

ผลของฮิวแมนบีตา-ดีเฟนซิน-1, -2 และ -3
ต่อการสร้างเซลล์สลายกระดูก



ธนภัทร ศรีโพนทอง

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต

สาขาวิชาปริทัศน์วิทยา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
กันยายน 2559

ผลของฮิวแมนบีตา-ดีเฟนซิน-1, -2 และ -3 ต่อการสร้างเซลล์สลายกระดูก

ชนภัทร ศรีโพนทอง

วิทยานิพนธ์นี้เสนอต่อมหาวิทยาลัยเชียงใหม่เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาปริทัศน์วิทยา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

กันยายน 2559

ผลของฮิวแมนบีตา-ดีเฟนซิน-1, -2 และ -3 ต่อการสร้างเซลล์สลายกระดูก

ธนภัทร ศรีโพนทอง

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาปริทัศน์วิทยา

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ

(ผศ.ทพญ.ดร. ปิยะนุช เพิ่มพานิช)

.....กรรมการ

(รศ.ทพญ.ดร. นวรัตน์ วรอาศวกปติ เจริญ)

.....กรรมการ

(ทพญ.ดร. พัทนินทร์ มนตรีขจร)

.....กรรมการ

(ศ.ทพ.ดร. สุทธิชัย กฤษณะประกรกิจ)


.....กรรมการ

(ผศ.ทพญ.ดร. สาคกรัตน์ คงขุนเทียน)

.....กรรมการ

(ทพ.ดร. ชยารพ สุพรรณชาติ)

คณะกรรมการที่ปรึกษา

.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(ทพญ.ดร. พัทนินทร์ มนตรีขจร)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ศ.ทพ.ดร. สุทธิชัย กฤษณะประกรกิจ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผศ.ทพญ.ดร. สาคกรัตน์ คงขุนเทียน)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ทพ.ดร. ชยารพ สุพรรณชาติ)

11 สิงหาคม 2559

© ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเชียงใหม่

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาจาก ทพญ.ดร. พัทนินทร์ มนตรีขจร ศ.ทพ.ดร. สุทธิชัย กฤษณะประกรกิจ ผศ.ทพญ.ดร. สาครรัตน์ คงขุนเทียน และทพ.ดร. ชยารพ สุพรรณชาติ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ซึ่งกรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ คำปรึกษา ความช่วยเหลือในการทำ วิทยานิพนธ์ในครั้งนี้เป็นอย่างดี ตลอดจนตรวจแก้ไขจนวิทยานิพนธ์เสร็จสมบูรณ์ ผู้เขียนขอกราบ ขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณ นายอนุพงศ์ เมฆอุดม และ ดร.ปริษา โชติจำลอง ที่กรุณาให้ความรู้คำแนะนำ และช่วยเหลือเกี่ยวกับกระบวนการทดสอบทางห้องปฏิบัติการ

ขอขอบคุณ ดร.ธนวัฒน์ ศาสตราวุฒิจิ ที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำเกี่ยวกับการคำนวณทาง สถิติ

ขอขอบคุณกองทุนสนับสนุนการวิจัย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) บัณฑิตศึกษา บัณฑิตวิทยาลัย และคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ได้ให้ทุน สนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ และที่ขาดไม่ได้คือกลุ่มอาสาสมัครที่เข้าร่วมในงานวิจัยครั้งนี้

ท้ายที่สุดนี้ขอกราบขอบพระคุณบุพการี คณาจารย์ภาควิชาทันตกรรมบูรณะและปริทันตวิทยา ตลอดจนผู้มีพระคุณทุกท่านเป็นอย่างสูง รวมไปถึงเพื่อนนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาและเจ้าหน้าที่ คลินิกบัณฑิตศึกษาทุกท่าน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ ผู้เขียน หวังเป็นอย่างยิ่งว่าวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จักเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาองค์ความรู้เกี่ยวกับพยาธิกำเนิด ของโรคปริทันต์อักเสบได้ไม่มากนักน้อย

ธนภัทร ศรีโพนทอง

| | | |
|---------------------|--|----------------------|
| หัวข้อวิทยานิพนธ์ | ผลของอิวมานบีตา-ดีเฟนซิน-1, -2 และ -3 ต่อการสร้างเซลล์สลายกระดูก | |
| ผู้เขียน | นายธนภัทร ศรี โพนทอง | |
| ปริญญา | วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ปริทันตวิทยา) | |
| คณะกรรมการที่ปรึกษา | ทพญ.ดร.พัทธินทร์ มนตรีขจร | อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก |
| | ศ.ทพ.ดร.สุทธิชัย กฤษณะประกรกิจ | อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม |
| | ผศ.ทพญ.ดร.สาครรัตน์ กงขุนเทียน | อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม |
| | ทพ.ดร.ชยารพ สุพรรณชาติ | อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม |

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของอิวมานบีตา-ดีเฟนซิน-1, -2 และ -3 ต่อกระบวนการสร้างเซลล์สลายกระดูกในห้องปฏิบัติการ โดยเก็บเลือดจากอาสาสมัครสุขภาพดีจำนวน 3 คนมาปั่นแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด โมโนนิวเคลียสเซลล์เพื่อกระตุ้นให้กลายเป็นเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สลายกระดูกเบื้องต้น ทดสอบความเป็นพิษของอิวมานบีตา-ดีเฟนซิน-1, -2 และ -3 ต่อเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สลายกระดูกด้วยวิธี MTT พบว่าอิวมานบีตา-ดีเฟนซินทั้ง 3 ชนิดที่ความเข้มข้น 12 ไมโคร โมลาร์ไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ จากนั้นเลือกความเข้มข้นของอิวมานบีตา-ดีเฟนซินระดับที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์กระตุ้นเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สลายกระดูกนาน 7 วัน เพื่อดูผลในการกระตุ้นการสร้างเซลล์สลายกระดูก หรือกระตุ้นเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สลายกระดูกด้วยอิวมานบีตา-ดีเฟนซินเป็นเวลา 14 วัน เพื่อดูการทำงานของเซลล์สลายกระดูกจากการเกิดหลุมบนแผ่นเนื้อฟัน พบว่า อิวมานบีตา-ดีเฟนซิน-1 มีผลในการเพิ่มจำนวนของเซลล์สลายกระดูกที่มีหลายนิวเคลียสและติดสี TRAcP (tartrate-resistant acid phosphate) และการเกิดหลุมบนแผ่นเนื้อฟันตามความเข้มข้นที่เพิ่มมากขึ้น ($p < 0.05$) ในทางตรงข้ามอิวมานบีตา-ดีเฟนซิน-3 มีผลในการยับยั้งทั้งการสร้างและการทำงานของเซลล์สลายกระดูก ($p < 0.05$) ในขณะที่อิวมานบีตา-ดีเฟนซิน-2 นั้น ไม่มีผลต่อกระบวนการสร้างเซลล์สลายกระดูก อย่างไรก็ตาม จำเป็นต้องมีการศึกษาถึงบทบาทของอิวมานบีตา-ดีเฟนซินทั้งสามชนิดไม่ว่าจะเป็นในแง่ของการส่งเสริมหรือยับยั้งการทำงานของเซลล์สลายกระดูกที่เกี่ยวข้องกับโรคปริทันต์อักเสบต่อไปในอนาคต

| | | |
|---------------------------|---|------------|
| Thesis Title | Effects of Human Beta-Defensin-1, -2 and -3 on Osteoclastogenesis | |
| Author | Mr. Thanapat Sripontong | |
| Degree | Master of Science (Periodontology) | |
| Advisory Committee | Dr. Pattanin Montreekachon | Advisor |
| | Prof. Dr.Suttichai Krisanaprakornkit | Co-advisor |
| | Asst. Prof. Dr. Sakornrat Khongkhunthian | Co-advisor |
| | Dr. Chayarop Supanchart | Co-advisor |

Abstract

The aim of this study was to examine the effects of three human beta-defensin (hBD) peptides, including hBD-1, -2 and -3, on *in vitro* osteoclastogenesis. Human osteoclast progenitor cells were isolated from whole blood samples of three healthy volunteers. The toxicity of chemically-synthesized hBD-1, -2 and -3 on these osteoclast progenitors was first determined by an MTT assay. It was shown that the concentrations of three hBDs up to 12 μ M were not toxic to these cells. Human osteoclast progenitors were then cultured in the presence or absence of various non-toxic concentrations of hBDs for seven days during an *in vitro* induction of osteoclastogenesis or for 14 days for a resorption pit assay on dentin slices. The results showed that hBD-1 significantly increased the number of tartrate-resistant acid phosphatase-positive multinucleated cells in a dose-dependent manner and the formation of resorption pits on dentine slices ($p < 0.05$). On the other hand, hBD-3 significantly inhibited osteoclast formation and the formation of resorption pit ($p < 0.05$), whereas hBD-2 had no effect on osteoclastogenesis. In conclusion, these results showed differential effects of hBD-1, -2 and -3 on *in vitro* osteoclastogenesis. However, it is necessary to further determine the role of hBD-1, -2 and -3 in either promotion or inhibition of *in vivo* osteoclast formation and bone resorption in association with periodontal disease in the future.

สารบัญ

| | หน้า |
|---|------|
| กิตติกรรมประกาศ | ก |
| บทคัดย่อภาษาไทย | ง |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | จ |
| สารบัญภาพ | ช |
| อักษรย่อและสัญลักษณ์ | ญ |
| บทที่ 1 บทนำ | 1 |
| 1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา | 1 |
| 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย | 5 |
| 1.3 สมมติฐานการวิจัย | 5 |
| 1.4 ขอบเขตการวิจัย | 5 |
| บทที่ 2 สรุปสาระสำคัญจากเอกสารที่เกี่ยวข้อง | 7 |
| บทที่ 3 วิธีการวิจัย | 20 |
| 3.1 การแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียร์เซลล์ออกจากเลือดครบส่วน | 21 |
| 3.2 ทดสอบความเป็นพิษของ hBD-1, -2 และ -3 ต่อเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สลายกระดูก | 23 |
| 3.3 ทดสอบผลของ hBD-1, -2 และ -3 ต่อการกระตุ้นการสร้างเซลล์สลายกระดูก | 24 |
| 3.4 ทดสอบผลของ hBD-1, -2 และ -3 ต่อการทำงานของเซลล์สลายกระดูก | 25 |
| 3.5 วิเคราะห์ผล | 26 |

| | หน้า |
|---|------|
| บทที่ 4 ผลการศึกษา | 27 |
| 4.1 ผลการศึกษาความเป็นพิษของ hBD-1, -2 และ -3 ต่อเซลล์ต้นกำเนิด เซลล์สลายกระดูกด้วยวิธี MTT | 27 |
| 4.2 ผลการศึกษา hBD-1, -2 และ -3 ต่อการสร้างเซลล์สลายกระดูก ด้วยวิธีการย้อมสี TRAcP | 29 |
| 4.3 ผลการศึกษา hBD-1, -2 และ -3 ต่อการทำงานของเซลล์สลายกระดูก | 32 |
| บทที่ 5 อภิปรายผลการศึกษา | 34 |
| บทที่ 6 สรุปผลการศึกษา | 38 |
| เอกสารอ้างอิง | 39 |
| ภาคผนวก | 46 |
| ภาคผนวก ก เอกสารคำแนะนำหรือแจ้งข้อมูลแก่ผู้ถูกวิจัยหรือผู้อนุญาต | 46 |
| ภาคผนวก ข เอกสารรับรองโครงการศึกษาวิจัย | 47 |
| ภาคผนวก ค ตารางการคำนวณทางสถิติเปรียบเทียบความมีชีวิตของเซลล์สลายกระดูก การสร้างเซลล์สลายกระดูกและการทำงานของเซลล์สลายกระดูก | 48 |
| ประวัติผู้เขียน | 53 |

สารบัญภาพ

| | หน้า | |
|------------|---|----|
| ภาพที่ 1-1 | แผนภูมิแสดงพยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์อักเสบ | 2 |
| ภาพที่ 2-1 | ภาพจำลองแสดงรูปร่างและโครงสร้างของเซลล์สลายกระดูก | 9 |
| ภาพที่ 2-2 | ภาพจำลองแสดงการสร้างเซลล์สลายกระดูก | 10 |
| ภาพที่ 2-3 | แผนภูมิแสดงอัตราส่วนระหว่าง RANKL ต่อ OPG ใน น้ำเหลืองเหงือกของกลุ่มควบคุมที่ไม่เป็นโรค กลุ่มผู้ป่วยโรคเหงือกอักเสบ ผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรัง ผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบก้าวร้าย และผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน | 12 |
| ภาพที่ 2-4 | ภาพจำลองแสดงลักษณะโครงสร้างทุดิพของเพปไทด์ด้านจุลชีพแบบต่างๆ | 14 |
| ภาพที่ 2-5 | ภาพจำลองแสดงลักษณะของเพปไทด์ด้านจุลชีพที่เป็นแอมฟิพาธิคทำให้เคลื่อนตัวผ่านเข้าไปสอดแทรกในชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลชีพได้ | 14 |
| ภาพที่ 2-6 | ภาพจำลองแสดงลักษณะโครงสร้างของ hBD-1, hBD-2 และ hBD-3 | 16 |
| ภาพที่ 2-7 | แผนภูมิแสดงการวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน hBD-1, -2 และ -3 ในเนื้อเยื่อเหงือกปกติ เนื้อเยื่อเหงือกของผู้ป่วยโรคเหงือกอักเสบ และเนื้อเยื่อเหงือกของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ | 17 |
| ภาพที่ 2-8 | แผนภูมิแสดงการเปรียบเทียบการแสดงออกของระดับ hBD-1 และ hBD-2 ในน้ำเหลืองเหงือกของคนปกติและผู้ป่วยที่มีการอักเสบรอบรากฟันเทียม | 18 |
| ภาพที่ 2-9 | ผลการศึกษการยับยั้งการสร้างเซลล์สลายกระดูกด้วย LL-37 โดยวิธีย้อมสี TRAcP และการทำงานของเซลล์สลายกระดูกด้วยวิธีเลี้ยงเซลล์บนแผ่นเนื้อฟัน | 19 |
| ภาพที่ 3-1 | แสดงแผนผังวิธีการวิจัย | 21 |
| ภาพที่ 3-2 | ภาพจำลองแสดงขั้นตอนการแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียร์เซลล์ | 22 |
| ภาพที่ 3-3 | ภาพจำลองแสดงการนับจำนวนเซลล์และปรับความเข้มข้นในอาหารเลี้ยงเซลล์ | 23 |
| ภาพที่ 3-4 | การทดสอบความเป็นพิษด้วยวิธี MTT | 24 |

| | | |
|------------|---|----|
| ภาพที่ 3-5 | เซลล์สลายกระดูกที่ข้อมติคิลี TRAcP ซึ่งสังเกตได้จากมีนิวเคลียสตั้งแต่ 3 นิวเคลียสขึ้นไป | 25 |
| ภาพที่ 3-6 | หลุมบนแผ่นเนื้อฟัน ซึ่งเกิดจากการทำงานของเซลล์สลายกระดูก | 26 |
| ภาพที่ 4-1 | แสดงผลการทดสอบความเป็นพิษของ hBD-1, hBD-2 และ hBD-3 ต่อเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สลายกระดูกด้วยวิธีการ MTT โดยใช้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 ถึง 12 ไมโครโมลาร์ | 28 |
| ภาพที่ 4-2 | แสดงการข้อมติ TRAcP บนเซลล์สลายกระดูกที่ได้ใส่ hBD-1, hBD-2 และ hBD-3 ในช่วงที่กระตุ้นการสร้าง กลุ่มควบคุมเชิงบวกที่ไม่ได้ใส่ hBD และกลุ่มควบคุมเชิงลบที่ไม่ได้กระตุ้นการสร้างเซลล์สลายกระดูก | 30 |
| ภาพที่ 4-3 | แสดงแผนภาพเปรียบเทียบจำนวนเซลล์สลายกระดูกที่ข้อมติคิลี TRAcP ที่ใส่ hBD-1, -2 หรือ -3 ในช่วงกระตุ้นการสร้างเซลล์สลายกระดูกที่ความเข้มข้น 0.2, 1 และ 5 ไมโครโมลาร์ | 31 |
| ภาพที่ 4-4 | แสดงการเกิดหลุม resorption pits บนแผ่นเนื้อฟันที่เลี้ยงเซลล์สลายกระดูกที่ใส่ hBD-1, hBD-2 และ hBD-3 ในช่วงที่กระตุ้นการสร้าง กลุ่มควบคุมเชิงบวกและกลุ่มควบคุมเชิงลบ | 32 |
| ภาพที่ 4-5 | แสดงแผนภาพเปรียบเทียบจำนวนการเกิดหลุมบนแผ่นเนื้อฟันที่ใส่ hBD-1, -2 หรือ -3 ในช่วงกระตุ้นการสร้างเซลล์สลายกระดูก | 33 |

อักษรย่อและสัญลักษณ์

| | |
|------------------|---|
| AAP | The American Academy of Periodontology |
| CLC-7 | chloride channel 7 |
| DMSO | dimethyl sulfoxide |
| GCF | gingival crevicular fluid |
| hBD | human beta-defensin |
| HNP | human neutrophil peptide |
| IL-1 | interleukin 1 |
| INF- γ | interferon gamma |
| M-CSF | macrophage-colony-stimulating factor |
| MMP | matrix metalloproteinase |
| MTT | 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide |
| OPG | osteoprotegerin |
| PGE ₂ | prostaglandin E ₂ |
| RANK | receptor activator of nuclear factor-kappa B |
| RANKL | receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand |
| TGF- β | transforming growth factor-beta |
| TNF- α | tumor necrosis factor alpha |
| TRAcP | tartrate-resistant acid phosphate |

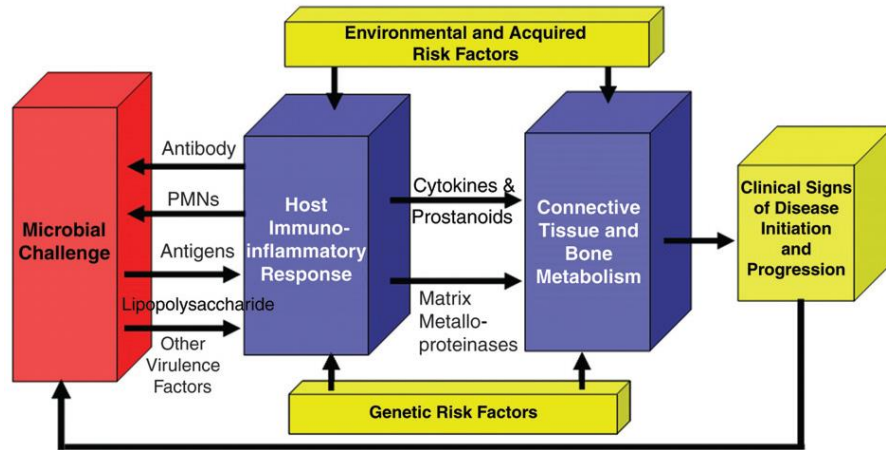
บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

โรคปริทันต์นับเป็นปัญหาทันตสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทยนับจากอดีตจนถึงปัจจุบัน โดยจากผลการสำรวจสภาวะสุขภาพช่องปากระดับประเทศครั้งที่ 7 พ.ศ. 2555 พบว่าประชากรวัยทำงานที่มีอายุระหว่าง 35-44 ปีเป็นโรคปริทันต์อักเสบที่มีการทำลายของกระดูกเขี้ยวฟันร่วมด้วยถึงร้อยละ 15.6 และพบความรุนแรงของโรคเพิ่มขึ้นในประชากรที่มีอายุมากขึ้น โดยจะพบความรุนแรงเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าในกลุ่มประชากรที่มีอายุระหว่าง 60-74 ปีคือร้อยละ 32.1 (กองทันตสาธารณสุข กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข 2556) จึงนับว่าโรคปริทันต์เป็นปัญหาสุขภาพที่สำคัญของประเทศไทย

โรคปริทันต์ (periodontal disease) เป็นโรคที่มีการอักเสบและการทำลายของอวัยวะปริทันต์ (periodontium) ได้แก่ เหงือก (gingiva) เอ็นยึดปริทันต์ (periodontal ligament) เคลือบรากฟัน (cementum) และกระดูกเขี้ยวฟัน (alveolar bone) ซึ่งมีสาเหตุหลักมาจากแบคทีเรียในคราบจุลินทรีย์ ส่งผลให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (immuno-inflammatory response) นำไปสู่การสร้างและหลั่งไซโตไคน์ (cytokines) รวมถึงสารสื่อกลางการอักเสบ (inflammatory mediators) หลายชนิด ส่งผลให้อวัยวะปริทันต์ถูกทำลาย ซึ่งอาการแสดงในผู้ป่วยแต่ละคนอาจแตกต่างกันไปโดยสามารถพบได้ตั้งแต่มีการอักเสบของเหงือก เกิดการทำลายกระดูกเขี้ยวฟัน (alveolar bone loss) เกิดร่องลึกปริทันต์ (periodontal pocket) และอาจทำให้สูญเสียฟันไปในที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากโรคปริทันต์เป็นโรคที่เกิดจากหลายปัจจัย (multifactorial disease) โดยนอกจากเชื้อแบคทีเรียที่เป็นเชื้อก่อโรคแล้ว ยังมีปัจจัยทางพันธุกรรมและปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่ส่งผลต่อการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายและส่งผลให้ผู้ป่วยแต่ละคนมีความรุนแรงของโรครวมถึงการตอบสนองต่อการรักษาที่แตกต่างกันด้วย ซึ่งสรุปเป็นแผนภูมิแสดงกระบวนการเกิดโรคได้ดังภาพที่ 1-1 (Kornman, 2008)



