

การแสดงออกของพาร์-2 ในเซลล์เอ็นดีพรีพันต์ของมนุษย์เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อก่อโรคพรีพันต์

ปริญญาานิพนธ์

ของ

ศรินทิพย์ อังสุโกไคย

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาปริพันต์วิทยา

พฤษภาคม 2550

การแสดงออกของพาร์-2 ในเซลล์เอ็นดีพรีพันต์ของมนุษย์เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อก่อโรคพรีพันต์

ปริญญาานิพนธ์

ของ

ศรินทิพย์ อังสุโกไคย

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาปริทันต์วิทยา

พฤษภาคม 2550

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การแสดงออกของพาร์-2 ในเซลล์เอ็นดีบริพันต์ของมนุษย์เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อก่อโรคปริทันต์

ของ

ศรินทิพย์ อังศุโกไคย

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาปริทันตวิทยา

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เพ็ญศิริ จีระเดชากุล)

วันที่.....เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2550

คณะกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

.....ประธาน

.....ประธาน

(รองศาสตราจารย์ ทพ.ดร.ณรงค์ศักดิ์ เหล่าศรีสิน)

(รองศาสตราจารย์ ทญ.ทิพาพร วงศ์สุรสิทธิ์)

.....กรรมการ

.....กรรมการ

(อาจารย์ ทญ.ดร.สิริลักษณ์ ตีรณธนากุล)

(รองศาสตราจารย์ ทพ.ดร.ณรงค์ศักดิ์ เหล่าศรีสิน)

.....กรรมการ

(อาจารย์ ทญ.ดร.สิริลักษณ์ ตีรณธนากุล)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ทญ.ดร.นวรรตน์ วราห์ศวปติ เจริญ)

## ประกาศคุณูปการ

ปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความช่วยเหลือและคำแนะนำอย่างดียิ่งจากคณาจารย์หลายท่าน ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร.ณรงค์ศักดิ์ เหล่าศรีสิน ประธานควบคุมปริญญาานิพนธ์ และอาจารย์ทันตแพทย์หญิง ดร.สิริลักษณ์ ตีรณธนากุล กรรมการควบคุมปริญญาานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำแนวทาง ข้อมูลและข้อคิดเห็นต่างๆ ที่มีประโยชน์ต่อการทำวิจัยในครั้งนี้ด้วยดีตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ทิพาพร วงศ์สุรสิทธิ์, รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง เพ็ญพรรณ เลหาพันธุ์ และรองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.นวรรตน์ วราห์ศวปติ เจริญ ที่กรุณาช่วยเป็นกรรมการสอบเค้าโครงและสอบปากเปล่าปริญญาานิพนธ์ ตลอดจนให้คำแนะนำและข้อเสนอแนะต่างๆ ของการวิจัยรวมทั้งให้ความกรุณาตรวจแก้ไขปริญญาานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทันตแพทย์หญิง ดร.นิรดา ธเนศวร, อาจารย์ ดร.ดวงพร ศรีสุภาพ ที่กรุณาแนะนำและเอื้อเฟื้อวัสดุและอุปกรณ์ต่างๆ ในการทำวิจัย และอาจารย์ ทันตแพทย์ อเนก ชยสดมภ์ สำหรับส่วนสกัดเซลล์แตกพอรีไฟโรโมแนสจิงจิवालีส สายพันธุ์ ATCC33277

ขอขอบคุณทันตแพทย์หญิงกนิษฐีย์ นันทเสนีย์ และทันตแพทย์พลภัทร จรัสชัยวรรณานา ที่เอื้อเฟื้อวัสดุและอุปกรณ์ต่างๆ ในการทำวิจัย

และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาไอศฐวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ทุกท่านที่ให้การช่วยเหลือและให้คำแนะนำเป็นอย่างดี

ท้ายที่สุดนี้ผู้วิจัยใคร่ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ผู้เป็นที่รักยิ่ง ที่ให้การสนับสนุนและคอยให้กำลังใจจนสำเร็จการศึกษา

ศรินทิพย์ อังศุโกไคย

# สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง.....	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	4
ความสำคัญของการวิจัย.....	4
กรอบแนวคิดของการวิจัย.....	5
สมมติฐานในการวิจัย.....	6
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	7
โรคปริทันต์และแบคทีเรียก่อโรค.....	7
บทบาทของพอร์ไฟโรโมแนสจึงจิวัลิสกับโรคปริทันต์อักเสบ.....	11
ปัจจัยก่อโรคของพอร์ไฟโรโมแนสจึงจิวัลิส.....	15
บทบาทของแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์กับโรคปริทันต์อักเสบ.....	22
ปัจจัยก่อโรคของแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์.....	27
พาร์: คุณสมบัติและหน้าที่.....	31
บทบาทของพาร์-2 และกระบวนการอักเสบ.....	34
บทบาทของพาร์-2 ในโรคปริทันต์อักเสบ.....	34
สารหลังจากแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์ที่มีผลต่อเนื้อเยื่อปริทันต์.....	37
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	39
การกำหนดกลุ่มตัวอย่าง.....	39
การสร้างเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	40
วิธีการวิจัย.....	41
วิเคราะห์ข้อมูล.....	49

## สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 ผลการวิจัย.....	50
การแสดงออกของพาร์-2 ในเซลล์เอ็นดีคปริทันต์และเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือก ในสภาวะที่ไม่ได้รับการกระตุ้น.....	50
การทดสอบความเป็นพิษของส่วนลอยส่วนลอยจากแอคติโนแบซิลัสแอคติโน มายซิเทมโคมิแทนส์และส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวัลิส.....	51
การแสดงออกของพาร์-2 เมื่อกระตุ้นเซลล์เอ็นดีคปริทันต์ของมนุษย์ด้วยส่วนลอย จากแอคติโนแบซิลัสแอคติโนมายซิเทมโคมิแทนส์.....	52
การแสดงออกของพาร์-2 เมื่อกระตุ้นเซลล์เอ็นดีคปริทันต์ของมนุษย์ด้วยส่วน สกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวัลิส.....	56
5 อภิปรายผลและบทสรุป.....	60
อภิปรายผล.....	60
บทสรุป.....	64
บรรณานุกรม.....	66
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	83

## บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 แบบที่เรียชชนิดต่างๆ ที่มีความสัมพันธ์กับโรคปริทันต์และบริเวณที่มี อวัยวะปริทันต์ที่สมบูรณ์.....	10
2 แสดงเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มพอร์ไฟโรโมแนส.....	12
3 แสดงปัจจัยก่อโรคที่ผลิตโดยพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालิส.....	14
4 แสดงการศึกษาพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालิส โดยแบ่งตามซีโรไทป์.....	16
5 แสดงปัจจัยก่อโรคของ แอคติโนแบซิลัสแอคติโนมายซิเทมโคมิแทนส์.....	28
6 แสดงสมาชิกของพาร์ เอ็นไซม์ที่กระตุ้นการทำงานและยับยั้งการทำงาน ตำแหน่งที่ถูกเอ็นไซม์ตัด รวมทั้งบริเวณและบทบาทของพาร์.....	33

# บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 แสดงโคโลนีของพอร์ไฟโรโมแนสจึงจิตัวลิสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ และลักษณะรูปร่างของเชื้อเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน.....	13
2 แสดงลักษณะของโคโลนีและลักษณะรูปร่างของแอกติโนแบซิลัส แอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์.....	24
3 แสดงโครงสร้างและหน้าที่ของโดเมนที่เป็นส่วนประกอบของพาร์.....	32
4 แสดงเอ็นไซม์ที่กระตุ้นกลไกการทำงานของพาร์-2 .....	35
5 ความเป็นไปได้ในการมีส่วนร่วมของพาร์-2 ในการเกิดโรคปริทันต์อักเสบ.....	36
6 การแสดงออกของพาร์-2 ในเซลล์เอ็นอีดีปริทันต์และเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกของมนุษย์ ที่ปราศจากการกระตุ้น.....	50
7 กราฟเส้นแสดงผลการทดสอบระดับความเป็นพิษของส่วนลอยจากแอกติโนแบซิลัสแอกติ โนมายซิเทมโคมิแทนส์.....	51
8 กราฟเส้นแสดงผลการทดสอบระดับความเป็นพิษของส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนส จึงจิตัวลิส.....	52
9 การแสดงออกของยีนพาร์-2 ในระดับเมซเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอ ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธีอาร์ที-พีซีอาร์ เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยส่วนลอยจากแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์.....	52
10 แผนภูมิแท่งและกราฟเส้นแสดงร้อยละของความเข้มข้นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของ กลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยส่วนลอยจากแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์....	54
11 แสดงการตรวจพบโปรตีนพาร์-2 ในเซลล์ที่ทำให้แตก ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธีเวสเทิร์นบลอต ภายหลังกระตุ้นด้วยส่วนลอยจากแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์.....	55
12 การแสดงออกของยีนพาร์-2 ในระดับเมซเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอ ซึ่งวิเคราะห์ด้วย วิธีอาร์ที-พีซีอาร์ เมื่อกระตุ้นด้วยส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนสจึงจิตัวลิส.....	56
13 แผนภูมิแท่งและกราฟเส้นแสดงร้อยละของความเข้มข้นบีเอ็นเอของ กลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนสจึงจิตัวลิส.....	57
14 แสดงการตรวจพบโปรตีนพาร์-2 ในเซลล์ที่ทำให้แตก ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธีเวสเทิร์นบลอต ภายหลังกระตุ้นด้วยส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนสจึงจิตัวลิส.....	59



การแสดงออกของพาร์-2 ในเซลล์เอ็นดีพรีทันต์ของมนุษย์เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อก่อโรคพรีทันต์

บทคัดย่อ

ของ

ศรินทิพย์ อังสุโกไคย

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพรีทันต์วิทยา

พฤษภาคม 2550

ศรินทิพย์ อังสุโกไคย. (2550). การแสดงออกของพาร์-2 ในเซลล์เอ็นดีปรีทนต์ของมนุษย์เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อก่อโรคปริทันต์. ปริญญาานิพนธ์ วท.ม.(ปริทันตวิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม: รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร.ณรงค์ศักดิ์ เหล่าศรีสิน, อาจารย์ทันตแพทย์หญิง ดร.สิริลักษณ์ ตีรณธนากุล.

จากความรู้ที่ว่าเมื่อมีการรุกรานของแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์ ทั้งตัวเชื้อเองและปัจจัยก่อโรคของเชื้อทำให้มีการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ส่งผลให้เซลล์ของร่างกาย หลังสารอักเสบต่างๆ ร่วมทั้งเอ็นไซม์ ซึ่งกระบวนการส่งสัญญาณเพื่อให้เซลล์ตอบสนองต่อการกระตุ้นจากสารภายนอกเซลล์นั้นต้องอาศัยตัวรับจำเพาะที่อยู่บนผิวเซลล์ โดยเฉพาะพาร์-2 (PAR-2) มีการศึกษาพบว่ามีความสำคัญเกี่ยวข้องกับการอักเสบโดยเป็นตัวรับจำเพาะบนผิวเซลล์ที่เริ่มต้นให้มีการตอบสนองของการอักเสบ แล้วส่งผลให้มีการทำลายของเนื้อเยื่อปริทันต์และมีการละลายกระดูกเข้ากันได้ อีกทั้ง ยังไม่เคยมีการศึกษาบทบาทของพาร์-2 กับเซลล์เอ็นดีปรีทนต์ของมนุษย์

**วัตถุประสงค์** เพื่อศึกษาการแสดงออกของพาร์-2 ในเซลล์เอ็นดีปรีทนต์ของมนุษย์ทั้งในสภาวะปกติและหลังจากที่ได้รับการกระตุ้นด้วยส่วนลอยของอาหารเลี้ยงแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมัซิเทมโคมิแทนส์ และส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालิส

**วิธีดำเนินการวิจัย** วิเคราะห์หาพาร์-2 ในระดับเมเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอ ด้วยวิธีพีซีอาร์ และโปรตีนพาร์-2 ด้วยวิธีเวสเทิร์นบลอต ในเซลล์เอ็นดีปรีทนต์ของมนุษย์ ในสภาพปกติที่ไม่มีการกระตุ้นโดยเทียบกับเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือก และในสภาวะที่ได้รับการกระตุ้นด้วยส่วนลอยของอาหารเลี้ยงแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมัซิเทมโคมิแทนส์ หรือส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालิส ในสภาวะที่เหมาะสมกับแต่ละการกระตุ้น

**ผลการวิจัย** สามารถพบการแสดงออกของพาร์-2 ทั้งในระดับเมเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอและโปรตีนพาร์-2 ในเซลล์เอ็นดีปรีทนต์ของมนุษย์ในสภาวะปกติที่ไม่มีการกระตุ้นใดๆ และเมื่อกระตุ้นเซลล์เอ็นดีปรีทนต์ของมนุษย์ด้วยส่วนลอยจากแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมัซิเทมโคมิแทนส์จะพบการแสดงออกของพาร์-2 มีระดับเพิ่มขึ้นตามสัดส่วนที่เพิ่มขึ้นของการกระตุ้น ขณะที่ส่วนสกัดเซลล์แตกพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालิสนั้นการแสดงออกของพาร์-2 มีระดับลดลง

**บทสรุป** การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเซลล์เอ็นดีปรีทนต์ของมนุษย์สามารถพบการแสดงออกของพาร์-2 ได้เหมือนกับเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือก อีกทั้งเป็นไปได้ว่าเซลล์เอ็นดีปรีทนต์ของมนุษย์ เมื่อถูกกระตุ้นด้วยส่วนลอยจากแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมัซิเทมโคมิแทนส์ ได้อาศัยกลไกการส่งสัญญาณผ่านทางพาร์-2 ในขณะที่ถ้าถูกกระตุ้นด้วยส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालิส ดูเหมือนว่าจะไม่ได้ใช้การส่งสัญญาณผ่านทางพาร์-2

EXPRESSION OF PAR-2 IN HUMAN PERIODONTAL LIGAMENT CELLS ACTIVATED BY  
PERIODONTOPATHIC BACTERIA

AN ABSTRACT

BY

SARINTHIP ANGSUPOKAI

Presented in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Master of Science Degree in Periodontology  
at Srinakharinwirot University

May 2007

Sarinthip Angsupokai. (2007). *Expression of PAR-2 in Human Periodontal Ligament Cells Activated by Periodontopathic Bacteria*. Master thesis, M.S. (Periodontology). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Assoc. Prof. Dr. Narongsak Laosrisin, Dr. Siriluk Tiranathanagul.

Periodontopathic bacteria or its virulence factors play the role in human immune response via the mechanism of inflammatory mediators releasing by the host cell. For this process, the specific cell surface receptor is always required for the intracellular signal transduction in order to activate cell function. Protease activated receptor-2 (PAR-2) was found to be one of the receptor that related to the inflammation and destruction of periodontal tissue. However, the role of PAR-2 in stimulating human periodontal ligament (HPDL) cells are still unclear and need to be clarified.

**Objectives** : The expression of PAR-2 in HPDL cells both in normal condition and after stimulated by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*Aa*) culture supernatant and sonicated extract of *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) were investigated.

**Materials and Methods** : In normal condition, the expression of human gingival fibroblasts was also performed to compare as positive control. After stimulated by *Aa* culture supernatant and sonicated extract of *Pg*, both mRNA and protein PAR-2 expression in HPDL cells were analyzed by using RT-PCR technique and Western blotting analysis compare to each negative control.

**Results** : The expression of PAR-2 mRNA and protein level in HPDL cells were shown in both non-stimulating and after stimulated conditions. After stimulated by *Aa* culture supernatant, PAR-2 expression were increased, In contrast, the expression after stimulated by sonicated extract of *Pg* were decreased.

**Conclusions** : From this study, the expression of PAR-2 could be found in HPDL cells as well as gingival fibroblasts. There is a possibility that HPDL cells may be activated by *Aa* culture supernatant via PAR-2, not via this receptor when activated by sonicated extract of *Pg*.

# บทที่ 1

## บทนำ

### ภูมิหลัง

โรคปริทันต์ (periodontal disease) เป็นโรคติดเชื้อที่มีการอักเสบแบบเรื้อรัง โดยพบว่ามีการทำลายของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) และกระดูกเบ้าฟัน (alveolar bone) ซึ่งนำไปสู่การสูญเสียของอวัยวะที่รองรับฟันและนำไปสู่การสูญเสียฟันในที่สุด การศึกษามากมายเน้นให้เห็นความสำคัญของปัจจัยด้านเชื้อก่อโรค (pathogenic microbial factor) ต่อพยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์ โรคปริทันต์ที่มีการทำลายอวัยวะปริทันต์จนเกิดลักษณะของร่องลึกปริทันต์ (periodontal pocket) ขึ้นนั้น เรียกว่าโรคปริทันต์อักเสบ (periodontitis) สาเหตุหลักของโรคปริทันต์อักเสบ คือ เชื้อก่อโรคที่อยู่ในคราบจุลินทรีย์ ซึ่งสะสมอยู่บนตัวฟันบริเวณขอบเหงือก เชื้อก่อโรคและสารที่หลังจากเชื้อเหล่านี้เช่น ไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharides; LPS) และเอ็นไซม์ต่างๆ จะแทรกซึมเข้าไปยังอวัยวะปริทันต์ ก่อให้เกิดการอักเสบและการทำลายอวัยวะปริทันต์ รวมถึงการทำลายกระดูกเบ้าฟัน<sup>(1-6)</sup> เชื้อก่อโรคส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียชนิดแกรมลบที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต (gram-negative anaerobic bacteria)<sup>(5, 7-8)</sup> แบคทีเรียที่สำคัญและมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคปริทันต์อักเสบคือ แอคติโนแบซิลลัส แอคติโนมายซิเทมโคมิแทนส์ (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*; Aa) พอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวาลิส (*Porphyromonas gingivalis*; Pg) แทนเนอเรลลาฟอร์ซียเทนซิส (*Tannerella forsythensis*; Tf)<sup>(7)</sup>

การศึกษาในระยะต่อมาบ่งชี้ถึงความสัมพันธ์ระหว่างพยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์อักเสบกับปัจจัยทางระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (host immune response) การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อก่อโรคปริทันต์หรือต่อสารหลังจากเชื้อ เป็นอีกสาเหตุหนึ่งซึ่งก่อให้เกิดการอักเสบ และการทำลายอวัยวะปริทันต์<sup>(9-10)</sup> บทบาทของแบคทีเรียชนิดแกรมลบที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโตซึ่งเป็นสาเหตุและก่อให้เกิดพยาธิสภาพของโรคปริทันต์นั้นมีการศึกษาอย่างมากมาย<sup>(11-13)</sup> และแบคทีเรียชนิดแกรมลบที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโตที่สำคัญที่กล่าวถึงในงานวิจัยนี้ คือ พอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวาลิส และ แอคติโนแบซิลลัสแอคติโนมายซิเทมโคมิแทนส์

พอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวาลิส เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคปริทันต์อักเสบแบบเรื้อรัง (chronic periodontitis) และมีความรุนแรงในผู้ใหญ่ โดยพบว่าเชื้อชนิดนี้มีความสัมพันธ์อย่างมากกับการวัดผลทางคลินิก โดยเฉพาะ ความลึกของร่องลึกปริทันต์ และการมีเลือดออกขณะวัดร่องลึกปริทันต์ (bleeding on probing) ส่วนแอคติโนแบซิลลัสแอคติโนมายซิเทมโคมิแทนส์ เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญกับการเกิดโรคปริทันต์อักเสบแบบรุกราน (aggressive periodontitis)<sup>(14)</sup> นอกจากนี้ยัง

พบว่ามีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคปริทันต์อักเสบอย่างรุนแรง (severe periodontitis) ในวัยรุ่นและผู้ใหญ่<sup>(15-17)</sup> ปัจจัยก่อโรคของแบคทีเรียทั้งสองชนิดพบได้ทั้งที่เซลล์ของแบคทีเรียและที่แบคทีเรียหลั่งออกมาซึ่งก่อให้เกิดการทำลายอวัยวะปริทันต์มีอยู่หลายชนิดโดยปัจจัยก่อโรคของพอร์ไฟโรโมนเนสจิจิวาลิส ได้แก่ ฟิมเบรีย (fimbriae) แคปซูลาร์โพลีแซคคาไรด์ (capsular polysaccharide) ฮีแมกกลูตินิน (hemagglutinins) เอนไซม์ (enzymes) โปรตีนแอนติเจน (protein antigens)<sup>(18)</sup> และปัจจัยก่อโรคของแอคติโนแบซิลัสแอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ เช่น ลิวโคทอกซิน (leukotoxin)<sup>(19)</sup> โพลีมอร์ฟนิวเคลียร์ลิวโคไซด์คีโมแทกซิสอินฮิบิติงแฟกเตอร์ (polymorphonuclear leukocyte chemotaxis-inhibiting factor)<sup>(20)</sup> ลิมโฟไซตส์ซัพเพรสซิงแฟกเตอร์ (lymphocyte-suppressing factor)<sup>(21)</sup> และไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharides)<sup>(22)</sup> ซึ่งปัจจัยก่อโรคเหล่านี้มีผลต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ทำให้มีการผลิตไซโตไคน์ (cytokine) และหลังสารต่างๆ ได้แก่ โพรสตาแกลนดิน (prostaglandins; PG) อินเตอร์ลิวคิน (interleukins; IL) ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ (tumornecrosis factor; TNF) จากเซลล์ของร่างกายที่อยู่บริเวณที่มีการอักเสบ เช่น โมโนไซต์ (monocyte) มาโครฟาจ (macrophage) และไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) ซึ่งสารสื่ออักเสบ (inflammatory mediators) เหล่านี้มีคุณสมบัติทางชีวภาพที่ส่งผลกระทบต่อเซลล์เป้าหมาย (target cells) หลายชนิด โดยก่อนที่เซลล์ของร่างกายจะผลิตและหลั่งสารต่างๆ ออกมานั้น ต้องมีการส่งสัญญาณ (signal transduction) จากการกระตุ้นด้วยสารภายนอกเซลล์ ได้แก่ ปัจจัยก่อโรคจากแบคทีเรีย ไซโตไคน์ โพลีเปปไทด์ โกรทแฟกเตอร์ ผ่านเข้าสู่เซลล์โดยอาศัยการควบคุมจากโมเลกุลที่อยู่บนผิวเซลล์ เช่น ตัวรับจำเพาะบนผิวเซลล์ (cell surface receptors) จากนั้นต้องอาศัยตัวรับจำเพาะตัวถัดไป (second-messenger) เพื่อทำหน้าที่ส่งสัญญาณ (signal cascade) แล้วส่งผลให้มีการตอบสนองต่อสารกระตุ้นดังกล่าวข้างต้น ดังนั้นตัวรับจำเพาะบนผิวเซลล์จึงเป็นตัวเริ่มต้นในการส่งสัญญาณให้กับเซลล์ของร่างกาย โดยตัวรับจำเพาะบนผิวเซลล์ที่สำคัญชนิดหนึ่งคือ โปรตีเอสแอคติเวเตดรีเซพเตอร์ (protease-activated receptors) หรือเรียกว่า พาร์ (PARs)

มีการรายงานการศึกษาว่าพาร์เป็นสมาชิกในกลุ่มของจีโปรตีนลิงคิงรีเซพเตอร์ (G-protein-linked receptors) การกระตุ้นการทำงานของพาร์นั้นเกิดขึ้นโดยเอ็นไซม์โปรตีเอสซึ่งเป็นเอ็นไซม์ที่มาจากระบบไหลเวียนโลหิต เซลล์อักเสบ เซลล์เยื่อเมือก และจากแบคทีเรีย ย่อยสลายโปรตีน (preteolytic) ทำให้มีการตัดสายโมเลกุลของกรดอะมิโนที่บริเวณเอ็นเทอร์มินอลโดเมน (N-terminal domain) เป็นผลให้เกิดการแสดงออกของลำดับโมเลกุลของกรดอะมิโนที่เรียก เทอแธร์ไลแกนด (tethered ligand) ซึ่งสามารถทำให้พาร์ทำหน้าที่ได้<sup>(23)</sup> พาร์มีสมาชิก 4 ชนิด ที่เคยได้รับการลอกแบบ (clone) ออกมา ได้แก่ พาร์-1 พาร์-2 พาร์-3 พาร์-4 (PAR<sub>1</sub>, PAR<sub>2</sub>, PAR<sub>3</sub>, PAR<sub>4</sub>) โดยทริอมบินสามารถกระตุ้นการทำงานของ พาร์-1 พาร์-3 พาร์-4 ขณะที่ พาร์-2 นั้นจะได้รับการกระตุ้นให้สามารถทำหน้าที่

ได้ต้องอาศัยทริปซิน (trypsin) มาสต์เซลล์ทริปเตส (mast cell trypsin) นิวโทรฟิลโปรตีนเนส 3 (neutrophil proteinase 3) ติชชูแฟกเตอร์ (tissue factor) และโปรตีเอสที่หลังหรือผลิตจากพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวาลิส<sup>(24-25)</sup> แม้ว่าลักษณะทางโครงสร้างและกลไกของการกระตุ้นการทำงานของพาร์แต่ละชนิดจะเหมือนกันแต่การทำงานและตำแหน่งของเนื้อเยื่อที่พบมีความแตกต่างกัน โดยพาร์-1 ได้ที่เกล็ดเลือด (platelets) ของมนุษย์ เยื่อบุหลอดเลือด (endothelium) เยื่อบุผิว (epithelium) เซลล์สร้างเส้นใย (fibroblast) เซลล์ของเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ (myocytes) เซลล์ประสาท (neurons) และเซลล์รูปดาว (astrocytes) ที่อยู่ในเนื้อเยื่อที่เป็นส่วนยึดค้ำของระบบประสาท มีบทบาทในการสะสมเมทริกซ์ในหลอดเลือดภายหลังการเกิดบาดแผล พาร์-3 และพาร์-4 พบได้ที่เกล็ดเลือด เยื่อบุหลอดเลือด เซลล์ของเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ และเซลล์รูปดาว มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการสร้างก้อนเลือด (thrombus) และการเกิดก้อนเลือดอุดตันในปอด (pulmonary embolism)<sup>(23)</sup> ส่วนพาร์-2 นั้นพบได้ทุกส่วนของร่างกาย โดยเฉพาะพบในเยื่อบุผิว เยื่อบุหลอดเลือด เซลล์สร้างเส้นใย เซลล์สร้างกระดูก (osteoblasts) เซลล์เม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิล (neutrophils) เซลล์ของเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ เซลล์ประสาท และเซลล์รูปดาว<sup>(26-27)</sup> ในทางปริทันต์สามารถพบพาร์-2 ที่เซลล์เยื่อบุผิวช่องปาก (oral epithelial cells) และเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือก (gingival fibroblasts)<sup>(28)</sup> แต่ยังไม่พบว่ามีการศึกษาบทบาทของพาร์-2 ที่เซลล์เอ็นยึดปริทันต์ของมนุษย์ มีการศึกษาพบว่าบทบาทของพาร์-2 มีความเกี่ยวข้องกับพยาธิวิทยาของการเกิดโรคโดยเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของเม็ดเลือดขาวผ่านผนังหลอดเลือด (leukocyte migration) การอักเสบของข้อต่อ ผิวหนัง และไต รวมถึงการอักเสบที่เกี่ยวกับโรคภูมิแพ้ของทางเดินหายใจ นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถทำให้หลอดเลือดผ่อนคลาย (blood vessel relaxation) ความดันโลหิตต่ำ (hypotension) เพิ่มความสามารถในการซึมผ่านสารของหลอดเลือด (vascular permeability) ทำให้มีการแทรกซึมของแกรนูโลไซต์ (granulocyte infiltration)<sup>(29-30)</sup> แม้ว่าจะมีการศึกษาบทบาทของพาร์-2 ในสาขาอื่นๆเป็นจำนวนมาก เช่น มีการศึกษาหน้าที่และกลไกการทำงานของพาร์-2 ในกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดมนุษย์<sup>(31)</sup> และพบว่าทริปซินสามารถกระตุ้นการทำงานของพาร์-2 แล้วส่งผลให้เซลล์มะเร็งตับมีการเพิ่มจำนวนขึ้น (proliferation)<sup>(32)</sup> นอกจากนี้ยังพบว่าการกระตุ้นการทำงานของพาร์-2 จะทำให้เซลล์เยื่อบุมดลูกมีการเพิ่มจำนวนและกระตุ้นให้มีการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-6 และอินเตอร์ลิวคิน-8<sup>(33)</sup> แต่ทางปริทันต์วิทยายังพบไม่มาก ซึ่งมีการศึกษาในหนูทดลองพบว่า พาร์-2 เป็นสาเหตุให้เกิดโรคปริทันต์อักเสบผ่านทางกลไกที่เกี่ยวข้องกับการหลั่งโพรสตาแกลนดิน (prostaglandin) และการกระตุ้นการทำงานของเอ็มเอ็มพี-2 และเอ็มเอ็มพี-9<sup>(28)</sup> ส่วนในห้องทดลองพบว่าพาร์-2 มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการอักเสบและการละลายกระดูกที่พบในโรคปริทันต์อักเสบ โดยพบว่าจิงจิวาลิน (gingipain) ที่สกัดจากพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวาลิสสามารถ กระตุ้นการทำงานของพาร์-2 ที่อยู่บนผิวเซลล์เยื่อบุช่องปาก แล้วทำให้มีการหลั่งของสารอักเสบคือ อินเตอร์ลิวคิน-6 (IL-6) ซึ่งทำให้มีการละลายกระดูก<sup>(25)</sup> นอกจากนี้ยัง

พบว่า เปปไทด์ที่ได้จากการสังเคราะห์ (synthetic PAR<sub>2</sub> agonist peptide) สามารถกระตุ้นการทำงานของพาร์-2 ที่อยู่บนผิวเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือก ให้ผลิตอินเตอรฺลิวคิน-8 (IL-8) และยังสามารถกระตุ้นการทำงานของ เอ็มเอ็มพี (matrix metalloproteinases; MMPs)<sup>(27)</sup> ซึ่งเอ็มเอ็มพีเป็นเอ็นไซม์ที่เมื่อมีการผลิตและหลั่งออกมาปริมาณมากในเนื้อเยื่อจะเหนี่ยวนำให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและเกิดการละลายกระดูกเบ้าฟันอย่างกว้างขวางและเร็วขึ้น<sup>(9, 34-35)</sup>

จากการศึกษาดังกล่าวข้างต้นจึงทำให้ผู้วิจัยเล็งเห็นว่าบทบาทของพาร์-2 น่าจะมีความสำคัญเกี่ยวข้องและเป็นตัวรับจำเพาะเริ่มต้นในการเกิดโรคปริทันต์อักเสบ ซึ่งทำให้เกิดการทำลายของอวัยวะปริทันต์และทำให้มีการทำลายของกระดูกเบ้าฟัน โดยผู้วิจัยได้ตั้งสมมุติฐานว่าเซลล์เอ็นยัดปริทันต์ของมนุษย์จะพบการแสดงออกของพาร์-2 ด้วย และระดับการแสดงออกของพาร์-2 จะเพิ่มขึ้นเมื่อกระตุ้นด้วยส่วนล่อยของอาหารเลี้ยงแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมัชชีเทมโคมิแทนส์ (*Actinobacillus actinomycetemcomitans* culture supernatant) หรือส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมนเนสจิงจิวาลิส (sonicate extracts of *Porphyromonas gingivalis*) ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงศึกษาการแสดงออกของพาร์-2 เมื่อกระตุ้นเซลล์เอ็นยัดปริทันต์ของมนุษย์ด้วยส่วนล่อยของอาหารเลี้ยงแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมัชชีเทมโคมิแทนส์ และส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมนเนสจิงจิวาลิส ซึ่งผลจากการวิจัยที่ได้คาดว่าจะเป็ข้อมูลที่มีประโยชน์ต่อการทำวิจัยต่อไปในอนาคต

## ความมุ่งหมายของการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้ตั้งความมุ่งหมายไว้ดังนี้

เพื่อศึกษาการแสดงออกของพาร์-2 ในเซลล์เอ็นยัดปริทันต์ของมนุษย์ทั้งในสภาวะปกติและหลังจากที่ได้รับการกระตุ้นด้วยส่วนล่อยของอาหารเลี้ยงแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมัชชีเทมโคมิแทนส์ และส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมนเนสจิงจิวาลิส

## ความสำคัญของการวิจัย

โรคปริทันต์อักเสบเป็นโรคติดเชื้อแบบเรื้อรังมีการทำลายอวัยวะปริทันต์ กระบวนการอักเสบที่เกิดขึ้นจะลุกลามไปยังส่วนของเหงือก (gingiva) เอ็นยัดปริทันต์ (periodontal ligament) และกระดูกเบ้าฟัน จนก่อให้เกิดการทำลายของกระดูกเบ้าฟัน ฟันโยก และนำไปสู่การสูญเสียฟันในที่สุด ปัจจัยที่ก่อให้เกิดโรคปริทันต์อักเสบนั้นเกิดได้จากหลายปัจจัยร่วมกัน เช่น พฤติกรรมในการรักษาสุขภาพช่องปาก พันธุกรรม สภาวะแวดล้อมภายในช่องปาก ปัจจัยที่สำคัญ คือ แบคทีเรียก่อโรค ได้แก่ พอร์ไฟโรโมนเนสจิงจิวาลิส และแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมัชชีเทมโคมิแทนส์ ซึ่งทั้งตัวเชื้อเองและปัจจัยก่อโรค สามารถทำให้เกิดการอักเสบ อย่างไรก็ตามการทำลายอวัยวะปริทันต์ยังเกี่ยวข้องกับความ

สมดุลระหว่างระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายและแบคทีเรียก่อโรค โดยเมื่อมีการรุกรานของแบคทีเรียซึ่งส่งผลให้มีการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อแบคทีเรีย ทำให้มีการผลิตไซโตไคน์ (cytokine) และหลั่งสารอักเสบต่างๆ ออกมาจากเซลล์ของร่างกายที่อยู่บริเวณที่มีการอักเสบ ซึ่งกระบวนการดังกล่าวนี้จะต้องผ่านการควบคุมจากโมเลกุลที่อยู่บนผิวเซลล์ และหนึ่งในโมเลกุลที่อยู่บนผิวเซลล์ที่มีความสำคัญคือ ตัวรับจำเพาะบนผิวเซลล์

