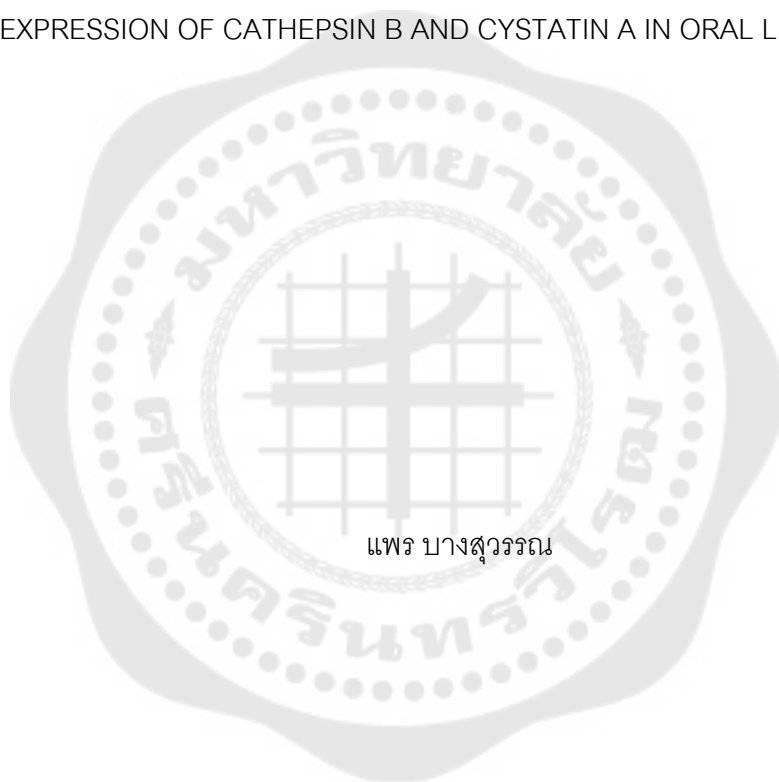




การแสดงออกของคาเทปซิน บี และ ซีสแตทิน เอ ในรอยโรคไลเคนแพลานัสในช่องปาก
THE EXPRESSION OF CATHEPSIN B AND CYSTATIN A IN ORAL LICHEN PLANUS



แพรว บางสุวรรณ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2563

การแสดงออกของคาเทปซิน บี และ ซีสเตทิน เอ ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการช่องปากและแม็กซิลโลเฟเชียล
คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2563
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

THE EXPRESSION OF CATHEPSIN B AND CYSTATIN A IN ORAL LICHEN PLANUS



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of MASTER OF SCIENCE
(Oral and Maxillofacial Sciences)

Faculty of Dentistry, Srinakharinwirot University

2020

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์
เรื่อง
การแสดงออกของคาเทปซิน บี และ ซีสเดทิน เอ ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก
ของ
แพร บางสุวรรณ

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการช่องปากและแม็กซิลโลเฟเชียล
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก	 ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภัทธยา แตบวรพกุล)	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรมาภรณ์ กลั่นฤทธิ์)
..... ที่ปรึกษาร่วม	 กรรมการ
(อาจารย์ ดร.วรวลัญช์ หิรัญวิชญารัตน์)	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มานิสา ศรีชลเพชร)

ชื่อเรื่อง	การแสดงออกของคาเทปซิน บี และ ซีสเตติน เอ ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก
ผู้วิจัย	แพรว บางสุวรรณ
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2563
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภัทราวุธ แต่บรรพกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ ดร. วรวัณณ์ หิรัญวิชญารัตน์

ไลเคนแพลนัสเป็นโรคเรื้อรังที่สามารถพบได้ทั้งที่ผิวหนังและเยื่อช่องปาก สาเหตุและการดำเนินโรคยังไม่ทราบแน่ชัด ปัจจุบันเชื่อว่าเกิดจากความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกันชนิดที่เซลล์เป็นสื่อ คาเทปซิน บีและซีสเตติน เอ ซึ่งเป็นโปรติเอสและตัวยับยั้งโปรติเอส พบรายงานว่าเป็นองค์ประกอบหนึ่งในกระบวนการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันร่างกายและเกี่ยวข้องกับการตายแบบอะพอโตซิสของเซลล์เยื่อผิวและเซลล์เม็ดเลือดขาว อาจเป็นไปได้ว่าหากมีการเสียสมดุลของการแสดงออกของคาเทปซินและตัวยับยั้งโปรติเอสที่อยู่ภายในเซลล์ อาจมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากได้ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการแสดงออกของคาเทปซิน บีและซีสเตติน เอ ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติด้วยวิธีทางอิมมูโนฮิสโตเคมีโดยใช้ชิ้นเนื้อรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากและเนื้อเยื่อปกติกลุ่มละ 30 ชิ้น ทำการแปลผลโดยดูรูปแบบการแสดงออกของคาเทปซิน บีและซีสเตติน เอ นับจำนวนเซลล์ที่มีการติดสีและประเมินระดับความเข้มการติดสีของคาเทปซิน บีและซีสเตติน เอ รวมทั้งทำการแปลผลตามเกณฑ์ของ immunoreactive score (IRS) และวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้ที่ทดสอบไคสแควร์ (chi-square) ผลการทดลองพบการแสดงออกของคาเทปซิน บี และซีสเตติน เอ ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากทุกราย แต่ในชิ้นเนื้อเยื่อปกติพบการแสดงออกของคาเทปซิน บีและซีสเตติน เอ จำนวน 29 รายและ 28 รายตามลำดับ พบลักษณะการแสดงออกของคาเทปซิน บีในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก มีการติดสีส่วนใหญ่อยู่ในชั้นเยื่อผิวเป็นจุดพบทั้งในนิวเคลียสและไซโทพลาซึม โดยมีความหนาแน่นของการติดสีเพิ่มขึ้นโดยเฉพาะเบซิลเซลล์ ซึ่งต่างจากเนื้อเยื่อปกติที่พบการติดสีเท่าๆกันในเซลล์กระจายทั่วทั้งชั้นเยื่อผิว โดยพบค่าเฉลี่ยร้อยละจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของคาเทปซิน บี ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก (ร้อยละ 53.69±16.23) มากกว่าชิ้นเนื้อเยื่อปกติ (ร้อยละ 29.47±25.77) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างของความเข้มของการติดสีคาเทปซิน บี ระหว่างทั้งสองกลุ่ม ($p = 0.254$) แต่พบระดับค่า IRS ของคาเทปซิน บี ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากมีค่ามากกว่าเนื้อเยื่อปกติ ($p = 0.014$) สำหรับลักษณะการแสดงออกของซีสเตติน เอ ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก จะมีลักษณะการติดสีเข้มทั้งในนิวเคลียสและไซโทพลาซึมของเซลล์และพบระดับการติดสีเข้มอยู่ที่เซลล์เยื่อผิวโดยเฉพาะชั้นสตราตัมคอร์เนียม, สตราตัมแกรนูโลซัมและสตราตัมสไปโนซัมและติดสีจางลงในเบซิลเซลล์ ขณะที่เนื้อเยื่อปกติจะพบลักษณะการติดสีของซีสเตติน เอ เช่นเดียวกับรอยโรคแต่พบมีระดับการติดสีของเบซิลเซลล์จางกว่า โดยมีค่าเฉลี่ยร้อยละจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของซีสเตติน เอ ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก (ร้อยละ 63.47±19.86) มากกว่าชิ้นเนื้อเยื่อปกติ (ร้อยละ 56.85±28.35) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) รวมทั้งพบความเข้มของการติดสีของซีสเตติน เอ และระดับค่า IRS ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากมากกว่าชิ้นเนื้อเยื่อปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.018$ และ $p = 0.008$ ตามลำดับ) จากการศึกษาขั้นสรุปได้ว่า พบการแสดงออกของคาเทปซิน บี และซีสเตติน เอ ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากมากกว่าเนื้อเยื่อปกติ โดยอาจเป็นไปได้ว่าทั้งคาเทปซิน บีและซีสเตติน เอ มีบทบาทในกระบวนการดำเนินโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ ยังไม่สามารถสรุปความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของคาเทปซิน บีและซีสเตติน เอ ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากได้จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ : ไลเคนแพลนัสในช่องปาก, คาเทปซิน บี, ซีสเตติน เอ, อิมมูโนฮิสโตเคมี

Title	THE EXPRESSION OF CATHEPSIN B AND CYSTATIN A IN ORAL LICHEN PLANUS
Author	PEAR BANGSUWAN
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2020
Thesis Advisor	Assistant Professor Dr. Patrayu Taebunpakul
Co Advisor	Dr. Worawalun Hirunwidchayarat

Lichen planus is a chronic inflammatory mucocutaneous condition which affects the skin and oral mucosa. The etiology and pathogenesis of oral lichen planus (OLP) are uncertain. Currently, OLP is believed to be T-cell-mediated immune disease. Cathepsin B (Cat-B), a cysteine cathepsin protease and cystatin A (Cys-A), a protease inhibitor, are involved in the immune response of the body, and apoptosis of keratinocytes and immune cells. An imbalance between cathepsin protease and its inhibitor may be associated with OLP pathogenesis. The purpose of this study was to determine the expression of Cat-B and Cys-A in OLP compared to healthy gingiva (HG) by immunohistochemistry (IHC). There were 30 specimens investigated in each group. The evaluation was performed based on expression patterns, the number of staining cells and the intensity of Cat-B and Cys-A. The immunoreactive score (IRS) was used for interpretation and the data was analyzed with an unpaired t-test and a chi-square test. The results showed 100% of Cat-B and Cys-A expression in OLP specimens (30 cases), whereas the expression of Cat-B and Cys-A in HG was found in 29 and 28 specimens, respectively. The Cat-B expression pattern was found in the epithelium with granular dot-like characteristics in the nucleus and cytoplasm. An increase in staining intensity was observed in the basal cells. The expression of Cat-B in HG demonstrated a relatively consistent intensity in the epithelial layer. The mean percentage of Cat-B positive cells in OLP ($53.69 \pm 16.23\%$) was significantly higher than HG ($29.47 \pm 25.77\%$) ($p < 0.001$). There was no difference in Cat-B intensity in these groups ($p = 0.254$). The IRS score of Cat-B in OLP was greater than HG ($p = 0.014$). Similarly, the expression of Cys-A in OLP was mainly exhibited in the nucleus and cytoplasm of epithelial layer. The high staining intensity was observed in the stratum corneum, stratum granulosum and stratum spinosum, but not the stratum basale. In addition, Cys-A expression pattern in HG was similar to OLP with a lower staining intensity in the basal cells. The mean percentage of Cys-A positive cells in OLP ($63.47 \pm 19.86\%$) was significantly greater than HG ($56.85 \pm 28.35\%$) ($p < 0.001$). The staining intensity and IRS score of Cys-A in OLP were significantly higher than in HG ($p = 0.018$ and $p = 0.008$ respectively). In conclusion, the expression of Cat-B and Cys-A in OLP were greater than in HG. Therefore, Cat-B and Cys-A may play a role in the pathogenesis of OLP. However, future studies are required to elucidate the association between Cat-B and Cys-A in OLP.

Keyword : Oral lichen planus, Cathepsin B, Cystatin A, Immunohistochemistry

กิตติกรรมประกาศ

ผู้ทำปริญญานิพนธ์ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.ทพญ.ภัทราวุธ แต่บรรพกุล อาจารย์ที่ปรึกษาหลักและ อ.ทพญ.วรวลัญช์ หิรัญวิชญารัตน์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ให้ความอนุเคราะห์ช่วยเหลือและสั่งสอน หลักการทำปริญญานิพนธ์ให้บรรลุตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ ชี้แนะแนวทางการแก้ปัญหา ถ่ายทอดความรู้วิธี ขั้นตอนการทำอิมมูโนสโตเคมีอย่างละเอียด อีกทั้งยังเป็นกำลังใจและผลักดันให้ข้าพเจ้าทำปริญญานิพนธ์ได้ จนสมบูรณ์ รวมทั้งขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาสัตวศาสตร์ช่องปากและเวชศาสตร์ช่องปากทุกท่านที่ ให้ความอนุเคราะห์ช่วยเหลือ ทั้งแนะนำแนวทางปฏิบัติและให้ความรู้แก่ข้าพเจ้าจนสามารถทำปริญญานิพนธ์ได้สำเร็จ อีกทั้งขอขอบพระคุณ นางสาวอุตมาพร บุญทรง(พี่พร) ผู้ที่ช่วยเหลือในการตัดชิ้นเนื้อ ทำ สไลด์ชิ้นเนื้อและแนะนำการขั้นตอนการทำอิมมูโนสโตเคมี พร้อมทั้งอำนวยความสะดวกในด้านการสืบค้น ข้อมูลใบส่งตรวจชิ้นเนื้อ สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอขอบคุณเรืออากาศเอกหญิง ถนอมวีดา พงษ์พานิช (น้องมาย) เพื่อนทันตแพทย์ร่วมชั้นปีทุกคน บุคคลในครอบครัวและพี่โป่งที่คอยช่วยเหลือสนับสนุนและให้กำลังใจแก่ ข้าพเจ้าในการทำปริญญานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงได้เป็นอย่างดี

แพรว บางสุวรรณ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูปภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง	1
ความมุ่งหวังของการศึกษา.....	5
ความสำคัญของการศึกษา	5
ขอบเขตของงานวิจัย	5
กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย.....	5
ตัวแปรที่ศึกษา	5
กรอบแนวคิดการศึกษา	6
สมมติฐานการวิจัย.....	7
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	8
รอยโรคไลเคนแพลันัสในช่องปาก (oral lichen planus)	8
ลักษณะทางคลินิก	9
ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา	10
เกณฑ์การวินิจฉัยไลเคนแพลันัสในช่องปากที่ปรับปรุงจากเกณฑ์ขององค์การอนามัย โลก ในปี ค.ศ.2003	10

ลักษณะภูมิโนฟลูออเรสเซนส์ทางตรงของรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก	11
การดำเนินโรคของรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก.....	11
การรักษาโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก.....	14
ซีสเทอีน คาเทปซิน (cysteine cathepsins).....	15
คาเทปซิน บี (cathepsin B).....	17
คาเทปซิน บี (cathepsin B) ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก.....	18
ซีสเตทิน (cystatins).....	18
ซีสเตทิน เอ.....	19
คาเทปซิน บี (cathepsin B) และซีสเตทิน เอ (cystatins A)	20
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	21
การกำหนดประชากรการเลือกกลุ่มตัวอย่าง.....	21
การคำนวณกลุ่มตัวอย่าง.....	21
ประชากรที่ใช้ในการวิจัย.....	21
วิธีการทำการทดลอง.....	22
วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	23
สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	23
ขั้นตอนการย้อมด้วยวิธีภูมิโนฮีสโตเคมี.....	24
การเตรียมสารเคมี (Chemical preparation).....	24
การเตรียมชิ้นเนื้อ (Specimen preparation)	24
การคืนสภาพแอนติเจน (Antigen retrieving)	24
การยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ภายใน (Block endogenous peroxidase activity)	25
การยับยั้งการจับแบบไม่จำเพาะ (Block nonspecific background)	25

การใส่แอนติบอดี (Antibody application)	25
การย้อมสี (Color development)	25
การเก็บรวบรวมข้อมูล	26
การวิเคราะห์ข้อมูล.....	27
บทที่ 4 ผลการดำเนินการวิจัย	29
ข้อมูลทั่วไปของกลุ่มประชากรที่ศึกษา	29
ลักษณะการแสดงออกของคาเทปซิน บีและซีสเตริน เอ ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก และเนื้อเยื่อปกติ	30
ลักษณะการแสดงออกของคาเทปซิน บี.....	30
ลักษณะการแสดงออกของซีสเตริน เอ	31
การแสดงออกของคาเทปซิน บี ในเนื้อตับของหนู.....	33
การแสดงออกของซีสเตริน เอ ในเยื่อบุหลอดอาหารของคน.....	33
จำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของคาเทปซิน บี และซีสเตริน เอ ในรอยโรคไลเคนแพลนัสใน ช่องปากและเนื้อเยื่อปกติ.....	34
ความเข้มของการติดสีของคาเทปซิน บี และซีสเตริน เอ ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่อง ปากและเนื้อเยื่อปกติ.....	37
ค่าคะแนน IRS ของการแสดงออกของคาเทปซิน บี และซีสเตริน เอ ในรอยโรคไลเคนแพลนัสใน ช่องปากและเนื้อเยื่อปกติ.....	39
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายและข้อเสนอแนะ.....	42
สรุปผลการวิจัย.....	42
การแสดงออกของคาเทปซิน บีและซีสเตริน เอ	42
อภิปรายผลการวิจัย	43
ข้อเสนอแนะ	48
บรรณานุกรม	49

ภาคผนวก.....	55
การปรับมาตรฐานการประเมินผล	56
เอกสารรับรองพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์.....	60
ตารางผลคะแนน IRS ของคาทอลิกจีน ปีและสี่สแตติน เอ ในประชากรศึกษาแต่ละราย.....	61
ประวัติผู้เขียน.....	62



สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 ข้อมูลทั่วไปของกลุ่มประชากรที่ทำการศึกษา.....	30
ตาราง 2 ค่าเฉลี่ยร้อยละจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของคาเทปซิน บีและซีสเตติน เอ ในรอยโรคไคเคนแพลงนัสในช่องปากและเนื้อเยื่อเหงือกปกติ	35
ตาราง 3 ความถี่คะแนนของร้อยละจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของคาเทปซิน บีและซีสเตติน เอ ในกลุ่มประชากรทั้ง 2 กลุ่ม	36
ตาราง 4 ความเข้มของเซลล์ที่มีการติดสีของคาเทปซิน บีและซีสเตติน เอ ในกลุ่มประชากรทั้ง 2 กลุ่ม	39
ตาราง 5 ระดับคะแนน immunoreactive score (IRS) ของคาเทปซิน บี และ ซีสเตติน เอ ในกลุ่มประชากรทั้ง 2 กลุ่ม.....	41

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพประกอบ 1 กรอบแนวคิดการศึกษา	6
ภาพประกอบ 2 สมมติฐานการดำเนินโรคของรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากที่เกี่ยวข้องกับ กลไกนำเสนอแอนติเจนแบบจำเพาะ	13
ภาพประกอบ 3 สมมติฐานการดำเนินโรคของรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากที่เกี่ยวข้องกับ กลไกนำเสนอแอนติเจนแบบไม่จำเพาะ	13
ภาพประกอบ 4 แนวทางการรักษารอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากโดยแบ่งกลุ่มตามลักษณะ อาการทางคลินิก	15
ภาพประกอบ 5 การผลิตและปล่อยคาเทปซินออกจากเซลล์และหน้าที่ของตัวยับยั้งโปรตีเอส	20
ภาพประกอบ 6 ลักษณะการแสดงออกของคาเทปซิน บี ในชั้นเนื้อเยื่อปกติกและชั้นเนื้อเยื่อ โรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก	31
ภาพประกอบ 7 ลักษณะการแสดงออกของซีสเตติน เอ ในชั้นเนื้อเยื่อปกติกและชั้นเนื้อเยื่อโรคไล เคนแพลนัสในช่องปาก	32
ภาพประกอบ 8 การแสดงออกของคาเทปซิน บี ในเซลล์ตับของหนู	33
ภาพประกอบ 9 การแสดงออกของซีสเตติน เอ ในเยื่อบุหลอดอาหารของคน	34
ภาพประกอบ 10 ระดับความเข้มข้นการติดสีของคาเทปซิน บี ในชั้นเนื้อเยื่อปกติกและในชั้นเนื้อเยื่อ โรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก	37
ภาพประกอบ 11 ระดับความเข้มข้นการติดสีของซีสเตติน เอ ในชั้นเนื้อเยื่อปกติกและในชั้นเนื้อเยื่อ โรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก	38

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

รอยโรคไลเคนแพลนัสเป็นโรคที่สามารถพบได้ทั้งที่ผิวหนังและเยื่อช่องปาก โดยมีอุบัติการณ์การเกิดรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากได้ตั้งแต่ร้อยละ 0.1-4⁽¹⁾ ของประชากรที่ศึกษาจากการทบทวนวรรณกรรมของ McCartan และคณะในปี ค.ศ. 2008 พบค่าเฉลี่ยอุบัติการณ์การเกิดของรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากได้ร้อยละ 1.27⁽²⁾ โดยพบในเพศหญิงมากกว่าเพศชาย 1.4 เท่า มักเกิดในช่วงอายุมากกว่า 40 ปีขึ้นไป⁽³⁾ รอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากเป็นโรคที่มีการอักเสบแบบเรื้อรัง มีอาการทางคลินิกพบได้หลากหลาย ตั้งแต่ไม่มีอาการหรือมีอาการระคายเคืองในช่องปากจนถึงมีอาการปวดแสบ ปวดร้อน ส่งผลต่อคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยได้ รอยโรคจะพบได้ทั้งสองข้างของเยื่อช่องปาก พบได้บ่อยบริเวณกระพุ้งแก้ม (buccal mucosa) สำหรับลักษณะทางคลินิกแบ่งได้เป็น 5 ชนิด ได้แก่ ชนิดร่างแห (reticular) ฝ้าขาว (plaque) แผลถลอก (erosive/ulceration) ตุ่มตัน (papular) และฝ่อลีบ (atrophic)⁽⁴⁻⁶⁾

สาเหตุและการดำเนินโรคของรอยโรคไลเคนแพลนัสยังไม่ทราบแน่ชัด แต่มีหลักฐานเชื่อว่าอาจเกิดจากปัจจัยทางพันธุกรรม หรือ โรคภูมิคุ้มกันตัวเอง (autoimmune diseases) ที่ทำให้มีการนำเสนองานแอนติเจนต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดทีลิมโฟไซต์ (T lymphocyte) ซึ่งกระตุ้นกระบวนการผลิตและหลั่งสารไซโตไคน์ (cytokine) หลายชนิด ได้แก่ อินเตอร์ลิวคิน 12 (IL-12), อินเตอร์ลิวคิน 2 (IL-2), ทูมอร์เนกโครซิสแฟกเตอร์-แอลฟา (TNF- α) และอินเตอร์ฟิรอนแกมมา (IFN-gamma) ทำให้เกิดการอักเสบในชั้นเยื่อผิวและเกิดการตายแบบอะพอพโตซิสของเซลล์เยื่อผิวโดยเฉพาะเซลล์เคอราติโนไซต์ (keratinocyte apoptosis)^(7, 8) โดย Thongprasom และคณะ ได้ทำการศึกษาในผู้ป่วยที่มีรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากจำนวน 18 ราย ทำการรักษาโรคด้วยการใช้ยาฟลูโอซินิลอน อะเซทโทไนด์ 0.1% ชนิดทาเฉพาะที่เมื่อทาที่บริเวณรอยโรควันละ 2-4 ครั้ง เป็นระยะเวลานาน 4 สัปดาห์ พบว่า มีผลลัพธ์การรักษาที่ดี ผู้ป่วยมีอาการดีขึ้น และนอกจากนี้ยังสามารถลดการแสดงออกของทูมอร์เนกโครซิสแฟกเตอร์-แอลฟาในรอยโรคภายหลังการรักษาด้วย⁽⁹⁾ ซึ่งทูมอร์เนกโครซิสแฟกเตอร์-แอลฟาเป็นไซโตไคน์สำคัญที่หลั่งออกมาจากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดไซโททอกซิกทีเซลล์ (antigen-specific cytotoxic T lymphocyte) มีบทบาทในกระบวนการตายของเซลล์เคอราติโนไซต์และสามารถชักนำการรวมกลุ่มของเซลล์เม็ด

เลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ (recruitment of lymphocyte) เข้าสู่ชั้นใต้ต่อเยื่อผิว (subepithelial layer) นำมาซึ่งการหลังไซโตไคน์อื่น ๆ ที่มีผลต่อการอักเสบของเยื่อผิวอีกด้วย⁽¹⁰⁾ ปัจจุบันนี้จึงเชื่อว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์มีบทบาทหน้าที่สำคัญกับการดำเนินโรคของรอยโรคไลเคนแพลนัสผ่านกระบวนการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์เป็นสื่อ (cell-mediated immune response) โดยพบการนำเสนอแอนติเจนต่อเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันที่สัมพันธ์กับ MHC class I และ MHC class II ซึ่งเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดไซโททอกซิกทีเซลล์ (cytotoxic T cell) และเฮลเปอร์ทีเซลล์ (helper T cell) มีหน้าที่สำคัญในกระบวนการดังกล่าว⁽⁷⁾ สอดคล้องกับกับลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของรอยโรคไลเคนแพลนัสที่พบเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ (lymphocyte) จำนวนมากเรียงตัวเป็นแถบในรอยโรคและยังพบเซลล์ที่สามารถนำเสนอแอนติเจน (antigen presenting cell) จำนวนมากกระจายอยู่ทั้งในชั้นใต้เยื่อผิวและชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue layer)⁽³⁾ ร่วมกับการสลายตัวชนิดลิควิเฟคทีฟ (liquefactive degeneration) ของชั้นเบสเมมเบรน (basement membrane) ซึ่งเกิดเนื่องมาจากกระบวนการตายของเซลล์สโตรมา (stroma cell)⁽¹¹⁾

กระบวนการหลุดลอก (desquamation process) ของชั้นสตราตัมคอร์เนียม (stratum corneum) ซึ่งเป็นชั้นเยื่อผิวชั้นบนสุด มีความสำคัญในการป้องกันอันตรายระดับโมเลกุลของเยื่อผิว โดยสมดุลของโปรติเอส (protease) และตัวยับยั้งโปรติเอส (protease inhibitor) มีบทบาทสำคัญในกระบวนการนี้⁽¹²⁾ ซีสเทอีน คาเทปซิน (cysteine cathepsins) หรือคาเทปซิน (cathepsin) เป็นหนึ่งในโปรติเอสที่สังเคราะห์ในเซลล์ (endogenous proteases) ผลิตในร่างแหเอนโดพลาซึมแบบขรุขระ (rough endoplasmic reticulum) เก็บสะสมในรูปที่ไม่ทำงานอยู่ภายในไลโซโซม (lysosome) โดยสามารถพบได้ในเนื้อเยื่อทุกส่วนของร่างกายมนุษย์ ซึ่งสามารถพบคาเทปซินได้ 11 ชนิด ตัวอย่างเช่น คาเทปซิน บี, คาเทปซิน ซี, คาเทปซิน แอล หรือ คาเทปซิน เค เป็นต้น⁽¹³⁾ คาเทปซินเหล่านี้มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการทำงานภายในของเซลล์ทั้งในสภาวะปกติและสภาวะเป็นโรค เนื่องจากพบความสามารถในการย่อยสลายโปรตีน เช่น การปรับรูปและการสลายตัวของเมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix remodeling and degradation) ซึ่งสามารถทำให้เกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อได้อีกด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าคาเทปซินมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการนำเสนอแอนติเจน (presentation of antigenic peptides)⁽¹⁴⁾ โดยส่งเสริมการแสดงออกของ MHC class II ในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายและกระบวนการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เคอราติโนไซต์ (keratinocyte differentiation) จึงพบความสัมพันธ์ระหว่างคาเทปซินกับกระบวนการเกิดโรคได้หลายชนิด ได้แก่ โรคข้อเสื่อม (osteoarthritis), โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์

(rheumatoid arthritis), โรคมะเร็ง (cancer), โรคภาวะหลอดเลือดแข็ง (atherosclerosis), โรคภูมิคุ้มกันเนื้อเยื่อของตนเอง (autoimmune disease) และโรคที่มีความเกี่ยวข้องกับการอักเสบ (inflammatory disease) เป็นต้น^(15, 16)

คาเทปซิน บี เป็นหนึ่งในคาเทปซินที่มีการศึกษาตั้งแต่ปี ค.ศ 1990 มีบทบาทหน้าที่กระบวนการต่าง ๆ ของร่างกาย เช่น การรักษาสมดุลของระบบประสาทส่วนกลาง (CNS homeostasis), การปลดปล่อยของไทรอยด์ฮอร์โมน (thyroid hormone liberation), กระบวนการสลายกระดูก (bone resorption), การปรับรูปร่างและการสลายตัวของเมทริกซ์นอกเซลล์ และมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันร่างกายและการอักเสบของเนื้อเยื่อ มีรายงานว่า คาเทปซิน บี เป็นองค์ประกอบหนึ่งในกระบวนการนำเสนอแอนติเจนต่อเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันร่างกายผ่านการแสดงออกของ MHC Class II มีบทบาทกับการตายแบบอะพอโตซิสของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดทีลิมโฟไซต์และบีลิมโฟไซต์ รวมทั้งเกี่ยวข้องกับการกระบวนการส่งสัญญาณในระดับของเซลล์ผ่านตัวรับชนิด Toll-like receptor (TLR) และกระบวนการผลิตของไซโตไคน์ ได้แก่ ทัมอร์เนกโครซิสแฟกเตอร์-แอลฟา⁽¹⁷⁾ ดังที่ได้กล่าวมา คาเทปซิน บี จึงอาจจะมีบทบาทเกี่ยวกับการดำเนินโรคของรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากได้

มีการศึกษาการแสดงของคาเทปซิน บีในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากมาก่อน โดยในปี ค.ศ. 2017 Satelur และคณะทำการศึกษาการแสดงออกของคาเทปซิน บี ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก เพื่อต้องการศึกษาคาเทปซิน บี ในแง่เป็นตัวชี้วัด (marker) ที่อาจบ่งบอกถึงการเปลี่ยนแปลงไปเป็นโรคมะเร็งชนิดสควamousเซลล์คาร์ซิโนมาของรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก ด้วยวิธีทางอิมมูโนฮิสโตเคมี โดยแบ่งกลุ่มตัวอย่างเป็น 3 กลุ่ม เนื้อเยื่อปกติจำนวน 10 ราย รอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากจำนวน 50 ราย และเนื้อเยื่อมะเร็งชนิดสควamousเซลล์คาร์ซิโนมาจำนวน 10 ราย ผลการศึกษาพบว่าเนื้อเยื่อรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากมีระดับความเข้มของการติดสีของคาเทปซิน บี ตั้งแต่ระดับปานกลางถึงมากคิดเป็นร้อยละ 56 (28 รายใน 50 ราย) ในขณะเดียวกัน เนื้อเยื่อมะเร็งชนิดสควamousเซลล์คาร์ซิโนมามีระดับความเข้มของการติดสีตั้งแต่ระดับปานกลางถึงมากร้อยละ 50 (5 รายใน 10 ราย) โดยผู้วิจัยสรุปว่ารูปแบบของการติดสีของระหว่างรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากที่มีการติดสีระดับปานกลางถึงเข้มกับเนื้อเยื่อมะเร็งชนิดสควamousเซลล์คาร์ซิโนมามีความคล้ายคลึงกัน สำหรับเนื้อเยื่อปกติมีการติดสีบางตำแหน่งหรือระดับน้อยคิดเป็นร้อยละ 60 (6 รายใน 10 ราย) แต่อย่างไรก็ตาม ในการศึกษานี้มีข้อจำกัดในเรื่องจำนวนกลุ่มควบคุมที่เป็นเนื้อเยื่อปกติซึ่งมีเพียงจำนวน 10 ราย ซึ่งอาจจะไม่เพียงพอวิธีการแปลผลของการศึกษานี้พิจารณาเพียงระดับความเข้มการติดสีของคาเทปซิน บี รวมทั้ง

วัตถุประสงค์ของการศึกษามุ่งเน้นศึกษาคาเทปซิน บีในแง่เป็นตัวชี้วัดของการเปลี่ยนแปลงไปเป็นโรคมะเร็งของรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากเท่านั้น⁽¹⁸⁾

การทำงานของโปรติเอสจะถูกควบคุมด้วยตัวยับยั้งโปรติเอส โดยตัวยับยั้งโปรติเอสที่มีส่วนสำคัญในการควบคุมการทำหน้าที่ของคาเทปซิน (cathepsins) มีหลายชนิด ได้แก่ ซีสแตทิน (cystatins), คินิโนเจน (kininogens) และไทโรปิน (thyropins) เป็นต้น⁽¹⁹⁾ มีรายงานว่า ซีสแตทิน (cystatins) อาจจะมีบทบาทในการยับยั้งการหลั่งของคาเทปซินออกสู่ภายนอกเซลล์ได้ โดยพบว่าซีสแตทินสามารถแบ่งตามลักษณะโครงสร้างได้เป็น 3 ประเภท ได้แก่ ซีสแตทินประเภทที่ 1 ประกอบด้วย ซีสแตทิน เอและซีสแตทิน บีเป็นโปรติเอสที่มีบทบาทหลักภายในเซลล์ ซีสแตทินประเภทที่ 2 จะมีบทบาทภายนอกเซลล์และซีสแตทินประเภทที่ 3 ส่วนใหญ่มักพบอยู่ในระบบไหลเวียนเลือด⁽²⁰⁾ ซีสแตทิน เอ เป็นตัวยับยั้งโปรติเอสชนิดแรกที่ถูกพบอยู่ในเซลล์ของชั้นเยื่อผิว เซลล์นิวโทรฟิล (neutrophil) และเดนไดรติกเซลล์ (dendritic cell) ในเนื้อเยื่อของต่อมน้ำเหลือง จึงเชื่อได้ว่าการแสดงออกของซีสแตทิน เอในเนื้อเยื่อเกี่ยวข้องกับกระบวนการตอบสนองของภูมิคุ้มกันของร่างกายด้วย⁽²¹⁾

กลไกการยับยั้งคาเทปซินโดยตัวยับยั้งโปรติเอสเกิดขึ้นจากการจับกันระหว่างคาเทปซินกับซีสแตทินส่งผลให้คาเทปซินไม่สามารถทำหน้าที่ได้ โดยพบค่าคงที่ของการแตกตัวระหว่างคาเทปซินและซีสแตทิน (equilibrium constant for dissociation of complexes) มีค่าที่ต่ำ ซึ่งส่งผลให้ซีสแตทิน เอ (cystatin A) จับกับคาเทปซิน บีได้แน่น⁽¹⁹⁾ นอกจากนี้ Chunsun และคณะในปี ค.ศ.2011 ได้ศึกษาการแสดงออกของคาเทปซิน บี และซีสแตทิน เอในผู้ป่วยมะเร็งกล่องเสียงในหอนกทดลองพบว่า เมื่อมีการยับยั้งการแสดงออกของคาเทปซิน บีในเซลล์ HEP-2 โดย siRNA พบว่าเซลล์จะมีการอพยพและแพร่กระจายตัวได้ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ขณะเดียวกันเมื่อเพิ่มระดับการแสดงออก (overexpression) ของซีสแตทิน เอในเซลล์ HEP-2 พบว่า เซลล์มีการอพยพและแพร่กระจายตัวลดลงเช่นเดียวกัน⁽²²⁾ จากการศึกษานี้ผู้วิจัยได้มีข้อเสนอว่าอาจจะมีความสัมพันธ์ระหว่างบทบาทหน้าที่ของคาเทปซิน บีกับซีสแตทิน เอ

จากการทบทวนวรรณกรรมที่กล่าวมาข้างต้น อาจมีความเป็นไปได้ว่า คาเทปซิน บี รวมทั้งตัวยับยั้งของมัน ได้แก่ ซีสแตทิน เอ มีบทบาทในการดำเนินโรคของรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก นอกจากนั้น ยังพบมีการศึกษาเกี่ยวกับคาเทปซิน บีในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากเพียงหนึ่งการศึกษาและยังไม่พบการศึกษาเกี่ยวกับซีสแตทิน เอในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากมาก่อน ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาการแสดงออกของคาเทปซิน บี และซีสแตทิน เอ ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติด้วยวิธีการทางอิมมูโนฮิสโตเคมี

ความมุ่งหวังของการศึกษา

เพื่อศึกษาการแสดงออกของคาเทปซิน บีและซีสเตติน เอในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก

ความสำคัญของการศึกษา

รอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก มีอาการทางคลินิกพบได้ตั้งแต่ไม่มีอาการหรือมีอาการระคายเคืองในช่องปาก จนถึงมีอาการปวดแสบ ปวดร้อน ส่งผลต่อคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยได้ และยังไม่มียาการรักษาให้หายได้ เนื่องจากยังไม่สามารถอธิบายการดำเนินโรคของรอยโรคได้แน่ชัด การศึกษาการแสดงออกของคาเทปซิน บี และซีสเตติน เอในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก อาจจะช่วยให้เข้าใจการดำเนินโรคของรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากได้ดียิ่งขึ้นซึ่งอาจนำข้อมูลดังกล่าวไปเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อนำไปพัฒนาวิธีการรักษารอยโรคชนิดนี้ต่อไป

ขอบเขตของงานวิจัย

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย

แบ่งกลุ่มเป็น 2 กลุ่ม

1. ขึ้นเนื้อปกติของเหงือกที่ไม่เป็นโรค
2. ขึ้นเนื้อรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก

ตัวแปรที่ศึกษา

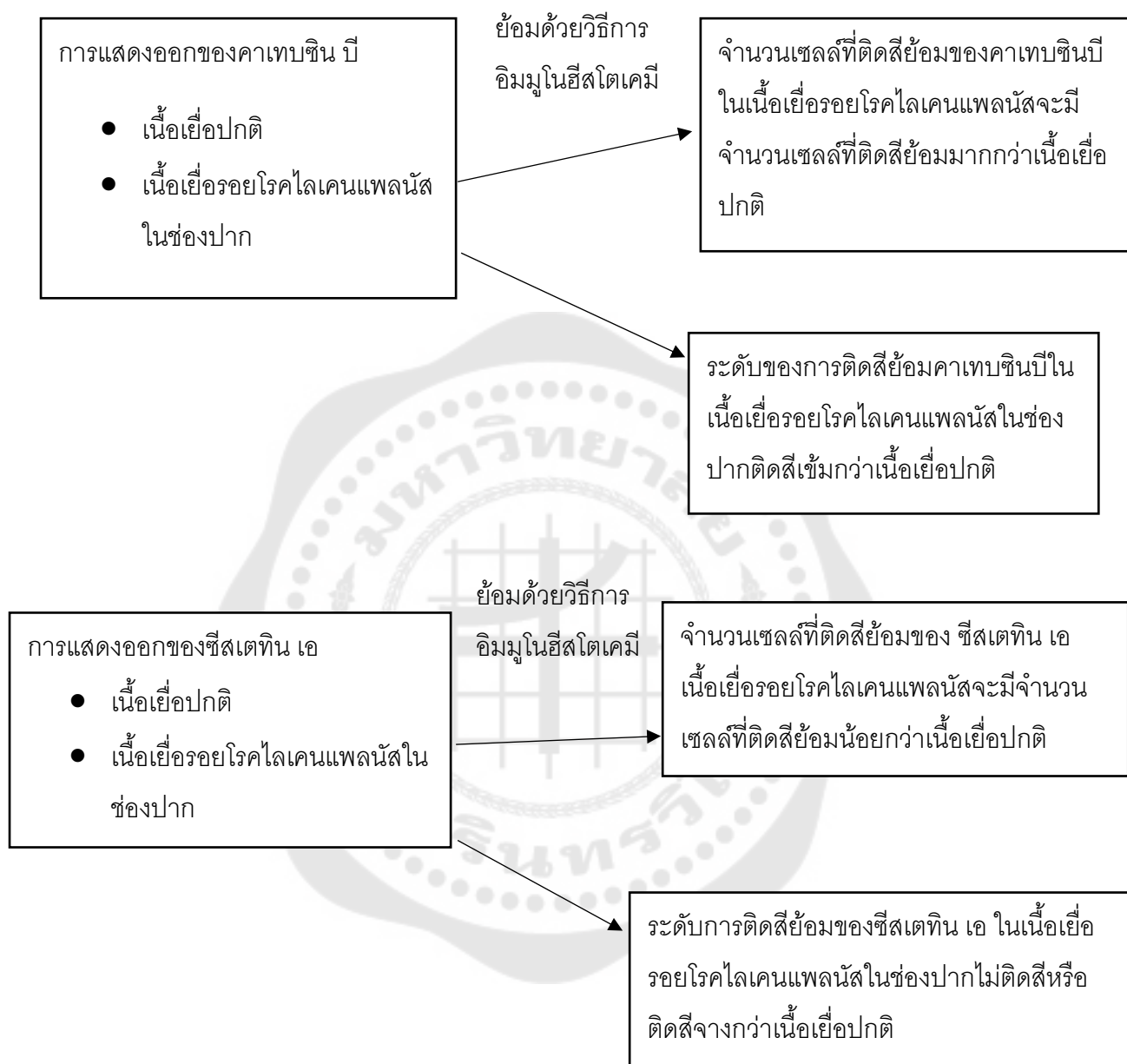
1. ตัวแปรต้น แบ่งเป็นดังนี้

- 1.1. เนื้อเยื่อปกติ
- 1.2. เนื้อเยื่อรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก

2. ตัวแปรตาม แบ่งเป็นดังนี้

- 2.1. จำนวนเซลล์ที่ติดสีย้อม
- 2.2. ระดับความเข้มของการติดสีย้อมของคาเทปซิน บีและซีสเตติน เอ

กรอบแนวคิดการศึกษา



ภาพประกอบ 1 กรอบแนวคิดการศึกษา

สมมติฐานการวิจัย

- 1.การแสดงออกของคาเทปซิน บี ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากและเนื้อเยื่อปกติ มีความแตกต่างกัน
- 2.การแสดงออกของซีสเตทิน เอ ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากและเนื้อเยื่อปกติ มีความแตกต่างกัน
- 3.มีความแตกต่างกันระหว่างรูปแบบการติดสีย้อมของคาเทปซิน บีกับการติดสีย้อมของ ซีสเตทิน เอ ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากและเนื้อเยื่อปกติ



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องและนำเสนอตามหัวข้อดังนี้

1. รอยโรคไลเคนแพลันส์ในช่องปาก
2. ซีสเทอีน คาเทปซิน
 - 2.1 คาเทปซิน บี
 - 2.2 คาเทปซิน บี ในรอยโรคไลเคนแพลันส์ในช่องปาก
3. ซีสเตติน
 - 3.1 ซีสเตติน เอ
4. คาเทปซิน บี และ ซีสเตติน เอ

รอยโรคไลเคนแพลันส์ในช่องปาก (oral lichen planus)

รอยโรคไลเคนแพลันส์เป็นรอยโรคที่สามารถพบได้ทั้งที่ผิวหนังและเยื่อช่องปากโดยมีอุบัติการณ์การเกิดรอยโรคไลเคนแพลันส์ในช่องปากได้ตั้งแต่ร้อยละ 0.1-4⁽¹⁾ ของประชากรที่ศึกษา จากการทบทวนวรรณกรรมของ McCartan และคณะในปี ค.ศ 2008 พบค่าเฉลี่ยอุบัติการณ์การเกิดของรอยโรคไลเคนแพลันส์ในช่องปากได้ร้อยละ 1.27⁽²⁾ พบในเพศหญิงได้มากกว่าเพศชาย 1.4 เท่า มักเกิดในช่วงอายุมากกว่า 40 ปีขึ้นไป⁽³⁾

สำหรับการศึกษาในประเทศไทย ปี ค.ศ.2010 ของ Thongprasom และคณะรวบรวมข้อมูลผู้ป่วยตั้งแต่ปี ค.ศ.2002 ถึง ค.ศ.2007 ในคลินิกเวชศาสตร์ช่องปากของ มหาวิทยาลัยมหิดล , จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยขอนแก่นและมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ พบผู้ป่วยที่มีรอยโรคไลเคนแพลันส์ในช่องปากจำนวน 533 ราย ในอายุตั้งแต่ 40-60 ปี พบในเพศหญิงมากกว่าเพศชาย 4 เท่า นอกจากนี้ จากการติดตามผู้ป่วยพบรอยโรคไลเคนแพลันส์ในช่องปากมีเปลี่ยนแปลงเป็นโรคมะเร็งช่องปากชนิดสควamousเซลล์คาร์ซิโนมาได้จำนวน 1 ราย (ร้อยละ0.2)⁽²³⁾ ในขณะที่การศึกษาในประเทศอิตาลี ระหว่างปี ค.ศ.2001 ถึงปี ค.ศ. 2009 ทำการศึกษาในผู้ป่วยที่มีรอยโรคไลเคนแพลันส์ในช่องปากที่ได้รับการวินิจฉัยตามเกณฑ์ที่ถูกปรับปรุงจากเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลกในปี ค.ศ. 2003 รายงานว่า มีผู้ป่วยที่มีรอยโรคไลเคนแพลันส์ในช่องปากเปลี่ยนเป็นโรคมะเร็งชนิดสควamousเซลล์คาร์ซิโนมาจำนวน 8 ราย จากผู้ป่วยจำนวน 327 ราย (ร้อยละ2.4)

โดยมีการติดตามรอยโรคก่อนการเปลี่ยนแปลงมีระยะเวลาเฉลี่ย 39.3 เดือน⁽²⁴⁾ แต่อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันนี้ยังมีข้อถกเถียงกันเรื่องการเปลี่ยนเป็นโรคมะเร็งของรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก

รอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากเป็นโรคที่มีการอักเสบแบบเรื้อรัง พบอาการทางคลินิกได้หลายแบบ ตั้งแต่ไม่มีอาการหรือมีอาการระคายเคืองในช่องปาก จนถึงมีอาการปวดแสบ ปวดร้อน และส่งผลต่อคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยได้ จากรายงานของ Thongprasom และคณะพบว่ารอยโรค ไลเคนแพลนัสในช่องปากของประเทศไทย ผู้ป่วยมีอาการนำที่สำคัญคือ ปวดแสบปวดร้อนในช่องปาก (burning sensation) โดยพบถึงร้อยละ 72.9, มีอาการปวดร้อยละ 26.5, รู้สึกขรุขระ ร้อยละ 6.4, และไม่มีอาการเพียงร้อยละ 7.9 จากผู้ป่วยทั้งหมดจำนวน 533 ราย รอยโรคจะพบได้ทั้งสองข้างของเยื่อช่องปาก โดยพบได้บ่อยบริเวณกระพุ้งแก้ม⁽²³⁾ สามารถพบลักษณะทางคลินิกได้หลายแบบ ได้แก่ ชนิดร่างแห, ฝ้าขาว, แผลถลอก, ตุ่มตัน, และฝ่อลีบ^(4, 5) สาเหตุและการดำเนินโรคของรอยโรคไลเคนแพลนัสยังไม่ทราบแน่ชัด แต่เชื่อว่าอาจเกิดจากปัจจัยทางพันธุกรรมหรือโรคภูมิคุ้มกันเนื้อเยื่อของตนเอง โดยการนำเสนอแอนติเจนต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดทีลิมโฟไซต์ทำให้มีการกระตุ้นให้ผลิตสารและการหลั่งไซโตไคน์หลายชนิดเช่น อินเตอร์ลิวคิน12, อินเตอร์ลิวคิน2, ทูมอร์เนกโครซิสแฟกเตอร์-แอลฟาและอินเตอร์ฟิรอน แกมมา ทำให้มีการอักเสบในเยื่อผิวจนเป็นผลให้เกิดกระบวนการตายแบบอะพอพโตซิสของเซลล์ที่เยื่อผิวโดยเฉพาะเซลล์เคอราติโนไซต์