ภาพที่ 1-1 แผนภูมิแสดงพยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์อักเสบ (ดัดแปลงมาจาก Kornman, 2008)

โรคปริทันต์สามารถแบ่งออกตามการจำแนกของ The American Academy of Periodontology (AAP) ในปี ค.ศ. 1999 ออกเป็น 8 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ (Armitage, 1999)

1. โรคเหงือก (gingival disease)
2. โรคปริทันต์อักเสบเรื้อรัง (chronic periodontitis)
3. โรคปริทันต์อักเสบก้าวร้าว (aggressive periodontitis)
4. โรคปริทันต์อักเสบอันเป็นอาการแสดงของโรคทั่วกาย (periodontitis as a manifestation of systemic diseases)
5. โรคปริทันต์เนื้อตาย (necrotizing periodontal disease)
6. โรคฝีปริทันต์ (abscesses of the periodontium)
7. โรคปริทันต์อักเสบที่สัมพันธ์กับรอยโรคปลายราก (periodontitis associated with endodontic lesions)
8. ความพิการและสภาวะที่เกิดจากการพัฒนาหรือเกิดขึ้นภายหลัง (developmental or acquired deformities and conditions)

โดยโรคปริทันต์ที่พบได้บ่อยคือ โรคเหงือกอักเสบ (gingivitis) และ โรคปริทันต์อักเสบ (periodontitis) โดยโรคเหงือกอักเสบเป็นโรคที่มีเพียงการอักเสบของเหงือกรอบตัวฟัน โดยไม่มีการทำลายอวัยวะปริทันต์ ในขณะที่โรคปริทันต์อักเสบเป็นโรคที่มีการทำลายของอวัยวะปริทันต์ร่วมด้วย โรคปริทันต์อักเสบที่พบมากมีสองแบบ ได้แก่ โรคปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรัง (chronic periodontitis) ที่มักพบในผู้ป่วยที่มีอายุมาก มีการดำเนินของโรคอย่างช้าๆ มีระดับความรุนแรงของโรคสัมพันธ์กับ

ปัจจัยเฉพาะที่ และ โรคปริทันต์อักเสบชนิดก้าวร้าว (aggressive periodontitis) ที่มักพบในผู้ป่วยอายุน้อยที่มีสุขภาพร่างกายแข็งแรง มีการดำเนินของโรคที่รวดเร็ว และมีระดับความรุนแรงของโรคไม่สัมพันธ์กับปัจจัยเฉพาะที่ นอกจากนั้น โรคนี้ยังมีลักษณะเฉพาะคือมักเกิดการสูญเสียอวัยวะปริทันต์ในฟันหน้าและฟันกรามแท้ที่แรกร่วมด้วย (Newman, 2002) โรคปริทันต์อักเสบเป็นโรคที่มีการอักเสบและการทำลายของกระดูกเขี้ยวฟัน โดยมีสาเหตุมาจากแบคทีเรียในคราบจุลินทรีย์โดยเฉพาะกลุ่มแบคทีเรียชนิดที่ข้อมติคสีแกรมลบ (gram-negative) ที่ไม่พึ่งออกซิเจน (anaerobe) หรือเจริญได้โดยไม่พึ่งออกซิเจน (facultative anaerobe) เมื่อแบคทีเรียเหล่านี้ถูกทิ้งไว้นานโดยไม่มีการกำจัดออก จะมีการเพิ่มจำนวนและสร้างปัจจัยความเป็นพิษ (virulence factor) เพิ่มมากขึ้น กระบวนการอักเสบอย่างเรื้อรังนี้ส่งผลให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกายด้วยการสร้างสารสื่อกลางการอักเสบและไซโตไคน์หลายชนิด ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของเซลล์สลายกระดูก (osteoclasts) โดยตรง หรือส่งผลต่อ pre-osteoclast นำไปสู่การเพิ่มจำนวนของเซลล์สลายกระดูก นอกจากนี้ ปัจจัยก่อโรคจากแบคทีเรีย (bacteria component) และ สารสื่อกลางการอักเสบ ยังส่งผลโดยตรงต่อการทำหน้าที่และการสร้างเซลล์สร้างกระดูก โดยทำให้มีการสร้างเซลล์สร้างกระดูกลดลง และผลสุดท้ายเกิดเป็นการทำลายกระดูกเขี้ยวฟันให้เห็นในทางคลินิก

มีงานวิจัยมากมายที่พยายามศึกษาถึงกระบวนการกระตุ้นการสร้างและการทำงานของเซลล์สลายกระดูก จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการกระตุ้นให้เกิดกระบวนการสร้างและกระตุ้นการทำงานของเซลล์สลายกระดูก (osteoclastogenesis) ต้องอาศัยสารสื่อกลางการอักเสบ (inflammatory mediators) และไซโตไคน์หลายชนิด ซึ่งส่วนใหญ่มาจากเซลล์อักเสบที่มีอยู่เป็นจำนวนมากในเนื้อเยื่อปริทันต์บริเวณที่เป็นโรค เช่น อินเตอร์ลิวคินวัน (interleukin 1: IL-1) อินเตอร์ลิวคินซิกซ์ (IL-6) ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์แอลฟา (tumor necrosis factor-alpha: TNF- α) อินเตอร์เฟียร์รอนแกมมา (interferon gamma: INF- γ) รีเซปเตอร์แอกทิเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปา บี (receptor activator of nuclear factor-kappa B: RANK) รีเซปเตอร์แอกทิเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปา บีไลแกนด์ (receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand: RANKL) และออสติโอโปรเทจรีน (osteoprotegerin: OPG) (Cochran, 2008; Schwartz และคณะ, 1997)

การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อการรุกรานของเชื้อจุลินทรีย์นั้นมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดและการดำเนินโรค ซึ่งร่างกายจะตอบสนองต่อการติดเชื้อในช่วงแรกด้วยระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (innate immunity) เป็นด่านแรกของการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียไม่ให้เข้าสู่ร่างกาย ซึ่งสามารถตอบสนองต่อการรุกรานของเชื้อแบคทีเรียได้อย่างรวดเร็วและไม่จำเพาะเจาะจง ประกอบด้วยการไหลเวียนของน้ำลายและน้ำเหลืองเหงือก (gingival crevicular fluid; GCF) ร่วมกับการหลุดลอกของเซลล์เยื่อบุผิวช่องปากและเซลล์เยื่อบุผิวเชื่อมต่อ ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถเกาะติดและเพิ่มจำนวนได้

(Dentino และคณะ, 2013) และยังมีการทำงานของเซลล์ในอวัยวะปริทันต์ เช่น เซลล์เยื่อเมือก เซลล์สร้างเส้นใย รวมถึงการทำงานของเซลล์อักเสบ โดยเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญ คือ นิวโทรฟิลและแมกโครเฟจ (macrophage) หากภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดไม่สามารถกำจัดเชื้อก่อโรคให้หมดไปได้ จะมีการส่งสัญญาณต่อไปกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันที่ได้มาภายหลัง (adaptive immunity) ซึ่งมีเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด ที และ บี ลิมโฟไซท์ (T and B lymphocytes) เป็นเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญ และพบว่าในเนื้อเยื่อของรอยโรคปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรังที่มีการลุกลามจะพบเม็ดเลือดขาวชนิด บี ลิมโฟไซท์และเซลล์พลาสมา (plasma cell) ในสัดส่วนที่มากขึ้น (Lindhe และคณะ, 1980)

นอกจากนั้นยังมีกลไกของร่างกายในการต่อสู้กับแบคทีเรียที่เรียกว่า antimicrobial defense systems ซึ่งระบบนี้ประกอบด้วยเพปไทด์ (peptide) ซึ่งเป็นโปรตีนสายสั้นๆ ในกลุ่มเพปไทด์ต้านจุลชีพ (antimicrobial peptides) (Dale และคณะ, 2005) เพปไทด์ต้านจุลชีพมีลักษณะเป็นเพปไทด์สายสั้นๆ ที่มีคุณสมบัติที่สำคัญคือสามารถตรวจหาและทำลายเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิด (broad spectrum antimicrobial activity) โดยนอกจากหน้าที่ในการป้องกันการรุกรานและกำจัดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคแบบไม่จำเพาะแล้ว ยังมีส่วนช่วยในการรักษาสมดุล (homeostasis) ระหว่างแบคทีเรียประจำถิ่นกับแบคทีเรียก่อโรค และมีการศึกษาพบว่าแบคทีเรียในช่องปากแต่ละชนิดสามารถกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของเพปไทด์ต้านจุลชีพได้ในลักษณะที่แตกต่างกัน (Gorr และ Abdolhosseini, 2011) เพปไทด์ต้านจุลชีพที่สำคัญประกอบด้วย 2 ครอบครัวยุคแรก ได้แก่ ครอบครัวยุคแรกแคทีลิซิน (cathelicidin) และครอบครัวยุคแรกดีเฟนซิน (defensin) โดยเพปไทด์ต้านจุลชีพในครอบครัวยุคแรกแคทีลิซินที่พบการแสดงออกในมนุษย์ คือ LL-37 (Zanetti, 2004) ส่วนเพปไทด์ต้านจุลชีพในครอบครัวยุคแรกดีเฟนซินที่มีการตรวจพบการแสดงออกในมนุษย์ ได้แก่ แอลฟา-ดีเฟนซิน (α -defensins) และบีตา-ดีเฟนซิน (β -defensins)

ครอบครัวยุคแรกบีตา-ดีเฟนซินที่พบภายในช่องปากได้บ่อย ได้แก่ human β -defensin-1, -2 และ -3 (hBD-1, -2 และ -3) (Abiko และคณะ, 2007) ซึ่งจะมีการแสดงออกที่แตกต่างกันไปในแต่ละบุคคล โดยจะพบการแสดงออกของ hBD-1 และ hBD-2 ในชั้นเหนือเบซัล (suprabasal) ของเยื่อเมือกเหงือกปกติ (Dale และคณะ, 2001) และยังตรวจพบในน้ำเหลืองเหงือกด้วย (Diamond และคณะ, 2001) ส่วน hBD3 จะพบการแสดงออกในเซลล์เยื่อเมือกชั้นเบซัลของเหงือกปกติและบริเวณที่เกิดการอักเสบ (Lu และคณะ, 2005)

ในส่วนของการสัมพันธ์กับโรคปริทันต์นั้น พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันของระดับการแสดงออกของ hBD-1 และ -2 ในผู้ป่วยโรคเหงือกอักเสบ แต่จะพบการแสดงออกของระดับ hBD-1 มากกว่า hBD-2 ในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรัง และ hBD-2 มากกว่า hBD-1 ในผู้ป่วยโรคปริ

ทันต์อักษะชนิดแก้วราว (Vardar-Sengul และคณะ, 2007) นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกของ hBD-1 และ -2 ในเนื้อเยื่อที่เกิดการอักเสบรอบรากฟันเทียม (peri-implantitis) อีกด้วย (Kuula และคณะ, 2008) สำหรับการศึกษาระดับของ hBD-3 นั้นกลับพบว่า ระดับของ hBD-3 ในเนื้อเยื่อปกติจะมีระดับสูงกว่าเมื่อเทียบกับเนื้อเยื่อที่เป็นโรคปริทันต์อักษะ (Bissell และคณะ, 2004)

จากการศึกษาที่ผ่านมา ทำให้ทราบว่าบีตา-ดีเฟนซินในช่องปาก (hBD-1, -2 และ -3) มีความเกี่ยวข้องกับพยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์ แต่ในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับผลของบีตา-ดีเฟนซินต่อเซลล์สลายกระดูก ทั้งในแง่ของการกระตุ้นการสร้างเซลล์สลายกระดูกและการทำงานของเซลล์สลายกระดูก จึงนำไปสู่แนวคิดในการศึกษาผลของ hBD-1, -2 และ -3 ต่อการสร้างและทำหน้าที่ของเซลล์สลายกระดูก โดยมีสมมติฐานว่า hBD-1, -2 และ -3 จะสามารถควบคุมการสร้างและทำหน้าที่ของเซลล์สลายกระดูกในหลอดทดลองได้

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1.2.1 เพื่อศึกษาความเป็นพิษของบีตา-ดีเฟนซิน-1, -2 และ -3 ต่อเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สลายกระดูก
- 1.2.2 เพื่อศึกษาผลของบีตา-ดีเฟนซิน-1, -2 และ -3 ต่อการสร้างเซลล์สลายกระดูก
- 1.2.3 เพื่อศึกษาผลของบีตา-ดีเฟนซิน-1, -2 และ -3 ต่อการทำหน้าที่ของเซลล์สลายกระดูก

1.3 สมมติฐานการวิจัย

บีตา-ดีเฟนซิน-1, -2 และ -3 มีผลต่อกระบวนการสร้างและการทำงานที่แตกต่างกันของเซลล์สลายกระดูกได้

1.4 ขอบเขตการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาในห้องปฏิบัติการถึงผลของฮิวแมนบีตา-ดีเฟนซิน-1, -2 และ -3 ต่อการสร้างเซลล์สลายกระดูก โดยเก็บเลือดจากอาสาสมัครที่มีสุขภาพแข็งแรง แล้วปั่นแยกเซลล์เม็ด

เลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียร์เซลล์ด้วยวิธี Ficoll–Hypaque density gradient centrifugation แล้วนำมาทดสอบความเป็นพิษของอิวแมนบีตา-ดีเฟนซิน-1, -2 และ -3 ต่อเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สลายกระดูกด้วย MTT assay จากนั้นกระตุ้นโมโนนิวเคลียร์เซลล์ให้กลายเป็นเซลล์สลายกระดูกด้วย M-CSF และ RANKL ร่วมกับอิวแมนบีตา-ดีเฟนซิน-1, -2 และ -3 ความเข้มข้นระดับที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เพื่อทดสอบผลของอิวแมนบีตา-ดีเฟนซินทั้ง 3 ชนิดต่อการสร้างเซลล์สลายกระดูกด้วยวิธีย้อมสี TRAcP และการทำงานของเซลล์สลายกระดูกด้วยวิธีเลียงเซลล์บนแผ่นเนื้อฟัน (dentine slices)



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทที่ 2

สรุปสาระสำคัญของเอกสารที่เกี่ยวข้อง

โรคปริทันต์เป็นโรคที่มีการอักเสบของอวัยวะปริทันต์ ส่งผลให้มีการทำลายอวัยวะปริทันต์ อันประกอบด้วย เหงือก เอ็นยึดปริทันต์ เคลือบรากฟัน และกระดูกเบ้าฟัน จนอาจนำไปสู่การสูญเสียฟันได้หากไม่ได้รับการรักษาที่เหมาะสม การศึกษาในระยะแรกนั้นเชื่อว่า การเกิดโรคปริทันต์มีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรียเพียงอย่างเดียว แต่การศึกษาและการพัฒนาความรู้ที่มีอย่างต่อเนื่องมาจนถึงปัจจุบันทำให้ทราบว่า พยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์มีผลจากหลายปัจจัยเกี่ยวเนื่องเชื่อมโยงกัน โดยเริ่มต้นจากการมีเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดในคราบจุลินทรีย์บนผิวฟัน มีการสะสมและแบ่งตัวเพิ่มจำนวนลูกกลมลงสู่ร่องเหงือก รวมทั้งมีการปรับสภาวะแวดล้อมภายในร่องเหงือกให้เหมาะสมกับการเจริญของกลุ่มเชื้อแบคทีเรียก่อโรค (Socransky และคณะ, 1992) ซึ่งส่วนใหญ่มักเป็นเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบ (gram-negative) ชนิดไม่อาศัยออกซิเจนหรืออาศัยออกซิเจนเล็กน้อยในการเจริญ (anaerobic, microaerophilic) แบคทีเรียที่พบในร่องเหงือกและมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคปริทันต์ที่สำคัญ ได้แก่ แอ กกริ เกติ แบ ค เตอร์ แอ ค ที โน มัย ชิ เต็ม โค มิ แทน ส์ (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส (*Porphyromonas gingivalis*) แทนเนอเรลลา ฟอร์ซัยเรีย (*Tannerella forsythia*) ทรีโปนีมา เดนติโคลา (*Treponema denticola*) ฟิวโซแบคทีเรียม นิวคลีเอตัม (*Fusobacterium nucleatum*) ยูแบคทีเรียม โนดาตัม (*Eubacterium nodatum*) 프리โวเทลลา อินเตอร์มีเดีย (*Prevotella intermedia*) และ 프리โวเทลลา นิเกรสเซน (*Prevotella nigrescens*) (Socransky และคณะ, 1998; Teles และคณะ, 2006) เมื่อแบคทีเรียถูกทิ้งไว้นานๆ โดยไม่มีการกำจัดออก จะมีการเพิ่มจำนวนและมีการสร้างปัจจัยความเป็นพิษเพิ่มมากขึ้น นำไปสู่การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ทำให้มีการสร้างสารสื่อกลางการอักเสบ (proinflammatory mediators) โดยแบคทีเรียดังกล่าวสามารถทำให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อปริทันต์ได้ทั้งทางตรงและทางอ้อม การทำลายเนื้อเยื่อปริทันต์ทางตรงเกิดจากการหลั่งสารพิษภายใน (endotoxin) หรือเอนไซม์ เพื่อย่อยเนื้อเยื่อ ปริทันต์และสารต่างๆที่อยู่ระหว่างเซลล์ ส่วนการทำลายทางอ้อมเกิดจากการที่สารหรือโครงสร้างบางอย่างของแบคทีเรีย เช่น โลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide; LPS) ไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ทำให้เกิดการตอบสนองโดยการหลั่งสารในกลุ่มสารสื่อการอักเสบ

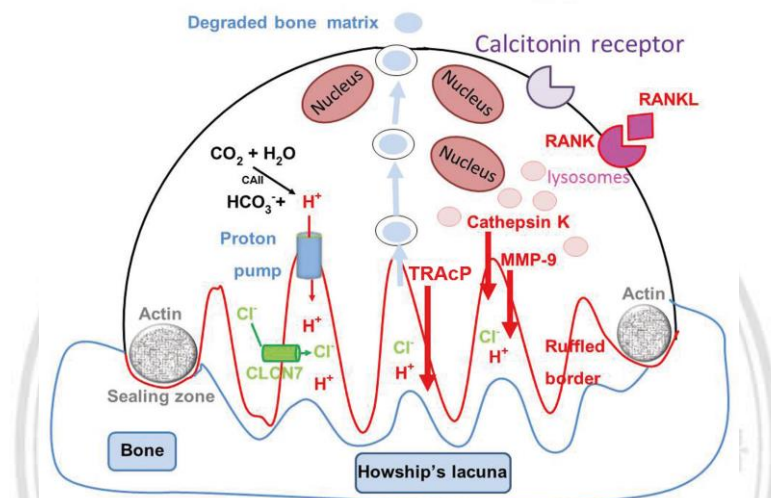
(proinflammatory cytokines) ได้แก่ IL-1, TNF- α , พรอสตาแกลนดิน (prostaglandin E₂; PGE₂) และ เอนไซม์ไฮโดรไลติก (hydrolytic enzymes) ทำให้เกิดการทำลายอวัยวะปริทันต์ตามมา นอกจากนี้ ความรุนแรงของโรคปริทันต์ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยทางพันธุกรรมและปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมอีกด้วย ทำให้ อาการแสดงทางคลินิกและการลุกลามของโรค รวมถึงการตอบสนองต่อการรักษาในผู้ป่วยแต่ละคนมีความแตกต่างกัน จนในที่สุดเกิดเป็นลักษณะทางคลินิกคือมีร่องลึกปริทันต์และฟันโยก เนื่องจากเกิดการทำลายการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์และกระดูกเบ้าฟัน

จะเห็นได้ว่าลักษณะทางคลินิกที่สำคัญของโรคปริทันต์อักเสบ คือมีการทำลายของอวัยวะ ปริทันต์โดยเฉพาะกระดูกเบ้าฟัน ซึ่งเซลล์หลักที่ทำหน้าที่นี้คือเซลล์สลายกระดูก ซึ่งเป็นเซลล์ที่พัฒนามา จากเซลล์ต้นกำเนิดของเม็ดเลือดโดยเฉพาะในสายที่จะแปรสภาพไปเป็น โมโนไซต์และแมคโครฟาจ (monocyte-macrophage progenitor cell lineage) ที่อยู่ในไขกระดูก โดยลักษณะเฉพาะของเซลล์ สลายกระดูก ได้แก่

1. เป็นเซลล์ที่มีหลายนิวเคลียส (multinucleated cells)
2. มีกอลจิแอปพาราตัส (golgi apparatus) และไมโทคอนเดรีย (mitochondria) จำนวนมาก ทำให้เหมาะสำหรับการสร้างพลังงานที่เก็บไว้ในรูปอะดีโนซีน ไตรฟอสเฟต (Adenosine triphosphate; ATP)
3. พบแวคิวโอล (vacuole) และไลโซโซม (lysosome) เป็นจำนวนมาก