มีการรวบรวมการศึกษาพาร์-2 ซึ่งเป็นตัวรับจำเพาะบนผิวเซลล์มีความเกี่ยวข้องกับการอักเสบและอาจเป็นไปได้ที่จะเป็นสื่อทำให้เกิดโรคปริทันต์อักเสบ<sup>(36)</sup> โดยเมื่อพาร์-2 ได้รับการกระตุ้นจะเป็นตัวเริ่มต้นของการส่งสัญญาณทำให้เซลล์ของร่างกายปล่อยไซโตไคน์และสารอักเสบต่างๆ ได้แก่ อินเตอร์ลิวคิน และทูเมอร์เนโครซิสแฟคเตอร์ (TNF) รวมทั้งเอ็มเอ็มพี<sup>(25, 27)</sup> ซึ่งสารเหล่านี้ก่อให้เกิดการทำลายของอวัยวะปริทันต์และละลายกระดูกเบ้าฟัน และมีการศึกษาว่า พอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวาลิส และ แอคติโนแบซิลัสแอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ เป็นแบคทีเรียชนิดแกรมลบที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต โดยพบว่าพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวาลิส มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคปริทันต์อักเสบแบบเรื้อรัง ส่วนแอคติโนแบซิลัสแอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคปริทันต์อักเสบทั้งโรคปริทันต์อักเสบแบบรุกรานและโรคปริทันต์อักเสบแบบเรื้อรัง มีผลทำให้มีการทำลายอวัยวะปริทันต์อย่างรวดเร็ว ด้วยเหตุผลนี้การทำวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาเพื่อศึกษาการแสดงออกของพาร์-2 ในเซลล์เอ็นอีดีปริทันต์ของมนุษย์ทั้งในสภาวะปกติและหลังจากที่ได้รับการกระตุ้นด้วยส่วนย่อยของอาหารเลี้ยงแอคติโนแบซิลัสแอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ และส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวาลิส

## นิยามศัพท์เฉพาะ

1. protease-activated receptor-2
2. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*
3. *Porphyromonas gingivalis*
4. periodontitis
5. inflammation

## กรอบแนวคิดในการทำวิจัย

เนื่องจากโรคปริทันต์อักเสบเป็นโรคติดเชื้อเรื้อรังซึ่งส่งผลทำให้มีการทำลายอวัยวะปริทันต์ มีการศึกษาพบว่า การเกิดโรคปริทันต์อักเสบนั้นต้องอาศัยปัจจัยหลายอย่างร่วมกัน แต่ที่สำคัญคือเชื้อก่อโรค พอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวาลิส และ แอคติโนแบซิลัสแอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ เป็นแบคทีเรียแกรม

ลบที่ไม่ต้องใช้ใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโต ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคปริทันต์อักเสบ ทำให้มีการทำลายอวัยวะปริทันต์อย่างรวดเร็วและรุนแรง เมื่อมีการรุกรานของแบคทีเรียดังกล่าว ทั้งตัวเชื้อเองและปัจจัยก่อโรคของเชื้อทำให้มีการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ส่งผลให้เซลล์ของร่างกายหลังสารอักเสบต่างๆ รวมทั้งเอ็นไซม์ ซึ่งกระบวนการส่งสัญญาณเพื่อให้เซลล์ตอบสนองต่อการกระตุ้นจากสารภายนอกเซลล์นั้นต้องอาศัยตัวรับจำเพาะที่อยู่บนผิวเซลล์ โดยเฉพาะตัวรับพาร์-2 ซึ่งมีการศึกษาพบว่ามีความสำคัญเกี่ยวข้องกับการอักเสบโดยเป็นตัวรับจำเพาะบนผิวเซลล์ที่เริ่มต้นให้มีการตอบสนองของการอักเสบ นอกจากนี้การศึกษาบทบาทของตัวรับพาร์-2 ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคปริทันต์อักเสบนั้นมีไม่มาก รวมทั้งยังไม่มีการศึกษาบทบาทของตัวรับพาร์-2 กับเซลล์เอ็นยิตปริทันต์ของมนุษย์ ผู้วิจัยเล็งเห็นว่าถ้าปัจจัยก่อโรคของเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เอ็นยิตปริทันต์ของมนุษย์ผลิตพาร์-2 เป็นจำนวนมาก เมื่อพาร์-2 ได้รับการกระตุ้นจะส่งผลให้เซลล์มีการตอบสนองโดยหลังสารอักเสบต่างๆ ออกมา ซึ่งส่งผลให้มีการทำลายของอวัยวะปริทันต์และละลายกระดูกเบ้าฟันได้ ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาการแสดงออกของพาร์-2 ในเซลล์เอ็นยิตปริทันต์ของมนุษย์ทั้งในสภาวะปกติและหลังจากที่ได้รับการกระตุ้นด้วยส่วนล่อยของอาหารเลี้ยงแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์ และส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมนเนสจิงจิवालิส เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษากลไกของการก่อโรคปริทันต์อักเสบ ซึ่งนำไปสู่การคิดค้นวิธีการยับยั้งและป้องกันการก่อโรคซึ่งเป็นกลไกที่ผ่านมาจากพาร์-2

## สมมุติฐานในการวิจัย

เซลล์เอ็นยิตปริทันต์ของมนุษย์จะพบการแสดงออกของพาร์-2 และระดับการแสดงออกของพาร์-2 จะเพิ่มขึ้นเมื่อกระตุ้นด้วยส่วนล่อยของอาหารเลี้ยงแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์ หรือส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมนเนสจิงจิवालิส

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และนำเสนอตามหัวข้อดังต่อไปนี้

1. โรคปริทันต์และแบคทีเรียก่อโรค
2. บทบาทของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालิส กับโรคปริทันต์อักเสบ
3. ปัจจัยก่อโรคของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालิส
4. บทบาทของแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์กับโรคปริทันต์อักเสบ
5. ปัจจัยก่อโรคของแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์
6. พาร์: คุณสมบัติและหน้าที่
7. บทบาทของพาร์-2 และกระบวนการอักเสบ
8. บทบาทของพาร์-2 ในโรคปริทันต์อักเสบ
9. สารหลังจากแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์ ที่มีผลต่อเนื้อเยื่อปริทันต์

### โรคปริทันต์และแบคทีเรียก่อโรค

#### โรคปริทันต์

โรคปริทันต์เป็นโรคติดเชื้อชนิดหนึ่งซึ่งก่อให้เกิดพยาธิสภาพต่ออวัยวะปริทันต์ทำให้มีการอักเสบแบบเรื้อรังและมีผลต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายโดยแสดงออกมาทางคลินิกได้ โรคปริทันต์จะมีผลต่อเหงือก เอ็นยึดปริทันต์ และกระดูกเบ้าฟัน โรคปริทันต์ในความหมายจะรวมถึงโรคเหงือกอักเสบ (gingivitis) และ โรคปริทันต์อักเสบ โรคเหงือกอักเสบเป็นโรคที่มีการอักเสบของเหงือกที่อยู่รอบๆฟัน และเป็นการตอบสนองโดยตรงของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อคราบจุลินทรีย์ที่อยู่บนผิวฟัน ถ้ามีการอักเสบของเหงือก เอ็นยึดปริทันต์ และกระดูกเบ้าฟันซึ่งมีหน้าที่รองรับฟันจนกระทั่งมีการทำลาย จะเรียกโรคปริทันต์นั้นว่าโรคปริทันต์อักเสบ<sup>(37-38)</sup> พบมีการอักเสบรุนแรงซึ่งสัมพันธ์กับการมีการทำลายกระดูกเบ้าฟันและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในอวัยวะปริทันต์ (periodontium) จนนำไปสู่การสูญเสียฟันในที่สุด<sup>(39)</sup> เนื้อเยื่อที่ถูกทำลายนั้นเป็นผลจากการที่เซลล์ของร่างกายที่อยู่บริเวณอวัยวะปริทันต์ที่มีการอักเสบหลังสารอักเสบออกมา ได้แก่ ไซโตไคน์ และ เอ็นไซม์ ปัจจัยเหล่านี้เป็นตัวกระตุ้นให้มีการละลายของกระดูกเบ้าฟัน โดยเฉพาะเอ็นไซม์ โปรตีเอส (proteases) สามารถย่อยเมทริกซ์นอกเซลล์เป็นผลให้เนื้อเยื่อบริเวณที่มีการอักเสบถูกทำลาย<sup>(40-41)</sup>

กระบวนการของการเกิดพยาธิสภาพของโรคปริทันต์อักเสบส่วนใหญ่แล้วเป็นผลมาจากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อแบคทีเรียก่อโรคซึ่งเหนี่ยวนำให้เกิดการทำลายของเนื้อเยื่อ โดยกระบวนการทำลายเริ่มจากแบคทีเรียก่อโรคจากคราบจุลินทรีย์ที่แพร่กระจายเข้าสู่เนื้อเยื่อ ทำให้มีการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย แบคทีเรียในคราบจุลินทรีย์ได้เหงือกของมนุษย์ (human subgingival plaque) มีประมาณ 300 ชนิด และมีไม่กี่ชนิดที่มีบทบาทในการเกิดพยาธิสภาพของโรคปริทันต์<sup>(4)</sup> แม้ว่าแบคทีเรียบางชนิดจะพบได้บางช่วงเวลาแต่ส่วนใหญ่แล้วสามารถพบได้เสมอในคราบจุลินทรีย์<sup>(38)</sup> โดยอยู่ร่วมกันและมีการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมให้เอื้อต่อการดำรงชีวิตแบคทีเรียชนิดต่างๆ เหล่านี้จะอาศัยอยู่ใกล้บริเวณที่มีเลือดมาเลี้ยงมาก ได้แก่ เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือก และเอ็นยึดปริทันต์ แต่พบได้น้อยกว่าแบคทีเรียเหล่านี้เป็นสาเหตุให้มีการติดเชื้อทางระบบ ในผู้ที่มีสุขภาพแข็งแรง ซึ่งเป็นผลมาจากการมีระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายที่ดีที่สามารถป้องกันการรุกรานของแบคทีเรียเข้าสู่เนื้อเยื่อได้<sup>(38)</sup> ในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไปว่า พยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์อักเสบขึ้นอยู่กับความสมดุลระหว่างปัจจัยต่างๆ ทั้งปัจจัยทางด้านแบคทีเรียก่อโรคและปัจจัยทางระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย แบคทีเรียจะมีการปรับตัวให้อยู่รอดและเจริญเติบโตในสภาพแวดล้อมขณะนั้นขณะที่เซลล์ร่างกายมีระบบภูมิคุ้มกันเพื่อตอบสนองต่อแบคทีเรียเหล่านี้ ในภาวะที่ร่างกายมีระบบภูมิคุ้มกันที่ต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรคต่ำลงก็สามารถเกิดการอักเสบซึ่งส่งผลให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อปริทันต์ได้ ดังนั้นการเกิดโรคปริทันต์อักเสบจึงเกี่ยวข้องกับความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียก่อโรคกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ยิ่งไปกว่านั้น ปัจจัยเสี่ยงเช่น การสูบบุหรี่ หรือโรคเบาหวาน และปัจจัยทางพันธุกรรม ก็มีผลต่อพยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์อักเสบด้วย การเสียสมดุลของปัจจัยต่างๆ เหล่านี้จึงส่งผลต่ออาการแสดงทางคลินิกของโรคปริทันต์อักเสบ<sup>(42-43)</sup>

คราบจุลินทรีย์ถือได้ว่าเป็นไมโครเบียล ไบโอฟิล์ม (microbial biofilm) ไบโอฟิล์มนั้น หมายถึงเมทริกซ์ที่ประกอบแบคทีเรียชนิดต่างๆ มายึดเกาะบนพื้นผิวหรือระหว่างพื้นผิว คราบจุลินทรีย์ มี 2 แบบ ได้แก่ คราบจุลินทรีย์ที่อยู่เหนือเหงือก และคราบจุลินทรีย์ที่อยู่ใต้เหงือก เมื่อแบคทีเรียเกาะบริเวณผิวฟันที่ได้รับการทำความสะอาดเพียงช่วงเวลาไม่นานจะมีแผ่นฟิล์มบางๆ มาปกคลุมบริเวณผิวฟันเรียกว่าเพลลิเคิล (pellicle) ซึ่งประกอบด้วยโปรตีน และไกลโคโปรตีน (glycoproteins) ที่พบในน้ำลาย (saliva) และน้ำเหลืองเหงือก (crevicular fluid) ดังนั้นบทบาทของเพลลิเคิลจึงเป็นเสมือนตัวรับที่จำเพาะ (specific receptors) สำหรับให้แบคทีเรียมาเกาะ โดยแบคทีเรียกลุ่มแรกที่มาเกาะที่ผิวของเพลลิเคิล คือกลุ่มของสเตรปโตคอคคัส (*Streptococcus* species) ซึ่งจากนั้นจะเป็นตัวเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียในกลุ่มฟิวไซแบคทีเรีย (*Fusobacterium* species) มายึด ต่อมาจะมีแบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่จำเพาะโดยจะเป็นแบคทีเรียชนิดแกรมลบที่ไม่ใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโตซึ่งมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคปริทันต์ ได้แก่ แอคติโนแบซิลัส แอคติโนมายซิเทม โคมิแทนส์ พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวัลิส และแทน

เนอเรลลาฟอร์ซัยเทนซิส มายึดกันเป็นกลุ่ม<sup>(44)</sup> การยึดจับกันนั้นไม่เพียงเป็นการอยู่ร่วมกันแต่ยังเป็นการช่วยส่งเสริมซึ่งกันและกันในด้านการหาอาหารและกลไกการส่งสัญญาณระหว่างเซลล์ ดังนั้นไบโอฟิล์มจึงเป็นเสมือนแหล่งเริ่มต้นของการก่อให้เกิดพยาธิสภาพของโรคปริทันต์

เมื่อมีการสะสมของคราบจุลินทรีย์มากขึ้นจะทำให้เกิดการอักเสบของเหงือก เยื่อบุผิวเชื่อมต่อ (junctional epithelium) ของเหงือกจะแยกตัวออกจากผิวฟันและเคลื่อนตัวลงไปตามรากฟัน เป็นผลทำให้เกิดพยาธิสภาพที่ เรียกว่า ร่องลึกปริทันต์ (periodontal pocket) ซึ่งเมื่อเกิดร่องลึกปริทันต์แล้วจะทำให้การกำจัดคราบจุลินทรีย์โดยวิธีการแปรงฟันเป็นไปได้ยาก ในช่วงที่มีการดำเนินของโรคปริทันต์ อยู่ นั้นจะพบมีการละลายของกระดูกเข้าฟันและมีการสูญเสียของอวัยวะปริทันต์ตามมา โดยช่วงของการทำลาย (periods of destruction) จะเกิดขึ้นภายในเวลาไม่กี่วันจนถึงหลายสัปดาห์ และเข้าสู่ช่วงของทุเลาลงของโรค (periods of remission) ซึ่งจะพบว่าอาการเกิดพยาธิสภาพนี้จะเกิดเฉพาะบริเวณฟันที่มีการติดเชืเท่านั้น<sup>(45)</sup>

### แบคทีเรียที่สัมพันธ์กับโรคปริทันต์อักเสบ (Microbial composition associated with periodontitis)

การเกิดโรคปริทันต์อักเสบนั้นมีความสัมพันธ์กับเชื้อก่อโรคที่สำคัญคือแอกติโนแบคทีเรียในแบคทีเรียกลุ่มไมซีโทมโคมิแทนส์ พอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวาลิส และแทนเนอเรลลาฟอร์ซัยเทนซิส ซึ่งการเกิดโรคปริทันต์อักเสบนั้นไม่ได้เกิดจากแบคทีเรียเพียงชนิดเดียว แต่ต้องอาศัยแบคทีเรียหลายชนิดดังแสดงในตาราง 1

ตาราง 1 แบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่มีความสัมพันธ์กับโรคปริทันต์และบริเวณที่มีอวัยวะปริทันต์ที่เสื่อมบุรณ์

Health	Gingivitis	Periodontitis
<i>Streptococcus oralis</i> <sup>g</sup>	<i>Streptococcus oralis</i> <sup>g</sup>	<i>Porphyromonas gingivalis</i> <sup>g</sup>
<i>Streptococcus sanguis</i> <sup>g</sup>	<i>Streptococcus sanguis</i> <sup>g</sup>	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> serotype b <sup>g</sup>
<i>Streptococcus mitis</i> <sup>g</sup>	<i>Streptococcus mitis</i> <sup>g</sup>	<i>bateroides forsythus</i> <sup>g</sup>
<i>Streptococcus gordonii</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>	PRO spirochete
<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Capnocytophaga ochracea</i>	<i>Treponema denticola</i>
<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	<i>Prevotella intermedia</i> <sup>g</sup>
<i>Streptococcus intermedius</i>	<i>Campylobacter gracilis</i> <sup>g</sup>	<i>Prevotella nigrescens</i> <sup>g</sup>
<i>Gemella morbillorum</i>	<i>Prevotella loescheii</i> <sup>g</sup>	<i>Campylobacter rectus</i> <sup>g</sup>
<i>Rothia dentocariosa</i>	<i>Peptostreptococcus micros</i> <sup>g</sup>	<i>Peptostreptococcus micros</i>
<i>Actinomyces naeslundii</i>	<i>Eubacterium nodatum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp.vincentii
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	<i>Actinomyces naeslundii</i>	
<i>Actinomyces odontolyticus</i>		

ตาราง 1 (ต่อ)

Health	Gingivitis	Periodontitis
<i>Peptostreptococcus micros</i>	<i>Actinomyces israelii</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i>
<i>Eubacterium nodatum</i>	<i>Campylobacter concisus</i>	<i>Selenomonas noxia</i>
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	<i>Actinomyces odontolyticus</i> <sup>g</sup>	<i>Selenomonas flueggeii</i> <sup>g</sup>
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i>	Enteric species
<i>Campylobacter gracilis</i>	<i>Eubacterium brachy</i>	<i>Fusobacterium alocis</i>
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>polymorphum</i>	<i>Eikenella corrodens</i>	<i>Lactobacillus uli</i> <sup>g</sup>
	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> serotype a	<i>Veillonella parvula</i> <sup>g</sup>

*g = also associated with gingivitis*

ที่มา: Page CR, Kornman SK. (1997). The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000*. 14 : 24.

แบคทีเรียหลายชนิดที่อยู่ได้เหงือกอาจมีความสัมพันธ์กับโรคอื่นๆ เช่น เชื้อในกลุ่ม ฟิวไซสไปโรคิเทล (fusospirochetal complex) ที่พบในโรคหัวใจชนิด วินเซนต์ แองไจนา (Vincent's angina) เหมือนกันกับที่พบในโรคเหงือกอักเสบชนิด วินเซนต์ จิงจิไวติส (Vincent's gingivitis) หรือโรคเหงือกอักเสบชนิดเนื้อตายเฉียบพลัน (acute necrotizing ulcerative gingivitis)

นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียต่างชนิดกันมีความสัมพันธ์กัน โดยมีการจับกันของแบคทีเรียต่างชนิดกันเพื่อประโยชน์ในการหาอาหารซึ่งอาศัยอยู่ร่วมกันโดยไม่ทำอันตรายต่อกัน เช่นการอยู่ร่วมกันของ ทรีโพนีมา เดนติโคลา (*Treponema denticola*) แทนเนอเรลลา ฟอร์ซัยเทนซิส และ พอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวัลิส<sup>(46)</sup> การอยู่อาศัยของแบคทีเรียจะเป็นความสัมพันธ์กันทั้งทางเชิงบวกและเชิงลบ<sup>(47)</sup> เช่นไม่สามารถพบแทนเนอเรลลา ฟอร์ซัยเทนซิส ร่วมกับ เปปโตสเตรปโตคอกคัส ไมครอส (*Peptostreptococcus micros*) ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ ในทางตรงกันข้ามบริเวณที่พบ แทนเนอเรลลา ฟอร์ซัยเทนซิส สามารถพบ ฟิวไซแบคทีเรีย นิวคลีเอทัม โดยเชื้อชนิดนี้อาจมีความสัมพันธ์ในด้านการหาอาหารของ แทนเนอเรลลา ฟอร์ซัยเทนซิส

ในการวิจัยครั้งนี้จะกล่าวถึง พอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวัลิส และ แอคติโนแบซิลัสแอคติโนมัชชีเทมโคมิแทนส์ ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคชนิดที่มีความสำคัญในการก่อให้เกิดโรคปริทันต์อักเสบ และส่งผลให้มีการทำลายอวัยวะปริทันต์อย่างรุนแรงและรวดเร็ว

มีการศึกษาโดยใช้วิธีในตรวจหาเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ได้เหงือกพบว่ารูปแบบการแพร่กระจายของ แอคติโนแบซิลัสแอคติโนมัชชีเทมโคมิแทนส์ และพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวัลิส จะแตกต่างกันไปโดยแอคติโนแบซิลัสแอคติโนมัชชีเทมโคมิแทนส์พบในตำแหน่งที่มีความจำเพาะ<sup>(48, 49-51)</sup> ในขณะที่พอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวัลิส พบกระจายทั่วไป<sup>(48,49,51)</sup> ซึ่งการกระจายของเชื้อทั้งสองชนิดนี้อาจสัมพันธ์กับประสิทธิภาพของการตอบสนองของภูมิคุ้มกันร่างกายต่อเชื้อ โดยมีการศึกษาที่แสดงความแตกต่างใน

การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายระหว่างเชื้อทั้งสองชนิดพบว่าการตอบสนองของอิมมูโนโกลบูลิน จี (IgG) ต่อแอกติโนแบคทีเรียแอคทีโนมัยซิเทมโคมิแทนส์สามารถจำกัดบริเวณของการติดเชื้อได้ ขณะที่การเพิ่มขึ้นของระดับแอนติบอดีต่อพอร์ไฟโรโมนแนสจิงจิवालิส ไม่สามารถควบคุมบริเวณการติดเชื้อได้<sup>(52)</sup> ด้วยเหตุนี้จึงอาจนำไปสู่การทำลายของอวัยวะปริทันต์โดยทั่วไป สำหรับการศึกษาก่อนเกิด การติดเชื้อทั้งสองชนิดนี้มีการศึกษาพบผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อพอร์ไฟโรโมนแนสจิงจิवालิสสูงขึ้นเมื่อมีอายุเพิ่มขึ้น ขณะที่การติดเชื้อแอคทีโนแบคทีเรียแอคทีโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ในผู้ป่วยที่มีอายุเพิ่มขึ้นกลับพบมีจำนวนน้อยลง<sup>(53)</sup> นอกจากนี้ยังมีการศึกษาซึ่งมีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างพอร์ไฟโรโมนแนสจิงจิवालิส กับโรคปริทันต์อักเสบในผู้ป่วยที่เป็นโรคทางระบบ โดยพบว่าสามารถพบเชื้อชนิดนี้ได้ในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบที่เป็นโรคเบาหวาน<sup>(54)</sup>

## บทบาทของพอร์ไฟโรโมนแนสจิงจิवालิสกับโรคปริทันต์อักเสบ (Role of *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis)

พอร์ไฟโรโมนแนสจิงจิवालิส เป็นแบคทีเรียชนิดแกรมลบที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต ซึ่งมีการศึกษาพบว่ามีความสำคัญเกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพของโรคปริทันต์โดยทำให้โรคมีความรุนแรงและนำไปสู่การทำลายของเนื้อเยื่อปริทันต์และกระดูกเบ้าฟัน<sup>(55-56)</sup> ในเนื้อเยื่อปริทันต์ที่มีสภาพปกติจะไม่พบเชื้อชนิดนี้<sup>(57)</sup> แต่ระหว่างที่โรคปริทันต์มีการดำเนินไปจนเป็นโรคปริทันต์อักเสบสามารถพบเชื้อก่อโรคชนิดนี้ได้ การศึกษาเกี่ยวกับพอร์ไฟโรโมนแนสจิงจิवालิส ในโรคเหงือกอักเสบพบว่าเชื้อชนิดนี้ไม่มีความสัมพันธ์กับโรคเหงือกอักเสบและสามารถแยกเชื้อชนิดนี้ได้เพียงบางรอยโรคเท่านั้น<sup>(58-60)</sup> และสามารถตรวจพบเชื้อได้จากรอยโรคปริทันต์อักเสบ<sup>(61-62, 48)</sup> เชื้อชนิดนี้ถูกพบได้บ่อยในบริเวณที่มีระดับความลึกของร่องลึกปริทันต์มากๆ (deep periodontal pockets) โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณที่ยังคงมีการดำเนินของโรค (active sites) นอกจากนี้พอร์ไฟโรโมนแนสจิงจิवालิส ยังมีปัจจัยก่อโรคหลายชนิดที่ช่วยให้เชื้อสามารถรุกรานเนื้อเยื่อปริทันต์และส่งผลให้ลักษณะของรอยโรคมีความรุนแรงขึ้น<sup>(63)</sup>

เชื้อในกลุ่มพอร์ไฟโรโมนแนสพบว่ามีความสัมพันธ์กับมนุษย์และสัตว์เนื่องจากเชื้อในกลุ่มนี้สามารถตรวจพบได้ในช่องปากของมนุษย์ สุนัข แมว สมาชิกในกลุ่มพอร์ไฟโรโมนแนสนี้ดังตาราง 2

---

---

Species of the genus *Porphyromonas*

---

*Porphyromonas cangingivalis*  
*Porphyromonas canoris*  
*Porphyromonas cansulci*  
*Porphyromonas circumdentaria*  
*Porphyromonas crevioricanis*  
*Porphyromonas endodontalis*  
*Porphyromonas gingivalis*  
*Porphyromonas gingivicanis*  
*Porphyromonas levii*  
*Porphyromonas macacae*

---

Source: adapted from Collier L, Ballow A, Sussman M, ed. Topley & Wilson's microbiology and microbial infections. 9<sup>th</sup> edn. Vol.2. New York: Oxford University Press, 1998.

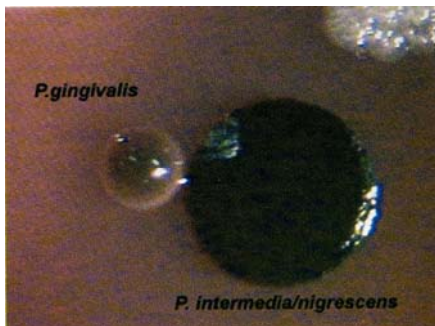
---

ที่มา: Stanley CH, Lakshmya K, Stephen W, Caroline AG. (1999) Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol* 2000. 20 : 170.

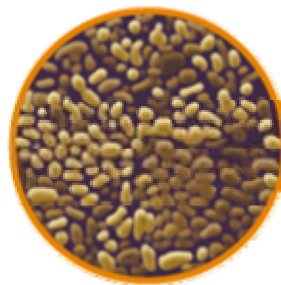
พอร์ไฟโรโมนเนสจิงจิวัลิส สามารถแบ่งได้เป็น 2 ไบโอบีจากทดสอบเอ็นไซม์แค้ทเทเลส (catalase test) ซึ่งเป็นเอ็นไซม์ที่กระตุ้นการเปลี่ยนของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นน้ำและออกซิเจน โดยเชื้อที่แยกได้จากมนุษย์จะอยู่ในรูปแบบที่ไม่พบแค้ทเทเลส (catalase-negative) ขณะที่เชื้อที่แยกได้จากสัตว์อยู่ในรูปแบบที่พบแค้ทเทเลส (catalase-positive)<sup>(64)</sup> นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าจากการแยกเชื้อทางคลินิกพบว่าพอร์ไฟโรโมนเนสจิงจิวัลิส ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสายพันธุ์อื่นเช่น พรีโวลเทลลา เมลานินิจินคา<sup>(65)</sup> มีรายงานการพบพอร์ไฟโรโมนเนสจิงจิวัลิส และการแพร่กระจายของเชื้อพบว่าเชื้อชนิดนี้สามารถตรวจพบและแยกออกมาจากคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือก นอกจากนี้ยังสามารถตรวจพบได้ในน้ำลาย ที่ลิ้น และต่อมทอนซิล<sup>(66)</sup>

### ลักษณะทางโครงสร้างของพอร์ไฟโรโมนเนสจิงจิวาลิส

พอร์ไฟโรโมนเนสจิงจิวาลิส มีลักษณะรูปร่างเป็นแท่ง ชนิดแกรมลบและไม่ใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโต ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.3 ถึง 0.5 ไมครอน ไม่เคลื่อนไหว ไม่สร้างสปอร์ไม่สามารถย่อยสลายน้ำตาล สามารถสร้างโคโลนีได้เมื่อเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเลือดเป็นส่วนผสม ดังภาพประกอบ 1 โดยโคโลนีในระยะเริ่มแรกจะมีสีขาวครีม จากนั้นภายใน 4 ถึง 8 วัน จะมีสีเข้มขึ้นจนเป็นสีแดงเข้มถึงสีดำโดยเริ่มจากบริเวณขอบของโคโลนีก่อน ซึ่งความเข้มของโคโลนีนั้นมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของโปรโตฮีมาที่เชื้อผลิตขึ้น เชื้อชนิดนี้สามารถผลิตเอ็นไซม์ และโปรตีน นอกจากนี้ผลผลิตที่ได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึมซึ่งเป็นปัจจัยก่อโรคโดยสารเหล่านี้สามารถขัดขวางกลไกการหลบหนีและการป้องกันของร่างกายได้ ดังแสดงในตาราง 3



1.1



1.2

ภาพประกอบ 1 แสดงโคโลนีของพอร์ไฟโรโมนเนสจิงจิวาลิสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ และลักษณะรูปร่างของเชื้อเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

ที่มา: 1.1 Sanz M, Lau L, Herrera D, Morillo JM, Silva A. (2004) Methods of detection of Actinobacillus actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis and Tannerella forsythensis in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular technique: a review. *J Clin Periodontol.* 31 : 1035.

1.2 Folayan, OM. (2004). The Epidemiology, Etiology, and Pathophysiology of Acute Necrotizing Ulcerative Gingivitis Associated with Malnutrition. (Online). Available: <http://www.Thejcdp.com/.../folayan/graphics/pgbc.gif> . Retrieved July 13, 2006.

ตาราง 3 แสดงปัจจัยก่อโรคที่ผลิตโดยพอร์ไฟโรโมนเนสจิงจิวาลิส

Tissue destruction	Host evasion
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	Immunoglobulin protease
Fibroblast growth inhibitors	
Endotoxicity	
Lipopolysaccharide-induced bone resorption	
Volatile sulfur compounds	Fibrinolysin
Short-chain acid end products	
Indole	Superoxide dismutase
Ammonia	NADH oxidase
H <sub>2</sub> S	Free-radical formation

ที่มา: Stanley CH, Lakshmyya K, Stephen W and Caroline AG. (1999) Virulence factors of *Porphyromonase gingivalis*. *Periodontology 2000*. 20 :168.

มีการศึกษาพบว่าพอร์ไฟโรโมนเนสจิงจิวาลิส เป็นแบคทีเรียที่ไม่สามารถย่อยสลายน้ำตาล ไม่ต้องใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโต โดยพบว่าสามารถเจริญเติบโตได้บริเวณที่มีปริมาณออกซิเจนน้อยๆ

แต่ต้องมีสารซึ่งมีส่วนประกอบของไนโตรเจนมากพอ ระบบนิเวศใต้เหงือกจะเป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเชื้อชนิดนี้

### การตรวจพบพอร์ไฟโรโมนแนสจิงจิวาลิสในช่องปาก (Early detect in oral cavity)

การก่อโรคปริทันต์อักเสบโดยพอร์ไฟโรโมนแนสจิงจิวาลิส เกิดจากการถ่ายทอดเชื้อเข้าสู่ช่องปากจากผู้ที่มีการติดเชื้อไปยังบุคคลอื่น โดยพบว่าน้ำลายเป็นตัวกลางที่สำคัญในการถ่ายทอดเชื้อ อย่างไรก็ตามคู่สมรสและบุตรซึ่งอยู่ในครอบครัวเดียวกันไม่จำเป็นว่าจะต้องพบพอร์ไฟโรโมนแนสจิงจิวาลิส ในสายพันธุ์เดียวกัน<sup>(67-68)</sup> ซึ่งการจำแนกสายพันธุ์ขึ้นอยู่กับวิธีการที่ใช้เพื่อศึกษาการจำแนกสายพันธุ์ (ribotyping, restriction endonuclease analysis, restriction fragment length polymorphism, multilocus enzyme electrophoresis and arbitrary PCR amplification)

### การสะสมของเชื้อในช่องปาก (initial colonization of the oral environment)

ในการเกิดโรคปริทันต์จะต้องมีการจับกันอย่างจำเพาะของเชื้อก่อโรคภายในช่องปาก ซึ่งร่างกายจะมีกลไกการป้องกันการรวมกลุ่มกันของเชื้อก่อโรคภายในช่องปากโดยการขยับของลิ้น การหลั่งของน้ำลายและน้ำร่องเหงือก (GCF) ซึ่งส่วนประกอบของน้ำลายจะช่วยในการรวมตัวกันของเชื้อก่อโรคเพื่อให้ง่ายในการกำจัดออกโดยอาศัยกลไกอื่นๆของร่างกาย และเมื่อกลไกของร่างกายไม่สามารถกำจัดเชื้อก่อโรคได้ เชื้อก่อโรคเหล่านี้จะสะสมกันจนกลายเป็นคราบจุลินทรีย์ซึ่งพบได้ทั้งเนื้อเยื่ออ่อนและเนื้อเยื่อแข็งภายในช่องปาก โดยพอร์ไฟโรโมนแนสจิงจิวาลิสจะเป็นเชื้อกลุ่มท้ายๆที่สะสมบนคราบจุลินทรีย์ เนื่องจากการรวมกลุ่มกันของเชื้อชนิดนี้ต้องอาศัยเชื้อชนิดอื่นในการจับกลุ่มกันเพื่อให้เกิดสภาวะที่เหมาะสมต่อการเข้าจับของพอร์ไฟโรโมนแนสจิงจิวาลิส ซึ่งสภาวะดังกล่าวจะต้องมีชนิดของเชื้อก่อโรคที่เอื้อต่อการเข้าจับของพอร์ไฟโรโมนแนสจิงจิวาลิส มีอาหารเพียงพอและมีปริมาณออกซิเจนที่ต่ำซึ่งเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ ในการรุกรานของเชื้อเข้าสู่เนื้อเยื่อนั้นเชื้อจะต้องอาศัยการเกาะติดบนพื้นผิวก่อน ซึ่งต้องอาศัยปัจจัยก่อโรค โดยปัจจัยก่อโรคของพอร์ไฟโรโมนแนสจิงจิวาลิส ที่ช่วยในการเกาะติดบนพื้นผิวที่สำคัญ ได้แก่ ฟิมเบรีย ฮีแมกกลูตินิน และโปรตีนที่เยื่อหุ้มส่วนนอก (outer membrane proteins) โดยพบว่าฟิมเบรียและฮีแมกกลูตินินจัดเป็นโมเลกุลที่ใช้ในการยึดเกาะ (adhesin molecules) เพื่อช่วยให้เชื้อชนิดนี้สามารถรุกรานเข้าสู่เนื้อเยื่อได้ง่ายขึ้น

### ปัจจัยก่อโรคของพอร์ไฟโรโมนแนสจิงจิวาลิส (Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*)

เพื่อให้เข้าใจเกี่ยวกับพอร์ไฟโรโมนแนสจิงจิวาลิส และการก่อโรคของเชื้อชนิดนี้ได้ดีขึ้น จึงควรทราบปัจจัยก่อโรคที่สำคัญของเชื้อชนิดนี้ซึ่งมีดังนี้

### แคปซูล (Capsule)

แคปซูลของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालิส เป็นสารเหนียวข้น (dense and amorphous capsule) ซึ่งถือได้ว่าเป็นแอนติเจนที่สำคัญชนิดหนึ่งซึ่งอยู่บนพื้นผิวเซลล์ของเชื้อชนิดนี้ โดยประกอบไปด้วยโพลีแซคคาร์ไรด์เฮเทอโรพอลิเมอร์ (polysaccharide heteropolymer) ที่มีความหนาถึง 15 นาโนเมตร แคปซูลนี้จะหุ้มอยู่รอบๆ เยื่อหุ้มภายนอก มีการศึกษาพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालิส โดยแบ่งตามซีโรไทป์ ซึ่งการศึกษาเกี่ยวกับแคปซูลนั้นอาศัยการวิเคราะห์โพลีแซคคาร์ไรด์ เค แอนติเจน ที่ตรวจพบ โดยมีรายงานว่าเมื่อแบ่งตามซีโรไทป์พบว่าทั้งหมด 6 เค แอนติเจน<sup>(69)</sup> ดังตาราง 4

ตาราง 4 แสดงการศึกษาพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालิส โดยแบ่งตามซีโรไทป์

Strain	Capsular serotype
W50	K1
W83	K1
HG184	K2
A7A1-28 (ATCC 53977)	K3
ATCC 49417	K4
HG1690	K5
HG1691	K6
381	K-neg
2561 (ATCC 33277)	K-neg
FAY19m-1	-
9-14K1	-

ที่มา: Neil MO, Paul DV, Stuart GD, Eric CR. (2004) Antigens of bacteria associated with periodontitis. *J Periodontol* 2000. 35 :111.