ลักษณะทางคลินิก

รอยโรคจะพบได้ทั้งสองข้างเยื่อช่องปาก โดยตำแหน่งที่พบได้บ่อยคือ กระพุ้งแก้ม และสามารถพบในตำแหน่งอื่น ๆ ในช่องปาก เช่น ลิ้น เหงือก เยื่อบุด้านในของริมฝีปาก ลักษณะทางคลินิกที่พบได้บ่อยคือ ชนิดร่างแห, ฝ้าขาวและแผลถลอก⁽⁵⁾ โดยสามารถแบ่งลักษณะทางคลินิกที่พบได้เป็น 5 ชนิด⁽⁶⁾ ได้แก่

- 1.ร่างแห (reticular) เป็นรูปแบบที่พบได้บ่อย มีลักษณะเป็นลายเส้นสีขาว เรียงตัวคล้ายตาข่าย พบบริเวณกระพุ้งแก้มทั้งสองข้าง รูปแบบนี้ผู้ป่วยมักไม่มีอาการ
- 2.ฝ้าขาว (plaque) มีลักษณะเป็นแผ่นสีขาว นูน และเรียบคล้ายกับลิวดิเพเคีย (leukoplakia) พบบริเวณด้านบนของลิ้นและเยื่อบุกระพุ้งแก้ม
- 3.ฝ่อลีบ (atrophic) มีลักษณะของการอักเสบที่เยื่อผิวเป็นรอยแดงมีเส้นสีขาวรอบ ๆ รอยโรคด้วยผู้ป่วยมักมีอาการปวดแสบปวดร้อนมักพบที่เหงือกยึด (attached gingiva)
- 4.แผลถลอก (erosive หรือ ulceration) มีลักษณะเป็นแผลที่มีแผ่นเยื่อเมือกเทียม (pseudomembrane) ปกคลุม บริเวณขอบแผลมักพบเป็นเส้นสีขาวร่วมด้วย รูปแบบนี้อาจ

เกิดขึ้นจากรูปแบบฝ่อลีบ แล้วเนื้อเยื่อผิวหนังที่บางหลุดลอกออกไปทำให้เกิดรอยถลอกและเป็นแผล ผู้ป่วยมักมีอาการปวดแสบปวดร้อนเล็กน้อยจนถึงปวดมากได้

5.ตุ่มตัน (papular) มีลักษณะเป็นตุ่มตันเล็กและมีสีขาวกระจายพบบ่อยที่บริเวณกระพุ้งแก้ม

ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา

พบการหนาตัวของชั้นเคอราตินที่ไม่มีหรือมีนิวเคลียส (orthokeratosis or parakeratosis) รอยโรคบริเวณผิวหนังมักพบว่าเป็นแบบฟันเลื่อย (saw-tooth) หรือ rete ridges แต่ไม่ค่อยพบในเยื่อช่องปาก พบลักษณะการสะสมของลิมโฟไซต์ที่เรียงตัวเป็นแถบชัดเจนจำนวนมาก ในชั้นบนของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน อาจพบเคอราติโนไซต์และเบซิลเซลล์ที่ถูกทำลาย บริเวณชั้นของเบสเม้นท์เมมเบรน การสลายตัวเช่นนี้เกิดเนื่องจากกระบวนการตายเป็นลักษณะ ลิวคิแฟคที่⁽¹¹⁾

เกณฑ์การวินิจฉัยไลเคนแพลนัสในช่องปากที่ปรับปรุงจากเกณฑ์ของ องค์การอนามัยโลก ในปี ค.ศ.2003

ลักษณะทางคลินิก⁽⁵⁾

- 1.มีรอยโรคทั้งสองด้านที่มีความสมมาตรกัน
- 2.มีลักษณะสีขาว หรือ เทา เป็นรูปแบบร่างแห

ลักษณะรอยโรคเป็นแผลถลอก, ฝ่อลีบ, ตุ่มน้ำ และฝ้าขาว โดยกลุ่มรอยโรคเหล่านี้จะถือว่าเป็นลักษณะย่อย ต้องพบลักษณะแบบร่างแหในตำแหน่งอื่นในช่องปากด้วย โดยรอยโรคอื่น ๆ ที่มีลักษณะทางคลินิกคล้ายรอยโรคไลเคนแพลนัสแต่ไม่ครบข้อกำหนดข้างต้นจะให้การวินิจฉัยว่ามีลักษณะทางคลินิกที่สอดคล้องกับรอยโรคไลเคนแพลนัส

ลักษณะทางพยาธิวิทยา⁽⁵⁾

- 1.พบลักษณะการสะสมของลิมโฟไซต์ที่เรียงตัวเป็นแถบชัดเจนจำนวนมากในชั้นบนของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน
- 2.มีการทำลายของชั้นเบซิลเซลล์ และการสลายตัวชนิวเคลียสที่ฟ
- 3.ไม่พบลักษณะของเซลล์เยื่อผิวหนังที่มีการเจริญที่ผิดปกติ (epithelial dysplasia)

นอกจากนี้การวินิจฉัยแยกกรอยโรคไลเคนแพลนัสกับรอยโรคไลเคนอยด์ในช่องปาก (oral lichenoid lesions) จะใช้เกณฑ์โดยรอยโรคไลเคนแพลนัสต้องพบลักษณะทางคลินิกและลักษณะทางพยาธิวิทยาครบทุกข้อ ดังที่กล่าวมาข้างต้น แต่รอยโรคไลเคนอยด์ในช่องปาก อาจเกิด

ร่วมปัจจัยอื่นเข้ามามีกระตุ้นให้เกิดอาการแพ้ เช่น ยารักษาโรคทางระบบและวัสดุทางทันตกรรม เป็นต้น

ลักษณะภูมิโนฟลูออเรสเซนซ์ทางตรงของรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก

ลักษณะทางคลินิกของรอยโรคไลเคนแพลนัสอาจพบลักษณะที่ไม่ชัดเจน การวินิจฉัยรอยโรคนี้จึงมีการทดสอบด้วยภูมิโนฟลูออเรสเซนซ์ทางตรง (direct immunofluorescence) เพื่อเป็นการทดสอบเพื่อหา immunoreactant ในชั้นเนื้อของรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก สามารถพบลักษณะได้ดังนี้⁽²⁵⁾

- 1.พบลักษณะฟูเป็นปุย (shaggy pattern) ของสสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ แอนติไฟบริโนเจน (anti-fibrinogen) ที่ชั้นใต้ต่อเยื่อผิวและชั้นของเบสเมมเบรันทิมเมเบรอน (epithelial basement membrane zone)
- 2.มีการติดสีย้อม IgM ที่คอลลอยด์บอดี (colloid bodies)
- 3.มีการติดสีย้อมของ anti – C3 ระดับน้อยมากที่ชั้นของเบสเมมเบรันทิมเมเบรอน

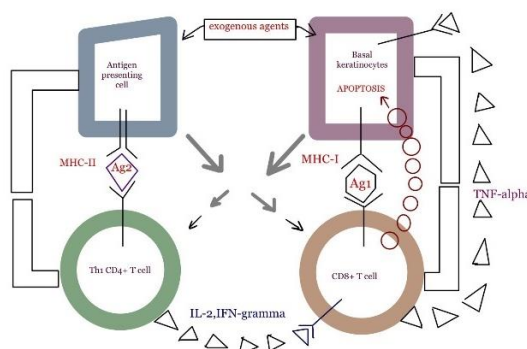
การดำเนินโรคของรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก

รอยโรคไลเคนแพลนัสเป็นโรคการอักเสบเรื้อรังเกี่ยวข้องกับความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์เป็นสื่อ แต่ยังไม่สามารถอธิบายกลไกได้อย่างชัดเจน พบเพียงข้อสันนิษฐานว่ามีการกระตุ้นผ่านกลไกการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันร่างกายเกี่ยวข้องกับเซลล์เม็ดเลือดขาวทีลิมโฟไซต์ เนื่องจากลักษณะทางพยาธิวิทยา (pathology) พบเซลล์เม็ดเลือดขาวทีลิมโฟไซต์ที่ได้รับการกระตุ้นจำนวนมากแทรกอยู่ในชั้นใต้ของเยื่อผิวและบริเวณรอยโรคพบการทำลายของเซลล์ในชั้นเบซัลเซลล์รวมถึงเบซัลเคอราติโนไซต์ถูกทำลาย⁽⁷⁾ นอกจากนี้บริเวณดังกล่าวของรอยโรคจะพบเซลล์ที่สามารถนำเสนอแอนติเจนเป็นจำนวนมากทั้งในชั้นใต้ต่อเยื่อผิวและชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน⁽³⁾ โดยมีสมมติฐานถึงการดำเนินโรคของรอยโรคที่เกี่ยวกับกลไกการนำเสนอแอนติเจนที่จำเพาะและไม่จำเพาะ พบเซลล์ที่มีบทบาทหน้าที่สำคัญ เช่น เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดทีลิมโฟไซต์ มาสต์เซลล์และเซลล์ที่สามารถนำเสนอแอนติเจนได้ เป็นต้น เชื่อว่าการดำเนินโรคจะเกิดเมื่อมีสิ่งรบกวนมากระตุ้นทำให้เกิดกระบวนการนำเสนอแอนติเจนและการอพยพ(migration)ของเซลล์เม็ดเลือดขาวเข้าสู่บริเวณใกล้ชั้นเยื่อผิว ซึ่งพบการอพยพของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดไซโทท็อกซิกทีเซลล์ สัมพันธ์กับการแสดงออกของ MHC class I บนผนังของเซลล์เคอราติโนไซต์ ในขณะที่เฮลเปอร์ทีเซลล์ จะถูกกระตุ้นโดยแอนติเจนที่มีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของ

MHC class II บนผนังของเซลล์เคอราติโนไซต์ ส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอโตซิสของเบซิลเคอราติโนไซต์ (ภาพประกอบ 2) นอกจากนี้ พบเซลล์แลงเกอร์ฮานส์ (Langerhans cells) ที่มีการแสดงออกของ MHC class II เพิ่มจำนวนมากในรอยโรค ซึ่งทั้งเซลล์แลงเกอร์ฮานส์และเซลล์เคอราติโนไซต์ทำหน้าที่นำเสนอแอนติเจนต่อเฮลเปอร์ทีเซลล์ กระตุ้นการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน2 และอินเตอร์เฟอรอน แกมมา โดยพบว่าไซโตไคน์ทั้งสองชนิดนี้สามารถทำหน้าที่ร่วมกับการแสดงออกของ MHC class II บนผนังเบซิลเคอราติโนไซต์และเฮลเปอร์ทีเซลล์ กระตุ้นการทำงานของไซโททอกซิกทีเซลล์ทำให้เกิดการตายของเซลล์เคอราติโนไซต์ได้อีกด้วย⁽⁶⁾

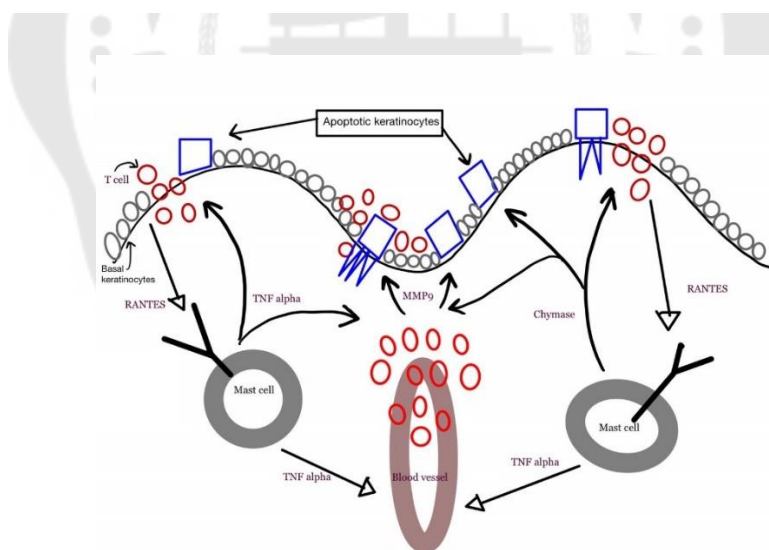
นอกจากนี้พบมาสต์เซลล์ในรอยโรคไลเคนแพลนัสที่มีการแตกตัวของเม็ดเล็ก ๆ ภายในเซลล์ (degranulation) อาจจะมีข้องเกี่ยวกับการหลั่งไซโตไคน์ที่ทำให้เกิดการอักเสบต่าง ๆ ตัวอย่างเช่น ทุมอร์เนกโครซิสแพกเตอร์-แอลฟา, ทริปเตส (tryptase) และไคเมส (chymase) เป็นต้น มาสต์เซลล์จึงอาจเป็นเซลล์อีกชนิดหนึ่งที่มีส่วนข้องเกี่ยวกับการทำลายชั้นของเบสเม้นท์เมมเบรน หรือ กระบวนการตายของเซลล์เคอราติโนไซต์ อาจเกิดจากกระบวนการของ RANTES ที่หลั่งจาก ทีลิมโฟไซต์ ดึงดูดการเข้ามาของมาสต์เซลล์ เมื่อมาสต์เซลล์ถูกกระตุ้นให้มีการหลั่งสารโปรติเอสและไคเมสทำให้เยื่อผิวเกิดการฉีกขาดจึงกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์เคอราติโนไซต์ (ภาพประกอบ 3) นอกจากนี้ ทุมอร์เนกโครซิสแพกเตอร์-แอลฟาซึ่งเป็นไซโตไคน์สำคัญที่หลั่งออกมาจากเซลล์เม็ดเลือดชนิดไซโททอกซิกทีเซลล์ที่จำเพาะต่อแอนติเจน มีรายงานว่า มีบทบาทในกระบวนการตายของเซลล์เคอราติโนไซต์และสามารถชักนำการรวมกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดขาวเข้าสู่ชั้นใต้ต่อเยื่อ ทำให้มีการหลั่งไซโตไคน์อื่น ๆ ซึ่งจะส่งผลต่อการอักเสบของเยื่อผิวอีกด้วย^(3, 26)

ในปัจจุบันยังไม่ทราบแน่ชัดว่าสิ่งเร้าใดที่สามารถกระตุ้นกลไกดังที่กล่าวมาจนทำให้เกิดรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก แต่เชื่อว่าอาจเกี่ยวข้องกับปัจจัยต่าง ๆ เช่น ความเครียด (stress) การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อเซลล์ร่างกายตัวเอง สิ่งแปลกปลอมจากภายนอก และการติดเชื้อไวรัส (viral infections) บางชนิด ที่อาจจะส่งผลทำให้มีการนำเสนอแอนติเจนต่อทีลิมโฟไซต์และเซลล์การอักเสบจนผลิตสารและหลั่งไซโตไคน์หลายชนิดส่งผลให้มีการอักเสบในเนื้อเยื่อตามมา⁽⁶⁻⁸⁾



ภาพประกอบ 2 สมมติฐานการดำเนินโรคของรอยโรคไลเคนแพลานัสในช่องปากที่เกี่ยวข้องกับ
กลไกนำเสนอแอนติเจนแบบจำเพาะ

ที่มา : Lodi G, Scully C, Carrozzo M, Griffiths M, Sugerman PB, Thongprasom K. Current controversies in oral lichen planus: report of an international consensus meeting. Part 1. Viral infections and etiopathogenesis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2005;100(1):40-51.



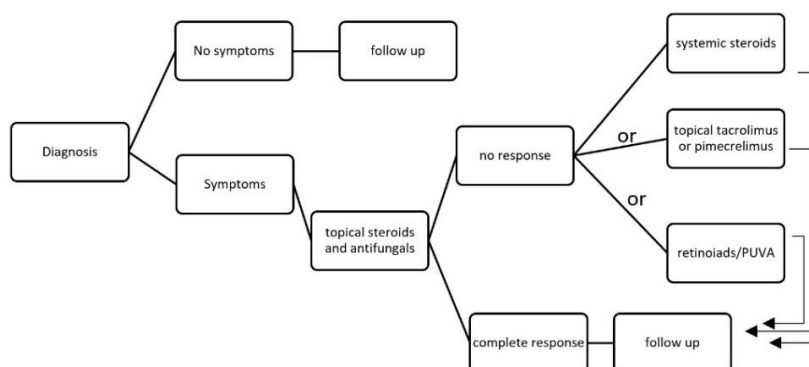
ภาพประกอบ 3 สมมติฐานการดำเนินโรคของรอยโรคไลเคนแพลานัสในช่องปากที่เกี่ยวข้องกับ
กลไกนำเสนอแอนติเจนแบบไม่จำเพาะ

ที่มา : Sugerman PB, Savage NW, Walsh LJ, Zhao ZZ, Zhou XJ, Khan A, et al. The Pathogenesis of Oral Lichen Planus. Crit Rev Oral Biol Med. 2002;13(4):350-65

การรักษาโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก

เป้าหมายของการรักษารอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก คือ การบรรเทาอาการ ความเจ็บปวดและภาวะแทรกซ้อนอื่น ๆ เกิดขึ้น โดยวิธีการรักษาที่มีความนิยมมากที่สุด คือ การใช้ ยาสเตียรอยด์ (corticosteroids) ซึ่งมีทั้งแบบรับประทาน แบบฉีด แบบพ่น และแบบทาเฉพาะที่ ยาสเตียรอยด์รูปแบบที่นิยมใช้เป็นชนิดทาเฉพาะที่ ตัวอย่างเช่น ไตรแอมซิโนโลน อะเซทโทไนด์ (triamcinolone acetonide) ฟลูโอซิโนโลน อะเซทโทไนด์ (fluocinolone acetonide) โคลบีตาโซล (clobetasol) เป็นต้น⁽⁵⁾ พบรายงาน การใช้ยา ฟลูโอซิโนโลน อะเซทโทไนด์ 0.1% ชนิดทาเฉพาะที่ ได้ผลลัพธ์ที่ดี เมื่อทาบริเวณรอยโรควันละ 2-4 ครั้ง เป็นระยะเวลานาน 4 สัปดาห์⁽⁹⁾ รวมทั้งยังมีรายงานการรักษารอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากด้วยการใช้ยากดภูมิต้านทาน (immunosuppressant) ยาต้านจุลชีพหรือสารปรับระบบภูมิคุ้มกัน (immunomodulatory agent) เช่น ยาไซโคลสปอริน (cyclosporine) แดปโซน (dapsone) หรือเตตราไซคลีน (tetracycline) เป็นต้น นอกจากนี้มีรายงานการรักษาด้วยวิธีการอื่นๆ ตัวอย่างเช่น การใช้แสงแบบโฟโตไดนามิก (photodynamic therapy) หรือด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต เอ ร่วมกับสารเคมี (PUVA therapy) และการใช้คาร์บอนไดออกไซด์เลเซอร์หรือการผ่าตัดทำศัลยกรรมด้วยแผ่นเหงือกอิสระ (free gingival graft) มาใช้ในการรักษารอยโรคที่มีอาการรุนแรงและไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา เป็นต้น ปัจจุบันยังไม่มีแนวทางการรักษารอยโรคไลเคนแพลนัสที่ทำให้รอยโรคหายขาดได้ จึงยังคงมีการศึกษาหาวิธีการรักษารอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากต่อไป โดยมีเป้าหมายเพื่อยับยั้ง กลไกการเกิดโรคที่มีสาเหตุมาจากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายที่ผิดปกติไป⁽²⁷⁾

แนวทางการรักษารอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก แสดงดังภาพประกอบ 4



ภาพประกอบ 4 แนวทางการรักษารอยโรคไคเคนแพลนัสในช่องปากโดยแบ่งกลุ่มตามลักษณะอาการทางคลินิก

ที่มา: Lavanya N, Jayanthi P, Rao UK, Ranganathan K. Oral lichen planus: An update on pathogenesis and treatment. J Oral Maxillofac Pathol. 2011;15(2):127-32.

ซิสเทอีน คาเทปซิน (cysteine cathepsins)

ซิสเทอีน คาเทปซิน (cysteine cathepsins) หรือ คาเทปซิน (cathepsins) เป็นหนึ่งในโปรติเอส (proteases) ซึ่งปัจจุบันมีการศึกษาบทบาทหน้าที่ของคาเทปซินที่มีผลต่อกระบวนการทำงานของเซลล์ทั้งในสภาวะปกติและเป็นโรค นอกจากนี้พบศึกษาทางเภสัชวิทยาเพื่อใช้เป็นตัวยารักษาการยับยั้งโรค เป็นตัวบ่งชี้ระดับโมเลกุลแสดงระยะการดำเนินโรคของโรคได้ โดยคาเทปซิน (cathepsins) เป็นโปรติเอสที่สังเคราะห์ในเซลล์ ผลิตในร่างแหเอนโดพลาสมิกซึมแบบขรุขระ (rough endoplasmic reticulum) แล้วอยู่ในรูปไม่ทำงานเก็บสะสมไว้ในไลโซโซม (lysosome) พบในเนื้อเยื่อได้ทุกส่วนของร่างกาย สำหรับมนุษย์สามารถพบได้ 11 ชนิด ตัวอย่างเช่น คาเทปซิน บี, คาเทปซิน ซี, คาเทปซิน แอล หรือคาเทปซิน เค เป็นต้น โดยทั่วไปคาเทปซินเป็นโปรติเอสภายในเซลล์ (endopeptidases) ยกเว้น คาเทปซิน ซีและ คาเทปซิน เอ็กซ์ เป็นโปรติเอสที่อยู่ภายนอกเซลล์ (exo-peptidases)⁽¹⁴⁾

โดยสรุปหน้าที่ของคาเทปซินมีบทบาทหน้าที่ในกระบวนการต่าง ๆ ดังนี้ (physiological functions of cysteine cathepsins)

1. การตายของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล, อีโอซิโนฟิลและเซลล์เคอราติโนไซต์
2. ควบคุมกระบวนการตัดต่อสายโปรตีน (Maturation and/or activation of protein precursors)

3.ส่งเสริมกระบวนการนำเสนอแอนติเจนของเซลล์เม็ดเลือดขาว

4.กระบวนการปรับรูปและสลายตัวของเมทริกซ์นอกเซลล์

ดังนั้นหากมีสิ่งกระตุ้นทำให้การทำงานของคาเทปซินมีความผิดปกติอาจจะมีผลต่อการเกิดโรค ตัวอย่างเช่น หน้าที่การย่อยสลายโปรตีนของคาเทปซิน ในกระบวนการปรับรูปของสารเคลือบเซลล์ ทำให้เกิดโรคได้ เช่น ข้อกระดูกเสื่อม, โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์, โรคมะเร็ง, โรคภาวะหลอดเลือดแข็งและโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เป็นต้น⁽¹⁵⁾ นอกจากนี้คาเทปซินยังมีความเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณในกระบวนการตายของเซลล์แบบอะพอปโตซิส โดย Conus และ Simon ในปี ค.ศ. 2010 อธิบายถึงกระบวนการปล่อยของคาเทปซินให้แพร่ผ่านออกจากผนังของไลโซโซมเข้าสู่ไซโตซอล เนื่องมาจากการส่งสัญญาณผ่านแคสเปสหรือสิ่งเร้า⁽²⁸⁾ ส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์ได้สองแบบ ได้แก่ หนึ่ง คือการปรับเปลี่ยนรูปร่างโดยตรงของ Bid และ/หรือ Bak/Bim (direct cleavage of Bid and/or Bak/Bim) ทำให้มีการเคลื่อนย้ายของ pro-apoptotic proteins เข้าสู่ผนังหุ้มไมโทคอนเดรียชักนำให้เกิดการปล่อยโมเลกุลที่ก่อให้เกิดการตายของเซลล์ คือ ไซโตโครม ซี (cytochrome c) ซึ่งจะไปกระตุ้นแคสเปส 9 (caspase-9) และการปล่อยอนุมูลอิสระ (ROS) โดยโมเลกุลทั้งสองนี้จะกลายเป็นตัวกระตุ้นย้อนกลับของวงจร ส่งผลทำให้เกิดการปล่อยคาเทปซินออกสู่ไซโตซอล (positive feedback) อีกครั้ง สอง คือการปรับเปลี่ยนรูปร่างโดยตรงของแคสเปส 8 หรือแคสเปส 2 (direct cleavage of caspase-8 or 2) ตามด้วยกระตุ้นการปรับเปลี่ยนรูปร่างโดยตรงของ Bid และ/หรือ Bax มีผลต่อการเคลื่อนย้ายโมเลกุลโปรตีน (pro-apoptotic proteins) เข้าสู่ผนังหุ้มไมโทคอนเดรียได้เช่นเดียวกัน^(17, 29)

