fibroblasts were cultured and activated by purified LPS of *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*.) or culture supernatant of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*.) or sonicated extract of *Pg* . The expression of HMGB1 ,mRNA and protein levels, were determined by RT-PCR and Western blot respectively.

Results: Both HMGB1 mRNA and protein expression were upregulated in human gingival fibroblast when activated by LPS of *Pg,* while only HMGB1 protein level was upregulated in PDL fibroblast. While limited change of HMGB1 mRNA and protein level in both cells were found when activated by culture supernatant of *Aa*. or sonicated extract of *Pg.*

Conclusions : The results showed that only the purified LPS of *Pg*. can activate the expression of HMGB1 in gingival and PDL fibroblasts.

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การแสดงออกของเอชเอ็มจีบี-1 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์
เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อก่อโรคปริทันต์

ของ

รุ่งทิวา ปันป่า

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาปริทันตวิทยา
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.สมชาย สันติวัฒนกุล)
วันที่.....เดือน มีนาคม พ.ศ. 2552

คณะกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์

.....ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ทพ. ณรงค์ศักดิ์ เหล่าศรีสิน)

.....กรรมการ
(อาจารย์ทพญ.นิรดา ธเนศวร)

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

.....ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ทพญ. ทิพาพร วงศ์สุรสิทธิ์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ทพ.ณรงค์ศักดิ์ เหล่าศรีสิน)

.....กรรมการ
(อาจารย์ทพญ.นิรดา ธเนศวร)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทพญ.สาครรัตน์ คงขุนเทียน)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความช่วยเหลือและคำแนะนำอย่างดียิ่งจากคณาจารย์หลายท่าน ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร.ณรงค์ศักดิ์ เหล่าศรีสิน ประธานควบคุมปริญญานิพนธ์ และอาจารย์ทันตแพทย์หญิง ดร. นิรดา ธเนศวร กรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำแนวทาง ข้อมูลและข้อคิดเห็นต่างๆ ที่มีประโยชน์ต่อการทำวิจัยในครั้งนี้ด้วยดีตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ทิพาพร วงศ์สุรสิทธิ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ทันตแพทย์หญิง สาครรัตน์ คงขุนเทียนที่กรุณาร่วมเป็นกรรมการสอบเค้าโครงและสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ ตลอดจนให้คำแนะนำและข้อเสนอแนะต่างๆของการวิจัยรวมทั้งให้ความกรุณาตรวจแก้ไขปริญญานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทันตแพทย์หญิง ดร.สิริลักษณ์ ตีรณธนากุล, อาจารย์ ดร.ดวงพร ศรีสุภาพ ที่กรุณาแนะนำและเอื้อเฟื้อวัสดุและอุปกร์ต่างๆในการทำวิจัย และอาจารย์ ทันตแพทย์ อเนก ชยสดมภ์ สำหรับส่วนสกัดเซลล์แตกพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส สายพันธ์ ATCC33277

ขอขอบคุณทันตแพทย์หญิงกนิษฐ์ นันทเสนีย์ และทันตแพทย์หญิงศรินทิพย์ อังศุโภไคย ที่เอื้อเฟื้อวัสดุและอุปกรณ์ต่างๆในการทำวิจัย

และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาโอษฐวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ทุกท่านที่ให้การช่วยเหลือและให้คำแนะนำเป็นอย่างดี

ท้ายที่สุดนี้ผู้วิจัยใคร่ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ผู้เป็นที่รักยิ่ง ที่ให้การสนับสนุนและคอยให้กำลังใจจนสำเร็จการศึกษา

รุ่งทิวา ปันป่า

สารบัญ

บทที่ **หน้า**

1 บทนำ.....1

ภูมิหลัง.....1

ความมุ่งหมายของการวิจัย.....3

ความสำคัญของการวิจัย.....3

ขอบเขตของการวิจัย.....4

กรอบแนวคิดของการวิจัย..... 4

สมมติฐานในการวิจัย.....6

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....7

โรคปริทันต์อักเสบ.....7

พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสกับโรคปริทันต์อักเสบ 8

แอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์กับโรคปริทันต์อักเสบ.....11

เอชเอ็มจีบี-1.....14

บทบาทไซโตไคน์ของเอชเอ็มจีบี-1.....15

3 วิธีดำเนินการวิจัย.....19

การกำหนดกลุ่มตัวอย่าง.....20

การสร้างเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....20

การทดสอบความเป็นพิษด้วยเทคนิค MTT assay.....22

วิธีการวิจัย.....23

วิเคราะห์ข้อมูล.....27

4 ผลการวิจัย.....28

การทดสอบความเป็นพิษของเซลล์ด้วยไลโพโปลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส

.....28

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ **หน้า**

4 (ต่อ).....28

การแสดงออกของเอชเอ็มจีบี-1 ในระดับเมสเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอและระดับโปรตีนเมื่อกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์ด้วยไลโพโปลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส.....28

การทดสอบความเป็นพิษของเซลล์ด้วยส่วนสกัดเซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส.....30

การแสดงออกของเอชเอ็มจีบี-1 ในระดับเมสเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอและระดับโปรตีนเมื่อกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์ด้วยส่วนสกัดเซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส.....31

การแสดงออกของเอชเอ็มจีบี-1 ในระดับเมสเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอและระดับโปรตีนเมื่อกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์ด้วยส่วนลอยจากแอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์..... 34

5 อภิปรายผลและบทสรุป.....37

อภิปรายผล.....37

บทสรุป.....42

บรรณานุกรม.....43

ประวัติย่อผู้วิจัย.....52

บัญชีตาราง

ตาราง **หน้า**

1 แสดงปัจจัยที่มีความรุนแรงที่ผลิตโดยพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส.....9
2 แสดงปัจจัยก่อโรคของแอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์.....12
3 ลักษณะของเอชเอ็มจีโครมาตินโปรตีน.....14
4 บทบาทของเอชเอ็มจีบี-1ต่อเซลล์และเนื้อเยื่อต่างๆ.....17

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ **หน้า**

1 แสดงโครงสร้างของเอชเอ็มจีบี…..15

2 แสดงกลไลการหลั่งเอชเอ็มจีบี-1 ……16

3 กราฟแท่งแสดงผลการทดสอบระดับความเป็นพิษของไลโพโปลีแซคคาไรค์ ของพอร์ไฟโรโมแนจิงจิวาลิสที่มีผลต่อเซลล์……..28

4 การแสดงออกของเอชเอ็มจีบี-1 ในระดับเมสเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอและระดับโปรตีนเมื่อกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกด้วยไลโพโปลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวาลิสและแสดงกราฟเส้นแสดงความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์และความเข้มของแถบโปรตีน……29

5 การแสดงออกของเอชเอ็มจีบี-1 ในระดับเมสเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอและระดับโปรตีนเมื่อกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์ด้วยไลโพโปลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวาลิส และแสดงกราฟเส้นแสดงความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์และความเข้มของแถบโปรตีน……..30

6 กราฟแท่งแสดงผลการทดสอบระดับความเป็นพิษของส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวาลิส ที่มีผลต่อเซลล์……31

7 การแสดงออกของเอชเอ็มจีบี-1 ในระดับเมสเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอและระดับโปรตีนเมื่อกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์ด้วยส่วนสกัดเซลล์แตกคลื่นเสียงของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส……..32

8 กราฟเส้นแสดงความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของเอชเอ็มจีบี-1 และความเข้มของแถบโปรตีนเอชเอ็มจีบี-1เมื่อกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์ด้วยส่วนสกัดเซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวาลิส……..33

9 การแสดงออกของเอชเอ็มจีบี-1 ในระดับเมสเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอ และระดับโปรตีน เมื่อกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์ด้วยส่วนลอยจากแอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์แทนส์……35

10 กราฟเส้นแสดงความเข้มแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของเอชเอ็มจีบี-1และความเข้มของแถบโปรตีนเอชเอ็มจีบี-1 เมื่อกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์ด้วยส่วนลอยจากแอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์……..36

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ **หน้า**

11 แสดงพยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์อักเสบและปัจจัยที่เกี่ยวข้อง.....37

บทที่ 1
บทนำ

ภูมิหลัง

เอชเอ็มจีบี-1 (High mobility group box 1 , HMGB1) เป็นโปรตีนขนาดเล็กถูกค้นพบมาประมาณ 30 ปีที่แล้ว โครงสร้างประกอบด้วย เอชเอ็มจีบ็อกซ์ (HMG boxes) ซึ่งเป็นส่วนจับของ ดีเอ็นเอ (DNA binding domains) และ ส่วนปลายที่เป็นกรด (acidic tail) แต่เดิมเอชเอ็มจีบี-1 ถูกค้นพบเป็นส่วนประกอบหนึ่งของนิวเคลียส[1] เอชเอ็มจีบี-1 ช่วยการทำหน้าที่หลายอย่างของนิวเคลียสและมีบทบาทต่อการแสดงออกของดีเอ็นเอ อันได้แก่ ทรานสคริปชั่น (transcription) การถอดแบบ (replication) และ วี(ดี)เจ รีคอมบิเนชั่น (V(D)J recombination) ในการศึกษาระยะต่อมาพบว่าเอชเอ็มจีบี-1 ไม่ได้จำกัดอยู่หรือมีบทบาทเฉพาะภายในเซลล์ แต่พบมีบทบาทภายนอกเซลล์ด้วย[2]

เอชเอ็มจีบี-1 สามารถพบได้ในเนื้อเยื่อต่างๆ และสามารถถูกหลั่งออกจากเซลล์ได้หลายชนิด เช่น เซลล์โมโนไซต์ (monocyte) แมกโครแฟจ (macrophage) เซลล์บุผนังหลอดเลือด (endothelial cell) เซลล์เดนไดรติก (dendritic cell) และเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ (smooth muscles cell) ที่ถูกกระตุ้น มีการศึกษาพบว่าเซลล์โมโนไซต์และแมกโครแฟจ จะสามารถหลั่ง เอชเอ็มจีบี-1 เมื่อถูกกระตุ้นโดยสารพิษภายในของแบคทีเรีย (exogenous bacterial endotoxin) เช่น ไลโพโปลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide: LPS) เป็นต้น หรือ เมื่อถูกกระตุ้นโดยไซโตไคน์อักเสบ (proinflammatory cytokine) เช่น ทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์ (tumor necrosis factor: TNF) เป็นต้น[3-5] โดยการหลั่งเอชเอ็มจีบี-1 ขึ้นกับเวลาและปริมาณที่กระตุ้น นอกจากนั้นยังสามารถหลั่งจากเซลล์ที่ถูกทำลาย (damage cell) หรือเกิดการตาย (necrotic cell) แต่ไม่หลั่งจากการขจัดตัวเองของเซลล์ (apoptotic cell)

การหลั่งของเอชเอ็มจีบี-1 จะมีผลต่อการกระตุ้นกระบวนการอักเสบหลายด้าน โดยสามารถกระตุ้นการเพิ่มปริมาณทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์ในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียร์ที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ (primary blood mononuclear culture) และการเพิ่มชั้นของโมเลกุลที่ใช้ในการยึดเกาะ (adhesion molecule) รวมทั้งยังกระตุ้นการหลั่งไซโตไคน์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบได้แก่ ทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์ และ อินเทอร์ลิวคิน-8 (interleukin-8: IL-8) ในเซลล์บุผนังหลอดเลือดด้วย[6]

เอชเอ็มจีบี-1 ยังมีบทบาทต่อการเกิดโรคต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบไม่ว่าจะเป็นการอักเสบแบบเฉียบพลันหรือแบบเรื้อรัง เช่น โรคไขข้ออักเสบ (arthritis)[7,8] โดยพบว่า เอชเอ็ม

จีบี-1 มีการเพิ่มระดับในเยื่อบุข้อต่อที่อักเสบ (inflammatory synovial tissue) และ ของเหลวที่หลั่งจากเยื่อบุข้อต่อ (synovial fluid) จากผู้ป่วยโรคไขข้ออักเสบ รวมไปถึงสภาวะอื่น ๆ ได้แก่ สภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด (sepsis)[9] โดยเอชเอ็มจีบี-1 ถูกจัดว่าเป็นไซโตไคน์ที่หลั่งออกมาค่อนข้างช้ากว่าไซโตไคน์ชนิดอื่น ๆ (late mediator) ในกระบวนการของการอักเสบ และปัจจุบันได้มีความพยายามในการยับยั้งเอชเอ็มจีบี-1ในผู้ป่วยในห้องฉุกเฉินเพื่อลดอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยลง แต่อย่างไรก็ตามยังพบว่ามีการศึกษาที่แสดงถึงบทบาทของเอชเอ็มจีบี-1 กับโรคในช่องปากอยู่น้อยมาก

โรคปริทันต์อักเสบ (periodontitis) เป็นโรคติดเชื้อที่มีการอักเสบแบบเรื้อรัง โดยพบว่ามีการทำลายของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) และกระดูกเบ้าฟัน (alveolar bone) การเกิดโรคปริทันต์อักเสบนั้นมีความสัมพันธ์กับเชื้อก่อโรคที่สำคัญ[10] คือ แอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ *(Aggregatibacter actinomycetemcomitans; Aa*) พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส (*Porphyromonas gingivalis; Pg*) แทนเนอเรลลา ฟอร์ซัยเธียซิส (*Tannerella forsythensis; Tf*) พยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์อักเสบ (pathogenesis of periodontitis) ขึ้นอยู่กับความสมดุลระหว่างปัจจัยต่าง ๆ ทั้งปัจจัยทางด้านชนิดของแบคทีเรียก่อโรคและปัจจัยที่มีความรุนแรงของแบคทีเรีย (virulent factors) นั้น ๆ ร่วมกับปัจจัยทางระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยกระบวนการของการเกิดพยาธิสภาพของโรคปริทันต์อักเสบส่วนใหญ่แล้วเป็นผลมาจากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อแบคทีเรียก่อโรคหรือต่อปัจจัยที่มีความรุนแรงของแบคทีเรีย ซึ่งเหนี่ยวนำให้เกิดการทำลายของเนื้อเยื่อตามมาได้

จากที่ได้กล่าวมาข้างต้นแล้วว่าเอชเอ็มจีบี-1 มีการแสดงออกในเซลล์หลายชนิด และมีบทบาทต่อโรคที่เกิดการอักเสบ อย่างไรก็ตามที่ผ่านมายังมีการศึกษาถึงการแสดงออกของเอชเอ็มจีบี-1 ในเซลล์หรือเนื้อเยื่อช่องปากน้อย มีการศึกษาของ กนิษฐ์ นันทเสนีย์และคณะ[11] ได้ศึกษาการแสดงออกของเอชเอ็มจีบี-1 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์ของมนุษย์ทั้งในระดับอาร์เอ็นเอและระดับโปรตีนภายในเซลล์ รวมทั้งยังศึกษาการแสดงออกของเอชเอ็มจีบี-1ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์ของมนุษย์ในสภาวะที่มีการกระตุ้นด้วยไลโพโปลีแซคคาไรด์ของเชื้ออีโคไล (*Escherichia coli*; *E coli.*) ด้วย คณะผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาต่อยอดถึงการแสดงออกของ เอชเอ็มจีบี-1ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์เมื่อถูกกระตุ้นด้วยส่วนของเชื้อก่อโรคปริทันต์ ซึ่งผลของการแสดงออกของเอชเอ็มจีบี-1 ในเซลล์เหล่านั้นจะช่วยอธิบายถึงกลไกการเกิดพยาธิสภาพของโรคปริทันต์รวมไปถึงการใช้ประโยชน์จากการเปลี่ยนแปลงระดับของการแสดงออกของโมเลกุลชนิดนี้ในการเป็นเครื่องหมายที่บ่งชี้ถึงสภาวะของการเป็นโรคต่อไปได้

ความมุ่งหมายของการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้มีความมุ่งหมายเพื่อศึกษาถึงการแสดงออกของเอชเอ็มจีบี-1 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยไลโพโปลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส (lipopolysaccharide of *Pg*.) ส่วนสกัดเซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส (Sonicated extract of *Pg*.) และส่วนลอยของอาหารเลี้ยงแอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ (*Aa*. culture supernatant)

ความสำคัญของการวิจัย

โรคปริทันต์เป็นโรคติดเชื้อชนิดหนึ่งซึ่งก่อให้เกิดพยาธิสภาพต่ออวัยวะปริทันต์ในรูปแบบของการอักเสบแบบเรื้อรังอันเป็นผลมาจากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายทำให้เกิดอาการแสดงทางคลินิกได้ โรคปริทันต์จะเกิดพยาธิสภาพกับเหงือก เอ็นยึดปริทันต์ และกระดูกเบ้าฟัน และนำไปสู่การสูญเสียฟันในที่สุด ปัจจัยที่สำคัญที่ทำให้เกิดโรคปริทันต์ คือ แบคทีเรียก่อโรค ได้แก่ พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส และแอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ รวมทั้งปัจจัยที่มีความรุนแรงของแบคทีเรียดังกล่าวด้วย อย่างไรก็ตามการทำลายอวัยวะปริทันต์ยังเกี่ยวข้องกับความสมดุลระหว่างระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายและแบคทีเรียก่อโรค โดยเมื่อมีการรุกรานของแบคทีเรียซึ่งส่งผลให้มีการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อแบคทีเรียทำให้มีการผลิตไซโตไคน์และหลั่งสารอักเสบต่างๆ ออกมาจากเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เช่น โมโนไซน์ แมกโครแฟจ เป็นต้น นอกจากนั้นเซลล์ของร่างกายที่อยู่บริเวณที่เกิดการอักเสบ เช่น เซลล์สร้างเส้นใยหรือไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) ยังสามารถถูกเหนี่ยวนำให้หลั่งสารไซโตไคน์จากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันเช่นกัน ซึ่งสารไซโตไคน์เหล่านี้ส่งผลกระทบต่อเซลล์เป้าหมาย ทำให้เกิดการอักเสบ และการทำลายอวัยวะปริทันต์ตามมาได้