จากการศึกษาพบว่าพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालิส สายพันธุ์ 381 และสายพันธุ์ ATCC 33277 ไม่สามารถพบ เค แอนติเจน และเมื่อวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่า สายพันธุ์ 381 ไม่มีชั้นแคปซูลาร์โพลีแซคคาร์ไรด์<sup>(70)</sup> และพบว่าแคปซูลของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालิส สายพันธุ์ A7A1-28

ประกอบด้วย กาแลคโตซามีน (galactosamine) กลูโคซามีน (glucosamine) กาแลคโตซามีนูโรนิกแอซิด (galactosaminuronic acid) กลูโคส (glucose) และมีปริมาณของกรดอะมิโนในระดับที่สูง<sup>(71)</sup> นอกจากนี้ยังพบว่าแอนติชีรัมในผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังสามารถจดจำ เค แอนติเจน ได้ และแอนติเจนที่พบได้บ่อยคือ เค 1 (สายพันธุ์ W50) เค 2 (สายพันธุ์ HG184) และ เค 6 (สายพันธุ์ HG1691) จากการศึกษาดังกล่าวสามารถบอกได้ว่าแคปซูลของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालิส เป็นปัจจัยก่อโรคที่สำคัญและเมื่อทำการศึกษาในหนูทดลองพบว่าพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालิส ในสายพันธุ์ที่ตรวจพบ เค แอนติเจน เป็นสาเหตุให้บาดแผลของหนูทดลองกลายเป็นแผลเปื่อยที่กว้างขึ้นเนื่องจากเชื้อมีความสามารถในการรุกรานเข้าสู่เนื้อเยื่อได้สูง ขณะที่สายพันธุ์ที่ไม่พบ เค แอนติเจน นั้นพบว่าสามารถเกิดหนองเฉพาะตำแหน่งเท่านั้น<sup>(72)</sup> นอกจากนี้ที่ที่เสมือนเป็นเกราะป้องกันสำหรับเชื้อเพื่อป้องกันการทำลายจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายแล้ว ยังมีการศึกษาพบว่าแคปซูลของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालิส ขัดขวางการยึดเกาะของเอ็นยึดปริทันต์กับพื้นผิวรากฟัน<sup>(73)</sup> และพบว่าแคปซูลของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालิส สายพันธุ์ W50 และ HG184 ต้านทานการการกลืนกินแบคทีเรียของโพลีมอร์โฟนิวเคลียร์เซลล์ ได้ดีกว่า พอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालิส สายพันธุ์ 381 ซึ่งไม่สามารถตรวจพบ เค แอนติเจน<sup>(74)</sup>

### **ไลโปโพลีแซคคาไรด์ หรือ แอลพีเอส (Lipopolysaccharide; LPS)**

มีรายงานการศึกษาจำนวนมากที่แสดงให้เห็นว่าไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालิส เป็นแอนติเจนที่มีความสำคัญเกี่ยวกับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในโรคปริทันต์อักเสบ แอลพีเอสของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालิส จะแตกต่างจากแบคทีเรียชนิดอื่น คือ จะไม่พบสารบางชนิดซึ่งได้แก่ ฮีปโตส (heptose) เบต้าไฮดรอกซีดีคาโนอิกแอซิด ( $\beta$ -hydroxydecanoic acid)<sup>(75)</sup> และยังพบว่ามีสารบางชนิด (2-keto-3-deoxyoctonate) ซึ่งช่วยในการยึดกับโพลีแซคคาไรด์<sup>(76)</sup> แอลพีเอสของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालิส ยังสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ร่างกายหลังไซโตไคน์ได้ เช่นมีการศึกษาพบว่าเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ (human gingival fibroblast ) ตอบสนองต่อแอลพีเอสของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालิส โดยการหลั่งไซโตไคน์หลายชนิดได้แก่ อินเตอร์ลิวคิน 1 เบต้า, อินเตอร์ลิวคิน 6 และอินเตอร์ลิวคิน 8<sup>(77)</sup> รวมทั้งยังกระตุ้นให้เซลล์สร้างเส้นใยที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบหลั่งอินเตอร์ลิวคิน 6 ซึ่งมีปริมาณสูงกว่าที่แยกได้จากผู้ป่วยที่มีสภาพเหงือกปกติ<sup>(78)</sup> และพบว่ากลไกในการกระตุ้นให้เซลล์สร้างเส้นใยหลั่งอินเตอร์ลิวคิน 6 นั้นจะอาศัยทอลไลครีเซพเตอร์ (Toll-like receptors)<sup>(79)</sup> นอกจากนี้ยังพบว่าแอลพีเอสของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालิส ยังเกี่ยวข้องกับการทำให้เกิดการละลายของกระดูกโดยมีรายงานการศึกษาพบว่า เมื่อแอลพีเอสของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालิส จับกับซีดี 14 ซึ่งเป็นรีเซพเตอร์อยู่บนผิวเซลล์ออสทีโอคลาส จะเหนี่ยวนำให้มีการหลั่งของอินเตอร์ลิวคิน 1 เบต้า และอินเตอร์ลิวคิน 6 ซึ่งจะไปมีผลกับเซลล์และส่งผลให้เกิดการละลายของกระดูก<sup>(80)</sup>

## พิมเบรีย

พิมเบรียเป็นโครงสร้างที่อยู่บริเวณพื้นผิวเซลล์ของพอร์ไฟโรโมแนสจิจิวาลิส เป็นส่วนที่ยื่นออกไปจากพื้นผิวเซลล์ โดยพิมเบรียนี้ถือว่าเป็นโมเลกุลที่ช่วยในการยึดเกาะของเชื้อกับพื้นผิวของเนื้อเยื่อเหงือก ซึ่งโยชิมูระ (Yoshimura) และคณะได้ทำการสกัดพิมเบรียได้สำเร็จจากพอร์ไฟโรโมแนสจิจิวาลิส สายพันธุ์ 381 พบว่าพิมเบรียมีลักษณะเป็นเส้นเดี่ยว (single-stranded filament) และหยิกเป็นลอน (curly) มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 นาโนเมตร โดยมีพิมบริลลิน (fimbrillin) เป็นส่วนประกอบย่อยโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของพิมเบรียนั้นมีขนาดโมเลกุลตั้งแต่ 41-49 กิโลดาลตัน ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อ โดยมียีน (gene) ที่สร้างโปรตีนคือ ยีนพิมเอ (*fimA* gene)<sup>(81-82)</sup>

พิมเบรียของพอร์ไฟโรโมแนสจิจิวาลิสสามารถแบ่งได้เป็น 5 ชนิด คือ ชนิดที่ 1-5<sup>(83)</sup> มีการศึกษาพบว่าพิมเบรียมีความสำคัญเกี่ยวข้องกับการเกาะติดของแบคทีเรียกับเนื้อเยื่อของร่างกาย<sup>(84)</sup> โดยพบว่าพิมเบรียของพอร์ไฟโรโมแนสจิจิวาลิส สายพันธุ์ 381 และ ATCC 33277 (พิมเบรียชนิดที่ 1) จำเป็นสำหรับการยึดเกาะและการรุกรานเยื่อเมือกช่องปากและไฟโบรบลาสต์<sup>(85)</sup> นอกจากนี้เมื่อทำให้พิมเบรียของพอร์ไฟโรโมแนสจิจิวาลิส สายพันธุ์ 381 หรือสายพันธุ์ ATCC 33277 มีการเปลี่ยนแปลงจะพบว่าลดความสามารถในการจับและรุกรานเซลล์เยื่อเมือกและไฟโบรบลาสต์<sup>(86)</sup> และมีการศึกษาซึ่งแสดงว่าพอร์ไฟโรโมแนสจิจิวาลิส สายพันธุ์ที่พบว่าพิมเบรียเป็นชนิดที่ 2 จะมีความสามารถในการรุกรานเซลล์เยื่อเมือกได้มากกว่าสายพันธุ์ที่พบว่าพิมเบรียชนิดอื่น<sup>(87)</sup> จากการศึกษาดังกล่าวทำให้เราทราบว่าพิมเบรียมีความสำคัญที่ช่วยให้พอร์ไฟโรโมแนสจิจิวาลิส สามารถยึดเกาะได้ดี โดยเชื่อนั้นสามารถยึดเกาะกับสารภายในช่องปากและโมเลกุลต่างๆ ได้ซึ่งรวมถึงโพรตีนริชโปรตีน (praline-rich proteins; PRPs) โพรตีนริชไกลโคโปรตีน (praline-rich glycoproteins) สเตทเทอริน (staterin) เชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ไฟบริโนเจน (fibrinogen) ไฟโบรเนคติน (fibronectin) และแลคโตเฟอริน (lactoferrin)<sup>(88-93)</sup>

นอกจากนั้นแล้วพิมเบรียยังมีคุณสมบัติอื่นๆ อีก เช่น การกระตุ้นให้มีการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยจากการศึกษาในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบในวัยผู้ใหญ่พบว่าซีรัมที่ได้จากผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรัง โรคปริทันต์อักเสบรุนแรงและโรคเหงือกอักเสบสามารถพบภูมิคุ้มกันชนิดอิมมูโนโกลบูลินจีที่มีความจำเพาะต่อพิมเบรียของพอร์ไฟโรโมแนสจิจิวาลิส (Pg fimbriae-specific IgG antibody) ในปริมาณสูง แต่พบอิมมูโนโกลบูลินเอและเอ็ม (IgA, IgM) ในปริมาณต่ำ ส่วนซีรัมจากผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบรุกรานที่พบในผู้ป่วยอายุน้อยๆ นั้นพบว่าอิมมูโนโกลบูลินชนิดดังกล่าวในปริมาณต่ำ<sup>(94)</sup>

และเมื่อศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่าการยับยั้งการทำงานของยีนที่ควบคุมการสร้างพิมเบรียจะส่งผลให้ไม่มีการสร้างพิมเบรีย ซึ่งทำให้เชื่อดังกล่าวมีความสามารถในการก่อให้เกิดการทำลายกระดูกน้อยลง<sup>(95)</sup>

## ฮีแมกกลูตินิน

ฮีแมกกลูตินิน แอดฮีซิน (hemagglutinin adhesin, HA-Ag2) เป็นกลุ่มของโปรตีน (Protein complex) ที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มผิวภายนอกของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालิส ซึ่งจัดว่าเป็นโมเลกุลที่ใช้ในการเกาะติด (Adhesin molecules) เช่นเดียวกับพิมเบรีย มีการศึกษาพบว่าฮีแมกกลูตินินจากผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์ อักเสบเรื้อรังทั้งหมด 8 คนสามารถทำปฏิกิริยากับฮีแมกกลูตินิน แอดฮีซิน 2 ชนิด ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 43 และ 49 กิโลดาลตัน<sup>(96)</sup> นอกจากนี้ฮีแมกกลูตินินยังเป็นแอนติเจนที่ใช้สำหรับตรวจสอบสายพันธุ์ของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालิส<sup>(97)</sup> ฮีแมกกลูตินินมีความสามารถในการจับกับเม็ดเลือดแดง (erythrocyte) เนื่องจากบนผิวเซลล์ของเม็ดเลือดแดงมีรีเซพเตอร์ที่สามารถจับกับฮีแมกกลูตินินของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालิส โดยมีการศึกษาพบว่าฮีแมกกลูตินินของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालิส สายพันธุ์ ATCC 33277 สามารถทำให้เกิดการจับกลุ่มและมีการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดง<sup>(98)</sup> ดังนั้นฮีแมกกลูตินินของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालิส จึงเป็นปัจจัยก่อโรคที่ส่งเสริมให้เชื้อสามารถตั้งรกรากอยู่บริเวณได้เหงือกได้ และเนื่องจากพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालิสจำเป็นต้องใช้ฮีมี (heme) หรือสารที่มีธาตุเหล็กเป็นองค์ประกอบ ดังนั้นเชื้อจึงจับกับเม็ดเลือดแดงเพื่อประโยชน์ในด้านแหล่งอาหาร

## เอ็นไซม์ย่อยสลายโปรตีนที่เชื้อปลดปล่อยออกนอกเซลล์ (Extracellular proteolytic enzyme)

พอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालิส สามารถผลิตเอ็นไซม์โปรตีเอสได้หลายชนิดซึ่งเอ็นไซม์เหล่านี้สามารถย่อยสลายโปรตีนของร่างกายและกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เอ็นไซม์เหล่านี้ถือว่าเป็นเอ็นไซม์ที่มีความจำเพาะของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालิส ซึ่งทำให้เชื้อสามารถแยกออกจากเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มที่ไม่ใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโตได้ง่ายขึ้น มีโปรตีเอสหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालิส โดยเป็นปัจจัยก่อโรคที่พบได้ที่พื้นผิวเซลล์ ได้แก่ ทริปซิน- (trypsin-) ไทออล- (thiol-) และเคซิโนไลติกโปรตีเอส (caseinolytic proteinase) และมีเอ็นไซม์เปปติเดส 2 ชนิด ได้แก่ glycypropyldipeptidylaminopeptidase และ glycypropylpeptidase ซึ่งเอ็นไซม์เหล่านี้จะมีบทบาทสำคัญที่ทำให้โรคปริทันต์มีการรุกรานมากขึ้น รวมถึงทำให้พอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालิส และแบคทีเรียชนิดอื่นแพร่กระจายเข้าไปสู่เนื้อเยื่อปริทันต์ได้ลึกขึ้น จนนำไปสู่การทำลายของเนื้อเยื่อและเซลล์ในที่สุด<sup>(99-100)</sup> การศึกษาในระยะต่อมาพบว่าเอ็นไซม์สามารถตัดสายโพลีเปปไทด์ซึ่งอยู่หลังโมเลกุลของอาร์จินีน (Arginine) และไลซีน (lysine) จึงมีการจัดกลุ่มเอ็นไซม์ว่าเป็นโปรตีเอสที่จำเพาะต่ออาร์จินีน (arginine-(Arg-)) หรือว่า ไลซีน (lysine-(Lys-)) อาร์จินีน และไลซีน โปรตีเอสเป็นซีสเตอินโปรตีเอสหรือมีชื่อว่า จิงจิเพน (gingipains) จิงจิเพน ถูกรายงานครั้งแรกว่าเป็นซีสเตอินโปรตีเอสที่มีน้ำหนักโมเลกุล 50 กิโลดาลตัน มีลักษณะสำคัญ 3 อย่าง ที่แตกต่างออกไปจากซีสเตอินโปรตีเอสปกติทั่วไป คือ เป็นเอ็นไซม์ที่กระตุ้นให้เกิดการย่อยสลาย เอไมด์ด้วยโคเปปไทด์ที่มีไกลซีนเป็น

ส่วนประกอบ (glycine-containing dipeptides) มีช่วงที่แสดงความจำเพาะที่แคบซึ่งอยู่ภายในส่วนของอาร์จินิน (arginine) ที่มีพันธะเปปไทด์ (peptide bond) เป็นส่วนประกอบ นอกจากนี้ยังเป็นเอ็นไซม์ที่มีความทนทานต่อตัวยับยั้งโปรตีนเนส (proteinase inhibitors) ที่มีอยู่ในพลาสมาของมนุษย์ (human plasma)<sup>(94)</sup>

ในระยะต่อมาได้มีการศึกษาพบว่ามียีนที่แตกต่างกันอย่างน้อย 3 ยีนซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายโปรตีนที่พบได้ในเอ็นไซม์ซิสเตอินโปรตีเอสทั้ง 2 ชนิดคือ อาร์จิงจิปเพน 1 และ 2 (Arg-gingipain 1 and 2; RGP-1 and RGP-2) และไลซีนจิงจิปเพน 1 (Lys-gingipain 1; KGP)<sup>(101)</sup> โดยพบว่าโปรตีเอสของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวาลิส สามารถแยกได้จากเซลล์ทั้งเซลล์ (whole cell) แยกได้จากการสกัดเซลล์ (cell extracts) แยกได้จากการทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียง (cell sonicates) แยกได้จากเยื่อผิวภายนอกและสารที่เชื่อมผลิตออกมา

ต่อมาได้มีการศึกษารายงานถึงซิสเตอินโปรตีเอสที่คล้ายกับทริปซิน (trypsin-like cysteine protease) ซึ่งมีคุณสมบัติเหมือนฮีแมกกลูตินินจากพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวาลิส สายพันธุ์ 381 โดยพบว่าที่ปลายเอ็น (N-terminal) จะมีความแตกต่างไปจากการรายงานอื่นๆ<sup>(82)</sup> ในระยะต่อมาได้มีการสกัดซิสเตอินโปรตีนเนสที่จำเพาะต่ออาร์จินิน (arginine-specific cysteine proteinase) ที่มีชื่อเรียกว่า อาร์จิงจิปเพน (argingipain) ซึ่งเอ็นไซม์ที่สกัดได้นี้จะเป็นชนิดที่ขึ้นกับไทออล แต่จะมีบางส่วนที่มีลักษณะของเอ็นไซม์ชนิดอื่น (metallo and serine endopeptidase) ร่วมด้วย<sup>(102)</sup> โดยเอ็นไซม์ชนิดนี้สามารถย่อยสลายคอลลาเจนชนิดที่ 1 และ 4 (collagen type I and IV) รวมทั้งอิมมูโนโกลบูลินจี (IgG) ได้อย่างรุนแรง<sup>(94)</sup>

ได้มีการสกัดทริปซินไลท์โปรตีเอสซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 55 กิโลดาลตัน พบว่าสามารถไฮโดรไลซ์ (hydrolyze) คอลลาเจนชนิดที่ 1 3 4 และ 5 ซึ่งเป็นองค์ประกอบในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของอวัยวะปริทันต์ นอกจากนี้ยังสามารถไฮโดรไลซ์ องค์ประกอบที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันของร่างกาย ได้แก่ คอมพลีเมนต์ ไฟบริโนเจน อัลบูมิน (albumin)<sup>(103)</sup> สรุปได้ว่าพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวาลิสสามารถผลิตเอ็นไซม์โปรตีนเนสซึ่งเป็นเอ็นไซม์ที่สำคัญที่มีผลในขบวนการการรุกรานและการทำลายเนื้อเยื่อของร่างกายได้โดยตรง รวมทั้งมีผลทางอ้อมในกระบวนการกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยสามารถกระตุ้นให้เกิดการหลั่งของเอ็มเอ็มพี (MMPs) ซึ่งส่งผลให้เกิดการทำลายเมทริกซ์ภายนอกเซลล์ (extracellular matrix) รวมไปถึงกระบวนการยับยั้งตัวหน่วงในพลาสมาโปรตีน (plasma protein inhibitor) การตัดออกบางส่วนของตัวรับบริเวณผิวเซลล์ (cell surface receptor) การกระตุ้นหรือยับยั้งคอมพลีเมนต์ (complement factor) และไซโตไคน์ (cytokine) รวมทั้งมีผลกระตุ้นกลไกบางอย่าง (kallikreinkin cascade)<sup>(104)</sup>

นอกจากนี้ในการศึกษาทางพยาธิวิทยา พบว่าในสัตว์ทดลองกลุ่มที่ได้รับโปรตีนเอสจะพบระยะระหว่างเซลล์ในชั้นเยื่อบุผิวมีระยะห่างมากขึ้น (enlargement of intercellular space) พบเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโพลิมอร์โฟนิวเคลียสนิวโทรฟิลและการขยายตัวของหลอดเลือดเป็นจำนวนมาก การทำลายของเนื้อเยื่อและผลของการทำลายดังกล่าวจะถูกพบได้มากขึ้นในกลุ่มที่ได้รับไลโปโพลีแซคคาไรด์ร่วมด้วย<sup>(105)</sup>

### โปรตีนแอนติเจน (Protein antigens)<sup>(106)</sup>

เป็นโปรตีนที่พบที่เยื่อหุ้มเซลล์ส่วนนอกของพอร์ไฟโรโมนแอสจิงจิวาลิส ซึ่งสามารถกระตุ้นให้ร่างกายสร้างแอนติบอดีออกมา โดยโปรตีนเหล่านี้จะมีน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกันไป มีการศึกษาพบว่าโปรตีนที่อยู่ที่ยูบิควินินเยื่อหุ้มเซลล์ส่วนนอก (outer membrane protein) ของพอร์ไฟโรโมนแอสจิงจิวาลิสสายพันธุ์ W50 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 55 กิโลดาลตัน สามารถกระตุ้นให้ร่างกายมีการสร้างแอนติบอดี โดยสามารถตรวจพบได้จากซีรัมของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ และมีการศึกษาพบว่าโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 46 กิโลดาลตัน เป็นโปรตีนแอนติเจนที่เป็นตัวเด่นที่สุดที่พบในซีรัมจากผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบที่มีความรุนแรงของโรคมาก นอกจากนี้ยังพบว่าระบบภูมิคุ้มกันต้านทานในผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบเร็วรังจะตอบสนองต่อโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมาก แต่ในผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบรุนแรงจะมีการตอบสนองต่อโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ซึ่งการศึกษาพบว่าโปรตีนแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 43 กิโลดาลตันมีความสำคัญต่อการกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต้านทานของร่างกาย ดังแสดงให้เห็นว่าโปรตีนแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 40-44 กิโลดาลตัน จะเป็นเป้าหมายในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันต้านทานของร่างกายของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ

### บทบาทที่เป็นไปได้ของพอร์ไฟโรโมนแอสจิงจิวาลิส ในโรคปริทันต์อักเสบ (Potential role of *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis)<sup>(107)</sup>

พอร์ไฟโรโมนแอสจิงจิวาลิส แตกต่างจากเชื้อแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่นโดยไม่สามารถในการกระตุ้นให้เซลล์บุผนังหลอดเลือดของมนุษย์ผลิตอีซีเลคติน (E-selectin) ได้โดยตรง<sup>(108)</sup> และมีการศึกษาพบว่าพอร์ไฟโรโมนแอสจิงจิวาลิส สามารถสกัดกั้นกระบวนการการตอบสนองต่อการอักเสบ โดยทำให้ลิวโคไซต์ (leukocyte) ไม่สามารถเกาะกับเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดและไม่สามารถเคลื่อนตัวออกไปสู่ภายนอกหลอดเลือดได้ (extravascular compartment) การศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่าไลโปโพลีแซคคาไรด์ จากพอร์ไฟโรโมนแอสจิงจิวาลิส ไม่สามารถกระตุ้นให้มีการตอบสนองต่อการอักเสบได้ในทันที พบว่าอีซีเลคตินจะได้รับการกระตุ้นโดยผ่านทูเมอร์ เนคโครซิส แฟคเตอร์ แอลฟา และอินเตอร์ลิวคินวันเบต้า แต่จากการตรวจสอบพบว่าความสามารถของไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมนแอสจิงจิวาลิสในการกระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดของมนุษย์ (human peripheral blood

mononuclear cell) หลังไซโตไคน์ทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นไปได้ไม่ดี นอกจากนี้แล้วยังพบอีกว่าไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालิส ยังจับกับโปรตีนที่ทำหน้าที่จับกับไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide binding protein) ได้ไม่ดี นั่นแสดงว่า โอกาสในการพบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายจะเป็นไปได้ยาก<sup>(109)</sup>

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่าพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालิส ยังสามารถยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นในการกระตุ้นให้เซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดหลังอีซีเลคติน<sup>(108)</sup> และยังพบอีกว่าพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालิส และไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालิส สามารถยับยั้งการหลั่งสารอื่นๆ ได้แก่ โมโนไซต์ คีโมแทกซิส โปรตีน-1 (monocyte chemotaxis protein-1) อินเตอร์ลิวคิน-8 จากเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด ไฟโบรบลาสต์ และเซลล์เยื่อบุผิวของเหงือก อย่างไรก็ตามการตอบสนองของเซลล์แต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน แต่บทบาทของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालิสสามารถยับยั้งการอักเสบซึ่งเป็นการตอบสนองของเซลล์ร่างกายต่อแบคทีเรียได้ ซึ่งภาวะดังกล่าวเกิดมาจากบทบาทความสามารถของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालิส ที่ช่วยให้เกิดสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมและเอื้อต่อการยึดเกาะและเจริญเติบโตของแผ่นคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือก (subgingival plaque biofilm) การที่พอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालิส เป็นสาเหตุที่ทำให้ประสิทธิภาพในการตอบสนองของร่างกายไม่ดีพอจึงเป็นปัจจัยที่สำคัญที่ส่งผลให้เกิดการลุกลามของโรคปริทันต์ เชื้อแบคทีเรียเหล่านี้สามารถก่อให้เกิดโรคปริทันต์อักเสบได้หลายลักษณะ และจะปล่อยปัจจัยก่อโรคออกมาซึ่งเกี่ยวข้องกับการอักเสบและเหนี่ยวนำให้เกิดการสูญเสียของกระดูก

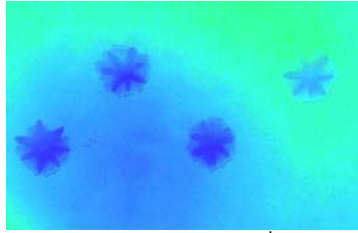
### **บทบาทของแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์กับโรคปริทันต์อักเสบ (Role of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in periodontitis)**

ระหว่างปี 1960 ถึง ปี 1970 มีรายงานการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของแบคทีเรียก่อโรคในคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือกกับโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรัง ทำให้สมมุติฐานเกี่ยวกับคราบจุลินทรีย์มีความกระจ่างขึ้นขณะที่ระยะเวลาและความรุนแรงของโรคปริทันต์อักเสบมีความสัมพันธ์กับแบคทีเรียก่อโรค<sup>(110-111)</sup> จากการศึกษาพบว่าแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์ เป็นแบคทีเรียสำคัญที่สัมพันธ์กับโรคปริทันต์อักเสบรุนแรงเฉพาะที่<sup>(112-113)</sup> โดยพบแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์ถึงร้อยละ 40-100 ของคราบจุลินทรีย์บริเวณใต้เหงือกของผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบรุนแรง<sup>(114)</sup> รวมถึงมีรายงานพบแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์ในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังโดยเฉพาะผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังที่รักษาแล้วไม่หายหรือคือต่อการรักษา (refractory chronic periodontitis)<sup>(115-117)</sup> รวมทั้งสามารถแยกเชื้อและจำแนกสายพันธุ์ทางคลินิกได้จากรอยโรคของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบรุนแรงในปี ค.ศ. 1979 มูรีและคณะพบว่าผู้ป่วยในวัยผู้ใหญ่ตอนต้น (young adult) ที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบรุนแรงและรุนแรงการตรวจวัดการเพิ่มขึ้นของระดับซีรัมแอนติบอดีต่อเชื้อนี้ซึ่งสามารถใช้ในการ

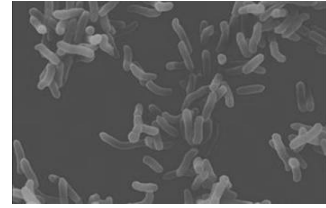
ยืนยันการเกิดโรคได้ เมื่อมีการติดเชื้อแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์ การตอบสนองของแอนติบอดีของผู้ป่วยพบว่าการเพิ่มขึ้นของอิมมูโนโกลบูลิน จี (IgG) ทั้งในซีรัมและในน้ำเหลืองเหนือก นอกจากนี้ยังพบว่าแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์สายพันธุ์ซีโรไทป์บีซึ่งสามารถผลิตลิโคทอกซินในปริมาณที่มากกว่า จะมีสถิติที่แสดงว่ามีความสัมพันธ์กับโรคปริทันต์อักเสบรุกราน<sup>(118)</sup> เมื่อลิโคทอกซินของเชื้อชนิดนี้มีปริมาณมากขึ้นสามารถฆ่าโพลีมอร์โฟนิวเคลียร์ ลิโคไซท์ และเพอริเฟอร์ล บลัด โมโนไซท์ (peripheral blood monocyte) ได้<sup>(119)</sup> เชื้อชนิดนี้ส่วนใหญ่พบในวัยรุ่น นอกจากนี้พบว่าสามารถถ่ายทอดจากพ่อแม่ไปสู่ลูกได้<sup>(120)</sup>

เชื้อสามารถผลิตปัจจัยก่อโรคที่สำคัญได้หลายอย่าง ได้แก่ ฟิมเบรีย สามารถทำให้เชื้อเจริญเติบโตและดำรงชีวิตอยู่ได้ในช่องปาก ลิโคทอกซิน และโปรตีนที่ช่วยกดภูมิคุ้มกันของร่างกาย ช่วยขัดขวางกลไกการป้องกันของร่างกาย ไซโตทอกซิน คอลลาจีเนส และสารที่ทำให้มีการละลายของกระดูก ช่วยในการทำลายเนื้อเยื่อของร่างกาย<sup>(121)</sup> โดยคอลลาจีเนสอาจลดจำนวนเส้นใยคอลลาเจนของเมทริกซ์นอกเซลล์ของอวัยวะปริทันต์ และลดการผลิตเส้นใยคอลลาเจนจากไฟโบรบลาสต์<sup>(122)</sup> ส่วนไลโปโพลีแซคคาไรด์ และโปรตีนบนพื้นผิวเซลล์บางชนิดสามารถเป็นสารที่ทำให้เกิดการละลายของกระดูก (bone resorptive mediators) ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงทำให้เชื้อสามารถหลบหลีกการป้องกันของร่างกายได้ด้วยกลไกหลายวิธี มีรายงานพบเชื้อมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของร่องลึกปริทันต์ (pocket depth) และการสูญเสียการยึดเกาะ (attachment loss) โดยจะพบเชื้อบริเวณที่มีร่องลึกปริทันต์ลึกมากๆ ในผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรัง<sup>(123)</sup> อย่างไรก็ตามมีรายงานพบเชื้อนี้บริเวณอวัยวะปริทันต์ที่สมบูรณด้วยแต่พบในระดับที่ต่ำ และพบว่าเมื่อมีการดูแลสุขภาพช่องปากไม่ดีพอ จะทำให้ขาดความสมดุลระหว่างระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายและปริมาณของเชื้อ เมื่อเชื้อการก่อตัวในปริมาณที่เพิ่มขึ้นสามารถบ่งบอกถึงการขาดความสมดุลซึ่งนำไปสู่การเกิดการทำลายอวัยวะปริทันต์ในที่สุด<sup>(124)</sup>

คลินเกอร์ (Klinger)<sup>(125)</sup> เป็นคนแรกที่อธิบายถึงรูปร่างและการเพาะเลี้ยงเชื้อของแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์ เชื้อนี้มีลักษณะรูปร่างเป็นแท่ง ชนิดแกรมลบและไม่ใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโต โดยแยกเชื้อมาจากกรวยโรคเชื้อราแอกติโนมายโคซิสบริเวณคอและใบหน้า (cervicofacial actinomycosis) เริ่มแรกเชื้อชนิดนี้มีชื่อว่า แบคทีเรียม แอกติโนมายซิทัม โคมิแทนส์ (*Bacterium actinomycetum comitans*) และต่อมาเปลี่ยนเป็น แบคทีเรียม โคมิแทนส์ (*Bacterium comitans*) สุดท้ายจึงใช้ชื่อแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์ ชื่อ แอกติโนแบซิลัสนั้น บอถึงโครงสร้างภายในของโคโลนีที่มีลักษณะคล้ายดาว (star-shaped) ที่พบบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (solid media) เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าเชื้อมีลักษณะรูปร่างเป็นแท่งสั้น (short rod) ดังภาพประกอบ 2



2.1 โคโลนีของแอกติโนแบซิลัส ที่มีลักษณะคล้ายดาว



2.2 เชื้อมีรูปร่างกลมหรือเป็นแท่งสั้น

ภาพประกอบ 2 แสดงลักษณะของโคโลนีและลักษณะรูปร่างของแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมัชชีเทมโคมิแทนส์

ที่มา: 2.1 Mr. Derren Ready. (2003). Research Images As Art 2003/2004 Gallery. (online). Available: <http://www.Grad.ucl.ac.uk /comp/2003/research/gallery> . Retrieved July 12, 2005.

2.2 Goncalves A, Gomes M. (2004). Periodontite. (online). Available: <http://alunos.crb.cup.pt/.../Micro/periodontite.htm>. Retrieved April 10, 2007.