นอกจากนี้ยังพบว่า คาเทปซินมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการนำเสนอแอนติเจน (presentation of antigenic peptides)⁽¹⁴⁾ โดยส่งเสริมการทำงานของ MHC class II บนผนังของเซลล์ในร่างกาย^(17, 30) การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันร่างกายทั้งแบบไม่จำเพาะ (innate immunity) และแบบจำเพาะ (adaptive immunity) พบว่ามีความสัมพันธ์กับคาเทปซิน หลายชนิด ตัวอย่างเช่น คาเทปซิน เค, คาเทปซิน บี, คาเทปซิน แอล, คาเทปซิน เอส และ คาเทปซิน เอฟ มีความเกี่ยวข้องกับการควบคุมการส่งสัญญาณของ Toll-like receptor (TLR) ที่ผนังเซลล์ในการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ^(30, 31) เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Honey K และคณะในปี ค.ศ. 2003 พบว่าคาเทปซินมีส่วนเกี่ยวข้องในกระบวนการนำเสนอแอนติเจนต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวผ่านการแสดงออกของ MHC Class II ในระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะได้ด้วย⁽³²⁾

คาเทปซิน บี (cathepsin B)

คาเทปซิน บีเป็นหนึ่งในคาเทปซินที่มีการศึกษาดังแต่ปี ค.ศ 1990 พบว่ามีบทบาทหน้าที่ในกระบวนการต่าง ๆ ของร่างกาย เช่น การรักษาสมดุลของระบบประสาทส่วนกลาง (CNS homeostasis), การปลดปล่อยของไทรอยด์ฮอร์โมน (thyroid hormone liberation), กระบวนการสลายกระดูก (bone resorption), การปรับรูปร่างและการสลายตัวของเมทริกซ์นอกเซลล์ และมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันร่างกายและการอักเสบของเนื้อเยื่อ นอกจากนี้พบว่า คาเทปซิน บี เป็นองค์ประกอบหนึ่งในกระบวนการนำเสนอแอนติเจนต่อเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันร่างกายสัมพันธ์กับการแสดงออก MHC Class II ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการตายแบบอะพอปโตซิสของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดทีลิมโฟไซต์และบีลิมโฟไซต์ รวมถึงเกี่ยวข้องกับกระบวนการส่งสัญญาณในระดับเซลล์ผ่านตัวรับชนิดToll-like receptor (TLR) และกระบวนการผลิตทูมอร์เนกโครซิสแฟกเตอร์-แอลฟา⁽¹⁷⁾ นอกจากนี้ยังพบความสัมพันธ์ระหว่างคาเทปซิน บี กับการเกิดโรคได้หลายโรค เช่น โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease), โรคตับอ่อนอักเสบ (pancreatitis), ติดเชื้อไวรัสและโรคมะเร็ง เป็นต้น⁽³³⁾ จากการทบทวนวรรณกรรมของ Benarji และคณะ ในปี ค.ศ. 2019 พบการแสดงออกของคาเทปซิน บี ในรอยโรคของช่องปากได้เช่นกัน ได้แก่ โรคฟันผุ โรคปริทันต์อักเสบ โรคถุงน้ำและเนื้องอกที่เกิดจากเนื้อเยื่อกำเนิดของฟัน และยังพบว่าอาจจะมียบทบาทในการแพร่กระจายของโรคมะเร็งช่องปากได้⁽³⁴⁾

มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างคาเทปซิน บี กับกระบวนการดำเนินโรคของโรคมะเร็งและโรคอื่น ๆ อาทิ โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ สำหรับการศึกษาในโรคมะเร็ง พบการแสดงออกของคาเทปซิน บี ในโรคมะเร็งที่อวัยวะหลายชนิด เช่น ลำไส้ ปอด เต้านม รังไข่ ตับอ่อน สมอง กระเพาะปัสสาวะ เยื่อบุช่องปาก เป็นต้น จากการศึกษาในปีค.ศ 2016 ของ Ruan และคณะ พบการแสดงออกของ คาเทปซิน บี เพิ่มขึ้นทั้งจากเซลล์เนื้อเยื่อของมะเร็งตับที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง (cell line) และจากในเนื้อเยื่อของผู้ป่วยมะเร็งตับที่ไม่ได้รับการรักษาใด ๆ ก่อนการผ่าตัด จำนวน 168 ราย เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อตับปกติ นอกจากนี้ยังพบว่าการแสดงออกของคาเทปซิน บี มีความสัมพันธ์แบบแปรผันตามระดับความรุนแรงของโรคอีกด้วย จึงมีข้อสันนิษฐานว่าคาเทปซิน บี อาจจะเป็นตัวบ่งชี้การดำเนินโรคของโรคมะเร็งและการแพร่กระจายของโรคมะเร็งได้ (metastasis)⁽³⁵⁾

สำหรับการศึกษาในโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ ของ Hashimoto ได้ศึกษาระดับ คาเทปซิน บี ในน้ำไขข้อ โดยวิธีการ sandwich ELISA เปรียบเทียบระหว่างโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์กับโรคข้อเสื่อมในผู้ป่วยจำนวน 16 และ 18 รายตามลำดับ พบระดับคาเทปซิน บี ในน้ำไขข้อของโรค

ข้ออักเสบรูมาตอยด์สูงกว่าในโรคข้อเสื่อมอย่างมีนัยสำคัญ จึงสันนิษฐานว่า คาเทปซิน บีอาจมีความสัมพันธ์กับการทำลายของเนื้อกระดูกแข็งใต้ข้อ (subchondral bone) ในโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ โดยอาจเกิดจากความสามารถของคาเทปซิน บี ในกระบวนการปรับรูปและการสลายตัวของเมทริกซ์นอกเซลล์⁽³⁶⁾

คาเทปซิน บี (cathepsin B) ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก

สำหรับการศึกษาเกี่ยวกับคาเทปซิน บีในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากนั้น พบเพียงการศึกษาของ Satelur และคณะ ในปี ค.ศ 2017 โดยผู้วิจัยได้ทำการศึกษาการแสดงออกของคาเทปซิน บี ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก เพื่อต้องการศึกษาคาเทปซิน บี ในแง่เป็นตัวชี้วัด (marker) ที่อาจบ่งบอกถึงการเปลี่ยนแปลงเป็นโรคมะเร็งชนิดสควamousเซลล์คาร์ซิโนมาของรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากด้วยวิธีทางอิมมูโนฮิสโตเคมี การศึกษาได้แบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ เนื้อเยื่อปกติจำนวน 10 ราย รอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากจำนวน 50 ราย และเนื้อเยื่อมะเร็งชนิดสควamousเซลล์คาร์ซิโนมาจำนวน 10 ราย โดยผลการศึกษาพบว่าเนื้อเยื่อรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก มีระดับความเข้มของการติดสีย้อมของคาเทปซิน บี ตั้งแต่ระดับปานกลางถึงมาก คิดเป็นร้อยละ 56 (28 รายใน 50 ราย) ในขณะเดียวกัน เนื้อเยื่อมะเร็งชนิดสควamousเซลล์คาร์ซิโนมามีระดับความเข้มของการติดสีตั้งแต่ระดับปานกลางถึงมากคิดเป็นร้อยละ 50 (5 รายใน 10 ราย) โดยสรุปว่ามีรูปแบบการติดสีที่คล้ายคลึงกันระหว่างรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากที่มีการติดสีระดับปานกลางถึงเข้มกับเนื้อเยื่อมะเร็งชนิดสควamousเซลล์คาร์ซิโนมา สำหรับเนื้อเยื่อปกติมีการติดสีบางตำแหน่งหรือระดับน้อยคิดเป็นร้อยละ 60 (6 รายใน 10 ราย) แต่อย่างไรก็ตาม ในการศึกษานี้มีข้อจำกัดในเรื่องกลุ่มควบคุมที่เป็นเนื้อเยื่อปกติมีเพียง 10 ราย ซึ่งอาจจะไม่เพียงพอที่จะสรุปผลและวิธีการแปลผลในการศึกษานี้พิจารณาเพียงระดับความเข้มการติดสีของคาเทปซิน บี รวมทั้งการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์มุ่งเน้นศึกษาคาเทปซิน บี ในแง่เป็นตัวชี้วัดการเปลี่ยนแปลงเป็นมะเร็งของรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากเท่านั้น⁽¹⁸⁾

ซิสเตติน (cystatins)

โดยปัจจุบันเชื่อว่า ซิสเตตินเป็นโปรตีนที่มีบทบาทหลักภายในเซลล์ซึ่งอาจมีบทบาทยับยั้งการหลั่งของคาเทปซินออกสู่ภายนอกเซลล์ได้⁽²⁰⁾ นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกของซิสเตตินในเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันร่างกายและในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโพลิมอร์โฟนิวเคลียร์⁽²¹⁾ มีผู้กล่าวถึงซิสเตตินตั้งแต่ปี ค.ศ. 1960 ว่าสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตตั้งแต่

ในปรีสตีไปจนถึงในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สำหรับในมนุษย์พบซีสเททินได้ถึง 12 ชนิด แบ่งตามลักษณะโครงสร้างได้ 3 ประเภท ดังนี้⁽³⁷⁾

1. ซีสเททิน ประเภทที่ 1 ได้แก่ ซีสเททิน เอ และ บี (cystatins A and B) ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 100 ตัว ซึ่งไม่มีพันธะไดซัลไฟด์ (disulphide bond) และคาร์โบไฮเดรต มีบทบาทหลักอยู่ภายในเซลล์ (intracellular)

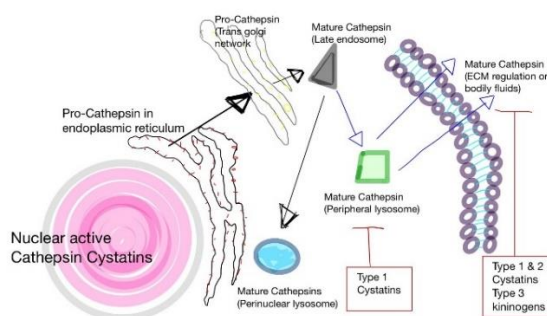
2. ซีสเททิน ประเภทที่ 2 ได้แก่ ซีสเททิน ซี, ดี, อี, เอฟ, จี, เอส เป็นต้น (cystatins C, D, E/M, F, G, S, SN และ SA) ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 120 ตัว มีพันธะไดซัลไฟด์ (disulphide bond) บทบาทหลักอยู่นอกเซลล์ (extracellular)

3. ซีสเททิน ประเภทที่ 3 ได้แก่ ซีสเททิน แอล, เอช (cystatins L, H) คินิโนเจน (kininogens) ประกอบด้วยโมเลกุลขนาดใหญ่ มีบทบาทหลักอยู่ในหลอดเลือด (intravascular proteins)

โดยทั่วไปการทำงานของซีสเททินมีทำหน้าที่เกี่ยวกับการยับยั้งการปล่อยของคาเทปซินจากไลโซโซมอล ซึ่งมีผลต่อกระบวนการตายของเซลล์หรือกระบวนการหลั่งสารต่าง ๆ ของเซลล์ฟาโกไซต์ (phagocyte degranulation)⁽³⁷⁾ นอกจากนี้ซีสเททินยังสามารถยับยั้งคาเทปซินที่หลังจากในเซลล์และคาเทปซินที่มาจากเชื้อจุลินทรีย์หรือปรสิตได้ โดยอาจจะมียบทบาทในการป้องกันการติดเชื้อดังกล่าวได้⁽³⁰⁾

ซีสเททิน เอ

ซีสเททิน เอ ตัวยับยั้งโปรติเอสชนิดแรกที่ถูกพบอยู่ในเซลล์เยื่อบุผิว เซลล์นิวโทรฟิล และเดนไดรติกเซลล์ของเนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลือง⁽³⁸⁾ โดยซีสเททิน เอ ประกอบด้วยกรดอะมิโน 98 ตัว สามารถพบได้จำนวนมากอยู่ภายในเซลล์ร่างกายโดยเฉพาะในผิวหนัง ซีสเททิน เอ เป็นองค์ประกอบของเซลล์ชั้นบนสุดของหนังกำพร้า คือ ชั้นคอร์นนิไฟล์ (cornified layer) ซึ่งจะเป็นเซลล์ที่จะมีการตายเกิดขึ้นตลอดเวลาจึงเกิดการหลุดลอกออกของเซลล์จากผิวหนังของร่างกาย⁽³⁷⁾ จากการศึกษาของ Rinne และคณะปี ค.ศ.1986 พบการแสดงออกของซีสเททิน เอในเดนไดรติกเซลล์ซึ่งเป็นเซลล์ที่สามารถนำเสนอแอนติเจนและอาจจะมียบทบาทยับยั้งการส่งสัญญาณการตายของบีลิโมไฟต์แบบอะพอโตซิสได้ด้วย จึงเชื่อว่าการแสดงออกของซีสเททิน เอในเนื้อเยื่ออาจเกี่ยวข้องกับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันร่างกาย⁽³⁹⁾ นอกจากนี้ การศึกษาบทบาทหน้าที่ของคาเทปซินและตัวยับยั้งโปรติเอสของมันพบว่าซีสเททินประเภทที่ 1 สามารถยับยั้งการปล่อยของคาเทปซินออกสู่ภายนอกเซลล์ได้อีกด้วย⁽²⁰⁾ (ภาพประกอบ 5)



ภาพประกอบ 5 การผลิตและปล่อยคาเทปซินออกจากเซลล์และหน้าที่ของตัวยับยั้งโปรติเอส

ที่มา : Soond SM, Kozhevnikova MV, Townsend PA, Zamyatnin AA. Cysteine Cathepsin Protease Inhibition: An update on its Diagnostic, Prognostic and Therapeutic Potential in Cancer. Pharmaceuticals (Basel). 2019;12(2): 87

คาเทปซิน บี (cathepsin B) และซิสเตติน เอ (cystatins A)

กลไกการยับยั้งการทำหน้าที่ของคาเทปซินด้วยตัวยับยั้งโปรติเอส เกิดขึ้นโดยมีการจับกันระหว่างคาเทปซินกับซิสเตติน จะส่งผลให้คาเทปซินไม่สามารถทำหน้าที่ของมันได้ โดยพบว่ามีรายงานถึง ความสัมพันธ์ระหว่างบทบาทของคาเทปซิน บีกับซิสเตติน เอทั้งในระดับโมเลกุลและในโรคต่าง ๆ โดยพบว่าการคงที่ของการแตกตัวระหว่างคาเทปซินกับซิสเตติน (equilibrium constant for dissociation of complexes) มีค่าที่ต่ำซึ่งอาจจะได้แปลว่า ซิสเตติน เอ สามารถจับกับคาเทปซิน บีได้แน่น⁽¹⁹⁾

นอกจากนี้ Chunsun Li และคณะในปี ค.ศ.2011 ได้ศึกษาการแสดงออกของคาเทปซิน บี และซิสเตติน เอในผู้ป่วยมะเร็งกล่องเสียงในห้องทดลองพบว่า เมื่อมีการยับยั้งการแสดงออกของคาเทปซิน บีในเซลล์ HEP-2 โดย siRNA เซลล์จะมีการลุกลาม (invasion) และการแพร่กระจายของเซลล์ (migration) ได้ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในขณะเดียวกันเมื่อเพิ่มระดับการแสดงออก (overexpression) ของซิสเตติน เอในเซลล์ HEP-2 พบเซลล์มีการลุกลามและการแพร่กระจายของเซลล์ลดลงได้เช่นเดียวกัน⁽²²⁾ จากการศึกษานี้ผู้วิจัยได้เสนอว่า อาจจะมีความสัมพันธ์ระหว่างบทบาทหน้าที่ของคาเทปซิน บีกับซิสเตติน เอ จากที่กล่าวมาจึงเป็นไปได้ว่า การทำงานของคาเทปซิน บีนั้นถูกควบคุมโดยตัวยับยั้งโปรติเอส ได้แก่ ซิสเตติน เอ

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ดำเนินการตามขั้นตอน ดังนี้

- 1.การกำหนดประชากรและการสุ่มกลุ่มตัวอย่าง
- 2.วิธีการทำการทดลอง
- 3.การเก็บรวบรวมข้อมูล
- 4.สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

การกำหนดประชากรการเลือกกลุ่มตัวอย่าง

การคำนวณกลุ่มตัวอย่าง

การคำนวณจำนวนกลุ่มตัวอย่างใช้สูตรคอเครน(Cochran WG.)⁽⁴⁰⁾ โดยการอ้างอิงจากร้อยละการเกิดรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก

$$n = P(1-P)Z^2 / e^2$$

โดยการแทนค่าตัวแปรดังนี้

n= ขนาดของกลุ่มตัวอย่าง

P=ค่าความชุกของการเกิดรอยโรคไลเคนแพลนัส = 0.0127⁽⁴¹⁾

e = ร้อยละความคลาดเคลื่อนจากกลุ่มตัวอย่าง = 0.05

Z = ระดับความเชื่อมั่นที่กำหนดไว้ ณ ความเชื่อมั่นที่ 95 % = 1.96

จากการคำนวณแทนค่าได้จำนวนประชากร 30.11 จึงกำหนดจำนวนประชากรแต่ละกลุ่มเป็น 30 ราย แบ่งกลุ่มเป็น 2 กลุ่มดังนี้

- 1.ชั้นเนื้อปกติของเหงือกไม่เป็นโรค จำนวน 30 ราย
- 2.ชั้นเนื้อรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก จำนวน 30 ราย

ประชากรที่ใช้ในการวิจัย

แบ่งกลุ่มเป็น 2 กลุ่มดังนี้

- 1.ชั้นเนื้อปกติของเหงือกไม่เป็นโรค จำนวน 30 ราย

เกณฑ์การคัดเข้า คือ ชั้นเนื้อเยื่อปกติ เป็นชั้นเนื้อที่อยู่ในพาราฟินบล็อก ได้จากการศึกษาเรื่อง การแสดงออกของคาเทชินและตัวยับยั้งโปรติเอสในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่อง

ปากเมื่อตรวจด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี (Immunohistochemical expression of cathepsin and its protease inhibitor in oral lichen planus) ซึ่งได้รับการรับรองจริยธรรมงานวิจัย จากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมในมนุษย์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เลขที่รับรอง DENTSWU-EC08/2560 ซึ่งเป็นชิ้นเนื้อเห็งือกปกติ ไม่มีการอักเสบ

เกณฑ์การคัดออก คือ ชิ้นเนื้อเยื่อไม่สมบูรณ์ คือไม่สามารถเห็นทั้งชั้นเยื่อผิวและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันได้

2. ชิ้นเนื้อรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก จำนวน 30 ราย

เกณฑ์การคัดเลือก คือ ชิ้นเนื้อของรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก ใช้เป็นชิ้นเนื้อที่มีอยู่ในพาราฟินบล็อกซึ่งเก็บอยู่ในคลังพยาธิวิทยาของคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ทำการสืบค้นข้อมูลตั้งแต่ปี พ.ศ. 2553-2563 โดยชิ้นเนื้อมียางานผลการวินิจฉัยจากลักษณะทางคลินิก ผลการวินิจฉัยทางจุลพยาธิวิทยาหรือ ผลการวินิจฉัยด้วยอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ทางตรง เป็นรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก โดยชิ้นเนื้อที่จะนำมาใช้เพื่อศึกษาต้องมีผลการวินิจฉัยเป็นรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากอย่างน้อย 2 ใน 3 วิธีที่กล่าวมาข้างต้น ซึ่งได้รับการรับรองจริยธรรมงานวิจัย จากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมในมนุษย์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เลขที่รับรอง DENTSWU-EC029/2563X

เกณฑ์การคัดออก คือ ชิ้นเนื้อเยื่อไม่สมบูรณ์ คือไม่สามารถเห็นทั้งชั้นเยื่อผิวและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันได้

วิธีการทำการทดลอง

การศึกษาเป็นการนำชิ้นเนื้อที่ถูกเก็บอยู่ในพาราฟินบล็อก ของคลังพยาธิวิทยา มาย้อมสีด้วยวิธีทางอิมมูโนฮิสโตเคมี เพื่อดูปริมาณการแสดงออกและรูปแบบการแสดงออก โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. ชิ้นเนื้อรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก เป็นชิ้นเนื้อที่มีอยู่แล้ว ในพาราฟินบล็อกของคลังพยาธิวิทยาของคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ โดยทำการสืบค้นข้อมูล ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2553-2563 ทั้งนี้ชิ้นเนื้อจากคลังของแผนกทันตพยาธิวิทยาเป็นข้อมูลที่ได้จากในคณะทันตแพทยศาสตร์และชิ้นเนื้อจากภายนอกคณะทันตแพทยศาสตร์

2. ชิ้นเนื้อเยื่อปกติในพาราฟินบล็อก จากการศึกษาเรื่องการแสดงออกของคาเทปซินและตัวยับยั้งโปรติเอสในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากเมื่อตรวจด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี

(Immunohistochemical expression of cathepsin and its protease inhibitor in oral lichen planus) ซึ่งได้รับการรับรองจริยธรรมงานวิจัยจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมในมนุษย์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เลขที่รับรอง DENTSWU-EC08/2560

3. ทำการย้อมชิ้นเนื้อจากประชากรกลุ่มต่าง ๆ ตามที่ได้กำหนดไว้ เพื่อดูการแสดงของ คาเทปซิน บี และ ซีสเตติน เอ โดยมีชิ้นเนื้อตัวควบคุมแบบบวก (positive control) และตัวควบคุมแบบลบ (negative control)

4. รวบรวมข้อมูล แปลผล และ วิเคราะห์ข้อมูล

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. สไลด์ชนิด glass slide coated (FLEX IHC Microscope slide)
2. เครื่องอบสไลด์ (Shandong SITO Biotechnology Co.Ltd, China)
3. ช่างเก็บความชื้น (humidity chamber)
4. แผ่นปิดสไลด์ (cover slide)
5. ไมโครเวฟ (Samsung, South Korea)
6. ปากกา (DAKO:S2002,USA)
7. กล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสง (Motic, Hong Kong)
8. ช่างใส่สไลด์ (rack)

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. ซีสเตติน เอ แอนติบอดี (Anti-Cystatin A antibody sc-376759: Santacruz Biotechnology.INC)
2. คาเทปซิน บี แอนติบอดี (Anti-Cathepsin B antibody sc-365558: Santacruz Biotechnology.INC)
3. ไซเตรตบัฟเฟอร์ (citrate buffer)
4. ไซเลน (xylene) (Pharmaco-Aaper, USA)
5. เอทานอลแอ็บโซลูท (Ethanol absolute for analysis) (EMSURE, Germany)
6. Bovine serum albumin (Sigma, USA)
7. Tween 20 (Sigma, USA)
8. แอลกอฮอล์แอ็บโซลูท (absolute alcohol)
9. Envision™ FLEX System (DAKO Omnis, USA)

10.Hematoxlin 560MX (Leica Biosystems, Canada)

ขั้นตอนการย้อมด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี

การเตรียมสารเคมี (Chemical preparation)