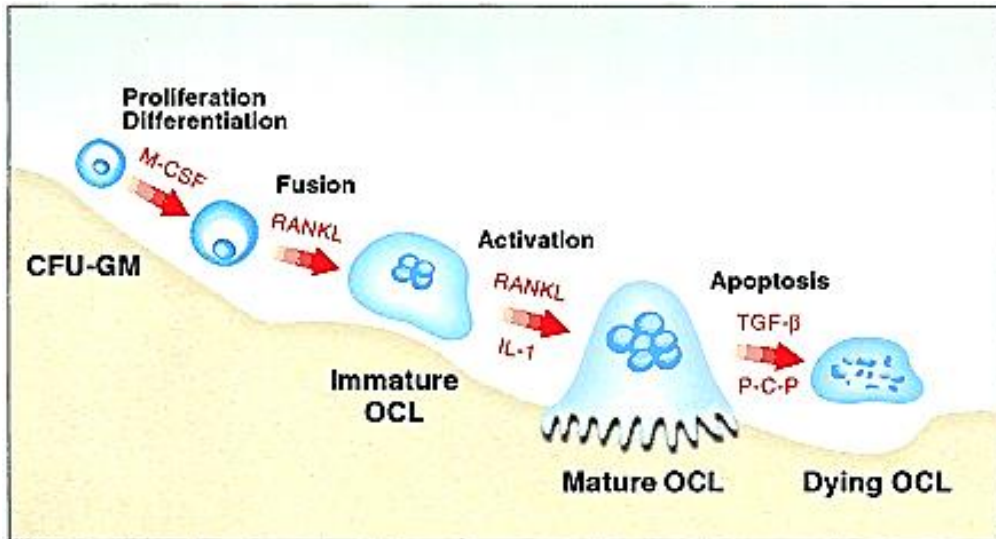
นอกจากนั้นเซลล์สลายกระดูกยังมีลักษณะพิเศษที่สำคัญสำหรับการทำหน้าที่ของเซลล์นี้ ได้แก่ ruffled border ตรงบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ส่วนปลาย (apical membrane) และมีบริเวณที่เรียกว่า sealing zone หรือ clear zone ซึ่งเป็นบริเวณที่พบแถบแอกทินที่หนาจำนวนมากซึ่งทำให้เซลล์สลาย กระดูกยึดเกาะกับผิวกระดูกได้ และยังช่วยแยกบริเวณที่มีการละลายของกระดูกหรือที่เรียกว่า Howship's lacuna ออกจากสิ่งแวดล้อมภายนอก ทำให้ร่างกายสามารถจำกัดบริเวณที่มีการทำลาย กระดูกให้เกิดขึ้นเฉพาะตำแหน่งเท่านั้น โดยในบริเวณที่มีการละลายของกระดูกที่พบความเป็นกรด ในระดับสูง จะพบปั๊มโปรตอน (proton pump) ที่ชื่อ vacuolar type H⁺-ATPase อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ บริเวณ ruffled border ทำหน้าที่สูบโปรตอนเข้าไปในบริเวณที่มีการละลายของกระดูกโดยใช้พลังงาน จาก ATP ทำให้บริเวณดังกล่าวเกิดการละลายแร่ธาตุออกจากกระดูก นอกจากนี้ยังพบการหลั่ง เอนไซม์คาเทปซินเค (cathepsin K) และ เมทริกซ์ เมทัลโลโปรตีนเนส-9 (matrix metalloproteinase; MMP-9) จากไลโซโซมเข้าไปใน Howship's lacuna เพื่อทำหน้าที่ย่อยสลายเมทริกซ์สารอินทรีย์ (organic matrix) ในกระดูก ดังนั้นความสามารถในการสลายกระดูกจะขึ้นอยู่กับความสามารถของ เซลล์สลายกระดูกในการสร้าง ruffled border ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการปล่อยกรดเพื่อไปละลายแร่ธาตุใน

กระดูก อย่างไรก็ตามต้องมีการคงสภาวะประจุรวมเป็นศูนย์ภายใน Howship's lacuna ดังนั้นเซลล์สลายกระดูกจึงมีการปล่อยคลอไรด์ไอออน (chloride ion; Cl⁻) ผ่านทางช่องคลอไรด์ (chloride channel 7; CLC-7) เพื่อขนส่งประจุลบเข้าไปสะเทินประจุบวกของโปรตอน (ภาพที่ 2-1) (สุทธิชัย และคณะ, 2557)



ภาพที่ 2-1 ภาพจำลองแสดงรูปร่างและโครงสร้างของเซลล์สลายกระดูก
(แหล่งที่มา Krisanaprakornkit, 2014)

การแปรสภาพของเซลล์สลายกระดูก จะถูกควบคุมจากเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast) โดยใช้ปัจจัยสำคัญที่สร้างมาจากเซลล์สร้างกระดูกในการควบคุม ซึ่งได้แก่ แมโครฟาจโคลนีสติมูเลติงแฟกเตอร์ (macrophage colony-stimulating factor; M-CSF) และ RANKL โดย M-CSF จะเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการเจริญและป้องกันการตายแบบอะพอพโตซิส (apoptosis) ในช่วงแรกของการสร้าง จากนั้น RANKL จะเป็นสื่อกลางแรกที่เข้ามาทำให้เกิดการสร้างเซลล์สลายกระดูก นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นๆที่เข้ามาทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปร่างของเซลล์ เช่น IL-1, prostaglandins เป็นต้น (ภาพที่ 2-2) (Roodman, 2006)



ภาพที่ 2-2 ภาพจำลองแสดงการสร้างเซลล์สลายกระดูก (แหล่งที่มาจาก Roodman, 2006)

ในทางกลับกัน เซลล์สลายกระดูกก็สามารถควบคุมการทำหน้าที่ของเซลล์สร้างกระดูกได้เช่นกัน โดยเมื่อเซลล์สลายกระดูกทำให้ปัจจัยต่างๆ ที่เก็บอยู่ในกระดูก เช่น ทรานส์ฟอร์มมิง โกรทแฟกเตอร์ เบตา (transforming growth factor- β ; TGF- β) โบน มอร์โฟเจเนติก โปรตีน (bone morphogenetic protein; BMP) หลุดออกมาจากกระดูก ปัจจัยเหล่านี้จะไปกระตุ้นการทำงานของเซลล์สร้างกระดูก นอกจากนั้น ยังพบว่าเซลล์สลายกระดูกสามารถสร้างปัจจัยที่ไปกระตุ้นการทำงานของเซลล์สร้างกระดูกได้โดยตรง จึงอาจกล่าวได้ว่า ในสภาวะปกติร่างกายจะมีการควบคุมการสร้างและการสลายของกระดูกไปพร้อมๆ กัน ไม่ให้กระบวนการใดกระบวนการหนึ่งเกิดขึ้นมากเกินไป ถ้าเกิดการเสียสมดุลของการควบคุมนี้ เช่น ทำให้กระบวนการสร้างกระดูกมีมากเกินไปจะทำให้เกิดภาวะออสทีโอเพโตรซิส (osteopetrosis) ในทางตรงกันข้ามถ้าเกิดการสลายกระดูกมากเกินไปจะทำให้เกิดภาวะกระดูกพรุน (osteoporosis) ได้

จากการศึกษาจะพบว่าเซลล์สร้างกระดูกมีความจำเป็นต่อการกระตุ้นการสร้างเซลล์สลายกระดูก โดยพบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูกร่วมกับเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สลายกระดูก และมีการกระตุ้นด้วยปัจจัยต่างๆ เช่น วิตามินดี (vitamin D) ฮอร์โมนพาราไทรอยด์ (parathyroid hormone) ฯลฯ จะทำให้เกิดการสร้างเซลล์สลายกระดูก นอกจากนี้ยังพบว่าถ้าเพาะเลี้ยงในลักษณะที่เซลล์ทั้งสองชนิดมีการสัมผัสกัน (cell-to-cell contact) จะทำให้เกิดการสร้างเซลล์สลายกระดูกและเกิดการย่อยสลายแผ่นเนื้อฟันจนเกิดเป็นหลุม (Jimi และคณะ, 1996) ซึ่งการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างเซลล์สร้างกระดูกต่อการสร้างเซลล์สลายกระดูก

จากข้างต้น เซลล์สร้างกระดูกสามารถสร้าง M-CSF ซึ่งจะมีผลต่อการพัฒนาและแปรสภาพของเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สลายกระดูก จากการศึกษานี้ในหนูทดลองที่เกิดการกลายพันธุ์ของยีนที่

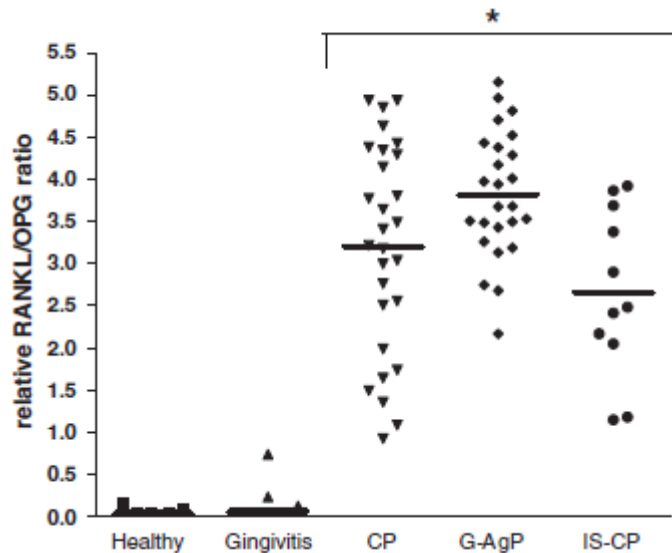
สร้าง M-CSF จนทำให้โปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นมีขนาดสั้นลงจนไม่สามารถทำงานได้ จะทำให้เกิดภาวะ ออสทีโอเพโทรซิสขึ้นในหนูทดลองดังกล่าว (Yoshida และคณะ, 1990) และเมื่อมีการให้ M-CSF ที่ ปกติเข้าไปจะช่วยแก้ไขการสลายกระดูกที่บกพร่องได้ นอกจากนี้เมื่อนำเซลล์สร้างกระดูกของหนูที่มี การกลายพันธุ์ของยีน M-CSF จะไม่กระตุ้นให้เกิดการสร้างเซลล์สลายกระดูกเมื่อนำไปเพาะเลี้ยง ร่วมกับเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สลายกระดูกที่ปกติ แต่เมื่อเติม M-CSF ที่ปกติเพิ่มเข้าไปจึงจะ สามารถกระตุ้นการสร้างเซลล์สลายกระดูกได้ (Suda และคณะ, 1999) แสดงให้เห็นว่า M-CSF ที่ถูก สร้างมาจากเซลล์สร้างกระดูก โดยส่วนใหญ่เป็นปัจจัยหลักที่สำคัญในกระบวนการสร้างเซลล์สลาย กระดูก

ปัจจัยที่สำคัญอีกปัจจัยหนึ่งในการกระตุ้นการแปรสภาพไปเป็นเซลล์สลายกระดูก ได้แก่ RANKL ซึ่งเป็นไซโตไคน์ (cytokine) ชนิดหนึ่งที่ถูกสร้างออกมาจากเซลล์สร้างกระดูกในสภาวะ ปกติ มีทั้งที่พบอยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ และที่ถูกตัดและหลั่งออกมาปะปนอยู่ในสารละลายภายนอกเซลล์ ซึ่งทั้งสองชนิดมีหน้าที่หลักในการกระตุ้นการสร้างเซลล์สลายกระดูก (Boyle และคณะ, 2003) โดยมิ การศึกษาในหนูทดลอง พบว่าหนูที่ไม่สร้าง RANKL จะเกิดภาวะออสทีโอเพโทรซิสได้ โดยไม่พบ เซลล์สลายกระดูกอยู่ในกระดูกเลย (Dougall และคณะ, 1999) นอกจากนี้ RANKL ยังแสดงออก เพิ่มขึ้นเมื่อสร้างเซลล์สร้างกระดูกถูกกระตุ้นด้วยปัจจัยที่กระตุ้นการละลายของกระดูก เช่น วิตามินดี โซร์โมนพาราไทรอยด์ เป็นต้น

นอกจากที่เซลล์สร้างกระดูกจะสร้างปัจจัยที่กระตุ้นการสร้างเซลล์สลายกระดูกแล้ว เซลล์ สร้างกระดูกยังสร้างปัจจัยที่ยังยั้งการสร้างเซลล์สลายกระดูกได้อีก ซึ่งได้แก่ OPG โดยมีการศึกษาใน หนูทดลอง พบว่าเมื่อเพิ่มระดับการแสดงออกของ OPG ในหนูทดลอง จะทำให้หนูทดลองเกิดภาวะ ออสทีโอเพโทรซิส (Sionet และคณะ, 1997) ในทางกลับกัน หนูที่ไม่สร้าง OPG จะเกิดภาวะกระดูก พรุนอย่างรุนแรงอันเนื่องมาจากการสร้างและการทำงานของเซลล์สลายกระดูกที่เพิ่มมากขึ้น (Bucay และคณะ, 1998) สำหรับการศึกษาการวิจัยในมนุษย์ จะพบการกลายพันธุ์ของยีน OPG ในผู้ป่วยที่เป็น โรค Paget's disease ทำให้ไม่เกิดการสร้าง OPG แต่กลับพบระดับของ RANKL ในซีรัมของผู้ป่วยราย นั้นเพิ่มสูงขึ้น (Whyte และคณะ, 2002) แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของสมดุลระหว่างระดับของ RANKL และ OPG ซึ่งทำงานตรงกันข้ามกันในการควบคุมการสร้างเซลล์สลายกระดูก

จากการศึกษาทางคลินิกพบว่าระดับของ RANKL และ OPG มีความสัมพันธ์กับค่าทางคลินิก ของโรคปริทันต์ อันได้แก่ ร่องลึกปริทันต์ นอกจากนี้ยังพบว่าค่า RANKL ต่อ OPG ในผู้ป่วยโรค ปริทันต์อักเสบมีค่ามากกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่เป็น โรค (Crotti และคณะ, 2003) ในปี ค.ศ. 2007 Bostanci และคณะ ทำการวัดระดับของ RANKL และ OPG ในน้ำเหลืองเหงือกของผู้ป่วยโรคปริทันต์ อักเสบ พบความสัมพันธ์ของอัตราส่วนระหว่าง RANKL ต่อ OPG กับความรุนแรงของโรค โดย

พบว่าในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังและโรคปริทันต์อักเสบก้าวร้าวจะมีสัดส่วนระหว่าง RANKL ต่อ OPG ที่สูงกว่า ในผู้ป่วยโรคเหงือกอักเสบและกลุ่มควบคุมที่ไม่เป็นโรคดังกล่าวที่ 2-3 (Bostanci และคณะ, 2007)



ภาพที่ 2-3 แผนภูมิแสดงอัตราส่วนระหว่าง RANKL ต่อ OPG ใน น้ำเหลืองเหงือก ของกลุ่มควบคุมที่ไม่เป็นโรค กลุ่มผู้ป่วยโรคเหงือกอักเสบ ผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรัง ผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบก้าวร้าว และผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน (แหล่งที่มาดัดแปลงจาก Bostanci และคณะ, 2007)

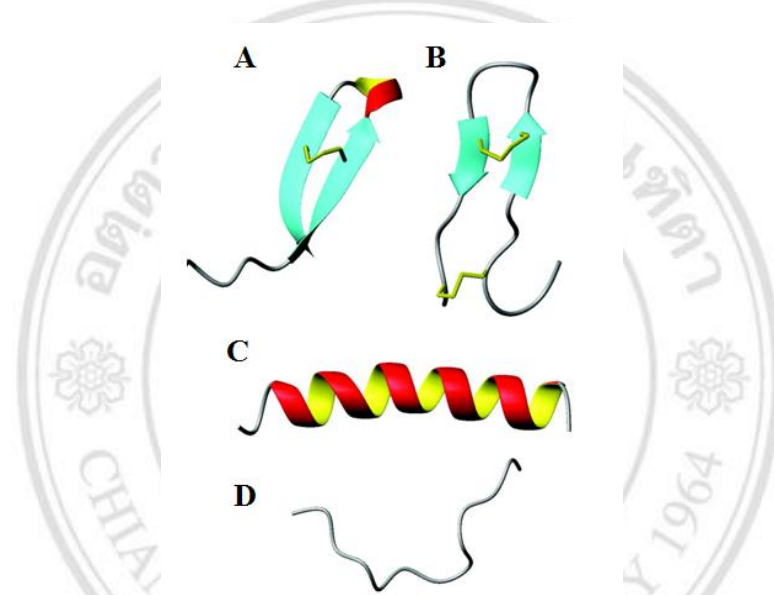
จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการสลายกระดูก โดยเฉพาะกระดูกเบ้าฟันในโรคปริทันต์อักเสบนั้น จำเป็นต้องอาศัยสารสื่อกลางการอักเสบและไซโตไคน์หลายชนิดในการกระตุ้นให้เกิดกระบวนการสร้างเซลล์สลายกระดูก (osteoclastogenesis) คือการเปลี่ยนจากโปรเจนีเตอร์เซลล์ (progenitor cells) เป็นเซลล์สลายกระดูกที่สามารถทำงานได้ (active osteoclasts) นอกจากนี้ ยังมีสารที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการกระตุ้นและยับยั้งการสร้างเซลล์สลายกระดูกอีกหลายชนิด ได้แก่ IL-1, IL-6, TNF- α , RANK, INF- γ , RANKL และ OPG (Cochran, 2008; Schwartz, 1997) สารเหล่านี้สร้างขึ้นจากเซลล์อักเสบในกระบวนการอักเสบที่เกิดขึ้นในเนื้อเยื่อปริทันต์ที่มีการอักเสบ ผ่านทางการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ซึ่งประกอบด้วยภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (innate immune response) และภูมิคุ้มกันที่ได้มาภายหลัง (adaptive immune response) ระบบภูมิคุ้มกันทั้งสองแบบมีการทำงานเกี่ยวเนื่องเชื่อมโยงกัน โดยภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดมีความสำคัญในกระบวนการเกิดพยาธิสภาพของโรคปริทันต์ โดยเป็นระบบแรกที่ตอบสนองต่อการรุกรานของเชื้อ

แบคทีเรียก่อโรคปริทันต์โดยมีการตอบสนองอย่างรวดเร็วและไม่จำเพาะเจาะจง มีเป้าหมายเพื่อกำจัดสิ่งรุกรานแบบไม่จำเพาะต่อแอนติเจน (non-antigen specific) รวมทั้งกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันที่ได้มาภายหลังนำไปสู่การตอบสนองที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น

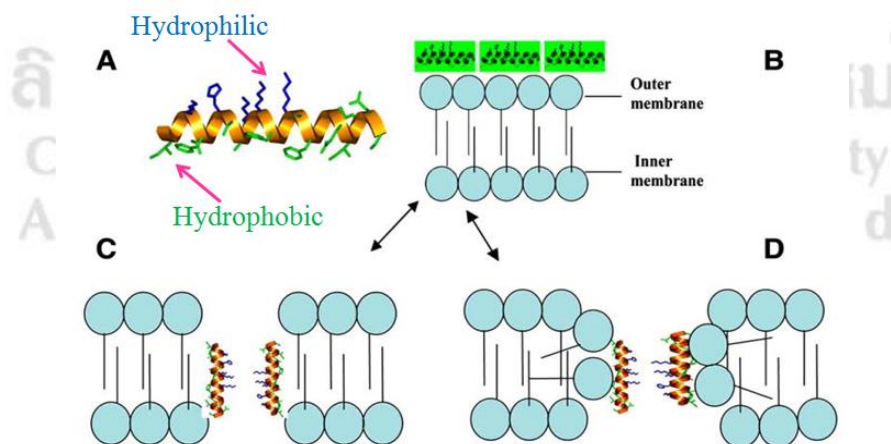
ภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดแบ่งออกได้เป็น การป้องกันทางกายภาพ เช่น ผิวหนัง ความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร หรือการพัดโบกของซีเลีย (cilia) ในระบบทางเดินหายใจ และการป้องกันทางเคมีซึ่งตอบสนองโดยการหลั่งไซโตไคน์และเพปไทด์ต้านจุลชีพ (antimicrobial peptides) (Diamond และคณะ, 2009) ภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดมีองค์ประกอบที่เป็นเซลล์และสารน้ำ องค์ประกอบที่เป็นเซลล์ประกอบด้วย เซลล์เม็ดเลือดขาว (leukocytes) ได้แก่ นิวโทรฟิล (Neutrophils) แมกโครเฟจ (macrophages) และส่วนที่เป็นสารน้ำ ได้แก่ ไซโตไคน์ เคโมไคน์ (chemokines) พรอสตาแกลนดิน คอมพลีเมนต์ (complement) และเพปไทด์ต้านจุลชีพ โดยเซลล์หลักในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดคือ นิวโทรฟิล ซึ่งเป็นเซลล์แรกที่เข้าถึงบริเวณที่มีการติดเชื้อ และมีความสามารถในการทำหน้าที่ต่างๆ ได้แก่ การเคลื่อนผ่านเยื่อหลอดเลือด (transendothelial migration) เคลื่อนผ่านเยื่อบุผิว (transepithelial migration) เคโมแทกซิส (chemotaxis) เพิ่มความสามารถในการแพร่ผ่านหลอดเลือด และส่งเสริมให้มีการเคลื่อนที่ของเซลล์ในกระบวนการอักเสบให้เข้ามาในบริเวณที่มีการรุกรานของเชื้อแบคทีเรีย ทำให้เกิดการอักเสบ นอกจากนี้ นิวโทรฟิลยังสามารถทำงานร่วมกับระบบภูมิคุ้มกันในส่วนของสารน้ำ และเชื่อมโยงกับระบบภูมิคุ้มกันที่ได้มาในภายหลัง โดยพบตัวรับสำหรับคอมพลีเมนต์ 1, 3, 4, 5 และแอนติบอดีชนิดอิมมูโนโกลบูลินจี (IgG antibody) ในแง่ของการเกิดโรคปริทันต์พบว่า นิวโทรฟิลมีบทบาทสำคัญในการคงสภาพสภาวะปริทันต์ (Page และ Kornman, 1997) โดยสามารถพบเซลล์ดังกล่าวได้เป็นจำนวนมากที่บริเวณเยื่อบุผิวเชื่อมต่อ (junctional epithelium) โดยเฉพาะบริเวณที่ติดกับไบโอฟิล์ม และยังสามารถพบเซลล์นี้ได้แม้ในเหงือกที่มีสุขภาพดีในทางคลินิก โดยพบการสะสมของเซลล์นี้ที่บริเวณเยื่อบุผิวเชื่อมต่อ โดยเฉพาะบริเวณที่ติดกับคราบจุลินทรีย์ (Page และ Kornman, 1997) การมีนิวโทรฟิลสะสมอยู่ดังกล่าว ส่งผลให้มีการสร้างองค์ประกอบเคโมแทคติก (chemotactic factors) ในร่องเหงือกและเนื้อเยื่อบริเวณดังกล่าว บทบาทอื่นๆ ของนิวโทรฟิลในแง่ของการทำลายเชื้อจุลชีพ ได้แก่ อ็อพโซไนเซชัน (opsonization) ฟาโกไซโตซิส (phagocytosis) และการฆ่าเชื้อภายในฟาโกไซโตโซมด้วยเอนไซม์ไฮโดรไลติก (hydrolytic enzymes) รวมไปถึงการสร้างและหลั่งเอนไซม์คอลลาจีเนส (collagenases) และโปรตีนเอส