เอชเอ็มจีบี-1 จัดเป็นโครมาตินโปรตีนซึ่งจะอยู่ภายในนิวเคลียสแต่ก็สามารถพบในไซโตพลาสซึมได้ในบางเซลล์ ในการศึกษาระยะต่อมาพบว่าเอชเอ็มจีบี-1 ไม่ได้จำกัดอยู่หรือมีบทบาทเฉพาะในเซลล์[1] ยังพบว่าเอชเอ็มจีบี-1 สามารถถูกขับออกนอกเซลล์โดยเซลล์บางประเภทซึ่งทำหน้าที่เป็นเหมือนไซโตไคน์ โดยเป็นไซโตไคม์ที่ถูกหลั่งออกมาช่วงหลังเมื่อเทียบกับไซโตไคน์ที่ชนิดอื่นๆ เซลล์หลายชนิดสามารถหลั่งเอชเอ็มจีบี-1 ออกมานอกเซลล์ เช่น โมโนไซน์ แมกโครแฟจ เซลล์บุผนังหลอดเลือด เซลล์เดนไดร์ติก และเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ รวมทั้งยังสามารถหลั่งจากเซลล์ที่ถูกทำลายหรือเกิดการตาย มีการศึกษาของ กนิษฐ์ นันทเสนีย์ พ.ศ.2549[11] พบว่าในสภาวะปกติมีการแสดงออกของเอชเอ็มจีบี-1 อยู่ในระดับหนึ่งอยู่แล้ว ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์ของมนุษย์ในสภาวะปกติที่เลี้ยงโดยไม่ได้รับการกระตุ้นใดๆทั้งในระดับ

อาร์เอ็นเอและระดับโปรตีนภายในเซลล์ แต่ไม่พบว่ามีโปรตีนเอชเอ็มจีบี-1หลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ นอกจากนั้นยังศึกษาการแสดงออกของเอชเอ็มจีบี-1 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์ของมนุษย์ในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโพโปลีแซคคาไรด์ของเชื้ออีโคไล พบว่ามีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของเอชเอ็มจีบี-1 ในระดับเมสเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอ เฉพาะสภาวะที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรั่มเป็นส่วนประกอบด้วยเท่านั้น แต่ยังคงไม่พบการเพิ่มขึ้นของโปรตีนเอชเอ็มจีบี-1 ทั้งในและนอกเซลล์เช่นเดียวกับภาวะที่ไม่ได้มีการกระตุ้นใดๆ จากผลการวิจัยดังกล่าว จึงทำให้คณะผู้วิจัยสนใจที่จะทำการศึกษาเพิ่มเติมถึงบทบาทของเชื้อก่อโรคปริทันต์อักเสบที่มีต่อการแสดงออกของเอชเอ็มจีบี-1 ในเนื้อเยื่อปริทันต์ทั้งสองชนิด

ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาภายในห้องปฏิบัติการเลี้ยงเซลล์เพื่อศึกษาการแสดงออกของเอชเอ็มจีบี-1 ในระดับอาร์เอ็นเอและระดับโปรตีนในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและเซลล์ไฟ โบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์ที่เพาะเลี้ยงและถูกกระตุ้นด้วยไลโพโปลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ส่วนสกัดเซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส และส่วนลอยของอาหารเลี้ยงแอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ เปรียบเทียบกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์ที่เพาะเลี้ยงโดยไม่ถูกกระตุ้นใดๆ

นิยามศัพท์เฉพาะ

- Periodontitis : โรคปริทันต์อักเสบ
- High mobility group box 1 : เอชเอ็มจีบี-1
- Human periodontal ligament fibroblast : เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์
- Human gingival fibroblast : เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกมนุษย์
- Periodontopathic bacteria : เชื้อก่อโรคปริทันต์

กรอบแนวคิดในการทำวิจัย

เนื่องจากโรคปริทันต์อักเสบเป็นโรคติดเชื้อเรื้อรังซึ่งส่งผลทำให้มีการทำลายอวัยวะปริทันต์ การเกิดโรคปริทันต์อักเสบนั้นต้องอาศัยปัจจัยหลายอย่างร่วมกัน ปัจจัยที่สำคัญคือเชื้อก่อ

โรค พอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวาลิส และ แอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่ไม่ต้องใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโต ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคปริทันต์อักเสบ ทำให้มีการทำลายอวัยวะปริทันต์อย่างรวดเร็วและรุนแรง เมื่อมีการรุกรานของแบคทีเรียดังกล่าว ทั้งตัวเชื้อเองและปัจจัยที่มีความรุนแรงของแบคทีเรีย ทำให้มีการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ส่งผลให้เซลล์ภูมิคุ้มกัน (immune cell) หลั่งสารอักเสบต่าง ๆ โดยนอกจากเซลล์ภูมิคุ้มกันแล้วพบว่าเซลล์ของร่างกายเองก็มีบทบาทอย่างมากในการเกิดพยาธิสภาพของโรคปริทันต์เช่นกัน พบว่าเซลล์ของร่างกาย เช่น เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ เป็นต้น สามารถถูกกระตุ้นและมีการแสดงออกและหลั่งสารอักเสบเช่นกัน[12,13] ซึ่งเซลล์ทั้ง 2 ชนิดนี้ เป็นเซลล์ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของร่างกายที่อยู่บริเวณที่ได้รับการรุกรานจากแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์และปัจจัยที่มีความรุนแรงของแบคทีเรียโดยตรง เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์นั้นไม่เพียงแต่ช่วยคงสภาพเอ็นยึดปริทันต์เท่านั้น ยังช่วยซ่อมแซม (repair) ปรับเปลี่ยน (remodel) และการสร้างใหม่ (regeneration) ของกระดูกเบ้าฟันและเคลือบรากฟันได้[14] เอชเอ็มจีบี-1 พบเป็นโครมาตินโปรตีนที่พบในนิวเคลียสและยังพบว่าเอชเอ็มจีบี-1 สามารถถูกขับออกนอกเซลล์โดยเซลล์บางประเภท ซึ่งเอชเอ็มจีบี-1 มีคุณสมบัติเป็นไซโตไคน์ที่ทำหน้าที่ในช่วงเวลาหลัง นอกจากนั้นเอชเอ็มจีบี-1 ยังสามารถกระตุ้นให้เกิดการหลั่งของสารไซโตไคม์ที่มีผลต่อการเกิดการอักเสบและมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบหลายโรค[6]

ดังนั้น ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะทำการศึกษาการแสดงออกของเอชเอ็มจีบี-1ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยปัจจัยที่มีความรุนแรงของแบคทีเรียของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสและแอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ ซึ่งได้แก่ ไลโพโปลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ส่วนสกัดเซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส และส่วนลอยของอาหารเลี้ยงแอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ ซึ่งพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสและแอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ มีปัจจัยที่มีความรุนแรงของเชื้ออยู่หลายชนิด ที่ช่วยให้เชื้อมีความสามารถในการรุกรานอวัยวะปริทันต์และส่งผลให้ลักษณะของรอยโรคมีความรุนแรงขึ้น

ไลโพโพลีแซคคาร์ไรด์เป็นส่วนผนังเซลล์ชั้นนอกของเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมลบ จากการศึกษา ไลโพโพลีแซคคาร์ไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ร่างกาย เช่น เซลล์ไฟโบรบลาสต์ หลั่งไซโตไคน์ได้ เช่น อินเทอร์ลิวคิน 1 เบต้าและ ทูเมอร์เนคโครซิส แฟคเตอร์ [15] ส่งผลให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อปริทันต์และการละลายของกระดูก

ส่วนสกัดเซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสและส่วนลอยของอาหารเลี้ยงแอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ ก็มีปัจจัยที่มีความรุนแรงของเชื้ออยู่

หลายชนิดเช่นกัน โดยพบปัจจัยก่อโรคที่สกัดได้จากส่วนลอยจากแอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ เช่น ลิวโคทอกซิน ไซโตทอกซิน เอ็นไซม์ย่อยสลายโปรตีนที่เชื้อปลดปล่อยออกนอกเซลล์ สำหรับพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวาลิสนั้นพบว่าปัจจัยก่อโรคที่สกัดได้จากส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวาลิสที่พบว่ามีความเกี่ยวข้องกับการทำลายของอวัยวะปริทันต์และกระดูกเบ้าฟันได้แก่ ไลโปโพลีแซคคาไรด์ ฟิมเบรีย ฮีแมกกลูตินิน และโปรตีนแอนติเจน

ผู้วิจัยจึงเล็งเห็นว่าปัจจัยที่มีความรุนแรงของแบคทีเรียทั้งสองชนิดดังกล่าวสามารถกระตุ้นให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์แสดงออกเอชเอ็มจีบี-1ในปริมาณที่สูงขึ้นเมื่อเทียบกับสภาวะที่ไม่ได้รับการกระตุ้น การที่เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์สามารถหลั่งเอชเอ็มจีบี-1ในปริมาณที่สูงขึ้นนั้น อาจทำให้ทราบถึงบทบาทของเอชเอ็มจีบี-1 ต่อพยาธิกำเนิดและการดำเนินไปของโรคปริทันต์อักเสบ เพื่อเป็นแนวทางในการรักษาโรคปริทันต์ต่อไป

สมมติฐานในการวิจัย

ทั้งเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์จะพบการแสดงออกของเอชเอ็มจีบี-1ที่สูงขึ้นเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยไลโพโปลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส หรือ ส่วนสกัดเซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส หรือส่วนลอยของอาหารเลี้ยงแอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องและได้นำเสนอตามหัวข้อต่อไปนี้

1. โรคปริทันต์อักเสบ
2. พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสกับโรคปริทันต์อักเสบ
3. แอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์กับโรคปริทันต์อักเสบ
4. เอชเอ็มจีบี-1
5. บทบาทไซโตไคน์ของเอชเอ็มจีบี-1

โรคปริทันต์อักเสบ

โรคปริทันต์อักเสบเป็นโรคติดเชื้อและมีการอักเสบเรื้อรัง มีการทำลายของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและกระดูกเบ้าฟัน นำไปสู่การสูญเสียของอวัยวะที่รองรับฟันและสูญเสียฟันในที่สุด พยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์อักเสบ (pathogenesis of periodontitis) เป็นขั้นตอนที่มีความซับซ้อนและเกี่ยวข้องกับปัจจัยหลายอย่างที่สำคัญ สาเหตุหลักของโรคปริทันต์อักเสบ คือ แบคทีเรียก่อโรค (periodontopathic bacteria) ในแผ่นคราบจุลินทรีย์ที่สะสมอยู่บนตัวฟัน[16] ซึ่งแบคทีเรียก่อโรคเหล่านี้เป็นตัวเริ่มต้นและทำให้เกิดการดำเนินของโรคปริทันต์อักเสบทั้งทางตรงและทางอ้อม แบคทีเรียก่อโรคปริทันต์อักเสบที่สำคัญเป็นแบคทีเรียชนิดแกรมลบที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต (gram-negative anaerobic bacteria) [10] เช่น แอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสและ แทนเนอเรลลา ฟอร์ซัยเธียซิส เป็นต้น แบคทีเรียก่อโรคเหล่านี้มักจะมีปัจจัยที่มีความรุนแรงต่างๆ เช่น ไลโพโปลีแซคคาร์ไรด์และเอ็นไซม์ต่างๆ ซึ่งจะแทรกซึมเข้าไปยังอวัยวะปริทันต์กระตุ้นกลไกภูมิคุ้มกันของร่างกาย มีการศึกษาในระยะต่อมามากมายบ่งชี้ถึงความสัมพันธ์ระหว่างพยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์อักเสบกับปัจจัยทางระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (host immune response) กระบวนการของการเกิดพยาธิสภาพของโรคปริทันต์อักเสบส่วนใหญ่แล้วเป็นผลมาจากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อแบคทีเรียก่อโรคและปัจจัยที่มีความรุนแรงของแบคทีเรีย โดยการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันนั้นมีผลทำให้เกิดการผลิตและหลั่งสารไซโตไคน์ เช่น โพรสตาแกลนดิน (prostaglandin) อินเทอร์ลิวคิน ทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์[17] จากเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เช่น โมโนไซน์

แมกโครแฟจ เป็นต้น นอกจากนั้น เซลล์ของร่างกายที่อยู่บริเวณที่เกิดการอักเสบ เช่น เซลล์สร้างเส้นใยหรือไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) ยังสามารถถูกเหนี่ยวนำให้หลั่งสารไซโตไคน์จากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันเช่นกัน ซึ่งสารไซโตไคน์เหล่านี้จะส่งผลกระทบต่อเซลล์เป้าหมาย ทำให้เกิดการอักเสบ การทำลายอวัยวะปริทันต์ รวมถึงการทำลายกระดูกเบ้าฟันตามมาได้[18,19]

พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสกับโรคปริทันต์อักเสบ

พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส เป็นแบคทีเรียชนิดแกรมลบที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโตที่มีความสัมพันธ์กับโรคปริทันต์อักเสบ ซึ่งมีการศึกษาพบว่ามีความสำคัญเกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพของโรคปริทันต์โดยทำให้โรคมีความรุนแรงและนำไปสู่การทำลายของเนื้อเยื่อปริทันต์และกระดูกเบ้าฟัน สามารถตรวจพบเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสในผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ[20] โดยเฉพาะบริเวณที่มีการดำเนินโรค[21] พบมีการติดเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสสูงขึ้นเมื่อผู้ป่วยมีอายุเพิ่มขึ้น และยังพบความสัมพันธ์ระหว่างพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสกับโรคปริทันต์อักเสบในผู้ป่วยที่เป็นโรคทางระบบ เช่น โรคเบาหวาน[22] พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส มีปัจจัยที่มีความรุนแรงหลายชนิด (ตาราง 1) ที่ช่วยให้เชื้อมีความสามารถในการรุกรานเนื้อเยื่อปริทันต์และส่งผลให้ลักษณะของรอยโรคมีความรุนแรงขึ้น[23] ปัจจัยที่มีความรุนแรงเหล่านั้น ได้แก่

แคปซูล (Capsule)

แคปซูลของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส เป็นสารเหนียวข้น (dense and amorphous capsule) ซึ่งถือได้ว่าเป็นแอนติเจนที่สำคัญชนิดหนึ่งซึ่งอยู่บนพื้นผิวเซลล์ของเชื้อชนิดนี้ โดยประกอบไปด้วยโพลีแซคคาร์ไรด์เฮทเทอโรโพลีเมอร์ (polysaccharide heteropolymer) ที่มีความหนาถึง 15 นาโนเมตร แคปซูลนี้จะหุ้มอยู่รอบๆเยื่อบุผิวภายนอก การศึกษาเกี่ยวกับแคปซูลนั้นอาศัยการวิเคราะห์โพลีแซคคาร์ไรด์ เค แอนติเจน โดยเชื้อสายพันธุ์ที่ตรวจพบ เค แอนติเจนนั้นพบว่ามีความสามารถในการรุกรานเข้าสู่เนื้อเยื่อได้สูง[24] นอกจากนั้นแคปซูลยังทำหน้าที่เสมือนเป็นเกราะป้องกันสำหรับเชื้อเพื่อป้องกันการทำลายจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ยังมีการศึกษาพบว่า แคปซูลของ พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ขัดขวางการยึดเกาะของเอ็นยึดปริทันต์กับพื้นผิวรากฟัน[25]

ตาราง 1 แสดงปัจจัยที่มีความรุนแรงที่ผลิตโดยพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส[26]

Tissue destruction	Host invasion
Collagenase	Degradation of plasma protease inhibitors
Trypsin-like protease	
Gelatinase	Degradation of iron transport proteins
Aminopeptidase	
Phospholipase A	Inhibition of polymorpho-
Alkaline phosphatase	Nuclear leukocytes
Acid phosphatase	Chemotaxis inhibitors
	Decrease phagocytosis
Chondroitin sulfatase	Lysis and intracellular killing
Hyaluronidase	
Keratinase	
Heparinase	Resistance to C' killing
Nuclease	C'-3/C'-5 degradation
Epitheliotoxin	Immunoglobin protease
Fibroblast growth inhibitors	
Endotoxicity	
LPS-induced bone resorption	
Volatile sulfur compounds	Fibrinolysin
Short-chain acid end products	
Indole	Superoxide dismutase
Ammonia	NADH oxidase
H_2S	Free-radical formation

ไลโพโปลีแซคคาร์ไรด์ หรือ แอลพีเอส (Lipopolysaccharide; LPS)

ไลโพโปลีแซคคาร์ไรด์เป็นส่วนผนังเซลล์ชั้นนอกของเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมลบเป็นปัจจัยที่มีความรุนแรงของแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์หลายชนิด โมเลกุลของไลโพโปลีแซคคาร์ไรด์ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ ไลปิดเอ (Lipid A) คอร์โพลีแซคคาร์ไรด์ (core polysaccharide) และโอแอนติเจน (O antigen) เมื่อแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์เจริญเติบโตในร่องลึกปริทันต์ (periodontal pocket) แบคทีเรียจะปล่อยไลโพโปลีแซคคาร์ไรด์ ซึ่งไลโพโปลีแซคคาร์ไรด์เป็นแอนติเจนที่มีความสำคัญเกี่ยวข้องกับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในโรคปริทันต์อักเสบ ไลโพโปลีแซค