1. การเตรียมโซเดียมซิเตรทบัฟเฟอร์ (sodium citrate buffer) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ sodium citrate ,0.05% Tween 20 pH 6.0 ใช้สาร Trisodium citrate (dehydrate) 2.94 กรัม ละลายน้ำ 1 ลิตร ได้ความเข้มข้น ปรับค่า pH ด้วย 1 N ของ HCL ใส่ Tween 0.5 มิลลิลิตรแล้วผสมให้เข้ากันที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
2. การเตรียมสาร Envision™ FLEX wash Buffer (20x) สำหรับสารละลาย 1 ลิตร ใช้น้ำกลั่น 950 มิลลิลิตร ผสมกับ wash Buffer 50 มิลลิลิตร
3. การเตรียมสาร Envision™ FLEX Substrate Working Solution โดยนำ Envision™ FLEX substrate buffer (SM803) ปริมาณ 1 มิลลิลิตรผสมกับ Envision™ FLEX DAB 1 หยดและผสม chromogen (DM827) ผสมเมื่อต้องการใช้ เก็บในที่มืดและอุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

การเตรียมชิ้นเนื้อ (Specimen preparation)

ตัดเนื้อที่ต้องการทดสอบและกลุ่มควบคุมที่ฝังในพาราฟินให้มีความหนา 4 ไมครอน วางบนสไลด์ชนิด glass slide coated อบที่ 60 องศาเซลเซียส ใช้เวลาข้ามคืน หลังจากนั้นนำไปผ่านกระบวนการละลายพาราฟิน (deparaffinization) และผ่านกระบวนการเติมน้ำ (rehydrated) ด้วยไซเลน 3 นาที เอทานอลแอ็บโซลูท 3 ครั้ง 3 ภาชนะละ 10 ครั้ง หลังจากนั้นนำไปผ่านน้ำประปา 2-3 นาที

การคืนสภาพแอนติเจน (Antigen retrieving)

ทำการอุ่นสารซิเตรทบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH เท่ากับ 6.0 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 270 มิลลิลิตร ในภาชนะให้เดือดนาน 3 นาที ใส่สไลด์ชิ้นเนื้อแล้วให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟอีกครั้ง 700 วัตต์ นาน 10 นาที รวมทั้งหมดใช้เวลา 13 นาทีแล้วนำมาพักไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที (cool down) โดยเปิดให้น้ำประปาไหลผ่าน 5 นาที

การยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ภายใน (Block endogenous peroxidase activity)

นำสไลด์มาสะอาดแล้วเรียงใส่ในช่องเก็บความชื้นโดยเติมน้ำในchamber เล็กน้อยหลังจากนั้น หยดสาร Envision™ FLEX Peroxidase-blocking reagent (SM801) แล้ว ปิดฝา chamber จับเวลานาน 5 นาที เมื่อครบเวลานำสไลด์มาสะอาด แล้วเรียงใส่ชั้น นำไปผ่าน น้ำประปานาน 5 นาที แล้วนำสไลด์มาล้างด้วย Envision™ FLEX wash buffer (DM831) 10 ครั้ง แล้วเท wash buffer ที่ทิ้ง หลังจากนั้นเติม wash buffer ใหม่ นำสไลด์แช่นาน 5 นาที เก็บ wash buffer ที่ใช้แล้วไว้ไม่ต้องทิ้ง

การยับยั้งการจับแบบไม่จำเพาะ (Block nonspecific background)

เมื่อแช่ wash buffer ครบ 5 นาที นำสไลด์มาสะอาด wash buffer ออกจนหมด เช็ดขอบสไลด์ด้านล่างโดยรอบขึ้นเนื้อนำปากกามาถูกรอบขึ้นเนื้อแล้วเรียงสไลด์ใส่chamberโดย ระวังไม่ให้สไลด์แห้ง หลังจากนั้นจึงหยดสาร protein block (DAKO X0909/ 5% BSA in TBS-T) พอท่วมสไลด์ แล้วทำการปิดฝารอเวลา 10 นาที

การใส่แอนติบอดี (Antibody application)

นำสไลด์มาสะอาด protein block ออกจนหมด ชุบน้ำตรงขอบที่วางปากกา อย่างระมัดระวัง นำสไลด์เรียงใส่ chamber โดยระวังอย่าให้สไลด์แห้ง หลังจากนั้นหยดสาร primary antibody ที่ความเข้มข้น 1: 500 ปริมาณ 100-200 ไมโครลิตรแล้วพักไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน เมื่อครบทำการเคาะ primary antibody ออก แล้วนำสไลด์เรียงใส่ chamber นำไปล้างด้วย wash buffer ที่เตรียมไว้แล้ว 10 ครั้ง หลังจากนั้นเท wash buffer ที่ทิ้งไป นำสไลด์ล้างด้วยการแช่ใน wash buffer ใหม่ อีก 2 ครั้ง ใช้เวลาครั้ง 3 นาที แล้วเก็บ wash buffer ครั้งสุดท้ายไว้ นำสไลด์มาสะอาด wash buffer ออก ชุบน้ำตรงขอบที่วางปากกา ระวังอย่าให้ขอบที่วางหลุด เรียงสไลด์ใส่ chamber โดยระวังอย่าให้สไลด์แห้ง จากนั้นหยดสาร Envision™ FLEX HRP (SM802) พอท่วมสไลด์พักไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที นำสไลด์ล้างด้วยการแช่ใน wash buffer อีก 2 ครั้ง ใช้เวลาครั้ง 3 นาที หลังจากนั้นเท wash buffer ที่ทิ้ง

การย้อมสี (Color development)

เตรียมสาร Envision™ FLEX Substrate Working Solutionไว้ก่อน นำสไลด์มา สะอาด wash buffer ออก แล้วชุบน้ำตรงขอบที่วางปากกา นำสไลด์เรียงใส่ chamber ใช้

ปิเปตพลาสติก หยดสาร Envision™ FLEX Substrate Working Solution พอท่วม ปิดฝา chamber โดยระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศบนสไลด์ เรียงสไลด์ใส่ชั้นรอเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำไปผ่านน้ำประปานาน 5 นาทีหรือมากกว่านั้น เพื่อหยุดปฏิกิริยาทำการ counterstain ด้วยการจุ่มสาร hematoxylin 2-3 ครั้ง แล้วนำไปผ่านน้ำประปา 5 นาที จากนั้นทำการ dehydrated ด้วยการแช่ในเอทานอล 95% จำนวน 2 ภาชนะ ภาชนะละ 10 นาที แช่ด้วยเอทานอลแอ็บโซลูท 2 ภาชนะ ภาชนะละ 10 ครั้ง และ แช่ในไซเลนอีก 2 ภาชนะ ภาชนะละ 10 ครั้งแล้วทำการสลับให้หมด หลังจากนั้นนำสไลด์มาปิดด้วย cover slide

การเก็บรวบรวมข้อมูล

การแปลผลแบ่งเป็น 2 ส่วน ดังนี้

1. การนับจำนวนเซลล์ที่ติดสี

การกำหนดพื้นที่ของชิ้นเนื้อเป็นสี่เหลี่ยม แบบสุ่มตำแหน่ง จำนวน 4 ส่วน ในชั้นของเยื่อบุผิวและจำนวน 4 ส่วนในชั้นของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน โดยเลื่อนสไลด์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ X400 จากด้านซ้ายมือของผู้อ่านไปด้านขวามือของผู้อ่าน ทำการนับจำนวนเซลล์ที่ติดสี ย้อมภายในพื้นที่กำหนดผ่านกล้องจุลทรรศน์ X 400 และบันทึกผลเป็นตารางข้อมูล

2. การดูระดับความเข้มของสีย้อม

โดยวัดระดับความเข้มของการติดสีย้อม ให้ค่าคะแนนตั้งแต่ 0 – 3 บันทึกผลแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ ชั้นเยื่อบุผิวและชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน รายละเอียดคะแนนดังนี้⁽⁴²⁾

คะแนน 0 คือ ไม่มีการติดสี

คะแนน 1 คือ มีระดับการติดสีจาง

คะแนน 2 คือ มีระดับการติดสีปานกลาง

คะแนน 3 คือ มีระดับการติดสีเข้ม

ทำการเก็บรวบรวมข้อมูลทั้ง 2 ส่วน โดยทันตแพทย์ผู้ทำวิจัยที่ได้รับการฝึกฝนการอ่านผลทางจุลพยาธิวิทยาจำนวน 1 คน ซึ่งจะต้องผ่านการทดสอบค่าความเชื่อมั่นระหว่างผู้ประเมินกับทันตแพทย์เฉพาะทางด้านทันตพยาธิวิทยา โดยคำนวณจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ภายในชั้น (Intra-Class Correlation: ICC) และค่าสัมประสิทธิ์โคเฮนแคปปา (Cohen's Kappa)⁽⁴³⁾

3. แปลผลเป็น immunoreactive score (IRS)⁽⁴²⁾ คะแนน 0 – 12 โดยคิดเป็น 2 ส่วน

3.1. ค่า A คือ ร้อยละของจำนวนเซลล์ที่ติดสี คะแนน 0-4

คะแนน 0 คือ ไม่มีเซลล์ที่ติดสี

คะแนน 1 คือ มีจำนวนเซลล์ติดสีน้อยกว่าร้อยละ 10

คะแนน 2 คือ มีจำนวนเซลล์ติดสีร้อยละ 10-50

คะแนน 3 คือ มีจำนวนเซลล์ติดสีมากกว่าร้อยละ 50 - 80

คะแนน 4 คือ มีจำนวนเซลล์ติดสีมากกว่า 80

3.2. ค่า B คือ ระดับความเข้มของการติดสี คะแนน 0 – 3

คะแนน 0 คือ ไม่มีการติดสี

คะแนน 1 คือ มีระดับการติดสีจาง

คะแนน 2 คือ มีระดับการติดสีปานกลาง

คะแนน 3 คือ มีระดับการติดสีเข้ม

โดยค่า immunoreactive score จะคำนวณมาจาก $A \times B$ และแปลผลได้ดังนี้

คะแนน 0-1 แปลผลเป็นลบ (negative)

คะแนน 2-3 แปลผลเป็นบวกน้อย (mild)

คะแนน 4-8 แปลผลเป็นบวกปานกลาง (moderate)

คะแนน 9-12 แปลผลเป็นบวกมาก (strongly positive)

การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูล แบ่งเป็น 2 ส่วน

1.วิเคราะห์เชิงคุณภาพโดยการบรรยายข้อมูลของรูปแบบและลักษณะการติดสีของ
ของคาเทปซิน บี และซีสเททิน เอในเนื้อเยื่อปกติและรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก

2.วิเคราะห์เชิงปริมาณ โดยแบ่งการวิเคราะห์ข้อมูลตามการแปลผลดังนี้

2.1. ข้อมูลเป็นที่มีจำนวนเซลล์ของการติดสีของคาเทปซิน บี และซีสเททิน เอ ใน
เนื้อเยื่อปกติและรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก โดยทั้ง 2 กลุ่มตัวอย่าง แสดงข้อมูลเป็น
ค่าเฉลี่ย (mean)

2.2. ข้อมูลที่เป็นระดับความเข้มของการติดสีของคาเทปซิน บี และซีสเททิน เอ
ในเนื้อเยื่อปกติและรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก แสดงข้อมูลเป็น จำนวนความถี่และร้อยละ

2.3. ถ้าการกระจายตัวข้อมูลเป็นปกติ วิเคราะห์ข้อมูลความแตกต่างระหว่าง
จำนวนเซลล์ของการติดสีของคาเทปซิน บี และซีสเททิน เอ ในเนื้อเยื่อปกติและรอยโรค
ไลเคนแพลนัสในช่องปาก ด้วยสถิติ unpaired T test ถ้าการกระจายตัวของข้อมูลไม่ปกติใช้สถิติ
เป็น Mann-Whitney U test โดยใช้โปรแกรม SPSS statistics เวอร์ชัน 25 ในการคำนวณ

2.4. การวิเคราะห์ข้อมูล ความแตกต่างระหว่างระดับการแสดงออกของคาเทปซิน บีและซีสเตติน เอ ในเนื้อเยื่อปกติและรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก ด้วยสถิติไคสแควร์ (chi-square) โดยใช้โปรแกรม SPSS statistics เวอร์ชัน 25 ในการคำนวณ

2.5. หาระดับความสัมพันธ์ของการแสดงออกของคาเทปซิน บีและซีสเตติน เอ ในเนื้อเยื่อปกติและรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก ด้วยสถิติ ordinal logistic regression และ Spearman correlation โดยใช้โปรแกรม SPSS statistics เวอร์ชัน 25 ในการคำนวณ



บทที่ 4

ผลการดำเนินการวิจัย

ข้อมูลทั่วไปของกลุ่มประชากรที่ศึกษา

ชิ้นเนื้อที่นำมาใช้ศึกษาแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ประกอบด้วย กลุ่มควบคุมเป็นชิ้นเนื้อเหงือกที่ไม่มีการอักเสบอยู่ในพาราฟินบล็อก ได้มาจากผู้ป่วยที่เข้ารับการผ่าตัดฟันคุด จำนวน 30 ราย ในจำนวนนี้เป็นเพศหญิง 16 ราย คิดเป็นร้อยละ 53.3 และเพศชาย 14 ราย คิดเป็นร้อยละ 46.7 อัตราส่วนเพศหญิงต่อเพศชายคิดเป็น 1.14 : 1 โดยมีอายุตั้งแต่ 18-61 ปี (อายุเฉลี่ย 25.55 ± 10.78 ปี) สำหรับกลุ่มทดลองเป็นชิ้นเนื้อรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก จำนวน 30 ราย เป็นชิ้นเนื้อที่มาจากเพศหญิงจำนวน 19 ราย คิดเป็นร้อยละ 63.3 และเป็นเพศชาย 11 ราย คิดเป็นร้อยละ 36.7 มีอัตราส่วนเพศหญิงต่อเพศชายเป็น 1.72 : 1 โดยมีอายุตั้งแต่ 22-84 ปี (อายุเฉลี่ย 55.73 ± 15.22 ปี) ระยะเวลาการเกิดโรคตั้งแต่ 1-72 เดือน โดยมีค่าเฉลี่ยเป็น 17.44 ± 20.91 เดือน และพบรอยโรคโดยบังเอิญ จำนวน 1 ราย

จากประวัติใบส่งตรวจทางพยาธิวิทยา ชิ้นเนื้อรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก มีตำแหน่งที่ตัดชิ้นเนื้อ ได้แก่ กระพุ้งแก้ม จำนวน 21 ราย เป็นคิดร้อยละ 70 บริเวณเหงือก จำนวน 8 ราย คิดเป็นร้อยละ 26.7 และเพดานปาก จำนวน 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 3.3 (ตาราง 1) นอกจากนี้ลักษณะรอยโรคทางคลินิกเป็นชนิดผื่นสีขาว จำนวน 20 ราย รอยโรคชนิดแผลถลอก จำนวน 7 ราย รอยโรคชนิดร่างแห จำนวน 2 ราย และรอยโรคชนิดผ้าขาว จำนวน 1 ราย โดยผู้ป่วยทุกรายที่มีรอยโรคชนิดผื่นสีขาวและแผลถลอกมีอาการเจ็บแสบในช่องปาก โดยเฉพาะเวลารับประทานอาหารเผ็ดร้อน

ตาราง 1 ข้อมูลทั่วไปของกลุ่มประชากรที่ทำการศึกษา

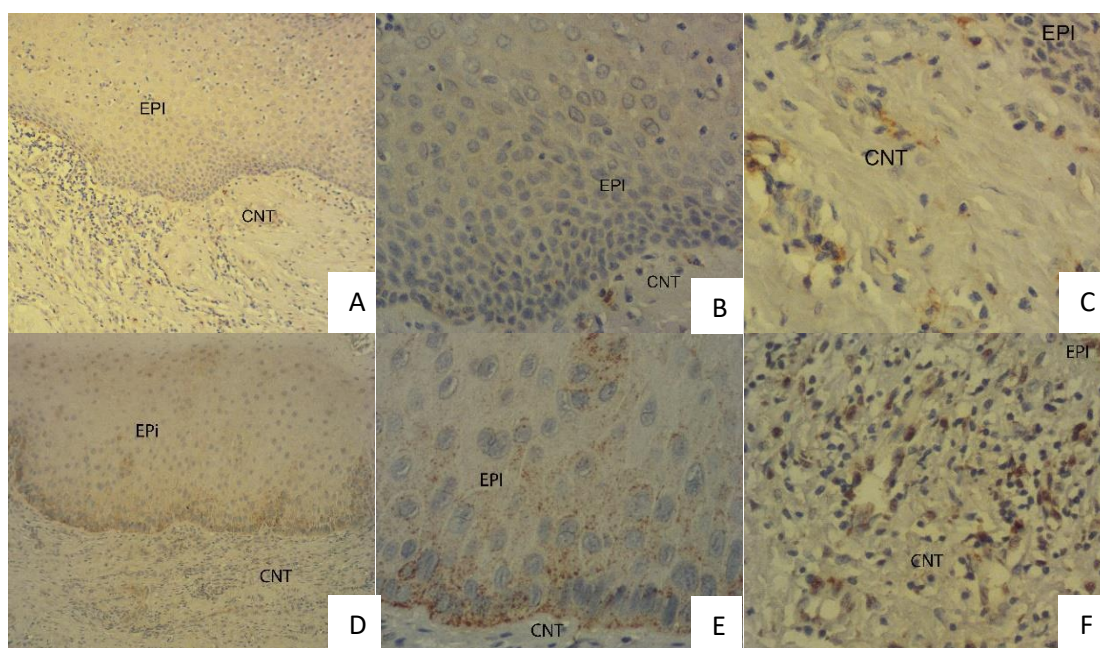
ลักษณะของข้อมูล	รอยโรคไลเคน แพลนัสในช่องปาก	เนื้อเยื่อปกติ
1.เพศ	ราย (ร้อยละ)	ราย (ร้อยละ)
1.1 เพศหญิง	19 (63.3)	16 (53.3)
1.2 เพศชาย	11 (36.7)	14 (46.7)
รวม	30 (100)	30 (100)
2.อายุ		
ค่าต่ำสุด-ค่าสูงสุด(ปี)	22 - 84	18 - 61
ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน(ปี)	55.73 ±15.22	25.55 ± 10.78
3.ตำแหน่งในช่องปากที่ตัดชิ้นเนื้อ	ราย (ร้อยละ)	ราย (ร้อยละ)
3.1.กระพุ้งแก้ม	21 (70)	0 (0)
3.2.เหงือก	8 (26.7)	30 (100)
3.3.เพดาน	1 (3.3)	0 (0)
รวม	30 (100)	30 (100)

ลักษณะการแสดงออกของคาเทชิน บี และซีสเตทิน เอ ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากและเนื้อเยื่อปกติ

ลักษณะการแสดงออกของคาเทชิน บี

ผลการศึกษาพบการแสดงออกของคาเทชิน บี ในชิ้นเนื้อเยื่อปกติ จำนวน 29 ราย จากทั้งหมด 30 ราย โดยพบลักษณะการติดสีทั้งในชั้นเยื่อบุผิวและเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ซึ่งการติดสีในชั้นเยื่อบุผิวจะมีลักษณะเป็นจุดเล็กๆ (granular dot-like) ส่วนมากจะติดสีจางและมีตำแหน่งการติดสีกระจายทั่วไปอยู่ในไซโทพลาซึมและนิวเคลียสของเซลล์ชั้นเยื่อบุผิว สำหรับในชิ้นเนื้อรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากจะพบการแสดงออกของคาเทชิน บี ในทุกราย โดยพบลักษณะการติดสีทั้งในชั้นเนื้อเยื่อบุผิวและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเช่นเดียวกัน โดยในชั้นเยื่อบุผิวจะมีการติดสีเป็นจุดเล็กๆ (granular dot-like) แต่การติดสีส่วนใหญ่จะพบติดสีระดับปานกลางซึ่งกระจายอยู่ในไซโทพลาซึมและนิวเคลียสของเซลล์เยื่อบุผิว แต่จะพบลักษณะการติดสีเป็นจุดที่มีความหนาแน่น

เพิ่มขึ้นในเซลล์ชั้นสตราตัมเบซาลе ส่วนในชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน การแสดงออกของคาเทปซิน บี ในชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและชั้นเนื้อเยื่อโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากนั้น จะพบการติดสีในไซโทพลาซึมและนิวเคลียสของเซลล์อักเสบ ดังแสดงในภาพประกอบ 6



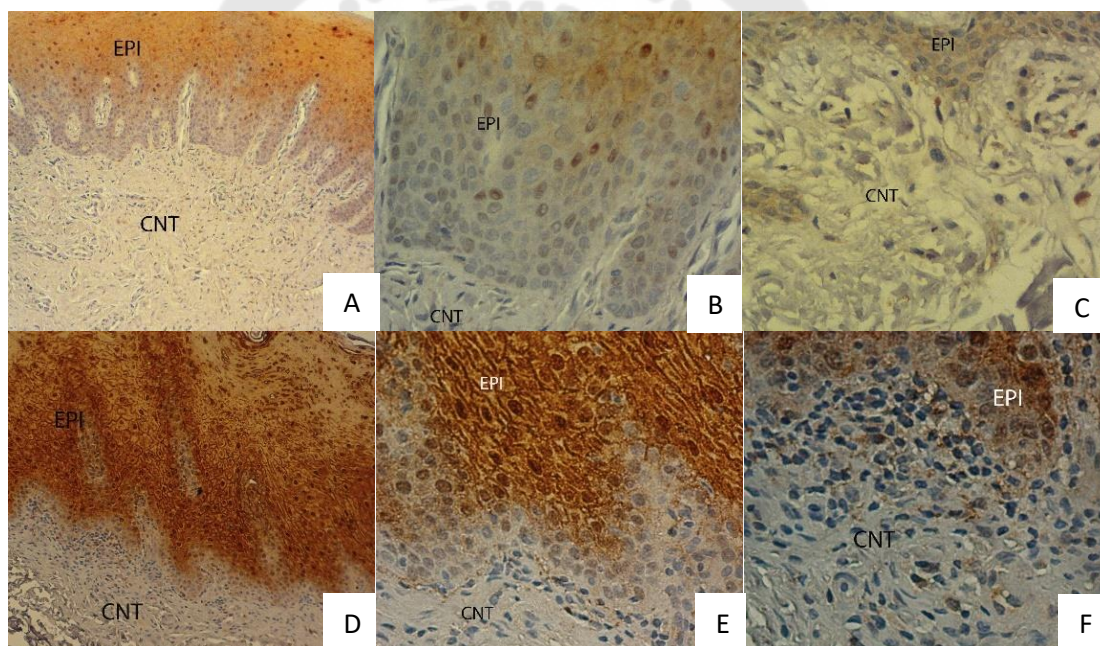
ภาพประกอบ 6 ลักษณะการแสดงออกของคาเทปซิน บี ในชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและชั้นเนื้อเยื่อโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก

รูป A,B,C ชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ส่วนมากจะพบการติดสีจางเป็นจุดเล็กๆทั้งในชั้นเยื่อเมือและเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน โดยพบทั้งในส่วนของไซโทพลาซึมและนิวเคลียสของเซลล์เยื่อเมือและเซลล์อักเสบ และรูป D,E,F ชั้นเนื้อเยื่อโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก ส่วนมากจะพบการติดสีระดับปานกลางเป็นจุดเล็กๆทั้งในชั้นเยื่อเมือและเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน พบลักษณะการติดสีเป็นจุดที่หนาแน่นเพิ่มขึ้นในเซลล์ชั้นสตราตัมเบซาลе (รูป A,D กำลังขยาย 100 เท่า, รูป B,E ชั้นเยื่อเมือ กำลังขยาย 400 เท่า, รูป C,F ชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน กำลังขยาย 400 เท่า) (EPI = Epithelium ,CNT= Connective tissue)