ในส่วนของเยื่อบุผิวเหงือก นอกจากจะทำหน้าที่หลักแบบเชิงกลในการป้องกันการรุกรานของจุลชีพแล้ว เยื่อบุผิวเหงือกยังสามารถผลิตเพปไทด์ต้านจุลชีพที่มีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อจุลชีพได้ (Dale, 2002) เพปไทด์ต้านจุลชีพเป็นโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาตั้งแต่ดั้งเดิม โดยจะมีลำดับเบสและรูปร่างแตกต่างกันในแต่ละชนิดและประเภทของสิ่งมีชีวิตดังกล่าวที่ 2-4 แต่อย่างไรก็ตาม

สามารถพบลักษณะโครงสร้างพื้นฐานที่เหมือนกันคือ ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีประจุรวมสุทธิของเพปไทด์เป็นบวกเนื่องจากมีส่วนประกอบที่เป็นกรดอะมิโนไลซีนและอาร์จินิน ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นเบสในสัดส่วนที่มากกว่ากรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติเป็นกรด มีส่วนประกอบที่เป็นกรดอะมิโนชนิดไม่ชอบน้ำ (hydrophobic amino acids) อยู่ด้านหนึ่งของโมเลกุล และส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic domain) อยู่อีกด้านหนึ่ง เรียกลักษณะดังกล่าวว่า แอมฟิพาธิค (amphipathic) คุณสมบัตินี้ทำให้เพปไทด์ด้านจุดชีพสามารถเคลื่อนผ่านตัวกลางที่มีสถานะเป็นของเหลว เพื่อเข้าไปสอดแทรกและทำปฏิกิริยากับเยื่อหุ้มเซลล์ของจุดชีพได้ดังภาพที่ 2-5 (Weinberg และคณะ, 1998)



ภาพที่ 2-4 ภาพจำลองแสดงลักษณะ โครงสร้างทุติยภูมิของเพปไทด์ด้านจุดชีพแบบต่าง ๆ (แหล่งที่มาดัดแปลงจาก Jensen และคณะ, 2006)



ภาพที่ 2-5 ภาพจำลองแสดงลักษณะของเพปไทด์ด้านจุดชีพที่เป็นแอมฟิพาธิค ทำให้เคลื่อนตัวผ่านเข้าไปสอดแทรกในชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ของจุดชีพได้ (แหล่งที่มาดัดแปลงจาก Diamond และคณะ, 2009)

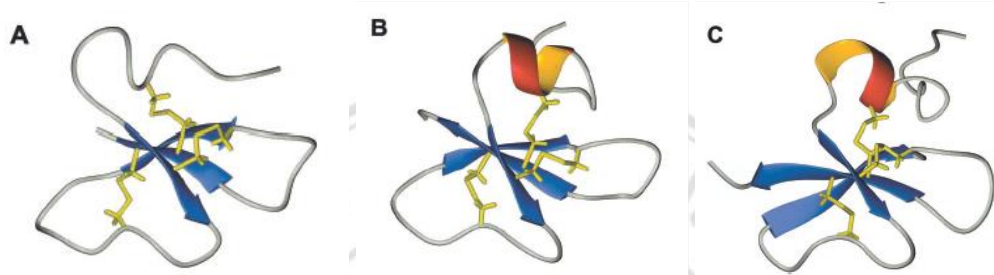
เพปไทด์ต้านจุลชีพที่พบในมนุษย์นั้นมีหลายชนิด เช่น แกรนูโลซิน (granulysin) ฮีสตามีน (histatin) แลคโตเฟอริซิน (lactoferricin) แคทีลิกไซด์ินและดีเฟนซิน เพปไทด์ต้านจุลชีพมีคุณสมบัติต้านทานต่อทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ เชื้อรา และไวรัส (Zaiou และคณะ, 2003) โดยมีการศึกษาที่พบว่าแบคทีเรียในช่องปากแต่ละชนิดสามารถกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของเพปไทด์ต้านจุลชีพได้ในลักษณะที่แตกต่างกัน (Gorr และ Abdolhosseini, 2011) ซึ่งเพปไทด์ต้านจุลชีพที่ถูกสร้างขึ้นแต่ละชนิดจะมีรูปร่างลักษณะการทำงานแตกต่างกัน โดยความแตกต่างดังกล่าวมีความสำคัญในการต่อต้านการรุกรานของเชื้อแบคทีเรียและยังเป็นการรักษาสมดุลระหว่างเชื้อประจำถิ่นกับเชื้อก่อโรคอีกด้วย (Weinberg และคณะ, 1998)

ซึ่งเพปไทด์ต้านจุลชีพที่พบในช่องปากของ มนุษย์ที่ถูกสร้างมาจากเยื่อเมือกช่องปาก เม็ดเลือดขาว และต่อมน้ำลายมีจำนวนไม่น้อยกว่า 45 ชนิด (Gorr และ Abdolhosseini, 2011) โดยพบว่ามีครอบครัวหลักๆของครอบครัวเพปไทด์ต้านจุลชีพอยู่ 2 ครอบครัวที่สร้างมาจากเซลล์เยื่อเมือกช่องปากและมีผู้ศึกษาวิจัยเป็นจำนวนมาก ได้แก่ ดีเฟนซิน (defensin) และแคทีลิกไซด์ิน (cathelicidin) ในครอบครัวของดีเฟนซินยังแบ่งเพปไทด์ออกได้อีก 2 กลุ่มคือ แอลฟา-ดีเฟนซิน (α -defensin) และบีตา-ดีเฟนซิน (β -defensin) ในขณะที่ครอบครัวของแคทีลิกไซด์ินพบว่ามีเพปไทด์ต้านจุลชีพเพียงชนิดเดียวที่พบในมนุษย์ซึ่งได้แก่ LL-37

ดีเฟนซินเป็นเพปไทด์ต้านจุลชีพที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนอาร์จินีนและไลซีนหลายๆตัวภายในโมเลกุล นอกจากนั้นยังประกอบด้วยกรดอะมิโนซิสเทอีนจำนวน 6 ตัวภายในโมเลกุล ทำให้เกิดพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) 3 พันธะขึ้นภายใน โมเลกุลได้ เพื่อทำให้โครงสร้างมีความเสถียร และยังมีลักษณะ โครงสร้างแบบแอมฟิพาติก ทำให้ดีเฟนซินสามารถสอดแทรกผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้มีฤทธิ์ในการทำลายจุลชีพได้การค้นพบดีเฟนซินครั้งแรกในเซลล์ของมนุษย์ถูกนำเสนอในปี ค.ศ. 1985 โดยสกัดได้จากเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล (Selsted และคณะ, 1985) และต่อมาก็ได้มีการศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับดีเฟนซินเพิ่มเติม ทำให้ทราบว่าดีเฟนซินจะพบได้ในเนื้อเยื่อทั่วร่างกาย โดยเฉพาะในเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์เยื่อเมือกต่างๆ ส่วนการสร้างและการแสดงออกจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของดีเฟนซิน ชนิดของเซลล์ และชนิดของสิ่งกระตุ้น (Menendez และ Finlay, 2007) ในการที่พบดีเฟนซินในเนื้อเยื่อต่างๆ ของร่างกาย เช่น ใต้ ปอด และทางเดินอาหาร หรือแม้กระทั่งภายในช่องปาก เช่น เหงือก ลิ้น ต่อมน้ำลายและเยื่อเมือกช่องปาก เป็นต้น ทำให้ทราบว่าดีเฟนซินมีบทบาทสำคัญในการป้องกันและต่อต้านการรุกรานของแบคทีเรียเข้าสู่เซลล์ของร่างกาย (Diamond และคณะ, 2001) ซึ่งนับว่าเป็นกลไกที่สำคัญอย่างหนึ่งของระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด

ครอบครัวดีเฟนซินสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ครอบครัว ได้แก่ ครอบครัวแอลฟา-ดีเฟนซิน ซึ่งมีสมาชิกทั้งหมด 6 ตัว โดยที่สมาชิก 4 ตัวแรก ซึ่งได้แก่ human neutrophil peptide (HNP) 1-4

(HNP 1-4) จะถูกสร้างและเก็บอยู่ในนิวโทรฟิล (Ganz, 2003) โดยเชื่อกันว่า HNP 1-3 มีบทบาทในการป้องกันการเกิดฟันผุ (Tao และคณะ, 2005) ส่วน HNP-4 ยังไม่มีรายงานการศึกษาที่ชัดเจน ในขณะที่สมาชิกอีก 2 ตัว ซึ่งได้แก่ human defensin-5 และ -6 (HD-5, HD-6) จะถูกสร้างและเก็บอยู่ในเซลล์พานเอท (paneth cell) ซึ่งเป็นเซลล์พิเศษที่อยู่และมีบทบาทภายในลำไส้เล็ก (Ganz, 2003)

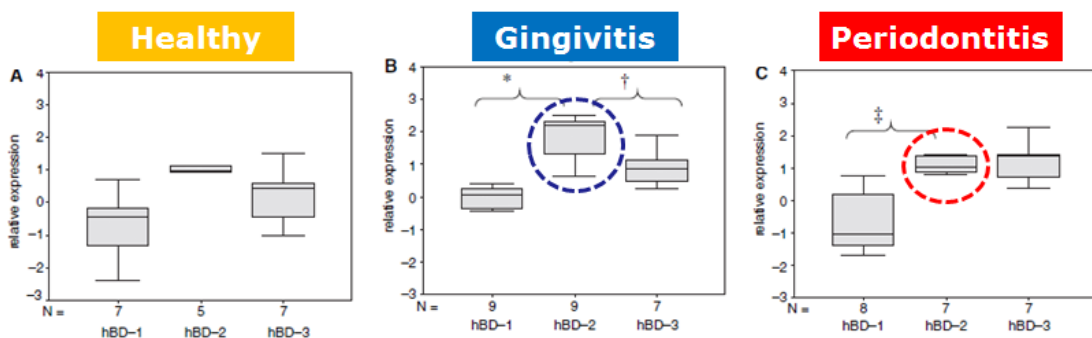


ภาพที่ 2-6 ภาพจำลองแสดงลักษณะโครงสร้างของ hBD-1 (A), hBD-2 (B) และ hBD-3 (C) (แหล่งที่มาดัดแปลงจาก Schibli และคณะ, 2002)

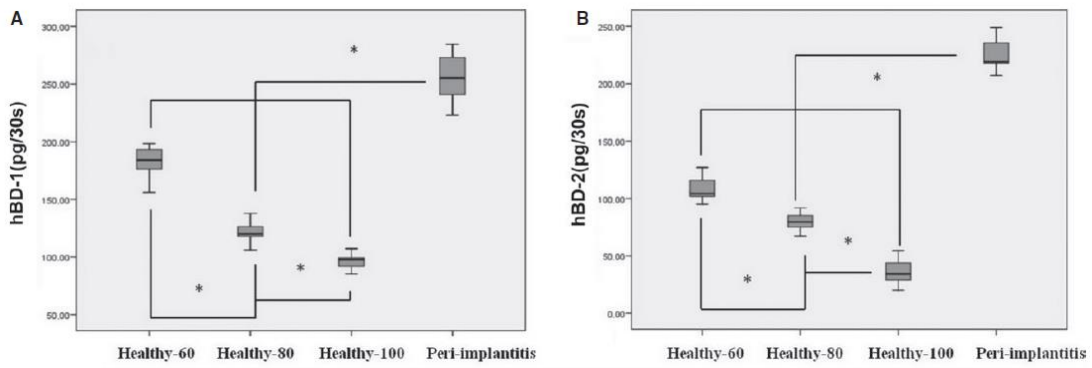
ครอบครัวดีเฟนซินอีกครอบครัวหนึ่ง ได้แก่ ครอบครัวบีตา-ดีเฟนซิน ซึ่งพบว่ามีสมาชิกอยู่ 6 ตัว ได้แก่ human β -defensin-1 ถึง -4 (hBD-1 ถึง -4) ซึ่งพบการแสดงออกในเซลล์เยื่อบุผิวที่ปกคลุมเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ โดยเฉพาะผิวหนังและเยื่อเมือกบนทางเดินอาหารและลำไส้ ทางเดินหายใจ และทางเดินปัสสาวะ (Ganz, 2003) ในขณะที่พบ hBD-5 และ -6 จะแสดงออกเฉพาะที่บางอวัยวะ เช่น เอพิไดมิส (epididymis) (Yamaguchi และคณะ, 2002) อย่างไรก็ตาม สำหรับเนื้อเยื่อภายในช่องปาก จะพบการแสดงออกเฉพาะ hBD-1, -2 และ -3 เท่านั้น ดังภาพที่ 2-6 (Abiko และคณะ, 2007) โดยพบการแสดงออกของ hBD-1 และ hBD-2 ในชั้นเหนือเบซัล (suprabasal) ของเยื่อบุผิวเหงือกปกติ (Dale และคณะ, 2001) และยังตรวจพบในน้ำเหลืองเหงือกด้วย (Diamond และคณะ, 2001) ซึ่ง hBD-1 จะพบการแสดงออกในเซลล์เยื่อบุเหงือกในระดับคงที่ซึ่งไม่สัมพันธ์กับการอักเสบของเนื้อเยื่อ แต่จะแตกต่างกันไปในแต่ละบุคคล (Krisanaprakornkit และคณะ, 1998) นอกจากนี้ยังตรวจพบปริมาณต่ำๆ ในน้ำลาย (Mathews และคณะ, 1999) และในน้ำเหลืองเหงือกในปริมาณที่แตกต่างกันในแต่ละบุคคล (Diamond และคณะ, 2001) ส่วน hBD-2 นั้นจะพบว่าการควบคุมการแสดงออกจะเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นจากทั้งกระบวนการอักเสบโดยจุลินทรีย์และจากกระบวนการแปรสภาพของเซลล์เยื่อบุผิว ซึ่งจะพบสูงสุดในบริเวณเหงือกรอบตัวฟัน ซึ่งอยู่ติดกับบริเวณที่มีการสะสมคราบจุลินทรีย์และบริเวณที่เซลล์เยื่อบุผิวเหงือกได้แปรสภาพไปแล้ว (Dale และคณะ, 2001) สำหรับ hBD-3 นั้นถูกค้นพบเป็นครั้งแรกในเซลล์คีราติโนไซต์ (keratinocyte cells) (Harder และคณะ, 2001) โดยในช่องปากจะพบการ

แสดงออกในเซลล์เยื่อบุผิวชั้นเบซัลของเหงือกปกติ และเหงือกที่อักเสบ (Lu และคณะ, 2005) การศึกษาส่วนใหญ่มักจะแสดงให้เห็นถึงประโยชน์ของดีเฟนซิน เช่น การใช้บีตา-ดีเฟนซินเฉพาะที่ในการรักษาการติดเชื้อไวรัสบางชนิดหรือการติดเชื้อแบคทีเรีย รวมไปถึงการติดเชื้อรา (Diamond และคณะ, 2001; Menendez และ Finlay, 2007; Mathews และคณะ, 1999) แต่มีเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่กล่าวถึงผลกระทบที่ไม่พึงประสงค์ของบีตา-ดีเฟนซิน เช่น เมื่อเกิดการอักเสบร่างกายจะสร้างบีตา-ดีเฟนซินมากขึ้น ทำให้มีผลกระทบทำให้เกิดภาวะภูมิคุ้มกันต้านทานต่อตัวเอง (autoimmune disease) (Abiko และคณะ, 2007)

ในแง่ของโรคปริทันต์นั้น มีการศึกษาที่ดูการแสดงออกของ hBD-1 และ -2 ในผู้ป่วยโรคเหงือกอักเสบ โรคปริทันต์อักเสบเรื้อรัง และโรคปริทันต์อักเสบก้าวร้าว พบว่า ระดับการแสดงออกของ hBD-1 และ -2 ในผู้ป่วยโรคเหงือกอักเสบจะไม่แตกต่างกัน ส่วนโรคปริทันต์อักเสบนชนิดเรื้อรังจะมีระดับการแสดงออกของ hBD-1 มากกว่า hBD-2 และในโรคปริทันต์อักเสบนชนิดก้าวร้าวจะมีระดับการแสดงออกของ hBD-2 มากกว่า hBD-1 (Vardar-Sengul และคณะ, 2007) ซึ่งสอดคล้องกับอีกการศึกษาที่ดูการแสดงออกของ hBD-1, -2 และ -3 ในเนื้อเยื่อเหงือกปกติเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อเหงือกของของผู้ป่วยโรคเหงือกอักเสบและโรคปริทันต์อักเสบ พบว่า ระดับการแสดงออกของบีตา-ดีเฟนซินทั้ง 3 ชนิดจะไม่แตกต่างกันในเนื้อเยื่อปกติ แต่ทั้งในเนื้อเยื่อเหงือกของผู้ป่วยโรคเหงือกอักเสบและโรคปริทันต์อักเสบจะพบว่า hBD-2 มีระดับที่สูงขึ้น ดังภาพที่ 2-7 (Dommisch และคณะ, 2005) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่พบว่า ในเนื้อเยื่อและน้ำเหลืองเหงือกจากบริเวณที่เกิดการอักเสบรอบรากฟันเทียม (peri-implantitis) จะมีการแสดงออกของ hBD-1 และ -2 ที่สูงขึ้นด้วย (Kuula และคณะ, 2008; Ertugrul และคณะ, 2014) จากภาพที่ 2-8



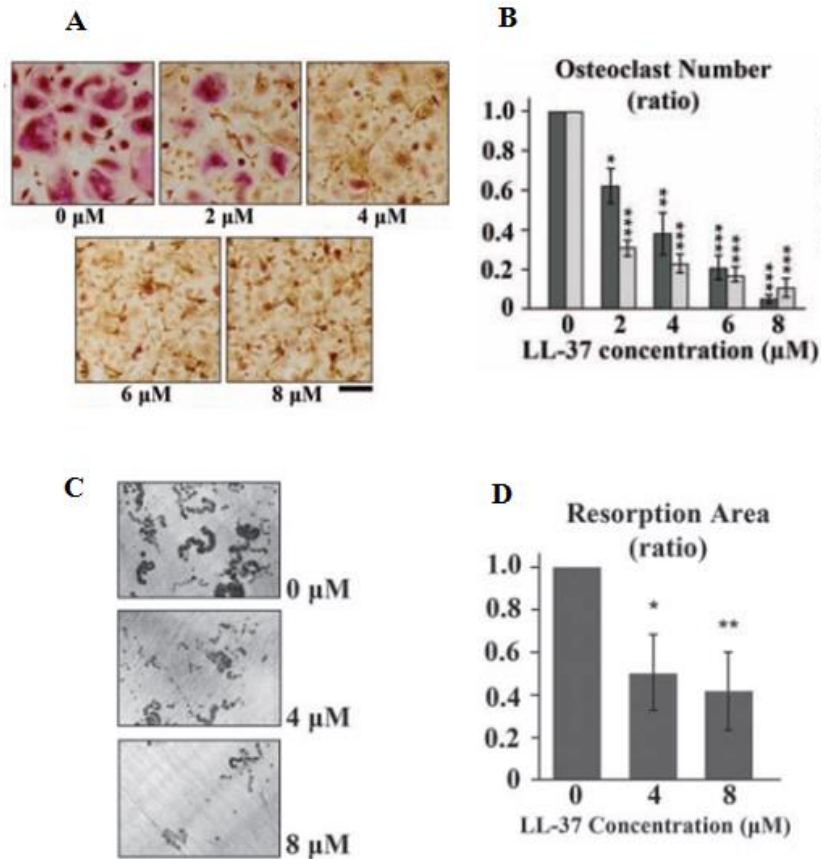
ภาพที่ 2-7 แผนภูมิแสดงการวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน hBD-1, -2 และ -3 ในเนื้อเยื่อเหงือกปกติ (A) เนื้อเยื่อเหงือกของผู้ป่วยโรคเหงือกอักเสบ (B) และ เนื้อเยื่อเหงือกของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ (C) (แหล่งที่มาดัดแปลงจาก Dommisch และคณะ, 2005)



ภาพที่ 2-8 แผนภูมิแสดงการเปรียบเทียบการแสดงผลของระดับ hBD-1 (A) และ hBD-2 (B) ใน น้ำเหลืองเหงือกของคนปกติและผู้ป่วยที่มีการอักเสบรอบรากฟันเทียม (แหล่งที่มาคัดแปลงจาก Ertugrul และคณะ, 2014)