คาร์ไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ร่างกาย เช่น เซลล์สร้างเส้นใยหลั่งไซโตไคน์ได้ เช่น อินเทอร์ลิวคิน 1 เบต้า, อินเทอร์ลิวคิน 6 และทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์ ส่งผลให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อปริทันต์และการละลายของกระดูก[27,28] รวมทั้งยังกระตุ้นให้เซลล์สร้างเส้นใยที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบหลั่งอินเทอร์ลิวคิน 6 ซึ่งมีปริมาณสูงกว่าที่แยกได้จากผู้ป่วยที่มีสภาพเหงือกปกติ[29]

ฟิมเบรีย (Frimbriae)

ฟิมเบรียเป็นโครงสร้างที่อยู่บริเวณพื้นผิวเซลล์ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส เป็นส่วนที่ยื่นออกไปจากพื้นผิวเซลล์ โดยฟิมเบรียช่วยในการยึดเกาะของเชื้อกับพื้นผิวของเนื้อเยื่อเหงือก[30] ฟิมเบรียของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวาลิสสามารถแบ่งได้เป็น 5 ชนิด[31] พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส สายพันธุ์ที่พบฟิมเบรียเป็นชนิดที่ 2 จะมีความสามารถในการรุกรานเซลล์เยื่อบุผิวได้มากกว่าสายพันธุ์ที่พบมีฟิมเบรียชนิดอื่น[32] นอกจากนั้นแล้วฟิมเบรียยังมีคุณสมบัติกระตุ้นให้มีการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย[33]

ฮีแมกกลูตินิน (hemagglutinin)

ฮีแมกกลูตินิน เป็นกลุ่มของโปรตีนที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ซึ่งจัดว่าเป็นโมเลกุลที่ใช้ในการเกาะติด (adhesin molecules) เช่นเดียวกับฟิมเบรีย เป็นแอนติเจนที่ใช้สำหรับตรวจสอบสายพันธุ์ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสเช่นกัน[34] ฮีแมกกลูตินินมีความสามารถในการจับกับเม็ดเลือดแดง (erythrocyte) เนื่องจากบนผิวเซลล์ของเม็ดเลือดแดงมีตัวจับบนผิวเซลล์ที่สามารถจับกับฮีแมกกลูตินินของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส โดยมีการศึกษาพบว่าฮีแมกกลูตินินของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส สายพันธุ์ ATCC 33277 สามารถทำให้เกิดการจับกลุ่มและมีการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดง[35] ดังนั้นฮีแมกกลูตินินของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส จึงเป็นปัจจัยที่มีความรุนแรงที่ส่งเสริมให้เชื้อสามารถอยู่บริเวณใต้เหงือกได้

เอ็นไซม์ย่อยสลายโปรตีนเมทริกซ์ภายนอกเซลล์ (Extracellular proteolytic enzyme)

พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส สามารถผลิตเอ็นไซม์โปรตีเอส (proteinase) ได้หลายชนิด ซึ่งเอ็นไซม์เหล่านี้ถือว่าเป็นเอ็นไซม์ที่มีความจำเพาะของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวาลิส เอ็นไซม์นี้สามารถย่อยสลายโปรตีนของร่างกายและกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เอ็นไซม์เหล่านี้ ได้แก่ ทริปซิน-(trypsin-) ไทออล-(thiol-) และเคซิโนไลติคโปรตีเอส (caseinolytic proteinase) และมีเอ็นไซม์เปปติเดส 2 ชนิด ได้แก่ ไกลซิลโพรพิลไดเปบติดิลอะมิโนเปบติเดส (glycylpropyldipeptidylaminopeptidase) และ ไกลซิลโพรพิลเปบติเดส (glycylpropylpeptidase) ซึ่งเอ็นไซม์เหล่านี้จะมีบทบาทสำคัญที่ทำให้โรคปริทันต์มีการรุกรานมากขึ้น รวมถึงทำให้พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส และแบคทีเรียชนิดอื่นแพร่กระจายเข้าไปสู่เนื้อเยื่อ

ปริทันต์ได้ลึกขึ้น[36,37] โดยพบว่าโปรตีเอสของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวาลิส สามารถแยกได้จากเซลล์ทั้งเซลล์ (whole cell) แยกได้จากการสกัดเซลล์ (cell extracts) แยกได้จากการทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียง (cell sonicates) แยกได้จากเยื่อบุผิวภายนอกและสารที่เชื้อผลิตออกมา

โปรตีนแอนติเจน (Protein antigens)[38]

เป็นโปรตีนที่พบที่เยื่อหุ้มเซลล์ส่วนนอกของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวาลิส ซึ่งสามารถกระตุ้นให้ร่างกายสร้างแอนติบอดีออกมา และสามารถตรวจพบได้จากซีรัมของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ

แอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์กับโรคปริทันต์อักเสบ

แอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ ลักษณะรูปร่างเป็นแท่ง ชนิดแกรมลบที่ไม่ใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโต มีความสัมพันธ์กับโรคปริทันต์อักเสบรุกราน (aggressive periodontitis) [39] โดยพบแอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ ถึงร้อยละ 40-100 ของผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบรุกราน[40] ปัจจัยที่มีความรุนแรงของแอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ เช่น ลิวโคทอกซิน (leukotoxin) โพลีมอร์โฟนิวเคลียร์ลิวโคไซต์ คีโมแทกซิสอินฮิบิติงแฟคเตอร์ (polymorphonuclear leukocyte chemotaxis-inhibiting factor) ลิมโฟไซต์ซัปเพรสซิงแฟคเตอร์ (lymphocyte-suppressing factor) และไลโพโปลีแซคคาไรด์ ซึ่งช่วยให้เชื้อสามารถเจริญเติบโตและดำรงชีวิตอยู่ได้ในช่องปาก ช่วยทำให้เชื้อสามารถหลบหลีกการป้องกันของร่างกายได้ (ตาราง 2)

แบคทีริโอซิน (Bacteriocin)

เป็นโปรตีนที่ผลิตโดยแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นได้ โดยแบคทีริโอซินที่แอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ ผลิตขึ้นมา เรียกว่า แอคติโนแบซิลิน (actinobacillin) มีบทบาทในการขัดขวางการเจริญเติบโตของสเตรปโตคอกคัส แซนเควียส (*Streptococcus sanquis*) และแอคติโนแบซิลัส วิสโคซัส (*Actinobacillus viscosus*) โดยทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) มีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติการให้สารผ่านเข้าออกเซลล์ทำให้สารโมเลกุลเล็กๆ หรืออิออนที่มีประจุที่อยู่ภายนอกเซลล์สามารถซึมเข้าสู่ภายในเซลล์ได้มากขึ้น ส่งผลให้ ดีเอ็นเอ (DNA) อาร์เอ็นเอ (RNA) และโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของแบคทีเรียนั้นถูกทำลาย

ตาราง 2 แสดงปัจจัยก่อโรคของแอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ [41]

Factors that promote colonization and persistence in the oral cavity
- Adhesions
- Invasins
- Bacteriocins
- Antibiotic resistance
Factors that interfere with the host's defenses
- Leukotoxin
- Chemotactic inhibitors
- Immunosuppressive proteins
- Fc-binding protein
Factors that destroy host tissue
- Cytotoxins
- Collagenase
- Bone resorption agents
- Stimulators of inflammatory mediators
Factors that inhibit host repair of tissue
- Inhibitors of fibroblast proliferation
- Inhibitors of bone formation

คอลลาจิเนส (collagenase)

สารประกอบที่อยู่ภายนอกเซลล์ของเนื้อเยื่อต่างๆส่วนใหญ่จะมีคอลลาเจนเป็นส่วนประกอบ เมื่อการเกิดโรคปริทันต์มักจะพบว่าปริมาณของเส้นใยคอลลาเจนมีจำนวนน้อยลง การที่คอลลาเจนถูกทำลายนั้นเกี่ยวข้องกับการที่แบคทีเรียที่อยู่บริเวณเนื้อเยื่อที่เกิดพยาธิสภาพปล่อยคอลลาจิเนสออกมาแล้วมีผลโดยตรงในการทำลายคอลลาเจนที่อยู่ในเนื้อเยื่อปริทันต์จนทำให้เกิดโรคปริทันต์ แต่ในปัจจุบันนี้เป็นที่ยอมรับกันแล้วว่าสาเหตุสำคัญของการที่คอลลาเจนถูกทำลายนั้นมาจากการที่เซลล์ในเนื้อเยื่อบริเวณที่มีการอักเสบ ได้แก่ โพลีมอร์โฟนิวเคลียร์เซลล์และไฟโบรบลาสต์ ตอบสนองต่อเชื้อหรือสารหลั่งจากเชื้อทำให้ปล่อยคอลลาจิเนสออกมา [42]

ไซโตทอกซิน (cytotoxin)

มีการศึกษาเกี่ยวกับ ฮีท-เลไบล์ ไซโตทอกซิน (heat-labile cytotoxin) ที่ผลิตโดยแอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ เป็นไซโตทอกซิน ที่มีความจำเพาะ และเป็นปัจจัยที่มีความรุนแรงชนิดหนึ่งที่มีผลต่อไฟโบรบลาส ได้แก่ ไซโตทอกซิน ที่ปล่อยออกมาในสารหลั่งจากเชื้อ มีน้ำหนักโมเลกุล 50 กิโลดาลตัน ซึ่งสามารถยับยั้งการผลิตดีเอ็นเอของไฟโบร

บลาสต์ [43] นอกจากนี้ยังพบว่ามีไซโตทอกซินที่อยู่บนผิวเซลล์มีน้ำหนักโมเลกุล 8 กิโลดาลตัน พบว่าสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไฟโบรบลาสต์ได้[44]

ลิวโคทอกซิน (Leukotoxin)

แอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ ผลิตโปรตีนแอนติเจน น้ำหนักโมเลกุล 116 กิโลดาลตัน (116 kDa immunomodulating protein antigen) ที่ยึดอยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก[45] ที่เรียกว่า ลิวโคทอกซิน ซึ่งเป็นพอร์-ฟอร์มมิ่งโปรตีน (pore-forming protein) ซึ่งสามารถทำลายนิวโทรฟิวล์ โพลีมอร์โฟนิวเคลียร์ ลิวโคไซต์ และเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันอื่นๆ ได้แก่ ทีเซลล์ โดยการทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดการสูญเสียความสมดุลของสารที่ผ่านเข้าออกเซลล์และทำให้เซลล์ตาย (necrosis) ในที่สุด การที่ลิวโคทอกซินสามารถทำลายเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันได้เป็นผลให้ร่างกายไม่สามารถควบคุมการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ทำให้มีการปล่อยเอ็นไซม์หลายชนิด ส่งผลให้มีการอักเสบและนำไปสู่การทำลายของเนื้อเยื่อ และ ลิวโคทอกซินจากแอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ ซีโรไทพ์บีสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดตายแบบขจัดตัวเอง ในเซลล์โปรไมย์อีโลไซต์ (promyelocytic cell) ด้วย

เอ็นไซม์ย่อยสลายโปรตีนเมทริกซ์ภายนอกเซลล์ (Extracellular proteolytic enzyme)

เอ็นไซม์ย่อยสลายโปรตีนของแอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ เช่น ทริปซิน-ไลค์ โปรตีโอไลย์ติค เอ็นไซม์ (trypsin-like proteolytic enzyme) ซึ่งพบว่ามีความสัมพันธ์กับสภาวะทางคลินิกของรอยโรคปริทันต์อักเสบ[46] และยังพบว่าเอ็นไซม์ในกลุ่มนี้สามารถลดอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์เยื่อบุผิวของเหงือกในการเพาะเลี้ยง [47] รวมทั้งยังมีผลในการย่อยสลายไอจีจี (IgG) ไอจีเอ (IgA) ไอจีเอ็ม (IgM) [48]

ไลโพโปลีแซคคาร์ไรด์

ไลโพโปลีแซคคาร์ไรด์ เป็นปัจจัยก่อโรคที่สำคัญมากที่ก่อให้เกิดการทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อปริทันต์ ในกลไกการเกิดโรคปริทันต์อักเสบ ไลโพโปลีแซคคาร์ไรด์ของแอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ สามารถกระตุ้นเซลล์ร่างกายโดยเฉพาะอย่างยิ่ง คือ โมโนไซต์ และแมกโครแฟจ ให้มีการผลิตไซโตไคน์ของการอักเสบ เช่น อินเทอร์ลิวคินวันและ ทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์ ทำให้เกิดการอักเสบและเกิดการละลายของกระดูก[49]

ปัจจัยที่ยับยั้งระบบภูมิคุ้มกัน (Immunosuppressive factors)

แอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ จะมีปัจจัยที่มีความรุนแรงหลายอย่างที่สามารถยับยั้งหรือรบกวนกลไกการป้องกันของร่างกาย ซึ่งได้แก่ การที่เชื้อสามารถผลิตเอ็นไซม์ที่สามารถยับยั้งการสร้าง ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ และโปรตีนในทีเซลล์ [50]

เอชเอ็มจีบี-1 (HMGB1)

โครงสร้างของ เอชเอ็มจีบี-1

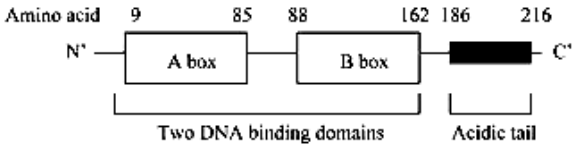
เอชเอ็มจีบี-1 (High molecular group box protein : HMGB1) เป็นโปรตีนที่อยู่ในนิวเคลียสซึ่งค้นพบมาประมาณ 30 ปี เป็นสมาชิกในกลุ่มเอชเอ็มจีโปรตีน (high-mobility group protein super family) ซึ่งประกอบด้วย เอชเอ็มจีบี (HMGB) เอชเอ็มจีเอ็น (HMGN) และเอชเอ็มจีเอ (HMGA) แต่ละกลุ่มสมาชิกต่างกันที่ส่วนลำดับที่ทำหน้าที่ (functional sequence motif) ส่วนลำดับที่ทำหน้าที่ของเอชเอ็มจีบี เรียกว่า เอชเอ็มจีบ็อกซ์ (HMG boxes) ส่วนลำดับที่ทำหน้าที่ของเอชเอ็มจีเอ็น เรียกว่า ส่วนจับของนิวคลิโอโซม (nucleosomal binding domain) ส่วนลำดับที่ทำหน้าที่ของเอชเอ็มจีเอ เรียกว่า เอทีฮุค (AT-hook)

ตาราง 3 ลักษณะของเอชเอ็มจีโครมาตินโปรตีน (Revised nomenclature for the HMG chromosomal proteins)[51]

HMG motif protein	Functional motif	HMG proteins		
		Root symbol	New name (canonical HMGs)	Old name (canonical HMGs)
HMG-box proteins	HMG-box	HMGB	HMGB1,2,…n	HMG-1/HMG-2
NBD proteins	NBD	HMGN	HMGN1,2,…n	HMG-14/HMG-17
ATH proteins	ATH	HMGA	HMGA1,2,…n	HMG-I/HMG-Y/HMG-C

ATH; AT-hook, HMG; high mobility group, NBD; nucleosome binding domain

โครงสร้างของเอชเอ็มจีบี (HMGBs) ประกอบด้วย 3 ส่วน (domains) ได้แก่ เอชเอ็มจีบอกซ์ (HMG boxes) ซึ่งเป็นส่วนจับของดีเอ็นเอ (DNA binding domains) และส่วนปลายที่เป็นกรด (acidic tail) ซึ่งเอชเอ็มจีบ็อกซ์ แบ่งเป็น เอชเอ็มจีบอกซ์เอ (HMG box A) และเอชเอ็มจีบอกซ์บี (HMG box B)[52] (ภาพประกอบ 1)



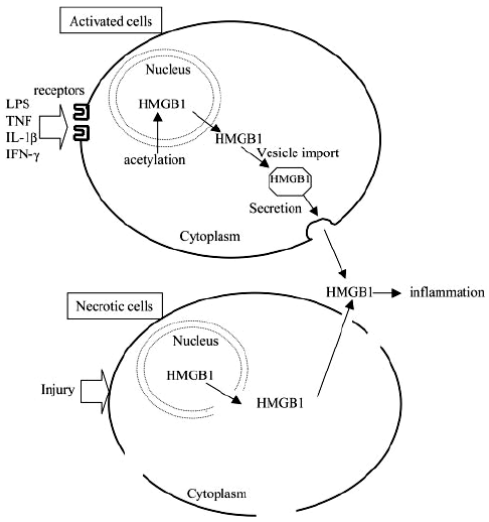
ภาพประกอบ 1 แสดงโครงสร้างของเอชเอ็มจีบี (HMGBs) [6]

ที่มา :Yang H.,et al.(2005) The cytokine activity of HMGB1. J of Leuko Bio;78:1-8.