ลักษณะการแสดงออกของซิสเตติน เอ

ผลการศึกษาพบการแสดงออกของซิสเตติน เอ ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน จำนวน 28 ราย จากทั้งหมด 30 ราย และในชั้นเนื้อเยื่อโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากทุกราย โดยทั้งรอยโรคไลเคน

แพลงนัสในช่องปากและเนื้อเยื่ออกปกติจะพบลักษณะการติดสีในชั้นเยื่อผิวเป็นจุดเล็กๆ กระจายอยู่ในไซโทพลาซึมและติดสีเข้มในนิวเคลียสของเซลล์ โดยมีระดับการติดสีเข้มในเซลล์เยื่อผิวชั้นสตราตัมคอร์เนียม, สตราตัมแกรนูโลซัมและสตราตัมสไปโนซัม (stratum corneum, stratum granulosum และ stratum spinosum) แต่จะมีการติดสีจางในเซลล์ชั้นสตราตัมเบซาล (stratum basale) อย่างไรก็ตามจะพบความเข้มการติดสีของชั้นเนื้อเยื่อโรคไลเคนแพลงนัสในช่องปากมีระดับความเข้มมากกว่าในชั้นเนื้อเยื่อปกติ ส่วนในชั้นเนื้อเยื่อปกติจะพบเซลล์ที่ไม่มีการติดสีหรือมีการติดสีจางได้ในเซลล์ชั้นสตราตัมเบซาล สำหรับในชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ทั้งในชั้นเนื้อเยื่อปกติ และชั้นเนื้อเยื่อโรคไลเคนแพลงนัสในช่องปาก จะพบการติดสีในไซโทพลาซึมและนิวเคลียสของเซลล์อักเสบ ดังแสดงในภาพประกอบ 7



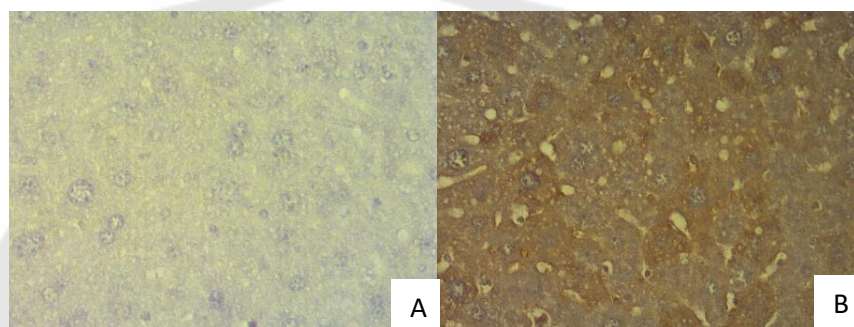
ภาพประกอบ 7 ลักษณะการแสดงออกของซีสเตติน เอ ในชั้นเนื้อเยื่อปกติและชั้นเนื้อเยื่อโรคไลเคนแพลงนัสในช่องปาก

รูป A,B,C ชั้นเนื้อเยื่อปกติ ส่วนมากพบการติดสีเข้มเป็นจุดเล็กๆในส่วนของไซโทพลาซึมและนิวเคลียสของเซลล์ โดยเฉพาะในเซลล์เยื่อผิวส่วนบน แต่จะไม่พบการติดสีหรือพบการติดสีจางในเซลล์ชั้นสตราตัมเบซาล ส่วนในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน พบการติดสีเข้มเป็นจุดเล็กๆทั้งในส่วนของไซโทพลาซึมและนิวเคลียสของเซลล์อักเสบ และ รูป D,E,F เป็นชั้นเนื้อเยื่อโรคไลเคนแพลงนัสในช่องปาก พบลักษณะการแสดงออกเช่นเดียวกับเนื้อเยื่อปกติ แต่พบมีการติดสีเข้ม

กว่า ส่วนในชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันพบการติดสีทั้งในส่วนของไซโทพลาซึมและนิวเคลียสของเซลล์
 อักเสบ (A,D กำลังขยาย 100 เท่า, รูป B,E ชั้นเยื่อบุผิว กำลังขยาย 400 เท่า, รูป C,F ชั้นเนื้อเยื่อ
 เกี่ยวพัน กำลังขยาย 400 เท่า) (EPI = Epithelium ,CNT= Connective tissue)

การแสดงออกของคาเทชิน บี ในเนื้อตับของหนู

การแสดงออกของคาเทชิน บี ในเนื้อตับของหนู ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อควบคุมที่ให้ผลบวก
 ต่อคาเทชิน บี (positive control) จะพบการแสดงออกของคาเทชิน บี ในเซลล์ตับ
 (hepatocyte) และเซลล์เยื่อบุท่อน้ำดี (bile duct epithelium) ดังแสดงในภาพประกอบ 8

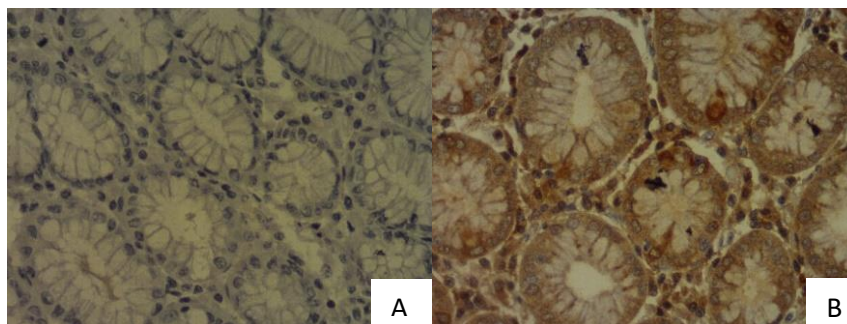


ภาพประกอบ 8 การแสดงออกของคาเทชิน บี ในเซลล์ตับของหนู

รูป A ชั้นเนื้อตับหนูที่ย้อมโดยไม่ใช้คาเทชิน บี แอนติบอดี (negative control) รูป B
 ชั้นเนื้อตับหนูที่ย้อมโดยใช้คาเทชิน บี แอนติบอดี (positive control) กำลังขยาย 400 เท่า

การแสดงออกของซีเตทิน เอ ในเยื่อบุหลอดอาหารของคน

การแสดงออกของซีเตทิน เอ ในเยื่อบุหลอดอาหารของคน ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อควบคุม ที่
 ให้ผลบวกต่อ ซีเตทิน เอ (positive control) พบการติดสีในชั้นเยื่อบุผิวของหลอดอาหาร
 (mucosa) ดังแสดงในภาพประกอบ 9



ภาพประกอบ 9 การแสดงออกของซีสเตติน เอ ในเยื่อบุหลอดอาหารของคน

รูป A ชิ้นเนื้อเยื่อหลอดอาหารของคนที่ย้อมโดยไม่ใช้ซีสเตติน เอ แอนติบอดี (negative control), รูป B ชิ้นเนื้อตับหนูที่ย้อมโดยใช้ซีสเตติน เอ แอนติบอดี (positive control) กำลังขยาย 400 เท่า

จำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของคาเทชิน บี และซีสเตติน เอ ในรอยโรคไลเคน แพลนัสในช่องปากและเนื้อเยื่อปกติ

ผลการศึกษาพบชิ้นเนื้อที่มีการแสดงออกของคาเทชิน บี ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากทุกราย จำนวน 30 ราย คิดเป็นร้อยละ 100 สำหรับชิ้นเนื้อเยื่อปกติ มีการแสดงออกของคาเทชิน บี จำนวน 29 ราย คิดเป็นร้อยละ 96.67 ทั้ง 2 กลุ่ม มีค่าเฉลี่ยร้อยละจำนวนเซลล์ที่แสดงออกในชั้นเยื่อผิวมากกว่าเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน โดยมีค่าเฉลี่ยร้อยละจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของคาเทชิน บี ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากมากกว่าชิ้นเนื้อเยื่อปกติ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) คิดเป็นร้อยละ 53.69 ± 16.23 และ 29.47 ± 25.77 ตามลำดับ (ตาราง 2)

นอกจากนี้พบการแสดงออกของซีสเตติน เอ ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากทุกราย จำนวน 30 ราย คิดเป็นร้อยละ 100 สำหรับชิ้นเนื้อเยื่อปกติ พบมีการแสดงออกของซีสเตติน เอ จำนวน 28 ราย คิดเป็นร้อยละ 93.30 ทั้ง 2 กลุ่ม มีค่าเฉลี่ยร้อยละจำนวนเซลล์ที่แสดงออกในชั้นเยื่อผิวมากกว่าเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน โดยมีค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของซีสเตติน เอ ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากมากกว่าชิ้นเนื้อเยื่อปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) คิดเป็นร้อยละ 63.47 ± 19.86 และ 56.85 ± 28.35 ตามลำดับ (ตาราง 2)

ตาราง 2 ค่าเฉลี่ยร้อยละจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของคาเทปซิน บีและซีสเตติน เอ ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากและเนื้อเยื่อปากติ

ค่าเฉลี่ย จำนวนเซลล์ที่ติดสี (ร้อยละ)	คาเทปซิน บี		ซีสเตติน เอ	
	รอยโรคไล เคนแพลนัส ในช่องปาก	เนื้อเยื่อ ปากติ	รอยโรคไล เคนแพลนัส ในช่องปาก	เนื้อเยื่อ ปากติ
จำนวนชิ้นเนื้อ	N=30	N=30	N=30	N=30
1.ในชั้นเยื่อบุผิว	85.59±14.79	38.98±36.20	90.77±14.63	78.07±31.45
2.ในชั้นเนื้อเยื่อ เกี่ยวพัน	21.79±23.15	19.78±18.91	36.17±31.35	35.63±33.63
3.ทั้งในชั้นเยื่อบุผิว และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน	53.69±16.23	29.47±25.77	63.47±19.86	56.85±28.35

เมื่อแบ่งกลุ่มร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของคาเทปซิน บี ตามเกณฑ์ของ immunoreactive score (IRS) โดยมีการแปลผลร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออก (ค่า A) มีค่าคะแนนตั้งแต่ 0-4 ได้แก่ คะแนน 0 คือ ไม่มีเซลล์ที่มีการแสดงออก คะแนน 1 คือ มีจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกน้อยกว่าร้อยละ 10 คะแนน 2 คือ มีจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออก ร้อยละ 10-50 คะแนน 3 คือ มีจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออก มากกว่าร้อยละ 50 - 80 และคะแนน 4 คือ มีจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกมากกว่า ร้อยละ 80⁽⁴²⁾

พบว่าชิ้นเนื้อรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก จำนวน 30 ราย มีค่าฐานนิยมของคะแนน เป็น 3 คือ มีจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกมากกว่าร้อยละ 50- 80 คะแนน จำนวน 19 ราย คิดเป็น ร้อยละ 63.3 ในขณะที่ชิ้นเนื้อเยื่อปากติ ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม พบค่าฐานนิยมของคะแนนเป็น 2 คือ มีจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกร้อยละ 10-50 คะแนน จำนวน 13 ราย คิดเป็นร้อยละ 43.3 (ตาราง 3) นอกจากนี้พบว่าค่าคะแนนของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของคาเทปซิน บีระหว่าง รอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากและเนื้อเยื่อปากติมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$)

สำหรับค่าคะแนนของร้อยละจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออก (ค่า A) ของชีสเตติน เอ ใน รอยโรคไลแคนแพลนัสในช่องปากและเนื้อเยื่อปากปติ มีค่าฐานนิยมของคะแนนเป็น 3 ทั้ง 2 กลุ่ม โดยพบว่าขึ้นเนื้อรอยโรคไลแคนแพลนัสในช่องปาก ที่มีจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกมากกว่าร้อยละ 50-80 มีจำนวน 14 ราย คิดเป็นร้อยละ 46.7 และขึ้นเนื้อเยื่อปากปติ มีจำนวน 10 ราย คิดเป็น ร้อยละ 33.3 (ตาราง 3) อย่างไรก็ตามค่าคะแนนของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของชีสเตติน เอ ระหว่างรอยโรคไลแคนแพลนัสในช่องปากกับเนื้อเยื่อปากปติ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.182$)

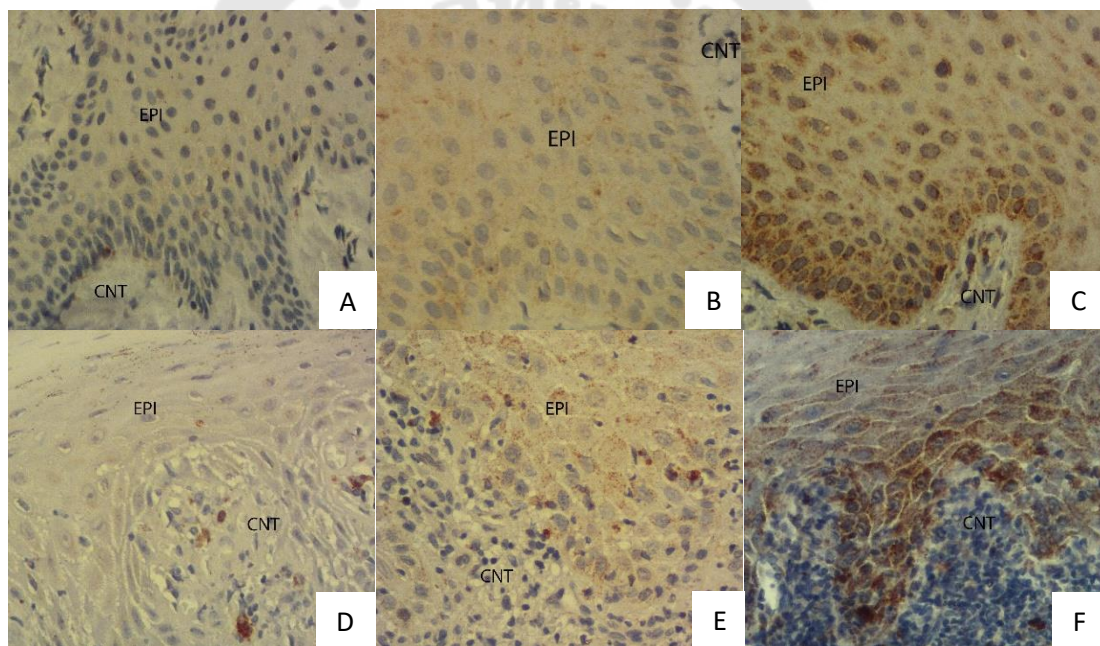
ตาราง 3 ความถี่คะแนนของร้อยละจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของคาเทปซิน บีและชีสเตติน เอ ในกลุ่มประชากรทั้ง 2 กลุ่ม

จำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออก (A)	คาเทปซิน บี		ชีสเตติน เอ	
	รอยโรคไลแคนแพลนัสในช่องปาก	เนื้อเยื่อปากปติ	รอยโรคไลแคนแพลนัสในช่องปาก	เนื้อเยื่อปากปติ
	N=30	N=30	N=30	N=30
	ราย(ร้อยละ)	ราย(ร้อยละ)	ราย(ร้อยละ)	ราย(ร้อยละ)
1. ร้อยละ 0	0 (0)	1 (3.3)	0 (0)	2 (6.7)
2. <ร้อยละ 10	0 (0)	9 (30.0)	0 (0)	2 (6.7)
3. ร้อยละ 10-50	10 (33.3)	13 (43.3)	9 (30.0)	8 (26.7)
4. >ร้อยละ 50-80	19 (63.3)	6 (20.0)	14 (46.7)	10 (33.3)
5. >ร้อยละ 80	1 (3.3)	1 (3.3)	7 (23.3)	8 (26.7)
รวม	30 (100)	30 (100)	30 (100)	30 (100)

ความเข้มของการติดสีของของคาเทชิน บี และซีสเตทิน เอ ในรอยโรคไลเคนแพลนัส ในช่องปากและเนื้อเยื่อปกติ

ในการศึกษานี้แปลผลระดับความเข้มของการติดสี ตามเกณฑ์ของ immunoreactive score (IRS) โดยค่า B เป็นคะแนนตั้งแต่ 0 – 3 ดังนี้ (1)คะแนน 0 แปลผลเป็นไม่มีการติดสี (2)คะแนน 1 แปลผลเป็นมีระดับการติดสีจาง (3) คะแนน 2 แปลผลเป็น มีระดับการติดสีปานกลาง (4) คะแนน 3 แปลผลเป็นมีระดับการติดสีเข้ม⁽⁴²⁾

เมื่อย้อมคาเทชิน บี ในชิ้นเนื้อเยื่อปกติและชิ้นเนื้อรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก สามารถพบระดับความเข้มในการติดสี แบ่งได้เป็น 3 ระดับ คือ ติดสีจาง ติดสีปานกลาง และติดสีเข้ม ดังแสดงในภาพประกอบ 10

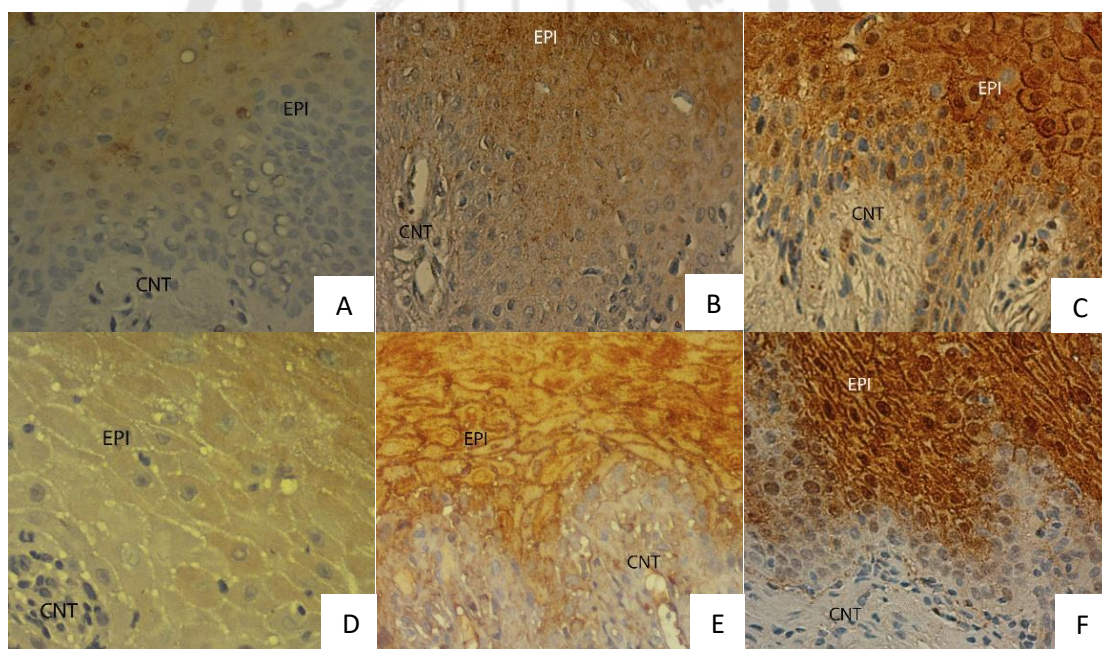


ภาพประกอบ 10 ระดับความเข้มการติดสีของคาเทชิน บี ในชิ้นเนื้อเยื่อปกติและในชิ้นเนื้อรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก

รูป A,B,C ชิ้นเนื้อเยื่อปกติ D,E,F ชิ้นเนื้อรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก รูป A,D แสดงการติดสีจาง รูป B,E แสดงการติดสีปานกลาง และรูป C,F แสดงการติดสีเข้ม กำลังขยาย 400 เท่า (EPI = Epithelium ,CNT= Connective tissue)

ผลการศึกษาระดับความเข้มของการติดสี (ค่า B) คาเทชิน บี ของรอยโรคไลเคน แพลนัสในช่องปาก มีค่าฐานนิยมของคะแนนเป็น 2 คือระดับการติดสีปานกลาง จำนวน 14 ราย คิดเป็นร้อยละ 46.7 ในขณะที่เนื้อเยื่อปกติ มีค่าฐานนิยมของคะแนนเป็น 1 คือมีระดับการติดสี ง่าย จำนวน 16 ราย คิดเป็นร้อยละ 53.3 และพบชิ้นเนื้อที่ไม่ติดสี จำนวน 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 3.3 (ตาราง 3) อย่างไรก็ตาม ค่าคะแนนของระดับความเข้มของการติดสีคาเทชิน บี ระหว่างรอย โรคไลเคนแพลนัสในช่องปากกับเนื้อเยื่อปกติ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.254$)

เมื่อย้อมสีเตทิน เอ ในชิ้นเนื้อเยื่อปกติและชิ้นเนื้อรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก สามารถพบระดับความเข้มในการติดสี แบ่งได้เป็น 3 ระดับเช่นกัน คือ ติดสีง่าย ติดสีปานกลาง และติดสีเข้ม ดังแสดงในภาพประกอบ 11



ภาพประกอบ 11 ระดับความเข้มการติดสีของซีเตทิน เอ ในชิ้นเนื้อเยื่อปกติและในชิ้นเนื้อรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก

รูป A,B,C ชิ้นเนื้อเยื่อปกติ D,E,F ชิ้นเนื้อรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก รูป A,D แสดงการติดสีง่าย รูป B,E แสดงการติดสีปานกลางและรูป C,F แสดงการติดสีเข้ม กำลังขยาย 400 เท่า (EPI = Epithelium ,CNT= Connective tissue)

ผลการศึกษาระดับความเข้มของการติดสี (ค่า B) ซีสเตทิน เอ ของรอยโรคไลเคนแพลนัส ในช่องปากและเนื้อเยื่อปาก พบว่าในชั้นเนื้อรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก มีค่านิยามของคะแนนเป็น 3 แปลผลเป็นระดับการติดสีเข้ม จำนวน 22 ราย คิดเป็นร้อยละ 73.3 ในขณะที่เนื้อเยื่อปากพบมีค่านิยามของคะแนนเป็น 3 แปลผลระดับการติดสีเข้ม จำนวน 14 ราย คิดเป็นร้อยละ 46.7 (ตาราง 4) โดยพบว่าค่าคะแนนของระดับความเข้มการติดสีซีสเตทิน เอ ระหว่างรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากกับเนื้อเยื่อปาก มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.018$)

ตาราง 4 ความเข้มของเซลล์ที่มีการติดสีของคาเทชิน บี และซีสเตทิน เอ ในกลุ่มประชากรทั้ง 2 กลุ่ม

ค่าคะแนนความ เข้มของการติดสี (B)	คาเทชิน บี		ซีสเตทิน เอ	
	รอยโรคไล เคนแพลนัส ในช่องปาก	เนื้อเยื่อ ปาก	รอยโรคไล เคนแพลนัส ในช่องปาก	เนื้อเยื่อ ปาก
	N=30 ราย(ร้อยละ)	N=30 ราย(ร้อยละ)	N=30 ราย(ร้อยละ)	N=30 ราย(ร้อยละ)
0 = ไม่มีติดสี	0 (0)	1 (3.3)	0 (0)	2 (6.7)
1 = ติดสีจาง	7 (23.3)	16 (53.3)	2 (6.7)	4 (13.3)
2 = ติดสีปานกลาง	14 (46.7)	8 (26.7)	6 (20.0)	10 (33.3)
3 = ติดสีเข้ม	9 (30.0)	5 (16.7)	22 (73.3)	14 (46.7)
รวม	30 (100)	30 (100)	30 (100)	30 (100)

ค่าคะแนน IRS ของการแสดงออกของคาเทชิน บี และซีสเตทิน เอ ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากและเนื้อเยื่อปาก

เมื่อคำนวณค่าคะแนน immunoreactive score (IRS) จากผลคูณค่าคะแนนร้อยละ จำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกกับคะแนนระดับความเข้มการติดสี ($A \times B$) โดยแปลผลดังนี้ (1)ระดับ