สำหรับการศึกษาระดับของ hBD-3 นั้นกลับพบว่า ระดับของ hBD-3 ในเนื้อเยื่อปกติจะมีระดับสูงกว่าเมื่อเทียบกับเนื้อเยื่อที่เป็น โรคปริทันต์อักเสบ (Bissell และคณะ, 2004) นอกจากนี้ยังพบว่า ระดับของ hBD-3 ในน้ำเหลืองเหงือกของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบจะมีระดับต่ำกว่าของกลุ่มควบคุมที่ไม่เป็นโรค (Brancatisano และคณะ, 2011) และเมื่อศึกษาความสัมพันธ์ของบีตา-ดีเฟนซินกับเชื้อแบคทีเรียได้เหงือกและเชื้อก่อโรคปริทันต์ในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังเปรียบเทียบกับคนปกติ ที่พบว่า การแสดงผลของฮิน hBD-1, -2 และ -3 ในเนื้อเยื่อเหงือกของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังจะน้อยลง ในขณะที่มีเชื้อแบคทีเรียได้เหงือกและเชื้อก่อโรคปริทันต์เพิ่มขึ้น (Wang และคณะ, 2015)

ทั้งนี้จากการศึกษาที่ผ่านมาในมนุษย์เกี่ยวกับบทบาทของเพปไทด์ต้านจุลชีพต่อการสร้างและการทำหน้าที่ของเซลล์สลายกระดูกนั้นเคยมีการศึกษาที่ทำในเพปไทด์ต้านจุลชีพครอบครัวแคทีลิซิน (LL-37) เท่านั้น (Supancharit และคณะ, 2012) ซึ่งพบว่า LL-37 มีคุณสมบัติในการยับยั้งการสร้างเซลล์สลายกระดูก (ภาพ 2-9A) และการทำงานของเซลล์สลายกระดูก (ภาพ 2-9C) นอกจากนี้เมื่อความเข้มข้นของ LL-37 เพิ่มขึ้น ก็จะมีผลทำให้การสร้างและการทำงานของเซลล์สลายกระดูกลดลงเช่นกัน (ภาพ 2-9B และ 2-9D) ดังภาพที่ 2-9



ภาพที่ 2-9 ผลการศึกษาการยับยั้งการสร้างเซลล์สลายกระดูกด้วย LL-37 โดยวิธีย้อมสี TRAcP (A และ B) และการทำงานของเซลล์สลายกระดูกด้วยวิธีเล็งเซลล์บนแผ่นเนื้อฟัน (C และ D) (แหล่งที่มาดัดแปลงจาก Supanchart และคณะ, 2012)

อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีการศึกษาเกี่ยวกับบทบาทของ hBDs ต่อพยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์ รวมถึงยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับบทบาทของ hBDs ต่อเซลล์สลายกระดูก ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญในการเกิดโรคปริทันต์ จึงนำไปสู่แนวคิดในการศึกษาผลของ hBD-1, -2 และ -3 ต่อการสร้างและการทำหน้าที่ของเซลล์สลายกระดูก โดยมีคำถามงานวิจัยว่า hBDs แต่ละชนิดมีบทบาทในการควบคุมทั้งการสร้างและการทำหน้าที่ของเซลล์สลายกระดูกในห้องทดลองอย่างไร

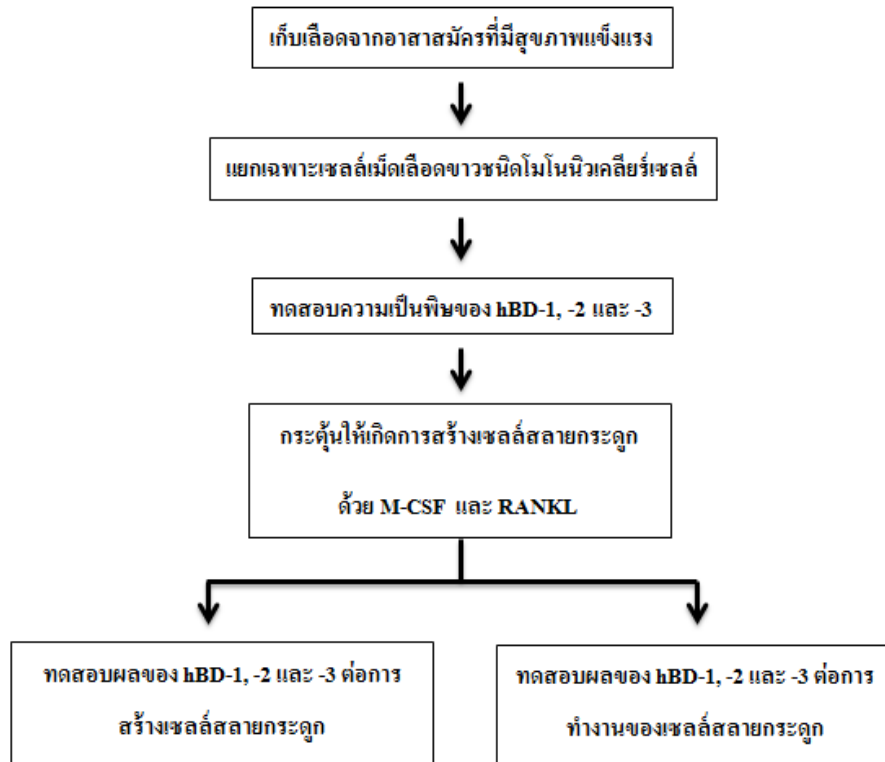
บทที่ 3

วิธีการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาในห้องปฏิบัติการ โดยทำการแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียร์เซลล์จากเลือดครบส่วน (whole blood) ที่ได้จากอาสาสมัครที่มีสุขภาพร่างกายแข็งแรงดีจำนวน 3 ราย ซึ่งผ่านการยินยอมให้ความร่วมมือในการทำวิจัยและได้รับอนุมัติจากคณะกรรมการพิทักษ์สิทธิ์และสวัสดิภาพของผู้ถูกวิจัยของคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่เรียบร้อยแล้ว นำไปทดสอบความเป็นพิษของ hBD-1, -2 และ -3 ที่มีต่อเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สลายกระดูกด้วยวิธี MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) ตามวิธีการของ Supanchart และคณะ (2012) โดยใช้ hBD-1, -2 และ -3 ที่ได้มาจากการสังเคราะห์ (Peptide Institute, Inc., Osaka, Japan)

เลือกระดับความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เพื่อศึกษาผลของ hBD-1, -2 และ -3 ต่อการสร้างเซลล์สลายกระดูก โดยกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียร์เซลล์ให้กลายเป็นเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สลายกระดูกร่วมกับ hBD-1, -2 หรือ -3 โดยใช้ M-CSF และ RANKL เป็นตัวควบคุมเชิงบวก ส่วนตัวควบคุมเชิงลบคือ เซลล์ที่ใส่เฉพาะ M-CSF แล้วนับจำนวนเซลล์สลายกระดูกที่ย้อมติดสี TRAcP ซึ่งสังเกตได้จากมีนิวเคลียสตั้งแต่ 3 นิวเคลียสขึ้นไปเพื่อดูผลของ hBDs ต่อการกระตุ้นการสร้างเซลล์สลายกระดูก

ส่วนการทดสอบผลของ hBD-1, -2 และ -3 ต่อการทำงานของเซลล์สลายกระดูก ทำการกระตุ้นโมโนนิวเคลียร์เซลล์ให้กลายเป็นเซลล์สลายกระดูกด้วย M-CSF และ RANKL ร่วมกับการใช้ hBD-1, -2 และ -3 บนแผ่นเนื้อฟีนเพื่อกำหนดบริเวณที่เกิดเป็นหลุม และติดสี ซึ่งเป็นผลจากการทำงานของเซลล์สลายกระดูก โดยสรุปเป็นแผนผังงานวิจัยได้ดังภาพที่ 3-1



ภาพที่ 3-1 แสดงแผนผังงานวิจัย (แหล่งที่มา จัดทำขึ้นเอง)

3.1 การแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียร์เซลล์ออกจากเลือดครบส่วน

3.1.1 เก็บเลือดจากหลอดเลือดดำโดยใช้สารกันเลือดแข็งชนิด heparin จากอาสาสมัครที่มีอายุ 18-25 ปี จำนวน 3 คน (ทำการทดสอบแบบ triplication) โดยจะต้องผ่านการยินยอมให้ความร่วมมือในการทำวิจัยและได้รับอนุมัติจากคณะกรรมการพิทักษ์สิทธิฯ ของคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยมีหลักเกณฑ์ในการคัดเลือกอาสาสมัคร ดังนี้

- 1) มีสุขภาพแข็งแรง ไม่มีโรคประจำตัว
- 2) ไม่มีประวัติเป็นโรคปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรังและก้าวร้าว

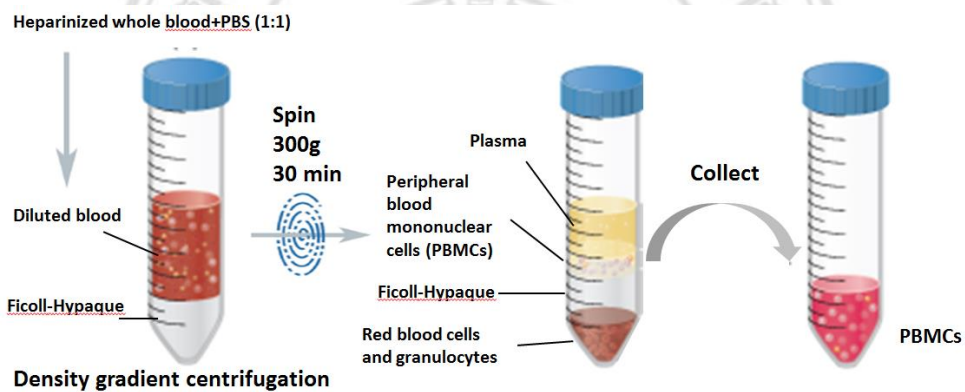
หลักเกณฑ์ในการไม่คัดเลือกอาสาสมัคร ดังนี้

- 1) ผู้ป่วยที่เป็นโรคเกี่ยวกับการอักเสบและการทำลายของกระดูก เช่น โรคข้อเสื่อม โรคข้ออักเสบ โรคข้อรูห์มาตอยด์ และโรคกระดูกพรุน
- 2) ผู้ป่วยที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน ยาต้านการแข็งตัวของเลือด ยาในกลุ่มบิสฟอสโฟเนต รวมทั้งผู้ที่ได้รับยาปฏิชีวนะและยาต้านการอักเสบมาก่อนการเก็บตัวอย่างเลือดเป็นเวลา 3 เดือน และผู้ที่จำเป็นต้องได้รับการป้องกันการติดเชื้อในกระแสเลือดก่อนการเก็บตัวอย่าง

3) ผู้ป่วยที่เป็นโรคทางระบบและมีภาวะที่เป็นปัจจัยเสี่ยงของโรคปริทันต์อักเสบ ได้แก่ โรคเบาหวานที่ไม่ได้รับการควบคุมและการสูบบุหรี่

4) ผู้ป่วยที่เป็นสตรีมีครรภ์และผู้ให้นมบุตร

3.1.2 จากนั้นทำการแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียร์เซลล์โดยใช้วิธี Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation ซึ่งมีขั้นตอน คือ นำเลือดครบส่วนมาเจือจางด้วยสารละลายปลอดเชื้อ phosphate buffered saline (PBS) ที่อัตราส่วน 1:1 แล้วนำไปใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลาย Ficoll-Hypaque (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden) ปริมาณ 3 ml อยู่ก่อนแล้ว จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความแรง 300 g เป็นเวลา 30 นาที จะทำให้เกิดการแยกชั้นของเซลล์ จากนั้นทำการเก็บเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียร์เซลล์ที่จะอยู่ในชั้น buffy coat ทำการปั่นล้างเซลล์ด้วย PBS สองรอบ ดังภาพที่ 3-2



ภาพที่ 3-2 ภาพจำลองแสดงขั้นตอนการแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียร์เซลล์

(แหล่งที่มาดัดแปลงจาก Supanchart และคณะ, 2012)

3.1.3 นับจำนวนเซลล์ที่ได้และปรับความเข้มข้นให้เป็น 3×10^6 cells/ml ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด α -MEM (Lonza Walkersville, Inc., Walkersville, MD, USA) ที่มี 10% fetal calf serum (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen) และ 2 mM L-glutamine (Lonza Walkersville, Inc.) เพื่อใช้ทำการทดลองต่อไป ดังภาพที่ 3-3



Culture in α -MEM supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, and 1% penicillin/streptomycin

Seed at 3×10^6 cells/ml in culture well plates

ภาพที่ 3-3 ภาพจำลองแสดงการนับจำนวนเซลล์และปรับความเข้มข้นในอาหารเลี้ยงเซลล์

(แหล่งที่มาดัดแปลงจาก Supanchart และคณะ, 2012)

3.2 ทดสอบความเป็นพิษของ hBD-1, -2 และ -3 ต่อเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สลายกระดูก

3.2.1 ทดสอบโดยเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด โมโนนิวเคลียร์เซลล์ที่เตรียมได้จากข้อ 3.1.3 ใน 96-well culture plate (Nunc A/S, Roskilde, Denmark) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 5% CO₂, humidified เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

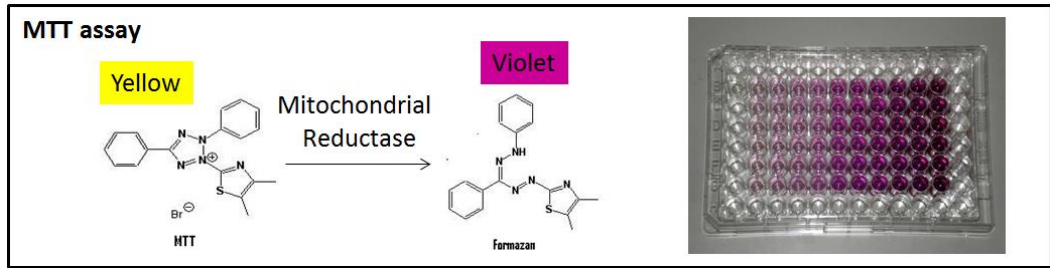
3.2.2 จากนั้นเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี hBD-1, -2 หรือ -3 (Peptide Institute, Inc., Osaka, Japan) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน 5, 10, 20, 30, 40, 50 μ g/ml (1, 2, 5, 7, 10 และ 12 ไมโครโมลาร์) และกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ใส่ hBDs เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2.3 เติมนสาร MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ที่มีความเข้มข้น 5 mg/ml เป็นเวลา 4 ชั่วโมงเพื่อทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ โดยเซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้นจะมีเอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยนสารที่เติมลงไปให้กลายเป็นผลิตภัณฑ์สีม่วงที่ไม่ละลายน้ำได้ ดังภาพที่ 3-4

3.2.4 ดูด supernatant ที่งอกจากนั้นละลายผลิตภัณฑ์ด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) (Amresco, Solon, Ohio) ปริมาณ 200 μ l

3.2.5 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD 540 nm โดยความมีชีวิตของเซลล์คำนวณได้จาก

$$\% \text{ survival} = \frac{\text{O.D.กลุ่มทดสอบ}}{\text{O.D.กลุ่มควบคุม}} \times 100$$



ภาพที่ 3-4 การทดสอบความเป็นพิษด้วยวิธี MTT
(แหล่งที่มาคัดแปลงจาก Supanchart และคณะ, 2012)

3.3 ทดสอบผลของ hBD-1, -2 และ -3 ต่อการกระตุ้นการสร้างเซลล์สลายกระดูก

3.3.1 กระตุ้น โมโนนิวเคลียร์เซลล์ให้กลายเป็นเซลล์สลายกระดูกด้วย M-CSF (R&D systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) และ RANKL (R&D system, Inc.) ร่วมกับการใส่ hBDs ที่ความเข้มข้น 0.2, 1 หรือ 5 μM ใน 96-well culture plate ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.1.3 ตามวิธีการของ Supanchart และคณะ (2012)

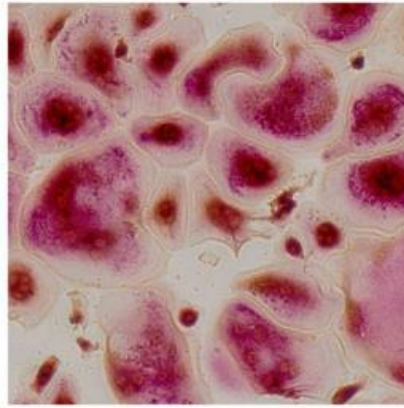
3.3.2 แบ่งการทดลองเป็น 5 กลุ่ม ดังนี้

- 1) กลุ่มที่ 1 ใส่ M-CSF 15 ng/mL เพียงอย่างเดียว เพื่อใช้เป็น negative control
- 2) กลุ่มที่ 2 ใส่ M-CSF 15 ng/mL และ RANKL 30 ng/mL เพื่อเป็น positive control
- 3) กลุ่มที่ 3 ใส่ M-CSF 15 ng/mL, RANKL 30 ng/mL และ hBD-1 0.2, 1, 5 μM
- 4) กลุ่มที่ 4 ใส่ M-CSF 15 ng/mL, RANKL 30 ng/mL และ hBD-2 0.2, 1, 5 μM
- 5) กลุ่มที่ 5 ใส่ M-CSF 15 ng/mL, RANKL 30 ng/mL และ hBD-3 0.2, 1, 5 μM

โดยเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7 วัน และเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2-3 วัน

3.3.3 จากนั้นทำการตรึงสภาพเซลล์ด้วยสารละลาย 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) ในสารละลาย PBS ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างออกด้วยสารละลาย PBS อีก 5 นาที จำนวน 2 รอบ

3.3.4 ย้อมเซลล์ด้วย 1.5 mM Fast Red Violet LB salt (Sigma-Aldrich) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วล้างออก ซึ่งสีที่เกิดขึ้นเป็นผลมาจากปฏิกิริยาการตัดสารตั้งต้น Naphthol AS-MX phosphate ด้วยเอนไซม์ TRAcP ของเซลล์ จากนั้นนับจำนวนเซลล์สลายกระดูกซึ่งเป็นเซลล์ที่ติดสีและมีนิวเคลียสตั้งแต่ 3 นิวเคลียสขึ้นไป ดังภาพที่ 3-5 โดยส่องนับเซลล์จากกล้อง Inverted phase contrast microscope ซึ่งจะนับจากการสุ่มถ่ายภาพ 3 ตำแหน่งจากเลนส์ 10x แล้วนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ย



ภาพที่ 3-5 เซลล์สลายกระดูกที่ย้อมติดสี TRAcP ซึ่งสังเกตได้จากมีนิวเคลียสตั้งแต่ 3 นิวเคลียสขึ้นไป (แหล่งที่มาดัดแปลงจาก Supanchart และคณะ, 2012)

3.4 ทดสอบผลของ hBD-1, -2 และ -3 ต่อการทำงานของเซลล์สลายกระดูก

3.4.1 กระตุ้นโมโนนิวเคลียร์เซลล์ให้กลายเป็นเซลล์สลายกระดูกด้วย M-CSF และ RANKL ร่วมกับการใส่ hBDs ที่ความเข้มข้น 5 μ M ใน 96-well culture plate บนแผ่นเนื้อพิน ที่ได้มาจากงาช้าง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 mm ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.1.3 ตามวิธีการของ Supanchart และคณะ (2012)

3.4.2 แบ่งการทดลองเป็น 5 กลุ่ม ดังนี้

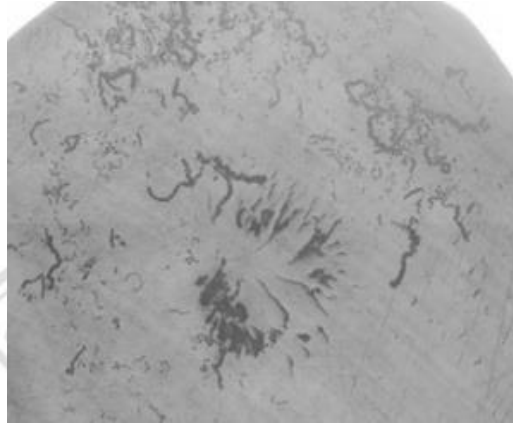
- 1) กลุ่มที่ 1 ใส่ M-CSF 15 ng/mL เพียงอย่างเดียว เพื่อใช้เป็น negative control
- 2) กลุ่มที่ 2 ใส่ M-CSF 15 ng/mL และ RANKL 30 ng/mL เพื่อเป็น positive control
- 3) กลุ่มที่ 3 ใส่ M-CSF 15 ng/mL, RANKL 30 ng/mL และ hBD-1 5 μ M
- 4) กลุ่มที่ 4 ใส่ M-CSF 15 ng/mL, RANKL 30 ng/mL และ hBD-2 5 μ M
- 5) กลุ่มที่ 5 ใส่ M-CSF 15 ng/mL, RANKL 30 ng/mL และ hBD-3 5 μ M

โดยเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 14 วัน และเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2-3 วัน

3.4.3 เก็บแผ่นเนื้อพินมาเช็ดล้างด้วยน้ำพร้อมกับถูออกด้วยนิ้วมือเพื่อนำเซลล์ที่เกาะอยู่ออกไป

3.4.4 ย้อมแผ่นเนื้อพินด้วยสี Indian ink โดยใส่สีทิ้งไว้สักครู่ จนเริ่มจะแห้งแล้วเช็ดหมึกส่วนเกินออกด้วยผ้าชุบน้ำหมาดๆ

3.4.5 จำนวนบริเวณที่เกิดเป็นหลุม (resorption pit) และคิซีส ดังภาพที่ 3-6 ซึ่งเกิดจากการทำงานของเซลล์สลายกระดูกด้วย โปรแกรม Image J โดยเปรียบเทียบร้อยละของพื้นที่ที่คิซีสเทียบกับพื้นที่ทั้งหมดของแผ่นเนื้อฟัน