ยีนเอชเอ็มจีบี-1 ในมนุษย์พบบนโครโมโซม 13q12 เอชเอ็มจีบี-1 สามารถจับกับดีเอ็นเอ (DNA binding domains) และมีบทบาทต่อการแสดงออกของดีเอ็นเอ ทำหน้าที่ช่วยคงสภาพนิวคลิโอโซม (nucleosomes) และควบคุมแสดงออกของยีน (gene transcription) [6,53]

บทบาทไซโตไคน์ของเอชเอ็มจีบี-1

เอชเอ็มจีบี-1 ส่วนใหญ่พบเป็นโครมาตินโปรตีนในนิวเคลียส นอกจากนั้นยังพบในไซโตพลาสซึมในบางเซลล์ เอชเอ็มจีบี-1 ยังสามารถเคลื่อนระหว่างนิวเคลียสและไซโตพลาสซึมในช่วงวงจรเซลล์ (cell cycle) ในการศึกษาระยะต่อมา พบว่าเอชเอ็มจีบี-1 ไม่ได้จำกัดอยู่หรือมีบทบาทเฉพาะในเซลล์ ยังพบว่าเอชเอ็มจีบี-1สามารถถูกขับออกนอกเซลล์โดยเซลล์บางประเภท ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นไซโตไคน์[54-55] โดยเอชเอ็มจีบี-1 สามารถกระตุ้นให้เกิดการหลั่งของไซโตไคน์ที่มีผลต่อการอักเสบและมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบหลายโรค เช่น สภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด(sepsis)[9] สภาวะความเสียหายของปอดเฉียบพลัน(acute lung injury)[56] โรคไขข้ออักเสบ (arthritis)[7,8] โดยเอชเอ็มจีบี-1 เป็นไซโตไคน์ที่หลั่งออกมาค่อนข้างช้ากว่าไซโตไคน์ชนิดอื่น ๆ (late acting cytokine) ในกระบวนการของการอักเสบ[57] โดยจากการศึกษาพบเอชเอ็มจีบี-1 ภายหลังกระตุ้นแมกโครแฟจเป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง เอชเอ็มจีบี-1 ส่งสัญญานผ่านทางตัวรับสัญญานคือ ตัวรับสัญญานสำหรับแอดวานซ์ไกลเคชั่นเอนโพรดักซ์ (receptor for advanced glycation end product :RAGE) และตัวรับโทล-ไลค์ (toll-like receptor 2,4 :TLR2,4)[54,58]



ภาพประกอบ 2 แสดงกลไลการหลั่งเอชเอ็มจีบี-1 (Pathways of HMGB1 secretion)

ที่มา :Yang H.,et al.(2005) The cytokine activity of HMGB1. J of Leuko Bio;78:1-8.

เซลล์หลายชนิดสามารถหลั่งเอชเอ็มจีบี-1 ออกมานอกเซลล์ (ภาพประกอบ 2) เช่น โมโนไซน์ แมกโครแฟจ เซลล์บุผนังหลอดเลือด เซลล์เดนไดร์ติกและเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ เป็นต้น รวมทั้งยังสามารถหลั่งจากเซลล์ที่ถูกทำลายหรือเกิดการตาย[59-61] โดยพบว่าเซลล์สามารถหลั่งเอชเอ็มจีบี-1 จากภาวะที่ถูกกระตุ้น (actively) และเซลล์หลั่งโดยตรง (passively) จากการศึกษาพบมีหลั่งเอชเอ็มจีบี-1 จาก โมโนไซย์และแมกโครแฟจที่ถูกกระตุ้นโดยสารพิษภายในของแบคทีเรีย (exogenous bacterial endotoxin :LPS) หรือไซโตไคน์อักเสบ (proinflammatory cytokine :TNF,IL-1,IFN) และ หลั่งโดยตรงจากเซลล์ที่ถูกทำลายหรือเกิดการตาย[6] โดยเอชเอ็มจีบี-1สามารถกระตุ้นการตอบสนองการอักเสบและส่งผ่านสัณญานความเสียหาย (injury signal) ต่อเซลล์ภูมิคุ้มกันที่อยู่ใกล้เคียงได้

ตาราง 4 บทบาทของเอชเอ็มจีบี-1ต่อเซลล์และเนื้อเยื่อต่างๆ[6]

Cells	HMGB1	Effects
Macrophages/monocytes	1) Increase TNF mRNA and protein release; increase IL-1α,β, IL-1RA, IL-6, IL-8, MIP-1α and β release. 2) Release after LPS stimulation.	Inflammation
Endothelial cells	Induces expression of adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1) and RAGE; induces cytokine release (TNF and IL-8) and expression of MCP-1, tPA, and PAI-1.	Increase neutrophil adhesion, inflammation, regulation of fibronolysis
Neutrophils	Increase TNF, IL-1β and IL-8 gene expression.	Inflammation
Epithelial cells	Increase enterocyte permeability.	Increase bacterial translocation
Dendritic cells	1) Increase TNF, IL-1α, IL-6, IL-8, and IL-12 release. 2) Increase CD40, CD54, CD58, CD80, and CD83 expression.	Dendritic cell maturation
Smooth muscle cells	Cause cell migration and cytoskeleton reorganization.	Chemotaxis
Tissue	Effects	
Brain	Induces fever, anorexia, taste aversion, and weight loss; induces brain cytokine expression (TNF, IL-1, and IL-6).	
Lung	Cause acute lung injury, increased pulmonary levels of TNF, IL-1β and MIP-2, lung edema, and neutrophil accumulation.	
Intestine	Cause intestinal barrier of dysfunction and bacterial translocation.	
Joints	Induces arthritis and inflammation	
Heart	Arrhythmia	
Others	Bactericidal activity	

มีการศึกษาเอชเอ็มจีบี-1 ที่หลั่งโดยเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันรวมทั้งเซลล์ของร่างกายอื่นๆ เช่น การศึกษาของ El Gazzar M. (2006) [62] ได้ศึกษาการตอบสนองการอักเสบของเอชเอ็มจีบี-1 โดยกระตุ้นแมกโครแฟจด้วยไลโพโปลีแซคคาไรค์ พบมีการหลั่งเอชเอ็มจีบี-1 ในส่วนลอยของอาหารเลี้ยงเซลล์ ในเวลา 8 ชั่วโมงและหลั่งมากที่สุดในเวลา 48 ชั่วโมง Wang H และคณะ (1999) [3] ศึกษาการหลั่งเอชเอ็มจีบี-1 เมื่อกระตุ้นแมกโครแฟจด้วยไลโพโปลีแซคคาไรค์ อินเทอร์ลิวคิน-1 (IL-1) และทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์ พบมีการหลั่งเอชเอ็มจีบี-1 ในส่วนลอยของอาหารเลี้ยงเซลล์ (culture supernatant) ในเวลา 8 ชั่วโมงและหลั่งมากที่สุดในเวลา 18 ชั่วโมง นอกจากนั้นยังศึกษาการหลั่งเอชเอ็มจีบี-1 ในซีรั่ม (serum) พบมีการหลั่งเอชเอ็มจีบี-1 หลังจากกระตุ้นในเวลา 8-32 ชั่วโมง

ในเซลล์ช่องปากยังมีจำนวนการศึกษาเกี่ยวกับเอชเอ็มจีบี-1น้อยและยังเป็นที่สงสัยกันว่า เอชเอ็มจีบี-1จะมีความสัมพันธ์กับการอักเสบในโรคปริทันต์อักเสบหรือไม่ ซึ่งมีการศึกษาของ Morimoto Y. (2006)[63] พบการแสดงออกของเอชเอ็มจีบี-1 ในเซลล์บุผิวเหงือก และจากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ กนิษฐ์ และคณะ[11] พบว่าในสภาวะปกติมีการแสดงออกของเอชเอ็มจีบี-1 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์ของมนุษย์ทั้งในระดับอาร์เอ็นเอและระดับโปรตีนภายในเซลล์ แต่ไม่พบโปรตีนเอชเอ็มจีบี-1 หลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ นอกจากนั้นยังศึกษาการแสดงออกของเอชเอ็มจีบี-1 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์ของมนุษย์ในสภาวะที่มีไลโพโปลีแซคคาไรค์ของเชื้ออีโคไล พบว่ามีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของเอชเอ็มจีบี-1ในระดับอาร์เอ็นเอ เฉพาะสภาวะที่ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบของซีรั่มเท่านั้น แต่ยังคงไม่พบการเพิ่มขึ้นของโปรตีนเอชเอ็มจีบี-1 ทั้งในและนอกเซลล์

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ดำเนินการตามขั้นตอนดังนี้

1. การกำหนดกลุ่มตัวอย่าง
2. การสร้างเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย
   2.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์
   2.2 การเตรียมสารที่ใช้กระตุ้น
      2.2.1 เตรียมไลโพโปลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส
      2.2.2 เตรียมส่วนลอยของอาหารเลี้ยงแอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์
      2.2.3 เตรียมส่วนสกัดเซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงของ พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส
      2.2.4 เตรียมไพรเมอร์สำหรับเอชเอ็มจีบี-1
3. วิธีการวิจัย
   3.1 กระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์ของมนุษย์และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกด้วยไลโพโปลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ส่วนลอยจากแอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์แทนส์และส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวาลิส โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง
   3.2 วิเคราะห์การแสดงออกของเอชเอ็มจีบี-1ในระดับเมสเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอ ด้วยวิธีรีเวอร์สทรานส์คริพเทส-โพลีเมอเรส เชน รีแอคชั่น (reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)
   3.3 วิเคราะห์การแสดงออกของเอชเอ็มจีบี-1 ในระดับโปรตีนด้วยวิธีเวสเทิร์นบลอท (Western blot analysis)
4. วิเคราะห์ข้อมูล

ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

การกำหนดกลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ จะประกอบด้วยเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์จากฟันของผู้ป่วยที่ต้องถอนเนื่องจากเป็นฟันคุดหรือเพราะต้องการจัดฟัน โดยฟันนั้นจะต้องไม่มีพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อปริทันต์ และได้รับความยินยอมจากผู้ป่วย โดยเตรียมเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกจากชิ้นเหงือกรอบๆตัวฟัน ส่วนการเตรียมเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์จะเตรียมจากผิวรากฟันบริเวณตอนกลาง (Middle third)

การสร้างเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

การเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์

การเตรียมเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือก มีวิธีการ คือ ล้างฟันด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลายน์ (Phosphate buffer saline :PBS) หลายๆ ครั้ง จากนั้นจึงใช้มีดผ่าตัดตัดชิ้นเหงือกบนผิวรากฟันและตัดชิ้นเหงือกให้เป็นชิ้นเล็กๆ ส่วนการเตรียมเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์มีวิธีการ คือ ใช้มีดผ่าตัดขูดเนื้อเยื่อออกจากผิวฟันบริเวณตอนกลางของรากฟันเพื่อหลีกเลี่ยงเนื้อเยื่อเหงือกและเนื้อเยื่อจากปลายรากฟัน

เนื้อเยื่อที่ได้จะถูกเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 มิลลิเมตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็ม (Dulbecco Modified Eagle's Medium : DMEM) ที่เติมสารประกอบดังต่อไปนี้ คือ ซีรัมจากลูกอ่อนวัวร้อยละ 10 (10% Fetal calf serum,FCS) กลูตามีน (L-Glutamine) เพนนิซิลิน (Penicillin) สเตรปโตมัยซิน (Streptomysin) เลี้ยงในตู้อบที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 รอจนเซลล์ออกจากชิ้นเนื้อมาอยู่บนจานเลี้ยง จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยง จนเซลล์เจริญเต็มจานเลี้ยง การขยายจำนวนเซลล์จะทำโดยการถ่าย (Subculture) เซลล์ที่เจริญเต็มจานเลี้ยงลงสู่จานเลี้ยงเซลล์ใหม่ ในอัตราส่วน 1:3 (หว่านเซลล์ 1 ใน 3 ของเซลล์ทั้งหมดต่อจานเลี้ยงเซลล์ใหม่ 1 จาน) โดยใช้เอ็นไซม์ทริปซิน-อีดีทีเอ (Trypsin-EDTA) เซลล์ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้จะเป็นเซลล์รุ่นที่ 3-8

การเตรียมสารที่ใช้กระตุ้น

1. การเตรียมไลโพโปลีแซคคาไรค์ ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส

ใช้สารบริสุทธิ์ไลโพโปลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส (Invivogen®, San Diego, USA) โดยเตรียมความเข้มข้น (stock solution) ที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำปราศจากเชื้อ (distilled water) และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ในการทดลอง

2. การเตรียมส่วนลอยของอาหารเลี้ยงแอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์

การเพาะเลี้ยงเชื้อจะทำวิธีเดียวกับการวิจัยของ ตีรณธนากุล และคณะ[64] ซึ่งมีวิธีดังนี้ เพาะเลี้ยงแอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ (ATCC 43718) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปโตนซอย (tryptone soya broth : TSB) (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) ที่มีสารสกัดจากยีสต์ ร้อยละ 1 (yeast extract 1%) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเลี้ยงในตู้อบ (Candle jar)

นำอาหารเลี้ยงเชื้อไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 660 นาโนเมตร จนได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.6 ถึง 0.7 จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลางที่ระดับความเร็ว 10,000g เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อแยกส่วนของเชื้อออกจากส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อที่เก็บได้จะถูกนำไปกรองด้วยแผ่นกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.2 ไมโครเมตร เพื่อกำจัดเอาส่วนของเชื้อที่ยังหลงเหลืออยู่ออกให้หมด อาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้นี้จะประกอบด้วยสารหลั่งจากแอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ และต่อไปจะเรียกว่า ส่วนลอยของอาหารเลี้ยงแอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ เก็บส่วนลอยของอาหารเลี้ยงแอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ ที่ได้นี้ไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ในการทดลอง

3. การเตรียมส่วนสกัดเซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส

ส่วนสกัดเซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส สายพันธุ์ ATCC 33277 (ได้รับความอนุเคราะห์โดยทันตแพทย์ อเนก ชยสดมภ์ นิสิตปริญญาเอกหลักสูตรชีววิทยาช่องปาก ภาควิชาสรีรวิทยาและชีวเคมี คณะทันตแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยมหิดล) ถูกนำมาใช้ ซึ่งมีขั้นตอนการสกัดโดยย่อ คือ แบคทีเรียได้รับการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเชดเลอร์บรอท (Schaedler broth) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้อบที่ไม่มีออกซิเจน จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ให้ได้ค่าเท่ากับ 1 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร นำอาหารเลี้ยงเชื้อไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง เพื่อแยกส่วนของเชื้อออกจากส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดย

ส่วนของเชื้อจะตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอดทดลอง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเชื้อออก แล้วชะล้างส่วนของเชื้อด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลายน์ แล้วนำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง จากนั้นดูดฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลายน์ออก แล้วทำการชะล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลายน์อีกครั้ง จากนั้นเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลายน์ ปริมาณ 300 ไมโครลิตร นำไปผ่านคลื่นเสียงเพื่อทำให้เซลล์แตก จากนั้นจึงนำไปย้อมดูเชื้อแบคทีเรียเพื่อตรวจสอบการแตกของเซลล์ แล้วนำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง เพื่อเป็นการกำจัดเศษเซลล์ที่เหลือออก นำส่วนลอยที่เป็นของเหลวใสมาใช้โดยวัดความเข้มข้นโปรตีนของแบคทีเรีย (Protein assay) ส่วนลอยที่เก็บได้จะถูกนำไปกรองด้วยแผ่นกรอง เก็บส่วนสกัดของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสที่ได้นี้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ในการทดลอง

4. การเตรียมเอชเอ็มจีบี-1 ไพรเมอร์ (HMGB1 primer)

เอชเอ็มจีบี-1 ไพรเมอร์ ถูกสังเคราะห์โดยโอเปอร์รอน (OPERON) (A Qiagen company) ตรวจวัดลำดับไพรเมอร์ โดยใช้ครัสตอลเอ็กซ 1.6-บี (clustalx 1.6b) ความยาวไพรเมอร์อยู่ระหว่าง 18 ถึง 25 เบส

HMGB1; forward-CTCTTCTGCTCTGAGTATCGC

reverse-CAACTGAAGATGAAAAAACTACC

การทดสอบความเป็นพิษด้วยเทคนิคเอ็มทีที (MTT assay)

ในการทดสอบความเป็นพิษของไลโพโปลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสและส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ทำโดยวิธีเอ็มทีทีดัดแปลงจากวิธีของ Mossman T. (1983)[65] มีวิธีการดังนี้

เซลล์ถูกถ่ายลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุม และกระตุ้นด้วยไลโพโปลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ที่ความเข้มข้น เท่ากับ 0, 1, 5,10, 50 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสที่ความเข้มข้น เท่ากับ 0, 0.1, 0.5, 1 และ 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยกระตุ้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เติมซีรัมจากลูกอ่อนวัวร้อยละ 2.5 (2.5% FCS-DMEM) จากนั้นอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนเป็นชนิดไม่มีซีรัม (serum free-DMEM) และเติมเอ็มทีทีที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อครบเวลา 30 นาที ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก แล้วเติมไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide, DMSO) 100 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลุมของจานเลี้ยงเซลล์ จากนั้นจึงนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 550 นาโนเมตร

วิธีการวิจัย

ถ่ายเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์ที่เลี้ยงลงในจานเลี้ยงแบบ 6 หลุม ที่มีความหนาแน่น 200,000 เซลล์/หลุม ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็มที่เติมซีรัมจากลูกอ่อนวัวร้อยละ 10 (10% fetal calf serum,FCS) ปล่อยให้เซลล์มายึดที่จานเลี้ยงเป็นเวลา 1 คืน

การกระตุ้นเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ที่เพาะเลี้ยงด้วยเชื้อก่อโรคปริทันต์

แบ่งเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่

1. กระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมจากลูกอ่อนวัวร้อยละ 2.5 (2.5% fetal calf serum-DMEM) ด้วยไลโพโปลีแซคคาไรค์ ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสที่ความเข้มข้น 25 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีกลุ่มควบคุมเป็นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ร่วมกับน้ำปราศจากเชื้อ
2. กระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัม (serum free – DMEM) ด้วยส่วนลอยของอาหารเลี้ยงแอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ ในอัตราส่วน ส่วนลอยจากแอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ /อาหารเลี้ยงเซลล์ เท่ากับ 1:10, 1:5 โดยมีกลุ่มควบคุมเป็นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัมร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปโตนซอย
3. กระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม ด้วยส่วนสกัดเซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสที่ความเข้มข้น 0.25 และ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีกลุ่มควบคุมเป็นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัมร่วมกับน้ำปราศจากเชื้อ

แล้วจึงนำไปตรวจหาการแสดงออกของเอชเอ็มจีบี-1 ในระดับเมสเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และตรวจหาการแสดงออกของเอชเอ็มจีบี-1 ในระดับโปรตีนเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง

การวิเคราะห์การแสดงออกของเอชเอ็มจีบี-1ในระดับเมสเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอ ด้วยวิธีรีเวอร์สทรานส์คริพเทส-โพลีเมอเรส เชน รีแอคชั่น (reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)

1. **การสกัดอาร์เอ็นเอ** (total RNA extraction) ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกและล้างด้วย PBS แล้วดูดทิ้ง อาร์เอ็นเอจากเซลล์เพาะเลี้ยงจะถูกเตรียมโดยใช้ไตรซอล (Trizol, Gibco, USA) ตามวิธีการแนะนำโดยบริษัทผู้ผลิต มีขั้นตอนโดยย่อ คือ ใส่ไตรซอล ปริมาณ 1 มิลลิลิตร/หลุม ทิ้งไว้ 5 นาที เติมคลอโรฟอร์มปริมาณ 200 ไมโครลิตร จากนั้นเขย่าหลอดพลาสติกแรงๆ 15 วินาที แล้วทิ้งไว้ 3 นาที จากนั้นนำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลางที่ระดับความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการดูดของเหลวใสที่อยู่ชั้นบนสุดซึ่งเป็นชั้นที่มีอาร์เอ็นเอปนอยู่ จากนั้นเติมไอโซ โพรพานอล ปริมาณ 500 ไมโครลิตร นำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลางที่ระดับความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วเทส่วนของเหลวใสออกให้เหลือแต่ตะกอนที่ก้นหลอดพลาสติก จากนั้นล้างด้วย เอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 75 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เคาะที่ข้างหลอดเบาๆ แล้วนำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลางที่ระดับความเร็ว 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเทของเหลวใสออกแล้วคว่ำหลอดพลาสติกทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 10 นาที แล้วละลายตะกอนที่อยู่ก้นหลอดซึ่งเป็นอาร์เอ็นเอด้วยน้ำที่ปราศจากเอ็นไซม์อาร์เอ็นเอส (RNase-free water) ปริมาณ 15 ไมโครลิตร แล้วนำไปอุ่นที่อ่างน้ำ (water bath) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที อาร์เอ็นเอที่ได้จะเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. **การสังเคราะห์คอมพรีเมนแทรีดีเอ็นเอสแตนด์** (First strand cDNA synthesis)

การสังเคราะห์ดีเอ็นเอต้นแบบทำโดยใช้ชุดสกัดรีเวอร์สเอด (RevertAid™ first strand cDNA synthesis kit) (Fermentas, Life sciences, USA) โดยใช้ปริมาณอาร์เอ็นเอ 1 ไมโครกรัม และ โอลิโก (Oligo (dt) 18) ในปริมาณ 0.5 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร ปรับปริมาณรวมให้ได้ 12 ไมโครลิตร โดยใช้ดีเพควอเตอร์ (DPEC-water) นำไปอุ่นที่อ่างน้ำที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปวางไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที ขณะนั้นเติมบัฟเฟอร์ที่ช่วยเพิ่มปฏิกิริยา (5x reaction buffer) ปริมาณ 4 ไมโครลิตร เติมตัวยับยั้งเอ็นไซม์ไรโบนิวคลีเอส (ribonuclease inhibitor) ปริมาณ 1 ไมโครลิตร และ ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ ไตรฟอสเฟส (deoxyribonucleotide triphosphate: dNTPs) ปริมาณ 2 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปปั่น (mix and quick spin) แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการเติมเอ็นไซม์รีเวอร์สทรานส์คริพเทส (RevertAid™ M-MuLV reverse transcriptase) ปริมาณ 1

ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและปั่นอีกครั้ง จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จนกระทั้งปฏิกิริยาสมบูรณ์ แล้วนำไปเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ก่อนที่จะทำไปใช้งาน

3. **การเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอโดยใช้หลักการโพลีเมอเรสเชนรีแอคชั่นหรือเรียกว่าพีซีอาร์** (Polymerase Chain reaction: PCR)

การแสดงผลของพีซีอาร์จะใช้เอ็นไซม์แทคดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (Taq DNA polymerase) โดยใช้ปริมาณรวมของพีซีอาร์ทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย ดีเอ็นเอสำหรับใช้เป็นต้นแบบ 1 ไมโครกรัม (1 μg of cDNA template) ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ ไตรฟอสเฟส ทั้ง 4 ชนิด คือ ดีเอทีพี (dATP) ดีซีทีพี (dCTP) ดีจีทีพี (dGTP) และ ดีทีทีพี (dTTP) อย่างละ 2.5 มิลลิโมลาร์ (2.5 mM of each dNTPs) ซึ่งใช้สร้างดีเอ็นเอสายใหม่ นอกจากนี้ยังมีส่วนประกอบอื่นๆ ได้แก่ น้ำกลั่น บัฟเฟอร์ (10x PCR buffer) แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$ concentration between 1-5 mM) เอ็นไซม์แทคดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (0.6 U of Taq DNA polymerase) โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ ซึ่งได้แก่ แกปดีเอช (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ,GAPDH) และ เอชเอ็มจีบี-1 ไพรเมอร์

HMGB1; forward-CTCTTCTGCTCTGAGTATCGC
reverse-CAACTGAAGATGAAAAAACTACC
GAPDH; forward; 5'-TGAAGGTCGGAGTCAACGGAT-3'
reverse 5'-TCACACCCATGACGAACATGG-3'.

การทำงานของเครื่องพีซีอาร์นั้นจะตั้งสภาวะปฏิกิริยาเริ่มต้นสำหรับ แกปดีเอชและเอชเอ็มจีบี-1 ไว้ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ปฏิกิริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอจะเกิดขึ้นเมื่อทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิหมุนเวียนอยู่ ณ อุณหภูมิ 3 ระดับ ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที เพื่อทำให้เกิดการแยกสายของดีเอ็นเอต้นแบบเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว (denaturation) อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เพื่อการจับระหว่างสายไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบที่เป็นสายเดี่ยว (annealing) อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที สำหรับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ และรอบสุดท้ายทำการต่อปลายของไพร์เมอร์ (final extension) โดยใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นตรวจหาขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์โดยวิธี อิเล็คโตรโฟเรซิส (electrophoresis) ด้วยอะกาโรสเจล ที่มีความเข้มข้นของอะกาโรสร้อยละ 1.6 (1.6 % agarose gel) และนำเจลไปย้อมด้วย เอ็ทธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ประมาณ 10 นาที นำเจลไปล้างเอ็ทธิเดียมโบรไมด์ส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น ถ่ายภาพด้วยกล้องฟิล์ม บนเครื่องกำเนิด

แสงอัลตราไวโอเล็ต (ULTRA LUM, Electonic U.V. Transilluminator) ความเข้มระหว่างดีเอ็นเอที่สนใจและดีเอ็นเอควบคุมจะนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม (sionimage) เพื่อตรวจวัดความเข้มของภาพ

การวิเคราะห์การแสดงออกของเอชเอ็มจีบี-1ในระดับโปรตีนด้วยวิธีเวสเทิร์นบลอท (Western blot analysis)

เมื่อครบกำหนดเวลาที่เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์ได้รับการกระตุ้นในสภาวะข้างต้น เซลล์จะถูกทำให้แตก (cell lysate) เริ่มจากดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งแล้วล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลายน์ แล้วใส่โซเดียมโดเดกซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulphate, SDS) ความเข้มข้นร้อยละ 1 (1% SDS) ซึ่งจะไปทำให้สายของโปรตีนยืดออกได้เลยโดยไม่ม้วนกลับเข้าไปอีก ใช้โซเดียมโดเดกซิลซัลเฟตความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ทำการขูดจานเพาะเลี้ยงเซลล์แต่ละหลุมให้ทั่วหลุม แล้วเก็บส่วนของเหลวใสใส่หลอดพลาสติกขนาด 1.5 ไมโครลิตร จากนั้นนำของเหลวใสส่วนหนึ่งไปวัดปริมาณโปรตีน โดยวิธีของแบรดฟรอด (Bradford method) ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร ปรับสารละลายเซลล์แตกให้มีปริมาณโปรตีนที่เท่ากันจากแต่ละกลุ่มทดลอง นำโปรตีนไปแยกด้วยขบวนการอิเลกโตรโฟเรสิส (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) ที่มีความเข้มข้นของอะคริลามายด์ร้อยละ 10 ปรับกระแสไฟฟ้าให้มีระดับที่เหมาะสม ประมาณ 20 มิลลิแอมแปร์ หลังจากโปรตีนถูกแยกแล้วจะถูกถ่ายลงบนแผ่นพีวีดีเอฟ (poly) vinylidene difluoride immunoblot membrane (PVDF) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). จากนั้นแช่แผ่นในบล็อกกิ้งโซลูชั่น (blocking solution, 5% skim milk in TBS-T) เป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้วบลอทด้วยแอนติบอดีต่อเอชเอ็มจีบี-1 (HMGB1 antibodies ,Monoclonal Anti-HMG-1 Clone HAP46.5, Sigma, USA) ในอัตราส่วน 1:1000 เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นล้างแผ่นด้วย washing solution 5 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที ต่อมาบลอทต่อด้วยแอนติบอดีทุติยภูมิ (secondary antibody) ที่ต่อกับเอนไซม์เปรอ์ออกซิเดส (ECL Anti-Mouse IgG, Horseradish Peroxidase-Linked Species-Specific whole Antibody (from sheep) (Amersham Bioscience, UK)) ในอัตราส่วน 1:50,000 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงบ่มแผ่นในอีซีแอลพลัส (ECL plus reagent) ตามวิธีการของผู้ผลิต และตรวจจับสัญญาณของเอชเอ็มจีบี-1 ด้วยแผ่นฟิล์มเอกซ์เรย์ (standard HyperfilmTM ECL, Amersham Bioscience, UK)

วิเคราะห์ข้อมูล

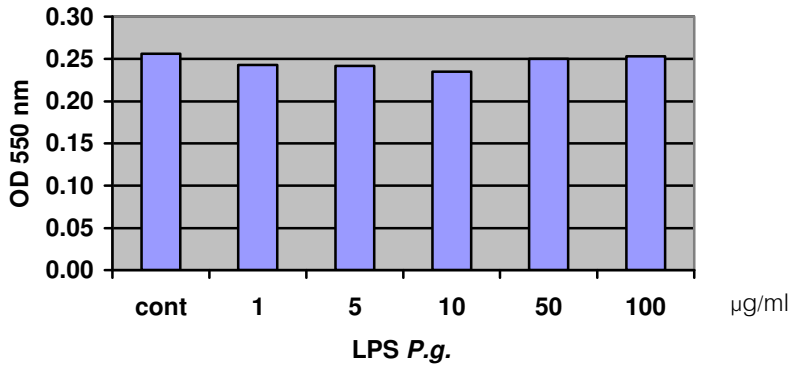
การวิจัยนี้แสดงผลการวิจัยในแบบข้อมูลเชิงพรรณนา

บทที่ 4

ผลการวิจัย

ผลการทดสอบความเป็นพิษของของไลโพโปลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ด้วยเทคนิคเอ็มทีที (MTT assay)

ในการทดลองนี้เลือกไลโพโปลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสที่ความเข้มข้นเท่ากับ 25 และ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยอ้างอิงจากการวิจัยของกนิษฐ์และคณะ[11] อย่างไรก็ตามได้ทำการทดสอบความเป็นพิษของไลโพโปลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสต่อเซลล์โดยวิธีเอ็มทีที ในช่วงความเข้มข้นที่ครอบคลุมความเข้มข้นที่เลือกนี้ พบว่าไม่เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ (ดังแสดงในภาพประกอบ 3)



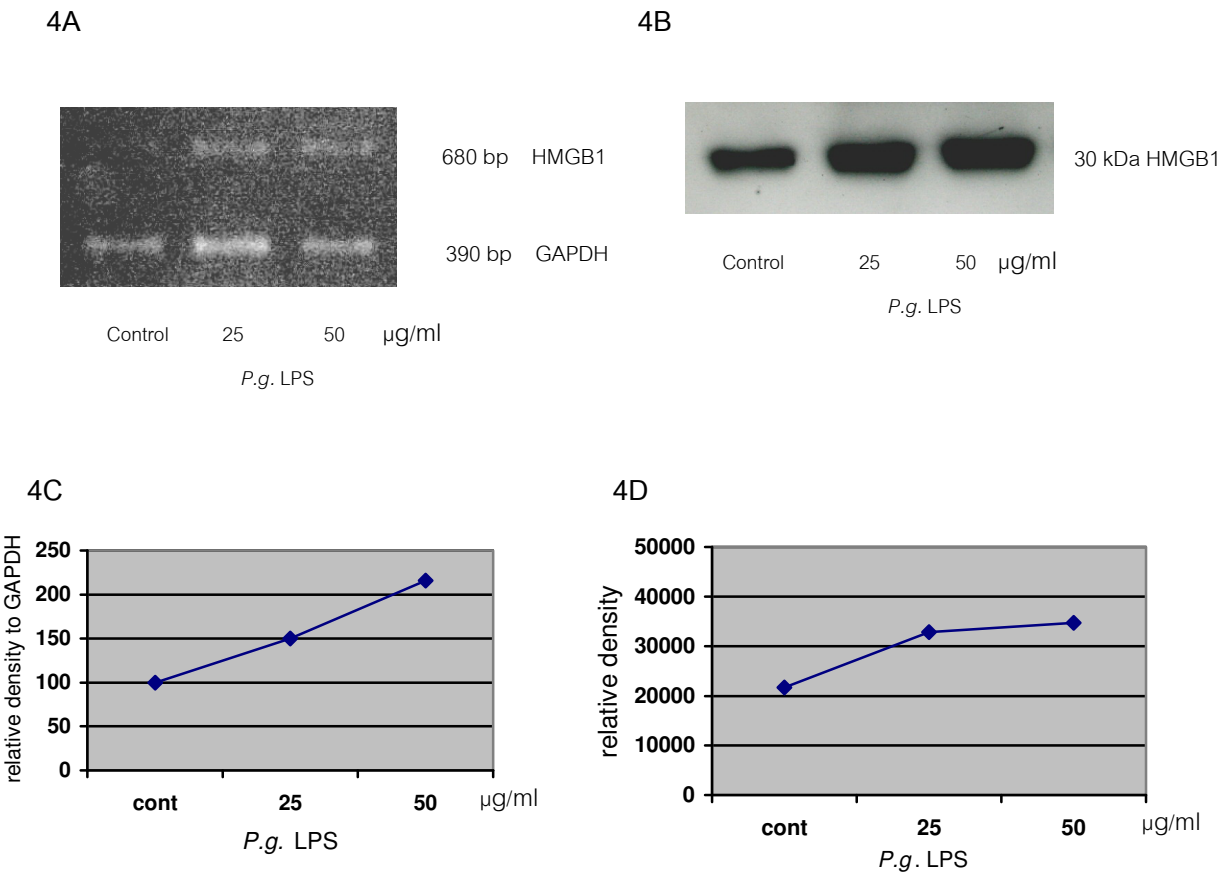
ภาพประกอบ 3 กราฟแท่งแสดงผลการทดสอบระดับความเป็นพิษของไลโพโปลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสที่มีผลต่อเซลล์

ผลการแสดงออกของเอชเอ็มจีบี-1 ในระดับเมสเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอและระดับโปรตีนเมื่อกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์ด้วยไลโพโปลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส

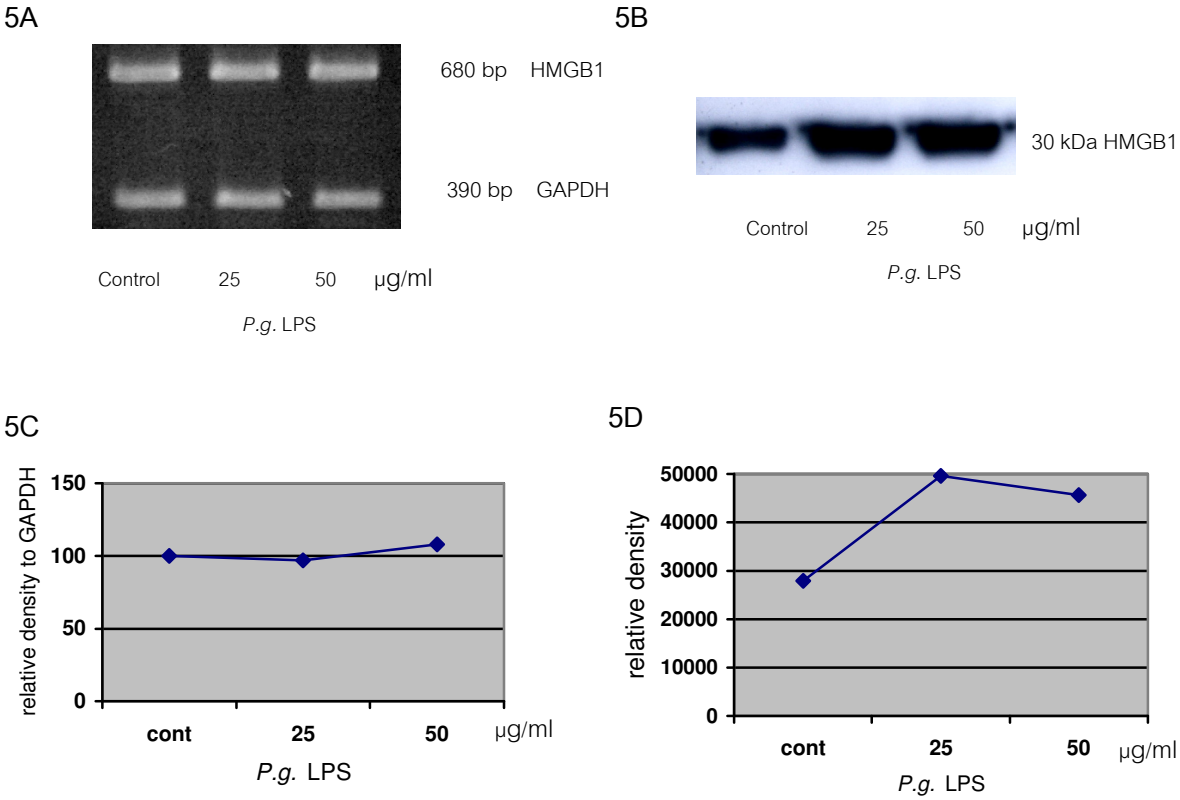
จากการทดลองพบว่า ไลโพโปลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสที่ความเข้มข้น 25 และ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกให้มีการแสดงออก