คะแนน 0-1 แปลผลเป็นลบ (negative) (2) ระดับคะแนน 2-3 แปลผลเป็นบวกระดับน้อย (mild) (3) ระดับคะแนน 4-8 แปลผลเป็นบวกระดับปานกลาง (moderate) และคะแนน 9-12 แปลผลเป็นบวกระดับมาก (strongly positive)⁽⁴²⁾

ผลการศึกษาพบค่าคะแนน IRS ของการแสดงออกของคาเทชิน ปี ในรอยโรคไลเคน แพลนัสในช่องปากแปลผลเป็นบวกทุกราย ส่วนใหญ่มีค่า IRS แปลผลเป็นบวกระดับปานกลางถึงมาก จำนวน 23 ราย คิดเป็นร้อยละ 76.7 ในขณะที่เนื้อเยื่อปกติ ส่วนใหญ่มีค่า IRS แปลผลลบ และเป็นบวกระดับน้อย จำนวน 18 ราย คิดเป็นร้อยละ 60 (ตาราง 4) โดยค่า IRS ของคาเทชิน ปี ระหว่างรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากกับเนื้อเยื่อปกติ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.014$) สำหรับค่าคะแนน IRS ของการแสดงออกของซีเอสเตทิน เอ ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากแปลผลเป็นบวกทุกราย ส่วนใหญ่มีค่า IRS แปลผลเป็นบวกระดับมาก จำนวน 21 ราย คิดเป็นร้อยละ 70 ในขณะที่เนื้อเยื่อปกติ ส่วนใหญ่มีค่า IRS แปลผลเป็นบวกระดับปานกลาง จำนวน 12 ราย คิดเป็นร้อยละ 40 และ แปลผลเป็นบวกระดับมาก จำนวน 12 ราย คิดเป็นร้อยละ 40 (ตาราง 5) โดยพบระดับค่า IRS ของซีเอสเตทิน เอ ระหว่างรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากกับเนื้อเยื่อปกติ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.008$)

ตาราง 5 ระดับคะแนน immunoreactive score (IRS) ของคาเทปซิน บี และ ซีสเดทิน เอ ในกลุ่มประชากรทั้ง 2 กลุ่ม

ค่าคะแนน IRS=(AxB)	คาเทปซิน บี		ซีสเดทิน เอ	
	รอยโรคไล เคนแพลนัส ในช่องปาก	เนื้อเยื่ออก ปกติ	รอยโรคไล เคนแพลนัส ในช่องปาก	เนื้อเยื่ออก ปกติ
	N=30	N=30	N=30	N=30
	ราย(ร้อยละ)	ราย(ร้อยละ)	ราย(ร้อยละ)	ราย(ร้อยละ)
0-1 แปลผลเป็น ลบ(negative)	0 (0)	9 (30.0)	0 (0)	4 (13.3)
2-3 แปลผลเป็น บวกระดับน้อย (mild)	7 (23.3)	9 (30.0)	2 (6.7)	2 (6.7)
4-8 แปลผลเป็น บวกระดับปาน กลาง (moderate)	14 (46.7)	8 (26.7)	7 (23.3)	12 (40.0)
9-12 แปลผลเป็น บวกระดับมาก (strongly positive)	9 (30.0)	4 (13.3)	21 (70.0)	12 (40.0)
รวม	30 (100)	30 (100)	30 (100)	30 (100)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายและข้อเสนอแนะ

ในการวิจัยเรื่องการแสดงออกของคาเทชิน บี และซีสเททิน เอ ในรอยโรคไลเคนแพลนัส ในช่องปาก การศึกษานี้ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างการแสดงออกของคาเทชิน บี และการแสดงออกของซีสเททิน เอ ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากกับเนื้อเยื่อปกติ ด้วยวิธีทางอิมมูโนฮิสโตเคมี โดยแบ่งหัวข้อการสรุปผลได้ดังนี้

1. สรุปผลการวิจัย
2. อภิปรายผลการวิจัย
3. ข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

การแสดงออกของคาเทชิน บีและซีสเททิน เอ

จากการศึกษาในครั้งนี้ พบการแสดงออกของคาเทชิน บีและซีสเททิน เอ ในชั้นเนื้อ รอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากทุกราย (30 ราย) สำหรับชั้นเนื้อเยื่อปกติพบการแสดงออกของ คาเทชิน บี และซีสเททิน เอ จำนวน 29 รายและ 28 ราย ตามลำดับ

ลักษณะการแสดงออกของคาเทชิน บี ในชั้นเนื้อรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก พบการติดสีส่วนใหญ่อยู่ในชั้นเยื่อผิว โดยติดสีทั้งในนิวเคลียสและไซโทพลาซึมของเซลล์ มีความหนาแน่นของการติดสีที่เพิ่มขึ้นโดยเฉพาะเบซิลเซลล์ สำหรับชั้นเนื้อเยื่อปกติพบการติดสีใน เซลล์กระจายทั่วทั้งชั้นเยื่อผิว ส่วนในชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของทั้งรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก และเนื้อเยื่อปกติ พบการติดสีเข้มในเซลล์อักเสบ โดยมีค่าเฉลี่ยร้อยละจำนวนเซลล์ที่มีการ แสดงออกของคาเทชิน บีและระดับคะแนนของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของคาเทชิน บีใน รอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากมากกว่าเนื้อเยื่อปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) อย่างไรก็ตาม ไม่พบความแตกต่างของระดับความเข้มของการติดสีคาเทชิน บีระหว่างทั้งสอง กลุ่ม ($p = 0.254$) สำหรับระดับค่าคะแนน IRS ของคาเทชิน บีในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่อง ปาก พบมีค่ามากกว่าเนื้อเยื่อปกติ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.014$)

ลักษณะการแสดงออกของซีสเททิน เอ ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก พบการ ติดสีส่วนใหญ่อยู่ในชั้นเยื่อผิวทั้งในนิวเคลียสและไซโทพลาซึมของเซลล์ โดยมีระดับการติดสีเข้ม โดยเฉพาะในชั้นสตราตัมคอร์เนียม, สตราตัมแกรนูโลซัมและสตราตัมสไปโนซัม (stratum

corneum, stratum granulosum และ stratum spinosum) และติดสีจางลงในชั้นสตราตัมเบซาล (stratum basale) สำหรับเนื้อเยื่อปกติ พบลักษณะการติดสีเช่นเดียวกับชั้นเนื้อรอยโรคไลเคน แพลนัสในช่องปาก แต่มีระดับความเข้มการติดสีของเบซิลเซลล์จางกว่าชั้นเนื้อรอยโรค โดยพบค่าเฉลี่ยร้อยละจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของซีเอสเตทิน เอ ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก มากกว่าชั้นเนื้อเยื่อปกติ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) อย่างไรก็ตาม พบว่าค่าคะแนน จำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของคาเทชิน บีระหว่างทั้งสองกลุ่มไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.182$) สำหรับระดับความเข้มการติดสีของซีเอสเตทิน เอ และค่าคะแนน IRS ของซีเอสเตทิน เอ ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากมีค่ามากกว่าเนื้อเยื่อปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.018$ และ $p = 0.008$ ตามลำดับ)

จากผลการศึกษาสรุปได้ว่าพบการแสดงออกของคาเทชิน บีและซีเอสเตทิน เอ ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากมากกว่าเนื้อเยื่อปกติ จึงอาจเป็นไปได้ว่าทั้ง คาเทชิน บี และ ซีเอสเตทิน เอ อาจมีบทบาทในการดำเนินโรคของไลเคนแพลนัสในช่องปาก อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ยังไม่สามารถสรุปความสัมพันธ์ระหว่างคาเทชิน บีและซีเอสเตทิน เอ ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากได้ จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปในอนาคต

อภิปรายผลการวิจัย

ไลเคนแพลนัส เป็นโรคเรื้อรังที่พบได้ทั้งผิวหนังและเยื่อช่องปาก พบอุบัติการณ์การเกิด รอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากได้ตั้งแต่ร้อยละ 0.1-4 ของประชากรที่ศึกษา⁽¹⁾ โดยรอยโรคไลเคน แพลนัสในช่องปาก มีลักษณะอาการนำของผู้ป่วยได้หลากหลาย ตั้งแต่ไม่มีอาการหรือมีอาการ ระคายเคืองในช่องปากจนถึงมีอาการปวดแสบ ปวดร้อนและส่งผลต่อคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยได้ อย่างไรก็ตาม สาเหตุและการดำเนินโรคของไลเคนแพลนัสยังไม่ทราบแน่ชัด แต่เชื่อว่าเกี่ยวข้องกับ ความผิดปกติของการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันชนิดทีเซลล์เป็นสื่อ⁽⁸⁾ ในการศึกษาครั้งนี้จึงสนใจ ศึกษาการแสดงออกของคาเทชิน บี และซีเอสเตทิน เอ ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก เนื่องจากมีรายงานว่าคาเทชิน บี มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการทำงานของกระบวนการนำเสนองาน แอนติเจนของเซลล์เม็ดเลือดขาว กระบวนการปรับรูปและสลายตัวของเมทริกซ์นอกเซลล์และ กระบวนการตอบสนองการอักเสบที่เกิดจากแอนติเจน เป็นต้น⁽¹⁷⁾ และซีเอสเตทิน เอ ซึ่งเป็นตัวยับยั้ง โปรตีนเอสที่ถูกพบอยู่ในเซลล์เยื่อผิว เซลล์นิวโทรฟิล และเดนไดรติกเซลล์ของเนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลืองนั้นก็มียางานว่ามีบทบาทที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายเช่นกัน⁽⁴⁴⁾ นอกจากนี้การศึกษาในผิวหนังของหนู มียางานว่าการแสดงออกของซีเอสเตทิน เอ มีบทบาท

เกี่ยวข้องกับพัฒนาการของเซลล์ชั้นเยื่อบุผิว(development)⁽³⁸⁾ ดังนั้นคาเทชิน บีและซีสเตทิน เอ อาจมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการดำเนินโรคของไลเคนแพลนัสในช่องปากได้

การศึกษานี้ได้ทำการศึกษาในชั้นเนื้อของผู้ป่วยที่มีรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก จำนวน 30 ราย ในจำนวนนี้เป็นเพศหญิง 19 รายและเพศชาย 11 ราย โดยคิดเป็นอัตราส่วนเพศหญิงต่อเพศชายเป็น 1.72 :1 มีอายุตั้งแต่ 22-84 ปี (อายุเฉลี่ย 55.73 ± 15.22 ปี) (ตาราง 1) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในประเทศไทยของ Thongprasom และคณะ ที่ทำการศึกษาในผู้ป่วยที่มีรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก พบมีอัตราส่วนของเพศหญิงมากกว่าเพศชายและมีอายุตั้งแต่ 17-90 ปี (อายุเฉลี่ย 50.9 ± 13.1)⁽²³⁾ นอกจากนั้น ลักษณะทั่วไปของประชากรที่ศึกษาในครั้งนี้ไม่แตกต่างกับการศึกษาจากต่างประเทศ โดย Eisenและคณะ ปีค.ศ. 2002 ศึกษาในผู้ป่วยที่มีรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากในประเทศสหรัฐอเมริกาจำนวน 723 ราย พบว่ามีอัตราส่วนเพศหญิงต่อเพศชายเป็น 3:1 และมีอายุตั้งแต่ 13-82 ปี (อายุเฉลี่ย 57 ปี)⁽⁴⁵⁾

การศึกษานี้พบการแสดงออกของคาเทชิน บีทั้งในชั้นเนื้อไลเคนแพลนัสในช่องปากและเนื้อเยื่อปกติ โดยมีค่าเฉลี่ยร้อยละจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของคาเทชิน บี ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากมากกว่าเนื้อเยื่อปกติ ($p < 0.001$) รวมทั้งมีระดับค่าคะแนน IRS ของคาเทชิน บี ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากมากกว่าเนื้อเยื่อปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.014$) (ตาราง 5) โดยพบลักษณะการแสดงออกของคาเทชิน บี ของรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากในชั้นเยื่อบุผิวมากกว่าชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (ตาราง 2) พบการติดสีทั้งในนิวเคลียสและไซโทพลาซึมของเซลล์ มีลักษณะการติดสีเป็นจุดเล็ก ๆ (granular dot-like) ซึ่งมีความหนาแน่นของการติดสีเพิ่มมากขึ้นในเบซิลล์เซลล์ สำหรับชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันพบการติดสีเข้มของคาเทชิน บีในเซลล์อักเสบ (ภาพประกอบ 6D-6F) โดยมีระดับความเข้มการติดสีของคาเทชิน บี ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก ส่วนใหญ่ติดสีระดับปานกลาง จำนวน 14 ราย คิดเป็นร้อยละ 46.7 ในขณะที่เนื้อเยื่อปกติส่วนใหญ่พบการติดสีระดับจาง จำนวน 16 ราย คิดเป็นร้อยละ 53.3 (ตาราง 4) ซึ่งผลการศึกษานี้มีความสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Satelur และคณะ ในปี ค.ศ 2017 ซึ่งเป็นเพียงการศึกษาเดียวที่ศึกษาการแสดงออกของคาเทชิน บี ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก โดยรายงานว่าการแสดงออกของคาเทชิน บี ในชั้นเนื้อเยื่อรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก จำนวน 47 รายจากทั้งหมด 50 ราย คิดเป็นร้อยละ 94 และพบการแสดงออกของคาเทชิน บี ทั้งในนิวเคลียสและไซโทพลาซึมของเซลล์ โดยเฉพาะเบซิลล์เซลล์และเซลล์ในชั้นสโตรมาใกล้เคียงกับชั้นเบสเม้นท์เมมเบรน โดยมีระดับความเข้มการติดสีส่วนใหญ่คือติดสีปานกลาง จำนวน 17 ราย คิดเป็นร้อยละ 34 และในการศึกษานี้ ยังรายงานพบการแสดงออก

ของคาเทปซิน บี ในชั้นเนื้อเยื่อปกติเช่นกัน โดยพบการติดสีของคาเทปซิน บี ในชั้นเนื้อจำนวน 6 ใน 10 ราย คิดเป็นร้อยละ 60⁽¹⁸⁾

นอกจากการศึกษาของคาเทปซิน บีในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากแล้ว เคยมีการศึกษาการแสดงออกของคาเทปซิน เค และคาเทปซิน แอล ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากมาก่อน โดย Kitkhajornkiat และคณะ ในปี ค.ศ. 2020 รายงานว่าพบการแสดงออกของคาเทปซิน แอลในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากมากกว่าเนื้อเยื่อปกติ โดยพบลักษณะการติดสีเป็นจุดมีความหนาแน่นเพิ่มขึ้นในเบซิลเซลล์ของชั้นเยื่อผิวและติดสีเข้มในเซลล์อักเสบใกล้เคียงกับชั้นเบสเมมเบรน จึงอาจเป็นไปได้ว่าคาเทปซิน แอลมีบทบาทในการดำเนินโรคของรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก⁽⁴⁶⁾ นอกจากนี้ในปี ค.ศ. 2016 Siponen และคณะรายงานว่าพบการแสดงออกของคาเทปซิน เคในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก โดยพบลักษณะการแสดงออกของคาเทปซิน เค มีการติดสีเป็นจุดเล็กๆในเมลานোসัยต์ (melanocyte) แมคโครฟาจ (macrophage) ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) และเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือด (vascular endothelium) นอกจากนี้พบการติดสีในเบซิลเซลล์ในบางชั้นเนื้อบางส่วน สำหรับในชั้นสโตรมาส่วนใหญ่พบการติดสีอยู่ภายนอกเซลล์และเมื่อทำการรักษารอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก ด้วยยาทาโครลิมัสชนิดทาเฉพาะที่ พบการลดลงของระดับการแสดงออกของคาเทปซิน เค ในรอยโรคโดยเฉพาะบริเวณของชั้นเยื่อผิว คณะผู้วิจัยจึงสรุปว่า คาเทปซิน เค น่าจะมีบทบาทในการดำเนินโรคของรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก⁽⁴⁷⁾ เมื่อพิจารณาลักษณะการติดสีของคาเทปซิน แอล และคาเทปซิน เค ในการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่ามีลักษณะการแสดงออกคล้ายคลึงกับการแสดงออกของคาเทปซิน บี ในการศึกษาครั้งนี้ จึงอาจเป็นไปได้ว่า คาเทปซิน บี อาจมีความสัมพันธ์กับการดำเนินโรคของรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากได้เช่นเดียวกับคาเทปซิน แอลและคาเทปซิน เค

นอกจากนั้นจากการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องกับหน้าที่ของคาเทปซิน บี มีรายงานการศึกษาโดย Xu และคณะ ในปี ค.ศ. 1994 พบว่าคาเทปซิน บี เป็นองค์ประกอบหนึ่งของกระบวนการนำเสนอแอนติเจนต่อเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันร่างกาย เนื่องจากสามารถทำหน้าที่ย่อยสลายสายโปรตีน (Invariant chain) ซึ่งเป็นตัวควบคุมการแสดงออกของ MHC Class II ส่งผลให้ MHC Class II สามารถจับกับแอนติเจนและนำเสนอแอนติเจนต่อระบบภูมิคุ้มกันได้⁽⁴⁸⁾ Guicciardi และคณะ ในปี ค.ศ. 2000 ซึ่งได้ทำการศึกษาในเซลล์ตับของหนู พบว่าคาเทปซิน บี เป็นองค์ประกอบหนึ่งของกระบวนการตายแบบอะพอโตซิสของเซลล์ โดยผ่านการนำส่งสัญญาณของทูมอร์เนกโครซิสแฟกเตอร์-แอลฟา⁽⁴⁹⁾ พบว่าหน้าที่ของคาเทปซิน บี ดังที่กล่าวมา มีความสอดคล้องกับลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก ซึ่งพบว่ามี เคอราติ

ไนไซต์และเบซิลเซลล์ที่ถูกทำลาย บริเวณชั้นเบสเมมเบรนมีการสลายตัวเกิดเนื่องจากกระบวนการตายเป็นลักษณะลิคิฟแฟคทีฟและมีการสะสมของลิพิดที่เรียงตัวเป็นแถบชัดเจนจำนวนมากในชั้นบนของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ซึ่งจากผลการศึกษาที่พบลักษณะการแสดงออกของคาเทปซิน บีเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะเบซิลเซลล์ของชั้นเยื่อบุผิวและเซลล์อักเสบในรอยโรค อาจเป็นข้อสนับสนุนเพิ่มเติมว่าคาเทปซิน บีมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการดำเนินโรคของรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากได้

ตัวยับยั้งโปรติเอสมีหลายชนิดอยู่ในเซลล์ ได้แก่ ซีสเตติน (cystatin) เซอรปิน (serpins) และทรูปโรปิน (thyropins) มีบทบาทควบคุมการทำงานของคาเทปซิน ซึ่งหากสมดุลของคาเทปซินและตัวยับยั้งโปรติเอสเกิดการเปลี่ยนแปลงไปอาจจะมีผลต่อการเกิดโรคต่างๆ ได้ เช่น ข้อกระดูกเสื่อม, โรคข้อรูมาตอยด์, โรคมะเร็ง เป็นต้น⁽¹⁴⁾ สำหรับโรคทางผิวหนัง เช่น โรคผื่นภูมิแพ้ผิวหนัง (atopic dermatitis) พบความสัมพันธ์ระหว่างคาเทปซินและตัวยับยั้งของมันกับกระบวนการหลุดลอก (desquamation process) ของชั้นผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียม (stratum corneum) โดยการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของระดับการแสดงออกของคาเทปซินและตัวยับยั้งของมันสามารถนำไปสู่กระบวนการหลุดลอกก่อนเวลาได้ (premature desquamation) ส่งผลทำให้ชั้นผิวหนังบางลง จึงมีผลต่อความสามารถในการป้องกันอันตรายจากสารกระตุ้นการแพ้หรือเชื้อโรคได้⁽⁵⁰⁾ ซึ่งพบว่ามีผลสอดคล้องกับลักษณะทางคลินิกของรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากบางชนิดที่พบการหลุดลอกหรือบางลงของเยื่อบุผิวในช่องปาก ได้แก่ ไลเคนแพลนัสชนิดผื่นและชนิดแผลลอก เป็นต้น จึงอาจเป็นไปได้ว่าการดำเนินโรคของรอยโรคอาจจะเกี่ยวข้องกับภาวะการเสียสมดุลการแสดงออกของคาเทปซินและตัวยับยั้งของมันไป ทั้งนี้การศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของซีสเตติน เอ ซึ่งเป็นตัวยับยั้งคาเทปซินในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากยังไม่เคยมีมาก่อน ดังนั้นในการศึกษานี้จึงต้องการศึกษาการแสดงออกของคาเทปซิน บี และซีสเตติน เอ ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติ

ผลการศึกษาพบการแสดงออกของซีสเตติน เอ ในชั้นเนื้อรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากทุกราย จำนวน 30 รายและชั้นเนื้อเยื่อปกติ จำนวน 28 ราย จากทั้งหมดจำนวน 30 ราย โดยมีค่าเฉลี่ยร้อยละจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของซีสเตติน เอ ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากมากกว่าเนื้อเยื่อปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) (ตาราง 2) พบลักษณะการแสดงออกของซีสเตติน เอ ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากที่คล้ายคลึงกับเนื้อเยื่อปกติ โดยพบการติดสีทั้งในนิวเคลียสและไซโทพลาซึมของเซลล์ในชั้นเยื่อบุผิว และมีระดับการติดสีเข้มทั้งชั้นเยื่อบุผิวโดยเฉพาะเซลล์ในชั้นสตราตัมคอร์เนียม, สตราตัมแกรนูโลซัมและสตราตัมสไปนซัม

(stratum corneum, stratum granulosum และ stratum spinosum) รวมทั้งพบระดับการติดสีจางลงในชั้นสตราตัมเบซาล (stratum basale) ของชั้นเยื่อผิวหนัง เมื่อพิจารณาระดับความเข้มการติดสีของเบซัลเซลล์ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก จะพบว่าการติดสีที่เข้มกว่าในเนื้อเยื่อปกติ สำหรับการแสดงออกของซีสเตทิน เอ ในชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของทั้ง 2 กลุ่มนั้น พบการติดสีเข้มในนิวเคลียสและไซโทพลาซึมของเซลล์อักเสบ (ภาพประกอบ 7D-7F) นอกจากนี้ระดับความเข้มการติดสีของซีสเตทิน เอ ในชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในช่องปาก พบว่าการติดสีเข้มกว่าเนื้อเยื่อปกติ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.018$) (ตาราง 4) รวมทั้งพบระดับค่าคะแนน IRS ของซีสเตทิน เอ ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากมีค่ามากกว่าเนื้อเยื่อปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน ($p=0.008$) (ตาราง 5) อย่างไรก็ตาม ยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของซีสเตทิน เอ ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากมาก่อน มีเพียงการศึกษาการแสดงผลของซีสเตทิน เอ ในผิวหนังปกติ ตามรายงานของ Palungwachira และคณะ ในปี ค.ศ 2002 ที่ศึกษาการแสดงผลของซีสเตทิน เอ ด้วยวิธีทางอิมมูโนฮิสโตเคมี ส่วนใหญ่พบการติดสีระดับเข้มในชั้นของหนังกำพร้า (epidermis) และมีการติดสีระดับจางลงในเบซัลเซลล์ของชั้นเยื่อผิวหนัง สำหรับชั้นหนังแท้ (dermis) พบการติดสีในเซลล์ไฟโบรบลาสต์และเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือด⁽⁵¹⁾ เห็นได้ว่าจากรายงานลักษณะการแสดงผลของซีสเตทิน เอ ในผิวหนังปกติที่กล่าวมา มีความคล้ายคลึงกับการแสดงผลของซีสเตทิน เอ ในเนื้อเยื่อปกติของการศึกษา