เชื้อชนิดนี้มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับแอกติโนมัชชีเทม อิศราลีไอ (actinomyces israelii) ที่พบในรอยโรค แอกติโนมัชชีโคติก (actinomycotic lesion) โรคเชื้อราแอกติโนมัชชีโคซิส เป็นโรคติดเชื้อหลายชนิด รวมทั้งจากแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมัชชีเทมโคมิแทนส์ และแอกติโนมัชชีเทม อิศราลีไอ โดย โฮล์ม (Holm)<sup>(126)</sup> สามารถแยกแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมัชชีเทมโคมิแทนส์จากรอยโรคแอกติโนมัชชีโคติกที่กำลังดำเนินอยู่ (active actinomycotic lesion ) ขณะที่แอกติโนมัชชีเทม อิศราลีไอสามารถกำจัดได้ก่อนที่จะทำการรักษาโดยใช้ยาปฏิชีวนะ จึงสันนิษฐานว่า แอกติโนแบซิลัส แอกติโนมัชชีเทมโคมิแทนส์ เป็นสาเหตุของโรคเชื้อราแอกติโนมัชชีโคซิส มีรายงานการศึกษาพบว่าแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมัชชีเทมโคมิแทนส์ดำรงชีวิตเป็นปรสิตของมนุษย์โดยอาศัยอยู่บริเวณเยื่อเมือก (mucous membranes) โดยเฉพาะเยื่อเมือกในช่องปาก การศึกษาระยะต่อมาพบเชื้อชนิดนี้ในคราบจุลินทรีย์และร่องลึกปริทันต์ซึ่งเป็นบริเวณที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อชนิดนี้<sup>(127)</sup>

### ลักษณะทางโครงสร้างของแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมัชชีเทมโคมิแทนส์

แอกติโนแบซิลัสแอกติโนมัชชีเทมโคมิแทนส์ เป็นเชื้อชนิดแกรมลบรูปร่างเป็นแท่งสั้นขนาดประมาณ  $0.4 \pm 0.1 \times 1.0 \pm 0.4$  ไมครอน เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จึงเห็นเชื้อมีรูปร่างเป็นแท่งร่วมกับ

มีรูปร่างกลม แอคติโนแบซิลัสแอคติโนมัชชีเทมโคมิแทนส์เจริญเติบโตได้ดีในบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ (capnophilic) ร้อยละ 5-10<sup>(128)</sup> สามารถเจริญเติบโตได้โดยไม่ต้องใช้ออกซิเจน เชื้อไม่สามารถสร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนไหว ไม่สามารถสลายเม็ดเลือดแดงและปล่อยฮีโมโกลบินออกมาได้ (non-hemolytic) สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการเฟอร์เมนเตชัน (fermentation) เพื่อเป็นแหล่งพลังงานให้กับแบคทีเรียชนิดอื่นในช่องปาก<sup>(129)</sup>

แอคติโนแบซิลัสแอคติโนมัชชีเทมโคมิแทนส์ มีโครงสร้างขนาดเล็กที่อยู่บนพื้นผิวเซลล์ซึ่งสามารถมองด้วยกล้องจุลทรรศน์ ได้แก่ ฟิมเบรีย เวสซิเคิล (vesicle) และสารเมื่อกรอบนอกเซลล์ (extracellular amorphous material) ซึ่งโครงสร้างที่อยู่บนพื้นผิวเซลล์เหล่านี้ เชื่อว่าเป็นปัจจัยก่อโรคซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการยึดเกาะ

ฟิมเบรียของแอคติโนแบซิลัสแอคติโนมัชชีเทมโคมิแทนส์มีลักษณะเหมือนแบคทีเรียชนิด แกรมลบอื่นๆ โดยฟิมเบรียของแอคติโนแบซิลัสแอคติโนมัชชีเทมโคมิแทนส์เป็นเส้นใยเล็กๆ (filamentous) ยื่นออกมาที่ผิวเซลล์ของเชื้อซึ่งมีความสัมพันธ์กับการยึดเกาะของแบคทีเรียกับเนื้อเยื่อของร่างกาย<sup>(130)</sup> ที่ฟิมเบรียจะพบเส้นขนเล็กๆเกาะอยู่มีความยาวมากกว่า 2 ไมครอน และมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 นาโนเมตร โดยทั่วไปแล้วเมื่อแยกเชื้อออกมาจากช่องปากจะพบว่าไม่มีฟิมเบรีย แต่ถ้าทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการจะไม่พบฟิมเบรีย ด้วยเหตุนี้จึงทำให้เชื้อผลิตโคโลนีได้ต่างกันโดยเชื้อที่มีฟิมเบรียจะผลิตโคโลนีที่ภายในมีรูปร่างลักษณะคล้ายดาว ส่วนเชื้อที่ไม่มีฟิมเบรียนั้นจะพบว่าโครงสร้างภายในของโคโลนีนั้นไม่พบรูปร่างลักษณะคล้ายดาว ซึ่งความต่างนี้มีความสัมพันธ์กับการยึดเกาะของแอคติโนแบซิลัสแอคติโนมัชชีเทมโคมิแทนส์ มีการศึกษาพบว่าแอคติโนแบซิลัสแอคติโนมัชชีเทมโคมิแทนส์สายพันธุ์ที่มีฟิมเบรียสามารถยึดเกาะกับเซลล์เยื่อผิวของหนูได้ดีกว่าไม่มีฟิมเบรีย มีการวิเคราะห์ในระดับชีวโมเลกุลพบว่าฟิมเบรียมีความสัมพันธ์โปรตีนโดยสามารถพบการแสดงของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 54 กิโลดาลตัน ในสายพันธุ์ที่มีฟิมเบรียแต่ไม่พบในสายพันธุ์ที่ไม่มีฟิมเบรีย และได้ทำการทดลองโดยใช้แอนติซีรัมที่ทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 54 กิโลดาลตัน พบว่าสามารถยับยั้งการยึดเกาะของแอคติโนแบซิลัสแอคติโนมัชชีเทมโคมิแทนส์ได้<sup>(131)</sup> การศึกษาระยะต่อมาพบว่าฟิมเบรียกับการยึดเกาะนั้นมีความสัมพันธ์กัน แต่อย่างไรก็ตามแอคติโนแบซิลัส แอคติโนมัชชีเทมโคมิแทนส์ที่ไม่มีฟิมเบรียก็ยังสามารถแสดงคุณสมบัติในการยึดเกาะได้โดยใช้โครงสร้างชนิดอื่นที่ทำหน้าที่ในการยึดเกาะดังจะกล่าวต่อไป<sup>(132-133)</sup>

นอกจากฟิมเบรียแล้วเชื้อชนิดนี้ยังมีลักษณะเด่นของพื้นผิวคือพบว่ามีเวสิเคิลหรือเบลบส์ (blebs) ซึ่งมี ไลโปโพลีแซคคาไรด์ เป็นส่วนประกอบพื้นฐานเพราะเป็นส่วนที่เชื่อมติดกับเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (outer membrane) เบลบส์จะถูกปล่อยออกมาเป็นจำนวนมาก ในสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการทำลายเม็ดเลือดขาว (leukotoxic) พบว่าจะมีเบลบส์สะสมบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกอยู่เป็น

จำนวนมาก ในทางตรงกันข้ามเชื้อสายพันธุ์ที่ไม่สามารถทำลายเม็ดเลือดขาวได้จะพบเบลบส์จำนวนน้อยหรือแทบไม่พบเลย<sup>(134)</sup> ดังนั้นหน้าที่ของเบลบส์จึงเสมือนเป็นพาหนะสำหรับการปล่อยสารพิษของแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์<sup>(135)</sup>

รวมทั้งสารเมื่อกรอบนอกเซลล์ซึ่งเป็นสารประเภทโปรตีนที่พบบนผิวเซลล์ มีลักษณะคล้ายไกลโคโปรตีนซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องกับการละลายของกระดูกและการยึดเกาะ จากการเพาะเลี้ยงแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์พบว่าเมื่อล้างเชื้อด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซโรไลน์ (phosphate-buffered saline) จะทำให้สารเมื่อกรอบนอกเซลล์ถูกกำจัดออกไป ส่งผลให้การยึดเกาะของเชื้อกับเซลล์เยื่อบุผิวเป็นไปได้น้อยลง ดังนั้นเมื่อมีปริมาณสารเมื่อกรอบนอกเซลล์บนพื้นผิวเซลล์ของแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์ มาก สามารถแสดงคุณสมบัติในการยึดเกาะได้เพิ่มขึ้น<sup>(136)</sup>

### ลักษณะทางชีวเคมีและการแบ่งกลุ่มตามไบโอไทป์

มีการศึกษาลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์ในสายพันธุ์ต่างๆที่แยกออกมาได้จากช่องปาก เชื้อสามารถสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) ลดไนเตรต (nitrate) ผลิตอัลคาลีนไลต์ (alkaline) และแอซิด ฟอสฟาเตส (acid phosphatase) และสามารถใช้และย่อยสลายน้ำตาลโมเลกุลคู่จำพวก ฟรุกโตส (fructose) กลูโคส (glucose) และแมนโนส (mannose) ให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวจำพวก เดกซ์ทริน มอลโตส และไซโลส นอกจากนี้บางสายพันธุ์สามารถให้น้ำตาล กาแลกโตส ได้ด้วย ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวใช้ในการกำหนดความแตกต่างของเชื้อตามลักษณะของไบโอไทป์ (biotype) การจำแนกความแตกต่างตามไบโอไทป์อธิบายครั้งแรกโดย คิง และทาทัม (King and Tatum)<sup>(137)</sup> โดยแบ่งเป็นกลุ่มที่สามารถย่อยสลายให้เป็นน้ำตาลกาแลกโตส แมนนิทอล (mannitol) และไซโลส มี 8 ไบโอไทป์<sup>(138)</sup> และกลุ่มที่ย่อยสลายให้เป็นน้ำตาลเดกซ์ทริน มอลโตส แมนนิทอล และไซโลส พบมี 10 ไบโอไทป์<sup>(16)</sup>

นอกจากนี้ปฏิกิริยาทางชีวเคมี ยังมีประโยชน์ในการแยกแยะระหว่างเชื้อแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์ กับ เชื้อที่มีความใกล้เคียงกันอย่างมาก คือ ฮีโมฟิลัส เฮโมฟิลัส (*Haemophilus aphrophilus*)<sup>(139)</sup> โดยฮีโมฟิลัส เฮโมฟิลัส มีรูปร่างใกล้เคียงกับแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์มาก แต่เป็นเชื้อซึ่งต้องการ ฮีมิน (hemin; X growth factor) และนิโคตินาไมด์ อะดีนีน ไดนิวคลีโอไทด์ (nicotinamide adenine dinucleotide; V growth factor) ในการเจริญเติบโต และสามารถเกิดปฏิกิริยาการกระตุ้นการเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นน้ำและออกซิเจน การเฟอร์เมนเตชันของน้ำตาลแลกโตส (lactose) แป้ง (starch) ซูโครส (sucrose) และทรีฮาโลส (trehalose) รวมทั้งการมีคุณสมบัติต้านทานต่อโซเดียม ฟลูออไรด์ (sodium fluoride resistance) ในทางตรงกันข้ามเชื้อ แอ

คติโนแบซิลลัสแอคตินอมัยซิเทมโคมิแทนส์สามารถเจริญเติบโตได้โดยไม่ต้องมีฮีมิน และนิโคตินาไมด์อะดีนีน ได นิวคลีโอไทด์

### ลักษณะตามส่วนประกอบของแอนติเจนและการแบ่งกลุ่มตามซีโรไทป์

การศึกษาในระยะแรกพบมี 3 ซีโรไทป์ (serotype) ได้แก่ ซีโรไทป์ เอ บี และซี<sup>(140)</sup> โดยซีโรไทป์ที่พบมากที่สุดในช่วงปากคือ เอ และบี อีกทั้งยังพบว่าซีโรไทป์บีจะมีความสัมพันธ์กับโรคปริทันต์อักเสบ รุกรานเฉพาะที่ (localized aggressive periodontitis) ในขณะที่ซีโรไทป์เอนั้นจะสัมพันธ์กับโรคปริทันต์อักเสบแบบรุนแรง ส่วนซีโรไทป์ซีนั้นพบเพียงร้อยละ 10 ในช่วงปาก และพบได้ในผู้ใหญ่ที่มีอวัยวะปริทันต์แข็งแรงดี ซีโรไทป์ซีมักพบเด่นในการติดเชื้อภายนอกช่องปาก การศึกษาในระยะต่อมาได้เพิ่มการจำแนกออกเป็น 6 ซีโรไทป์ คือ เอ บี ซี ดี อี และ เอฟ<sup>(141)</sup> และพบว่าโดยส่วนใหญ่แล้วผู้ป่วยจะมีการติดเชื้อเพียงซีโรไทป์เดียวเท่านั้น

### ปัจจัยก่อโรคของแอคตินอมัยซิเทมโคมิแทนส์ (Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*)

ปัจจัยก่อโรคเกี่ยวข้องกับแบคทีเรียคือทำให้แบคทีเรียสามารถหลบหลีกจากกลไกการป้องกันของร่างกายและทำให้แบคทีเรียเจริญเติบโตได้ และในกรณีที่ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายต่ำลงปัจจัยก่อโรคจะเป็นปัจจัยที่มีความเกี่ยวข้องกับการทำให้แบคทีเรียสามารถแพร่กระจายเข้าสู่ร่างกายได้

ปัจจัยก่อโรคของแอคตินอมัยซิเทมโคมิแทนส์ มีอยู่หลายปัจจัยซึ่งล้วนแต่ให้เชื้อสามารถดำรงชีวิตอยู่ในช่องปากโดยหลบหลีกจากกลไกการป้องกันของร่างกายได้ และปัจจัยเหล่านั้นยังเกี่ยวข้องกับการกำเนิดของโรคปริทันต์อักเสบด้วย พบว่าเชื้อจะมีความสามารถยึดติดได้ดีกับเมทริกซ์โปรตีนนอกเซลล์ซึ่งอยู่บริเวณใต้เยื่อเมือกและในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน โปรตีนส่วนใหญ่ของเมทริกซ์นอกเซลล์คือคอลลาเจน และบางส่วนเป็นโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจน ได้แก่ ไฟโบรเนคติน (fibronectin) และลามินิน (laminin) โดยเชื้อสามารถจับได้ดีกับคอลลาเจนชนิดที่ 1 2 3 และ 5 แต่ไม่สามารถจับกับคอลลาเจนชนิดที่ 4 โปรตีนในเยื่อหุ้มเซลล์ด้านนอก (outer membrane proteins) ของเชื้อจะมีองค์ประกอบที่จำเป็นสำหรับการยึดจับ แอคตินอมัยซิเทมโคมิแทนส์ สามารถจับกับไฟโบรเนคติน แต่ไม่สามารถจับกับพลาสมาโปรตีนได้ ซึ่งการจับจะมีความจำเพาะสูง รวมทั้งยังพบว่าเชื้อสามารถยึดจับกับเซลล์เยื่อเมือก และสามารถแทรกตัวเข้าสู่เซลล์เยื่อเมือกและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันได้ เมื่อเนื้อเยื่อปริทันต์เกิดพยาธิสภาพจากการตอบสนองต่อการบุกรุกของเชื้อโดยเริ่มจากการอักเสบของเหงือกและตามด้วยการทำลายของเอ็นยึดปริทันต์และกระดูกเบ้าฟัน ดังนั้นปัจจัยก่อโรคของแอคตินอมัยซิเทมโคมิแทนส์

เทมโคมิแทนส์สามารถแบ่งเป็น ปัจจัยก่อโรคที่ก่อให้เกิดการอักเสบ ปัจจัยที่เหนียวนำไปเกิดการทำลาย รวมถึงปัจจัยที่ยับยั้งการซ่อมแซมเนื้อเยื่อภายหลังเกิดพยาธิสภาพ ดังแสดงในตาราง 5

ตาราง 5 แสดงปัจจัยก่อโรคของ แอคติโนแบซิลัสแอคติโนมายซิเทมโคมิแทนส์

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

ที่มา: Fives-Taylor MP, Meyer HD, Mintz PK, Brissette C. (1999). Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Periodontol* 2000. 20:152.

### แบคทีริโอซิน

เป็นโปรตีนที่ผลิตโดยแบคทีเรียมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นได้ โดยแบคทีริโอซินที่แอคติโนแบซิลัสแอคติโนมายซิเทมโคมิแทนส์ผลิตขึ้นมา เรียกว่า แอคติโนแบซิลลิน (actinobacillin) นั้น มีบทบาทในการขัดขวางการเจริญเติบโตของสเตรปโตคอกคัส แซนควีซ (*Streptococcus sanquis*) และแอคติโนแบซิลัส วิสโคซัส (*Actinobacillus viscosus*) โดยทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของสเตรปโตคอกคัส แซนควีซ และแอคติโนแบซิลัส วิสโคซัส มีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติการให้สารผ่านเข้าออกเซลล์ทำให้สารต่างๆ หรืออิออนที่มีประจุที่อยู่ภายนอกเซลล์ซึมเข้าสู่ภายในเซลล์ได้มากขึ้นส่งผลให้ดีเอ็นเอ (DNA) อาร์เอ็นเอ (RNA) และโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของแบคทีเรานั้นถูกทำลาย

## สารที่ทำให้มีการละลายของกระดูก (Bone resorption)

โรคปริทันต์อักเสบพบมีการทำลายกระดูกที่รองรับฟัน มีการศึกษาว่าแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์สามารถกระตุ้นให้มีการละลายของกระดูกด้วยกลไกต่างๆหลายวิธี ได้แก่ ไลโปโพลีแซคคาไรด์ และสารที่อยู่บนผิวเซลล์ (surface-associated material) ซึ่งพบว่าเป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 64 กิโลดาลตัน ( 64 kDa GroEL protein) มีบทบาทในการกระตุ้นการทำงานของออสทีโอคลาส (osteoclast) ทำให้มีการละลายของกระดูก และพบว่ากลไกนี้จะแตกต่างจากการกระตุ้นโดยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อชนิดนี้ รวมทั้งการยับยั้งกระบวนการในการละลายของกระดูกของโปรตีนชนิดดังกล่าวจะไม่สามารถยับยั้งได้โดยใช้ อินโดเมทาซิน (indomethacin) หรือ การใช้ตัวแย่งจับกับ อินเตอร์ลิวคิน-วัน รีเซพเตอร์ (IL-1 receptor antagonist)<sup>(142)</sup> นอกจากนี้ยังพบว่าในสถานะที่โปรตีนชนิดนี้มีความเข้มข้นต่ำจะสามารถเหนี่ยวนำให้มีการเจริญ (proliferation) ของเซลล์เยื่อเมือก แต่ในสถานะที่มีความเข้มข้นสูงกลับเป็นพิษต่อเซลล์เยื่อเมือก<sup>(143-144)</sup>

## คอลลาจีเนส

เมทริกซ์ภายนอกเซลล์ส่วนใหญ่ประกอบด้วยคอลลาเจน การเกิดโรคปริทันต์พบว่าปริมาณของเส้นใยคอลลาเจนมีน้อยลง การทำหน้าที่ของคอลลาจีเนสมีความสัมพันธ์กับเชื้อที่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพของการเกิดโรคที่สำคัญ 2 ชนิด คือ แอกติโนแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์ และพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาริส<sup>(145)</sup> เชื่อว่าการที่คอลลาเจนถูกทำลายนั้นเกี่ยวข้องกับการที่แบคทีเรียที่อยู่บริเวณเนื้อเยื่อที่เกิดพยาธิสภาพปล่อยคอลลาจีเนสออกมาแล้วมีผลโดยตรงในการทำลายคอลลาเจนที่อยู่ในเนื้อเยื่อปริทันต์จนทำให้เกิดโรคปริทันต์ แต่ในปัจจุบันนี้เป็นที่ยอมรับกันแล้วว่าสาเหตุสำคัญของการที่คอลลาเจนถูกทำลายนั้นมาจากการที่เซลล์ในเนื้อเยื่อบริเวณที่มีการอักเสบ ได้แก่ โพลีมอร์โฟนิวเคลียร์เซลล์ และไฟโบรบลาสต์ ตอบสนองต่อเชื้อหรือสารหลังจากเชื้อทำให้ปล่อยคอลลาจีเนสออกมา<sup>(146)</sup> ซึ่งคอลลาจีเนสที่เซลล์ปล่อยออกมานั้นเป็นที่ทราบกัน คือ MMP-1 และ MMP-8

## ไซโตท็อกซิน

มีการศึกษาเกี่ยวกับ ฮีท-เลอเบิล ไซโตท็อกซิน (heat-labile cytotoxin) ที่ผลิตโดยแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์เป็นไซโตท็อกซินที่มีความจำเพาะ และเป็นปัจจัยก่อโรคชนิดหนึ่งที่มีผลต่อไฟโบรบลาสต์ ได้แก่ ไซโตท็อกซินที่ปล่อยออกมาในสารหลังจากเชื้อ เมื่อแยกออกมาแล้วพบว่าเป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 50 กิโลดาลตัน ซึ่งสามารถยับยั้งการผลิตดีเอ็นเอในไฟโบรบลาสต์<sup>(147)</sup> หรือไซโตท็อกซินที่อยู่บนผิวเซลล์มีความเข้มข้นต่ำเป็นโปรตีนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 8 กิโลดาลตัน พบว่าสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไฟโบรบลาสต์ได้<sup>(148)</sup>

## ลิวโคท็อกซิน

แอกติโนแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์ผลิตแอนติเจนโปรตีน (116 kDa immunomodulating protein antigen) ที่เรียกว่าลิวโคท็อกซิน เป็นพอร์-พอร์มมิงโปรตีน (pore-forming protein) ซึ่งเป็นสารเป็นพิษชนิดหนึ่งจากแบคทีเรีย การศึกษาของแฮมบุนและคณะพบว่าร้อยละ 55 ของผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบรุนแรงเฉพาะที่พบมีการติดแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์สายพันธุ์ที่สามารถผลิตลิวโคท็อกซินได้<sup>(149)</sup> โดยสามารถย่อยโพลีเมอร์ฟิโนวเคลียร์ ลิวโคไซด์ ได้ ลิวโคท็อกซินไม่ได้หลั่งออกมาจาก แอกติโนแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์แต่ยึดอยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์<sup>(150)</sup> มีการศึกษาแสดงให้เห็นว่าลิวโคท็อกซินสามารถทำลายนิวโทรฟิลล์ โพลีเมอร์ฟิโนวเคลียร์ ลิวโคไซด์ และเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันอื่นๆ ได้แก่ ทีเซลล์ โดยการทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดการสูญเสียความสมดุลของสารที่ผ่านเข้าออกเซลล์และทำให้เซลล์ตาย (necrosis) ในที่สุด การที่ลิวโคท็อกซินสามารถทำลายเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันได้เป็นผลให้ร่างกายไม่สามารถควบคุมการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ทำให้มีการปล่อยเอ็นไซม์หลายชนิด ส่งผลให้มีการอักเสบและนำไปสู่การทำลายของเนื้อเยื่อ นอกจากนี้มีการศึกษาเกี่ยวกับลิวโคท็อกซินจากแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์พบว่าลิวโคท็อกซินจากแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์ซีโรไทป์บีสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดตายแบบอะปอโตซิส ในเซลล์โปรไมยอิลไลต์ (promyelocytic cell) และเมื่อศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่าซีโรไทป์บีสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดตายแบบอะปอโตซิสได้มากกว่าซีโรไทป์เอ ส่วนซีโรไทป์ซีพบว่าจะไม่เหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะปอโตซิสเลย<sup>(151)</sup>

## เอ็นไซม์ย่อยสลายโปรตีนที่เชื่อมปลดปล่อยออกนอกเซลล์ (Extracellular proteolytic enzyme)

มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับเอ็นไซม์ในกลุ่มที่เป็นทริปซิน-ไลค์ โปรตีโอไลติค เอ็นไซม์ (trypsin-like proteolytic enzyme) ของแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์ซึ่งพบว่ามีความสัมพันธ์กับสถานะทางคลินิกของรอยโรคปริทันต์อักเสบ<sup>(152)</sup> และยังพบว่าเอ็นไซม์ในกลุ่มนี้สามารถลดการเพิ่มจำนวนของเซลล์เยื่อผิวของเหงือกในการเพาะเลี้ยง<sup>(153)</sup> นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในห้องทดลองที่แสดงว่าพบเอ็นไซม์ย่อยสลายโปรตีนอื่นๆ ที่ แอกติโนแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์ ปลดปล่อยออกมา มีผลในการย่อยสลาย ไอจีจี (IgG) ไอจีเอ (IgA) ไอจีเอ็ม (IgM)<sup>(154)</sup> ซึ่งกระบวนการย่อยสลายโปรตีนโดยเอ็นไซม์เหล่านี้จึงเท่ากับเป็นการรบกวนระบบการควบคุมของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกาย

## ไลโปโพลีแซคคาไรด์ หรือ แอลพีเอส

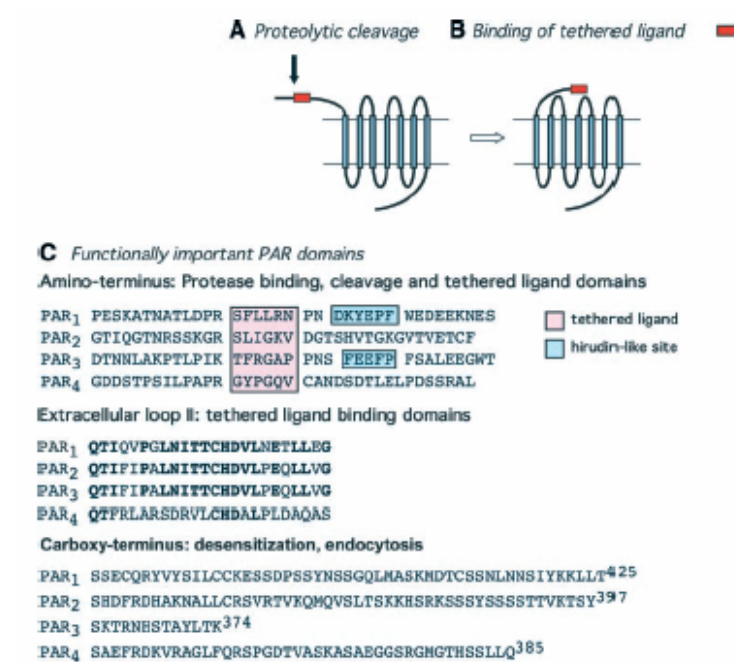
แอลพีเอสซึ่งเป็นเอ็นโดท็อกซิน (endotoxin) จัดเป็นปัจจัยก่อโรคที่สำคัญมากที่ก่อให้เกิดการทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อปริทันต์ ในกลไกการเกิดโรคปริทันต์อักเสบ แอลพีเอสของแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์สามารถกระตุ้นเซลล์ร่างกายโดยเฉพาะอย่างยิ่ง คือ โมโนไซต์ และมาโครฟาจให้มีการผลิตไซโตไคน์ของการอักเสบ เช่น อินเตอร์ลิวคิน-วันและ ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ ทำให้เกิดการอักเสบและเกิดการละลายของกระดูก<sup>(155)</sup> โดยมีการอธิบายว่าเมื่อมาโครฟาจเคลื่อนตัวไปยังบริเวณที่มีการติดเชื้อ แอลพีเอสของเชื้อจะเป็นตัวกระตุ้นให้มาโครฟาจผลิตไซโตไคน์เหล่านั้นออกมาเพิ่มขึ้นไปมีผลกระตุ้นการทำงานของออสติโอคลาสต่อไป

## ปัจจัยที่ยับยั้งระบบภูมิคุ้มกัน (Immunosuppressive factors)

แม้ว่าระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายจะเป็นกลไกการป้องกันของร่างกายมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการสะสมของแบคทีเรียในคราบจุลินทรีย์ก็ตาม แต่พบว่า แอกติโนแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์จะมีปัจจัยก่อโรคหลายอย่างที่สามารยับยั้งหรือรบกวนกลไกการป้องกันของร่างกาย ซึ่งได้แก่การที่เชื้อสามารถผลิตเอ็นไซม์ที่สามารถยับยั้งการสร้าง ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ และโปรตีนในทีเซลล์<sup>(156)</sup>

## พาร์: คุณสมบัติและหน้าที่

มีรายงานการศึกษาพบว่าพาร์เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค<sup>(157)</sup> โดยพบว่าเป็นโมเลกุลที่อยู่บนผิวเซลล์ทำหน้าที่เป็นตัวรับที่เรียกว่า โปรตีเอสแอกติเวเตดรีเซพเตอร์ (Protease-activated receptors) หรือเรียกย่อๆ ว่า พาร์ (PARs) มีรายงานการศึกษาพบว่าพาร์อยู่ในกลุ่มเดียวกับจีโปรตีนคัปเปิล (G-protein-coupled) คือเป็นตัวรับจำเพาะซึ่งประกอบด้วย 7 โดเมน ที่พาดผ่านผนังเซลล์ พาร์จะทำหน้าที่ได้ก็ต่อเมื่อมีเอ็นไซม์โปรตีเอสมาตัดสายโมเลกุลของกรดอะมิโนที่บริเวณเอ็นเทอร์มินอลโดเมน (N-terminal domain) เป็นผลให้เกิดการแสดงออกของลำดับโมเลกุลของกรดอะมิโนที่เรียก เทอแอร์ ไลแกนด์(tethered ligand) ซึ่งสามารถทำให้พาร์ทำหน้าที่ได้ซึ่งจะเป็นการเริ่มต้นของการส่งสัญญาณไปสู่ภายในเซลล์ (signal transduction)<sup>(23)</sup> โดยเทอแอร์ ไลแกนด์จะไปจับกับโดเมนส่วนที่อยู่ภายนอกเซลล์ที่บริเวณลูปที่ 2 ดังภาพประกอบ 3



ภาพประกอบ 3 แสดงโครงสร้างและหน้าที่ของโดเมนที่เป็นส่วนประกอบของพาร์ โดยแสดงการเรียงตัวของโดเมน ทั้ง 4 ชนิด ภาพ a-b แสดงกลไกของการตัด และการจับของเทรเชอร์ไลแกนด์กับโดเมนส่วนที่อยู่ภายนอกเซลล์ ภาพ c แสดงหน้าที่ที่สำคัญของโดเมนพาร์ โดยแสดงลำดับของกรดอะมิโนที่อยู่ในบริเวณส่วนปลายของสายโมเลกุล ลูปที่ 2 ที่อยู่ภายนอกเซลล์

ที่มา: Ossovskaya VS. Bunnet NW. (2004). Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Rev.*84: 582.

พาร์มีสมาชิกทั้งหมด 4 ชนิดซึ่งได้จากการแยกแยะโดยใช้การคัดลอกโมเลกุล (molecular cloning) ซึ่งประกอบด้วย พาร์-1, พาร์-2, พาร์-3, พาร์-4 ดังตาราง 6

ตาราง 6 แสดงสมาชิกของพาร์ เอ็นไซม์ที่กระตุ้นการทำงานและยับยั้งการทำงาน ตำแหน่งที่ถูกเอ็นไซม์ตัด รวมทั้งบริเวณและบทบาทของพาร์

	PAR <sub>1</sub>	PAR <sub>2</sub>	PAR <sub>3</sub>	PAR <sub>4</sub>
Activating proteases	Thrombin FXa APC Granzyme A Gingipains-R Trypsin	Trypsin Tryptase FVIIa FXa MT-SP1 Proteinase-3 Acrosien Der P3 D9 Gingipains-R Elastase Cathepsin G	Thrombin	Thrombin Trypsin Cathepsin G Gingipains-R
Inactivating proteases	Cathepsin G Plasmin Elastase Proteinase-3		Cathepsin G	
Cleavage site AP	Trypsin LDPR <sup>dl</sup> ↓ S <sup>42</sup> PILLRN SFLLRN TFLLRN	SKGR <sup>3d</sup> ↓ S <sup>56</sup> LIGKV SLIGKV	LPIK <sup>3a</sup> ↓ T <sup>20</sup> FRGAP None	PAPR <sup>47</sup> ↓ G <sup>45</sup> YPGQV GYPGQV AYPGKF
Localization	Platelets (human), endothelium, epithelium, fibroblasts, myocytes, neurons, astrocytes	Epithelium, endothelium, fibroblasts, myocytes, neurons, astrocytes	Platelets (mouse), endothelium, myocytes, astrocytes	Platelets (human), endothelium, myocytes, astrocytes
Phenotype of knockout	Partial embryonic lethality, vascular matrix deposition after injury	Impaired leukocyte migration; impaired allergic inflammation of airway, joints, kidney	Protection against thrombus formation/ pulmonary embolism	Protection against thrombus formation/ pulmonary embolism

ที่มา: Ossovskaya VS. Bunnet NW. (2004). Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Rev*.84: 581.