ของเอชเอ็มจีบี-1 เพิ่มขึ้นกว่ากลุ่มควบคุม ทั้งในระดับเมสเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอและระดับโปรตีน ทั้งนี้ยังพบว่าการแสดงออกของเอชเอ็มจีบี-1 มีการเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อความเข้มข้นของไลโพโปลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสเพิ่มขึ้นจาก 25 เป็น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ดังแสดงในภาพประกอบ 4)

เมื่อทำการกระตุ้นเซลล์เอ็นยึดปริทันต์มนุษย์ด้วยไลโพโปลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสที่ความเข้มข้น 25 และ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ไม่พบว่ามีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของเอชเอ็มจีบี-1 ในระดับเมสเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่ระดับเอชเอ็มจีบี-1 โปรตีนนั้นมีปริมาณเพิ่มขึ้นกว่ากลุ่มควบคุมอย่างชัดเจน (ดังแสดงในภาพประกอบ 5)



ภาพประกอบ 4 การแสดงออกของเอชเอ็มจีบี-1 ในระดับเมสเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอ (พีซีอาร์ จำนวน 20 รอบ และมีแกปดีเอชเป็นตัวควบคุม) (4A) และระดับโปรตีน (4B) เมื่อกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกด้วยไลโพโปลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส และแสดงกราฟเส้นแสดงความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์(4C) และความเข้มของแถบโปรตีน (4D) (จากการแปรผลด้วยโปรแกรมscionImage)

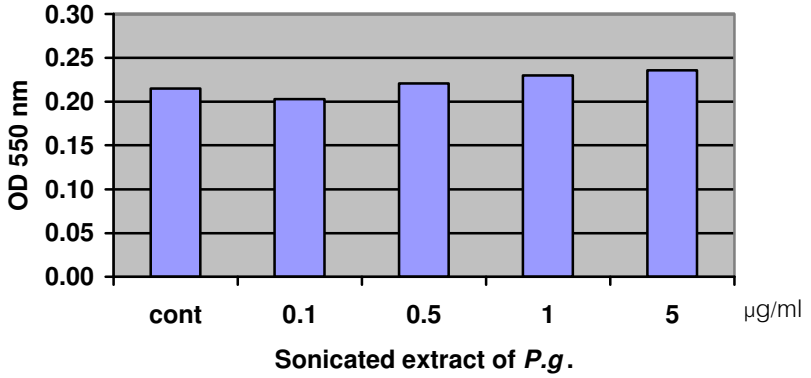


ภาพประกอบ 5 การแสดงออกของเอชเอ็มจีบี-1 ในระดับเมสเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอ (พีซีอาร์ จำนวน 24 รอบ และมีแกปดีเอชเป็นตัวควบคุม) (5A) และระดับโปรตีน (5B) เมื่อกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์ด้วยไลโพโปลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส และแสดงกราฟเส้นแสดงความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (5C) และความเข้มของแถบโปรตีน (5D) (จากการแปรผลด้วยโปรแกรม ScionImage)

ผลการทดสอบความเป็นพิษของส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ด้วยเทคนิคเอ็มทีที (MTT assay)

ในการทดลองนี้เลือกส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.25 และ 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยอ้างอิงจากการวิจัยของศรินทิพย์และคณะ[66] อย่างไรก็ตามได้ทำการทดสอบความเป็นพิษของส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนส

จิงจิวาลิส ต่อเซลล์โดยวิธีเอ็มทีที ในช่วงความเข้มข้นที่ครอบคลุมความเข้มข้นที่เลือกนี้ พบว่าไม่เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ (ดังแสดงในภาพประกอบ 6)

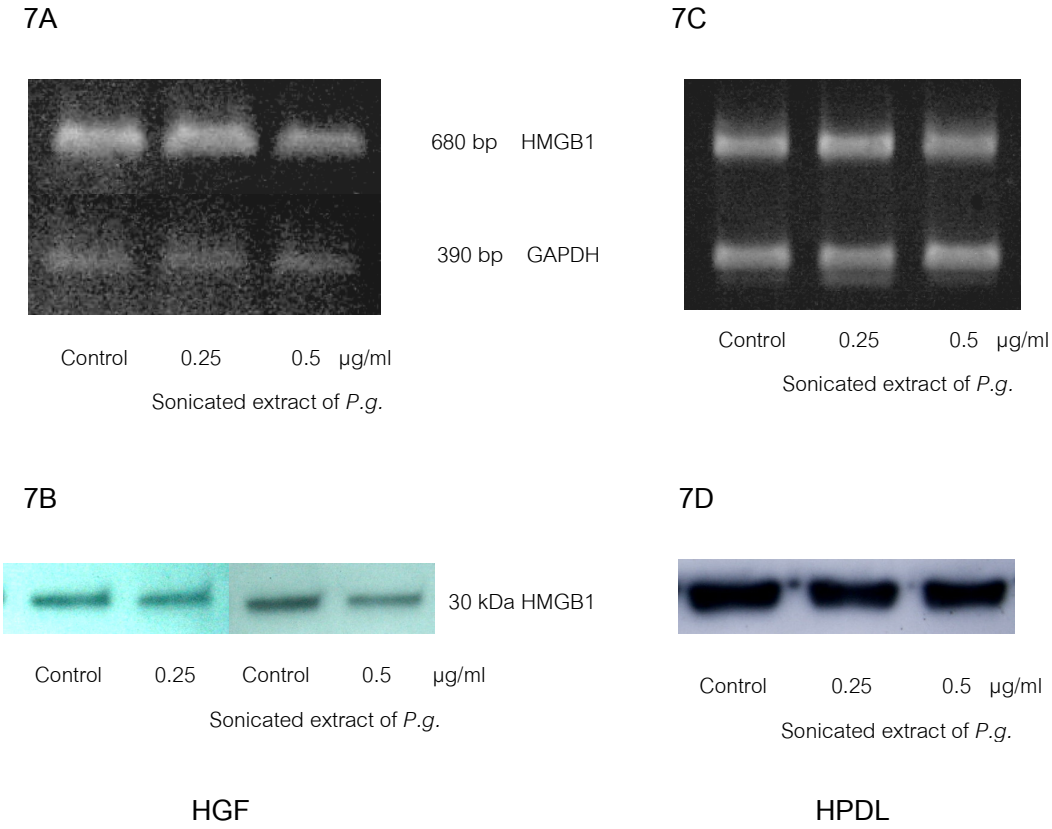


ภาพประกอบ 6 กราฟแท่งแสดงผลการทดสอบระดับความเป็นพิษของส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ที่มีผลต่อเซลล์

ผลการแสดงออกของเอชเอ็มจีบี-1 ในระดับเมสเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอและระดับโปรตีนเมื่อกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์ด้วยส่วนสกัดเซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส

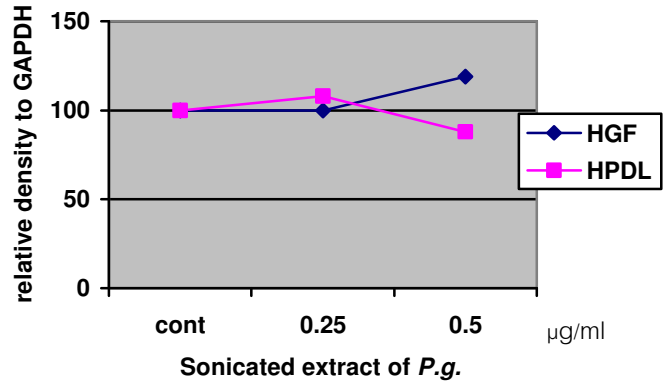
จากการทดลอง ในระดับเมสเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอ เมื่อกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกด้วยส่วนสกัดเซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสที่ความเข้มข้น 0.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีการแสดงออกไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม แต่ในกลุ่มที่กระตุ้นด้วยความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรมีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่กระตุ้นด้วยความเข้มข้น 0.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรเล็กน้อย (ดังแสดงในภาพประกอบ 7A,8A) ส่วนในเซลล์เอ็นยึดปริทันต์มนุษย์นั้นพบว่ามีการแสดงออกไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมมากนัก (ดังแสดงในภาพประกอบ 7C,8A)

ในระดับโปรตีน พบว่าส่วนสกัดเซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ไม่สามารถกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและเซลล์เอ็นยึดปริทันต์มนุษย์ให้มีการแสดงออกของเอชเอ็มจีบี-1 ที่เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมแต่อย่างใด แต่กลับพบมีการแสดงออกเอชเอ็มจีบี-1 โปรตีนที่ลดลงเล็กน้อยในกลุ่มที่กระตุ้นเซลล์เอ็นยึดปริทันต์มนุษย์ (ดังแสดงในภาพประกอบ 7B, 7D, 8B)

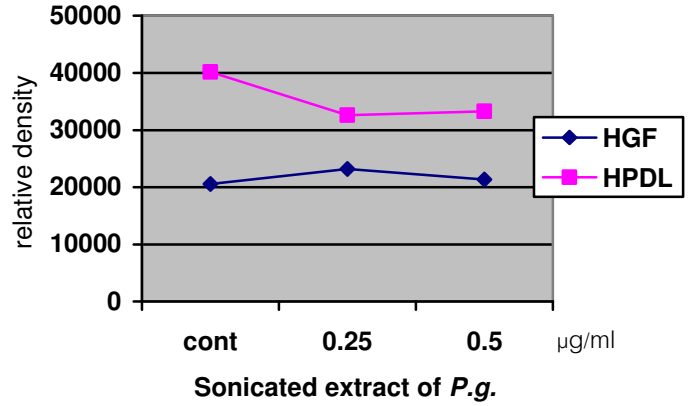


ภาพประกอบ 7 การแสดงออกของเอชเอ็มจีบี-1 ในระดับเมสเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอ (พีซีอาร์ จำนวน 20 รอบ และมีแกปดีเอชเป็นตัวควบคุม) (7A,7C) และระดับโปรตีน (7B,7D) เมื่อกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์ด้วยส่วนสกัดเซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส

8A



8B



ภาพประกอบ 8 กราฟเส้นแสดงความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของเอชเอ็มจีบี-1 (8A) (พีซีอาร์ จำนวน 20 รอบ และมีแกปดีเอชเป็นตัวควบคุม) และความเข้มของแถบโปรตีนเอชเอ็มจีบี-1 (8B) (จากการแปรผลด้วยโปรแกรม scionimage) เมื่อกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์ด้วยส่วนสกัดเซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส

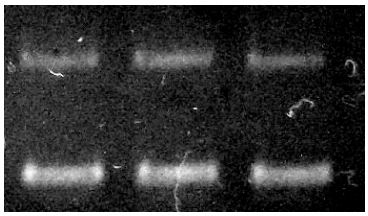
ผลการแสดงออกของเอชเอ็มจีบี-1 ในระดับเมสเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอและระดับโปรตีนเมื่อกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์ด้วยส่วนลอยจากแอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์แทนส์

การทดสอบความเป็นพิษของส่วนลอยจากแอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ ได้ใช้ค่าเอ็มทีทีจากการวิจัยของศรินทิพย์และคณะ[66] ซึ่งอัตราส่วนที่นำมาใช้ในการศึกษา คือ อัตราส่วนส่วนลอยจากแอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์/อาหารเลี้ยงเซลล์ เท่ากับ 1:10, 1:5 ไม่พบเป็นพิษต่อเซลล์

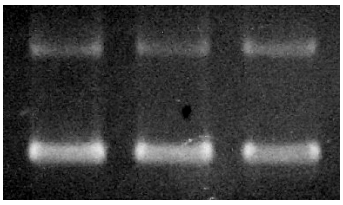
จากการทดลองพบว่าในระดับเมสเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอ ส่วนลอยจากแอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์แทนส์ทั้งอัตราส่วน 1:10 และ 1:5 ไม่สามารถกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกให้มีการแสดงออกของเอชเอ็มจีบี-1 ที่เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมแต่อย่างใด แต่กลับมีการแสดงออกที่ลดลงเล็กน้อยโดยแปรผันตามอัตราส่วนที่ใช้ในการกระตุ้น (ดังแสดงในภาพประกอบ 9A,10A) ส่วนในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์นั้น พบว่ากลุ่มที่กระตุ้นด้วยอัตราส่วน 1:10 มีการแสดงออกไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมมากนัก ส่วนกลุ่มที่กระตุ้นด้วยอัตราส่วน1:5 มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่กระตุ้นด้วยอัตราส่วน 1:10 (ดังแสดงในภาพประกอบ 9C,10A)

ในระดับโปรตีน พบว่ากลุ่มที่กระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกด้วยอัตราส่วน 1:10 มีการแสดงออกไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมมากนักแต่กลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นที่อัตราส่วน 1:5 มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่กระตุ้นด้วยอัตราส่วน 1:10 (ดังแสดงในภาพประกอบ 9B,10B) ส่วนในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์นั้นทั้งอัตราส่วน 1:10 และ 1:5 มีระดับเอชเอ็มจีบี-1 โปรตีนเพิ่มขึ้นกว่ากลุ่มควบคุมเพียงเล็กน้อย (ดังแสดงในภาพประกอบ 9D,10B)

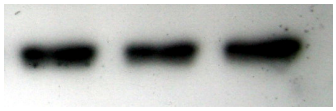
9A



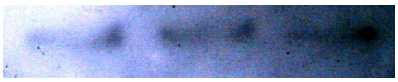
9C



9B



9D

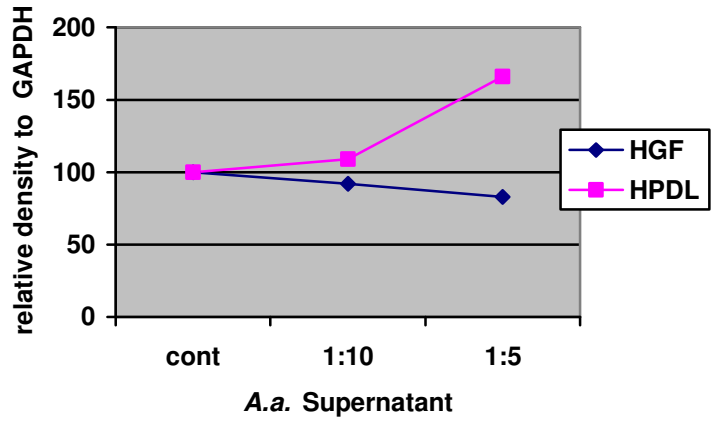


HGF

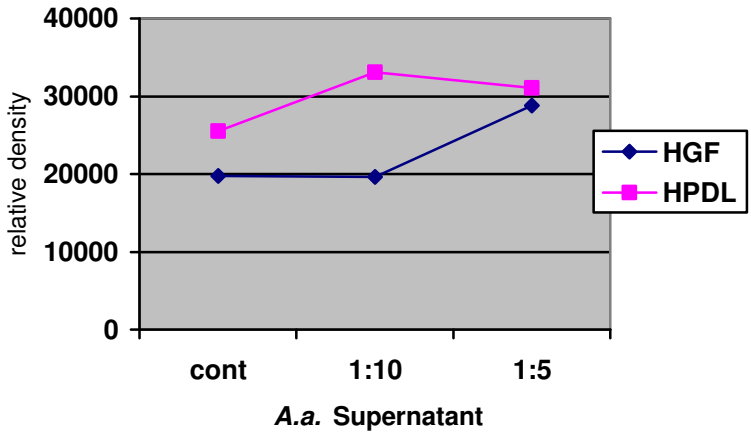
HPDL

ภาพประกอบ 9 การแสดงออกของเอชเอ็มจีบี-1 ในระดับเมสเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอ (พีซีอาร์ จำนวน 24 รอบ และมีแกปดีเอชเป็นตัวควบคุม) (9A,9C) และระดับโปรตีน (9B,9D) เมื่อกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์ด้วยส่วนลอยจากแอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์แทนส์

10A



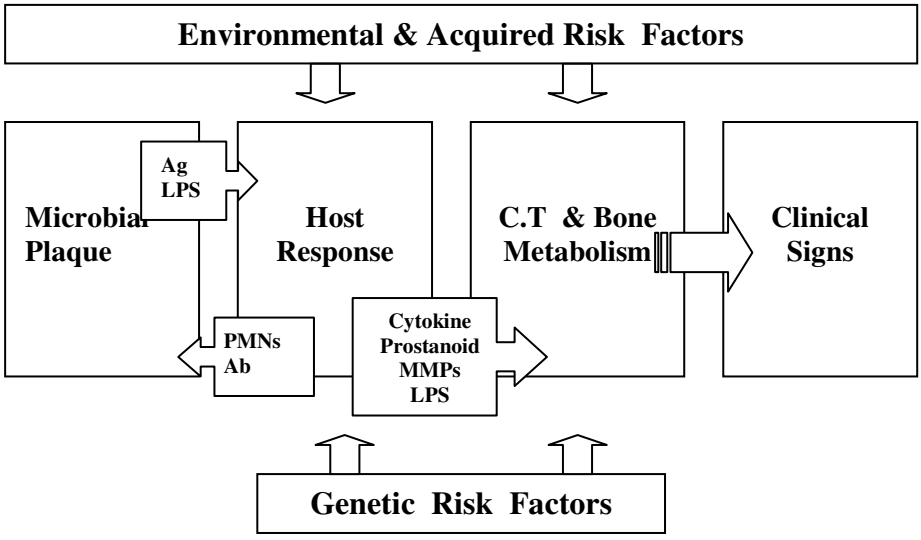
10B



ภาพประกอบ 10 กราฟเส้นแสดงความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของเอชเอ็มจีบี-1 (10A) (พีซีอาร์ จำนวน 24 รอบ และมีแกปดีเอชเป็นตัวควบคุม) และความเข้มของแถบโปรตีนเอชเอ็มจีบี-1 (10B) (จากการแปรผลด้วยโปรแกรม scionimage) เมื่อกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์ด้วยส่วนลอยจากแอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์แทนส์

บทที่ 5
อภิปรายผลและสรุปผล

โรคปริทันต์อักเสบเป็นโรคติดเชื้อเรื้อรังที่ส่งผลให้มีการทำลายอวัยวะปริทันต์ พยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์อักเสบนั้นเกี่ยวข้องกับปัจจัยหลายอย่าง[67] ได้แก่ แบคทีเรียในคราบจุลินทรีย์ ปัจจัยทางระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ร่วมกับปัจจัยเสี่ยงทางพันธุกรรม (Genetic risk factors) และปัจจัยเสี่ยงทางด้านสิ่งแวดล้อม (Environment risk factor) ส่งผลทำให้มีการทำลายกระดูกเบ้าฟันและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในอวัยวะปริทันต์และมีแสดงออกทางคลินิกได้ (ภาพประกอบ 11) โดยเชื้อก่อโรคปริทันต์อักเสบที่สำคัญ [10] คือ แอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ และพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส โดยพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคปริทันต์อักเสบแบบเรื้อรัง (chronic periodontitis) ส่วนแอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญกับ การเกิดโรคปริทันต์อักเสบแบบรุกราน (aggressive periodontitis)[68]



ภาพประกอบ 11 แสดงพยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์อักเสบและปัจจัยที่เกี่ยวข้อง[67]

ที่มา : Page RC and Kornman KS The pathogenesis of human periodontitis. Periodontol 2000.1997;14:9-11.

ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันว่า โรคปริทันต์อักเสบส่วนใหญ่แล้วเป็นผลมาจากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อแบคทีเรียก่อโรคหรือต่อปัจจัยที่มีความรุนแรงของแบคทีเรียดังกล่าว ซึ่งการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายที่ไม่สมดุลส่งผลให้โรคปริทันต์อักเสบมีความรุนแรงมากขึ้น กรณีที่มีการตอบสนองภูมิคุ้มกันของร่างกายมากเกินไปทำให้สารที่เซลล์หลั่งออกมาหรือที่เรียกว่าไซโตไคน์ นอกจากจะทำลายสิ่งแปลกปลอมแล้วยังส่งผลทำลายเซลล์ของร่างกายเอง และการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์เนื่องจากเป็นเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญที่เกี่ยวข้องกับพยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์อักเสบ ซึ่งในทางปริทันตวิทยาเซลล์ทั้งสองชนิดนี้ เกี่ยวข้องในกระบวนการสร้างและคงสภาพของอวัยวะยึดปริทันต์ [14] รวมทั้งยังช่วยซ่อมแซมและช่วยสร้างกระดูกเบ้าฟันขึ้นมาใหม่ ซึ่งเซลล์เหล่านี้จะสัมผัสโดยตรงกับเชื้อก่อโรคและปัจจัยที่มีความรุนแรงของเชื้อและยังเป็นเซลล์ที่ตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกัน [18,19] โดยมีการหลั่งไซโตไคน์ด้วย

เอชเอ็มจีบี-1 หรืออีกชื่อหนึ่งว่าแอมโฟเทอริน เริ่มแรกเป็นที่รู้จักกันว่าเป็นโครมาตินโปรตีนที่อยู่ในนิวเคลียส [1] แต่ต่อมาทราบว่าสามารถหลั่งออกมาภายนอกเซลล์ได้ในเซลล์หลายชนิด โดยเมื่อหลั่งออกมาภายนอกแล้วเอชเอ็มจีบี-1 จะทำหน้าที่เป็นไซโตไคน์ โดยเอชเอ็มจีบี-1 ถูกจัดว่าเป็นไซโตไคน์ที่หลั่งออกมาค่อนข้างช้ากว่าไซโตไคน์ชนิดอื่นๆในกระบวนการของการอักเสบ [2] รวมทั้งเอชเอ็มจีบี-1เอง ยังสามารถกระตุ้นให้เกิดการหลั่งของสารไซโตไคน์ที่มีผลต่อการเกิดการอักเสบและมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบหลายโรค เช่น โรคไขข้ออักเสบ สภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด[7-9] โดยเอชเอ็มจีบี-1สามารถกระตุ้นการตอบสนองการอักเสบและส่งผ่านสัณญานความเสียหาย (injury signal) ต่อเซลล์และเนื้อเยื่อต่างๆดังแสดงใน ตาราง 4 [6] การวิจัยครั้งนี้จึงสนใจศึกษาบทบาทของเอชเอ็มจีบี-1ต่อโรคปริทันต์ซึ่งเป็นโรคปริทันต์ก็จัดเป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบเช่นกัน

อย่างไรก็ตาม บทบาทของเอชเอ็มจีบี-1 ต่อโรคในช่องปากนั้นยังจำกัดอยู่ มีการศึกษาเมื่อไม่นานมานี้รายงานว่าสามารถพบการแสดงออกของเอชเอ็มจีบี-1 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเซลล์ในช่องปาก ได้แก่ เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์ โพรงประสาทฟัน และเหงือก[11] รวมทั้งในเซลล์บุผิวเหงือกก็มีการรายงานเช่นเดียวกันว่าพบการแสดงออกของเอชเอ็มจีบี-1 ในนิวเคลียสของทั้งผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบและผู้ป่วยที่ไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ แต่ในผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบนั้นยังพบการแสดงออกของเอชเอ็มจีบี-1 ในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ด้วย รวมทั้ง Morimoto Y. (2008)[63] ยังพบการแสดงออกของโปรตีนเอชเอ็มจีบี-1 ในน้ำเหลืองเหงือก (gingival crevicular fluid) ของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบแต่ไม่พบในน้ำเหลืองเหงือกของผู้ป่วยที่ไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบและในการศึกษาก่อนหน้านี้ของ กนิษฐ์และคณะ[11] ยังได้ศึกษาการแสดงออกของเอชเอ็มจีบี-1 ในเซลล์ไฟโปรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์ภายหลังการกระตุ้นด้วย

ไลโพโปลีแซคคาร์ไรด์ของเชื้ออีโคไล ผลที่ได้พบว่ามีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของเอชเอ็มจีบี-1 ในระดับเมสเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์ของมนุษย์เมื่อกระตุ้นด้วยไลโพโปลีแซคคาไรค์ของเชื้ออีโคไล แต่ไม่พบการเพิ่มขึ้นของโปรตีนเอชเอ็มจีบี-1 การศึกษาครั้งนี้ ทางผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาต่อยอด โดยนำไลโพโปลีแซคคาร์ไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส มากระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือก จากผลการวิจัย พบว่าไลโพโปลีแซคคาร์ไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส สามารถกระตุ้นให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือก แสดงออกเอชเอ็มจีบี-1ในปริมาณที่สูงขึ้นทั้งในระดับเมสเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอและโปรตีนเมื่อเทียบกับสภาวะที่ไม่ได้รับการกระตุ้น แต่เมื่อกระตุ้นเซลล์เอ็นยึดปริทันต์มนุษย์กลับไม่พบแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของเอชเอ็มจีบี-1ในระดับเมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอ แต่พบการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของโปรตีนเอชเอ็มจีบี-1 ซึ่งผลที่ได้แตกต่างจากการศึกษาก่อนหน้านี้ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่อาจเนื่องจาก ไลโพโปลีแซคคาร์ไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสและเชื้ออีโคไลนั้นมีความแตกต่างทางเคมีและทางชีววิทยา [69,70] โดยไลโพโปลีแซคคาร์ไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสนั้นจะไม่พบสารบางชนิดซึ่งได้แก่ ฮิปโตส (heptose) เบต้าไฮดรอกซีดีคาโนอิคแอซิด (β-hydroxydecanoic acid) และพบไดคีโตไตรดีออกซีออกโตเนท (2-keto-3-deoxyoctonate) ซึ่งช่วยในการยึดกับโพลีแซคคาร์ไรด์ รวมทั้งไลโพโปลีแซคคาร์ไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสมีกรดไขมัน (fatty acid) ชนิดที่เป็นกิ่ง (branched) และมีความยาวมากกว่า และยังมีการศึกษาพบว่ามีการแสดงออกยีนอินเทอร์ลิวคิน 8 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกที่กระตุ้นด้วย ไลโพโปลีแซคคาร์ไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสแต่ไม่พบการแสดงออกเมื่อกระตุ้นด้วยไลโพโปลีแซคคาร์ไรด์ของอีโคไล[71] ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าไลโพโปลีแซคคาร์ไรด์จากแบคทีเรียทั้งสองมีความแตกต่างกันจึงมีความสามารถในการกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ได้ต่างกัน และนอกจากนั้นเชื้ออีโคไลไม่พบเป็นเชื้อก่อโรคปริทันต์อักเสบ ไลโพโปลีแซคคาร์ไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสน่าจะเป็นตัวกระตุ้นที่ใกล้เคียงกับพยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์อักเสบมากกว่า

ส่วนผลที่ได้เมื่อกระตุ้นเซลล์เอ็นยึดปริทันต์มนุษย์ด้วยไลโพโปลีแซคคาร์ไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส พบเพียงการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของโปรตีนเอชเอ็มจีบี-1 แต่กลับไม่พบการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นในระดับเมสเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอ อาจเนื่องมาจากว่าไลโพโปลีแซคคาร์ไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสมีผลกระตุ้นการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของเอชเอ็มจีบี-1 ในระดับโปรตีนภายหลังการสังเคราะห์ (post-translational level) สอดคล้องกับการศึกษาในภาวะเฟรดริคอะแท็กเซีย (Friedreich's ataxia) ซึ่งเป็นโรคพันธุกรรมในกลุ่มอะแท็กเซีย (ataxia) โดยพบความผิดปกติที่ gene ที่ควบคุมการสร้างโปรตีนฟราทาซิน (frataxin protein) โดยจากการศึกษาดังกล่าวพบว่ายาที่ช่วยเพิ่มโปรตีนฟราทาซิน คือ อิริโทรพอยอิทิน (recombinant

human erythropoietin (rhu-EPO)) นั้นสามารถกระตุ้นเซลล์ไฟโปรบลาสต์ให้มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของโปรตีนฟราทาซิน แต่ไม่พบการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของฟราทาซินในระดับเมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอ[72] เช่นกัน

จากผลการแสดงออกที่แตกต่างกันของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์นั้นอาจเนื่องจากเซลล์ทั้งสองชนิดมีความแตกต่างกันจึงส่งผลให้การแสดงออกแตกต่างกันด้วย มีรายงานถึงความแตกต่างของการแสดงออกของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์ พบว่าเซลล์ทั้งสอง มีการแสดงออกออสติโอพอนทีน (osteopontin) ออสติโอแคลซิน (osteocalcin) โบนไซเอโลโปรตีน (bone sialoprotein) และอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase) แตกต่างกัน[73] โดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์มีการแสดงออกอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในปริมาณที่สูง มีการผลิตสารคล้ายโปรตีนเมทริกซ์ของกระดูก (bone-like matrix proteins) และสามารถสร้างเนื้อเยื่อแข็ง (mineralized nodules) ได้[74] รวมทั้งยังมีการแสดงออกของตัวรับบนผิวเซลล์ได้แก่ ตัวรับ ซีดี 14 (CD14 receptor) และ ตัวรับโทล-ไลค์ (Toll-like receptor) แตกต่างกันด้วย โดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกมีการแสดงออกตัวรับซีดี 14 และซีดี 14 อาร์เอ็นเอในระดับที่สูง ส่วนเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์พบมีการแสดงออกของทั้งตัวรับซีดี 14 และซีดี 14 อาร์เอ็นเอในระดับต่ำ แต่พบมีการแสดงออกตัวรับโทล-ไลค์2 (Toll-like receptor 2) ในปริมาณที่สูงกว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือก[75] ซึ่งการจับของไลโพโปลีแซคคาร์ไรด์กับผิวเซลล์พบว่าไลโพโปลีแซคคาร์ไรด์จะอาศัยทั้งตัวรับซีดี 14 ตัวรับโทล-ไลค์ และ ไลโพโปลีแซคคาร์ไรด์บายดิ้งโปรตีน (LPS-binding protein) [76] อย่างไรก็ตาม ไลโพโปลีแซคคาร์ไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสสามารถเพิ่มการแสดงออกเอชเอ็มจีบี-1 ในระดับโปรตีนได้ทั้งเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์ ซึ่งจะแสดงถึงการตอบสนองของเซลล์ทั้งสองต่อปัจจัยที่มีความรุนแรงของโรคปริทันต์ ซึ่งอาจแสดงถึงบทบาทของเอชเอ็มจีบี-1ที่มีผลทำให้โรค ปริทันต์มีความรุนแรงมากขึ้นได้ แต่กลไกการตอบสนองของเซลล์ต่อเอชเอ็มจีบี-1 รวมทั้งบทบาทของเอชเอ็มจีบี-1ต่อโรคปริทันต์นั้นยังคงต้องศึกษาต่อไป

ในการศึกษานี้ยังได้นำส่วนสกัดเซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสและส่วนลอยของอาหารเลี้ยงแอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ มาใช้กระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์ เนื่องจากส่วนสกัดเซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสและส่วนลอยของอาหารเลี้ยงแอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ มีปัจจัยที่มีความรุนแรงของเชื้ออยู่หลายชนิดซึ่งอาจมาจากแบคทีเรียก่อโรคเองหรืออาจเป็นสารที่แบคทีเรียก่อโรคนั้นหลั่งออกมา ปัจจัยก่อโรคที่สกัดได้จากส่วนลอยจากแอคติโนแบซิลัสแอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ เช่น ลิวโคท๊อกซิน ไซโตท๊อกซิน เอ็นไซม์ย่อย

สลายโปรตีนที่เชื้อปลดปล่อยออกนอกเซลล์ ส่วนปัจจัยก่อโรคที่สกัดได้จากส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวาลิสที่พบว่ามีความเกี่ยวข้องกับการทำลายของอวัยวะปริทันต์และกระดูกเบ้าฟันได้แก่ ไลโปโพลีแซคคาไรด์ ฟิมเบรีย ฮีแมกกลูตินิน และโปรตีนแอนติเจน ซึ่งปัจจัยก่อโรคเหล่านี้จะเป็นตัวกระตุ้นเซลล์ต่างๆที่อยู่บริเวณที่มีการอักเสบทั้งเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันหรือเซลล์ของร่างกายเช่น โมโนไซน์ แมกโครแฟจ และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ เป็นต้น ให้หลั่งไซโตไคน์มาทำลายอวัยวะปริทันต์ตามมาได้

แต่ในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจนของการแสดงออกของเอชเอ็มจีบี-1 ทั้งในระดับเมสเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอและระดับโปรตีน ซึ่งอาจเนื่องมาจากส่วนสกัดเซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสและส่วนลอยของอาหารเลี้ยงแอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ น่าจะมีปัจจัยก่อโรคหรือโมเลกุลมากกว่า 1 ชนิดที่มีผลต่อการแสดงออกของเอชเอ็มจีบี-1 กล่าวคือ มีปัจจัยก่อโรคหรือโมเลกุลบางอย่างสามารถกระตุ้นให้มีการแสดงออกของเอชเอ็มจีบี-1 ที่สูงขึ้นซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเป็นไลโพโปลีแซคคาร์ไรด์ ในขณะเดียวกันก็จะมีปัจจัยก่อโรคหรือโมเลกุลอีกชนิดหนึ่งหรือหลายชนิด ซึ่งมีผลในด้านการยับยั้งการแสดงออกของเอชเอ็มจีบี-1 ให้น้อยลง ซึ่งอาจจะเป็นพวกเอ็นไซม์โปรตีนเนส ที่ส่งผลให้เกิดการทำลายเอชเอ็มจีบี-1 ให้น้อยลง และการที่ไม่ได้ใช้ตัวกระตุ้นที่เป็นสารบริสุทธิ์เพียงชนิดใดชนิดหนึ่งที่สกัดออกมาจากเชื้อมาทำการศึกษา ผลที่ได้จึงไม่ได้แสดงผลกระตุ้นทางใดทางหนึ่งที่ชัดเจนลงไป ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารบริสุทธิ์เพียงชนิดใดชนิดหนึ่งที่สกัดออกมาจากเชื้อซึ่งการศึกษานี้ใช้ไลโพโปลีแซคคาร์ไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ดูจะให้ผลที่ชัดเจนกว่า แต่ก็มีการศึกษาของศรินทิพย์และคณะ[66] ที่ได้นำส่วนสกัดเซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสและส่วนลอยของอาหารเลี้ยงแอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ มากระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์เช่นเดียวกัน จากผลการทดลองพบว่าส่วนลอยจากแอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์สามารถกระตุ้นเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ให้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นของยีนพาร์-2 ในระดับเมซเซนเจอร์อาร์เอ็นเอและระดับโปรตีน แต่ส่วนสกัดเซลล์แตกพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวาลิสนั้นพบการแสดงออกของพาร์-2 มีระดับลดลง ซึ่งผลที่ตรงกันข้ามกันของส่วนลอยจากแอคกริเกติแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์และส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสจากการศึกษาดังกล่าว อาจเป็นไปได้ว่าส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส มีปัจจัยก่อโรคหรือโมเลกุลบางอย่างที่แสดงผลกดการทำงานหรือยับยั้งที่มากกว่าปัจจัยก่อโรคหรือโมเลกุลที่มีผลในด้านการกระตุ้น ทำให้ผลลัพธ์ของการกระตุ้นโดยรวมออกมาในทิศทางลดลงกว่ากลุ่มควบคุม