จากการศึกษาของ Takahashi และคณะ ในปี ค.ศ. 2007 ที่ทำการศึกษาทั้งในเซลล์มนุษย์และหนู มีรายงานว่า การแสดงผลของซีสเตทิน เอ สามารถยับยั้งการทำงานของแคสเปส 3 (caspase 3) ในเซลล์ผิวหนังปกติของมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการตายด้วยรังสียูวีบี นอกจากนี้ การแสดงผลของซีสเตทิน เอ ที่เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้พบจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตจากการถูกกระตุ้นด้วยรังสียูวีบีเพิ่มขึ้นด้วยเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่มีการแสดงผลของซีสเตทิน เอ จึงสรุปได้ว่า ซีสเตทิน เอ มีความสามารถในการป้องกันการตายแบบอะพอพโตซิสของเคอราติโนไซต์ที่ถูกกระตุ้นด้วยรังสียูวีบีได้⁽⁵²⁾ ซึ่งในการศึกษานี้พบการแสดงผลของซีสเตทิน เอ ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติ ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากการเพิ่มขึ้นของการแสดงผลของคาเทปซิน บี ส่งผลให้มีการเพิ่มขึ้นของระดับของซีสเตทิน เอ เพื่อยับยั้งการเกิดการตายแบบอะพอพโตซิสของเซลล์เคอราติโนไซต์ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากจากการเพิ่มขึ้นของคาเทปซิน บี เป็นวงจรสะท้อนกลับเชิงลบ (negative feedback loop) จากการที่ ซีสเตทิน เอ อาจจะมีบทบาทในการควบคุมการทำงานของคาเทปซิน บีได้ จึงมีการเพิ่มการแสดงผลออกเช่นเดียวกัน นอกจากนี้ในการศึกษาครั้งนี้ ยังสังเกตพบลักษณะการแสดงผลของ

คาเทปซิน บี ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก ทั้งในด้านจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกและระดับความเข้มการติดสี ที่มีค่าเพิ่มมากขึ้นในเบซัลเซลล์ของชั้นเยื่อบุผิว ขณะที่การแสดงออกของซีสเตทิน เอ ในเบซัลเซลล์ของชั้นเยื่อบุผิวของรอยโรค มีระดับการติดสีจางกว่าบริเวณอื่นในชั้นเยื่อบุผิว อย่างไรก็ตาม การศึกษาในครั้งนี้ยังไม่สามารถสรุปความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของคาเทปซิน บี และซีสเตทิน เอ ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากได้ อาจสรุปได้เพียงว่าการแสดงออกของคาเทปซิน บี และซีสเตทิน เอ ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปาก อาจจะมีบทบาทในการดำเนินโรคของไลเคนแพลนัสในช่องปาก สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างคาเทปซิน บี และซีสเตทิน เอ ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากนั้น จำเป็นจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปในอนาคต

ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการแสดงออกของคาเทปซิน บี และซีสเตทิน เอ ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติด้วยวิธีการทางอิมมูโนฮิสโตเคมีเพียงวิธีเดียว ซึ่งวิธีการทดลองนี้ได้ผลการศึกษาที่อธิบายได้เพียงรูปแบบลักษณะของการแสดงออกของโปรตีนและตัวยับยั้งทั้ง 2 ชนิดเท่านั้น แต่ยังไม่สามารถสรุปความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของคาเทปซิน บี และซีสเตทิน เอ ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากได้ และไม่สามารถบอกความแตกต่างของระดับปริมาณของคาเทปซิน บี และซีสเตทิน เอ ได้ ในการศึกษาครั้งต่อไปผู้วิจัยมีข้อเสนอแนะในการใช้เทคนิคอื่นๆ เพื่อทำการศึกษาเพิ่มเติม เช่น western blot analysis, Immunofluorescent double staining การวัดปริมาณความเข้มข้นของสารละลายจากวิธีการอีไลซ่า (ELISA) หรือ RT-PCR เป็นต้น ซึ่งจะทำให้สามารถศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของคาเทปซิน บี กับซีสเตทิน เอ ในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากได้ดียิ่งขึ้น

บรรณานุกรม

1. Scully C, Beyli M, Ferreiro MC, Ficarra G, Gill Y, Griffiths M, et al. Update on oral lichen planus: etiopathogenesis and management. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998;9(1):86-122.
2. McCartan BE, Healy CM. The reported prevalence of oral lichen planus: a review and critique. *J Oral Pathol Med.* 2008;37(8):447-53.
3. Sugerman PB, Savage NW, Walsh LJ, Zhao ZZ, Zhou XJ, Khan A, et al. The Pathogenesis of Oral Lichen Planus. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002;13(4):350-65.
4. Gupta S, Jawanda MK. Oral Lichen Planus: An Update on Etiology, Pathogenesis, Clinical Presentation, Diagnosis and Management. *Indian J Dermatol.* 2015;60(3):222-9.
5. Alrashdan MS, Cirillo N, McCullough M. Oral lichen planus: a literature review and update. *Arch Dermatol Res.* 2016;308(8):539-51.
6. Lodi G, Scully C, Carrozzo M, Griffiths M, Sugerman PB, Thongprasom K. Current controversies in oral lichen planus: report of an international consensus meeting. Part 1. Viral infections and etiopathogenesis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005;100(1):40-51.
7. Kurago ZB. Etiology and pathogenesis of oral lichen planus: an overview. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2016;122(1):72-80.
8. Roopashree MR, Gondhalekar RV, Shashikanth MC, George J, Thippeswamy SH, Shukla A. Pathogenesis of oral lichen planus-a review. *J Oral Pathol Med.* 2010;39(10):729-34.
9. Thongprasom K, Dhanuthai K, Sarideechaigul W, Chaiyarit P, Chaimusig M. Expression of TNF-alpha in oral lichen planus treated with fluocinolone acetonide 0.1%. *J Oral Pathol Med.* 2006;35(3):161-6.

10. Sugermann PB, Savage NW, Seymour GJ, Walsh LJ. Is there a role for tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in oral lichen planus? *J Oral Pathol Med*. 1996;25(5):219-24.
11. Warnakulasuriya S1 JN, van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med* 2007;36:575-80.
12. Meyer-Hoffert U. Reddish, scaly, and itchy: how proteases and their inhibitors contribute to inflammatory skin diseases. *A Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2009;57(5):345-54.
13. Fonovic M, Turk B. Cysteine cathepsins and extracellular matrix degradation. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1840(8):2560-70.
14. Reiser J, Adair B, Reinheckel T. Specialized roles for cysteine cathepsins in health and disease. *J Clin Invest*. 2010;120(10):3421-31.
15. Vizovisek M, Fonovic M, Turk B. Cysteine cathepsins in extracellular matrix remodeling: Extracellular matrix degradation and beyond. *Matrix Biol*. 2019;75-76:141-59.
16. Kramer L, Turk D, Turk B. The Future of Cysteine Cathepsins in Disease Management. *Trends Pharmacol Sci*. 2017;38(10):873-98.
17. Conus S, Simon HU. Cathepsins and their involvement in immune responses. *Swiss Med Wkly*. 2010;140:w13042.
18. Satelur KP, Bopaiah S, Bavle RM, Ramachandra P. Role of Cathepsin B as a Marker of Malignant Transformation in Oral Lichen Planus: An Immunohistochemical Study. *J Clin Diagn Res*. 2017;11(8):Zc29-zc32.
19. Abrahamson M, Alvarez-Fernandez M, Nathanson CM. Cystatins. *Biochem Soc Trans*. 2003(70):179-99.

20. Soond SM, Kozhevnikova MV, Townsend PA, Zamyatnin AA. Cysteine Cathepsin Protease Inhibition: An update on its Diagnostic, Prognostic and Therapeutic Potential in Cancer. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2019;12(2).
21. Magister S, Kos J. Cystatins in immune system. *J Cancer*. 2013;4(1):45-56.
22. Li C, Chen L, Wang J, Zhang L, Tang P, Zhai S, et al. Expression and clinical significance of cathepsin B and stefin A in laryngeal cancer. *Oncol Rep*. 2011;26(4):869-75.
23. Thongprasom K, Youngnak-Piboonratanakit P, Pongsiriwet S, Laothumthut T, Kanjanabud P, Rutchakitprakarn L. A multicenter study of oral lichen planus in Thai patients. *J Investig Clin Dent*. 2010;1(1):29-36.
24. Bombeccari GP, Guzzi G, Tettamanti M, Gianni AB, Baj A, Pallotti F, et al. Oral lichen planus and malignant transformation: a longitudinal cohort study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011;112(3):328-34.
25. Buajeeb W, Okuma N, Thanakun S, Laothumthut T. Direct Immunofluorescence in Oral Lichen Planus. *J Clin Diagn Res*. 2015;9(8):ZC34-ZC7.
26. Zhao ZZ, Sugerman PB, Zhou XJ, Walsh LJ, Savage NW. Mast cell degranulation and the role of T cell RANTES in oral lichen planus. *Oral Dis*. 2001;7(4):246-51.
27. Lavanya N, Jayanthi P, Rao UK, Ranganathan K. Oral lichen planus: An update on pathogenesis and treatment. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2011;15(2):127-32.
28. Wang F, Gomez-Sintes R, Boya P. Lysosomal membrane permeabilization and cell death. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*. 2018;19(12):918-31.
29. Conus S, Simon H-U. Cathepsins: Key modulators of cell death and inflammatory responses. *Biochem Pharmacol*. 2008;76(11):1374-82.
30. Prunk M, Perisic Nanut M, Sabotić J, Kos J. Cystatins, cysteine peptidase inhibitors, as regulators of immune cell cytotoxicity. *Biochem Pharmacol*. 2017;118.

31. Asagiri M, Hirai T, Kunigami T, Kamano S, Gober HJ, Okamoto K, et al. Cathepsin K-dependent toll-like receptor 9 signaling revealed in experimental arthritis. *Science* (New York, NY). 2008;319(5863):624-7.
32. Honey K, Rudensky AY. Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(6):472-82.
33. Kos J, Mitrovic A, Mirkovic B. The current stage of cathepsin B inhibitors as potential anticancer agents. *Future Med Chem*. 2014;6(11):1355-71.
34. Benarji K, Lakshmi K, Nelakurthi H, Haritha P, Rudraraju A. Cathepsins in oral diseases. *J Dr NTR Univ Health Sci*. 2019;8:153.
35. Ruan J, Zheng H, Rong X, Rong X, Zhang J, Fang W, et al. Over-expression of cathepsin B in hepatocellular carcinomas predicts poor prognosis of HCC patients. *Mol Cancer*. 2016;15(1):17.
36. Hashimoto Y, Kakegawa H, Narita Y, Hachiya Y, Hayakawa T, Kos J, et al. Significance of cathepsin B accumulation in synovial fluid of rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;283(2):334-9.
37. Dubin G. Proteinaceous cysteine protease inhibitors. *Cell Mol Life Sci*. 2005;62(6):653.
38. Scott DK, Lord R, Muller HK, Malley RC, Woods GM. Proteomics identifies enhanced expression of stefin A in neonatal murine skin compared with adults: functional implications. *Br J Dermatol*. 2007;156(6):1156-62.
39. Rinne A, Dorn A, Järvinen M, Alavaikko M, Jokinen K, Hopsu-Havu VK. Immunoelectron microscopical location of the acid cysteine proteinase inhibitor in the lymphatic tissue of the tonsils. *Acta Histochem*. 1986;79(2):137-45.
40. Naing L, Winn T, Rusli BJAooS. Practical issues in calculating the sample size for prevalence studies. *Arch Orofac Sc*. 2006;1:9-14.

41. De Rossi SS, Ciarrocca K. Oral Lichen Planus and Lichenoid Mucositis. *Dental Clinics of North America*. 2014;58(2):299-313.
42. Fedchenko N, Reifenrath J. Different approaches for interpretation and reporting of immunohistochemistry analysis results in the bone tissue - a review. *Diagn Pathol*. 2014;9:221-.
43. Koo TK, Li MY. A Guideline of Selecting and Reporting Intraclass Correlation Coefficients for Reliability Research. *J Chiropr Med*. 2016;15(2):155-63.
44. Magister Š, Kos J. Cystatins in Immune System. *J Can*. 2013;4(1):45-56.
45. Eisen D. The clinical features, malignant potential, and systemic associations of oral lichen planus: a study of 723 patients. *J Am Acad Dermatol*. . 2002;46(2):207-14.
46. Kitkhajornkiat A, Rungsiyanont S, Talungchit S, Jirawechwongsakul P, Taebunpakul P. The expression of Cathepsin L in oral lichen planus. *J Oral Biol Craniofac Res* 2020;10(3):281-6.
47. Siponen M, Bitu CC, Al-Samadi A, Nieminen P, Salo T. Cathepsin K expression is increased in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2016;45(10):758-65.
48. Xu M, Capraro GA, Daibata M, Reyes VE, Humphreys RE. Cathepsin B cleavage and release of invariant chain from MHC class II molecules follow A staged pattern. *Mol Immun*. 1994;31(10):723-31.
49. Guicciardi ME, Deussing J, Miyoshi H, Bronk SF, Svingen PA, Peters C, et al. Cathepsin B contributes to TNF- α -mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c. *J Clin Invest* 2000;106(9):1127-37.
50. Cork MJ, Robinson DA, Vasilopoulos Y, Ferguson A, Moustafa M, MacGowan A, et al. New perspectives on epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis;environment interactions. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118(1):3-21.

51. Palungwachira P, Kakuta M, Yamazaki M, Yaguchi H, Tsuboi R, Takamori K, et al. Immunohistochemical localization of cathepsin L and cystatin A in normal skin and skin tumors. *J Dermatol*. 2002;29(9):573-9.
52. Takahashi H, Komatsu N, Ibe M, Ishida-Yamamoto A, Hashimoto Y, Iizuka H. Cystatin A suppresses ultraviolet B-induced apoptosis of keratinocytes. *J Dermatol Sci*. 2007;46(3):179-87.





การปรับมาตรฐานการประเมินผล

ในการศึกษานี้มีการปรับมาตรฐานการประเมินของทันตแพทย์ผู้ทำวิจัยก่อนการแปลผลข้อมูลงานวิจัย โดยใช้สหสัมพันธ์ภายในชั้น (Intraclass Correlation) และ ค่าสัมประสิทธิ์โคเฮน แคปปา (Cohen's Kappa Coefficient) เพื่อประเมินผลความน่าเชื่อถือระหว่างผู้สังเกต (Inter-rater Reliability) ที่ใช้ผู้ประเมิน 2 คน คือ ทันตแพทย์ผู้ทำวิจัยนี้และทันตแพทย์ผู้เชี่ยวชาญด้านทันตพยาธิวิทยา โดยทำการนับจำนวนเซลล์ที่มีแสดงออกและพิจารณาระดับความเข้มการติดสีจากการสักรูปถ่ายสไลด์ขึ้นเนื้อที่ได้จากกล้องจุลทรรศน์ของชิ้นเนื้อรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากและชิ้นเนื้อเหงือกปกติ ซึ่งผ่านกระบวนการย้อมด้วยวิธีทางอิมมูโนฮิสโตเคมีโดยใช้แอนติบอดี ได้แก่ คาเทปซิน บี และซีสเตติน เอ จำนวน 16 รูป ทำการคำนวณความน่าเชื่อถือระหว่างผู้ประเมินทั้ง 2 คน โดยการวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ภายในชั้น สำหรับค่าคะแนนระดับร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออก (ค่า A) ซึ่งมีค่าคะแนนตั้งแต่ 0-4 และวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์โคเฮนแคปปา สำหรับผลความสอดคล้องกันในการประเมินของค่าคะแนนระดับความเข้มการติดสี (ค่า B) ซึ่งเป็นคะแนนตั้งแต่ 0 – 3 ที่ได้จากการสังเกตของผู้ประเมินทั้งสองคนด้วยโปรแกรม SPSS ได้ผลดังตาราง ก และทำการแปลผลค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ภายในชั้นและค่าสัมประสิทธิ์โคเฮนแคปปา ได้ตามตาราง ข และ ค ตามลำดับ⁽⁴³⁾

ตาราง ก แสดงข้อมูลค่าคะแนน A และ B ของทันตแพทย์ผู้ประเมินทั้ง 2 คน

ลำดับ	ค่าคะแนนระดับจำนวนเซลล์ที่มี การแสดงออก (ค่าA)		ระดับความเข้มการติดสี (ค่าB)	
	ผู้ประเมินคนที่1	ผู้ประเมินคนที่2	ผู้ประเมินคนที่ 1	ผู้ประเมินคนที่ 2
1	1	1	2	1
2	2	2	1	1
3	1	1	1	0
4	2	2	2	2
5	3	3	2	2
6	3	3	3	3
7	1	1	2	2
8	2	2	2	2
9	3	2	2	2
10	1	1	2	2
11	1	1	3	3
12	4	3	3	3
13	2	1	1	1
14	4	4	3	3
15	2	2	1	1
16	4	4	3	3

ตาราง ข แสดงการแปลผลค่าคะแนนสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ภายใน

คะแนนสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ภายใน	ความน่าเชื่อถือของผู้ประเมิน
0.00 – 0.50	มีความสอดคล้องกันในระดับต่ำ
0.50 – 0.74	ความสอดคล้องกันในระดับพอใช้
0.75 – 0.90	ความสอดคล้องกันในระดับดี
0.90 -1.00	ความสอดคล้องกันในระดับดีมาก

ตาราง ค แสดงการแปลผลค่าสัมประสิทธิ์โคเฮนแคปปา Fleiss Levin and Paik (2003)

ค่าสัมประสิทธิ์โคเฮนแคปปา	แปลผล
0.75 – 1.00	ความสอดคล้องกันในระดับดีมาก
0.40 - 0.74	ความสอดคล้องกันในระดับดี
0.00 – 0.39	ความสอดคล้องกันในระดับต่ำ

เมื่อใช้โปรแกรม SPSS คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ภายในของค่าคะแนนระดับจำนวนเซลล์ที่มีแสดงออก ระหว่างผู้ทำวิจัยและผู้เชี่ยวชาญ พบว่าได้ค่าเป็น 0.965 ซึ่งแปลผลได้ว่าความน่าเชื่อถือของผู้ประเมินมีความสอดคล้องกันในระดับดีมาก (ภาพประกอบ ก) และมีค่าสัมประสิทธิ์โคเฮนแคปปา (Cohen's Kappa Coefficient) ของความสอดคล้องระหว่างผู้ประเมินในการให้ค่าคะแนนระดับความเข้มการติดสีเป็น 0.815 ซึ่งแปลผลได้ว่ามีความสอดคล้องกันในระดับดีมาก (ภาพประกอบ ข)

Intraclass Correlation Coefficient

	Intraclass Correlation ^b	95% Confidence Interval		F Test with True Value 0			
		Lower Bound	Upper Bound	Value	df1	df2	Sig.
Single Measures	.932 ^a	.817	.976	28.487	15	15	.000
Average Measures	.965 ^c	.900	.988	28.487	15	15	.000

Two-way mixed effects model where people effects are random and measures effects are fixed.

- The estimator is the same, whether the interaction effect is present or not.
- Type C intraclass correlation coefficients using a consistency definition. The between-measure variance is excluded from the denominator variance.
- This estimate is computed assuming the interaction effect is absent, because it is not estimable otherwise.

ภาพประกอบ ก แสดงผลการคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ภายในของค่าคะแนนระดับร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกจากโปรแกรม SPSS

Symmetric Measures

		Value	Asymptotic Standard Error ^a	Approximate T ^b	Approximate Significance
Measure of Agreement	Kappa	.815	.117	4.881	.000
N of Valid Cases		16			

- Not assuming the null hypothesis.
- Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

ภาพประกอบ ข แสดงผลค่าสัมประสิทธิ์โคเฮนแคปปา ความสอดคล้องกันในการประเมินค่าคะแนนระดับความเข้มการติดสี ภายในจากโปรแกรม SPSS

เอกสารรับรองพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์

MF-04-version-2.0

วันที่ 18 ต.ค. 61



หนังสือยืนยันการยกเว้นการรับรอง
คณะกรรมการจริยธรรมสำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(เอกสารนี้เพื่อแสดงว่าคณะกรรมการจริยธรรมสำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์ ได้พิจารณาโครงการวิจัยนี้)

ชื่อโครงการวิจัย : การแสดงออกของคาเทชิน บี ควเทบซิน แอล และซิสเตติน เอ ในรอยโรคไลเคนแพลนัส
ในช่องปาก
ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย : อาจารย์ ดร. ทันตแพทย์หญิงสินภัทร์ ดลิ่งจิตร
หน่วยงานต้นสังกัด : คณะทันตแพทยศาสตร์
รหัสโครงการวิจัย : SWUEC-029/2563X

โครงการวิจัยนี้เป็นโครงการวิจัยที่เข้าข่ายยกเว้น (Research with Exemption from SWUEC)

วันที่ยืนยัน : 14 เมษายน 2563
ยืนยันโดย : คณะกรรมการจริยธรรมสำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

คณะกรรมการจริยธรรมสำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ดำเนินการ
รับรองโครงการวิจัยตามแนวทางหลักจริยธรรมการวิจัยในคนที่เป็นสากล ได้แก่ Declaration of Helsinki, the
Belmont Report, CIOMS Guidelines และ the International Conference on Harmonization in Good Clinical
Practice (ICH-GCP)

ออกให้ ณ วันที่ 14 เมษายน 2563

(ลงชื่อ).....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทันตแพทย์หญิงณปภา เอี่ยมจิตรกุล)
กรรมการและเลขานุการคณะกรรมการจริยธรรม
สำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์

(ลงชื่อ).....
(แพทย์หญิงสุรพร ภัทรสุวรรณ)
ประธานคณะกรรมการจริยธรรม
สำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์

หมายเลขรับรอง : SWUEC/X-029/2563

ภาพประกอบ ค เอกสารรับรองจริยธรรมโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์ จากคณะกรรมการจริยธรรม
สำหรับพิจารณาโครงการวิจัยในมนุษย์เลขที่ SWUEC-029/2563X

ตารางผลคะแนน IRS ของคาทอลิกจีน ปีและสี่เดือน เอ ในประชากรศึกษาแต่ละราย

ลำดับ	IRS of OLP-B	IRS of OLP-A	IRS of N-B	IRS of N-A
1	2	9	1	6
2	6	9	2	12
3	6	9	4	9
4	4	9	1	9
5	6	4	1	6
6	6	9	1	4
7	6	4	1	4
8	9	12	4	9
9	9	9	2	9
10	2	4	2	4
11	4	6	2	6
12	2	4	1	2
13	6	9	1	3
14	6	9	2	4
15	3	12	2	4
16	2	4	6	12
17	4	9	0	0
18	9	2	2	1
19	9	4	6	1
20	2	12	1	6
21	4	9	6	12
22	9	9	4	9
23	9	12	4	12
24	12	9	12	12
25	9	12	2	4
26	9	2	9	0
27	6	9	2	6
28	6	9	6	12
29	2	12	9	12
30	6	12	9	12

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวแพร บางสุวรรณ
วัน เดือน ปี เกิด	10 พฤศจิกายน 2531
สถานที่เกิด	จังหวัดกรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	ระดับประถมศึกษาถึงมัธยมศึกษา โรงเรียนราชินี ระดับปริญญาตรี ทนตแพทยศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ประกาศนียบัตรบัณฑิตชั้นสูง สาขาวิชาทันตแพทยศาสตร์วิชาเอก ศัลยศาสตร์ช่องปากและแม็กซิลโลเฟเชียล มหาวิทยาลัยมหิดล
ที่อยู่ปัจจุบัน	92/1 หมู่ 11 ต.คลองจินดา อ.สามพราน จ.นครปฐม