ภาพที่ 3-6 หลุม (resorption pits) บนแผ่นเนื้อฟัน ซึ่งเกิดจากการทำงานของเซลล์สลายกระดูก (แหล่งที่มาดัดแปลงจาก Supanchart และคณะ, 2012)

3.5 วิเคราะห์ผล

วิเคราะห์ผลการทดสอบความเป็นพิษของ hBDs แต่ละชนิดต่อเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สลายกระดูก โดยดูปริมาณการอยู่รอดของเซลล์เป็นร้อยละเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้น ด้วยสถิติแบบ parametric Student' *t*-test ที่ระดับความเชื่อมั่น (** $P < 0.01$) ด้วยโปรแกรมสถิติสำเร็จรูป SPSS

วิเคราะห์เปรียบเทียบทั้งจำนวนเซลล์สลายกระดูกที่ถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นจากการย้อมสี TRAcP และพื้นที่ที่เกิดหลุมระหว่างกลุ่ม hBDs ทั้งสามชนิดด้วยสถิติ non-parametric statistical analyses) คือ Kruskal-Wallis H test และ Mann-Whitney U test ที่ระดับความเชื่อมั่น (** $P < 0.05$) โดยใช้โปรแกรมสถิติสำเร็จรูป SPSS

Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

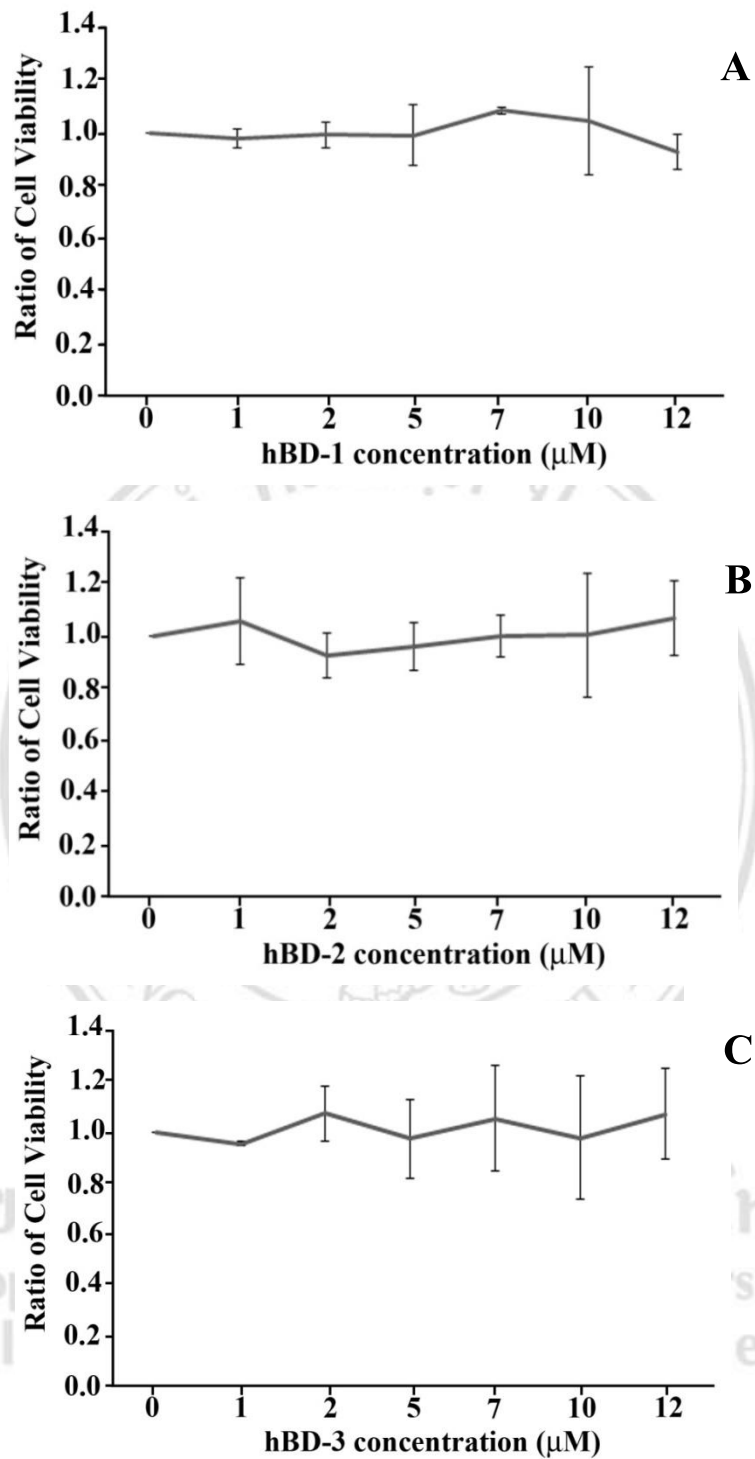
บทที่ 4

ผลการศึกษา

4.1 ผลการศึกษาคือความเป็นพิษของ hBD -1, -2 และ -3 ต่อเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สลายกระดูกด้วยวิธี MTT

ผลการทดสอบความเป็นพิษของ hBD -1, -2 และ -3 ที่จะนำมากระตุ้นเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สลายกระดูกด้วยวิธีการ MTT นั้น ได้ใช้ความเข้มข้นของ hBDs ทั้งสามชนิด ที่ความเข้มข้น 0, 1, 2, 5, 7, 10 และ 12 ไมโครโมลาร์ ซึ่งผลการทดสอบ พบว่า ความเข้มข้นของ hBD-1, -2 และ -3 ที่ความเข้มข้น 0, 1, 2, 5, 7, 10 และ 12 ไมโครโมลาร์นั้น ไม่ทำให้ความมีชีวิตของเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สลายกระดูกมีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุม แสดงว่าทุกความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ ไม่มีผลเป็นพิษต่อความมีชีวิตของเซลล์ ดังแผนภูมิ A, B และ C ในภาพที่ 4-1 จึงกล่าวได้ว่า hBD-1, -2 และ -3 ทุกความเข้มข้นที่นำมาทดสอบนั้น ไม่มีผลต่อความมีชีวิตของเซลล์ และไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วย hBDs ทดสอบด้วยสถิติ แบบ parametric Student' *t*-test ที่ระดับความเชื่อมั่น (** $P < 0.01$)

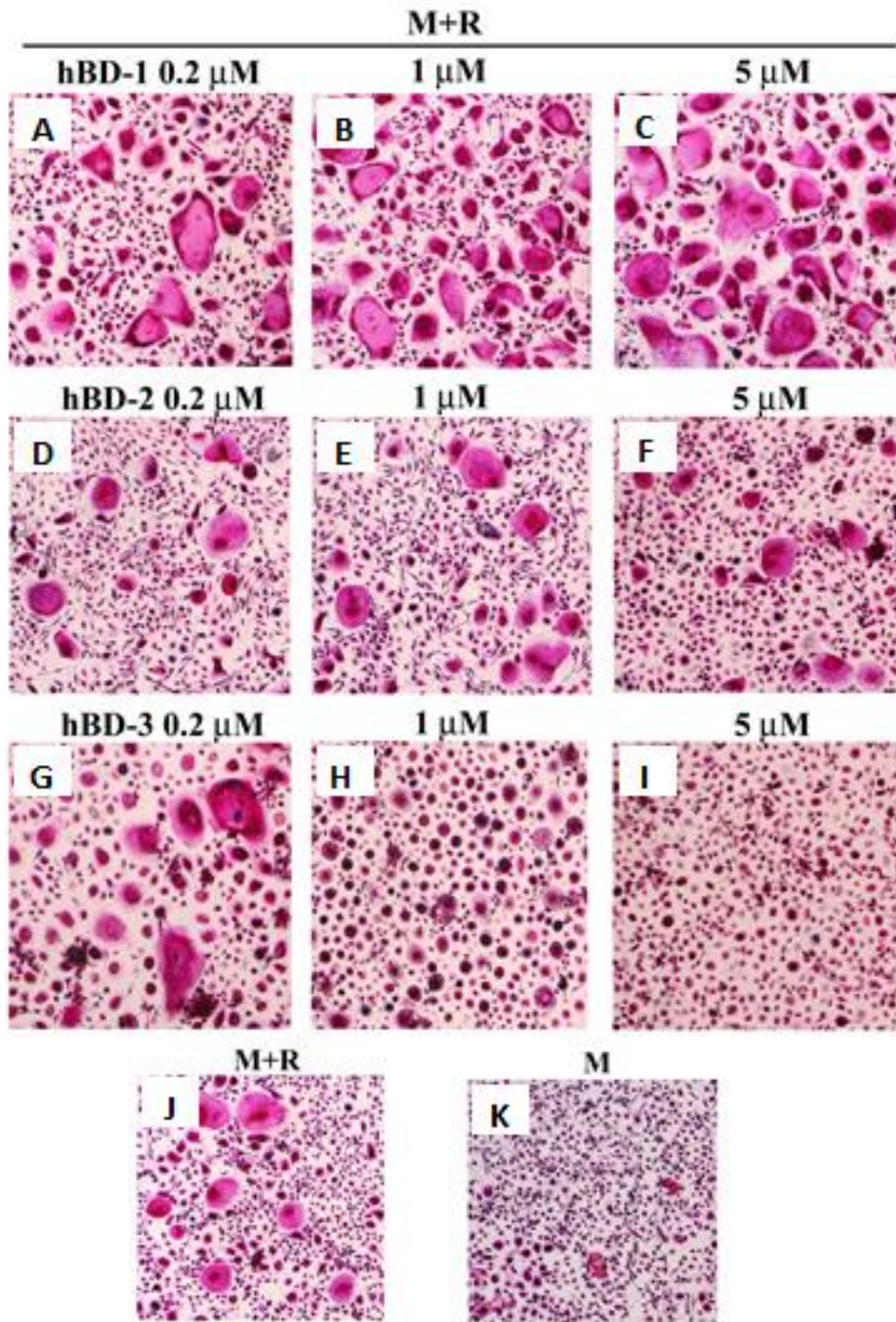
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 4-1 แสดงผลการทดสอบความเป็นพิษของ hBD-1 (A), hBD-2 (B) และ hBD-3 (C) ต่อเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สลายกระดูกด้วยวิธีการ MTT โดยใช้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 ถึง 12 ไมโครโมลาร์ (แหล่งที่มา จัดทำขึ้นเอง)

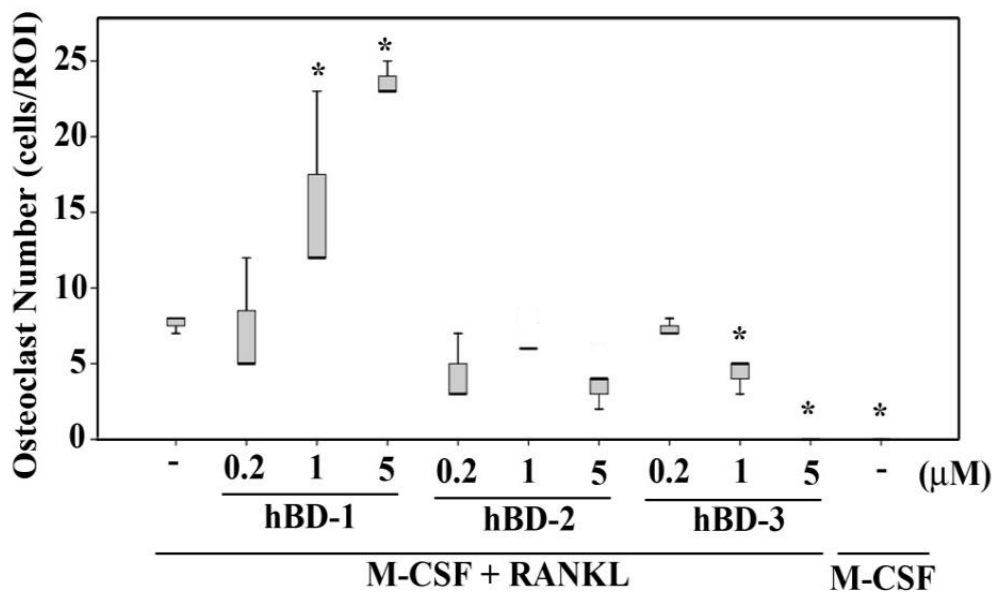
4.2 ผลการศึกษา hBD-1, -2 และ -3 ต่อการสร้างเซลล์สลายกระดูก ด้วยวิธีการย้อมสี TRAcP

จากผลการศึกษาด้วยวิธีการ MTT ที่ไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อใช้ hBD-1, -2 และ -3 ที่ระดับความเข้มข้นถึง 12 ไมโครโมลาร์ ทางผู้ทำการวิจัยได้เลือกใช้ hBD-1, -2 และ -3 ความเข้มข้น 0.2, 1 และ 5 ไมโครโมลาร์ในการศึกษาผลของ hBD แต่ละชนิด ต่อการสร้างเซลล์สลายกระดูก โดยจะพบว่า เมื่อกระตุ้นโมโนนิวเคลียร์เซลล์ด้วย M-CSF และ RANKL เพื่อให้กลายเป็นเซลล์สลายกระดูก แล้วใส่ hBD-1 นั้นจะพบการสร้างเซลล์สลายกระดูกจำนวนมาก (ภาพที่ 4-2A, 4-2B และ 4-2C) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงบวกที่ไม่ได้รับ hBD ในช่วงการกระตุ้นการสร้างเซลล์สลายกระดูก (ภาพ 4-2J) ในทางตรงข้ามเมื่อใส่ hBD-3 จะพบมีการสร้างเซลล์สลายกระดูกน้อยลง (ภาพที่ 4-2G, 4-2H และ 4-2I) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพ 4-2J) ส่วน hBD-2 จะพบการสร้างเซลล์สลายกระดูกใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 4-2D, 4-2E และ 4-2F) ดังแสดงในภาพที่ 4-2



ภาพที่ 4-2 แสดงการย้อมสี TRAcP บนเซลล์สลายกระดูกที่ได้ใส่ hBD-1 (A, B และ C), hBD-2 (D, E และ F) และ hBD-3 (G, H และ I) ในช่วงที่กระตุ้นการสร้าง กลุ่มควบคุมเชิงบวกที่ไม่ได้ใส่ hBD (J) และกลุ่มควบคุมเชิงลบที่ไม่ได้กระตุ้นการสร้างเซลล์สลายกระดูก (K) (แหล่งที่มา จัดทำขึ้นเอง)

เมื่อเปรียบเทียบทางสถิติ Kruskal-Wallis ที่ $P < 0.05$ พบว่า เมื่อความเข้มข้นของ hBD-1, -2 และ -3 เพิ่มขึ้นจะมีผลต่อกระบวนการสร้างเซลล์สลายกระดูกด้วย กล่าวคือ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ hBD-1 จาก 0.2 เป็น 1 และ 5 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ จะทำให้มีการสร้างเซลล์สลายกระดูกเพิ่มขึ้น ตัวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในทางตรงข้าม เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ hBD-3 ขึ้นกลับทำให้มีการสร้างเซลล์สลายกระดูกลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ส่วนความเข้มข้นของ hBD-2 ที่กระตุ้นเซลล์เพิ่มขึ้นนั้นจะมีผลต่อการสร้างเซลล์สลายกระดูกที่ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม ดังภาพที่ 4-3

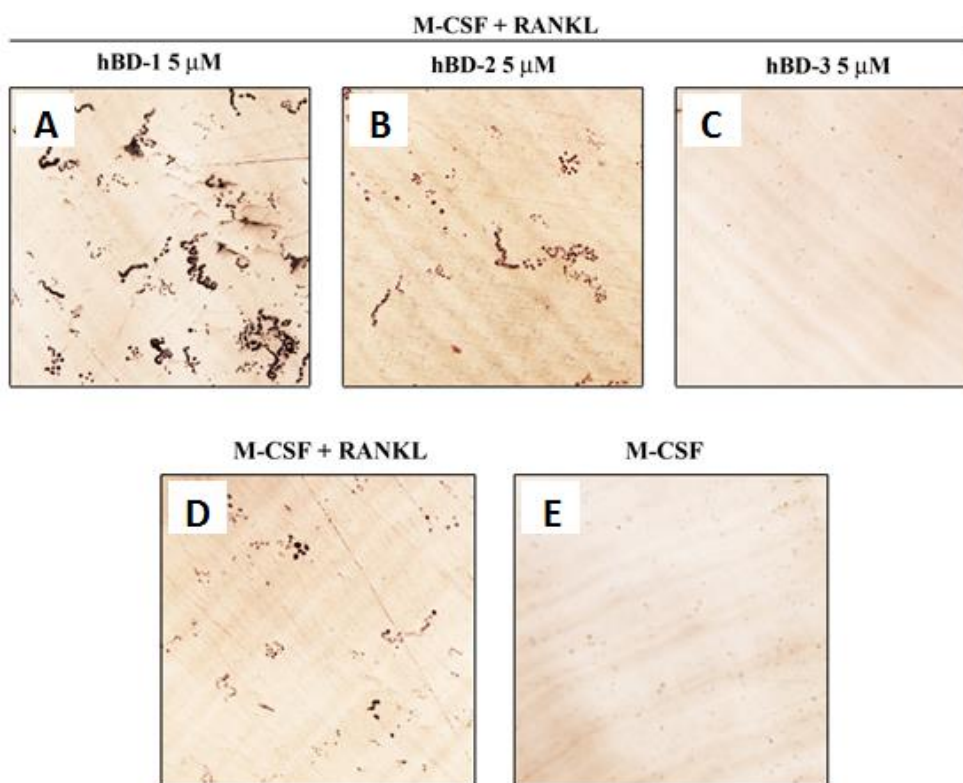


ภาพที่ 4-3 แสดงแผนภาพเปรียบเทียบจำนวนเซลล์สลายกระดูกที่ย้อมติดสี TRAcP ที่ใส่ hBD-1,-2 หรือ -3 ในช่วงกระตุ้นการสร้างเซลล์สลายกระดูก ที่ความเข้มข้น 0.2, 1 และ 5 ไมโครโมลาร์ (แหล่งที่มา จัดทำขึ้นเอง)

จากผลการศึกษาผลของ hBD-1, -2 และ -3 ต่อการสร้างเซลล์สลายกระดูกนั้น อาจกล่าวได้ว่า hBD-1 มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการสร้างเซลล์สลายกระดูก ในขณะที่ hBD-3 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างเซลล์สลายกระดูก ส่วน hBD-2 ไม่มีผลต่อการสร้างเซลล์สลายกระดูก อย่างไรก็ตามการทดลองนี้สามารถแสดงเพียงการกระตุ้นเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สลายกระดูกให้กลายเป็นเซลล์สลายกระดูก แต่ไม่ได้แสดงความสามารถของเซลล์สลายกระดูกในการทำลายกระดูก จึงมีการทดลองต่อถึงการทำงานของเซลล์สลายกระดูก

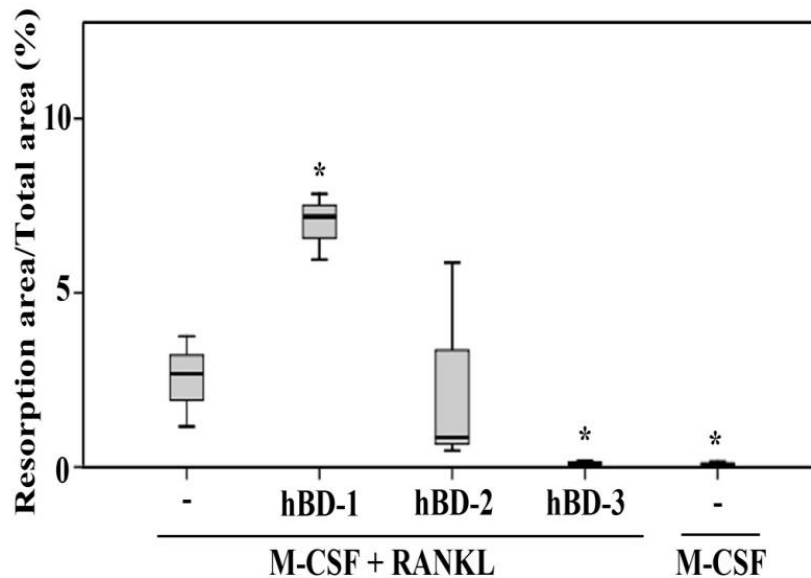
4.3 ผลการศึกษา hBD-1, -2 และ -3 ต่อการทำงานของเซลล์สลายกระดูก

การศึกษาผลของ hBD-1, -2 และ -3 ต่อการทำงานของเซลล์สลายกระดูก จะเลือกใช้ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ในการศึกษาเพื่อให้เห็นผลที่ชัดเจนขึ้น โดยลักษณะที่แสดงการทำงานของเซลล์สลายกระดูกนั้น คือ จะพบหลุม (resorption pits) บนแผ่นเนื้อฟัน โดยผลการศึกษา พบว่า แผ่นเนื้อฟันที่ใส่ hBD-1 จะเกิดหลุมจำนวนมาก (ภาพ 4-4A) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพ 4-4D) ส่วนแผ่นเนื้อฟันที่ใส่ hBD-2 จะพบหลุมจำนวนใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม (ภาพ 4-4B) ส่วน hBD-3 จะพบหลุมจำนวนน้อยมาก (ภาพ 4-4C) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงบวกที่ไม่ได้รับ hBD ในช่วงการกระตุ้นการสร้างเซลล์สลายกระดูก ดังภาพที่ 4-4