จากตารางจะพบว่าแม้ว่าลักษณะทางโครงสร้างและกลไกในการทำงานของพาร์แต่ละชนิดนั้นจะเหมือนกันแต่พาร์ได้ในเนื้อเยื่อที่ต่างกันและมีหน้าที่ต่างกัน โดยสามารถพบพาร์-1 ที่เกล็ดเลือดของมนุษย์ เยื่อบุผนังหลอดเลือด เยื่อบุผิว เซลล์สร้างเส้นใย เซลล์กล้ามเนื้อ และเซลล์ประสาท พาร์-1 มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการสะสมเมทริกซ์ในหลอดเลือดภายหลังการเกิดบาดแผล พาร์-3 และพาร์-4 พบได้ที่เกล็ดเลือด เยื่อบุหลอดเลือด เซลล์ของเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ และเซลล์รูปดาว มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการสร้างก้อนเลือด (thrombus) และการเกิดก้อนเลือดอุดตันในปอด (pulmonary embolism)<sup>(23)</sup> ส่วนพาร์-2 นั้นพบได้ทุกส่วนของร่างกาย โดยเฉพาะพบในเยื่อบุผิว เยื่อบุหลอดเลือด เซลล์สร้างเส้นใย เซลล์สร้างกระดูก (osteoblasts) เซลล์เม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิล (neutrophils) เซลล์ของเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ เซลล์ประสาท และเซลล์รูปดาว<sup>(26-27)</sup> มีการศึกษาพบว่าบทบาทของพาร์-2 มีความเกี่ยวข้องกับพยาธิวิทยาของการเกิดโรค โดยเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของเม็ดเลือดขาวผ่านผนังหลอดเลือด (leukocyte migration) การอักเสบของข้อต่อ ผิวหนัง และไต รวมถึงการอักเสบที่เกี่ยวข้องกับโรคภูมิแพ้ของทางเดินหายใจ นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถทำให้หลอดเลือดผ่อนคลาย (blood vessel relaxation) ความดันโลหิตต่ำ (hypotension) เพิ่มความสามารถในการซึมผ่านสารของหลอดเลือด (vascular permeability) ทำให้มีการแทรกซึมของแกรนูโลไซต์ (granulocyte infiltration)

## พาร์-2 และการอักเสบ (PAR-2 and inflammation)<sup>(36)</sup>

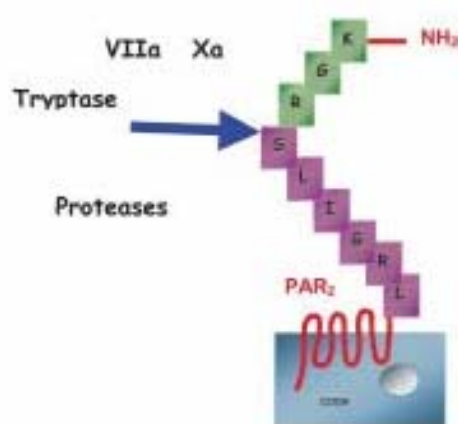
ความเกี่ยวข้องของพาร์-2 ในการอักเสบนั้นมีการศึกษาที่สนับสนุนมากมาย โดยการศึกษาเมื่อไม่นานมานี้พบว่าสารอักเสบเช่น ทุเมออร์เนคโคโรซิสแฟคเตอร์แอลฟา อินเตอร์ลิวคิน-วัน และไลโปโพลีแซคคาร์ไรด์<sup>(158)</sup> สามารถเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของพาร์-2 เพิ่มขึ้น นอกจากนี้การสูญเสียพาร์-2 ยังมีผลทำให้การอักเสบที่เกิดบริเวณทางเดินหายใจและข้อต่อเกิดได้น้อยลง<sup>(159-160)</sup> และมีการศึกษาที่แสดงว่าการกระตุ้นการทำงานของพาร์-2 สามารถทำให้หลอดเลือดคลายตัว ทำให้ความดันโลหิตต่ำ เพิ่มความสามารถของหลอดเลือดในการซึมผ่านของสาร ทำให้แกรนูโลไซต์แทรกซึมได้ดี และช่วยในการยึดเกาะและการเคลื่อนตัวของลิวโคไซด์ ทำให้เกิดความเจ็บปวด<sup>(29, 161-162)</sup> การกระตุ้นการทำงานของพาร์-2 สามารถทำให้เซลล์เยื่อบุผิวและเซลล์ที่ไม่ใช่เป็นเซลล์เยื่อบุผิว (non-epithelial cell) ปลดปล่อยพรอสตาโนอิด (prostanoids) และไซโตไคน์ ซึ่งรวมถึงอินเตอร์ลิวคิน-6 และ -8 (IL-6, IL-8)<sup>(25,26)</sup> และเมื่อไม่นานมานี้ได้พบว่าเอ็นไซม์ที่พบในลำไส้ใหญ่ซึ่งเป็นเอ็นไซม์ที่กระตุ้นการทำงานของพาร์-2 ได้แก่ ทริปซิน, ทริปเทรส เป็นเอ็นไซม์ที่ทำให้เกิดกระบวนการอักเสบ<sup>(163)</sup> และจากการศึกษาดังกล่าวทำให้ทราบถึงบทบาทของพาร์-2 ว่ามีบทบาทเกี่ยวข้องกับการควบคุมการอักเสบ

## บทบาทของพาร์-2 เกี่ยวกับโรคปริทันต์อักเสบ<sup>(36)</sup>

ความเป็นไปได้เกี่ยวกับพาร์-2 ที่มีความเกี่ยวข้องกับการอักเสบเรื้อรังในช่องปากโดยเฉพาะโรคปริทันต์อักเสบนั้นมีรายงานการศึกษาจำนวนมากที่ได้กล่าวถึง ได้แก่ การศึกษาของลัวบาคอส และคณะ (Lourbakos et al.) ปี 2001<sup>(25)</sup> พบว่าจึงจีเพนซึ่งเป็นโปรตีนที่ผลิตจากพอร์ไฟโรโมแนสจึงจีวาลิส เป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคปริทันต์อักเสบ นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกของพาร์-2 ได้ในออสทีโอเบลาสต์ เยื่อบุผิวในช่องปาก และเซลล์สร้างเส้นใยในเนื้อเยื่อเหงือกของมนุษย์<sup>(25-27)</sup> โดยการศึกษาของลัวบาคอสพบว่าจึงจีเพนสามารถกระตุ้นพาร์-2 ที่อยู่ในเซลล์เยื่อบุผิวช่องปากหลังไซโตไคน์ ได้แก่ อินเตอร์ลิวคิน-6 ซึ่งสามารถกระตุ้นให้ออสทีโอคลาสเกิดการเปลี่ยนแปลงและทำให้เกิดการละลายของกระดูก และการศึกษาของอุเอฮาระ และคณะ (Uehara et al.) ปี 2003<sup>(27)</sup> พบว่าสารสังเคราะห์ที่สามารถจับกับพาร์-2 (synthetic PAR-2 agonist peptide) สามารถกระตุ้นเซลล์สร้างเส้นใยในเนื้อเยื่อเหงือกผลิตอินเตอร์ลิวคิน-8 และยังกระตุ้น MMP ที่ผลิตจากเซลล์สร้างเส้นใยสามารถทำหน้าที่ได้ การศึกษาของชุงและคณะ (Chung et al.) ปี 2004<sup>(164)</sup> เมื่อไม่นานมานี้แสดงให้เห็นว่าพาร์-2 เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นเบต้าดีเฟนซิน (beta-defensin) ที่ผลิตขึ้นจากเซลล์เยื่อบุผิวเหงือก โดยเบต้าดีเฟนซินเป็นเปปไทด์ที่มีประจุบวกมีคุณสมบัติในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งในการศึกษานี้พบว่า เป็นจุดเริ่มต้นที่ทำให้เห็นถึงความเป็นไปได้ของบทบาทของพาร์-2 มีความเกี่ยวข้องกับการอักเสบ การที่พาร์ได้รับการกระตุ้นนั้นจะเป็นเสมือนกลไกฉุกเฉิน ที่บอกว่ามีการรุกรานของแบคทีเรียก่อโรคและเป็น

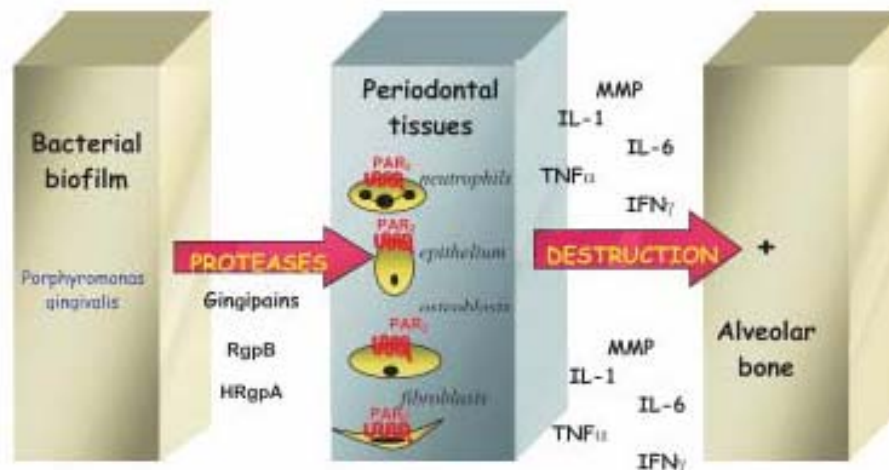
จุดเริ่มต้นของการตอบสนองของการอักเสบ การศึกษาดังกล่าวข้างต้นเป็นการศึกษาที่กล่าวถึงบทบาทการทำงานของพาร์-2 ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบและการละลายของกระดูกในขณะที่มีการดำเนินไปของโรคปริทันต์อักเสบ อย่างไรก็ตามมีบางรายงานการศึกษา ได้แก่ การศึกษาของสมิธ และคณะ (Smith et al.) ปี 2004<sup>(165)</sup> ได้แสดงให้เห็นว่า เปปไทด์ที่สามารถตัดลำดับของกรดอะมิโนบริเวณ SLIGRL-NH<sub>2</sub> ของพาร์-2 สามารถยับยั้งการละลายของกระดูก ซึ่งให้ผลตรงกันข้ามกับการศึกษาที่กล่าวมา

การศึกษาของ ฮอลส์เฮาเซน และคณะ (Holzhausen et al.)<sup>(36)</sup> ซึ่งศึกษาบทบาทการทำงานของพาร์-2 แสดงให้เห็นว่าเมื่อให้เปปไทด์ที่สามารถตัดลำดับของกรดอะมิโนบริเวณ SLIGRL-NH<sub>2</sub> ของพาร์-2 เฉพาะตำแหน่งในช่องปากของหนูทดลองพบว่า เป็นสาเหตุให้มีการแทรกซึมของแกรนูโลไซต์ และเกิดโรคปริทันต์อักเสบโดยผ่านกลไกที่เกี่ยวข้องกับการปลดปล่อยของพรอสตาแกลนดินและการกระตุ้นการทำงานของเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส นอกจากนี้ 7 วันหลังจากที่ให้เปปไทด์ไปพบว่ามีการแทรกซึมของแกรนูโลไซต์สูง (วัดโดยดูการเพิ่มขึ้นของไมยอีโลเปอร์ออกซิเดส (myeloperoxidase)) เมื่อมีการปรากฏของโพลีมอร์โฟนิวเคลียร์นิวโทรฟิล ซึ่งเป็นแหล่งสำคัญสำหรับไมยอีโลเปอร์ออกซิเดสในการอักเสบเฉียบพลัน และส่งเสริมให้มีการตอบสนองของการอักเสบโดยทำให้มีการหลั่งของสารอักเสบที่สามารถกระตุ้นออสทีโอคลาส การศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นได้ว่าการอักเสบและการทำลายกระดูกเป็นบทบาทของพาร์-2 ในโรคปริทันต์ และโปรตีเนสซึ่งอาศัยการทำงานของพาร์-2 ควรเป็นสื่อชนิดหนึ่งที่สำคัญในการก่อโรคปริทันต์ ดังภาพประกอบ 4 และ 5



ภาพประกอบ 4 แสดงเอ็นไซม์ที่กระตุ้นกลไกการทำงานของพาร์-2 ซึ่งได้แก่ ทริปซิน ทริปเตส โคแอกกูเลชัน แฟคเตอร์ (coagulation factor VIIa and Xa) และโปรตีเอสที่แบคทีเรียผลิต ซึ่งรวมถึง จิงจิเพนที่ผลิตโดยพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวัลิส สามารถตัดลำดับกรดอะมิโนบริเวณเอ็น เทอร์มินอล ของพาร์-2 ที่ตำแหน่งจำเพาะ ดังลูกศรชี้

ที่มา: Holzhausen M, Spolidorio LC, Vergnolle N. (2005). Role of protease-activated receptor-2 in inflammation, and its possible implications as a putative mediator of periodontitis. *Men Inst Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro.* 100(1): 178.



ภาพประกอบ 5 ความเป็นไปได้ในการมีส่วนร่วมของพาร์-2 ในการเกิดโรคปริทันต์อักเสบ โปรตีเอส รวมถึงจิงจิเพนที่ผลิตโดยพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวัลิส เป็นเอ็นไซม์ที่เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังสามารถกระตุ้นพาร์-2 ที่อยู่บนผิวเซลล์ของนิวโทรฟิล เซลล์เยื่อช่องปาก ออสทีโอเบลาสต์ และไฟโบรบลาสต์ของเนื้อเยื่อเหงือกทำให้มีการผลิตสารอักเสบต่างๆ ได้แก่ อินเตอร์ลิวคิน, ทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์แอลฟา, อินเตอร์เฟอรอนแกมมา (interferon-gamma: IFN $\gamma$ ), เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส ซึ่งสามารถทำลายอวัยวะปริทันต์

ที่มา: Holzhausen M, Spolidorio LC, Vergnolle N. (2005). Role of protease-activated receptor-2 in inflammation, and its possible implications as a putative mediator of periodontitis. *Men Inst Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro.* 100(1): 179.

ดังนั้นความสัมพันธ์ของพาร์-2 กับพยาธิสภาพของการเกิดโรคปริทันต์อักเสบสามารถสรุปได้ 3 ประการ คือ พาร์-2 ถูกกระตุ้นได้โดยปัจจัยที่ผลิตจากแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์ที่สำคัญได้แก่พอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวัลิส และพาร์-2 สามารถพบได้ที่เซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคปริทันต์ ได้แก่ เซลล์เยื่อบุผิว ไฟโบรบลาสต์ และออสทีโอบลาสต์ ซึ่งบทบาทการทำงานของพาร์-2 นั้นทำให้มีการผลิตไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องในการทำลายกระดูก และประการสุดท้ายคือ การกระตุ้นการทำงานของพาร์-2 โดยเปปไทด์ที่สังเคราะห์ขึ้นเป็นสาเหตุให้มีการแทรกซึมของแกรนูโลไซต์ และมีการสูญเสียของกระดูกเข้าฟันโดยผ่านกลไกที่เกี่ยวข้องกับการปลดปล่อยของพรอสตาแกลนดินและการกระตุ้นการทำงานของเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส

### สารหลังจากแอคติโนแบซิลัสแอคติโนมายซิเทมโคมิแทนส์ ที่มีผลต่อเนื้อเยื่อปริทันต์

การศึกษาเกี่ยวกับสารหลังจากแอคติโนแบซิลัสแอคติโนมายซิเทมโคมิแทนส์ มีไม่มากนักและจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสารหลังจากที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียชนิดนี้ มีสารที่เป็นพิษซึ่งสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวน (proliferation) ของไฟโบรบลาสต์ และพบว่าความเป็นพิษของสารหลังจากแบคทีเรียชนิดนี้มากกว่าแบคทีเรียชนิดแกรมลบที่มีรูปร่างเป็นแท่ง ได้แก่ พรีโวเทลลา ไนเกรสเซนส์ (*Prevotella ingrescens*) และ แคปโนไซโตฟากา โอคราเซีย (*Capnocytophaga ochracea*) โดยพิจารณาจากการเจือจางของสารหลังจากเชื้อทั้งสามชนิดพบว่าแอคติโนแบซิลัสแอคติโนมายซิเทมโคมิแทนส์ มีการเจือจางของสารหลังจากเชื้อมากกว่าสองชนิดดังกล่าว (ในอัตราส่วน 1:1000) แต่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของไฟโบรบลาสต์ได้ทั้งหมด ในขณะที่เชื้ออีกสองชนิดมีการเจือจางสารหลังจากเชื้อน้อยกว่า (ในอัตราส่วน 1:10) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของไฟโบรบลาสต์ได้เพียงร้อยละ 25 เท่านั้น<sup>(143)</sup> นอกจากนี้ได้มีการศึกษาพบว่าในสารหลังจากแอคติโนแบซิลัสแอคติโนมายซิเทมโคมิแทนส์ สามารถพบเอ็นไซม์ทริปซินไลโคโปรตีนเอส มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50 กิโลดาลตัน ซึ่งบทบาทของเอ็นไซม์ชนิดนี้อาจเป็นปัจจัยก่อโรคที่สำคัญที่ทำให้โรคปริทันต์มีความรุนแรงมากขึ้นโดยสามารถทำลายองค์ประกอบของเนื้อเยื่อปริทันต์ได้โดยตรง ได้แก่ คอลลาเจนชนิดที่ 1 และ ไฟโบรเนคติน<sup>(144)</sup> นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนอยู่ชนิดหนึ่งซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 37 กิโลดาลตัน เป็นไกลโคโปรตีนที่ชอบน้ำและอยู่ในสภาวะที่เป็นกรด ในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบสามารถตรวจพบโปรตีนชนิดนี้ได้สูงกว่าผู้ที่มีสภาวะปริทันต์ปกติ โปรตีนนี้สามารถเหนี่ยวนำให้มาโครฟาจของหนูสามารถหลั่งไซโตไคน์ พวกอินเตอร์ลิวคิน-วันเบตา อินเตอร์ลิวคิน-ซิกซ์ และทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-แอลฟา ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิดการทำลายกระดูก นอกจากนี้ในทางกลับกันอินเตอร์ลิวคิน-ซิกซ์ ยังสามารถเหนี่ยวนำให้โปรตีนชนิดนี้สามารถทำหน้าที่ได้ดีกว่าไลโปไลสแซคคาไรด์<sup>(145)</sup>

รวมทั้งการศึกษาล่าสุดของตีรณธนากุล และคณะ<sup>(169)</sup> พบว่าเมื่อเลี้ยงเซลล์เอ็นดีปรีทันต์ร่วมกับส่วนลอยของอาหารเลี้ยงแควติโนแบซิลัสแควติโนมายซีเทมโคมิแทนส์ ทำให้ระดับของMMP-2 ในรูปแควทีฟฟอร์มเพิ่มขึ้น ซึ่งมีผลเกี่ยวข้องกับการทำลายคอลลาเจนที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อปรีทันต์ดังนั้นผลการศึกษาทั้งหมดข้างต้นจึงเป็นที่มาของการนำส่วนลอยของอาหารเลี้ยงแควติโนแบซิลัสแควติโนมายซีเทมโคมิแทนส์มาศึกษาวิจัยเพื่อให้ได้เห็นว่าคุณสมบัติของอาหารเลี้ยงแควติโนแบซิลัสแควติโนมายซีเทมโคมิแทนส์ มีความสำคัญเกี่ยวข้องกับการมีส่วนร่วมในการเกิดโรคปรีทันต์อักเสบ

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ดำเนินการตามขั้นตอนดังนี้

1. การกำหนดกลุ่มตัวอย่าง
2. การสร้างเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย
  - 2.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย
  - 2.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์เอ็นอีคปริทันต์
  - 2.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือก
3. วิธีการวิจัย
  - 3.1 การเลี้ยงเซลล์เอ็นอีคปริทันต์ และเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกในสภาวะที่ไม่ได้รับการกระตุ้น
  - 3.2 การกระตุ้นเซลล์เอ็นอีคปริทันต์ที่เพาะเลี้ยงด้วยส่วนลอกจากแอกติโนแบซิลัส แอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์ และส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมนเนสจิงจิवालิส
  - 3.3 การวิเคราะห์การแสดงออกของพาร์-2.
    - 3.3.1 วิเคราะห์การแสดงออกของยีนพาร์-2 ในระดับเมซเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอ ด้วยวิธีรีเวอร์สทรานสคริปเทส-โพลีเมอเรส เซน รีแอคชัน (reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)
    - 3.3.2 วิเคราะห์โปรตีนพาร์-2 ในเซลล์ที่ทำให้แตก ด้วยวิธีเวสต์เทิร์นบลอต (Western blot analysis)  
โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง
4. วิเคราะห์ข้อมูล

ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

#### การกำหนดกลุ่มตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาวิจัยแบ่งเป็น 3 กลุ่ม

1. เซลล์เอ็นอีคปริทันต์ของมนุษย์และเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดDMEM (Dulbecco Modified Eagle's Medium) ที่เติมสารประกอบดังต่อไปนี้ คือ ซีรัมจากฟัตัสของวัวร้อยละ 5 (5% Fetal calf serum) กลูตามีน 2

มิลลิโมลาร์ (L-Glutamine) เพนนิซิลิน 100 ยูนิต/มิลลิลิตร (100 IU/ml Penicillin) สเตรปโตมัยซิน 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (100 µg/ml Streptomycin) และ แอมโฟเทอริซิน บี 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (5 µg/ml Amphotericin B)

2. เซลล์เอ็นยัดปริพันธ์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัมซึ่งมีแลคทอลบูมิน ไฮโดรไลเซท ร้อยละ 0.02 (0.02% lactalbumin) (Sigma Chemical Co.) ร่วมกับ ส่วนล่อยของอาหารเลี้ยงแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ โดยมีกลุ่ม ควบคุมเป็นเซลล์เอ็นยัดปริพันธ์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัมซึ่งมีแลค ทอลบูมินเป็นส่วนประกอบ ร้อยละ 0.02 ร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด TSB (tryptone soya broth) (TSB; Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England.) ที่ความเข้มข้น ต่างกัน คือ 1:10 1:5 และ 1:3
3. เซลล์เอ็นยัดปริพันธ์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัมซึ่งมีแลคทอลบูมิน เป็นส่วนประกอบ ร้อยละ 0.02 ร่วมกับส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิ วาลิส ที่มีอัตราส่วนที่ต่างกัน คือ 1.25 2.5 และ 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีกลุ่ม ควบคุมเป็นเซลล์เอ็นยัดปริพันธ์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัมซึ่งมีแลค ทอลบูมินเป็นส่วนประกอบ ร้อยละ 0.02 ร่วมกับ PBS (Phosphate buffer saline) ซึ่งเป็นสารที่เป็นตัวทำละลายของส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อเท่านั้นในความเข้มข้น เท่ากับส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิ วาลิส 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

## การสร้างเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

### การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

#### 1. การเพาะเลี้ยงแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์

การเพาะเลี้ยงเชื้อจะทำวิธีเดียวกับการวิจัยของ ตริรัตนากุล และคณะ<sup>(169)</sup> ซึ่งสรุปได้ดังนี้ เพาะเลี้ยงแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ (ATCC 43718) ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด TSB (tryptone soya broth) (TSB; Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England.) ที่มีสารสกัดจากยีสต์ ร้อยละ 1 (yeast extract 1%) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเลี้ยงในตู้อบที่มีปริมาณ คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5

นำอาหารเลี้ยงเชื้อไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย Spectrophotometer ที่ค่าความยาวคลื่นแสง 660 นาโนเมตร จนได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.6 ถึง 0.7 จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปเหวี่ยงด้วย เครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลางที่ระดับความเร็ว 10,000g เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อแยกส่วนของเชื้อออกจากส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อที่เก็บได้จะถูกนำไปกรองด้วย

แผ่นกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.2 ไมโครเมตร เพื่อกำจัดเอาส่วนของเชื้อที่ยังหลงเหลืออยู่ออกให้หมด อาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้นี้จะประกอบด้วยสารหลังจากแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์ และต่อไปจะเรียกว่า ส่วนลอยของอาหารเลี้ยงแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์

เก็บส่วนลอยของอาหารเลี้ยงแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์ที่ได้นี้ไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ในการทดลอง

## 2. ส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวัลิส

ส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวัลิส สายพันธุ์ ATCC 33277 (ได้รับความอนุเคราะห์โดยทันตแพทย์ อเนก ชยสดมภ์ นิสิตปริญญาเอกหลักสูตรชีววิทยาช่องปาก ภาควิชา สรีรวิทยาและชีวเคมี คณะทันตแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยมหิดล) ถูกนำมาใช้ ซึ่งมีขั้นตอนการสกัดย่อยๆ คือ แบคทีเรียได้รับการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Schaedler broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บัพที่ไม่มีออกซิเจน จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ให้ได้ค่าเท่ากับ 1 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเชื้อขึ้นมา 1 มิลลิลิตรต่อหลอดทดลองพลาสติกขนาด 1.5 ไมโครลิตร จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลางที่ระดับความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อแยกส่วนของเชื้อออกจากส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยส่วนของเชื้อจะตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอดทดลอง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเชื้อออก แล้วชะล้างส่วนของเชื้อด้วย PBS ปริมาณ 300 ไมโครลิตร แล้วนำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลางที่ระดับความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นดูด PBS ออก แล้วทำการชะล้างด้วย PBS อีกครั้ง จากนั้นเติม PBS ปริมาณ 300 ไมโครลิตร นำไปผ่านคลื่นเสียงเพื่อทำให้เซลล์แตก (high-intensity ultrasonication with pulse on 3 seconds and pulse off 2 seconds) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจึงนำไปย้อมดูเชื้อแบคทีเรียเพื่อตรวจสอบการแตกของเซลล์ แล้วนำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลางที่ระดับความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อเป็นการกำจัดเศษเซลล์ที่เหลือออก นำส่วนลอยที่เป็นของเหลวใสมาใช้ โดยวัดความเข้มข้นโปรตีนของแบคทีเรีย (Protein assay) ส่วนลอยที่เก็บได้จะถูกนำไปกรองด้วยแผ่นกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.2 ไมโครเมตร เก็บส่วนสกัดของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวัลิสที่ได้นี้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ในการทดลอง

## วิธีการวิจัย

### การเพาะเลี้ยงเซลล์เอ็นยิดปริทันต์

เตรียมเซลล์เอ็นยิดปริทันต์ จากเนื้อเยื่อบริเวณผิวดรากฟัน ของผู้ป่วยจำนวน 3 คน ซึ่งมีอายุระหว่าง 18 ถึง 20 ปี ที่มาถอนฟันที่คลินิกเอกชน เนื่องจากเป็นฟันคุดหรือเพราะต้องการจัดฟัน โดยฟัน

นั้นจะต้องไม่มีรอยโรคของฟันและเนื้อเยื่อปริทันต์ และได้รับความยินยอมจากผู้ป่วย และเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ที่เพาะเลี้ยงได้นั้นจะเป็นเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ของผู้ป่วยในแต่ละราย

การเตรียมเซลล์จากเนื้อเยื่อปริทันต์ทำตามวิธีที่เคยรายงานไว้แล้ว<sup>(170)</sup> โดยมีวิธีการโดยย่อคือ ฟันจะถูกล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซอลายน์ (Phosphate buffer saline) ที่ปราศจากเชื้อหลายๆ ครั้ง จากนั้นจึงใช้มีดผ่าตัดขูดเนื้อเยื่อออกจากผิวฟันบริเวณตอนกลางของรากฟัน (Middle third) เพื่อหลีกเลี่ยงเนื้อเยื่อเหงือกและเนื้อเยื่อจากปลายรากฟัน เนื้อเยื่อที่ได้จะถูกเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 35 มิลลิเมตรในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM (Dulbecco Modified Eagle's Medium) ที่เติมสารประกอบดังต่อไปนี้ คือ ซีรัมจากฟิทัสของวัวร้อยละ 5 (5% Fetal calf serum) กลูตามีน 2 มิลลิโมลาร์ (L-Glutamine) เพนนิซิลิน 100 ยูนิต/มิลลิลิตร (100 IU/ml Penicillin) สเตรปโตมัยซิน 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (100 µg/ml Streptomycin) และ แอมโฟเทอริซิน บี 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (5 µg/ml Amphotericin B)

เลี้ยงเนื้อเยื่อในตู้บ่มที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์วันเว้นวัน จนกระทั่งเซลล์เคลื่อนออกจากชั้นเนื้อมาอยู่บนจานเลี้ยง ซึ่งจะทำให้เวลาประมาณ 7-10 วัน จากนั้นอาหารเลี้ยงเซลล์จะเปลี่ยน 2 ครั้งต่อสัปดาห์ จนเซลล์เจริญเต็มจานเลี้ยง การขยายจำนวนเซลล์จะทำโดยการถ่าย (Subculture) เซลล์ที่เจริญเต็มจานเลี้ยงลงสู่จานเลี้ยงเซลล์ใหม่ ในอัตราส่วน 1:3 (หว่านเซลล์ 1 ใน 3 ของเซลล์ทั้งหมดต่อจานเลี้ยงเซลล์ใหม่ 1 จาน) โดยใช้เอ็นไซม์ทริปซิน-อีดีทีเอ (Trypsin-EDTA) และเริ่มนับเซลล์ที่หว่านใหม่นี้เป็นเซลล์รุ่นที่ 1 ถ่ายเซลล์สัปดาห์ละ 1 ครั้ง เซลล์ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้จะเป็นเซลล์รุ่นที่ 3-5

### **การเพาะเลี้ยงเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือก**

เตรียมเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือก จากชิ้นเหงือกของผู้ป่วยจำนวน 3 คน ซึ่งมีอายุระหว่าง 18 ถึง 20 ปี ที่มาทำศัลยกรรมปริทันต์เพื่อแก้ไขความสูงของตัวฟัน (crown lengthening) ที่คณะทันตแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ โดยเหงือกบริเวณนั้นต้องไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบหรือเป็นโรคเหงือกอักเสบ และได้รับความยินยอมจากผู้ป่วย และเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกที่เพาะเลี้ยงได้นั้นจะเป็นเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกของผู้ป่วยในแต่ละราย

การเตรียมเซลล์จากชิ้นเหงือก โดยมีวิธีการโดยย่อคือ ชิ้นเหงือกที่ได้มาถูกล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซอลายน์ (Phosphate buffer saline) ที่ปราศจากเชื้อหลายๆ ครั้ง จากนั้นจึงใช้มีดผ่าตัด ตัดชิ้นเหงือกให้เป็นชิ้นเล็กๆ ชิ้นเหงือกเล็กๆ ที่ได้จะถูกเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 35 มิลลิเมตรในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM (Dulbecco Modified Eagle's Medium) ที่เติมสารประกอบดังต่อไปนี้ คือ ซีรัม

จากฟอสของวัวร้อยละ 5 (5% Fetal calf serum) กลูตามีน 2 มิลลิโมลาร์ (L-Glutamine) เพนนิซิลิน 100 ยูนิต/มิลลิลิตร (100 IU/ml Penicillin) สเตربتโตมัยซิน 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (100 µg/ml Streptomycin) และ แอมโฟเทอริซิน บี 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (5 µg/ml Amphotericin B)

เลี้ยงในตู้บัพที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์วันเว้นวัน จนกระทั่งเซลล์เคลื่อนออกจากชั้นเนื้อมาอยู่บนจานเลี้ยง ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 5-7 วัน จากนั้นอาหารเลี้ยงเซลล์จะเปลี่ยน 2 ครั้งต่อสัปดาห์ จนเซลล์เจริญเต็มจานเลี้ยง การขยายจำนวนเซลล์จะทำได้โดยการถ่าย (Subculture) เซลล์ที่เจริญเต็มจานเลี้ยงลงสู่จานเลี้ยงเซลล์ใหม่ ในอัตราส่วน 1:3 (หว่านเซลล์ 1 ใน 3 ของเซลล์ทั้งหมดต่อจานเลี้ยงเซลล์ใหม่ 1 จาน) โดยใช้เอ็นไซม์ทริปซิน-อีดีทีเอ (Trypsin-EDTA) และเริ่มนับเซลล์ที่หว่านใหม่นี้เป็นเซลล์รุ่นที่ 1 ถ่ายเซลล์สัปดาห์ละ 1 ครั้ง เซลล์ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้จะเป็นเซลล์รุ่นที่ 3-5

### **การเลี้ยงเซลล์เอ็นยิดปริทันต์และเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกในสภาวะปกติ**

เซลล์เอ็นยิดปริทันต์และเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM (Dulbecco Modified Eagle's Medium) ที่เติมสารประกอบดังต่อไปนี้ คือ ซีรัมจากฟอสของวัวร้อยละ 5 (5% Fetal calf serum) กลูตามีน 2 มิลลิโมลาร์ (L-Glutamine) เพนนิซิลิน 100 ยูนิต/มิลลิลิตร (100 IU/ml Penicillin) สเตربتโตมัยซิน 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (100 µg/ml Streptomycin) และ แอมโฟเทอริซิน บี 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (5 µg/ml Amphotericin B) เลี้ยงในตู้บัพที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำไปตรวจหาการแสดงออกของพาร์-2 ในระดับเมสเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอและ 48 ชั่วโมงสำหรับการตรวจหาการแสดงออกของโปรตีนพาร์-2

### **การทดสอบความเป็นพิษด้วยเทคนิค MTT assay**

ในการทดสอบความเป็นพิษของส่วนลดยจากแอกติโนแบคทีเรียแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์ และ ส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวัลิส วัดโดย MTT assay<sup>(171)</sup> เซลล์ถูกถ่ายลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม และกระตุ้นด้วยส่วนลดยจากแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์ และส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวัลิส ในปริมาณต่างๆกันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนเป็นชนิดที่ไม่มี phenol red และมี MTT ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรใน 4 ชั่วโมงสุดท้ายของการกระตุ้น

เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมง อาหารเลี้ยงเซลล์ถูกดูดออก แล้วเติม dimethyl sulfoxide (DMSO) 1 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลุมของจานเลี้ยงเซลล์เพื่อละลายผลึก formazan ที่เซลล์สร้างขึ้นจากสารละลาย MTT จากนั้นจึงนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 570 นาโน

เมตร โดยค่าที่ได้จากการวัดพบว่าความเข้มข้นของส่วนลอยจากแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์ และส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालิส ที่เหมาะสมที่สามารถนำมาใช้ในการทดลอง มีดังนี้คือส่วนลอยจากแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์ ในอัตราส่วน ส่วนลอยจากแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์/อาหารเลี้ยงเซลล์ เท่ากับ 1:10, 1:5, 1:3 และส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालิส ในอัตราส่วนส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालิส/อาหารเลี้ยงเซลล์ เท่ากับ 1.25, 2.5, 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

### **การกระตุ้นเซลล์เอ็นยิตปริทันต์ที่เพาะเลี้ยงด้วยส่วนลอยจากแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์ และส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालิส**

ถ่ายเซลล์เอ็นยิตปริทันต์ลงในจานเลี้ยงแบบ 6 หลุม (Nunc) ที่มีความหนาแน่น 200,000 เซลล์/หลุม/ 2 มิลลิลิตรเป็นเวลา 16 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์มายึดที่จานเลี้ยง จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นชนิดที่ไม่มีซีรัม แต่ประกอบด้วยสารประกอบต่อไปนี้คือ แลคทอลบูมิน ไฮโดรไลเซท ร้อยละ 0.02 (0.02% lactalbumin) (Sigma Chemical Co.) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และทำซ้ำอีกครั้ง ก่อนที่จะเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์อีกครั้งโดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัมเหมือนข้างต้น พร้อมทั้งเติมส่วนลอยของอาหารเลี้ยงแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์ในอัตราส่วน ส่วนลอยจากแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์/อาหารเลี้ยงเซลล์ เท่ากับ 1:10, 1:5, 1:3 โดยในกลุ่มควบคุมจะเติมอาหารเลี้ยงเชื้อลงในปริมาณเท่ากับปริมาณของส่วนลอยของอาหารเลี้ยงแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์ที่ใช้กระตุ้นเซลล์

และส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालิสจะทำเช่นเดียวกับส่วนลอยของอาหารเลี้ยงแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์ โดยใช้อัตราส่วน ส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालิส /อาหารเลี้ยงเซลล์ เท่ากับ 1.25, 2.5, 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในกลุ่มควบคุมจะเติม PBS ในปริมาณที่เท่ากับส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालิส 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แล้วเลี้ยงต่อไปอีกเป็นเวลา 24, 48 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปตรวจหาการแสดงออกของพาร์-2 โดยการวิเคราะห์หาเมซเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอ และโปรตีน

### **การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนพาร์-2 (determine the expression of PAR-2) ในระดับเมซเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอด้วยวิธีอาร์ที-พีซีอาร์ ซึ่งขั้นตอนประกอบด้วย**

#### **1. การสกัดอาร์เอ็นเอ (total RNA extraction)**

อาร์เอ็นเอสกัดได้จากเซลล์เอ็นยิตปริทันต์และเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกที่เลี้ยงในสภาวะปกติ และจากเซลล์เอ็นยิตปริทันต์ที่ได้รับการกระตุ้นและไม่ได้รับการกระตุ้นจากส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालิสและส่วนลอยของอาหารเลี้ยงแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิ

แทนส์ เป็นเวลา 24, 48 ชั่วโมง ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ นำเซลล์เอ็นยัดปริทันต์และเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกที่เลี้ยงในสภาวะปกติ และเซลล์เอ็นยัดปริทันต์ที่เพาะเลี้ยงและได้รับการกระตุ้นและไม่ได้รับการกระตุ้นจากส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรไมแนสจิงจิवालิสและส่วนลอยของอาหารเลี้ยงแอดคิตโนแบซิลัสแอดคิตโนมัชชีเทมโคมิแทนส์ ในจานเลี้ยงแบบ 6 หลุม (Nunc) ที่มีความหนาแน่น 200,000 เซลล์/หลุม/ 2 มิลลิลิตร ทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกและล้างด้วย PBS แล้วดูดทิ้ง อาร์เอ็นเอจากเซลล์เพาะเลี้ยงจะถูกเตรียมโดยใช้ไตรซอล (Trizol, Gibco, USA ) ตามวิธีการแนะนำโดยบริษัทผู้ผลิต ขั้นตอนอย่างย่อๆ คือ ใส่ไตรซอล ปริมาณ 1 มิลลิลิตร/หลุม ทิ้งไว้ 5 นาที แล้วทำให้เซลล์แตกโดยการขูดจานเลี้ยงแต่ละหลุม โดยดูดไตรซอลมาใส่ไว้ในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตรเติมคลอโรฟอร์มปริมาณ 200 ไมโครลิตร จากนั้นเขย่าหลอดพลาสติกแรงๆ 15 วินาที แล้วทิ้งไว้ 3 นาที จากนั้นนำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลางที่ระดับความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการดูดของเหลวใส่ที่อุ้งชั้นบนสุดซึ่งเป็นชั้นที่มีอาร์เอ็นเอปนอยู่ ลงในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตร อีกหลอด โดยค่อยๆดูดทีละ 100 ไมโครลิตร (เพื่อไม่ให้ตะกอนสีขาวขุ่นซึ่งเป็นโปรตีนหรือเศษเซลล์พุ่งมาปนในชั้นของเหลวใส) ดูดให้ได้ปริมาณประมาณ 500 ไมโครลิตร จากนั้นเติมไอโซ โพรพานอล ปริมาณ 500 ไมโครลิตร ลงในหลอดพลาสติกดังกล่าวแล้วเขย่าเบาๆ (คว่ำและหงายหลอดเท่านั้น) แล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นนำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลางที่ระดับความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วเทส่วนของเหลวใสออกให้เหลือแต่ตะกอนที่ก้นหลอดพลาสติก จากนั้นล้างด้วย เอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 75 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เคาะที่ข้างหลอดพลาสติกเบาๆ แล้วนำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลางที่ระดับความเร็ว 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเทของเหลวใสออก แล้วคว่ำหลอดพลาสติกทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 10 นาที แล้วละลายตะกอนที่อยู่ก้นหลอดซึ่งเป็นอาร์เอ็นเอด้วยน้ำที่ปราศจากเอนไซม์อาร์เอ็นเอส (RNase-free water) ปริมาณ 15 ไมโครลิตร แล้วนำไปอุ่นที่อ่างน้ำ (water bath) ที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส อาร์เอ็นเอที่ได้จะเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

## 2. การสังเคราะห์คอมพริเมนแทรีตีเอ็นเอสแตนด์ (First strand cDNA synthesis)

นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร เพื่อนำไปคำนวณปริมาณของอาร์เอ็นเอที่จะใช้ใน 1 ไมโครกรัม การสังเคราะห์เฟิร์สทสแตนด์ซีดีเอ็นเอทำโดยใช้คิทสกัด (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 โดยใช้ DPEC-water นำไปอุ่นที่อ่างน้ำที่อุณหภูมิ 70 องศา

เซลล์เชื้อส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปวางไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที ขณะนั้นเติมบัฟเฟอร์ที่ช่วยเพิ่มปฏิกิริยา (5x reaction buffer) ปริมาณ 4 ไมโครลิตร เติมตัวยับยั้งเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส (ribonuclease inhibitor) ปริมาณ 1 ไมโครลิตร และ ดีโออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ ไตรฟอสเฟส (deoxyribonucleotide triphosphate: dNTPs) ปริมาณ 2 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปปั่น (mix and quick spin) แล้วนำไปอบ (incubated) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการเติมเอนไซม์ (RevertAid™ M-MuLV reverse transcriptase) ปริมาณ 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และปั่นอีกครั้ง จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จนกระทั่งปฏิกิริยาสมบูรณ์ แล้วนำไปเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ก่อนที่จะทำไปใช้งาน

### 3. การเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอโดยใช้หลักการโพลีเมอเรสเชนรีแอคชันหรือเรียกว่าพีซีอาร์ (Polymerase Chain reaction: PCR)

การแสดงผลของพีซีอาร์จะใช้เอนไซม์ แทคดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (Taq DNA polymerase) โดยใช้ปริมาณรวมของพีซีอาร์ทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย ดีเอ็นเอสำหรับใช้เป็นต้นแบบ 1 ไมโครกรัม (1 µg of cDNA template) ดีโออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ ไตรฟอสเฟส ทั้ง 4 ชนิด คือ ดีเอทีพี (dATP) ดีซีทีพี (dCTP) ดีจีทีพี (dGTP) และ ดีทีทีพี (dTTP) อย่างละ 10 มิลลิโมลาร์ (10 mM of each dNTPs) ซึ่งใช้สร้างดีเอ็นเอสายใหม่ นอกจากนี้ยังมีส่วนประกอบที่จำเป็นอื่นๆ ได้แก่ บัฟเฟอร์ (10x PCR buffer) แมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl<sub>2</sub> concentration between 1-5 mM) เอนไซม์แทคดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (0.6 U of Taq DNA polymerase) โอลิโกนิวคลีโอไทด์ ไพรเมอร์ ซึ่งได้แก่ แกปดีเอช และพาร์-2 (0.2-0.3 µM of GAPDH primer: GAPDHF 5'-TGAAGGTCGGAGTCAACGGAT-3', GAPDHR 5'-TCACACCCATGACGAACATGG-3' (PCR product, 390 bp; GenBank GI:4503912)<sup>(169)</sup> and PAR-2 primer: PAR2F 5'-GGTAAGGTTGATGGCACATC-3', PAR2R 5'- TGGTCTGCTTCACGACATAC-3' (PCR product, 509 bp; GenBank GI:1041728)<sup>(172)</sup>) และน้ำกลั่น การทำงานของเครื่องพีซีอาร์นั้นจะตั้งสภาวะปฏิกิริยาเริ่มต้นสำหรับแกป ดีเอชและพาร์-2 ไว้ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ปฏิกิริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอจะเกิดขึ้นเมื่อทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิหมุนเวียนอยู่ ณ อุณหภูมิ 3 ระดับ โดยแกปดีเอช ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที เพื่อทำให้เกิดการแยกสายของดีเอ็นเอต้นแบบเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว (denaturation) อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เพื่อการจับระหว่างสายไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบที่เป็นสายเดี่ยว (annealing) อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที สำหรับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ โดยการต่อปลายของไพรเมอร์ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์แทคดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (extension) และรอบสุดท้ายทำ

การต่อปลายของไพรเมอร์ (final extension) โดยใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ส่วน พาร์-2 ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที เพื่อทำให้เกิดการแยกสายของดีเอ็นเอ ต้นแบบเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว ที่อุณหภูมิ 59 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที เพื่อการจับระหว่างสาย ไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบที่เป็นสายเดี่ยว ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที สำหรับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ โดยการต่อปลายของไพรเมอร์ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอ็นไซม์แทคดีเอ็นเอโพลีเมอเรส และรอบสุดท้ายทำการต่อปลายของไพรเมอร์รอบ โดยใช้ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ในแต่ละขั้นตอนจะใช้เวลาเพียงสั้นๆ เป็นนาทีหรือส่วนของ นาที และทำหมุนเวียนเป็นวงจร จากนั้น

#### 4. การตรวจหาขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์โดยวิธีอะกาโรสเจล อิเล็กโตรโฟเรซิส (agarose gel electrophoresis)

เมื่อสิ้นสุดกระบวนการพีซีอาร์ แล้ว สายพันธุกรรมที่ได้จะถูกวิเคราะห์โดยการ แยกด้วยกระแสไฟฟ้าในอะกาโรสเจล ที่มีความเข้มข้นของอะกาโรสร้อยละ 1.6 แล้วถ่ายภาพด้วยกล้องฟิล์ม บนเครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ต (ULTRA LUM, Electronic U.V. Transilluminator)

ขั้นตอน

1. ชั่งผงอะกาโรส จำนวน 1.6 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่
2. จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์ (Tris-acetate-EDTA buffer) ให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
3. ละลายผงอะกาโรสโดยเพิ่มความร้อนบนเครื่องเพิ่มอุณหภูมิ นำออกมาเขย่าทุกๆ 30 วินาที จนได้สารละลายเจล วางไว้ให้เย็นประมาณ 50 องศาเซลเซียส
4. เตรียมถาดสำหรับเทเจลโดยปิดส่วนหัวและท้ายถาดด้วยเทปกาว และวางหวีลงบน ถาดเจลปรับระดับความลึกให้พอเหมาะ
5. เทเจลที่อุ่นลงบนถาด กำจัดฟองอากาศออกด้วยปิเปต วางเจลไว้ที่อุณหภูมิห้องให้ แข็งตัว (ประมาณ 15-30 นาที)
6. หลังจากเจลแข็งตัว ดึงหวีและเทปกาวที่ปิดส่วนหัวและท้ายออก เทสารละลาย บัฟเฟอร์ (1x TBE buffer) ให้ท่วมเจลเล็กน้อย (1-2 มิลลิเมตร)
7. เตรียมดีเอ็นเอมาตรฐาน (0.5x marker) โดยเตรียมในหลอด 2 มิลลิลิตร ใช้ดีเอ็นเอ มาตรฐาน (100 bp ladder DNA) 25 ไมโครลิตร สีย้อม (dye) 10 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 15 ไมโครลิตร
8. จากนั้นหยอดดีเอ็นเอมาตรฐาน (0.5x marker) ที่เตรียมลงในช่องของเจล

9. ใส่ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 10 ไมโครลิตร ที่ผสมกับสีย้อม (loading dye) 2 ไมโครลิตร ลงในช่องของเจล ปิดฝาของเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis chamber) และต่อเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า

10. ปรับกระแสไฟฟ้าให้มีระดับที่เหมาะสม ประมาณ 110 โวลต์ รอจนกระทั่งสีของโบรโมฟีนอลบลู (bromophenol blue) เคลื่อนที่ใกล้ส่วนท้ายเจลซึ่งใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง ปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าและนำเจลไปย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ประมาณ 10 นาที นำเจลไปล้างเอธิเดียมโบรไมด์ส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น

11. ความเข้มระหว่างดีเอ็นเอที่สนใจและดีเอ็นเอควบคุมจะนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม sionimage เพื่อตรวจวัดความเข้มของภาพ

### **การวิเคราะห์โปรตีนพาร์-2 ในเซลล์ที่ทำให้แตก ด้วยวิธีเวสเทิร์นบลอต**

หลังจากที่เซลล์เอ็นดีคปริทันต์และเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกที่เลี้ยงในสภาวะปกติ และเซลล์เอ็นดีคปริทันต์ได้รับการกระตุ้นด้วยสารส่วนลอกจากแอดทีโนแบคทีลัสแอกติโนมายซีเทมโคมิแทนส์ และส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวัลิส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และทำให้เซลล์แตก เริ่มจากดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งแล้วล้างด้วย PBS จากนั้นดูดทิ้ง แล้วใส่ SDS ซึ่งจะ去做ให้สายของโปรตีนยืดออกได้โดยไม่มีมันกลับเข้าไปอีก ใช้ SDS ความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ทำการขูดจานเพาะเลี้ยงเซลล์แต่ละหลุมให้ทั่วหลุม แล้วเก็บส่วนของเหลวใส่ใส่หลอดพลาสติกขนาด 1.5 ไมโครลิตร จากนั้นนำของเหลวใส่ส่วนหนึ่งไปวัดปริมาณโปรตีน โดยวิธีของแบรดฟอร์ด (Bradford method) ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร มีขั้นตอนดังนี้ ดูดของเหลวใส่ออกมา ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ใส่น้ำกลั่นที่ได้รับการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาณ 80 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นหยดโคมาสซีดีอายน์ (comassie dye for protein assay) ปริมาณ 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง แล้วทำการคำนวณจำนวนไมโครกรัมของโปรตีนจากแต่ละตัวอย่างให้เท่ากันแล้วผสมสีย้อม(ใส่หลอดพลาสติกขนาด 1.5 ไมโครลิตร) ต้มน้ำที่อุณหภูมิ 300 องศาเซลเซียส จนเดือดแล้ว นำโปรตีนในหลอดพลาสติกไปต้มเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นหยดโปรตีนตัวอย่างและโปรตีนควบคุม(marker: BenchMark™ Protein Ladder use for ) ซึ่งจะถูกนำมาแยกด้วยไฟฟ้าในเจลที่มีความเข้มข้นของอะคริลามายด์ร้อยละ 10 ปรับกระแสไฟฟ้าให้มีระดับที่เหมาะสม ประมาณ 20 มิลลิแอมแปร์ ดูให้สีย้อมตกขอบเจลแล้วจ่ายกระแสไฟฟ้าต่ออีก 5 นาที จากนั้นโปรตีนจะถูกถ่ายลงบนแผ่นพีวีดีเอพ (Hybond™P membrand, Amersham Biosciences, UK) แช่ในซีรัม (5% bovine serum) เป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้วย้อมด้วย แอนติบอดีวแมน พาร์-2 (goat-polyclonal IgG against N-terminal: Santa Cruz Biotech) เป็นเวลา 1 คืน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ย้อมด้วย secondary

antibody (mouse IgG, Horseradish Peroxidase-Linked Species-Specific whole Antibody (from sheep), Amersham Bioscience, UK) ตามวิธีการของผู้ผลิต เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงบ่มแผ่นไฮย์บอนด์พีไออีซีแอลพลัส (ECL plus reagent) และตรวจจับสัญญาณของพาร์-2 ด้วยแผ่นฟิล์มเอกซ์เรย์ (standard Hyperfilm™ ECL, Amersham Bioscience, UK)

### **วิเคราะห์ข้อมูล**

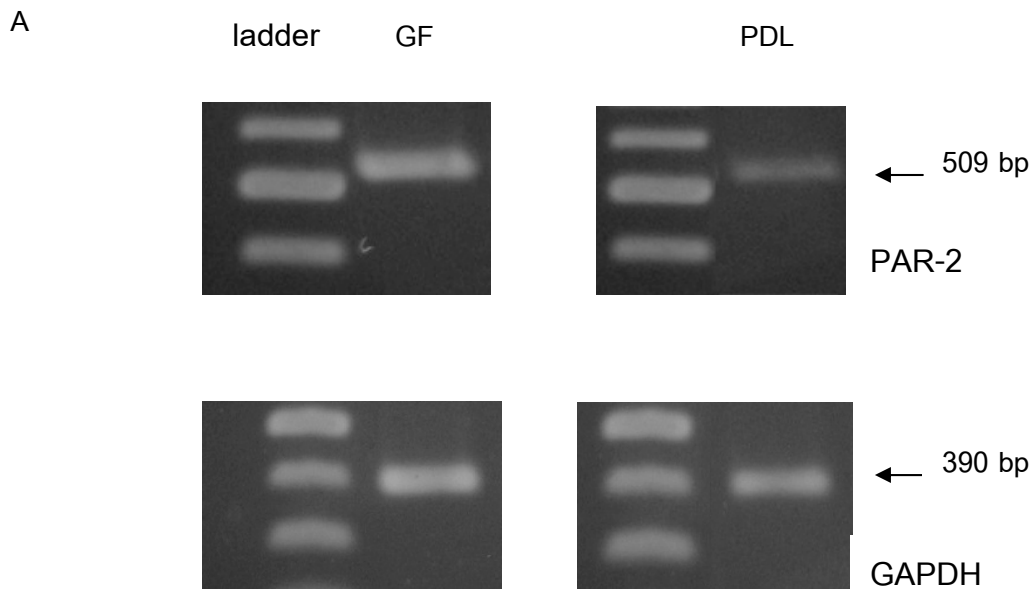
จะไม่ทำการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยนี้ทางสถิติ เนื่องจากเป็นการแสดงผลการวิจัยในรูปแบบข้อมูลเชิงพรรณนา

## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

#### การแสดงออกของพาร์-2 ในเซลล์เอ็นดอทีลียด์ปริทันต์เปรียบเทียบกับเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกของมนุษย์ในสภาวะที่ไม่มีการกระตุ้น

ภายหลังจากเลี้ยงเซลล์เอ็นดอทีลียด์ปริทันต์และเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกของมนุษย์โดยไม่ได้ทำการกระตุ้นใดๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อนำไปตรวจหาการแสดงออกของพาร์-2 ในระดับเมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอและโปรตีน ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเซลล์เอ็นดอทีลียด์ปริทันต์ของมนุษย์ในสภาวะปกติสามารถพบการแสดงออกของพาร์-2 ทั้งในระดับเมสเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอและโปรตีนในระดับที่ชัดเจน เช่นเดียวกับที่พบได้ในเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกดังแสดงในภาพประกอบ 6



ภาพประกอบ 6 การแสดงออกของพาร์-2 ในเซลล์เอ็นอีคปริทันต์และเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกของมนุษย์ ที่เลี้ยงโดยปราศจากการกระตุ้น

- A. การแสดงออกของพาร์-2 ในระดับเมซเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอที่วิเคราะห์ด้วยวิธีอาร์ที-พีซีอาร์ ซึ่งพาร์-2ที่เป็นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มีขนาด 509 bp
- B. การแสดงออกของโปรตีนพาร์-2 ขนาด 45 กิโลดาลตัน ที่วิเคราะห์ด้วยวิธีเวสเทิร์นบลอต

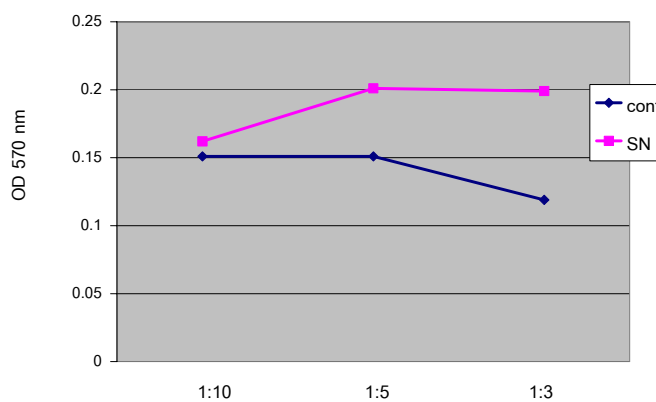
Ladder : 100 bp DNA ladder

GF : เซลล์สร้างเส้นใยของเหงือก

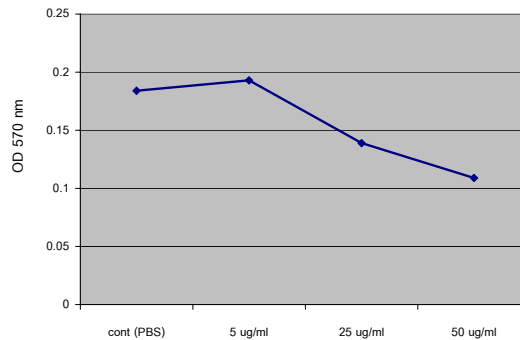
PDL : เซลล์เอ็นอีคปริทันต์

### ผลการทดสอบความเป็นพิษของส่วนลอกจากแอคติโนแบซิลัสแอคติโนมายซิเทมโคมิแทนส์ และส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालีส ด้วยเทคนิค MTT assay

จากการทดสอบระดับความเป็นพิษของส่วนลอกจากแอคติโนแบซิลัสแอคติโนมายซิเทมโคมิแทนส์ และส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालีส ที่มีผลต่อเซลล์เอ็นอีคปริทันต์ พบว่าปริมาณของส่วนลอกจากแอคติโนแบซิลัสแอคติโนมายซิเทมโคมิแทนส์ ที่อัตราส่วนของส่วนลอม/อาหารเลี้ยงเซลล์ 1:3 จะเป็นอัตราส่วนที่ยังคงไม่เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ (ภาพประกอบ 7) ดังนั้นจึงกำหนดใช้อัตราส่วน 1:10, 1:5 และ 1:3 ในการทดลองต่อไป สำหรับการทดสอบความเป็นพิษของส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालีส พบว่าที่อัตราส่วน 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นอัตราส่วนที่ไม่เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ (ภาพประกอบ 8) ดังนั้นจึงใช้อัตราส่วน 1.25, 2.5 และ 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรในการทดลองต่อไป



ภาพประกอบ 7 กราฟเส้นแสดงผลการทดสอบระดับความเป็นพิษของส่วนลอยจากแอคติโนแบซิลัสแอคตินอัมยซิเทมโคมิแทนส์ ที่มีผลต่อเซลล์เอ็นยี่ดปริทันต์

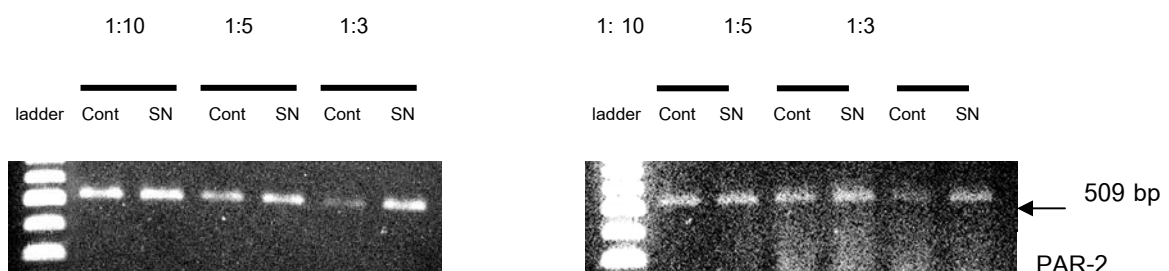


ภาพประกอบ 8 แผนภูมิแสดงผลการทดสอบระดับความเป็นพิษของส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालิส ที่มีผลต่อเซลล์เอ็นยี่ดปริทันต์

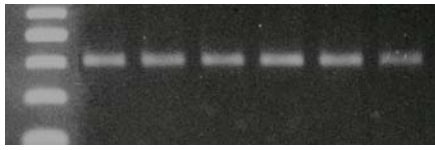
**ผลการแสดงออกของพาร์-2 เมื่อกระตุ้นเซลล์เอ็นยี่ดปริทันต์ของมนุษย์ด้วยส่วนลอยจากแอคติโนแบซิลัสแอคตินอัมยซิเทมโคมิแทนส์**

จากการทดลองพบว่าส่วนลอยจากแอคติโนแบซิลัสแอคตินอัมยซิเทมโคมิแทนส์สามารถกระตุ้นเซลล์เอ็นยี่ดปริทันต์ของมนุษย์ให้มีการแสดงออกของยีนพาร์-2 ในระดับเมสเซินเจอร์ อาร์เอ็นเอ เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดยพบว่าการแสดงออกของยีนพาร์-2 มีระดับเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมในอัตราส่วน 1:10 และ 1:3 ในขณะที่อัตราส่วน 1:5 นั้นมีระดับที่ลดลงกว่ากลุ่มควบคุมแต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมมากนัก แสดงใน(ภาพประกอบ 9) เมื่อเทียบการแสดงออกของยีนพาร์-2 ที่เลี้ยงในเวลา 24 ชั่วโมง กับ 48 ชั่วโมง พบว่าแนวโน้มการแสดงออกของพาร์-2 ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง มีระดับที่สูงกว่ากลุ่มควบคุม (ภาพประกอบ 10)

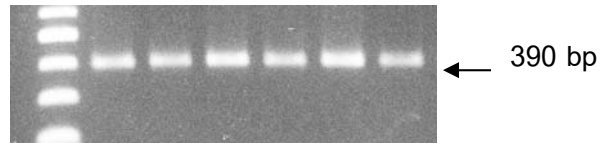
A



GAPDH

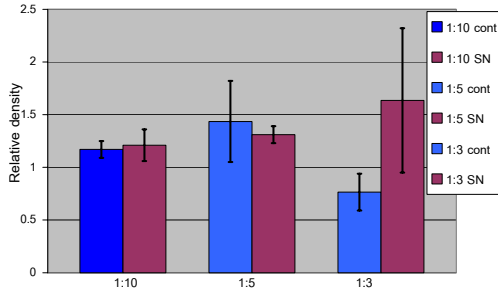


Aa 24 hrs

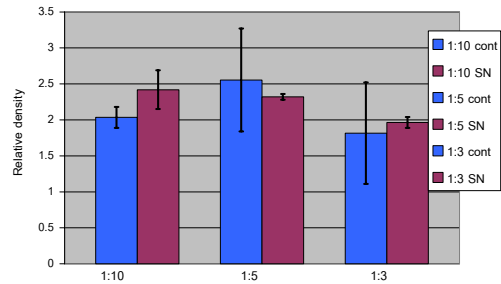


Aa 48 hrs

B



Aa 24 hrs



Aa 48 hrs

ภาพประกอบ 9 การแสดงออกของยีนพาร์-2 ในระดับเมซเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอ วิเคราะห์ด้วยวิธีอาร์ที-พีซีอาร์ ภายหลังจากได้รับการกระตุ้นด้วยส่วนลอยจากแอคติโนแบซิลัสแอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ที่อัตราส่วนต่างๆ เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

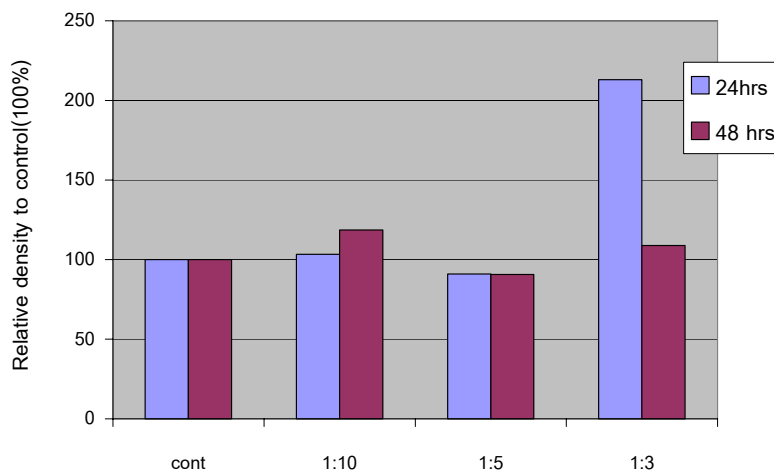
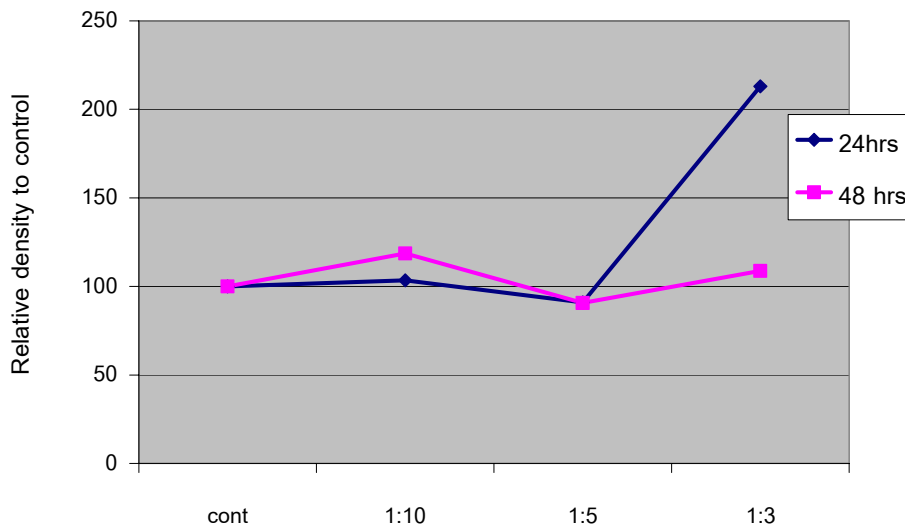
A แถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์แสดงความเข้มข้นของยีนพาร์-2 เมื่อถูกกระตุ้น ด้วยอัตราส่วนของส่วนลอยจากแอคติโนแบซิลัสแอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์/อาหารเลี้ยงเซลล์ เท่ากับ 1:10, 1:5, 1:3 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียว

B แผนภูมิแท่งความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (จากการแปรผลด้วยโปรแกรม ScionImage) ของแต่ละสภาวะที่กระตุ้นเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

Ladder : 100 bp DNA ladder

Cont : กลุ่มควบคุม

SN : กลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยส่วนลอยจากแอคติโนแบซิลัสแอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์



ภาพประกอบ 10 แผนภูมิแท่งและกราฟเส้นแสดงร้อยละของความเข้มแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (จากการแปรผลด้วยโปรแกรม ScionImage) ของสภาวะที่ได้รับการกระตุ้นด้วยส่วนลดยจากแอคติโนแบซิลัสแอคติโนมายซีเทมโคมิแทนส์ อัตราส่วน เท่ากับ 1:10, 1:5, 1:3 ระหว่างเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับ 48 ชั่วโมง (กลุ่มควบคุม มีค่าร้อยละของความเข้มแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ที่ 100)

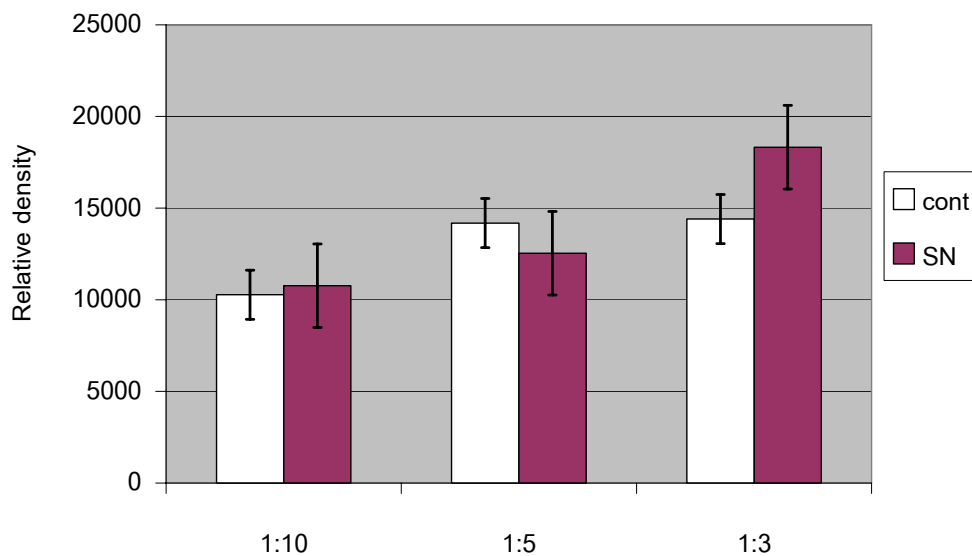
และเมื่อทำการกระตุ้นเซลล์เอ็นยี่ดปริทันต์ของมนุษย์ด้วยส่วนลดยจากแอคติโนแบซิลัสแอคติโนมายซีเทมโคมิแทนส์ ในอัตราส่วน เท่ากับ 1:10, 1:5, 1:3 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำให้เซลล์แตก แล้ววิเคราะห์หาโปรตีนพาร์-2 ด้วยวิธีเวสเทิร์นบลอท ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าระดับโปรตีนพาร์-2 ที่ได้จากเซลล์เอ็นยี่ดปริทันต์ของมนุษย์เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยส่วนลดยจากแอคติโนแบซิลัสแอคติโนมายซี

เทมโคมิแทนส์ที่อัตราส่วน 1:3 มีระดับมากกว่าตัวควบคุม ในขณะที่อัตราส่วน 1:10 และ 1:5 นั้นพบว่าไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมมากนัก (ภาพประกอบ 11)

A



B



ภาพประกอบ 11 แสดงการตรวจพบโปรตีนพาร์-2 ในเซลล์ที่ทำให้แตก ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธีเวสเทิร์นบลอต ภายหลังจากเซลล์เอ็นยัดปริทันต์ของมนุษย์ได้รับการกระตุ้นด้วยส่วนลดยจากแอคติโนแบซิลัสแอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ที่อัตราส่วนต่างๆ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

A แสดงแถบของโปรตีนพาร์-2 ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 45 กิโลดาลตัน ที่พบในเซลล์ที่ทำให้แตก ภายหลังจากได้รับการกระตุ้นด้วยส่วนลดยจากแอคติโนแบซิลัสแอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ที่อัตราส่วนต่างๆ

B แผนภูมิแท่งแสดงความเข้มของแถบโปรตีนพาร์-2 ในเซลล์ที่ทำให้แตก โดยการแปรผลด้วยโปรแกรม ScionImage เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

Pos. Cont : กลุ่มควบคุมบวก

GF : เซลล์สร้างเส้นใยเหงือก

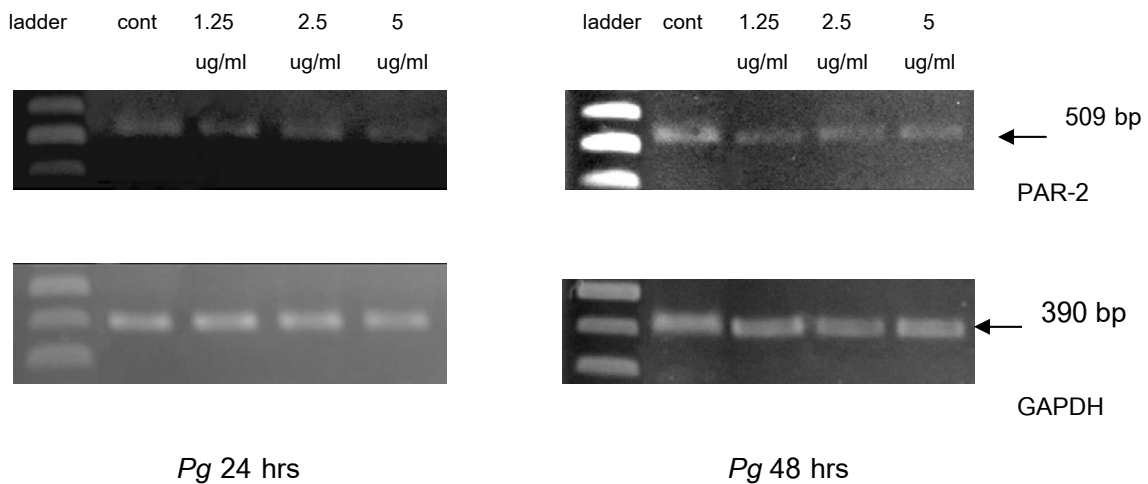
Cont : กลุ่มควบคุม

SN : กลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยส่วนลอกจากแอกติโนแบคทีเรียแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์

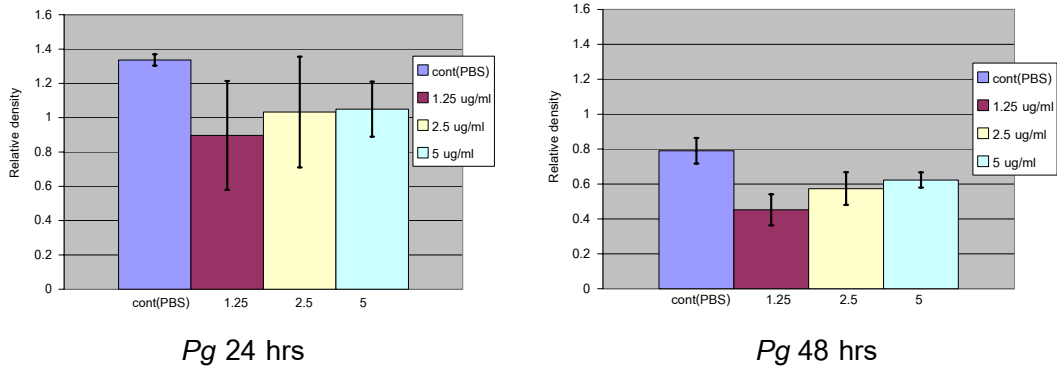
### ผลการแสดงออกของพาร์-2 เมื่อกระตุ้นเซลล์เอ็นยิตปริทันต์ของมนุษย์ด้วยส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวัลิส

จากการทดลองเหมือนว่าส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวัลิสจะไม่สามารถกระตุ้นเซลล์เอ็นยิตปริทันต์ของมนุษย์ให้มีการแสดงออกของยีนพาร์-2 ในระดับเมเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอเพิ่มขึ้นกว่าปกติได้เลย เนื่องจากการแสดงออกที่น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่เมื่อเปรียบเทียบกับในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวัลิสที่อัตราส่วนต่างกันพบว่ายีนพาร์-2 มีระดับเพิ่มขึ้นตามอัตราส่วนที่เพิ่มขึ้น ( $1.25 < 2.5 < 5 \mu\text{g/ml}$ ) แสดงดังภาพประกอบ 12 และเมื่อเทียบการแสดงออกของยีนพาร์-2 กับกลุ่มควบคุม พบว่าทั้งที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง มีการแสดงออกของพาร์-2 มีระดับที่ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมทุกอัตราส่วนของการกระตุ้น (ภาพประกอบ 13)

A



B



ภาพประกอบ 12 การแสดงออกของยีนพาร์-2 ในระดับเมซเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอ วิเคราะห์ด้วยวิธีอาร์ที-พีซีอาร์ ภายหลังจากได้รับการกระตุ้นด้วยส่วนผสมสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालีสที่อัตราส่วนต่างๆ เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

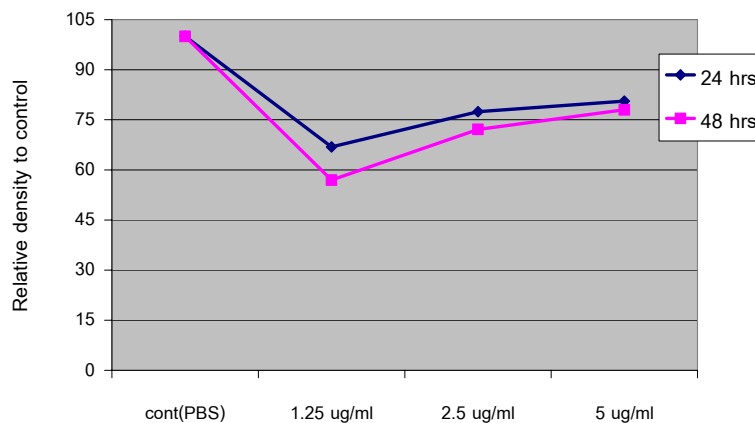
A แถบแสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์แสดงความเข้มข้นของยีนพาร์-2 เมื่อถูกกระตุ้นด้วยส่วนผสมสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालีส ที่อัตราส่วน 1.25, 2.5 และ 5  $\mu\text{g/ml}$  เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

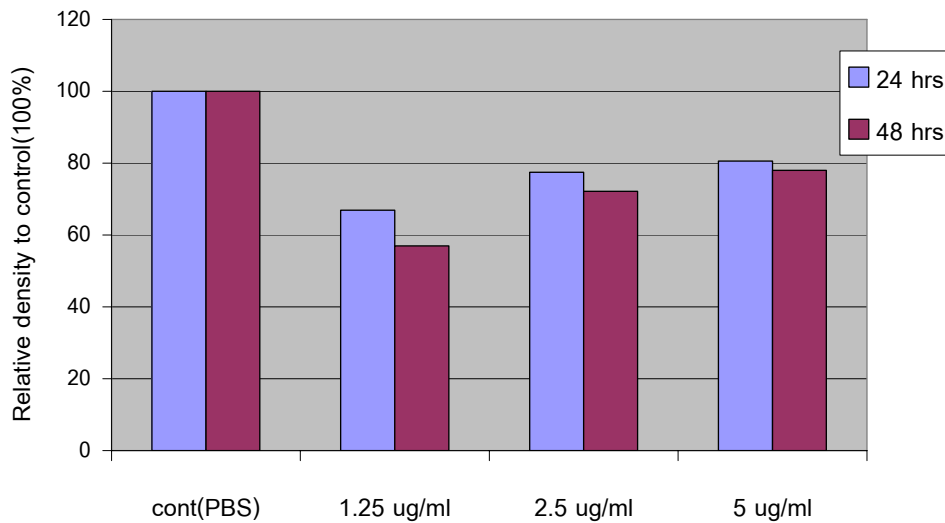
B แผนภูมิแท่งความเข้มแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (จากการแปรผลด้วยโปรแกรมScionImage) ของแต่ละสถานะที่กระตุ้นเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

Ladder : 100 bp DNA ladder

Cont : กลุ่มควบคุม

SN : กลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยส่วนผสมสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालีส

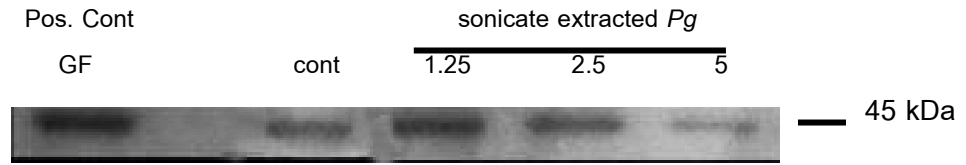




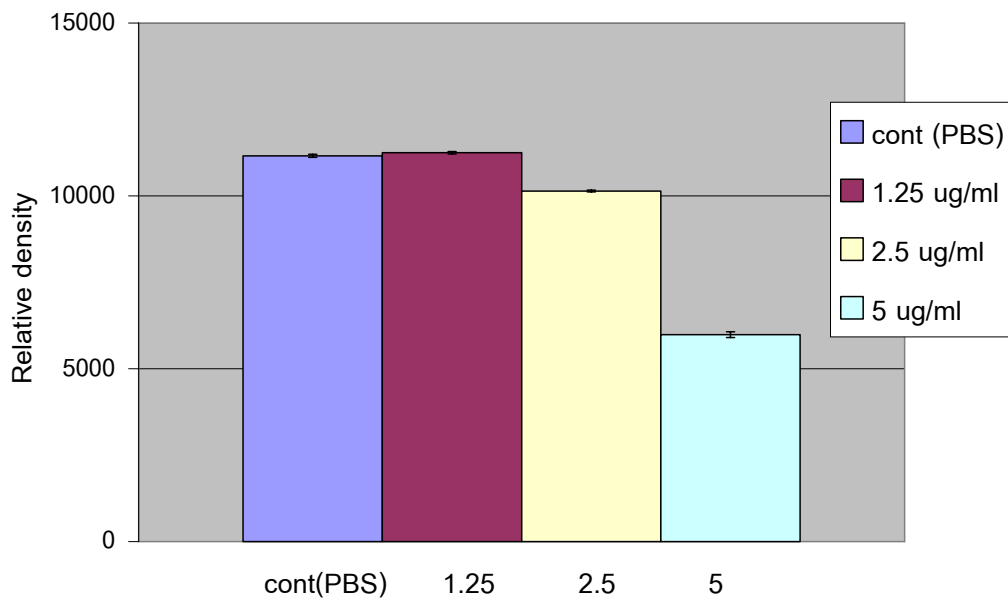
ภาพประกอบ 13 แผนภูมิแท่งและกราฟเส้นแสดงร้อยละของความเข้มแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (จากการแปรผลด้วยโปรแกรม ScionImage) ของภาวะที่ได้รับการกระตุ้นด้วยส่วนสกัดเซลล์แตกของพอรีไฟโรโมแนสจิงจิवालิส ที่อัตราส่วน 1.25, 2.5 และ 5  $\mu\text{g/ml}$  ระหว่างเวลา 24 ชั่วโมง กับ 48 ชั่วโมง (กลุ่มควบคุม มีค่าร้อยละของความเข้มแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ที่ 100)

และเมื่อทำการกระตุ้นเซลล์เอ็นยี่ดปริทันต์ของมนุษย์ด้วยส่วนสกัดเซลล์แตกของพอรีไฟโรโมแนสจิงจิवालิส ในอัตราส่วน 1.25, 2.5 และ 5  $\mu\text{g/ml}$  เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำให้เซลล์แตก แล้ววิเคราะห์หาโปรตีนพาร์-2 ด้วยวิธีเวสเทิร์นบลอต ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าระดับโปรตีนพาร์-2 ที่ได้จากเซลล์เอ็นยี่ดปริทันต์ของมนุษย์เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยส่วนสกัดเซลล์แตกของพอรีไฟโรโมแนสจิงจิवालิส ที่อัตราส่วน 1.25  $\mu\text{g/ml}$  มีระดับมากกว่าตัวควบคุม โดยระดับที่เพิ่มขึ้นนั้นมีระดับไม่ต่างกับตัวควบคุมมากนัก ในขณะที่อัตราส่วน 2.5 และ 5  $\mu\text{g/ml}$  มีระดับน้อยกว่าตัวควบคุม และเมื่อเปรียบเทียบกัน ในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยส่วนสกัดเซลล์แตกของพอรีไฟโรโมแนสจิงจิवालิสที่อัตราส่วนต่างๆ พบว่าโปรตีนพาร์-2 มีระดับลดลงเมื่ออัตราส่วนเพิ่มขึ้น (ภาพประกอบ 14)

A



B



ภาพประกอบ 14 แสดงการตรวจพบของโปรตีนพาร์-2 ในเซลล์ที่ทำให้แตก ซึ่งวิเคราะห์ ด้วยวิธี เวส เทิร์นบลอต ภายหลังจากเซลล์เอ็นยัดปริทันต์ของมนุษย์ได้รับการกระตุ้นด้วยส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวัลิส ที่อัตราส่วนต่างๆ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

A แสดงแถบของโปรตีนพาร์-2 ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 45 กิโลดาลตัน ที่พบในเซลล์ที่ทำให้แตก ภายหลังจากได้รับการกระตุ้นด้วยส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวัลิสที่อัตราส่วนต่างๆ

B แผนภูมิแท่งแสดงความเข้มของแถบโปรตีนพาร์-2 ในเซลล์ที่ทำให้แตก โดยการแปรผลด้วยโปรแกรม ScionImage เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

Pos. Cont : กลุ่มควบคุมบวก

GF : เซลล์สร้างเส้นใยเหืองอก

Cont : กลุ่มควบคุม

## บทที่ 5

### อภิปรายผลและสรุปผล

โรคปริทันต์อักเสบเป็นโรคติดเชื้อเรื้อรังซึ่งส่งผลให้มีการทำลายของอวัยวะปริทันต์และนำไปสู่การสูญเสียฟันในที่สุด โดยพยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์อักเสบนั้นเกี่ยวข้องกับปัจจัยหลายอย่างที่สำคัญได้แก่ แบคทีเรียก่อโรค ที่สำคัญและเป็นที่ยอมรับกันว่าเป็นสาเหตุของโรคปริทันต์อักเสบ คือ แอคติโนแบซิลัส แอคติโนมัยซิเทียม โคมิแทนส์ และพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวัลิส<sup>(5)</sup> โดยพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวัลิส เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคปริทันต์อักเสบแบบเรื้อรัง ส่วนแอคติโนแบซิลัส แอคติโนมัยซิเทียม โคมิแทนส์ เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญกับการเกิดโรคปริทันต์อักเสบแบบรุกราน ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าจึงเลือกที่จะทำการศึกษาแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 2 ชนิด

โดยปัจจัยก่อโรคจากแบคทีเรียสามารถก่อให้เกิดโรคปริทันต์อักเสบหรือส่งเสริมให้โรคปริทันต์อักเสบมีความรุนแรงมากขึ้นซึ่งปัจจัยก่อโรคอาจมาจากแบคทีเรียก่อโรคเองหรืออาจเป็นสารที่แบคทีเรียก่อโรคนั้นหลั่งออกมา ซึ่งในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เลือกศึกษาส่วนลอยจากแอคติโนแบซิลัส แอคติโนมัยซิเทียม โคมิแทนส์ และส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวัลิส เนื่องจากมีรายงานการศึกษาว่าสามารถกระตุ้นให้เกิดการทำลายของอวัยวะปริทันต์<sup>(144)</sup> โดยพบปัจจัยก่อโรคที่สกัดได้จากส่วนลอยจากแอคติโนแบซิลัส แอคติโนมัยซิเทียม โคมิแทนส์ เช่น ลิโคท็อกซิน ไชโตท็อกซิน เอ็นไซม์ย่อยสลายโปรตีนที่เชื่อมปลดปล่อยออกนอกเซลล์ สำหรับพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวัลิส นั้นพบว่าปัจจัยก่อโรคที่สกัดได้จากส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวัลิส ที่พบมีความเกี่ยวข้องกับการทำลายของอวัยวะปริทันต์ และกระดูกเบ้าฟันได้แก่ ไลโปโพลีแซคคาไรด์ ฟิมเบรีย ฮีแมกกลูตินิน และโปรตีนแอนติเจน ซึ่งปัจจัยก่อโรคเหล่านี้จะเป็นสื่อหรือตัวกระตุ้นเซลล์ต่างๆที่อยู่บริเวณที่มีการอักเสบให้มีการส่งสัญญาณเข้าไปสู่ภายในเซลล์ โดยกระบวนการส่งสัญญาณนี้จะต้องอาศัยตัวรับจำเพาะที่อยู่บนผิวเซลล์

พาร์-2 เป็นตัวรับจำเพาะที่สำคัญชนิดหนึ่งที่มีรายงานมีความเกี่ยวข้องกับการอักเสบ ซึ่งรวมถึงโรคปริทันต์อักเสบ<sup>(25-27,36,164-165)</sup> และการศึกษาเมื่อไม่นานมานี้ มีรายงานว่าสามารถพบการแสดงออกของพาร์-2 ได้ในอวัยวะต่างๆ ของร่างกาย เช่น สมอง ทางเดินหายใจ หัวใจ กระเพาะอาหาร ตับอ่อน ไต ตับ ผิวหนัง รวมทั้งเซลล์หลายชนิด ได้แก่ เซลล์เยื่อบุผิว เซลล์กระดูก และเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน<sup>(173)</sup> นอกจากนี้ยังสามารถพบพาร์-2 ที่เซลล์เยื่อบุผิวช่องปาก และเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือก<sup>(28)</sup> แต่สำหรับเซลล์เอ็นดอทีลียัลของมนุษย์ยังไม่มีการศึกษา ถือว่าเป็นเซลล์ชนิดหนึ่งที่มีบทบาทความสำคัญที่เกี่ยวข้องกับพยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์อักเสบนอกเหนือจากเซลล์อักเสบ โดยเฉพาะในเรื่องการสร้างและการทำลายขององค์ประกอบของเนื้อเยื่อปริทันต์ ในทางปริทันต์วิทยาเซลล์

ชนิดนี้เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างของอวัยวะปริทันต์ ซึ่งไม่เพียงช่วยในการสร้างและคงสภาพของเอ็นเยื่อปริทันต์ แต่ยังช่วยซ่อมแซมและช่วยสร้างกระดูกเบ้าฟันรวมทั้งเคลือบรากฟันขึ้นมาใหม่<sup>(174-178)</sup> โดยเซลล์ชนิดนี้ยังถือได้ว่าเป็นเซลล์ที่ตอบสนองต่อโรคปริทันต์อักเสบด้วย จึงเลือกเซลล์เอ็นเยื่อปริทันต์ของมนุษย์มาศึกษาในครั้งนี้

ดังได้กล่าวไปแล้วข้างต้นว่าบทบาทของพาร์-2 กับเซลล์เอ็นเยื่อปริทันต์ของมนุษย์นั้นยังไม่มีรายงานมาก่อน การศึกษาในครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นว่า เซลล์เอ็นเยื่อปริทันต์ของมนุษย์ในสภาวะปกติสามารถพบการแสดงออกของพาร์-2 ทั้งในระดับเมซเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอและโปรตีนได้เช่นเดียวกัน และเมื่อทำการศึกษาโดยการกระตุ้นเซลล์เอ็นเยื่อปริทันต์ของมนุษย์ด้วยส่วนลอยจากแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์ ในอัตราส่วนของส่วนลอยจากแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์ต่ออาหารเลี้ยงเซลล์ที่เพิ่มขึ้น พบว่า การแสดงออกของพาร์-2 ทั้งในระดับเมซเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอ และระดับโปรตีน มีระดับเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม จึงน่าจะเป็นไปได้ว่าในส่วนลอยจากแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์ มีปัจจัยก่อโรคบางชนิดที่สามารถจับกับพาร์-2 ที่อยู่บนผิวเซลล์เอ็นเยื่อปริทันต์ของมนุษย์แล้วส่งสัญญาณเข้าสู่ภายในเซลล์ ส่งผลให้มีการแสดงออกของพาร์-2 เพิ่มขึ้นกว่าในสภาวะปกติ โดยพาร์-2 ที่เพิ่มขึ้นเกิดจากการเคลื่อนย้ายของพาร์-2 ที่เก็บสะสมไว้ในกอลจิคอมเพลกซ์ หรือมีการผลิตขึ้นมาใหม่<sup>(179)</sup> หรือมีปัจจัยก่อโรคบางชนิดที่สามารถจับกับตัวรับชนิดอื่นบนผิวเซลล์ ซึ่งในปัจจุบันนี้ยังไม่มีรายงานที่ชัดเจนนัก มีเพียงการศึกษาของไนย์เสต์ทและคณะปี 1996 พบการแสดงออกของพาร์-2 เพิ่มขึ้น เมื่อกระตุ้นเซลล์หลอดเลือดด้วยแอลพีเอส<sup>(180)</sup> โดยไม่ได้สรุปถึงกลไกการส่งสัญญาณที่ทำให้เกิดการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของพาร์-2 อย่างไรก็ตามเราเชื่อว่าเป็นส่วนลอยจากแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์ ที่ใช้ในการวิจัยนี้ก็น่าจะมีแอลพีเอส เป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย ดังนั้นจึงอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ผลการกระตุ้นการแสดงออก โดยส่วนลอยจากแอกติโนแบซิลัสแอกติโนมายซิเทมโคมิแทนส์ มีมากกว่ากลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยังมีความเป็นไปได้ว่าสัญญาณที่ส่งผ่านในเซลล์นั้นส่งผลให้มีการหลั่งสารอักเสบหรือไซโตไคน์ต่างๆออกมา แล้วไซโตไคน์เหล่านี้ยังกลับไปมีผลไปกระตุ้นเซลล์เอ็นเยื่อปริทันต์ของมนุษย์ให้มีการแสดงออกของพาร์-2 เพิ่มขึ้นกว่าในสภาวะปกติได้อีกด้วย ดังเช่นการศึกษาของไนย์เสต์ท และคณะ ปี 1996 ทำการศึกษาผลการแสดงออกของพาร์-2 เมื่อกระตุ้นเซลล์หลอดเลือดด้วยไซโตไคน์ พบว่าอินเตอร์ลิวคิน-1แอลฟาหรือทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์แอลฟา สามารถเพิ่มการแสดงออกของพาร์-2 ได้<sup>(180)</sup>

แต่ในทางกลับกันในการศึกษาครั้งนี้เมื่อกระตุ้นเซลล์เอ็นเยื่อปริทันต์ของมนุษย์ด้วยส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรไมแนสจึงจิวาลิสไม่ว่าจะเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง จะพบว่าการแสดงออกของพาร์-2 มีระดับลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่จะเพิ่มขึ้นตามอัตราส่วนของส่วนสกัดเซลล์แตกพอร์ไฟโรไมแนสจึงจิวาลิส ที่ใส่ไปกระตุ้น คือ 1.25, 2.5 และ 5  $\mu\text{g/ml}$  แสดงว่าในส่วนสกัด

เซลล์แตกพอร์ไฟโรโมแนสจึงจิวาลิส จะมีปัจจัยก่อโรคหรือโมเลกุลมากกว่า 1 ชนิดที่มีผลกระตุ้นการ แสดงออกของพาร์-2 กล่าวคือ มีปัจจัยก่อโรคหรือโมเลกุลบางอย่างสามารถกระตุ้นให้มีการแสดงออก ของยีนพาร์-2 ที่สูงขึ้น ในขณะที่เดียวกันก็จะมีปัจจัยก่อโรคหรือโมเลกุลอีกชนิดหนึ่งหรือหลายชนิด ซึ่งมี ผลในด้านการยับยั้งการแสดงออกของยีนพาร์-2 ให้น้อยลง โดยลักษณะการยับยั้งนั้นอาจเกิดได้หลาย ลักษณะได้แก่ 1)การมีปัจจัยก่อโรคหรือโมเลกุลบางชนิดในส่วนของสัคเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนสไปมี ผลยับยั้งหรือแย่งจับกับตัวรับจำเพาะบนผิวเซลล์ซึ่งทำให้ไม่มีผลต่อการส่งสัญญาณไปกระตุ้นการ แสดงออกของพาร์-2 2)การจับกันระหว่างปัจจัยก่อโรคกับตัวรับจำเพาะบนผิวเซลล์ทำให้การส่ง สัญญาณต่อไปไม่ได้โดยตัวเอง 3)การมีปัจจัยก่อโรคหรือโมเลกุลบางชนิดจากส่วนของสัคเซลล์แตกของ พอร์ไฟโรโมแนสส่งสัญญาณเข้าสู่ในเซลล์แล้วไปมีผลต่อตัวส่งสัญญาณภายในเซลล์ ทำให้มีการผลิต สารบางชนิด ซึ่งสารนั้นมีผลให้เซลล์เอ็นยิดปริทันต์ของมนุษย์มีการแสดงออกของยีนพาร์-2 ให้น้อยลง ดังเช่นการศึกษาของไนย์สเตท และคณะปี 1996 พบว่าฟอร์สโคลิน สามารถกระตุ้นอะดีนิลไซคลิเซส (adenylyl cyclases) ซึ่งสารนี้จะมีผลต่อไปในการเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของ cAMP ส่งผลให้มีการ แสดงออกของยีนพาร์-2 น้อยลง

ส่วนการพบโปรตีนพาร์-2 ที่ได้จากการทำให้เซลล์แตก ภายหลังจากเซลล์เอ็นยิดปริทันต์ของ มนุษย์ได้รับการกระตุ้นด้วยส่วนของสัคเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนสจึงจิวาลิส มีระดับลดลง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยเป็นการลดลงที่ผูกพันกับอัตราส่วนของสารสัคเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนสจึงจิวาลิส ที่ใช้ในการกระตุ้น ซึ่งตรงข้ามกับผลการแสดงออกของยีนพาร์-2 จึงเข้าใจว่าน่าจะมีกลไกที่เป็น การลดการทำงาน (downregulation) จากส่วนของสัคเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนสจึงจิวาลิส ที่พอจะ เป็นไปได้ กล่าวคือ มีกลไกจากปัจจัยก่อโรคหรือโมเลกุลบางอย่างซึ่งอาจเป็นพวกเอ็นไซม์โปรตีนเนส ที่ ทำให้เกิดการลดลงของจำนวนโปรตีนพาร์-2 ไม่ว่าจะโปรตีนพาร์-2 ที่เก็บสะสมอยู่ภายในเซลล์หรือ เป็นโปรตีนพาร์-2 ที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับจำเพาะอยู่บนผิวเซลล์ สัมผัสโดยตรงกับเอ็นไซม์โปรตีนที่อยู่ใน ส่วนสัคเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนสจึงจิวาลิสเป็นเวลานานอาจเป็นชั่วโมงหรือเป็นวัน ส่งผลให้ โปรตีนพาร์-2 ถูกทำลายในเวลาต่อมา ดังเช่นรายงานของโอดิเวียร์ และคณะปี 1998<sup>(179)</sup> ซึ่งกล่าวว่า กลไกนี้เกิดได้ไม่บ่อยนัก ที่เซลล์จะได้รับการสัมผัสกับสารหรือโมเลกุลที่มีผลต่อการตอบสนองของเซลล์ (agonist) แต่อย่างไรก็ตามการลดการทำงานนี้ อาจเกิดได้ภายใต้พยาธิสภาพของการก่อโรค คือ เกิดได้เมื่อสภาวะนั้นมีการผลิตสารหรือโมเลกุลที่มีผลต่อการตอบสนองของเซลล์ออกมาอย่างต่อเนื่อง หรืออยู่ในช่วงเวลาที่ได้รับสารหรือโมเลกุลดังกล่าวเป็นเวลานาน ซึ่งเป็นไปได้ว่ากลไกที่เกิดขึ้นสามารถ เพิ่มการย่อยสลายและลดการผลิตโปรตีนพาร์-2 ได้ กลไกดังกล่าวนี้สามารถเกิดขึ้นได้ในพาร์-1 ดังเช่น การศึกษาเกี่ยวกับโปรตีนพาร์-1ของซาซาเรียส และคณะปี 1995<sup>(181)</sup> ศึกษาบทบาทของทรอมบิน และฟอร์บออลิซิสเทอร์ซึ่งเป็นสารกระตุ้นโปรตีนไคเนสซี (protein kinase C) ในการควบคุมการ

แสดงออกของพาร์-1 ทั้งในระดับโปรตีนและระดับเมสเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอ โดยอาศัยกลไกในการส่งสัญญาณที่แตกต่างกัน พบว่าเมื่อให้ทอมบิโนซึ่งถือว่าเป็นเอนไซม์ที่มีโครงสร้างคล้ายกับตัวรับจำเพาะพาร์-1 (ตัวรับจำเพาะต่อทอมบิโน) กระตุ้นตัวรับจำเพาะพาร์-1 เป็นเวลานาน (24 ชั่วโมง) จะส่งผลให้ตัวรับจำเพาะพาร์-1 มีการสลายตัวเพิ่มขึ้น ในขณะที่ยีนพาร์-1 ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับการกระตุ้นจากทอมบิโน

นอกจากนี้อาจเกิดจากกลไกที่เกิดจากโปรตีนพาร์-2 ที่อยู่บนผิวเซลล์ถูกเหนี่ยวนำด้วยเอนไซม์หรือโปรตีนบางชนิดทำให้โปรตีนพาร์-2 ที่อยู่บนผิวเซลล์ถูกนำเข้าสู่ภายในเซลล์ (endocytosis) มีการศึกษาพบว่าหลังจากมีการกระตุ้นโปรตีนพาร์ให้สามารถทำหน้าที่ได้นั้นจะเกิดการนำโปรตีนพาร์เข้าสู่ภายในเซลล์อย่างรวดเร็ว<sup>(182-183)</sup> ดังเช่นการศึกษาของโบฮ์ม และคณะปี 1996<sup>(182)</sup> พบว่าทริปซินและเปปไทด์สามารถกระตุ้นให้เซลล์เยื่อบุผิวมีการบวมตัวแล้วนำโปรตีนพาร์-2 เข้าไปภายในเซลล์ โดยโปรตีนพาร์-1 และพาร์-2 เริ่มเข้าไปอยู่ภายในถุงที่มีเยื่อหุ้มที่ได้จากกระบวนการนำโปรตีนพาร์-2 เข้าสู่ภายในเซลล์ เรียกว่าเอนโดโซม จากนั้นเอนโดโซมจะรวมกับไลโซโซมซึ่งเป็นแหล่งที่มีการย่อยสลายเกิดขึ้นภายในเซลล์ทำให้โปรตีนพาร์-2 เกิดการย่อยสลาย การบวมของเยื่อหุ้มเซลล์และการย่อยสลายที่เกิดขึ้นกับโปรตีนพาร์-2 นั้นเกี่ยวข้องกับการทำให้โปรตีนพาร์-2 ลดความไวในการเกิดปฏิกิริยา (desensitization) โดยการกำจัดโปรตีนพาร์-2 ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวรับจำเพาะออกจากพื้นผิวเซลล์และโดยการย่อยสลายโปรตีนพาร์-2 ในไลโซโซม

จากผลการศึกษาในครั้งนี้ทำให้ได้ข้อมูลในการสนับสนุนการเกิดพยาธิสภาพของโรคปริทันต์อักเสบซึ่งมีสาเหตุจากแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญ ได้แก่ แอคติโนแบคทีเรียแอคตินอมัยซิเทมโคมิแทนส์ และพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวัลลิส โดยพบว่าปัจจัยก่อโรคที่เกี่ยวข้องกับแอคติโนแบคทีเรียแอคตินอมัยซิเทมโคมิแทนส์ ปล่อยออกมาจากเซลล์นั้นสามารถทำให้โรคปริทันต์อักเสบนั้นมีความรุนแรงมากขึ้นได้ โดยมีกลไกของการส่งสัญญาณผ่านทางพาร์-2 การศึกษาครั้งนี้พบว่าส่วนลอยจากแอคติโนแบคทีเรียแอคตินอมัยซิเทมโคมิแทนส์สามารถกระตุ้นให้มีการแสดงออกของพาร์-2 ที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมซึ่งแปรผันตามอัตราส่วนของส่วนลอยที่มากกระตุ้น และรายงานการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า การส่งสัญญาณผ่านทางตัวรับพาร์-2 สามารถทำให้โรคปริทันต์อักเสบมีความรุนแรงขึ้น โดยส่งผลให้มีการทำลายกระดูกเบ้าฟันเพิ่มขึ้น<sup>(164)</sup> นอกจากนี้การส่งสัญญาณผ่านทางตัวรับพาร์-2 ยังมีผลต่อเซลล์ของร่างกายอื่นๆ หลายชนิด โดยเฉพาะเซลล์เยื่อบุผิวช่องปาก เซลล์สร้างเส้นใยของเหงือก หลังสารอักเสบและไซโตไคน์ออกมา เช่น อินเตอร์ลิวคิน-6 อินเตอร์ลิวคิน-8 โพรสตาแกลนดินอี-2 รวมทั้งกระตุ้น เอ็มเอ็มพี ซึ่งทำให้เกิดการทำลายของอวัยวะปริทันต์ได้<sup>(25-27)</sup>

สำหรับพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวัลลิส จากการศึกษาพบว่าส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวัลลิสนั้นพบการแสดงออกของพาร์-2 ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม โดยการแสดงออกของยีนพาร์-2 จะ

แปรผันตามอัตราส่วนของส่วนสกัดเซลล์แตกที่มากกระตุ้น ขณะที่การแสดงออกของโปรตีนพาร์-2 นั้นพบว่าแปรผกผันกับอัตราส่วนของส่วนสกัดเซลล์แตกที่มากกระตุ้น ซึ่งตรงกันข้ามกับผลที่พบจากส่วนลอกจากแอสตีโนแบซิลัสแอสตีโนมายซิเทมโคมิแทนส์ อาจเป็นไปได้ว่าส่วนสกัดเซลล์แตกของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालิส มีปัจจัยก่อโรคหรือโมเลกุลบางอย่างที่แสดงผลการทำงานหรือยับยั้งที่มากกว่าปัจจัยก่อโรคหรือโมเลกุลที่มีผลในด้านการกระตุ้น ทำให้ผลลัพธ์ของการกระตุ้นโดยรวมออกมาในทิศทางลดลงกว่ากลุ่มควบคุม จึงเป็นเรื่องน่าคิดว่าพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालิส ทำให้ร่างกายเกิดพยาธิสภาพได้ โดยไม่ได้อาศัยการส่งสัญญาณผ่านพาร์-2 แต่น่าจะใช้ตัวรับอื่นๆ ที่อยู่บนผิวเซลล์ในการส่งสัญญาณแล้วนำไปสู่การอักเสบและการทำลายของอวัยวะปริทันต์

การที่คิดว่าจะเกิดสถานการณ์แบบนี้ได้ เนื่องจากในการศึกษานี้ไม่ได้ใช้ตัวกระตุ้นที่เป็นสารบริสุทธิ์เพียงชนิดใดชนิดหนึ่งสกัดออกมาจากเชื้อมาทำการรักษา ผลที่ได้จึงไม่ได้แสดงผลกระตุ้นทางใดทางหนึ่งชัดเจนลงไป อย่างไรก็ตามการศึกษานี้สามารถเทียบเคียงได้กับการเกิดพยาธิสภาพของโรคปริทันต์อักเสบที่เกิดขึ้นจริงในร่างกายได้มากกว่า ซึ่งมีโอกาสพบปัจจัยก่อโรคหรือโมเลกุลหลายชนิดจากแบคทีเรียก่อโรคในเวลาพร้อมๆกัน แต่เซลล์ของร่างกายหรือกลไกของร่างกายจะเป็นตัวเลือกเองว่าจะใช้กลไกหรือตัวรับชนิดใดในการส่งสัญญาณผ่านตัวรับจำเพาะบนผิวเซลล์ ดังนั้นบทบาทและกลไกของพาร์-2 จึงไม่น่าจะเป็นตัวเด่นให้กับปัจจัยก่อโรคของพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालิสในการทำให้เกิดโรคปริทันต์อักเสบหรือทำให้โรคปริทันต์อักเสบมีความรุนแรง

อย่างไรก็ตามแม้การศึกษาที่เกี่ยวข้องกับพาร์-2 นั้นมีไม่มากนัก โดยเฉพาะอย่างยิ่งไม่เคยมีการศึกษา พาร์-2 กับเซลล์เอ็นเย็ดปริทันต์ของมนุษย์ และผลจากการศึกษาในครั้งนี้เป็นเพียงการศึกษาในขั้นต้นซึ่งแสดงให้เห็นถึงบทบาทของแบคทีเรียก่อโรค 2 ชนิด ที่มีผลกระตุ้นให้เซลล์เอ็นเย็ดปริทันต์ของมนุษย์มีการแสดงออกของพาร์-2 เป็นไปในทิศทางที่ต่างกัน ซึ่งผลการศึกษาในครั้งนี้คาดว่าจะมีประโยชน์ต่อไปในอนาคตในการศึกษาเกี่ยวกับกลไกต่างๆ ของพาร์-2 ต่อปัจจัยก่อโรคโดยเฉพาะที่มีอยู่ในแอสตีโนแบซิลัสแอสตีโนมายซิเทมโคมิแทนส์

## บทสรุป

จากผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าปัจจัยก่อโรคจากแบคทีเรียก่อโรคต่างชนิดกันสามารถกระตุ้นให้เซลล์เอ็นเย็ดปริทันต์ของมนุษย์มีการแสดงออกของพาร์-2 ได้ต่างกัน โดยผลการศึกษาที่ออกมานั้นยังไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัด แต่ทั้งนี้อาจเกี่ยวข้องกับกลไกการส่งสัญญาณภายในเซลล์ และกลไกการย่อยสลายของพาร์-2 นอกจากนี้ยังรวมถึงสารหรือโมเลกุลจากภายนอกและภายในเซลล์ที่มีผลในการยับยั้งกระบวนการในการแสดงออกของพาร์-2 ดังนั้นปัจจัยก่อโรคจากแบคทีเรียที่มี

ส่วนเกี่ยวข้องในการเกิดโรคปริณันต์อักเสบ และส่งผลให้โรคปริณันต์อักเสบมีความรุนแรงขึ้น อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับบทบาทของพาร์-2

บรรณานุกรม

## บรรณานุกรม

1. Socransky SS, Haffajee AD. Microbial mechanisms in the pathogenesis of destructive periodontal disease: a critical assessment. J Periodontol Res 1991;26:195-212.
2. Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. J Periodontol 1992;63:322-31.
3. Socransky SS, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol 1998;25:134-44.
4. Socransky SS, Haffajee AD. Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. Periodontol 2000 1994;5:7-25.
5. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal disease. Periodontol 2000 1994;5:78-111.
6. Williams RC. Periodontal disease. N Engl J Med 1990;322:373-382.
7. Zambon JJ. Periodontal disease: microbial factors. Ann Periodontol 1996;1:879-925.
8. Moore WE, Moore LH, Ranney RR, Smibert RM, Burmeister JA, Schenkein HA. The microflora of periodontal sites showing destructive progression. J Clin Periodontol 1991;18:729-39.
9. Genco RJ. Host responses in periodontal disease: current concepts. J Periodontol 1992;63:338-55.
10. Greenstein G, Lamster I. Changing periodontal paradigms: therapeutic implications. Int J Periodontics Restorative Dent 2000;20:336-57.
11. Moore WE. Microbiology of periodontal disease. J Periodontol Res 1987;22:335-340.
12. Slots J, Genco RJ. Black-pigmented *Bacteroides* species, *Capnocytophaga* species, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: virulence factors in colonization. Survival and tissue destruction. J Dent Res 1984;63:412-421.
13. Socransky SS. Microbiology of periodontal disease: Present status and future considerations. J Periodontol 1977;48:497-504.
14. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal disease and conditions. Ann Periodontol 1999;4:1-6.

15. Slots J, Listgarten MA. *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. J Clin Periodontol 1988;15:85-93.
16. Slots J, Reynolds HS, Genco RJ. *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: a cross-sectional microbiological investigation. Infect Immun 1980;29:1013-1020.
17. Zambon JJ. *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: a review article. J Clin Periodontol 1985;12:1-20.
18. Neil M. O'Brien-Simpson. Paul D. Antigens of bacteria associated with periodontitis. Periodontology 2000 2004;35:101-104.
19. Tsai CC, Shenker BJ, DiRienzo JM, Malamud D, Taichman NS. Extraction and isolation of a Leukotoxin from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. with polymyxin B . Infect Immun 1984;43:700-705.
20. Van Dyke TE, Bartholomew E, Genco RJ, Slots J, Levine MJ. Inhibition of neutrophil chemotaxis by soluble bacterial products. J Periodontol 1982;53:502-508.
21. Shenker BJ, McArthur WP, Tsai CC. Immune suppression induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* I. Effects on human peripheral blood lymphocyte responses to mitogens and antigens. J Immunol 1982;128:148-154.
22. Kiley P, Holt SC. Characterization of the lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4 and N27. Infect Immun 1980;30:862-873.
23. Ossovskaya VS. Bunnett NW. Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. Physiol Rev 2004;84:579-621.
24. Vergnolle N. Bunnett NW. Sharkey KA. Brussee V. Compton S. Grady E. Cirino G. Gerard N. Basbaum A. Andrade GP. Hollenberg MD. Wallace JL. Proteinase-activated receptor-2 and hyperalgesia: a novel pain pathway. Nat Med 2001;7:821-826.
25. Lourdoukous A. Potempa J. Travis J et al. Arginine-specific proteinase from *Porphyromonas gingivalis* activates proteinase-activated receptors on human oral epithelial cells and induces interleukin-6 secretion. Infect Immun 2001a;69:5121-5130.
26. Abraham LA. Chinni C. Jenkins AL et al. Expression of proteinase-activated receptor-2 by osteoblasts. Bone 2000;26:7-14.

27. Uehara A. Muramoto K. Takada H. Sugawara S. Neutrophil serine proteinase activate human nonepithelial cells to produce inflammatory cytokines through proteinase-activated receptor 2. *J Immunology* 2003;170:5690-5696.
28. Holzhausen M. Spolidorio LC. Vergnolle N. proteinase-activated receptor-2 (PAR<sub>2</sub>) agonist cases periodontitis in rats. *J Dent Res* 2005;84(2):154-159.
29. Vergnolle N. Wallace JL. Bunnett NW. Hollenberg MD. Protease-activated receptors in inflammation, neuronal signaling and pain. *Trends Pharmacol Sci* 2001;22:146-152.
30. Couhlin SR. Camerer E. Participation in inflammation. *J Clin Invest* 2003;111:25-27.
31. Fabien S. Silvia A. Reynal V. Marcello T. Nadine M. George C. Michele T. Giorgio C. Cristina M. Pierangelo G and Nigel W. Bunnett. Expression and Function of Proteinase-activated Receptor 2 in Human Bronchial Smooth Muscle. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1276-1281.
32. Ohta T. Shimizu K. Protease-activated receptor-2 expression and the role of trypsin in cell proliferation in human pancreatic cancers. *Inter J of Onco.*2003;23:61-66.
33. Yasushi Hirota, Yutaka Osuga<sup>1</sup>, Tetsuya Hirata, Miyuki Harada, Chieko Morimoto, Osamu Yoshino, Kaori Koga, Tetsu Yano, Osamu Tsutsumi and Yuji Taketani. Activation of protease-activated receptor 2 stimulates proliferation and interleukin (IL)-6 and IL-8 secretion of endometriotic stromal cells. *Human Reproduction* 2005;20(12):3547-3553.
34. Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal disease. *J Periodontol* 1993;64:474-84.
35. DeCarlo AA Jr., Windsor LJ, Bodden MK, Harber GJ, Birkedal-Hansen B, Birkedal-Hansen H. Activation and novel processing of matrix metalloproteinases by a thiol-proteinase from the oral anaerobe *Porphyromonas gingivalis*. *J Dent Res* 1997;76:1260-70.
36. M Holzhausen. LC Spolidoris. N Vergnolle. Role of protease-activated receptor-2 in inflammation, and its possible implications as a putative mediator of periodontitis. *Men Inst Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro* 2005;100(1):177-180.
37. World Workshop in Periodontics. Periodontal disease: pathogenesis and microbial factors. Consensus report. *Ann Periodontol* 1996;1:926-932.

38. Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000* 1997;14:9-11.
39. Garlet GP, Martins W Jr, Fonseca BA, Ferreira BR, Silva JS. Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2004;31:671-679.
40. Kinane DF, Lappin DF. Clinical, pathological and immunological aspects of periodontal disease. *Acta Odontol Scand* 2001;59:154-160.
41. Seymour GJ, Gemmell E. Cytokines in periodontal disease: where to from here? *Acta Odontol Scand* 2001;59:167-173
42. Darveau RP, Tanner A, Page RC. The microbial challenge in periodontitis. *Periodontol 2000* 1997;14:12-32.
43. Offenbacher S. Periodontal diseases: pathogenesis. *Ann of Periodontol* 1996;1:821-78.
44. Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: Summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontology* 2000 1997;14:216-248.
45. Fives-Taylor PM, Meyer DH, Mintz KP, Brissette C. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Periodontol 2000* 1999;20:136-167.
46. Yao ES, Lamont RJ, Leu SP, Weinberg A. Interbacterial binding among strains of pathogenic and commensal oral bacterial species. *Oral Microbiol Immunol* 1996;11:35-41.
47. Socransky SS, Haffajee AD, Dzink JL, Hillman JD. Associations between microbial species in subgingival plaque samples. *Oral Microbiol Immunol* 1988;3:1-7.
48. Christersson LA, Fransson CL, Dunford RG, Zambon JJ. Subgingival distribution of periodontal pathogenic microorganisms in adult periodontitis. *J Periodontol* 1992;63:418-425.
49. Beck JD, Koch GG, Zambon JJ, Genco RJ, Tudor GE. Evaluation of oral bacteria as risk indicators for periodontitis in older adults. *J Periodontol* 1992;63:93-99.
50. Ebersole JL, Cappelli D, Sandoval MN. Subgingival distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in periodontitis. *J Clin Periodontol* 1994;21:65-75.

51. Haffajee AD, Socransky SS, Smith C, Dibart S. The use of DNA probes to examine the distribution of subgingival species in subjects with different levels of periodontal destruction. *J Clin Periodontol* 1992;19:84-91.
52. Lamster I, Kaluszbnner-Shapira I, Herrera-Abreu M, Sinha R, Grbic J. Serum IgG antibody response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*: implications for periodontal diagnosis. *J Clin Periodontol* 1998;25:510-516.
53. Rodenburg JP, van Winkelhoff AJ, Winkel EG, Goene RJ, Abbas F, de Graff J. Occurrence of *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in severe periodontitis in relation to age and treatment history. *J Clin Periodontol* 1990;17:392-399.
54. Sastrowijoto SH, Hillemmas P, van Steenberghe TJM, Abraham-Inpijn L, and de Graaff J. Periodontal condition and microbiology of healthy and diseased periodontal pockets in type 1 diabetes mellitus patients. *J Clin Periodontol* 1989;16:316.
55. Holt SC, Ebersole JL, Felton J, Brunsvold M, Kornman KS. Implantation of *Bacteroides gingivalis* in nonhuman primates initiates progression of periodontitis. *Science* 1988;239:55-57.
56. Slots J, Lisgarten MA. *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1988;15:85-93.
57. Spiegel CA, Hayduk SE, Minah GE, and Krywolap GN. Black-pigmented *Bacteroides* from clinically characterized periodontal sites. *J Periodont Res* 1979;14:376.
58. van der Velden U, van Winkelhoff AJ, Abbas F, and de Graaff J. The habitat of periodontopathic microorganisms. *J Clin periodontal* 1986;13:243.
59. Moore WEC, Holdenman LV, Smibert RM, Good JJ, Burmeister JA, Palcanis KG, and Ranney RR. Bacteriology of experimental gingivitis in children. *Infect Immun* 1984; 46:1.
60. Savitt ED, and Socransky SS. Distribution of certain subgingival microbial species in selected periodontal conditions, *J Periodont Res* 1984;19:111.
61. Zambon JJ, Reynold HS, Genco RJ. Studies of the subgingival microflora in patients with acquire immunodeficiency syndrome. *J Periodontol* 1990;61:699.

62. Pekovic DD, Fillery ED. Identification of bacteria in immunopathological mechanisms of human periodontal disease. *J Periodont Res* 1984;77:324.
63. Paul JE, Christopher WC. Microorganisms as risk indicators for periodontal disease. *J Periodontol* 2000 2003;(32):24-35.
64. Laliberte M, Mayrand D. Characterization of black-pigmented *Bacteroides* strains isolated from animals. *J Appl Microbiol* 1983;55:247-252.
65. Takazoe I, Nakamura T, Okuda K. Colonization of the subgingival area by *Bacteroides gingivalis*. *J Dent Res* 1984;63:422-426.
66. Loos BG, Dyer DW, Genco RJ, Selander RK, Dickinson DP. Natural history and epidemiology. In: Shah HN, ed *Biology of the species Porphyromonas gingivalis*. Boca Raton, FL: CRC Press 1993:3-31.
67. Petit M D A, van Steenberghe T J M, Timmerman M F, de Graaff J, van der Velden U. Prevalence of periodontitis and suspected periodontal pathogens in families of adult periodontitis patients. *J Clin Periodontol*. 1994;21:76-85.
68. Potempa J, Pike R, Travis J. The multiple forms of trypsin-like activity present in various strains of *Porphyromonas gingivalis* are due to the presence of either Arg-gingipain or Lys-gingipain. *Infect Immun*. 1995;63:1176-1182.
69. Laine ML, Appelmeik BJ, van Winkelhoff AJ. Novel polysaccharide capsular serotypes in *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res* 1996;31:278-284.
70. Laine ML, Appelmeik BJ, van Winkelhoff AJ. Novel polysaccharide capsular serotypes in *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res* 1996;31:278-284.
71. Schifferle RE, Reddy MS, Zambon JJ, Genco RJ, Levine MJ. Characterization of a polysaccharide antigen from *Bacteroides gingivalis*. *J Immunol* 1989;143:3035-3042.
72. Laine ML, Appelmeik BJ, van Winkelhoff AJ. Novel polysaccharide capsular serotypes in *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res* 1996;31:278-284.
73. Zhao S, Shi J, Xiao M. Effects of capsules on attachment of human periodontal ligament fibroblasts to root surface. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 1996;31:19-21.
74. Sundqvist G, Figdor D, Hanstrom L, Sorlin S, Sandstrom G. Phagocytosis and virulence of different strains of *Porphyromonas gingivalis*. *Scand J Dent Res* 1991; 99:117-129.

75. Koga T, Nishihara T, Fujiwara T, Nisizawa T, Okahashi N, Noguchi T, Hamada S. Biochemical and immunobiological properties of lipopolysaccharide (LPS) from *Bacteriodes gingivalis* and comparison with lipopolysaccharide from *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1985;47:638-647.
76. Kumada H, Kondo S, Umemoto T, Tanamoto K. Chemical structure of the 2-keto-3-deoxyoctonate region of lipopolysaccharide isolated from *Porphyromonas (Bacteriodes) gingivalis*. *FEMS Microbiol Lett* 1993;108:75-79.
77. 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.
78. 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.
79. Tabeta K, Yamazaki K, Akashi S, Miyake K, Kumada H, Umemoto T, Yoshie H. Toll-like receptors confer responsiveness to lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* in human gingival fibroblast. *Infect Immun* 2000;68:3731-3735.
80. Miyata Y, Takeda H, Kitano S, Hanazawa S. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-stimulated bone resorption via CD14 is inhibited by broad-spectrum antibiotics. *Infect Immune* 1997;65:3513-3519.
81. Dickinson DP, Kubiniec MA, Yoshimura F, Genco RJ. Molecular cloning and sequencing of the gene encoding the fimbrial subunit protein of *Bacteroides gingivalis*. *J Bacteriol* 1988;170:1658-1665.
82. Yoshimura F, Takahashi K, Nodasaka Y, Suzuki T. Purification and characterization of a novel type of fimbriae from the oral anaerobe *Bacteroides gingivalis*. *J Bacteriol* 1984;160:949-957.
83. Lee JY, Sojar HT, Bedi GS, Genco RJ. *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* fimbrillin: size, amino-terminal sequence, and antigenic heterogeneity. *Infect Immune* 1991;59:383-389.
84. 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; 61:3570-3573.
85. Duncan MJ, Nakao S, Skobe Z, Xie H. Interactions of *Porphyromonas gingivalis* with epithelial cells. *Infect Immun* 1993;61:2260-2265.
86. Hamada N, Watanabe K, Sasakawa C, Yoshikawa M, Yoshimura F, Umemoto T. Construction and characterization of a fimA mutant of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 1994;62:1696-1704.
87. Nakagawa I, Amano A, Kuboniwa M, Nakamura T, Kawabata S, Hamada S. Functional differences among FimA variants of *Porphyromonas gingivalis* and their effect on adhesion to and invasion of human epithelial cells. *Infect Immun* 2002;70:277-285.
88. Goulbourne PA, Ellen RP. Evidence that *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* fimbriae function in adhesion to *Actinomyces viscosus*. *J Bacteriol* 1991;173(17):5266-74.
89. Weinberg A, Belton CM, Park Y, Lamont RJ. Role of fimbriae in *Porphyromonas gingivalis* invasion of gingival epithelial cells. *Infect Immun* 1997;65(1):313-6.
90. Amano A, Sharma A, Lee JY, Sojar HT, Raj PA, Genco RJ. Structural domains of *Porphyromonas gingivalis* recombinant fimbriillin that mediate binding to salivary proline-rich protein and statherin. *Infect Immun* 1996;64(5):1631-7.
91. Amano A, Shizukuishi S, Horie H, Kimura S, Morisaki I, Hamada S. Binding of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae to proline-rich glycoproteins in parotid saliva via a domain shared by major salivary components. *Infect Immun* 1998;66(5):2072-7.
92. Murakami Y, Iwahashi H, Yasuda H, Umemoto T, Namikawa I, Kitano S, et al. *Porphyromonas gingivalis* fimbriillin is one of the fibronectin-binding proteins. *Infect Immun* 1996;64(7):2571-6.
93. Sojar HT, Hamada N, Genco RJ. Structures involved in the interaction of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae and human lactoferrin. *FEBS Lett* 1998;422(2):205-8.
94. Ishikawa I, Nakashima K, Koseki T, Nagasawa T, Watanabe H, Arakawa S, et al. Induction of the immune response to periodontopathic bacteria and its role in the pathogenesis of periodontitis. *Periodontology* 2000 1997;14:79-111.

95. Malek R, Fisher JG, Caleca A, Stinson M, van Oss CJ, Lee JY, et al. Inactivation of the *Porphyromonas gingivalis* *fimA* gene blocks periodontal damage in gnotobiotic rats. *J Bacteriol* 1994;176(4):1052-9.
96. Deslauriers M, Mouton C. Immunoresctivity in humans of *Bacteroides gingivalis* hemagglutination adhesion HA-Ag2. *Oral Microbiol Immunol* 1990;5:302-304.
97. Du L, Pellen-Mussi P, Chandad F, Mouton C, Bonnaure Mallet M. Conservation of fimbriae and the hemagglutination adhesion HA-Ag2 among *Porphyromonas gingivalis* strains and other anaerobic bacteria studied by epitope mapping analysis. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997;4:711-714.
98. Lamonde L, Mouton C. Alteration of erythrocyte cell shape by hemagglutinating bacteria. *J Dent Res* 1988;67:331.
99. 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.
100. Holt SC, Bramanti TE. Factors in virulence expression and their role in periodontal disease pathogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 1991;2:177-281.
101. Potempa J, Pavloff N, Travis J. *Porphyromonas gingivalis*: a proteinase/gene accounting audit. *Trends Microbiol* 1995;3:430-434.
102. Kadowaki T, Yoneda M, Okamoto K, Maeda K, Yamamoto K. Purification and characterization of a novel arginine-specific cysteine proteinase (argingipain) involved in the pathogenesis of periodontal disease from the culture supernatant of *Porphyromonas gingivalis*. *J Biol Chem* 1994;269:21371-8.
103. Bedi G, Williams T. Purification and characterization of a collagen-degrading protease from *Porphyromonas gingivalis*. *J Biol Chem* 1994;269:599-606.
104. Lamont RJ, Jenkinson HF. Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;62(4):1244-63.
105. Ekuni D, Yamamoto T, Yamanaka R, Tachibana K, Watanabe T. Proteases augment the effects of lipopolysaccharide in rat gingiva. *J Periodontal Res* 2003;38(6):591-6.
106. Kagnoff MF, Eckmann L. Epithelial cells as sensors for microbial infection. *J Clin Invest* 1997;100(1):6-10.

107. Richard PD, Anne T, Roy CP. The microbial challenge in periodontitis. *Periodontology* 2000 1997;14:12-32.
108. Darveau RP, Cunningham MD, Bailey T, Seachord C, Ratcliffe K, Bainbridge B, Dietsch M, Page RC, Aruffo A. Ability of bacteria associated with chronic inflammatory disease to stimulate E-selectin expression and promote neutrophil adhesion. *Infect Immune* 1995;65:1311-1317.
109. Cunningham MD, Seachord C, Ratcliffe K, Bainbridge B, Aruffo A, Darveau RP. *Helicobacter pylori* and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide and poorly transferred to recombinant soluble CD14. *Infect Immun* 1996;64:3601-3608.
110. Loesche WJ. Chemotherapy of dental plaque infections. *Oral Sci Rev* 1976;9:65-107.
111. Loesche WJ. Possibilities for treating periodontal disease as specific anaerobic infections. *J Can Dent Assoc* 1984;50(6):467-472.
112. Slots J. The predominant cultivable organisms in juvenile periodontitis. *Scand J Dent Res* 1976;84(1):1-10.
113. Newman MG, Socransky SS, Savitt ED, Propas DA, Crawford A. Studies of the microbiology of periodontosis. *J Periodontol* 1976;47(7):373-379.
114. 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(5):278-307.
115. Rosenberg ES, Torosian JP, Hammond BF, Cutler SA. Routine anaerobic bacterial culture and systemic antibiotic usage in the treatment of adult periodontitis: a 6-year longitudinal study. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1993;13:213-243.
116. Pappanou PN, Baelum V, Luan WM, Madianos PN, Chen X Fejerskov O, Dahlen G. Subgingival microbiota in adult Chinese: prevalence and relation to periodontal disease progression. *J Periodontol* 1997;68:651-666.
117. Rodenburg JP, van Winkelhoff AJ, Winkel EG, Goene RJ, Abbas F, de Graff J. Occurrence of *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in severe periodontitis in relation to age and treatment history. *J Clin Periodontol* 1990;17:392-399.

118. Contreras A, Rusitanonta T, Chen C, Wagner WG, Michalowicz BS, Slots J. Frequency of 530-bp deletion in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin promoter region. *Oral Microbiol Immunol* 2000;15:338-340.
119. Baehni P, Tsai CC, McArthur WP, Hammond BF, Taichman NS. Interaction of inflammatory cells and oral microorganisms. VIII. Detection of leukotoxic activity of plaque-derived gram-negative microorganism. *Infect Immun* 1979;24:233-243.
120. Asikainen S, Chen C, Slots J. Likelihood of transmitting *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in families with periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1996;11:387-94.
121. Fives-Taylor PM, Meyer DH, Mintz KP, Brissette C. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Periodontol* 2000 1999;20:136-67.
122. Shenker BJ, Kushner ME, Tsai CC. Inhibition of fibroblast proliferation by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* 1982;38:986-92.
123. Muller HP, Heinecke A, Borneff M, Knopf A, Kiencke C, Pohl S. Microbial ecology of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens* and *Capnocytophaga* spp. in adult periodontitis. *J Periodont Res* 1997;32:530-542.
124. Asikainen S, Chen C. Oral ecology and person-to-person transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *periodontol* 2000 1999;20:65-81.
125. Klinger R. Untersuchungen uber menschliche Aktinomykose. *Centralblatt Bacteriol (Orig)* 1912;62:191-200.
126. Holm P. Studies of the aetiology of human actinomycosis. II. Do the "other microbes" of actinomycosis possess virulence ? *Acta Patho Microbiol Scand* 1951;28(4):391-406.
127. Slots J, Reynolds HS, Genco RJ. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: a cross-sectional microbiological investigation. *Infect Immun* 1980;29(3):1013-1020.
128. Slots J. Selective medium for isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Microbiol* 1982;15:606-609.
129. Zambon JJ. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1985;12:1-20.

130. Ofek I, Beachy EH. General concepts and principles of bacterial adherence in animals and man. In: Beachy EH, ed. Bacterial adherence. London: Chapman & Hall, 1980;1-29.
131. Ishihara K, Honma K, Miura T, Kato T, Kato T, Okuad K. Cloning and sequence analysis of the fimbriae associated protein (fap) gene from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Microb Pathog 1997;23:63-69.
132. Inouye T, Ohta H, Kokeyuchi S, Fukui K, Kato K. Colonial variation and fimbriation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. FEMS Microbiol Lett 1990;57:13-17.
133. Meghji S, Henderson B, Nair S, Wilson M. Inhibition of bone DNA and collagen production by surface-associated material from bacteria implicated in the pathology of periodontal disease. J Periodontol 1992;63:736-742.
134. Lai CH, Listgarten MA, Hammond BF. Comparative ultrastructure of leukotoxic and non-leukotoxic strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J Periodont Res 1981;16:379-389.
135. Meyer DH, Fives-Taylor PM. Evidence that extracellular components function in adherence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to epithelial cells. Infect Immun 1993;61:4933-4936.
136. Fives-Taylor P, Meyer D, Mintz K. Characteristics of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* invasion of and adhesion to cultured epithelial cells. Adv Dent Res 1995;9:55-62.
137. King EO, Tatum HW. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and Haemophilus aphrophilus. J Infect Dis 1962;111:85-94.
138. Pulverer G, Ko HL. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: fermentative capabilities of 140 strains. Appl Microbiol 1970;20:693-695.
139. Olsen I, Shah NH, Gharia EH. Taxonomy and biochemical characteristics of oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* Periodontology 2000 1999;20:14-52.
140. Zambon JJ, Slots J, Genco RJ. Serology of oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and serotype distribution in human periodontal disease. Infect Immun. 1983;14:19-27.

141. Kaplan JB, Perry MB, Maclean LL, Furgang D, Wilson ME, Fine DH. Structural and genetic analyses of O polysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype f. *Infect Immun* 2001;69(9):5375-84.
142. Meghji S, Wilson M, Barber P, Henderson B. Bone resorbing activity of surface-associated material from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Eikenella corrodens*. *J Med Microbiol* 1994;41:197-203.
143. Goulhen F, Hafezi A, Uitto VJ, Hinode D, Nakamura R, Grenier D, Mayrand D. Subcellular localization and cytotoxic activity of the GroEL-like protein isolated from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* 1998;66:5307-5313.
144. Paju S, Goulhen F, Asikainen S, Grenier D, Mayrand D, Uitto V. Localization of heat shock proteins in clinical *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains and their effects on epithelial cell proliferation. *FEMS Microbiol Lett* 2000;182:231-235.
145. Robertson PB, Lantz M, Marucha PT, Kornman KS, Trummel CL, Holt SC. Collagenolytic activity associated with *Bacteroides* species and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodont Res* 1982;17:275-283.
146. Lawson DA, Meyer TF. Biochemical characterization of *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* Collagenase. *Infect Immun* 1992;60:1524-1529.
147. 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;28:161-165.
148. 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.
149. Zambon JJ, DeLuca C, Slots J, Genco RJ. Studies of leukotoxin from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* using the promyelocytic HL-60 cell line. *Infect Immun* 1983;40:205-212.
150. Berthold P, Forti D, Kieba IR, Rosenbloom J, Taichman NS, Lally ET. Electron immunocytochemical localization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin. *Oral Microbial Immunol* 1992;7:24-27.

151. Ebersole JL, Kesavalu L, Schneider SL, Machen RL, Holt SC. Comparative virulence of periodontopathogens in a mouse abscess model. *Oral Dis* 1995;1:115-128.
152. 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.
153. 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.
154. Gregory RL, Kim DE, Kindle JC, Hobbs LC, Lloyd DR. Immunoglobulin-degrading enzymes in localized juvenile periodontitis. *J Periodontol Res* 1992;27:176-183.
155. 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.
156. Shenker BJ, Kushner ME, Tsai CC. Inhibition of fibroblast proliferation by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* 1982;38:986-992.
157. Valeria SO, Nigel WB. Protease-activated receptors: Contribution to physiology and disease. *Physiol Rev* 2004;84:579-621.
158. Nystedt S, Ramakrishnam V, Sundelin J. The proteinase activated receptor 2 is induced by inflammatory mediators in human endothelial cells. Comparison with the thrombin receptor. *J Biol Chem* 1996;271:14910-14915.
159. Schmidlin F, Amadesi S, Dabbagh K, Lewis DE, Knott P, Bunnett NW, Gater PR, Geppette P, Bertrand C, Stevens ME. Protease-activated receptor 2 mediates eosinophil infiltration and hyperreactivity in allergic inflammation of the airway. *J Immunol* 2002;169:5315-5321.
160. Ferrell WR, Lockhart JC, Kelso EB, Dunning L, Plevin R, Meek SE, Smith AJ, Hunter GD, MeLean JS, McGarry F et al. Essential role of for proteinase-activated receptor-2 in arthritis. *J Clin Invest* 2003;111:35-41.
161. Cocks TM, Moffatt JD. Proteinase-activated receptors: sentries for inflammation? *TIPS* 2000;21:103-108.
162. Coughlin SR, Camerer E. Participation in inflammation. *J Clin Invest* 2003;111:25-27.

163. Cenac N, Coelho A, Nguyen C, Compton S, Andrade-Gordon P, MacNaughton WK, Wallace JL, Hollenberg MD, Bunnett NW, Garcia-Villar R, Bueno L, Vernolle N. Induction of intestinal inflammation in mouse by activation of Proteinase-Activated Receptor-2. *Am J Pathol* 2002;161:1903-1915.
164. Chung WO, Hansen SR, Rao D, Dale DA. Protease-activated receptor signaling increase epithelial antimicrobial peptide expression. *J Immunol* 2004;173:5165-5170.
165. Smith R, Ransjö M, Tatarczuch L et al. Activation of proteinase-activated receptor-2 lead to inhibition of osteoclast differentiation. *J Bone Miner Res* 2004;19:507-516.
166. Letzelter C, Croute F, Pianezzi B, Roques C, Soleilhavoup JP. Supernatant cytotoxicity and proteolytic activity of selected oral bacteria against human gingival fibroblasts in vitro. *Arch Oral Biol* 1998;43:15-23.
167. Wang PL, Shirasu S, Shinohara M, Daito M, Fujii T, Kowashi Y, Ohura K. Purification and characterization of a trypsin-like protease. from the culture supernatant of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4. *Eur J Oral Sci* 1999;107(2):147-153.
168. Tani Y, Tani M, Kato I. Extracellular 37-kDa antigenic protein from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* induces TNF-alpha, IL-1beta, and IL-6 in murine macrophages. *J Dent Res* 76(9):1538-1547, September, 1997.
169. Tiranathanagul S, Pattamapun K, Yongchaitrakul T, Pavasant P. MMP-2 activation by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* supernatant in human PLD cells was corresponded with reduction of TIMP-2. *Oral Dis* 2004;10:383-388.
170. Darongsuwan T, Pavasant P. PDGF stimulates proliferation and matrices synthesis in cultured human PDL cells. *J Dent Assoc Thai* 1999;49:301-11.
171. Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.
172. Tancharoen S, Sarker PK, Imamura T, Biswas KK, Matsushita K, Tatsuyama S, Travis J, Potempa J, Torii M and Maruyama I. Neuropeptide Release from Dental Pulp Cells by RgpB via Proteinase-Activated Receptor-2 Signaling. *J Immunology* 2005;174:5796-5804.
173. Steinhoff M, Buddenkotte J, Shpacovitch V, Rattenholl A, Moormann C, Vergnolle N, Luger AT, Hollenberg DM. Proteinase-Activated Receptors: Transducers of

Proteinase-Mediated Signaling in Inflammation and Immune Response. *Endocrine Reviews* 2005;26(1):1-43.

174. Hou LT, Yaeger JA. Cloning and characterization of human gingival and periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontol*; 64: 1209-18.
175. Strutz F, Okada H, Lo CW, Danoff T, Carone RL, Tomaszewski JE, et al., Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *J Cell Biol* 1995; 130: 393-405.
176. Nishimura F, Terranova VP. Comparative study of the chemotactic responses of periodontal ligament cells and gingival fibroblasts to polypeptide growth factors. *J Dent Res* 1996; 75: 986-92.
177. 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.
178. Lackler KP, Cochran DL, Hoang AM, Takacs V, Oates TW. Development of an in vitro wound healing model for periodontal cells. *J Periodontol* 2000; 71: 226-37.
179. Olivier D, Carlos UC, Martin S, Nigel WB. Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases. *Am J Physiol* 1998;274:C1429-C1452.
180. Nystedt S, Ramakrishnan V, and Sundelin J. The Proteinase-activated Receptor 2 Is Induced by Inflammatory Mediators in Human Endothelial cells. *J of Biological chemistry* 1996;271:14910-14915.
181. Zacharias U, Xu Y, Hagege J, Sraer DJ, Brass FL, Rondeau E. Thrombin, phorbol ester, and cAMP regulate thrombin receptor protein and mRNA expression by different pathways. *J Biol Chem* 1995;270:545-550.
182. Böhm SK, Khitin ML, Grady FE, Aponte G, Payan GD, Bunnett WN. Mechanisms of desensitization and resensitization of proteinase-activated receptor-2. *J Biol Chem* 1996;271:22003-22016.
183. Brass LF, Pizarro S, Ahuja M, Belmonte E, Blanchard N, Stadel MJ, Hoxie AJ. Change in structure and function of the human thrombin receptor during receptor activation, intranalization, and recycling. *J Biol Chem* 1994;269:2943-2952.

ประวัติย่อผู้วิจัย

## ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	ศรินทิพย์ อังศุโกไคย
วัน เดือน ปีเกิด	15 มกราคม 2520
สถานที่เกิด	จังหวัดเพชรบุรี
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	56/109 หมู่ 5 หมู่บ้าน มั่นหนา ตำบลปลาย อำเภอบางกรวย จังหวัดนนทบุรี 11130
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	อาจารย์
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	ภาควิชาทันตกรรมอนุรักษ์และทันตกรรมประดิษฐ์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2535 – 2537	มัธยมศึกษาตอนปลาย จากโรงเรียนเบญจมเทพอุทิศ จังหวัดเพชรบุรี
พ.ศ. 2539 – 2545	ทันตแพทยศาสตรบัณฑิต จากคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทร วิโรฒ
พ.ศ. 2546 – 2550	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาปริทันตวิทยา จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