จากผลการศึกษาในครั้งนี้ทำให้ได้ข้อมูลขั้นต้นในการศึกษาถึงบทบาทของเอชเอ็มจีบี-1 ต่อโรคปริทันต์อักเสบ ซึ่งคาดว่าจะมีประโยชน์ต่อไปในอนาคตในการศึกษาเกี่ยวกับกลไกของเอชเอ็มจีบี-1 ต่อพยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์อักเสบ

บทสรุป

ภายใต้สภาวะของการวิจัยนี้ แสดงว่า สารบริสุทธิ์ไลโพโปลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสเท่านั้นที่สามารถกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและของเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์ ให้มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของเอชเอ็มจีบี-1

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

1. Goodwin GH, Sanders C, Johns EW. A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids. Eur J Biochem 1973; 38: 14-9.
2. Agresti A, Bianchi ME. HMGB proteins and gene expression. Curr Op Genet Develop 2003; 13: 170–8.
3. Wang H, Bloom M, Zhang JM, Vishnubhakat M, Ombrellino J, Che A, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. Science 1999; 285: 248-51.
4. Wang H, Vishnubhakat JM, Bloom O et al. Proinflammatory cytokines (tumor necrosis factor and interleukin 1) stimulate release of high mobility group protein-1 by pituicytes. Surgery 1999; 126: 389-92.
5. Rendon-Mitchell B, Ochani M, Li J et al. IFN-gamma induces high mobility group box1 protein release partly through a TNF-dependent mechanism. J Immunol 2003; 170: 3890-7.
6. Yang H , Wang H, Czura CJ , Tracey KJ. The cytokine activity of HMGB1. J of Leuko Bio 2005; 78: 1-8.
7. Jiang W, Pisetsky DS. Mechanisms of Disease: the role of high-mobility group protein 1 in the pathogenesis of inflammatory arthritis. Nat Clin Pract Rheumatol. 2007; 3:52-8.
8. Andersson U, Erlandsson-Harris H. HMGB1 is a potent trigger of arthritis. J Intern Med. 2004; 255:344-50.
9. Yang H, Ochani M, Li J, Qiang X, Tanovic M, Harris HE, Susarla SM, Ulloa L,Wang H, DiRaimo R, Czura CJ, Roth J, Warren HS, Fink MP, Fenton MJ, Andersson U, Tracey KJ. Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1. Proc Natl Acad Sci 2004; 101: 296-301.
10. Haffajee AD , Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal disease. Periodontal 2000. 1994; 5:78-111.

11. Nantasenee K, Laosrisin N,Dhanesuan N. Effect of LPS on HMGB1expression in Human Periodontal Ligament Fibroblasts. Thesis, M.S (Periodontology) 2006.

12. Yamazaki K, Ikarashi F, Aoyagi T, Takahashi K, Hara K, Seymour GJ. Direct and indirect effects of Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide on interleukin-8 production by human gingival fibroblasts. Oral Microbiol Immunol 1992; 7:218-224.

13. Yamaji Y, Kuboto T, Sasaguri K, Sato S, Suzuki Y, Kumada H et al. Inflammatory cytokine gene expression in human periodontal ligament fibroblasts stimulated with bacterial lipopolysaccharide. Infection and Immunity 1995; 3576-89.

14. Kuru L, Parkar MH, Griffiths GS, Newman HN, Olsen I. Flow cytometry analysis of gingival and periodontal ligament cells. J Dent Res 1998; 77: 555-64.

15. Nishida E, Hara Y, Kaneko T, Ikeda Y, Ukai T, Kato I. Bone resorption and local interleukin-1alpha and interleukin-1beta synthesis induced by Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide J Periodontal Res. 2001; 36: 1-8.

16. Helderman WH. Microbial etiology of periodontal disease. J Clin Periodontal 1981;8:261–280.

17. Kesavalu L, Chandrasekar B, Ebersole JL. In vivo induction of proinflammatory cytokines in mouse tissue by Porphyromonas gingivalis and Actinobacillus actinomycetemcomitans. Oral Microbiol Immunol. 2002; 17:177-80.

18. Socransky SS,Cugini MA ,Smith C,Kent RL. Microbial complexs in subgingival plaque. J Clin Periodontal 1998; 25:134-44.

19. Genco RJ. Host responses in periodontal disease: current concepts. J Periodontol 1992; 63:338-55.

20. Pekovic DD, Fillery ED. Identification of bacteria in immunological mechanisms of human periodontal disease. J Periodont Res 1984; 77:324.

21. Christersson LA,Fransson CL,Dunford RG,Zambon JJ. Subgingivalis distribution of periodontal pathogenic microorganisms in adult periodontitis.

J Periodontol 1992; 63:418-25.

22. Sastrowijoto SH, Hillemnas P,van Steenbergen TJM ,Abraham-Ipijn L,de Graaff J.Periodontal condition and microbiology of healthy and diseased periodontal pockets in type 1 diabetes mellitus patients. J Clin Periodontal 1989; 16:316.
23. Paul JE,Cristopher WC. Microorganisms as risk indicators for periodontal disease. . Periodontol 2000. 2003; 32:24-35.
24. Laine ML,Appelmelk BJ,van Winkelhoff AJ. Novel polysaccharide capsular serotypes in Porphyromonase gingivalis. J Periodont Res. 1996; 31:278-284.
25. Zhao S, Shi J,Xiao M. Effect of capsules on attachment of human periodontal ligament fibroblast to root surface. Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi 1996; 31:19-21.
26. Stanley CH, Lakshmyya K, Stephen W, Caroline AG. Virulence factors of Porphyromonase gingivalis. Periodont 2000. 1999; 20:168.
27. Yamazaki K, Ikarashi F, Aoyagi T, Takahashi K, Hara K, Seymour GJ. Direct and indirect effects of Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide on interleukin-8 production by human gingival fibroblasts. Oral Microbiol Immunol 1992; 7:218-224.
28. Yamaji Y, Kuboto T, Sasaguri K, Sato S, Suzuki Y, Kumada H et al. Inflammatory cytokine gene expression in human periodontal ligament fibroblasts stimulated with bacterial lipopolysaccharide. Infection and Immunity 1995; 3576-89.
29. Kent LW, Rahemtulla F, Michalek SM. Interleukin (IL)-1 and Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide stimulation of IL-6 production by fibroblast derived from healthy or periodontally diseased human gingival tissue. J Periodontol 1999; 70:274-282.
30. Sharma A, Sojar HT, Lee JY, Genco RJ. Expression of a functional Porphyromonas gingivalis fimbrillin polypeptide in Escherichia coli: purification, physicochemical and immunochemical characterization, and binding characteristics. Infect Immun. 1993; 61:3570-3.

31. Lee JY.Sojar HT, Bedi GS, Genco RJ. Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis fimbrillin: size, amino-terminal sequence, and antigenic heterogeneity. Infect Immun. 1991; 59:383-9.

32. Nakagawa I, Amano A, Kuboniwa M, Nakamura T, Kawabata S,Hamada S. Functional differences among FimA variants of Porphyromonas gingivalis and their effects on adhesion to and invasion of human epithelial cells. Infect Immun. 2002; 70:277-85.

33. Ishikawa I, Nakashima K, Koseki T,Nagasawa T,Watanabe H, Arakawa S, Nitta H,Nishihara T. Induction of the immune response to periodontopathic bacteria and its role in the pathogenesis of periodontitis. Periodontol 2000. 1997; 14:79-111.

34. Du L, Pellen-Mussi P, Chandad F, Mouton C, Bonnaure-Mallet M Conservation of fimbriae and the hemagglutinating adhesin HA-Ag2 among Porphyromonas gingivalis strains and other anaerobic bacteria studied by epitope mapping analysis. Clin Diagn Lab Immunol. 1997; 4:711-4.

35. Lamonde L, Mouton C. Alteration of erythrocyte cell shape by hemagglutinating bacteria. J Dent Res 1988; 67:331.

36. Grenier D, Mayrand D. Proteinases In: Shah HN, Mayrand D, Genco RJ, ed. Biology of the species Porphyromonas gingivalis. Boca Raton, FL: CRC Press, 1993; 227-243.

37. Holt SC, Bramanti TE. Factors in virulence expression and their role in periodontal disease pathogenesis. Crit Rev Oral Biol Med. 1991; 2:177-281.

38. Kobayashi T, Kaneko S, Tahara T, Hayakawa M, Abiko Y, Yoshie H. Antibody responses to Porphyromonas gingivalis hemagglutinin A and outer membrane protein in chronic periodontitis. J Periodontol. 2006; 77:364-9.

39. Rogers JE, Li F, Coatney DD, Rossa C, Bronson P, Krieder JM, Giannobile WV, Kirkwood KL. Actinobacillus actinomycetemcomitans lipopolysaccharide-mediated experimental bone loss model for aggressive periodontitis. . J Periodontol. 2007; 78: 550-8.

40. Tanner AC,Haffer C,Bratthall GT,Visconti RA ,Socransky SS.A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. J Clin Periodontol. 1979 ;6 :278-307.

41. Fives-Taylor MP, Meyer HD, Mintz PK, Brissette C. Virulence factors of Actinobacillus actinomycetemcomitans. Periodontol 2000. 1999; 20:152.

42. Lawson DA, Meyer TF. Biochemical characterization of Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis collagenase. Infect Immun. 1992; 60:1524-9.

43. Helgeland K, Nordby O. Cell cycle-specific growth inhibitory effect on human gingival fibroblasts of a toxin isolated from the culture medium of Actinobacillus actinomycetemcomitans. J Periodontal Res. 1993; 28:161-5.

44. Patel MD, Henderson B, Galgut P, Olsen I. Mechanism of the antiproliferative action of Actinobacillus actinomycetemcomitans surface-associated material. J Dent Res 1994; 73:793.

45. Berthold P,Forti D,Kieba IR,Rosenbloom J,Taichman NS,Lally ET Electron immunocytochemical localization of Actinobacillus actinomycetemcomitans leukotoxin. Oral Microbiol Immunol. 1992; 7:24-7.

46. Loesche WJ, Syed SA, Stoll J. Trypsin-like activity in subgingival plaque. A diagnostic marker for spirochetes and periodontal disease? J Periodontol 1987; 58:266-273.

47. Wang PL, Azuma Y, Shinohara M, Ohura K, Effect of Actinobacillus actinomycetemcomitans protease on the proliferation of gingival epithelial cells. Oral Dis 2001; 7:233-237.

48. Gregory RL, Kim DE, Kindle JC, Hobbs LC, Lloyd DR. Immunoglobulin-degrading enzymes in localized juvenile periodontitis. J Periodontal Res 1992; 27:176-183.

49. Saglie FR, Simon K, Merrill J, Koeffler HP. Lipopolysaccharide from Actinobacillus actinomycetemcomitans stimulates macrophage to produce interleukin-1 and tumor necrosis factor mRNA and protein . Oral Microbiol Immunol 1990;5:256-262

50. Shenker BJ, Kushner ME, Tsai CC. Inhibition of fibroblast proliferation by

Actinobacillus actinomycetemcomitans. Infect Immun 1982; 38:986-992.

51. Bustin M. Revised nomenclature for high mobility group (HMG) chromosomal proteins. Trends Biochem Sci 2001; 26: 152-3
52. Bustin M., Lehn DA, Landsman D. Structural features of the HMG chromosomal proteins and their genes. Biochim.Biophys.Acta 1990; 1049: 231–243.
53. Chen G,Ward MF,Sama AE ,Wang H. Extracellular HMGB1 as a Proinflammatory Cytokine. Journal of Interferon & Cytokine Research 2004; 24: 329 -333.
54. Erlandsson HH ,Andresson U. Mini-review : The nuclear protein HMGB1 as a proinflammatory mediator. Eur J Immunol 2004; 34: 1503-12.
55. Degryse B, Virgilio M. The nuclear protein HMGB1, a new kind of chemokine? FEBS Letters 2003; 553: 11-17.
56. Lutz W, Stetkiewicz J. High mobility group box 1 protein as a late-acting mediator of acute lung inflammation. Int J Occup Med Environ Health. 2004;17: 245-54.
57. Andersson U, Tracey KJ. HMGB1 in sepsis. Scand J Infect Dis 2003; 35: 577-84.
58. Kokkola R, Andersson A, Mullins G, Ostberg T, Treutiger CJ, Arnold B, Nawroth P, Andersson U, Harris RA, Harris HE. RAGE is the major receptor for the proinflammatory activity of HMGB1 in rodent macrophages. Scand J Immunol. 2005 ;61:1-9.
59. Inoue K, Kawahara K, Biswas KK, Ando K, Mitsudo K , Masakiyo N, Maruyama I. HMGB1 expression by activated vascular smooth muscle cells in advanced human atherosclerosis plaques. Cardiovascular Pathology 2007; 16: 336-143.
60. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. Nature. 2002;418:191-5.
61. Dumitriu IE, Baruah P, Valentinis B, Voll RE, Herrmann M, Nawroth PP, Arnold B, Bianchi ME, Manfredi AA,Rovere-Querini P. Release of high mobility group box 1 by dendritic cells controls T cell activation via the receptor for advanced glycation end products. J Immunol. 2005 Jun 15;174(12):7506-15.
62. El Gazzar M. HMGB1 modulates inflammatory responses in LPS-activated

macrophages. Inflamm Res. 2007;56:162-167.

63. Morimoto Y, Kawahara K, Maruyama I and Izumi Y. Expression of high mobility group box1 (HMGB1) in gingival epithelial cells. Eur perio 2006.

64. Tiranathanagul S, Pattamapun K, Yongchaitrakul T, Pavasant P. MMP-2 activation by *Actinobacillus actinomycetcmcomitans* supernatant in human PLD cells was corresponded with reduction of TIMP-2. Oral Dis 2004;10:383-388.

65. Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; application to proliferation and cytotoxicity assay. J Immunol Methods 1983;65:55-63.

66. Angsupokai S , Laosrisin N and Tiranathanagul S. Expression of PAR-2 in Human Periodontal Ligament Cells Activated by Periodontopathic Bacteria. Thesis, M.S (Periodontology) 2007.

67. Page RC, Kornman KS The pathogenesis of human periodontitis. P eriodontol 2000.1997;14:9-11.

68. Slots, J., and M. A. Listgarten. 1988. *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. J. Clin. Periodontol. 15:85–93.

69. Nair, B. C., W. R. Mayberry, R. Dziak, P. P. Chen, M. J. Levine, and E. Hausmann.. Biological effects of a purified lipopolysaccharide from Bacteroides gingivalis. J. Periodontal Res. 198318:4(-49.

70. Koga T , Nishihara T , Fujiawara T, Nisizawa T, Okahashi N, Noguchi T and Hamada S. Biochemical and Immunobiological Properties of Lipopolysaccharide (LPS) from Bacteroides gingivalis and Comparison with LPS from Escherichia coli. Infect Immun. 1985;47: 638-647.

71. Sveen K. The capacity of lipopolysaccharides from Bacteriodes, Fusobacterium and Veillonella to produce skin inflammation and the local and generalized Schwartzman reaction in rabbits. J Periodontal Res. 1997;12:340-350.

72. Acquaviva F, Castaldo I, Filla A, Giacchetti M, Marmolino D, Monticelli A, Pinelli M, Saccà F and Cocozza S. Recombinant Human Erythropoietin Increases Frataxin Protein Expression Without Increasing mRNA Expression. 2008;7:

1473-4222.

73. Ivanovski S, Li H, Haase HR, Bartold PM. Expression of bone associated macromolecules by gingival and periodontal ligament fibroblasts. J Periodontal Res. 2001;36:131-41.

74. Park JC, Kim YB, Kim HJ, Jang HS, Kim HS, Kim BO and Han KY. Isolation and Characterization of Cultured Human Periodontal Ligament Fibroblast-Specific cDNAs Biochemical and Biophysical Research Communications 2001;282:1145–1153.

75. Hatakeyama J ,Tamai R, Sugiyama A, Akashi S, Sugawara S and Takada H. Contrasting responses of human gingival and periodontal ligament fibroblasts to bacterial cell- surface components trough the CD14/Toll- like receptor system. Oral Microbiol Immunol 2003;18:14-23

76. Wang PL, Azuma Y, Shinohara M, and Ohura K Toll-like Receptor 4-Mediated Signal Pathway Induced by *Porphyromonas gingivalis* Lipopolysaccharide in Human Gingival Fibroblasts Biochemical and Biophysical Research Communications 2000;273:1161–1167.

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	รุ่งทิวา ปันป่า
วัน เดือน ปีเกิด	29 ตุลาคม 2523
สถานที่เกิด	จังหวัดเชียงใหม่
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	832/112 รัชดาซิตี้ 18 คอนโด ซอยอยู่เจริญ 29 แขวงสามเสนนอก เขตห้วยขวาง กรุงเทพมหานคร 10320
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	อาจารย์
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	ภาควิชาทันตกรรมอนุรักษ์และทันตกรรมประดิษฐ์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2542	มัธยมศึกษาตอนปลาย จากโรงเรียนมงฟอร์ตวิทยาลัย จังหวัดเชียงใหม่
พ.ศ. 2547	ทันตแพทยศาสตรบัณฑิต จากคณะทันตแทพยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
พ.ศ. 2551	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาปริทันตวิทยา จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