ภาพที่ 4-4 แสดงการเกิดหลุม resorption pits บนแผ่นเนื้อฟันที่เลี้ยงเซลล์สลายกระดูกที่ใส่ hBD-1 (A), hBD-2 (B) และ hBD-3 (C) ในช่วงที่กระตุ้นการสร้าง กลุ่มควบคุมเชิงบวกที่ไม่ได้ใส่ hBD (D) และกลุ่มควบคุมเชิงลบที่ไม่ได้กระตุ้นการสร้างเซลล์สลายกระดูก (E) (แหล่งที่มา จัดทำขึ้นเอง)

เมื่อเปรียบเทียบทางสถิติ Kruskal-Wallis ที่ $P < 0.05$ จะพบว่า มีการเกิดหลุมจำนวนมาก อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ บนแผ่นเนื้อฟันที่ใส่ hBD-1 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ส่วนแผ่นเนื้อฟันที่ใส่ hBD-2 จะพบหลุมจำนวนใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม และแผ่นเนื้อฟันที่ใส่ hBD-3 จะพบหลุมจำนวนน้อยมากอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงบวกที่ไม่ได้รับ hBD ในช่วงการกระตุ้น การสร้างเซลล์สลายกระดูก ดังภาพที่ 4-5



ภาพที่ 4-5 แสดงแผนภาพเปรียบเทียบจำนวนการเกิดหลุม resorption area บนแผ่นเนื้อฟันที่ใส่ hBD-1,-2 หรือ -3 ในช่วงกระตุ้นการสร้างเซลล์สลายกระดูก (แหล่งที่มา จัดทำขึ้นเอง)

การศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นถึงบทบาทของ hBD-1, -2 และ -3 ที่แตกต่างกันในการสร้างและการทำงานของเซลล์สลายกระดูก โดย hBD-1 มีผลในการกระตุ้นทั้งการสร้างและการทำงานของเซลล์สลายกระดูก ในขณะที่ hBD-3 กลับมีผลในการยับยั้งการสร้างและการทำงานของเซลล์สลายกระดูก ส่วน hBD-2 ไม่มีผลต่อทั้งการสร้างและการทำงานของเซลล์สลายกระดูก (ดังแสดงในภาพที่ 4-2 และ 4-4 ตามลำดับ)

บทที่ 5

อภิปรายผลการศึกษา

การศึกษานี้เป็นการศึกษาในห้องปฏิบัติการถึงผลของ hBD-1, -2 และ -3 ต่อการสร้างและการทำงานของเซลล์สลายกระดูก จากการทบทวนวรรณกรรมการศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของ hBDs ในเนื้อเยื่อปริทันต์มีค่อนข้างน้อยและมีความหลากหลาย โดยบางการศึกษาจะพบว่าในเนื้อเยื่อปริทันต์ของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรัง พบการแสดงออกของ hBD-2 และ hBD-3 ที่สูงกว่า hBD-1 (Dommisch และคณะ, 2005) ในขณะที่อีกการศึกษากลับพบการแสดงออกของ hBD-1 ที่สูงกว่า hBD-2 และในทางตรงข้าม ผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดก้าวร้าวกลับพบการแสดงออกของ hBD-2 ที่สูงกว่า hBD-1 (Vardar-Sengul และคณะ, 2007) นอกจากนี้ยังพบการเหนี่ยวนำให้เซลล์เยื่อบุผิวเหงือกจากผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ ให้มีการแสดงออกของ hBDs ในลักษณะที่แตกต่างกันเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยจุลินทรีย์ก่อโรคปริทันต์ที่ต่างชนิดกัน (Vankeerberghen และคณะ, 2005) ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับพยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์ที่มีหลายปัจจัยและมีเชื้อแบคทีเรียที่แตกต่างกันมาเกี่ยวข้อง (Kornman, 2008)

ผู้วิจัยเริ่มทำการศึกษาโดยเก็บเลือดจากอาสาสมัครที่มีสุขภาพแข็งแรง แล้วปั่นแยกเฉพาะส่วนของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียร์เซลล์ออกมา จากนั้นนำมาทดสอบความเป็นพิษของ hBD-1, -2 และ -3 ต่อเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สลายกระดูก เพื่อเลือกระดับความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT ผลการทดสอบพบว่าระดับความเข้มข้นของ hBD-1, -2 และ -3 ในช่วง 0-12 ไมโครโมลาร์นั้นไม่เป็นพิษต่อเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สลายกระดูก ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาอื่นที่ใช้ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0-20 ไมโครโมลาร์ เช่น ในเซลล์สร้างกระดูก เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ในมนุษย์ (human mesenchymal stem cells) เซลล์คีราติโนไซต์ (keratinocytes) ฮีลาเซลล์ (HeLa cells) เซลล์สร้างเส้นใยเหงือก หรือเซลล์เดนดริติก (dendritic cells) (Warnke และคณะ, 2013; Chotjumlong และคณะ, 2010; Harvey และคณะ, 2013)

การศึกษานี้ ผู้วิจัยใช้เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียร์เซลล์จากเลือดครบส่วนของอาสาสมัครจำนวน 3 ราย มากระตุ้นให้กลายเป็นเซลล์สลายกระดูก โดยแยกเซลล์ที่ต้องการจากชั้น

buffy coat ซึ่งชั้นดังกล่าวจะประกอบด้วยเกล็ดเลือดและเซลล์เม็ดเลือดขาวหลายชนิด ในการศึกษานี้จะใช้เฉพาะส่วนของเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียร์เซลล์มาทดสอบต่อ อย่างไรก็ตามเซลล์อื่นที่ติดมาด้วยจะไม่มีผลต่อผลการทดสอบ เนื่องจากเซลล์อื่นจะไม่ได้รับอาหารและการกระตุ้นให้เจริญเติบโต รวมถึงมีอายุที่ค่อนข้างสั้น และในการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2-3 วัน เซลล์ชนิดอื่นจะตายและหลุดลอกออกไปจากถาดเลี้ยงเซลล์ เหลือเฉพาะโมโนนิวเคลียร์เซลล์เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป และผลการศึกษาจากอาสาสมัครทั้ง 3 รายนั้น ไม่พบความแตกต่างระหว่างบุคคล โดยจากผลการศึกษาทั้งในส่วนของการกระตุ้นให้เกิดการสร้างเซลล์สลายกระดูกและการกระตุ้นการทำงานของเซลล์สลายกระดูก ให้ผลไปในทิศทางเดียวกัน

ผู้วิจัยทำการทดสอบการสร้างเซลล์สลายกระดูก โดยเริ่มจากกระตุ้นโมโนนิวเคลียร์เซลล์ให้เกิดการสร้างเซลล์สลายกระดูกด้วย M-CSF และ RANKL ร่วมกับ hBD-1, -2 หรือ -3 โดยความเข้มข้นที่เลือกใช้คือ 0.2, 1 และ 5 ไมโครโมลาร์ลงในช่วงการกระตุ้นการสร้างเซลล์สลายกระดูก จากนั้นนำไปย้อมสี TRAcP เพื่อดูการสร้างเซลล์สลายกระดูก ผลการศึกษาพบว่า เมื่อกระตุ้นการสร้างเซลล์สลายกระดูกร่วมกับ hBD-1 จะมีจำนวนของเซลล์สลายกระดูกมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ hBD-1 ขึ้น จะพบว่ามี การสร้างเซลล์สลายกระดูกเพิ่มขึ้นด้วย ในทางตรงกันข้าม เมื่อกระตุ้นการสร้างเซลล์สลายกระดูกร่วมกับ hBD-3 กลับพบว่ามี การสร้างเซลล์สลายกระดูกจำนวนน้อย และน้อยลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ hBD-3 ขึ้น และเมื่อกระตุ้นการสร้างเซลล์สลายกระดูกร่วมกับ hBD-2 นั้นกลับพบว่ามี การสร้างเซลล์สลายกระดูกใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม จากนั้นทำการทดสอบการทำงานของเซลล์สลายกระดูก โดยกระตุ้นให้เกิดการสร้างเซลล์สลายกระดูกบนแผ่นเนื้อฟันร่วมกับ hBD-1, -2 หรือ -3 ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์นาน 14 วัน แล้วนำมาย้อมหมึกดำ เพื่อดูลักษณะของหลุม (resorption pits) ที่เกิดขึ้นบนแผ่นเนื้อฟัน ซึ่งเกิดจากการทำงานของเซลล์สลายกระดูก ผลการทดสอบพบว่า เมื่อเลี้ยงเซลล์สลายกระดูกร่วมกับ hBD-1 จะพบการสร้างหลุมจำนวนมากอย่างมีนัยสำคัญ ในทางตรงกันข้ามเมื่อเลี้ยงร่วมกับ hBD-3 จะพบการสร้างหลุมจำนวนน้อยอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อเลี้ยงเซลล์สลายกระดูกร่วมกับ hBD-2 จะพบการสร้างหลุมใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม

จะเห็นได้ว่า เมื่อใส่ hBDs ต่างชนิดกัน ในช่วงการกระตุ้นการสร้างเซลล์สลายกระดูกนั้น จะกระตุ้นให้เกิดการสร้างและการทำงานของเซลล์สลายกระดูกที่แตกต่างกัน โดยเมื่อใส่ hBD-1 จะเกิดการกระตุ้นการสร้างและการทำงานของเซลล์สลายกระดูก ในขณะที่ hBD-3 จะเกิดการยับยั้งการสร้างและการทำงานของเซลล์กระดูก ส่วน hBD-2 ไม่มีผลต่อการสร้างและการทำงานของเซลล์สลายกระดูก ซึ่งสาเหตุที่เกิดการตอบสนองที่ต่างกันนั้น อาจมาจากลักษณะ โครงสร้าง ซึ่งถึงแม้จะมีโครงสร้างเป็นแบบ antiparallel beta sheet เหมือนกัน แต่มีประจุบวกรวมสุทธิ (net positive charge)

บนผิวโมเลกุลต่างกัน โดยประจุบวกรวมสุทธิบนโมเลกุลของ hBD-3 จะมากกว่า hBD-2 และ hBD-1 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบลักษณะ โครงสร้างของ hBD-2 และ hBD-3 ที่แตกต่างจาก hBD-1 โดยบน hBD-2 และ hBD-3 นั้นพบว่ามีลักษณะของ hair pin อยู่บน โมเลกุล (Schibli และคณะ, 2002) ซึ่ง ลักษณะโครงสร้างที่แตกต่างกันแม้เพียงเล็กน้อยนั้น อาจส่งผลให้เกิดการตอบสนองที่แตกต่างกันไปด้วย ดังเช่นในครอบครัวของ IL-1 ซึ่งเป็น โมเลกุลหลักในการตอบสนองต่อการอักเสบ โดยใน ครอบครัวของ IL-1 ประกอบด้วย IL-1 α และ IL-1 β ซึ่งจะจับกับ IL-1R (IL-1 receptor) นำไปสู่การตอบสนองของเซลล์ต่อไป รวมถึงยังมี IL-1RA (IL-1 receptor antagonist) ซึ่งเป็นตัวรับหลอกในการ กระตุ้น IL-1R นั้น แม้จะมีลักษณะ โครงสร้างโมเลกุลที่คล้ายกับ IL-1 α และ IL-1 β แต่เมื่อ IL-1RA ไปจับกับ IL-1R จะไม่ทำให้เกิดการตอบสนองขึ้น (Boch และคณะ, 2001)

จากผลการศึกษาที่พบว่า hBD-1 สามารถกระตุ้นการสร้างและการทำหน้าที่ของเซลล์สลาย กระดูกและเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ hBD-1 จะพบการสร้างเซลล์สลายกระดูกเพิ่มมากขึ้นด้วย ซึ่งหาก พิจารณาถึงระดับของ hBD-1 ในเนื้อเยื่อเหงือกของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรังจะมีการ แสดงออกของ hBD-1 ที่สูงกว่าในเนื้อเยื่อปริทันต์ที่ไม่เป็น โรค (Vardar-Sengul และคณะ, 2007) และ พบว่า ในเนื้อเยื่อน้ำเหลืองเหงือกจากบริเวณที่เกิดการอักเสบรอบรากฟันเทียมจะมีการแสดงออก ของ hBD-1 ที่สูงกว่าบริเวณที่ไม่เป็น โรคด้วย (Kuula และคณะ, 2008; Ertugrul และคณะ, 2014) และ เมื่อพิจารณาระดับของ hBD-1 ในแง่ของผลกระทบทางระบบ จะพบว่า ระดับของ hBD-1 ในซีรัมจะ เพิ่มสูงขึ้นในผู้ป่วยโรคตับแข็ง (cirrhosis) (Kaltsa และคณะ, 2016) และมีการแสดงออกที่มากขึ้นใน ผู้ป่วย SLE (Systemic Lupus Erythematosus) (Vordenbaumen และ Schneider, 2011) ยิ่งไปกว่านั้น การแสดงออกของ hBD-1 ในเซลล์เยื่อบุผิวเหงือก จะเพิ่มขึ้นเมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วยจุลินทรีย์ก่อ โรคปริทันต์บางชนิด (Vankeerberghen และคณะ, 2005) นั่นอาจบ่งชี้ว่า hBD-1 น่าจะมีกลไกหรือบทบาท บางอย่างที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการสร้างเซลล์สลายกระดูก ส่งผลให้เกิดการทำลายอวัยวะปริทันต์ ตามมา

ผลการศึกษาที่ยังแสดงให้เห็นถึงบทบาทที่น่าสนใจของ hBD-3 ที่มีผลยับยั้งทั้งการสร้างและ การทำงานของเซลล์สลายกระดูก ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้เกี่ยวกับผลของ hBD-3 ร่วมกับ LL-37 ในการยับยั้งการสร้างและหลั่งไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น IL-6, IL-8 ใน co-culture model ของเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกและเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก (Bedran และคณะ, 2014) นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาที่พบว่า hBD-3 จะมีการแสดงออกในเนื้อเยื่อเหงือกที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ ในระดับที่ต่ำกว่าเนื้อเยื่อเหงือกที่ไม่เป็น โรค (Bissell และคณะ, 2004; Brancatisano และคณะ, 2011) และเมื่อทำการรักษาทางปริทันต์แล้วจะพบว่าระดับของ hBD-3 จะมีระดับสูงขึ้นใกล้เคียงกับเนื้อเยื่อที่ ไม่เป็น โรคอีกด้วย (Ebrahim, 2013) จึงอาจกล่าวได้ว่า hBD-3 เป็น โมเลกุลที่มีความสำคัญในการ

ป้องกันหรือการคงสภาพของอวัยวะปริทันต์ ซึ่งสาเหตุหรือกลไกที่แน่ชัดนั้นยังไม่ทราบในปัจจุบัน ซึ่งจากการศึกษาของ Supanchart และคณะ ที่พบว่า LL-37 มีคุณสมบัติในการยับยั้งการสร้างและการทำงานของเซลล์สลายกระดูก เช่นเดียวกับ hBD-3 โดย LL-37 จะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แคลซิวินริน ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ฟอสฟาเตสเพื่อดึงเอากลุ่มฟอสเฟตออกจาก NFATc1 (nuclear factor of activated T-cells 1) ซึ่งเป็นทรานสคริปชัน แฟกเตอร์หลักที่กระตุ้นการสร้างเซลล์สลายกระดูก เคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียสได้ เมื่อเกิดการยับยั้งดังกล่าวทำให้ NFATc1 ไม่สามารถเข้าไปในนิวเคลียสเพื่อกระตุ้นการแสดงออกของยีนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเซลล์สลายกระดูก ทำให้เซลล์ต้นกำเนิดไม่เกิดการแปรสภาพไปเป็นเซลล์สลายกระดูกได้ (Supanchart และคณะ, 2012) จึงอาจเป็นไปได้ว่า กลไกที่เกิดขึ้นในการศึกษานี้ อาจคล้ายคลึงกับกลไกที่เกิดขึ้นในการศึกษาดังกล่าว เนื่องจาก LL-37 และ hBD-3 เป็นเปปไทด์ด้านจุลชีพที่พบในช่องปากเหมือนกัน และมีรูปแบบการศึกษาที่คล้ายกัน

ที่น่าสนใจคือ จากการศึกษาของ Chotjumlong และคณะ ที่กลับพบว่า hBD-3 น่าจะมีบทบาทสำคัญในการดำเนินโรคของโรคปริทันต์อักเสบ เนื่องจาก hBD-3 มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการแสดงออกของ cyclooxygenase-2 (COX-2) และ prostaglandin E₂ (PGE₂) จากเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกในห้องปฏิบัติการ (Chotjumlong และคณะ, 2010) และอีกการศึกษาที่พบว่าระดับของ hBD-3 นั้นเพิ่มมากขึ้นในผู้ป่วยที่มีการอักเสบที่เยื่อข้อ (synovial membrane) (Paulsen และคณะ, 2002) แสดงให้เห็นว่า hBD-3 น่าจะเป็นอีกโมเลกุลที่สำคัญในกระบวนการอักเสบทั้งในช่องปากและบริเวณอื่นในร่างกาย ดังนั้นหากมีการศึกษาเชิงลึกถึงกลไกของ hBD-1, 2 และ 3 ที่มีบทบาทต่างๆ กันในกระบวนการสร้างและการทำงานของเซลล์สลายกระดูก น่าจะทำให้เข้าใจในพยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์อักเสบได้ดียิ่งขึ้น

อย่างไรก็ตามการศึกษานี้เป็นการศึกษาในห้องปฏิบัติการ ทำให้ไม่สามารถนำมาผลการศึกษาที่ได้ไปใช้อธิบายการทำงานของ hBDs ในเนื้อเยื่อปริทันต์ได้โดยสมบูรณ์ แต่น่าจะมีประโยชน์อย่างมาก หากมีการศึกษาในอนาคตที่จะสามารถต่อยอดเพื่อพัฒนาตัวยับยั้งหรือควบคุมการทำงานของเซลล์สลายกระดูก เพื่อลดการทำลายกระดูกในเนื้อเยื่อปริทันต์ต่อไป

บทที่ 6

สรุปผลการศึกษา

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาในห้องปฏิบัติการถึงผลของ hBD-1, -2 และ -3 ต่อการสร้างและการทำงานของเซลล์สลายกระดูก โดยใส่ hBD-1, -2 หรือ -3 ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ลงไปในช่วงการกระตุ้นให้เกิดการสร้างเซลล์สลายกระดูกในห้องปฏิบัติการ เพื่อศึกษาการสร้างและการทำงานของเซลล์สลายกระดูก ผลการศึกษาพบว่า hBD-1 มีผลในการกระตุ้นการสร้างและการทำงานของเซลล์สลายกระดูก ในทางตรงกันข้าม hBD-3 มีผลในการยับยั้งการสร้างและการทำงานของเซลล์สลายกระดูก ส่วน hBD-2 ไม่มีผลต่อการสร้างและการทำงานของเซลล์สลายกระดูก

ผลของการศึกษานี้ทำให้ทราบว่า hBD-1, -2 และ -3 ซึ่งเป็นเปปไทด์ต้านจุลชีพที่พบภายในช่องปาก น่าจะมีบทบาทที่สำคัญต่อการเกิดโรคปริทันต์อักเสบ โดยเฉพาะ hBD-1 ซึ่งพบว่ามีฤทธิ์ในการกระตุ้นการสร้างเซลล์สลายกระดูก อาจนำไปสู่การทำลายของอวัยวะปริทันต์ที่รุนแรงขึ้น ในทางตรงกันข้าม hBD-3 ที่พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างเซลล์สลายกระดูก อาจมีส่วนในการช่วยป้องกันการทำลายของอวัยวะปริทันต์ได้ ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับเปปไทด์ต้านจุลชีพ hBD-1, -2 และ -3 ในอนาคตน่าจะมีส่วนช่วยให้เข้าใจถึงบทบาทของเปปไทด์ต้านจุลชีพ hBD-1, -2 และ -3 ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดโรคปริทันต์ และอาจนำไปสู่การพัฒนาตัวยับยั้ง hBD-1 หรือตัวกระตุ้น hBD-3 เพื่อช่วยป้องกันการเกิดหรือการลุกลามของโรคปริทันต์ได้

Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เอกสารอ้างอิง

- [1] กองทันตสาธารณสุข, กรมอนามัย, กระทรวงสาธารณสุข. รายงานสรุปการสำรวจสภาวะสุขภาพช่องปากระดับประเทศ ครั้งที่ 7. ประเทศไทย พ.ศ. 2555. 2556.
- [2] สุทธิชัย กฤษณะประกรกิจ. เพปไทด์ต้านจุลชีพ: โมเลกุลที่ออกฤทธิ์ในภูมิคุ้มกันบริเวณเยื่อเมือกและผิวหนัง. พิมพ์ครั้งที่ 1. เชียงใหม่: ห้างหุ้นส่วนจำกัดเชียงใหม่โรงพิมพ์แสงศิลป์, 2553.
- [3] สุทธิชัย กฤษณะประกรกิจ และคณะ. พยาธิวิทยาภูมิคุ้มกันของโรคปริทันต์. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2557 พิมพ์ครั้งที่ 1; 291.
- [4] Abiko Y, Saitoh M, Nishimura M, Yamazaki M, Sawamura D, Kaku T. Role of beta-defensins in oral epithelial health and disease. *Med Mol Morphol*. 2007; 40(4):179-84.
- [5] Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*. 1999; 4(1): 1-6.
- [6] Bedran TB, Mayer MP, Spolidorio DP, Grenier D. Synergistic anti-inflammatory activity of the antimicrobial peptides human beta-defensin-3 (hBD-3) and cathelicidin (LL-37) in a three-dimensional co-culture model of gingival epithelial cells and fibroblasts. *PLoS One*. 2014; 9(9):e106766.
- [7] Bissell J, Joly S, Johnson GK, Organ CC, Dawson D, McCray PB Jr, Guthmiller JM. Expression of beta-defensins in gingival health and in periodontal disease. *J Oral Pathol Med*. 2004; 33(5):278-85.
- [8] Boch JA, Wara-aswapati N, Auron PE. Interleukin 1 signal transduction—current concepts and relevance to periodontitis. *J Dent Res*. 200; 80: 400-7.
- [9] Bostanci N, Ilgenli T, Emingil G, Afacan B, Han B, Töz H, Atilla G, Hughes FJ, Belibasakis GN. Gingival crevicular fluid levels of RANKL and OPG in periodontal diseases: implications of their relative ratio. *J Clin Periodontol*. 2007; 34(5):370-6.
- [10] Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003; 423(6937):337-42.

- [11] Brancatisano FL, Maisetta G, Barsotti F, Esin S, Miceli M, Gabriele M, Giuca MR, Campa M, Batoni G. Reduced human beta defensin 3 in individuals with periodontal disease. *J Dent Res*. 2011; 90(2):241-5.
- [12] Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS. osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev*. 1998; 12(9):1260-8.
- [13] Chotjumlong P, Khongkhunthian S, Ongchai S, Reutrakul V, Krisanaprakornkit S. Human beta-defensin-3 up-regulates cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 synthesis in human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res*. 2010; 45(4):464-70.
- [14] Cochran DL. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J Periodontol*. 2008; 79(8 Suppl), 1569-76.
- [15] Crotti T, Smith MD, Hirsch R, Soukoulis S, Weedon H, Capone M, Ahern MJ, Haynes D. Receptor activator NF kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. *J Periodontal Res*. 2003; 38(4):380-7.
- [16] Dale BA. Periodontal epithelium: a newly recognized role in health and disease. *Periodontol 2000* 2002; 30: 70–78.
- [17] Dale BA, Fredericks LP. Antimicrobial peptides in the oral environment: expression and function in health and disease. *Curr Issues Mol Biol* 2005; 7: 119-133.
- [18] Dale BA, Kimball JR, Krisanaprakornkit S, et al. Localized antimicrobial peptide expression human gingival. *J Periodontal Res* 2001; 36: 285-294.
- [19] Dentino A, Lee S, Mailhot J, Hefti AF. Principles of periodontology. *Periodontol* 2000. 2013; 61(1):16-53.
- [20] Diamond G, Beckloff N, Weinberg A, Kisich KO. The roles of antimicrobial peptides in innate host defense. *Curr Pharm Des*. 2009; 15(21):2377-92.
- [21] Diamond DL, Kimball JR, Krisanaprakornkit S, Ganz T, Dale BA. Detection of beta-defensins secreted by human oral epithelial cells. *J Immunol Methods*. 2001; 256(1-2):65-76.

- [22] Dommisch H, Açil Y, Dunsche A, Winter J, Jepsen S. Differential gene expression of human beta-defensins (hBD-1, -2, -3) in inflammatory gingival diseases. *Oral Microbiol Immunol.* 2005; 20(3):186-90.
- [23] Dougall WC, Glaccum M, Charrier K, Rohrbach K, Brasel K, De Smedt T, Daro E, Smith J, Tometsko ME, Maliszewski CR, Armstrong A, Shen V, Bain S, Cosman D, Anderson D, Morrissey PJ, Peschon JJ, Schuh J. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev.* 1999; 13(18):2412-24.
- [24] Ebrahim MA. Expression of human beta defensins (HBDs) 1, 2 and 3 in gingival crevicular fluid of patients affected by localized aggressive periodontitis. *Saudi Dent J.* 2013; 25(2): 75-82.
- [25] Ertugrul AS, Tekin Y, Alpaslan NZ, Bozoglan A, Sahin H, Dikilitas A. Comparison of peri-implant crevicular fluid levels of adrenomedullin and human beta defensins 1 and 2 from mandibular implants with different implant stability quotient levels in nonsmoker patients. *J Periodontal Res.* 2014; 49(4):480-8.
- [26] Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3(9):710-20.
- [27] Gorr SU, Abdolhosseini M. Antimicrobial peptides and periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2011; 38: 126-141.
- [28] Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM. Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem.* 2001; 276(8):5707-13.
- [29] Harvey LE, Kohlgraf KG, Mehalick LA, Raina M, Recker EN, Radhakrishnan S, Prasad SA, Vidva R, Progulske-Fox A, Cavanaugh JE, Vali S, Brogden KA. Defensin DEFB103 bidirectionally regulates chemokine and cytokine responses to a pro-inflammatory stimulus. *Sci Rep.* 2013;3:1232.
- [30] Jenssen H, Hamill P, Hancock RE. Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19: 491-511.

- [31] Jimi E, Nakamura I, Amano H, Taguchi Y, Tsurukai T, Tamura M, Takahashi N, Suda T. Osteoclast function is activated by osteoblastic cells through a mechanism involving cell-to-cell contact. *Endocrinology*. 1996; 137(8):2187-90.
- [32] Kaltsa G, Bamias G, Siakavellas SI, Goukos D, Karagiannakis D, Zampeli E, Vlachogiannakos J, Michopoulos S, Vafiadi I, Daikos GL, Ladas SD. Systemic levels of human β -defensin 1 are elevated in patients with cirrhosis. *Ann Gastroenterol*. 2016; 29: 63-70.
- [33] Kornman KS. Mapping the pathogenesis of periodontitis: a new look. *J Periodontol*. 2008; 79(8 Suppl): 1560-8.
- [34] Krisanaprakornkit S, Weinberg A, Perez CN, Dale BA. Expression of the peptide antibiotic human beta-defensin 1 in cultured gingival epithelial cells and gingival tissue. *Infect Immun*. 1998; 66(9):4222-8.
- [35] Kuula H, Salo T, Pirilä E, Hagström J, Luomanen M, Gutierrez-Fernandez A, Romanos GE, Sorsa T. Human beta-defensin-1 and -2 and matrix metalloproteinase-25 and -26 expression in chronic and aggressive periodontitis and in peri-implantitis. *Arch Oral Biol*. 2008; 53(2):175-86.
- [36] Lindhe J, Liljenberg B, Listgarten M. Some microbiological and histopathological features of periodontal disease in man. *J Periodontol*. 1980; 51(5):264-9.
- [37] Lu Q, Samaranayake LP, Darveau RP, Jin L. Expression of human beta-defensin-3 in gingival epithelia. *J Periodontal Res*. 2005; 40(6):474-81.
- [38] Mathews M, Jia HP, Guthmiller JM, Losh G, Graham S, Johnson GK, Tack BF, McCray PB Jr. Production of beta-defensin antimicrobial peptides by the oral mucosa and salivary glands. *Infect Immun*. 1999; 67(6):2740-5.
- [39] Menendez A and Finlay BB. Defensins in the immunology of bacterial infections. *Curr Opin Immunol* 2007; 19: 385-391.
- [40] Newman MG. Classification and epidemiology of periodontal diseases. In: Carranza's clinical periodontology, 9th edition. Philadelphia; W.B. Saunders company; 2002: p. 64-73.

- [41] Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000*. 1997; 14:9-11.
- [42] Paulsen F, Pufe T, Conradi L, Varoga D, Tsokos M, Papendieck J, Petersen W. Antimicrobial peptides are expressed and produced in healthy and inflamed human synovial membranes. *J Pathol*. 2002; 198: 369-77.
- [43] Roodman GD. Regulation of osteoclast differentiation. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1068: 100-109.
- [44] Schibli DJ, Hunter HN, Aseyev V, Starner TD, Wiencek JM, McCray PB Jr, Tack BF, Vogel HJ. The solution structures of the human beta-defensins lead to a better understanding of the potent bactericidal activity of HBD3 against *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem*. 2002; 277(10): 8279-89.
- [45] Schwartz Z, Goultchin J, Dean DD, Boyan BD. Mechanisms of alveolar bone destruction in periodontitis. *Periodontol 2000*. 1997; 14, 158-72.
- [46] Selsted ME, Harwig SS, Ganz T, Schilling JW, Lehrer RI. Primary structures of three human neutrophil defensins. *J Clin Invest* 1985; 76: 1436-1439.
- [47] Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 1997; 89(2):309-19.
- [48] Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol*. 1992; 63(4 Suppl):322-31.
- [49] Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998; 25(2):134-44.
- [50] Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev*. 1999; 20(3):345-57.

- [51] Supanchart C, Thawanaphong S, Makeudom A, Bolscher JG, Nazmi K, Kornak U, Krisanaprakornkit S. The antimicrobial peptide, LL-37, inhibits in vitro osteoclastogenesis. *J Dent Res.* 2012; 91(11):1071-7.
- [52] Tao R, Jurevic RJ, Coulton KK, Tsutsui MT, Roberts MC, Kimball JR, Wells N, Berndt J, Dale BA. Salivary antimicrobial peptide expression and dental caries experience in children. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(9):3883-8.
- [53] Teles RP, Haffajee AD, Socransky SS. Microbiological goals of periodontal therapy. *Periodontol 2000.* 2006;42:180-218.
- [54] Vankeerberghen A, Nuytten H, Dierickx K, Quirynen M, Cassiman JJ, Cuppens H. Differential induction of human beta-defensin expression by periodontal commensals and pathogens in periodontal pocket epithelial cells. *J Periodontol* 2005; 76: 1293-1303.
- [55] Vardar-Sengul S, Demirci T, Sen BH, Erkizan V, Kurulgan E, Baylas H. Human beta defensin-1 and -2 expression in the gingiva of patients with specific periodontal diseases. *J Periodontal Res.* 2007; 42(5):429-37.
- [56] Vordenbäumen S and Schneider M. Defensins: Potential effectors in autoimmune rheumatic disorders. *Polymers.* 2011, 3, 1268-1281.
- [57] Wang P, Duan D, Zhou X, Li X, Yang J, Deng M, Xu Y. Relationship between expression of human gingival beta-defensins and levels of periodontopathogens in subgingival plaque. *J Periodontal Res.* 2015; 50(1):113-22.
- [58] Warnke PH, Voss E, Russo PA, Stephens S, Kleine M, Terheyden H, Liu Q. Antimicrobial peptide coating of dental implants: biocompatibility assessment of recombinant human beta defensin-2 for human cells. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2013; 28(4):982-8.
- [59] Weinberg A, Krisanaprakornkit S, Dale BA. Epithelial antimicrobial peptides: review and significance for oral applications. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998; 9(4):399-414.
- [60] Whyte MP, Obrecht SE, Finnegan PM, Jones JL, Podgornik MN, McAlister WH, Mumm S. Osteoprotegerin deficiency and juvenile Paget's disease. *N Engl J Med.* 2002; 347(3):175-84.

- [61] Yamaguchi Y, Nagase T, Makita R, Fukuhara S, Tomita T, Tominaga T, Kurihara H, Ouchi Y. Identification of multiple novel epididymis-specific beta-defensin isoforms in humans and mice. *J Immunol.* 2002; 169(5):2516-23.
- [62] Yoshida H, Hayashi S, Kunisada T, Ogawa M, Nishikawa S, Okamura H, Sudo T, Shultz LD, Nishikawa S. The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature.* 1990; 345(6274):442-4.
- [63] Zaiou M, Nizet V, Gallo RL. Antimicrobial and protease inhibitory functions of the human cathelicidin (hCAP18/LL-37) prosequence. *J Invest Dermatol.* 2003; 120(5):810-6.
- [64] Zanetti M. Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. *J Leukoc Biol* 2004; 75: 39-48.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ก

เอกสารคำแนะนำหรือแจ้งข้อมูลแก่ผู้ถูกวิจัยหรือผู้อนุญาต (Patient or Subject Information Sheet)

เรียน อาสาสมัครทุกท่าน

การศึกษาเรื่อง ผลของฮิวแมนบีตา-ดีเฟนซิน-1, -2 และ -3 ต่อการสร้างเซลล์สลายกระดูก นี้เป็นการศึกษาในห้องปฏิบัติการเพื่อศึกษาผลของฮิวแมนบีตา-ดีเฟนซิน-1, -2 และ -3 ต่อการสร้างและการทำงานของเซลล์สลายกระดูก โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) ศึกษาความเป็นพิษของบีตา-ดีเฟนซิน-1, -2 และ -3 ต่อเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สลายกระดูก 2) ศึกษาผลของบีตา-ดีเฟนซิน-1, -2 และ -3 ต่อการสร้างเซลล์สลายกระดูก 3) ศึกษาผลของบีตา-ดีเฟนซิน-1, -2 และ -3 ต่อการทำหน้าที่ของเซลล์สลายกระดูก

อาสาสมัครทุกท่านจะได้รับการเจาะเลือด 10 มิลลิลิตร โดยผู้เชี่ยวชาญ เพื่อนำมาใช้ในการศึกษาต่อไป โดยอาสาสมัครจะต้องมีสุขภาพแข็งแรง ไม่มีโรคประจำตัวเกี่ยวกับการอักเสบและการทำลายของกระดูก ไม่มีประวัติเป็นโรคปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรังและกำเริบ ท่านจะได้รับค่าตอบแทนอาสาสมัครคนละ 200 บาท


ข้อมูลส่วนตัวของท่านจะถูกปกปิดเป็นความลับ โดยไม่มีการเปิดเผยชื่อแต่อย่างใด ท่านสามารถบอกเลิกการเข้าร่วมในโครงการนี้ได้ทุกเมื่อถ้าท่านมีความประสงค์ โดยที่ไม่เกิดผลกระทบใดๆ ต่อการรักษาที่ท่านพึงได้รับจากคณะทันตแพทยศาสตร์ รวมทั้งการรักษาที่ยังคงต่อเนื่องอยู่

หากท่านมีข้อสงสัย หรือต้องการติดต่อผู้ทำวิจัย สามารถติดต่อได้ที่ ศ. ทพ. ดร. สุทธิชัย กฤษณะประกรกิจ ภาควิชาชีววิทยาช่องปากและวิทยาการวินิจฉัยโรคช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในเวลาราชการ โทร 053 944451 นอกเวลาราชการ โทร 081 671 3704

(ศ. ทพ. ดร. สุทธิชัย กฤษณะประกรกิจ)

ภาคผนวก ข

เอกสารรับรองโครงการศึกษาวิจัย



NO. 33 / 2010

CERTIFICATE OF ETHICAL CLEARANCE

**Human Experimentation Committee
Faculty of dentistry
Chiang Mai University
Chiang Mai, Thailand**

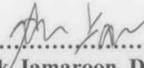
Title of project or study : The Role of Antimicrobial Peptides in the Pathogenesis of Periodontal Disease: A New Concept

Principal Investigator : Sakornratana Khongkhunthian

Participating Institution (S) : Faculty of Dentistry
Chiang Mai University
Chiang Mai, Thailand

Approved by the Faculty of Dentistry Human Experimentation Committee : November ๒๕ , 2010

Signature of the Chairman of the Committee :


.....
(Anak Iamaroon ,D.D.S.,M.S.,Ph.D.)

Countersigned :

T. Kumchai
.....
(Thongnard Kumchai , D.D.S.)
Dean ; Faculty of Dentistry

ภาคผนวก ค

ตารางการคำนวณทางสถิติเปรียบเทียบความมีชีวิตของเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์
สลายกระดูก การสร้างเซลล์สลายกระดูก และการทำงานของเซลล์สลายกระดูก
การเปรียบเทียบความมีชีวิตของเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สลายกระดูก

เปรียบเทียบความมีชีวิตของเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สลายกระดูกต่อ hBD-1 ของตัวอย่าง A, B
และ C ดังตารางและแผนภูมิ

| Conc. ($\mu\text{g/ml}$) | Viability | | | Mean | SD | SE |
|-------------------------------|-----------|-----|-----|------------|----|----|
| | A | B | C | | | |
| 0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 0 | 0 |
| 5 | 94 | 101 | 97 | 98 | 4 | 1 |
| 10 | 98 | 95 | 104 | 99 | 5 | 2 |
| 20 | 110 | 100 | 87 | 99 | 12 | 4 |
| 30 | 110 | 108 | 107 | 108 | 1 | 0 |
| 40 | 108 | 122 | 82 | 104 | 20 | 7 |
| 50 | 87 | 91 | 100 | 93 | 7 | 2 |

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เปรียบเทียบความมีชีวิตของเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สลายกระดูกต่อ hBD-2 ของตัวอย่าง A, B และ C ดังตารางและแผนภูมิ

| Conc. ($\mu\text{g/ml}$) | Viability | | | Mean | SD | SE |
|-------------------------------|-----------|-----|-----|------------|----|----|
| | A | B | C | | | |
| 0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 0 | 0 |
| 5 | 94 | 125 | 98 | 106 | 17 | 6 |
| 10 | 97 | 98 | 82 | 92 | 9 | 3 |
| 20 | 91 | 107 | 91 | 96 | 9 | 3 |
| 30 | 106 | 103 | 91 | 100 | 8 | 3 |
| 40 | 100 | 124 | 77 | 100 | 24 | 8 |
| 50 | 108 | 121 | 92 | 107 | 14 | 5 |

เปรียบเทียบความมีชีวิตของเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สลายกระดูกต่อ hBD-3 ของตัวอย่าง A, B และ C ดังตารางและแผนภูมิ

| Conc. ($\mu\text{g/ml}$) | Viability | | | Mean | SD | SE |
|-------------------------------|-----------|-----|-----|------------|----|----|
| | A | B | C | | | |
| 0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 0 | 0 |
| 5 | 94 | 96 | 96 | 95 | 1 | 0 |
| 10 | 117 | 96 | 108 | 107 | 11 | 4 |
| 20 | 115 | 90 | 87 | 97 | 16 | 5 |
| 30 | 122 | 82 | 112 | 105 | 21 | 7 |
| 40 | 126 | 80 | 88 | 98 | 25 | 8 |
| 50 | 127 | 101 | 93 | 107 | 18 | 6 |

การเปรียบเทียบการสร้างเซลล์สลายกระดูก

เปรียบเทียบการสร้างเซลล์สลายกระดูกต่อ hBD-1 ของตัวอย่าง A, B และ C ดังตาราง

| Sample | M-CSF | M-CSF+RANKL | M-CSF + RANKL + hBD-1 | | |
|-------------|----------|-------------|-----------------------|-----------------|-----------------|
| | | | 0.2 μ M hBD-1 | 1 μ M hBD-1 | 5 μ M hBD-1 |
| A | 0 | 8 | 5 | 12 | 23 |
| B | 0 | 7 | 12 | 23 | 25 |
| C | 0 | 8 | 5 | 12 | 23 |
| Mean | 0 | 8 | 7 | 16 | 24 |
| SD | 0 | 0 | 4 | 7 | 1 |
| SE | 0 | 0 | 2 | 4 | 1 |

เปรียบเทียบการสร้างเซลล์สลายกระดูกต่อ hBD-2 ของตัวอย่าง A, B และ C ดังตาราง

| Sample | M-CSF | M-CSF+RANKL | M-CSF + RANKL + hBD-2 | | |
|-------------|----------|-------------|-----------------------|-----------------|-----------------|
| | | | 0.2 μ M hBD-2 | 1 μ M hBD-2 | 5 μ M hBD-2 |
| A | 0 | 8 | 3 | 6 | 4 |
| B | 0 | 7 | 7 | 6 | 2 |
| C | 0 | 8 | 3 | 6 | 4 |
| Mean | 0 | 8 | 4 | 6 | 3 |
| SD | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 |
| SE | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |

เปรียบเทียบการสร้างเซลล์สลายกระดูกต่อ hBD-3 ของตัวอย่าง A, B และ C ดังตาราง

| Sample | M-CSF | M-CSF+RANKL | M-CSF + RANKL + hBD-3 | | |
|-------------|----------|-------------|-----------------------|-----------------|-----------------|
| | | | 0.2 μ M hBD-3 | 1 μ M hBD-3 | 5 μ M hBD-3 |
| A | 0 | 8 | 7 | 5 | 0 |
| B | 0 | 7 | 8 | 3 | 0 |
| C | 0 | 8 | 7 | 5 | 0 |
| Mean | 0 | 8 | 7 | 4 | 0 |
| SD | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| SE | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 Copyright© by Chiang Mai University
 All rights reserved

การเปรียบเทียบการทำงานของเซลล์สลายกระดูก

เปรียบเทียบการทำงานของเซลล์สลายกระดูกด้วยการนับจำนวนหลุมที่เกิดขึ้น เมื่อใส่ hBD-1, -2 และ -3 ของตัวอย่าง A, B และ C ดังตาราง

| Sample | Percent Resorption Area | | | | |
|-------------|-------------------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| | M-CSF | M+R | M+R+hBD-1 | M+R+hBD-2 | M+R+hBD-3 |
| A | 0.16 | 1.16 | 5.95 | 0.85 | 0.04 |
| B | 0.07 | 3.75 | 7.84 | 5.87 | 0.17 |
| C | 0.00 | 2.67 | 7.18 | 0.47 | 0.09 |
| Mean | 0.07 | 2.53 | 6.99 | 2.39 | 0.1 |
| SD | 0.08 | 1.3 | 0.96 | 3.01 | 0.07 |
| SE | 0.04 | 0.75 | 0.55 | 1.74 | 0.04 |

ประวัติผู้เขียน

| | |
|------------------|---|
| ชื่อ-สกุล | นายธนภัทร ศรีโพนทอง |
| วัน เดือน ปีเกิด | 13 กรกฎาคม 2530 |
| ประวัติการศึกษา | ปีการศึกษา 2553 ทันตแพทยศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น |
| ประวัติการทำงาน | พ.ศ. 2553 – ปัจจุบัน ทำงานตำแหน่งทันตแพทย์ทั่วไป คลินิกผู้ป่วยนอก โรงพยาบาลทันตกรรม คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น |



สงวนลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved