



ผลของสารสกัดหยาบขมิ้นชันต่อไนตริกออกไซด์ และอินดิวิชเบิลไนตริกออกไซด์ซินเทส
ของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ที่กระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ในสภาวะน้ำตาลสูง
EFFECTS OF CURCUMA LONGA CRUDE EXTRACT ON NITRIC OXIDE AND iNOS IN
LPS-STIMULATED HUMAN GINGIVAL FIBROBLAST IN HIGH GLUCOSE CONDITION

กมนพร บุญฤทธิ์

ผลของสารสกัดหยาบขมิ้นชันต่อไนตริกออกไซด์ และอินดิคิเบิลไนตริกออกไซด์ซินเทส
ของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ที่กระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ในสภาวะน้ำตาลสูง



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาทันตกรรมคลินิก
คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2564
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

EFFECTS OF CURCUMA LONGA CRUDE EXTRACT ON NITRIC OXIDE AND iNOS IN
LPS-STIMULATED HUMAN GINGIVAL FIBROBLAST IN HIGH GLUCOSE CONDITION



KAMONPORN BOONYARIT

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of MASTER OF SCIENCE
(Clinical Dentistry)

Faculty of Dentistry, Srinakharinwirot University

2021

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

ผลของสารสกัดหยาบขมิ้นชันต่อไนตริกออกไซด์ และอินดิคิเบิลไนตริกออกไซด์ซินเทส
ของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ที่กระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ในสภาวะน้ำตาลสูง

ของ

กมนพร บุญยฤทธิ์

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาทันตกรรมคลินิก

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร.ณรงค์ศักดิ์ เหล่าศรีสิน) (รองศาสตราจารย์ ดร.ดุษฎี หอมดี)

..... ที่ปรึกษาร่วม กรรมการ
(อาจารย์ ดร.พริมา บุญณสิน) (อาจารย์ ดร.รุ่งทิพา ศรีสุวรรณทนา)

ชื่อเรื่อง	ผลของสารสกัดหยาบขมิ้นชันต่อไนตริกออกไซด์ และอินดิวิชเบิลไนตริกออกไซด์ซินเทส
ผู้วิจัย	กมนพร บุญยฤทธิ์
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2564
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. ณรงค์ศักดิ์ เหล่าศรีสิน
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ ดร. พริมา บุญณลิน

มีการแสดงออกของอินดิวิชเบิลไนตริกออกไซด์ซินเทส (iNOS) ในเนื้อเยื่อเหงือกของผู้ที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบและ/หรือเบาหวาน ซึ่งสัมพันธ์กับการทำลายของเนื้อเยื่อปริทันต์ จึงอาจทำให้ iNOS ถูกใช้เป็นตัวบ่งชี้ของการวัดประสิทธิผลของการรักษาโรคปริทันต์อักเสบ หรือป้องกันโรคปริทันต์อักเสบในผู้ป่วยเบาหวาน เคอร์คิวมินมีคุณสมบัติทั้งด้านการอักเสบและต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นการใช้สารสกัดหยาบขมิ้นชันซึ่งคงสารประกอบอื่นอาจช่วยเสริมผลในการรักษา จึงนำมาสู่การศึกษาผลของสารสกัดหยาบขมิ้นชันต่อการสร้างไนตริกออกไซด์ (NO) และการแสดงออกของ iNOS ในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ (Human gingival fibroblasts; HGF) ที่กระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ (LPS) ในสถานะน้ำตาลสูง โดยสกัดขมิ้นชันด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 และเลี้ยง HGF ในอาหารเลี้ยงเซลล์น้ำตาลปกติ (5.5 มิลลิโมลาร์) หรือน้ำตาลสูง (50 มิลลิโมลาร์) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ต่อมาเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ไม่ผสมซีรัมที่มีสารสกัดหยาบขมิ้นชันความเข้มข้น 15 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ/หรือ LPS 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นวิเคราะห์ความมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT วิเคราะห์การสร้าง NO ด้วย Nitrate assay และวิเคราะห์การแสดงออกของ iNOS ด้วยวิธี qRT-PCR จากการศึกษาพบว่าสารสกัดหยาบขมิ้นชันไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ สถานะน้ำตาลสูงทำให้ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ส่วนการสร้าง NO และการแสดงออกของ iNOS ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่ได้รับและไม่ได้รับสารสกัดหยาบขมิ้นชัน อย่างไรก็ตามสารสกัดหยาบขมิ้นชันมีแนวโน้มลดการแสดงออกของ iNOS ในกลุ่มควบคุมภาวะน้ำตาลสูง ซึ่งอาจอนุมานได้ว่าการใช้สารสกัดหยาบขมิ้นชันเสริมอาจช่วยป้องกันการเกิดภาวะแทรกซ้อน เช่น โรคปริทันต์อักเสบ ในผู้ป่วยเบาหวานที่ควบคุมระดับน้ำตาลได้ไม่ดี

คำสำคัญ : สารสกัดหยาบขมิ้นชัน, เซลล์สร้างเส้นใยเหงือก, ไนตริกออกไซด์, อินดิวิชเบิลไนตริกออกไซด์ซินเทส

Title	EFFECTS OF CURCUMA LONGA CRUDE EXTRACT ON NITRIC OXIDE AND iNOS IN LPS-STIMULATED HUMAN GINGIVAL FIBROBLAST IN HIGH GLUCOSE CONDITION
Author	KAMONPORN BOONYARIT
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2021
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Narongsak Laosrisin
Co Advisor	Dr. Prima Buranasin

Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expresses in the gingival tissue of periodontitis and/or diabetes patients, which is associated with the destruction of periodontal tissues and as a potential therapeutic target. Curcumin has anti-inflammatory and antioxidant properties, so the usage of crude turmeric extract (TUR) may have pharmacological effects on other compounds that could improve therapeutic outcomes. This study aims to investigate the effects of TUR on nitric oxide (NO) production and iNOS expression in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human gingival fibroblasts (HGF) under high glucose conditions. Turmeric was extracted with 95% ethanol. HGF were cultured in normal (5.5 mM) or high (50 mM) glucose media for 72 hours, then the media were replaced with serum-free media containing 15 µg/ml TUR and/or 1 µg/ml LPS for 24 hours. The cell viability was determined by MTT assay. The NO production was assessed by a nitrate assay and the iNOS mRNA expression was evaluated by qRT-PCR. The results showed that TUR had no cytotoxicity. The high glucose condition significantly reduced cell viability ($p < 0.05$). There were no significant differences in NO production and iNOS expression between groups, with and without TUR. However, TUR tended to suppress high glucose-induced iNOS expression in HGF. Therefore, adjunctive therapy with TUR may prevent complications such as periodontitis in patients with uncontrolled diabetes.

Keyword : Crude turmeric extract, Gingival fibroblasts, Nitric oxide, iNOS

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความช่วยเหลือและคำแนะนำจากคณาจารย์หลายท่าน ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รศ.ดร.ทพ.ณรงค์ศักดิ์ เหล่าศรีสิน อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ที่กรุณาให้คำแนะนำในทุกขั้นตอน ช่วยแก้ปัญหา เป็นกำลังใจ และประสิทธิภาพความรู้ขอบพระคุณ อ.ดร.ทพญ.พริมา บุณยสิน อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้สอนเทคนิคในห้องปฏิบัติการ และให้คำแนะนำในการเขียนเล่มปริญญานิพนธ์ ขอบพระคุณ อ.ดร.ทพญ.รุ่งทิพา ศรีสุวรรณทา ผศ.ดร.ทพญ.ชื่นชีวิต ทองศิริ และ อ.ทพญ.จามรี เสมา สำหรับคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ยิ่ง รวมถึงการสนับสนุนด้านวัสดุอุปกรณ์

ขอบพระคุณ ดร.อุดมลักษณ์ สุขอัฒตะ จากสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สำหรับความอนุเคราะห์สารสกัดหยาบขมิ้นชัน

ขอบพระคุณ คุณศิริพงศ์ ตั้งประเสริฐกิจ และ คุณวรรณิ์ ผลสมหวัง เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ สำหรับการสอน และการอำนวยความสะดวกให้สามารถดำเนินการวิจัยจนเสร็จสิ้น

ขอบพระคุณ รศ.ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร คณบดีคณะวิทยาศาสตร์ และ คุณจนิษฐา ชูเลิศ นิสิตปริญญาเอก สำหรับความอนุเคราะห์เครื่องมือวิเคราะห์ รวมถึงการให้คำแนะนำเทคนิคในการวิเคราะห์

ขอบพระคุณ ผศ.ดร.ทพ.ณัฐวุธ แก้วสุทธา คณบดีคณะทันตแพทยศาสตร์ รศ.ดร.นันทนา อรุณฤกษ์ หัวหน้าภาควิชาโษษฐวิทยา และ อ.ดร.ดวงพร ศรีสุภาพ สำหรับคำแนะนำ และความเอื้อเฟื้อในการเข้าใช้ห้องปฏิบัติการในช่วงที่จำกัดการเข้าออกของบุคลากร

ขอบพระคุณสถาบันยุทธศาสตร์ทางปัญญาและวิจัย และคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สำหรับทุนสนับสนุนการวิจัย

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณครอบครัวที่ให้การสนับสนุนเสมอมา และขอบคุณเพื่อนร่วมสาขา สุทธิธ ญาณรังสี และ รพีพรรณ นะภิไจ ที่ร่วมกันฟันฝ่าอุปสรรค และเป็นกำลังใจให้กันจนปริญญานิพนธ์สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

กมลพร บุญยฤทธิ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูปภาพ.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง.....	1
ความมุ่งหมายของงานวิจัย.....	5
ความสำคัญของการวิจัย.....	5
ขอบเขตของการวิจัย.....	5
ประชากรที่ใช้ในการวิจัย.....	5
กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย.....	6
ตัวแปรที่ศึกษา.....	7
นิยามศัพท์เฉพาะ.....	7
กรอบแนวคิดในงานวิจัย.....	8
สมมุติฐานในการวิจัย.....	8
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	9
1. ขมิ้นชัน.....	9
1.1 องค์ประกอบทางเคมีของขมิ้นชัน.....	10
1.2 ผลทางชีวภาพและเภสัชวิทยาของขมิ้นชันและส่วนประกอบ.....	11

1.3 เคอร์คิวมิน	12
1.4 กลไกการออกฤทธิ์ด้านการอักเสบของเคอร์คิวมิน.....	12
1.5 กลไกการออกฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระของเคอร์คิวมิน.....	13
1.6 การศึกษาเคอร์คิวมินที่เกี่ยวข้องกับปริทันตวิทยา	13
1.7 การศึกษาเคอร์คิวมินที่เกี่ยวข้องกับไนตริกออกไซด์.....	14
1.8 การศึกษาสารสกัดหยาบขมิ้นชัน	15
2. โรคเบาหวาน.....	15
2.1 การจำแนกประเภทโรคเบาหวาน.....	15
2.2 การควบคุมระดับน้ำตาล	16
2.3 ภาวะแทรกซ้อนทางระบบของเบาหวาน	16
2.4 ภาวะแทรกซ้อนในช่องปากของโรคเบาหวาน	17
2.5 บทบาทของภาวะเครียดออกซิเดชันและการอักเสบต่อภาวะแทรกซ้อนของ โรคเบาหวานชนิดที่ 2.....	17
3. โรคปริทันต์อักเสบ.....	21
3.1 พยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์อักเสบ.....	21
3.2 การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกายในโรคปริทันต์อักเสบ	21
3.3 บทบาทของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก	24
4. ความสัมพันธ์ของโรคเบาหวานกับโรคปริทันต์อักเสบ	25
4.1 กลไกที่โรคเบาหวานส่งผลต่อโรคปริทันต์.....	25
4.2 กลไกที่โรคปริทันต์อักเสบส่งผลต่อภาวะโรคเบาหวาน	25
4.3 ผลของการรักษาโรคปริทันต์ต่อโรคเบาหวาน	26
4.4 ผลของระดับน้ำตาลสูงต่อการทำงานของเซลล์.....	26
5. ไนตริกออกไซด์.....	28

5.1 การสร้างไนตริกออกไซด์.....	28
5.2 ชีวเคมีของไนตริกออกไซด์	30
5.3 การควบคุมการสร้างไนตริกออกไซด์ด้วย iNOS.....	31
5.4 บทบาทของไนตริกออกไซด์ในโรคปริทันต์อักเสบ	31
5.5 บทบาทของไนตริกออกไซด์ในโรคเบาหวานและโรคปริทันต์อักเสบ	33
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	35
การกำหนดประชากรและการสุ่มกลุ่มตัวอย่าง	35
ประชากร	35
การเลือกกลุ่มตัวอย่าง.....	36
การสร้างเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	36
วิธีการหาคุณภาพเครื่องมือ.....	40
การวิเคราะห์การตอบสนองต่อสารสกัดหยาบขมิ้นชัน	40
การวิเคราะห์ความมีชีวิตของเซลล์.....	41
การวิเคราะห์การสร้างไนตริกออกไซด์.....	41
การวิเคราะห์การแสดงออกของ iNOS ในระดับ mRNA.....	42
การเก็บรวบรวมข้อมูล	45
การจัดกระทำข้อมูลและการวิเคราะห์ข้อมูล	46
บทที่ 4 ผลการศึกษา	48
การวิเคราะห์การตอบสนองต่อสารสกัดหยาบขมิ้นชัน	48
การวิเคราะห์ความมีชีวิตของเซลล์	49
การวิเคราะห์การสร้างไนตริกออกไซด์.....	50
การวิเคราะห์การแสดงออกของ iNOS ในระดับ mRNA	51
บทที่ 5 อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ	53

อภิปรายผลการวิจัย	53
สรุปผลการวิจัย	58
ข้อเสนอแนะ	59
บรรณานุกรม.....	60
ประวัติผู้เขียน.....	74



สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 ผลทางชีวภาพของขมิ้นชันและสารประกอบ.....	11
ตาราง 2 การใช้ขมิ้นชันในการรักษาโรค.....	11
ตาราง 3 สารสังเคราะห์ cDNA.....	44
ตาราง 4 ลำดับเบสของไพรเมอร์.....	45
ตาราง 5 องค์ประกอบของ PCR mix.....	45



สารบัญรูปภาพ

	หน้า
ภาพประกอบ 1 ขมิ้นชัน.....	10
ภาพประกอบ 2 ปฏิกริยาการสร้างไนตริกออกไซด์.....	29
ภาพประกอบ 3 โครงสร้างของ NOS (ก) และลักษณะของ NOS ที่พร้อมทำงาน (ข).....	30
ภาพประกอบ 4 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดหยาบขมิ้นชัน.....	37
ภาพประกอบ 5 ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์เมื่อตอบสนองต่อสารสกัดหยาบขมิ้นชัน (*p < 0.05)	49
ภาพประกอบ 6 ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์กลุ่มต่าง ๆ (*p < 0.05).....	50
ภาพประกอบ 7 ปริมาณไนตริกออกไซด์ (ไมโครโมลาร์) ในน้ำเลี้ยงเซลล์กลุ่มต่าง ๆ (*p < 0.05).....	51
ภาพประกอบ 8 อัตราส่วน (เท่า) การแสดงออกของ iNOS ในระดับ mRNA เทียบกับ β -actin ของ เซลล์กลุ่มต่าง ๆ.....	52

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

เบาหวาน (Diabetes mellitus) เป็นกลุ่มของโรคความผิดปกติของเมตาบอลิซึม (Metabolism) ซึ่งมีระดับกลูโคสในเลือดสูง (Hyperglycemia) เป็นผลมาจากความบกพร่องในการหลั่งอินซูลิน หรือภาวะดื้อต่ออินซูลิน (Insulin resistance) หรือทั้งสองอย่างร่วมกัน อินซูลินจำเป็นสำหรับการขนส่งกลูโคสจากเลือดเข้าสู่เซลล์ ความบกพร่องในการหลั่งอินซูลิน หรือภาวะดื้อต่ออินซูลินทำให้ไม่สามารถขนส่งกลูโคสเข้าสู่เซลล์ จึงเกิดภาวะน้ำตาลในเลือดสูง⁽¹⁾ ซึ่งก่อให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) จากความผิดปกติในการทำงานของไมโทคอนเดรีย (Mitochondrial dysfunction) และการเพิ่มการสร้างอนุมูลอิสระออกซิเจนที่ว่องไว (Reactive oxygen species; ROS) ประกอบกับไขมันในเลือดสูง (Hyperlipidemia) ทำให้เกิดการปล่อยไซโตไคน์ (Cytokine) กระตุ้นการอักเสบจากเนื้อเยื่อไขมัน จากที่กล่าวมาภาวะเครียดออกซิเดชันและการอักเสบที่เกิดขึ้นมีส่วนสำคัญในการดำเนินของโรคเบาหวานชนิดที่ 2 และการเกิดภาวะแทรกซ้อนของโรคเบาหวาน⁽²⁾ ทั้งในระดับหลอดเลือดขนาดเล็ก ได้แก่ เบาหวานขึ้นจอตา (Retinopathy) โรคไตจากเบาหวาน (Nephropathy) และปลายประสาทเสื่อมจากเบาหวาน (Neuropathy) และระดับหลอดเลือดขนาดใหญ่ ได้แก่ โรคหลอดเลือดสมอง (Stroke) โรคหลอดเลือดหัวใจ (Coronary heart disease) โรคกล้ามเนื้อหัวใจตายเฉียบพลัน (Acute myocardial infarction) และโรคหลอดเลือดส่วนปลาย (Peripheral vascular disease) รวมถึงภาวะแทรกซ้อนของโรคเบาหวานในช่องปาก เช่น โรคปริทันต์อักเสบ เป็นต้น⁽¹⁾

โรคปริทันต์อักเสบ (Periodontitis) เป็นโรคที่มีการอักเสบและการทำลายอวัยวะปริทันต์ ส่งผลให้เกิดการสูญเสียการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์ และนำไปสู่การสูญเสียฟันในที่สุด⁽³⁾ กระบวนการเกิดโรคปริทันต์เริ่มต้นจากการมีเชื้อแบคทีเรียสะสมบริเวณผิวฟันและในร่องเหงือก ซึ่งการเข้าสู่ร่างกายของเชื้อจะกระตุ้นการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายทั้งระบบ ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (Nonspecific immunity) และแบบจำเพาะ (Specific immunity) เพื่อต่อสู้ยับยั้งการแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรียไปยังเนื้อเยื่อชั้นลึกลงไป โดยการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันเหล่านี้จะกำจัดเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย แต่อีกส่วนหนึ่งจะส่งผลให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อ อย่างไรก็ตามหากกระบวนการอักเสบที่เกิดขึ้นอยู่ในสภาวะที่สมดุล การอักเสบดังกล่าวจะจำกัดอยู่เพียงบริเวณเหงือก เกิดเป็นโรคเหงือกอักเสบเท่านั้น เมื่อเชื้อแบคทีเรียถูกกำจัดออกไปจะทำให้อวัยวะปริทันต์ในบริเวณนั้นมีการซ่อมสร้างและไม่เกิดการสูญเสียการยึด

เกาะของอวัยวะปริทันต์ แต่ในผู้ที่มีความไวต่อการเกิดโรคปริทันต์อักเสบ (Periodontal susceptibility) หรือมีปัจจัยอื่น ๆ การตอบสนองต่อเชื้อปริทันต์ที่เกิดขึ้นจะเป็นลักษณะที่มากเกินไป (Hyperinflammation) จนทำให้กระบวนการอักเสบมีการลุกลามจากบริเวณเหงือกไปยังเนื้อเยื่อส่วนที่อยู่ลึกลงไป เกิดการทำลายส่วนยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์และกระดูก ทำให้มีการดำเนินโรคจากโรคเหงือกอักเสบกลายเป็นโรคปริทันต์อักเสบในที่สุด⁽⁴⁾ โรคปริทันต์อักเสบเป็นหนึ่งในภาวะแทรกซ้อนในช่องปากของเบาหวาน การควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเกิดและความรุนแรงของโรคปริทันต์อักเสบ โดยผู้ป่วยเบาหวานที่ควบคุมระดับน้ำตาลไม่ดีจะมีความชุกของการเกิดโรคปริทันต์อักเสบนานกว่าผู้ที่ไม่ได้เป็นเบาหวาน ความไวต่อการเกิดโรคปริทันต์อักเสบที่เพิ่มขึ้นเกิดจากการเปลี่ยนแปลงในการตอบสนองของร่างกาย การหายใจของแผล และเชื้อจุลินทรีย์ได้เหงือก⁽⁵⁾ ผลของโรคปริทันต์อักเสบต่อภาวะโรคเบาหวานเกิดจากแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์และผลิตภัณฑ์ของแบคทีเรีย รวมถึงไซโตไคน์และสารสื่ออักเสบอื่น ๆ ที่ผลิตในเนื้อเยื่อปริทันต์ที่อักเสบ ซึ่งสามารถเข้าสู่กระแสเลือดทำให้เกิดการอักเสบทางระบบ และนำไปสู่ความบกพร่องในการส่งสัญญาณของอินซูลินและภาวะดื้ออินซูลิน ทำให้เกิดโรคเบาหวานและการเพิ่มของระดับฮีโมโกลบินเอวันซี (Hemoglobin A1c; HbA1c) ซึ่งเพิ่มความเสี่ยงของภาวะแทรกซ้อนของเบาหวาน จึงกล่าวได้ว่าทั้งสองโรคมีความสัมพันธ์แบบสองทาง⁽⁶⁾

ไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide; NO) เป็นสารอนุมูลอิสระ ไม่มีขั้ว ที่มีช่วงอายุสั้น ทำหน้าที่ส่งสัญญาณสำหรับกระบวนการทางสรีรวิทยาและพยาธิวิทยาต่าง ๆ⁽⁷⁾ ไนตริกออกไซด์สร้างจากกรดอะมิโนแอลอาร์จินีน (L-arginine) โดยเอนไซม์ไนตริกออกไซด์ซินเทส (Nitric oxide synthase; NOS) ซึ่งมีอยู่ 3 ไอโซฟอร์ม (Isoforms) ได้แก่ นิวโรนอลไนตริกออกไซด์ซินเทส (Neuronal nitric oxide synthase; nNOS/NOS1) อินดิซิเบิลไนตริกออกไซด์ซินเทส (Inducible nitric oxide synthase; iNOS/NOS2) และเอนโดทีเลียลไนตริกออกไซด์ซินเทส (Endothelial nitric oxide synthase; eNOS/NOS3) โดยเอนไซม์ที่มีอยู่ประจำ (Constitutive enzyme) คือ eNOS และ nNOS ทำหน้าที่สร้างไนตริกออกไซด์ความเข้มข้นต่ำในช่วงเวลาสั้น ๆ ซึ่งมีบทบาทในกระบวนการทางสรีรวิทยา ตรงข้ามกับ iNOS ที่จะถูกกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่หลากหลาย ได้แก่ ไลโปโพลีแซคคาไรด์ (Lipopolysaccharides; LPS) ของแบคทีเรีย และไซโตไคน์กระตุ้นการอักเสบ⁽⁸⁾ นำไปสู่การสร้างไนตริกออกไซด์ ซึ่งมีบทบาทในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์⁽⁹⁾ การกระตุ้น iNOS จะทำให้เกิดการสร้างไนตริกออกไซด์ความเข้มข้นสูงเป็นระยะเวลายาวนาน⁽⁷⁾ มีรายงานการสร้างไนตริกออกไซด์และการแสดงออกของ iNOS เพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อปริทันต์ที่อักเสบของคนที่ไม่เป็น⁽¹⁰⁻¹⁴⁾ และเป็นโรคเบาหวาน^(15, 16) โดยไนตริกออกไซด์ในเนื้อเยื่อปริทันต์อาจเป็นส่วนหนึ่งของกลไก

การป้องกันตามธรรมชาติที่ไม่เฉพาะเจาะจงของช่องปากต่อแบคทีเรียก่อโรค และการมีไนตริกออกไซด์จำนวนมากเกินไปอาจนำไปสู่การทำลายเนื้อเยื่อปริทันต์บริเวณนั้น รวมถึงอาจมีบทบาทสำคัญในการเกิดโรคปริทันต์อักเสบ

การรักษาโรคปริทันต์มีส่วนในการควบคุมภาวะโรคเบาหวาน โดยช่วยลดแบคทีเรียในสภาพแวดล้อมได้หนึ่งออก และส่งผลในการลดการอักเสบของอวัยวะปริทันต์ นำไปสู่การลดระดับแบคทีเรียและผลิตภัณฑ์ของแบคทีเรียในกระแสเลือด โดยมีรายงานการลดลงของระดับไซโตไคน์และสารสื่อการอักเสบทางระบบ เช่น ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา (Tumor necrosis factor alpha; TNF- α) และซีรีแอคทีฟโปรตีน (C-reactive protein; CRP) ภายหลังการรักษาปริทันต์⁽¹⁷⁾ และมีการลดลงของ HbA1c อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 3 เดือนหลังการรักษาปริทันต์⁽¹⁸⁾ อย่างไรก็ตามกลไกที่นำไปสู่การลดลงของ HbA1c และการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด ภายหลังการรักษาปริทันต์ในผู้ป่วยโรคเบาหวานนั้นยังไม่ชัดเจน แต่สันนิษฐานว่าเกิดจากผลรวมของการลดการอักเสบและแบคทีเรียทางระบบ ซึ่งช่วยแก้ไขภาวะดื้ออินซูลินและการส่งสัญญาณของอินซูลิน⁽⁶⁾ ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันการรักษาโรคปริทันต์อักเสบมุ่งเน้นไปที่การลดปริมาณของแบคทีเรียในร่องลึกปริทันต์ และลดเชื้อก่อโรคปริทันต์อักเสบ เช่น พอร์ไฟโรโมนัส จิงจีวาลิส (*Porphyromonas gingivalis*; Pg) โดยการขูดหินน้ำลายและเกลารากฟัน การผ่าตัดลดร่องลึกปริทันต์ และการดูแลอนามัยช่องปากที่เหมาะสม นอกจากนี้ยังมีการใช้ยาต้านจุลชีพ/ยาปฏิชีวนะทั้งแบบเฉพาะที่และทางระบบมาช่วยเสริมในการรักษา แต่จากการศึกษาตามรุ่นย้อนหลัง (Retrospective cohort study) ไม่พบประโยชน์จากการให้ยาปฏิชีวนะทางระบบเสริมในการรักษาผู้ป่วยโรคปริทันต์ เมื่อประเมินจากการสูญเสียฟัน⁽¹⁹⁾ นอกจากนี้การใช้ยาปฏิชีวนะอาจมีผลข้างเคียงและส่งผลให้แบคทีเรียเกิดการดื้อยา จากข้อจำกัดของการใช้ยาปฏิชีวนะจึงทำให้เกิดความสนใจในวิธีการรักษาที่มุ่งเน้นปรับเปลี่ยนการตอบสนองของร่างกาย (Host modulatory therapy; HMT) โดย Howell และ Williams (1993) ได้นำเสนอการใช้ยาต้านการอักเสบชนิดที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (Non-steroidal anti-inflammatory drugs; NSAIDs)⁽²⁰⁾ ส่วนการศึกษาของ Golub และคณะ (1998) นำเสนอการใช้ยาเตตราไซคลิน ขนาดต่ำกว่าที่ออกฤทธิ์ต้านจุลชีพ (Non-antimicrobial tetracyclines) ซึ่งเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนส (Matrix metalloproteinases; MMPs) เพื่อช่วยเสริมการรักษาปริทันต์แบบดั้งเดิม โดยการขูดหินน้ำลายและเกลารากฟันจะเป็นส่วนหลักในการลดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย ส่วนเตตราไซคลินขนาดต่ำกว่าที่ออกฤทธิ์ต้านจุลชีพจะช่วยปรับเปลี่ยนการตอบสนองของร่างกายต่อการอักเสบและการสลายคอลลาเจน ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในพยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์⁽²¹⁾ นอกจากนี้ที่กล่าวมา ยังมีการนำ

บิสฟอสโฟเนต (Bisphosphonates) เรสเวอราทรอล (Resveratrol) และรีซอลวิน (Resolvins) มาใช้ร่วมในการรักษา⁽²²⁾ อย่างไรก็ตามมีเพียงด็อกซีไซคลินขนาดต่ำกว่าออกฤทธิ์ด้านจุลชีพ (Subantimicrobial-dose doxycycline; SDD)⁽²³⁾ เท่านั้นที่องค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (United States Food and Drug Administration; FDA) ให้การรับรอง และทันตแพทยสมาคมแห่งสหรัฐอเมริกา (American Dental Association; ADA) แนะนำว่าเป็นวิธีการปรับเปลี่ยนการตอบสนองที่ปลอดภัยและมีประสิทธิภาพสำหรับช่วยเสริมการรักษาปริทันต์แบบไม่ผ่าตัด แต่ขนาดยา SDD 20 มิลลิกรัม ที่แนะนำนั้นไม่มีจำหน่ายในประเทศไทย ฉะนั้น พฤษขบับัด หรือการรักษาด้วยสมุนไพร (Phytotherapy)⁽²⁴⁾ จึงเป็นอีกทางเลือกในการรักษาโรคปริทันต์อักเสบ เมื่อคำนึงถึงความปลอดภัย ความสามารถในการจัดหาหรือเข้าถึงได้ง่าย และประสิทธิภาพ เนื่องจากการทบทวนงานวิจัยอย่างเป็นระบบ (Systematic review) พบว่า การใช้สมุนไพรเฉพาะที่ร่วมกับการขูดหินน้ำลายและเกลารากฟันช่วยลดร่องลึกปริทันต์และเพิ่มการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์⁽²⁵⁾

ขมิ้นชัน (Turmeric) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ เคอร์คูมา ลองกา (*Curcuma longa* L.) เป็นพืชสมุนไพรที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการแพทย์แผนทางเลือก เป็นสารที่ไม่เป็นพิษ และมีคุณสมบัติที่หลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ฆ่าเชื้อ เป็นต้น⁽²⁶⁾ มีการศึกษาเกี่ยวกับประสิทธิภาพของเคอร์คิวมิน (Curcumin) ซึ่งเป็นสารสำคัญของขมิ้นชันอย่างกว้างขวาง โดยพบว่า เคอร์คิวมินสามารถยับยั้งการแสดงออกของ iNOS และการสร้างไนตริกออกไซด์ ในเซลล์แมคโครฟาจเพาะเลี้ยง (Cell line) ที่ได้จากหนู (RAW 264.7) ที่กระตุ้นด้วย LPS โดยยับยั้งการกระตุ้นทรานสคริปชันแฟกเตอร์ (Transcription factor) นิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบี (Nuclear factor kappa B; NF- κ B)^(27, 28) ส่วนผลของเคอร์คิวมินต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก (Gingival fibroblast) ซึ่งเป็นเซลล์หลักในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ไม่แสดงความทนต่อ LPS (LPS tolerance) มีบทบาทในการคงการอักเสบ ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการเกิดโรคปริทันต์อักเสบ⁽²⁹⁾ พบว่า ในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกหนูที่กระตุ้นด้วย LPS เมื่อได้รับเคอร์คิวมินจะช่วยลดการสร้างอินเตอร์ลิวคิน-1 β (Interleukin; IL-1 β) และ TNF- α ยับยั้งการกระตุ้น NF- κ B และยับยั้งการลดลงของอัตราส่วนของออสทีโอโปรเทเจรีน ต่อร์เซ็ปเตอร์แอกทีเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์ (Osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand; OPG/RANKL)⁽³⁰⁾ และในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ที่กระตุ้นด้วย LPS เคอร์คิวมินสามารถยับยั้งการแสดงออกของไซโคลออกซีจีเนส-2 (Cyclooxygenase-2; COX-2)⁽³¹⁾ อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาผลของเคอร์คิวมินต่อการสร้างไนตริกออกไซด์ และการแสดงออกของ iNOS ในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ที่กระตุ้นด้วย LPS นอกจากนี้เซลล์ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะน้ำตาลสูง

ซึ่งเทียบเท่ากับระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยเบาหวานที่ควบคุมไม่ได้ จะมีการทำงานต่างจากปกติ⁽³²⁻³⁶⁾ รวมถึงมีการตอบสนองต่อ LPS ที่มากกว่าปกติ⁽³⁷⁾ และเนื่องจากสารสกัดหยาบไขมันชั้นมีวิธีการเตรียมที่ไม่ซับซ้อน และประกอบด้วยคอรีควินและสารอื่น ๆ ที่อาจมีฤทธิ์ในการรักษา⁽³⁸⁾ จึงทำให้ผู้วิจัยเกิดความสนใจศึกษาผลของสารสกัดหยาบไขมันชั้นต่อการสร้างไนตริกออกไซด์ และการแสดงออกของ iNOS ในระดับเมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอ (Messenger RNA; mRNA) ในเซลล์สร้างเส้นใยเนื้อเยื่อที่ถูกระตุ้นด้วย LPS ในสภาวะน้ำตาลสูง

ความมุ่งหมายของงานวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้ตั้งความมุ่งหมายไว้ดังนี้

1. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดหยาบไขมันชั้นต่อการสร้างไนตริกออกไซด์ของเซลล์สร้างเส้นใยเนื้อเยื่อที่ถูกระตุ้นด้วย LPS ในสภาวะน้ำตาลสูง
2. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดหยาบไขมันชั้นต่อการแสดงออกของ iNOS ในระดับ mRNA ของเซลล์สร้างเส้นใยเนื้อเยื่อที่ถูกระตุ้นด้วย LPS ในสภาวะน้ำตาลสูง

ความสำคัญของการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการนำไขมันชั้น ซึ่งเป็นสมุนไพรที่หาได้ง่าย ราคาไม่สูง และคนไทยคุ้นเคยเป็นอย่างดี มาพัฒนาด้วยวิธีการที่ไม่ซับซ้อนคือ การสกัดหยาบ เพื่อคงองค์ประกอบอื่น ๆ ของไขมันชั้นนอกเหนือจากคอรีควินซึ่งเป็นสารสำคัญ โดยศึกษาในเซลล์สร้างเส้นใยเนื้อเยื่อที่ซึ่งเป็นเซลล์หลักในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเชิงอก จากนั้นจำลองสภาวะโรคปริทันต์อักเสบในผู้ป่วยเบาหวาน และประเมินผลของสารสกัดหยาบไขมันชั้นต่อการสร้างไนตริกออกไซด์ และการแสดงออกของ iNOS ในระดับ mRNA ซึ่งมีบทบาทในการเกิดโรคปริทันต์อักเสบที่มีการทำลายของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและกระดูกอัลมรอบฟัน ผลการศึกษานี้อาจแสดงคุณสมบัติของไขมันชั้นที่สามารถนำมาใช้ในการปรับเปลี่ยนการตอบสนองการอักเสบและภูมิคุ้มกัน เพื่อเสริมการรักษาโรคปริทันต์ในผู้ป่วยเบาหวานได้

ขอบเขตของการวิจัย

ประชากรที่ใช้ในการวิจัย

เซลล์สร้างเส้นใยเนื้อเยื่อจากเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือกบริเวณเพดานปากที่ไม่มีการอักเสบ และไม่มีรอยโรคใด ๆ ของผู้ป่วยที่เข้ารับการผ่าตัดปริทันต์ที่คลินิกหลังปริญญา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ โดยได้รับการยินยอมจากผู้ป่วย และผ่าน

การรับรองจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์จากคณะกรรมการจริยธรรมแล้ว (หมายเลขรับรอง SWUEC/F-313/2563)

เกณฑ์ในการคัดเลือกประชากรเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัย

1. เกณฑ์การคัดเข้า (Inclusion criteria)

- 1.1 อายุระหว่าง 20 ถึง 60 ปี
- 1.2 ไม่มีโรคประจำตัว
- 1.3 เหงือกสุขภาพดี

2. เกณฑ์การคัดออก (Exclusion criteria)

- 2.1 มีภาวะโรคประจำตัวที่ไม่สามารถทำศัลยกรรมได้
- 2.2 มีการอักเสบ หรือติดเชื้อในช่องปาก
- 2.3 ได้รับเคมีบำบัด หรือฉายรังสีรักษาบริเวณศีรษะและลำคอ
- 2.4 รับประทานยาปฏิชีวนะภายใน 1 เดือน ก่อนเข้าร่วมวิจัย
- 2.5 รับประทานยาที่มีผลต่อการอักเสบของเหงือก หรือการทำงานของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก เช่น กลูโคคอร์ติคอยด์ (Glucocorticoid) ยาต้านการชัก (Anticonvulsant) ยากดภูมิ (Immunosuppressant) และยาต้านแคลเซียม (Calcium channel blocker) เป็นต้น
- 2.6 ตั้งครรภ์ หรือให้นมบุตร
- 2.7 สูบบุหรี่

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

สุ่มเลือกเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกที่ได้จากผู้เข้าร่วมวิจัย 3 คน โดยใช้เซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้ในรุ่นที่ 3-6 นำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีระดับน้ำตาลต่างกันคือ กลูโคส 5.5 มิลลิโมลาร์ ในสภาวะน้ำตาลปกติ และกลูโคส 50 มิลลิโมลาร์ ในสภาวะน้ำตาลสูง มีการกระตุ้นและไม่กระตุ้นด้วย LPS และได้รับและไม่ได้รับสารสกัดหยาบขมิ้นชัน โดยแบ่งออกเป็นกลุ่มต่าง ๆ ดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมภาวะปกติ (NG)

กลุ่มที่ 2 กลุ่มน้ำตาลปกติ และได้รับสารสกัดหยาบขมิ้นชัน (NG+TUR)

กลุ่มที่ 3 กลุ่มน้ำตาลปกติ และกระตุ้นด้วย LPS (NG+LPS)

กลุ่มที่ 4 กลุ่มน้ำตาลปกติ กระตุ้นด้วย LPS และได้รับสารสกัดหยาบขมิ้นชัน (NG+LPS+TUR)

กลุ่มที่ 5 กลุ่มควบคุมภาวะน้ำตาลสูง (HG)

กลุ่มที่ 6 กลุ่มน้ำตาลสูง และได้รับสารสกัดหยาบขมิ้นชัน (HG+TUR)

กลุ่มที่ 7 กลุ่มน้ำตาลสูง และกระตุ้นด้วย LPS (HG+LPS)

กลุ่มที่ 8 กลุ่มน้ำตาลสูง กระตุ้นด้วย LPS และได้รับสารสกัดหยาบขมิ้นชัน

(HG+LPS+TUR)

ตัวแปรที่ศึกษา

1. ตัวแปรอิสระ แบ่งเป็นดังนี้
 - 1.1 สารสกัดหยาบขมิ้นชัน
 - 1.2 สภาวะน้ำตาล
2. ตัวแปรตาม ได้แก่
 - 2.1 การสร้างไนตริกออกไซด์
 - 2.2 การแสดงออกของ iNOS ในระดับ mRNA

นิยามศัพท์เฉพาะ

เบาหวาน (Diabetes mellitus) เป็นกลุ่มของโรคความผิดปกติของเมตาบอลิซึม ซึ่งมีระดับกลูโคสในเลือดสูง เป็นผลมาจากความบกพร่องในการหลั่งอินซูลิน หรือภาวะดื้อต่ออินซูลิน หรือทั้งสองอย่างร่วมกัน⁽¹⁾

โรคปริทันต์อักเสบ (Periodontitis) เป็นโรคที่มีการอักเสบและการทำลายอวัยวะปริทันต์ ส่งผลให้เกิดการสูญเสียการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์⁽³⁾

ไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide; NO) เป็นสารอนุมูลอิสระ ไม่มีขั้ว ที่มีช่วงอายุสั้น ทำหน้าที่เป็นโมเลกุลส่งสัญญาณสำหรับกระบวนการทางสรีรวิทยาและพยาธิวิทยาต่าง ๆ⁽⁷⁾

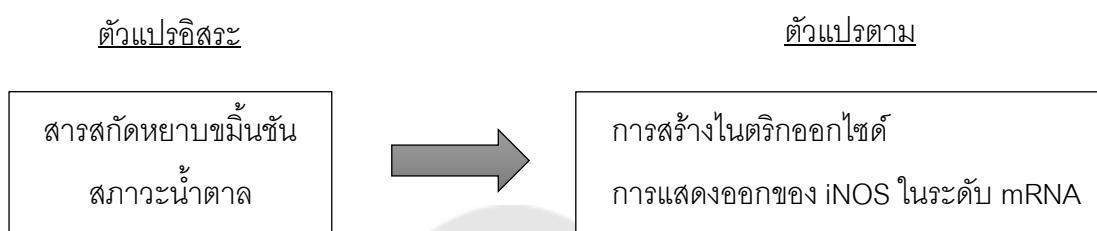
อินดิวิซิเบิลไนตริกออกไซด์ซินเทส (Inducible nitric oxide synthase; iNOS) คือ เอนไซม์ที่สร้างไนตริกออกไซด์จากการกระตุ้นของ LPS หรือไฮโดรโคโรน⁽³⁹⁾

สารสกัดหยาบ (Crude extract) หมายถึง สารสกัดเบื้องต้นจากสมุนไพรที่ยังไม่ถึงขั้นสารบริสุทธิ์ กรรมวิธีการสกัดไม่ยุ่งยากซับซ้อน สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้โดยตรงหรือต้องผ่านกรรมวิธีผลิตก่อนที่จะนำไปทำผลิตภัณฑ์⁽⁴⁰⁾

เคอร์คิวมินอยด์ (Curcuminoids) คือ สารพอลิฟีนอลสีเหลืองอมส้ม เป็นสารประกอบฟีนอล สกัดจากเหง้าของขมิ้นชัน แบ่งเป็น 3 ชนิด ได้แก่ เคอร์คิวมิน ดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน (Demethoxycurcumin) และบิสดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน (Bisdemethoxycurcumin) สารกลุ่มนี้มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอย่างกว้างขวาง มีคุณสมบัติในการรักษาบาดแผล ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ต้านการอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระ และสามารถต้านการเกิดมะเร็งได้⁽⁴¹⁾

กรอบแนวคิดในงานวิจัย

การศึกษาในห้องปฏิบัติการ (In vitro study) ในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ในสภาวะน้ำตาลปกติหรือน้ำตาลสูง โดยเปรียบเทียบผลของการได้รับและไม่ได้รับสารสกัดหยาบไขมันชั้น



สมมุติฐานในการวิจัย

สมมุติฐานที่ 1

H_0 : กลุ่มที่เลี้ยงเซลล์ด้วยสารสกัดหยาบไขมันชั้นพบการสร้างไนตริกออกไซด์ของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ที่กระตุ้นด้วย LPS และ/หรือสภาวะน้ำตาลสูง ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ได้เลี้ยงเซลล์ด้วยสารสกัดหยาบไขมันชั้นอย่างมีนัยสำคัญ

H_1 : กลุ่มที่เลี้ยงเซลล์ด้วยสารสกัดหยาบไขมันชั้นพบการสร้างไนตริกออกไซด์ของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ที่กระตุ้นด้วย LPS และ/หรือสภาวะน้ำตาลสูง แตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ได้เลี้ยงเซลล์ด้วยสารสกัดหยาบไขมันชั้นอย่างมีนัยสำคัญ

สมมุติฐานที่ 2

H_0 : กลุ่มที่เลี้ยงเซลล์ด้วยสารสกัดหยาบไขมันชั้นพบการแสดงออกของ iNOS ในระดับ mRNA ของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ที่กระตุ้นด้วย LPS และ/หรือสภาวะน้ำตาลสูง ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ได้เลี้ยงเซลล์ด้วยสารสกัดหยาบไขมันชั้นอย่างมีนัยสำคัญ

H_1 : กลุ่มที่เลี้ยงเซลล์ด้วยสารสกัดหยาบไขมันชั้นพบการแสดงออกของ iNOS ในระดับ mRNA ของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ที่กระตุ้นด้วย LPS และ/หรือสภาวะน้ำตาลสูง แตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ได้เลี้ยงเซลล์ด้วยสารสกัดหยาบไขมันชั้นอย่างมีนัยสำคัญ

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และได้นำเสนอตามหัวข้อต่อไปนี้

1. ขมิ้นชัน
2. โรคเบาหวาน
3. โรคปริทันต์อักเสบ
4. ความสัมพันธ์ของโรคเบาหวานกับโรคปริทันต์อักเสบ
5. ไนตริกออกไซด์

1. ขมิ้นชัน

ขมิ้นชัน มีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *เคอร์คูมา ลองกา* เป็นพืชสมุนไพรที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการแพทย์แผนทางเลือกอายุรเวท หรือการแพทย์แผนโบราณของอินเดีย ในทางพฤกษศาสตร์ขมิ้นชันเป็นพืชวงศ์ขิงหรือขมิ้นเหง้า เป็นไม้ล้มลุกที่มีอายุหลายปี ลำต้นสั้น ใบกลมรีใหญ่ และมีเหง้าซึ่งมักจะแตกกิ่งและมีสีเหลืองน้ำตาล (ภาพประกอบ 1) ขมิ้นชันถูกนำมาใช้เป็นสารเติมแต่งอาหาร และสีในประเทศแถบเอเชีย รวมทั้งจีนและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในการแพทย์อินเดียโบราณขมิ้นชันถูกใช้อย่างกว้างขวางในการรักษาอาการเคล็ดขัดยอกและบวมจากการบาดเจ็บ ในการแพทย์อินเดียโบราณใช้ผงขมิ้นชันรักษาความผิดปกติของน้ำดี โรคกลัวอ้วน (Anorexia) โรคหัวใจ ไต แผลเบาหวาน ความผิดปกติของตับ โรคไขข้อ และโพรงอากาศอักเสบ ในประเทศจีนใช้ขมิ้นชันรักษาอาการปวดท้อง ส่วนที่ให้สีของขมิ้นชันเป็นองค์ประกอบหลักของพืชชนิดนี้และมีคุณสมบัติด้านการอักเสบ⁽⁴²⁾

ขมิ้นชันมีตำแหน่งอนุกรมวิธาน⁽⁴³⁾ ดังนี้

หมวด (Division)	แมกโนลิโอไฟตา (Magnoliophyta)
ชั้น (Class)	ลิลิออปซิดา (Liliopsida)
ชั้นย่อย (Subclass)	ซิงจิเบอริเด (Zingiberidae)
อันดับ (Order)	ซิงจิเบอเรลส์ (Zingiberales)
วงศ์ (Family)	ซิงจิเบอเรซีอี (Zingiberaceae)
สกุล (Genus)	เคอร์คูมา (<i>Curcuma</i>)
สปีชีส์ (Species)	เคอร์คูมา ลองกา (<i>C. longa</i>)



ภาพประกอบ 1 ขมิ้นชัน

ที่มา: Ravindran P, Babu KN, Sivaraman K. (2007). Turmeric: the genus *Curcuma*.

1.1 องค์ประกอบทางเคมีของขมิ้นชัน

ขมิ้นชัน ประกอบด้วย โปรตีนร้อยละ 6.3 ไขมันร้อยละ 5.1 แร่ธาตุร้อยละ 3.5 คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 69.4 และความชื้นร้อยละ 13.1

องค์ประกอบของขมิ้นชัน 2 ส่วน ที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ได้แก่

1. เคอร์คิวมินอยด์ ประมาณร้อยละ 2.5-6 ทำให้ขมิ้นชันมีสีเหลือง ประกอบด้วย เคอร์คิวมิน และอนุพันธ์ของเคอร์คิวมินคือ ดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน และบิสดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน

2. น้ำมันหอมระเหย (Essential oil) ร้อยละ 5.8 ทำให้เกิดกลิ่นของขมิ้นชัน ได้จากการกลั่น heads ด้วยไอน้ำ ประกอบด้วย แอลฟาเฟลแลนดรีน (α -phellandrene) ร้อยละ 1 ซาบินีน (Sabinene) ร้อยละ 0.6 ยูคาลิปทอลซินีเออล (Cineole) ร้อยละ 1 บอร์เนอล (Borneol) ร้อยละ 0.5 ซิงจีเบอรีน (Zingiberene) ร้อยละ 25 และเสสควิเทอร์ปีน (Sesquiterpenes) ร้อยละ

1.2 ผลทางชีวภาพและเภสัชวิทยาของขมิ้นชันและส่วนประกอบ

ผงขมิ้นชัน (Turmeric powder) เคอร์คิวมินและอนุพันธ์ และสารสกัดอื่น ๆ จากเหง้า มีฤทธิ์ทางชีวภาพมากมาย และได้มีการนำมาใช้เป็นยา ดังแสดงในตาราง 1, 2⁽⁴²⁾

ตาราง 1 ผลทางชีวภาพของขมิ้นชันและสารประกอบ

Compound/extract	Biological activity
<i>Turmeric powder</i>	Wound-healing
<i>Ethanol extract</i>	Antiinflammatory, Hypolipemic, Antitumour, Antiprotozoan
<i>Petroleum ether extract</i>	Antiinflammatory, Antifertility
<i>Alcoholic extract</i>	Antibacterial
<i>Crude ether extract</i>	Antifungal
<i>Chloroform extract</i>	Antifungal
<i>Aqueous extract</i>	Antifertility
<i>Volatile oil</i>	Antiinflammatory, Antibacterial, Antifungal
<i>Curcumin</i>	Antibacterial, Antiprotozoal, Antiviral, Hypolipemic, Hypoglycemic, Anticoagulant, Antioxidant, Antitumour, Anticarcinogenic
<i>Ar-turmerone</i>	Antivenom
<i>Methylcurcumin</i>	Antiprotozoal
<i>Demethoxycurcumin</i>	Antioxidant
<i>Bisdemethoxycurcumin</i>	Antioxidant
<i>Sodium curcuminat</i>	Antiinflammatory, Antibacterial

ตาราง 2 การใช้ขมิ้นชันในการรักษาโรค

Turmeric finds medicinal applications in	Anaemia, atherosclerosis, diabetes, edema, haemorrhoids, hepatitis, hysteria, indigestion, inflammation, skin disease, urinary disease, wound and bruise healing, psoriasis, anorexia, cough, liver disorders, rheumatism, sinusitis
--	--

1.3 เคอร์คิวมิน

เคอร์คิวมิน เป็นสารสำคัญในการออกฤทธิ์ของขมิ้นชัน มีชีวปริมาณการออกฤทธิ์ (Bioavailability) ต่ำ เนื่องจากดูดซึมไม่ดี มีการเผาผลาญและขับออกจากร่างกายได้รวดเร็ว⁽⁴⁵⁾ องค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกาได้ให้การยอมรับว่ามีความปลอดภัยต่อทั้งคนและสัตว์ และไม่แสดงความเป็นพิษแม้จะใช้ในปริมาณสูง⁽⁴⁶⁾ เคอร์คิวมินมีผลต่อเป้าหมายระดับโมเลกุล (Molecular target) มากมาย เช่น NF- κ B, IL-1, TNF- α และ iNOS เป็นต้น⁽⁴⁷⁾ และแสดงผลทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย เช่น ด้านการอักเสบ ด้านอนุมูลอิสระ และด้านแบคทีเรีย เป็นต้น⁽⁴²⁾

1.4 กลไกการออกฤทธิ์ด้านการอักเสบของเคอร์คิวมิน

ฤทธิ์ด้านการอักเสบของเคอร์คิวมินนั้นเกิดจากหลายกลไก และมีผลที่เป้าหมายระดับโมเลกุลมากมาย ประการแรกคือ ยับยั้งการกระตุ้นการทำงานของทรานสคริปชันแฟกเตอร์ NF- κ B⁽⁴⁸⁾ ซึ่งมีความสำคัญในการเกิดการอักเสบ เนื่องจากสารที่ทำให้เกิดการอักเสบ เช่น TNF- α และ IL-1 β ซึ่งพบในโรคปริทันต์และ LPS จากเชื้อก่อโรคปริทันต์ทำให้เกิดการกระตุ้นทรานสคริปชันแฟกเตอร์ NF- κ B การที่เคอร์คิวมินยับยั้งการกระตุ้น NF- κ B จึงบ่งชี้ว่า เคอร์คิวมินมีศักยภาพในการรักษาโรคปริทันต์อักเสบ⁽⁴⁹⁾

ประการที่สอง เคอร์คิวมินลดการแสดงออกของ COX-2 ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย LPS ทำให้ลดการสังเคราะห์พรอสตาแกลนดินอี 2 (Prostaglandin E₂; PGE₂) ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นการละลายของกระดูกและเป็นส่วนสำคัญในโรคปริทันต์อักเสบ⁽⁵⁰⁾ อีกหนึ่งเป้าหมายระดับโมเลกุลของเคอร์คิวมินคือ iNOS ซึ่งเป็นโมเลกุลกระตุ้นการอักเสบและถูกควบคุมโดย NF- κ B ผ่านการกระตุ้นของ TNF- α , IL-1 β และ LPS โดยพบว่า เคอร์คิวมินสามารถยับยั้งการสังเคราะห์ และส่งเสริมการย่อยสลาย iNOS⁽⁵¹⁾

นอกจากนี้เคอร์คิวมินยังลดการแสดงออกของโมเลกุลยึดเกาะเซลล์บุผนังหลอดเลือด (Adhesion molecule) เช่น โมเลกุลยึดเกาะระหว่างเซลล์-1 (Intercellular adhesion molecule; ICAM-1) โมเลกุลยึดเกาะหลอดเลือด-1 (Vascular adhesion molecule; VCAM-1) และอีซีเลกติน (E-selectin) โมเลกุลเหล่านี้มีความสำคัญในการเกิดการอักเสบ โดยช่วยให้เม็ดเลือดขาวจากหลอดเลือดเข้าไปในเนื้อเยื่อ ในสภาวะปกติโมเลกุลยึดเกาะเซลล์เหล่านี้จะไม่ปรากฏบนพื้นผิวของเซลล์บุผนังหลอดเลือด แต่จะถูกกระตุ้นให้แสดงออกโดยไซโตไคน์กระตุ้นการอักเสบ เช่น IL-1 β และ TNF- α ⁽⁴⁹⁾ เคอร์คิวมินจะลดการแสดงออกของโมเลกุลยึดเกาะเซลล์ผ่านการยับยั้งการกระตุ้น NF- κ B ซึ่งส่งผลให้เกิดการยับยั้งไซโตไคน์ที่จะมากระตุ้นการแสดงออกของโมเลกุลยึดเกาะเซลล์จากกระบวนการนี้ทำให้เคอร์คิวมินแสดงผลยับยั้งไซโตไคน์ เช่น IL-1 β , IL-2, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12 และทูเมอร์เนคโรซิสแฟกเตอร์ เบตา (TNF- β)⁽⁴⁹⁾ ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในกระบวนการ

อักเสบ โดยเฉพาะในโรคปริทันต์อักเสบ นอกจากนี้เคอร์คิวมินยังยับยั้งการแสดงออกของทรานสคริปชันแฟกเตอร์แอคติเวเตอร์โปรตีน-1 (Activator protein; AP-1) ซึ่งเป็นตัวควบคุมที่สำคัญในกลไกทางชีวภาพมากมาย การที่เคอร์คิวมินยับยั้งวิถี AP-1 จะทำให้ยับยั้งการแสดงออกของไซโตไคน์ iNOS และ MMPs ได้แก่ MMP-1, MMP-3, MMP-9, MMP-14 และ MMP-13⁽⁴⁹⁾

1.5 กลไกการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเคอร์คิวมิน

เคอร์คิวมินสามารถดักจับ (Scavenge) สารที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา (Reactive species) เช่น อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ (Superoxide anion; $O_2^{\cdot-}$) อนุมูลไฮดรอกซิล (Hydroxyl radical; $OH^{\cdot}$) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen Peroxide; H_2O_2) ซิงเกิลตออกซิเจน (Singlet oxygen; 1O_2) และไนตริกออกไซด์⁽⁵²⁾ นอกจากนี้ยังกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีนป้องกัน (Cytoprotective protein) เช่น ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (Super oxide dismutase; SOD) คีตาเลส (Catalase; CAT) กลูตาไทโอนรีดักเทส (Glutathione reductase; GR) และกลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส (Glutathione peroxidase; GPx) ผ่านวิถีนิวเคลียร์แฟกเตอร์อีริทรอยด์ 2 รีเลทเทดแฟกเตอร์ 2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2; Nrf2)⁽⁵³⁾

1.6 การศึกษาเคอร์คิวมินที่เกี่ยวข้องกับปริทันต์วิทยา

การศึกษาในห้องปฏิบัติการและสัตว์ทดลอง พบว่า เคอร์คิวมินยับยั้งการแสดงออกของสารสื่อกลางการอักเสบที่มีบทบาทสำคัญในการทำลายเนื้อเยื่อในโรคปริทันต์อักเสบ

การศึกษาของ Chen และคณะ (2008) พบว่า เคอร์คิวมินยับยั้งการแสดงออกของ IL-1 β และ TNF- α ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS จากเชื้อ *Pg* โดยการยับยั้งแปรผันตรงกับความเข้มข้นเคอร์คิวมิน และเกี่ยวข้องกับวิถี NF- κ B⁽⁵⁴⁾ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Hu, Huang และ Chen (2013) ซึ่งพบว่า เคอร์คิวมินยับยั้งการแสดงออกของ COX-2 ในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS จากเชื้อ *Pg* โดยการยับยั้งแปรผันตรงกับความเข้มข้นเคอร์คิวมิน และเกี่ยวข้องกับวิถี NF- κ B⁽³¹⁾

และการศึกษาของ Shahzad และคณะ (2015) พบว่า เคอร์คิวมินมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญแบบอิสระ (Planktonic growth) ของเชื้อก่อโรคปริทันต์ ได้แก่ *Pg* แอกกิริเกทิแบกเทอร์ แอทิโนไมซีเทมคอมมิแทนส์ (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; Aa) และฟิวโซแบคทีเรียม นิวคลีเอตัม (*Fusobacterium nucleatum*; Fn)⁽⁵⁵⁾

นอกจากนี้การศึกษาของ Xiao และคณะ (2018) ได้ยืนยันผลการศึกษาก่อนหน้านี้ โดยศึกษาผลของเคอร์คิวมินในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกหนูที่กระตุ้นด้วย LPS และหนูที่กระตุ้นให้เกิดโรคปริทันต์อักเสบโดยการมัดฟัน (Ligature-induced experimental periodontitis) ในการ

เพาะเลี้ยงเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกหนู พบว่า เคอร์คิวมินลดการสร้าง IL-1 β และ TNF- α ยับยั้งการกระตุ้น NF-kB และยับยั้งการลดลงของอัตราส่วนของ OPG/RANKL ในลักษณะที่แปรผันตรงกับ ความเข้มข้น และเคอร์คิวมินทั้ง 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก ส่วนการศึกษาในสัตว์ทดลองโดยให้เคอร์คิวมิน 30 และ 100 ไมโครกรัม/กรัม (น้ำหนักตัว) ทางสายยาง (Oral gavage) พบว่า เคอร์คิวมินลดการอักเสบของเหงือก การทำลายเส้นใยคอลลาเจน และการสูญเสียกระดูกเบ้าฟัน แปรผันตามปริมาณที่ได้รับ จากผลการศึกษาสรุปได้ว่า เคอร์คิวมินมีฤทธิ์ต้านการอักเสบในหนูที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ โดยยับยั้งการกระตุ้น NF-kB และการลดลงของ OPG/RANKL ซึ่งบ่งชี้ถึงความเป็นไปได้ในการใช้เคอร์คิวมินรักษาโรคปริทันต์อักเสบ⁽³⁰⁾

1.7 การศึกษาเคอร์คิวมินที่เกี่ยวข้องกับไนตริกออกไซด์

ไนตริกออกไซด์ที่สร้างจาก iNOS มีบทบาทในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย⁽⁹⁾ แต่การเพิ่มการสร้างไนตริกออกไซด์ที่มากเกินไปมีความสัมพันธ์กับพยาธิสรีรวิทยาของโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ⁽⁵⁶⁾ จึงมีการศึกษาในระดับโมเลกุล เพื่อค้นหาวิธีการรักษาที่สามารถควบคุมระดับไนตริกออกไซด์ โดยมีหลายการศึกษาที่แสดงผลของเคอร์คิวมินในการควบคุมการสร้างไนตริกออกไซด์ และการแสดงออกของ iNOS ในหลายระดับ

จากการศึกษาของ Pan และคณะ (2000) พบว่า เคอร์คิวมินยับยั้งการแสดงออกของ iNOS และการสร้างไนตริกออกไซด์ของเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไอแคปปาบีไคเนส (I κ B kinase; IKK) ทำให้ไม่เกิดการเติมหมู่ฟอสเฟต (Phosphorylation) และการสลาย (Degradation) ของตัวยับยั้งนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีแอลฟา (NF-kB inhibitor alpha; I κ B α) ดังนั้นทรานสคริปชันแฟกเตอร์ NF-kB จึงยังคงสภาพไม่พร้อมทำงาน (Inactive) อยู่ในไซโตพลาสซึม ไม่ได้เคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียสแล้วเกิดกระบวนการถอดรหัส (Transcription) ขึ้นเป้าหมาย⁽²⁷⁾

จากการศึกษาผลของเคอร์คิวมินที่มีต่อเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ของ Kim และคณะ (2008) พบว่า เคอร์คิวมินความเข้มข้นสูง (มากกว่า 2 ไมโครโมลาร์) ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ และการแสดงออกของ iNOS ผ่านการยับยั้งการกระตุ้น NF-kB ส่วนเคอร์คิวมินความเข้มข้นต่ำ (0.5-2 ไมโครโมลาร์) ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ และการแสดงออกของ iNOS ผ่านการเหนี่ยวนำการแสดงออกของเอนไซม์ฮีโมออกซิจีเนส-1 (Heme oxygenase-1; HO-1)⁽²⁸⁾

จากการศึกษาของ Ben และคณะ (2011) ถึงผลของเคอร์คิวมินที่มีต่อเซลล์ RAW 264.7 ที่กระตุ้นด้วย LPS พบว่า นอกจากเคอร์คิวมินจะยับยั้งการแสดงออกของ iNOS ผ่านการ

ยับยั้งการกระตุ้น NF- κ B ในระดับการถอดรหัสแล้ว ในกระบวนการหลังการแปลรหัส (Post-translation) นั้น เคอร์คิวมินมีส่วนส่งเสริมการสลาย iNOS ผ่านวิถียูบิควิติน-โปรติเอสโซม (Ubiquitin-proteasome pathway) นอกจากนี้เคอร์คิวมินยังยับยั้งการทำงานของ iNOS ผ่านการยับยั้งการกระตุ้นโปรตีนไคเนสควบคุมสัญญาณนอกเซลล์ 1/2 (Extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2; ERK1/2)⁽⁵¹⁾

1.8 การศึกษาสารสกัดหยาบขมิ้นชัน

มีการศึกษามากมายเกี่ยวกับคุณสมบัติและตำแหน่งออกฤทธิ์ของเคอร์คิวมิน แต่ยังไม่มีการศึกษาคุณสมบัติของสารประกอบอื่น ๆ ในขมิ้นชันอย่างเป็นระบบมากนัก โดยเฉพาะฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ จากการศึกษาของ Lantz และคณะ (2005) ที่เปรียบเทียบผลของสารสกัดหยาบขมิ้นชันที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน เมทานอล (Dichloromethane-methanol) กับเคอร์คิวมินและบางส่วนของสารสกัดหยาบขมิ้นชันที่มีน้ำมันหอมระเหยแต่ไม่มีเคอร์คิวมินอยด์ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงที่ได้จากมนุษย์ (HL-60) ที่กระตุ้นด้วย LPS พบว่า ค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งการสร้าง TNF- α ได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) คือ 15.2, 28.8 และ 7.23 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และ IC₅₀ ที่ยับยั้งการสร้าง PGE₂ คือ 0.92, 0.45 และ 0.47 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ แสดงว่า สารสกัดหยาบขมิ้นชันยับยั้งการสร้าง TNF- α และ PGE₂ และพบว่า บางส่วนของสารสกัดหยาบขมิ้นชันที่มีน้ำมันหอมระเหยแต่ไม่มีเคอร์คิวมินอยด์ แสดงการยับยั้งที่ความเข้มข้นใกล้เคียงและต่ำกว่าเคอร์คิวมิน บ่งชี้ว่าสารประกอบอื่น ๆ ของขมิ้นชันนอกเหนือจากเคอร์คิวมินมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ⁽³⁸⁾

2. โรคเบาหวาน

โรคเบาหวาน เป็นกลุ่มโรคความผิดปกติของเมตาบอลิซึม ซึ่งทำให้มีระดับน้ำตาลในเลือดสูง เกิดจากความผิดปกติในการหลั่งอินซูลิน หรือความผิดปกติในการออกฤทธิ์ของอินซูลิน หรือทั้งสองอย่างร่วมกัน อาการของการมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงคือ ปัสสาวะบ่อย (Polyuria) กระหายน้ำ (Polydipsia) น้ำหนักลด รับประทานจุ (Polyphagia) และตามัว และเมื่อมีภาวะน้ำตาลในเลือดสูงเป็นเวลานานจะก่อให้เกิดความผิดปกติของโครงสร้างและการทำงานของอวัยวะต่าง ๆ ได้แก่ ตา ไต เส้นประสาท หัวใจ และหลอดเลือด⁽⁵⁷⁾

2.1 การจำแนกประเภทโรคเบาหวาน

มาตรฐานการรักษาผู้ป่วยโรคเบาหวาน ปี ค.ศ. 2020 โดยสมาคมโรคเบาหวานแห่งสหรัฐอเมริกา (American Diabetes Association หรือ ADA)⁽⁵⁸⁾ ได้จำแนกโรคเบาหวานดังต่อไปนี้

1. โรคเบาหวานชนิดที่ 1 (Type 1 diabetes) เกิดจากเซลล์เบต้าในตับอ่อนถูกทำลาย โดยมีสาเหตุมาจากภูมิคุ้มกันตนเอง (Autoimmune) ทำให้ขาดอินซูลิน
2. โรคเบาหวานชนิดที่ 2 (Type 2 diabetes) เป็นชนิดที่พบบ่อยที่สุด เกิดจากเซลล์เบต้าหลังอินซูลินไม่เพียงพอ และ/หรือมีภาวะดื้ออินซูลิน คือเนื้อเยื่อไม่ตอบสนองต่อฤทธิ์ของอินซูลิน ทำให้เซลล์ไม่สามารถนำกลูโคสไปใช้ได้ ภาวะดื้ออินซูลินเกิดจากปัจจัยทางพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อม เช่น ความอ้วน และการขาดการออกกำลังกาย
3. โรคเบาหวานขณะตั้งครรภ์ (Gestational diabetes mellitus) มักได้รับการวินิจฉัยในไตรมาสที่ 2 หรือ 3 ของการตั้งครรภ์ เป็นภาวะที่ร่างกายไม่สามารถควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดได้ตามปกติ (Glucose intolerance)
4. โรคเบาหวานจากสาเหตุอื่น (Specific types of diabetes) ได้แก่ โรคเบาหวานรูปแบบโมโนเจนิค (Monogenic diabetes syndromes) เช่น เบาหวานทารกแรกเกิด (Neonatal diabetes) และโรคเบาหวานที่มีอาการไวในผู้เยาว์ (Maturity-onset diabetes of the young), โรคตับอ่อน เช่น โรคซิสติกไฟโบรซิส (Cystic fibrosis) และตับอ่อนอักเสบ (Pancreatitis) และโรคเบาหวานที่เกิดจากยาหรือสารเคมี เช่น การใช้กลูโคคอร์ติคอยด์ (Glucocorticoid) ในการรักษาเอชไอวี (HIV) หรือหลังการปลูกถ่ายอวัยวะ

2.2 การควบคุมระดับน้ำตาล

วิธีที่ดีที่สุดในการประเมินการควบคุมระดับน้ำตาลของผู้ป่วยเบาหวานคือ การตรวจน้ำตาลสะสมในเลือด (Glycated Haemoglobin) การตรวจนี้สามารถดูสถานะกลูโคสในเลือดได้ 30-90 วัน ก่อนเก็บตัวอย่างเลือด เนื่องจากเมื่อกลูโคสอยู่ในกระแสเลือดจะจับกับฮีโมโกลบินบนเม็ดเลือดแดง การมีกลูโคสสูงในพลาสมาเป็นเวลานานจะทำให้ฮีโมโกลบินมีน้ำตาลสะสมมากขึ้น ในปี ค.ศ. 2003 สมาคมโรคเบาหวานแห่งสหรัฐอเมริกาได้ให้คำแนะนำว่า ผู้ป่วยเบาหวานควรมี HbA1c น้อยกว่าร้อยละ 7 และในกรณีที่มี HbA1c มากกว่าร้อยละ 8 อาจต้องพิจารณาเปลี่ยนการรักษาเพื่อให้ควบคุมระดับน้ำตาลได้ดีขึ้น⁽⁵⁹⁾

2.3 ภาวะแทรกซ้อนทางระบบของเบาหวาน

1. ภาวะแทรกซ้อนอย่างเฉียบพลัน

ได้แก่ ภาวะเลือดเป็นกรดจากเบาหวาน (Diabetes ketoacidosis; DKA) ภาวะหมดสติจากน้ำตาลในเลือดสูง (Hyperglycemic hyperosmolar state) และภาวะน้ำตาลต่ำ (Hypoglycemia)⁽¹⁾

2. ภาวะแทรกซ้อนเรื้อรังที่เกิดกับหลอดเลือดขนาดใหญ่

โรคหลอดเลือดและหัวใจ

ความเสี่ยงของโรคหลอดเลือดและหัวใจจะเพิ่มขึ้นอย่างมากในผู้ป่วยโรคเบาหวาน และเป็นสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิต โดยมีปัจจัยเสี่ยง ได้แก่ โรคอ้วนลงพุง ภาวะดื้อต่ออินซูลิน ความดันโลหิตสูง และภาวะไขมันผิดปกติ การป้องกันโรคหัวใจและหลอดเลือดสามารถทำได้โดยการควบคุมความดันโลหิต การรักษาภาวะไขมันผิดปกติ การเลิกสูบบุหรี่ การรักษาด้วยยาแอสไพริน และที่สำคัญคือ การควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด⁽¹⁾

3. ภาวะแทรกซ้อนเรื้อรังที่เกิดกับหลอดเลือดขนาดเล็ก

ได้แก่ โรคไตจากเบาหวาน เบาหวานขึ้นจอตา และปลายประสาทเสื่อมจากเบาหวาน⁽¹⁾

2.4 ภาวะแทรกซ้อนในช่องปากของโรคเบาหวาน

มีลักษณะในช่องปากหลายอย่างที่เป็ผลจากภาวะแทรกซ้อนของโรคเบาหวาน โดยมักพบในผู้ป่วยที่ควบคุมน้ำตาลได้ไม่ดี ภาวะแทรกซ้อนในช่องปากเหล่านี้ ได้แก่ โรคปริทันต์อักเสบ การหลั่งน้ำลายลดลงหรือมีส่วนประกอบของน้ำลายที่เปลี่ยนแปลงไป การติดเชื้อแบคทีเรียไวรัส หรือเชื้อราได้ง่าย แผลในช่องปาก ลิ้นมีลักษณะเป็นรอยแตก (Fissured tongue) และการมีฟันผุง่าย เป็นต้น⁽⁶⁰⁾

โรคปริทันต์อักเสบเป็นหนึ่งในภาวะแทรกซ้อนในช่องปากของโรคเบาหวาน โดยการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเกิดและความรุนแรงของโรคปริทันต์อักเสบที่ถูกนำเสนอเพื่ออธิบายความไวต่อโรคปริทันต์ที่เพิ่มขึ้นในผู้ป่วยโรคเบาหวาน ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงของเชื้อจุลินทรีย์ได้เหงือก การเปลี่ยนแปลงในการตอบสนองของร่างกาย และการหายของแผลที่เปลี่ยนไป⁽⁵⁾

2.5 บทบาทของภาวะเครียดออกซิเดชันและการอักเสบต่อภาวะแทรกซ้อนของโรคเบาหวานชนิดที่ 2

พยาธิสรีรวิทยาที่เชื่อมโยงโรคเบาหวานชนิดที่ 2 และภาวะแทรกซ้อนของหลอดเลือดมีความซับซ้อนและเกิดได้จากหลายปัจจัย โดยเชื่อว่ากลไกที่อยู่เบื้องหลังภาวะแทรกซ้อนเหล่านี้เกี่ยวข้องกับความเป็นพิษจากภาวะน้ำตาลและไขมันในเลือดสูง โดยน้ำตาลในเลือดสูงก่อให้เกิดความผิดปกติในการทำงานของไมโทคอนเดรีย และการเพิ่มการสร้าง ROS ส่งผลให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน ส่วนไขมันในเลือดสูงทำให้เกิดการปล่อยไซโตไคน์อักเสบจากเนื้อเยื่อไขมัน ซึ่งทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันและการอักเสบระดับต่ำ ๆ ทางระบบ ซึ่งมีส่วนสำคัญในการดำเนินโรคเบาหวานชนิดที่ 2 และการเกิดภาวะแทรกซ้อน⁽²⁾ นอกจากความเป็นพิษจากน้ำตาลและไขมันในเลือดสูงแล้ว ภาวะดื้ออินซูลินและความดันโลหิตสูงยังทำให้เกิดความเสียหายกับผนัง

หลอดเลือด และส่งผลให้เกิดความผิดปกติในการทำงานของหลอดเลือด (Endothelial dysfunction) ซึ่งเป็นอาการนำก่อนการเกิดภาวะแทรกซ้อนของหลอดเลือดขนาดเล็กและใหญ่⁽⁶¹⁾

ความเป็นพิษจากระดับน้ำตาลในเลือดสูงก่อให้เกิดความเสียหายกับหลอดเลือดจากกลไกต่าง ๆ ได้แก่ การเพิ่มการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอนด์โปรดักส์ (Advanced glycation end products; AGEs) และการแสดงออกของตัวรับแอดวานซ์ไกลเคชันเอนด์โปรดักส์ (Receptor for AGEs; RAGE) การกระตุ้นโปรตีนไคเนสซี (Protein kinase C; PKC) การกระตุ้นวิถีโพลียอล (Polyol pathway) และการกระตุ้นวิถีเฮกโซซามีน (Hexosamine pathway) ซึ่งเหนี่ยวนำให้ไมโทคอนเดรียสร้าง ROS เพิ่มขึ้น ส่งผลให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน⁽⁶²⁾

โดย AGEs ซึ่งสร้างจากปฏิกิริยาที่ไม่ใช้เอนไซม์ระหว่างโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสกับโปรตีนหรือไขมัน มีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันในเซลล์ เมื่อ AGEs จับกับ RAGE จะเกิดการกระตุ้นเอ็นเอตีพีเอชออกซิเดส (NADPH oxidase; NOX) และวิถี NF- κ B ทำให้เกิดการอักเสบและการแข็งตัวของหลอดเลือด (Thrombogenic alteration) ซึ่งเป็นพยาธิกำเนิดของภาวะแทรกซ้อนในหลอดเลือดของโรคเบาหวาน⁽⁶³⁾ โดย AGEs ที่จับกับผนังหลอดเลือด จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและหักล้าง (Neutralize) ไนตริกออกไซด์ ส่งผลต่อการทำงานของเซลล์บุผนังหลอดเลือด นอกจากนี้ AGEs ลดการแสดงออกของ eNOS และการอักเสบที่มีแมคโคฟาจเป็นสื่อภายในผนังหลอดเลือด และยังเพิ่มเอนโดทีลิน-1 (Endothelin-1; ET-1) ซึ่งเป็นสารทำให้หลอดเลือดหดตัว (Vasoconstrictor)⁽²⁾

ไดเอซิลกลีเซอรอล (Diacylglycerol; DAG) ซึ่งสร้างจากภาวะน้ำตาลในเลือดสูงสามารถกระตุ้น PKC ทำให้เกิดผลต่าง ๆ เช่น เพิ่มการสร้างอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ในเซลล์บุผนังหลอดเลือดซึ่งทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน ลดการทำงานของ eNOS และเพิ่ม ET-1 จึงลดการสร้างไนตริกออกไซด์ ทำให้หลอดเลือดหดตัว และเกิดการรวมตัวของเกล็ดเลือด นอกจากนี้ PKC ยังกระตุ้นการสร้างสารประกอบนอกเซลล์ (Extracellular matrix; ECM) และกระตุ้นการอักเสบ โดยกระตุ้นไซโตไคน์และโมเลกุลยึดเกาะ⁽⁶²⁾

น้ำตาลในเลือดสูงส่งผลต่อกระบวนการสร้างไนตริกออกไซด์ ซึ่งมีความสำคัญในการควบคุมภาวะสมดุลของหลอดเลือด โดยไนตริกออกไซด์จะกระตุ้นกวานิลิล ไสเคลส (Guanylyl cyclase) ในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด ทำให้เกิดการขยายหลอดเลือด เพิ่มการไหลเวียนของเลือด ยับยั้งการรวมตัวและการเกาะของเกล็ดเลือด และลดการเพิ่มจำนวนของกล้ามเนื้อเรียบ⁽⁶⁴⁾ eNOS เป็นเอนไซม์ที่สร้างไนตริกออกไซด์ มีการแสดงออกเป็นประจำในเซลล์บุผนังหลอดเลือด โดยอยู่ในคาวีโอล (Caveolae) เมื่อเซลล์บุผนังหลอดเลือดสัมผัสกับปัจจัยเสี่ยง

เช่น คาร์บอนหรือ ความดันโลหิตสูง น้ำตาลและไขมันในเลือดสูงซึ่งมักพบในโรคเบาหวาน จะมีการปรับเปลี่ยนวิธีการส่งสัญญาณ โดยเพิ่มการสร้าง ROS ซึ่งจะทำให้เตตระไฮโดรไบโอเทอริน (Tetrahydrobiopterin; BH₄) ซึ่งเป็นปัจจัยร่วมที่สำคัญของ eNOS เกิดการออกซิเดชันและมีปริมาณลดลง จึงทำให้เอนไซม์ไม่รวมตัวตามปกติและเกิดเป็น eNOS อันคัปปลิง (Uncoupling) ซึ่งจะสร้างซูเปอร์ออกไซด์แทนไนตริกออกไซด์ ทำให้ปริมาณไนตริกออกไซด์ลดลง และทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน นอกจากนี้ซูเปอร์ออกไซด์ที่มากเกินไปจะทำปฏิกิริยากับไนตริกออกไซด์ได้ผลิตภัณฑ์เป็นเปอร์ออกซีไนไตรต์ (Peroxynitrite) ซึ่งสร้างความเสียหายได้มากกว่าซูเปอร์ออกไซด์ ปัจจัยเหล่านี้นำไปสู่ความผิดปกติในการทำงานของหลอดเลือด และภาวะแทรกซ้อนของโรคเบาหวาน⁽⁶⁵⁾

นอกจากนี้ ภาวะดื้อต่ออินซูลิน ก็มีบทบาททำให้เกิดการทำงานผิดปกติของหลอดเลือด จากกลไกที่อินซูลินกระตุ้นวิถีไมโทเจน แอคทีเวเตด โปรตีนไคเนส/เอ็กstrasเซลล์ลูลาร์ ซิเนส (Mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinases; MAPK/ERK) ทำให้เกิดการเพิ่ม ET-1 และลดการสร้างไนตริกออกไซด์ในวิถีฟอสฟาติดีลอินซิทอล-3-ไคเนส/ซีรีน-ทรีโอนีน ไคเนส (Phosphatidyl inositol-3-kinase/serine-threonine kinase; PI3K/AKT)⁽⁶⁶⁾

ภาวะเครียดออกซิเดชันและการอักเสบส่งเสริมซึ่งกันและกัน และทำให้เกิดการตอบสนองโดยการอักเสบเพิ่มขึ้นและยาวนานเป็นพยาธิกำเนิดของโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ความเป็นพิษจากน้ำตาลและไขมันจะเหนี่ยวนำการอักเสบจากหลายกลไก โดยเฉพาะการกระตุ้น NF-κB ซึ่งทำให้เกิดการชักนำ (Recruitment) และการกระตุ้นเซลล์ภูมิคุ้มกัน นอกจากนี้ ROS ยังทำให้เกิดการเหนี่ยวนำการแสดงออกของโมเลกุลยึดเกาะ เช่น ICAM-1 และ VCAM-1 เพิ่มการชักนำเซลล์อักเสบ ส่งผลให้เพิ่มการหลั่งไซโตไคน์และสารสื่อการอักเสบ เช่น IL-6, TNF-α และโมโนไซต์เคโมแอตแทรกแทนต์โปรตีน-1 (Monocyte chemoattractant protein; MCP-1)⁽⁶⁷⁾

CRP เป็นตัวชี้วัดการอักเสบ ซึ่งสร้างจากเซลล์ตับ และควบคุมโดย IL-6 และ TNF-α พบว่ามีการเพิ่มระดับ CRP ในซีรัมเมื่อมีการอักเสบเฉียบพลันและเรื้อรัง เช่น ภาวะหลอดเลือดแข็ง (Atherosclerosis) โดย CRP มีบทบาทส่งเสริมการแสดงออกของ ICAM-1 และ VCAM-1 ซึ่งช่วยในการยึดเกาะของโมโนไซต์และเซลล์ที (T cell) กับผนังหลอดเลือดในขั้นแรกของการเกิดหลอดเลือดแข็งตัว (Atherogenic process) ระดับ CRP ที่สูงจะเพิ่มความเสี่ยงของโรคหัวใจและหลอดเลือด (Cardiovascular event) ได้แก่ โรคหลอดเลือดส่วนปลาย โรคกล้ามเนื้อหัวใจตายเฉียบพลัน โรคหลอดเลือดสมอง และการเสียชีวิต การเพิ่มของระดับไซโตไคน์กระตุ้นการอักเสบทั้ง

IL-6, TNF- α และ CRP ทำให้เกิดการลดลงของไนตริกออกไซด์ และเพิ่มการทำงานของ ET-1 ทำให้หลอดเลือดหดตัว เพิ่มการซึมผ่านผนังหลอดเลือด (Vascular permeability) เปลี่ยนแปลงการควบคุมหลอดเลือด (Vasoregulatory response) และเปลี่ยนแปลงการยึดเกาะของโมโนไซต์ นิวโทรฟิล และแมคโครฟาจ ทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ นอกจากนี้ไซโตไคน์ยังกระตุ้นการแสดงออกของตัวยับยั้งพลาสมิโนเจน แอคติเวเตอร์ 1 (Plasminogen activator inhibitor-1; PAI-1) ส่งเสริมการอุดตันของหลอดเลือด⁽⁶⁷⁾

กรดไขมันอิสระ (Free fatty acid; FFA) ที่มากเกินไป มีผลต่อการเกิดภาวะดื้ออินซูลินผ่านการกระตุ้นตัวรับเหมือนทอลล์ 4 (Toll-like receptor 4; TLR 4) บนเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งทำให้เกิดการกระตุ้นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ได้แก่ ซิ Jun เอ็น เทอมีนอล ไคเนส (c-Jun N-terminal kinase; JNK) IKK และ NF- κ B นอกจากนี้ TNF- α ที่หลั่งจากเนื้อเยื่อไขมันยังสามารถกระตุ้นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบได้เช่นกัน การอักเสบจากการเหนี่ยวนำของโมเลกุลเหล่านี้จะยับยั้งการทำงานของ eNOS โดยลดการแสดงออกและการทำงานของโคเนสของตัวรับอินซูลิน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการเติมหมู่ฟอสเฟตของไทโรซีนในซับสเตรตตัวรับอินซูลิน 1 (Insulin receptor substrate 1; IRS-1) ซึ่งจะทำให้เกิดการกระตุ้นวิถี PI3K ลดลง ส่งผลให้ลดการสร้างไนตริกออกไซด์ในเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด และยับยั้งการเคลื่อนของตัวขนส่งกลูโคส 4 (Glucose transporter type 4; GLUT4) ไปที่เยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เกิดการนำกลูโคสเข้าสู่เนื้อเยื่อได้น้อยลง ผลเหล่านี้ก่อให้เกิดความผิดปกติในการทำงานของหลอดเลือด และภาวะดื้ออินซูลิน⁽⁶⁷⁾

นอกจากนั้นไลโปโปรตีนความหนาแน่นต่ำ (Low density lipoprotein; LDL) ที่ถูกออกซิไดซ์ (Oxidized lipid from LDL particle; Ox-LDL) จะสะสมอยู่ในผนังหลอดเลือดแดง⁽⁶⁸⁾ แล้วถูกแมคโครฟาจจับกิน ทำให้แมคโครฟาจกลายเป็นโฟมเซลล์ (Foam cell) ซึ่งโฟมเซลล์จะกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของแมคโครฟาจ และดึงดูดเซลล์ที่มาเหนี่ยวนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนของกล้ามเนื้อเรียบในผนังหลอดเลือดและการสะสมคอเลสเตอรอล กระบวนการนี้จะทำให้เกิดการสะสมของคราบไขมัน (Atherosclerotic plaque) ที่ผนังหลอดเลือด ซึ่งมีพังผืดหุ้มอยู่ (Fibrous cap) เมื่อมีการแตกออกของรอยโรค อาจนำไปสู่การอุดตันของหลอดเลือดอย่างเฉียบพลัน (Acute vascular infarction)⁽⁶⁹⁾

กล่าวคือ ความเสียหายของเซลล์จากภาวะเครียดออกซิเดชันเป็นตัวกระตุ้นการอักเสบ และการอักเสบที่เกิดขึ้นก็กระตุ้นการสร้างอนุมูลอิสระ เป็นวงจรของกระบวนการเกิดโรคเบาหวานและภาวะแทรกซ้อนของหลอดเลือดในโรคเบาหวาน⁽⁶⁷⁾

3. โรคปริทันต์อักเสบ

โรคปริทันต์ (Periodontal disease) เป็นโรคที่เกิดขึ้นกับอวัยวะที่อยู่ล้อมรอบตัวฟัน หรือ อวัยวะปริทันต์ (Periodontium) ซึ่งประกอบด้วยเหงือก (Gingiva) เอ็นยึดปริทันต์ (Periodontal ligament) เคลือบรากฟัน (Cementum) และกระดูกเบ้าฟัน (Alveolar bone) สามารถจำแนกได้เป็นโรคเหงือกอักเสบ (Gingivitis) และโรคปริทันต์อักเสบ โดยโรคเหงือกอักเสบจะมีการอักเสบของเหงือกเพียงอย่างเดียวโดยไม่มีการทำลายอวัยวะปริทันต์ ส่วนโรคปริทันต์อักเสบจะมีการอักเสบและมีการทำลายอวัยวะปริทันต์ร่วมด้วย จึงทำให้เกิดการสูญเสียการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์ และนำไปสู่การสูญเสียฟันหากไม่ได้รับการรักษาที่เหมาะสม⁽³⁾

3.1 พยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์อักเสบ

พยาธิกำเนิด (Pathogenesis) ของโรคปริทันต์อักเสบเกิดมาจากหลายสาเหตุ (Multifactorial) โดยสาเหตุเริ่มแรกมาจากเชื้อแบคทีเรียในคราบจุลินทรีย์ (Dental plaque) เช่น เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (Gram-negative) ที่ไม่พึ่งออกซิเจน (Anaerobe) หรือเจริญได้โดยไม่ชอบออกซิเจน (Facultative anaerobe) ที่เข้ามายึดครอง (Colonize) บนผิวฟันบริเวณใกล้ขอบเหงือก (Marginal gingiva) หรือใต้เหงือก (Subgingival) เป็นระยะเวลานาน เมื่อไม่มีการกำจัดออกไปจะมีการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ก่อโรค (Pathogen) และมีการสร้างปัจจัยที่ก่อให้เกิดความรุนแรง (Virulence factor) เพิ่มมากขึ้น ซึ่งจะกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Host immune response) ทำให้มีการสร้างสารตัวกลางกระตุ้นการอักเสบ (Pro-inflammatory mediator) และเกิดการตอบสนองในรูปแบบของการทำลายเนื้อเยื่อและกระดูกเบ้าฟัน นอกจากนี้สาเหตุหลักที่เกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์ก่อโรคและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกายแล้ว ยังมีปัจจัยอื่น ๆ เกี่ยวข้องด้วย ได้แก่ ปัจจัยเสี่ยงทางพันธุกรรม (Genetic risk factor) ภาวะแวดล้อม (Environment) และปัจจัยเสี่ยงที่ได้รับมาภายหลัง (Acquired risk factor) ผลลัพธ์ที่ได้คือ อาการแสดงทางคลินิกของโรคปริทันต์ รวมไปถึงการลุกลามของโรคที่มีความแตกต่างกันไปในแต่ละบุคคล⁽⁴⁾

3.2 การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกายในโรคปริทันต์อักเสบ

โรคปริทันต์อักเสบเกิดจากการมีปฏิสัมพันธ์ที่ซับซ้อนระหว่างคราบจุลินทรีย์และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยคราบจุลินทรีย์เป็นปัจจัยนำในการเกิดโรค แต่การทำลายอวัยวะปริทันต์ร้อยละ 80 เกิดจากการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน⁽⁷⁰⁾

ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายประกอบด้วยส่วนประกอบต่าง ๆ ที่สำคัญ ได้แก่ เซลล์หลากหลายชนิดทั้งที่จัดอยู่ในระบบภูมิคุ้มกัน (Immune cell) และที่ไม่จัดอยู่ในระบบภูมิคุ้มกัน (Non-immune cell) ซึ่งมีปฏิสัมพันธ์และทำหน้าที่เกี่ยวข้องร่วมกันอย่างสลับซับซ้อน โดยช่วยทำ

ให้ร่างกายสามารถแยกแยะและจดจำได้ว่าสิ่งเร้าชนิดใดเป็นสิ่งแปลกปลอมที่รุกรานเข้าสู่ร่างกาย และทำลายสิ่งแปลกปลอมนั้น นอกจากนี้เซลล์ต่าง ๆ ยังสามารถสร้างโมเลกุลที่ทำหน้าที่เป็นสารตัวกลางที่ช่วยกระตุ้นการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เช่น ไซโตไคน์ คอมพลีเมนต์ (Complement) แอนติบอดี (Antibody) และเพปไทด์ต้านจุลินทรีย์ (Antimicrobial peptide) ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายแบ่งออกเป็น ระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดหรือระบบภูมิคุ้มกันไม่จำเพาะ (Innate/non-specific immune system) และระบบภูมิคุ้มกันที่ได้มาหรือระบบภูมิคุ้มกันจำเพาะ (Acquired/specific immune system) ซึ่งมีบทบาทในการทำลายจุลินทรีย์ร่วมกับระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด เพื่อทำให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดในการทำลายจุลินทรีย์ แต่อย่างไรก็ตามร่างกายจะต้องอาศัยเวลาในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันที่ได้มา เป็นเวลาหลายวันก่อนที่จะมีประสิทธิภาพเพียงพอในการต่อต้านจุลินทรีย์ ดังนั้น ในช่วงระยะเริ่มแรกของการติดเชื้อระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดจะมีบทบาทสำคัญในการต่อต้านจุลินทรีย์ เพื่อช่วยจำกัดขอบเขตของการติดเชื้อ ถือเป็นด่านแรกของการต่อต้านจุลินทรีย์ไม่ให้แพร่กระจายไปสู่ส่วนอื่น ๆ ของร่างกาย⁽⁷¹⁾

องค์ประกอบของระบบภูมิคุ้มกันที่พบในอวัยวะปริทันต์ ได้แก่ การไหลเวียนของน้ำลายและน้ำเหลืองเหงือก ร่วมกับการลอกหลุด (Desquamation) ของเซลล์เยื่อบุผิวเหงือก (Gingival epithelial cell) และเซลล์เยื่อบุผิวเชื่อมต่อ (Junctional epithelial cell) ภายในร่องเหงือก ซึ่งจะทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถเกาะติดและเพิ่มจำนวนได้ นอกจากนั้นยังพบการทำงานของเซลล์ของอวัยวะปริทันต์ (Resident cell) เช่น เซลล์เยื่อบุผิว และเซลล์สร้างเส้นใย ร่วมกับเซลล์อักเสบ (Inflammatory cell) เช่น นิวโทรฟิล และแมคโครฟาจ ในการต่อต้านและทำลายจุลินทรีย์⁽⁷¹⁾

เมื่อแบคทีเรียและผลิตภัณฑ์ของแบคทีเรียแทรกซึมเข้าไปในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน LPS บนเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียจะจับกับ TLR บนเยื่อหุ้มเซลล์ต่าง ๆ ในอวัยวะปริทันต์แล้วกระตุ้นการอักเสบ⁽⁷²⁾ โดยมีลำดับดังนี้ เซลล์แมสต์ (Mast cell) จะหลั่งสารอะมีน (Vasoactive amines) และ TNF- α ซึ่งเพิ่มการซึมผ่านหลอดเลือด และการแสดงออกของโมเลกุลยึดเกาะ เช่น ICAM-1 และพีซีเลคตินบนเซลล์บุผนังหลอดเลือด ทำให้นิวโทรฟิลเคลื่อนผ่านผนังหลอดเลือดมาที่เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน แล้วหลั่งไลโซไซม์ (Lysozyme) ซึ่งย่อยสลายเนื้อเยื่อ จากนั้นลิมโฟไซต์ (Lymphocyte) และแมคโครฟาจ ก็จะเข้ามาที่เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ซึ่งมีการทำลายคอลลาเจนไปแล้วร้อยละ 60-70 แต่ไม่มีการทำลายกระดูก โดยในสภาวะนี้ยังสามารถฟื้นฟูให้กลับมาปกติได้ แต่ถ้าหากเป็นผู้ที่มีความไวต่อการเกิดโรค และ/หรือมีภาวะแวดล้อมที่ทำให้การอักเสบเรื้อรังจะเกิดการสูญเสียกระดูก

แบบผันกลับไม่ได้ โดยเริ่มจากแมคโครฟาจสร้างเซลล์ตั้งต้น (Pre-osteoclast) ซึ่งเมื่อเจริญเต็มที่ จะทำหน้าที่สลายกระดูก⁽⁷³⁾

นอกจากนี้เมื่อการอักเสบยังคงอยู่ แอนติเจนของแบคทีเรียจะถูกเซลล์นำเสนอ แอนติเจน (Antigen presenting cell; APC) เช่น เซลล์เดนไดรติก (Dendritic cell), แมคโครฟาจ และเซลล์บี (B cell) นำไปกระตุ้นเซลล์ทีเฮลเปอร์ 0 (Naïve T helper cells; Th0) ให้เปลี่ยนเป็น Th1, Th2, Th17 และเซลล์ทีเรกูเลทอรี (Regulatory T cell; Treg) ซึ่งสร้างไซโตไคน์ต่าง ๆ ดังนี้ Th1 มีบทบาทในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบอาศัยเซลล์ (Cell-mediated immune response) โดยสร้าง IFN- γ , TGF- β , IL-2 และ TNF- α จากการกระตุ้นด้วย IL-12 ส่วน Th2 มีบทบาทในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบอาศัยสารน้ำ (Humoral immune response) โดยสร้าง IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 และ TGF- β จากการกระตุ้นด้วย IL-4 นอกจากนี้ Th17 และ Treg มีบทบาทเกี่ยวข้องกับภาวะภูมิคุ้มกันตนเอง (Autoimmunity) และการคงสมดุลของภูมิคุ้มกัน (Immune homeostasis) โดย Th17 หลั่ง IL-17, IL-23, IL-22, IL-6 และ TNF- α จากการกระตุ้นด้วย TGF- β , IL-1 β และ IL-6 ซึ่ง IL-17 เป็นไซโตไคน์ที่กระตุ้นการสร้างสารสื่อกลางการอักเสบมากมาย รวมถึง TNF- α , PGE₂, IL-6 และ IL-1 β โดยสารสื่อกลางเหล่านี้จะกระตุ้นเซลล์สลายกระดูกทำให้เกิดการละลายของกระดูก ส่วน Treg จะถูกกระตุ้นด้วย TGF- β และหลังไซโตไคน์กดภูมิคุ้มกัน (Immunosuppressive cytokine) ได้แก่ IL-10 และ TGF- β หากเกิดความบกพร่องในการทำงานของ Treg ทำให้การอักเสบไม่หายไป และเกิดโรคภูมิคุ้มกันตนเอง (Autoimmune disease) เช่น โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (Rheumatoid arthritis) โรคปลอกประสาทเสื่อมแข็ง (Multiple sclerosis) และลำไส้อักเสบ (Colitis) นอกจากนี้มีการศึกษาที่พบ Treg และ Th17 ในเนื้อเยื่อปริทันต์ของผู้ป่วยปริทันต์อักเสบ ร่วมกับการเพิ่มการแสดงออกของฟอร์คเฮดบ็อกซ์ 3 (Forkhead box P3; Foxp3) และ IL-17 ซึ่งเป็นตัวชี้วัดของเซลล์ Treg และ Th17 ตามลำดับ แสดงถึงบทบาทของเซลล์เหล่านี้ในการควบคุมการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (Immunoregulation) ในโรคปริทันต์อักเสบ⁽⁷³⁾

นอกจากเซลล์อักเสบที่มีบทบาทกระตุ้นการอักเสบแล้ว เซลล์ในเนื้อเยื่อปริทันต์ก็อาจส่งผลต่อการลุกลาม และการคงอยู่ของการอักเสบในโรคปริทันต์อักเสบ ดังนี้ หลอดเลือดประกอบด้วยเซลล์บุผนังหลอดเลือด และเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ เป็นส่วนแรกที่สัมผัสกับเซลล์อักเสบ ในส่วนของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือกนั้นเซลล์ส่วนใหญ่คือ เซลล์สร้างเส้นใยเหงือก มีบทบาทในการอักเสบ และทำให้โรคคงอยู่ เนื่องจากทำหน้าที่สร้างสารสื่อกลางการอักเสบ เช่น ไซโตไคน์ คีโมไคน์ (Chemokine) เอนไซม์ย่อยโปรตีน (Proteolytic enzyme) และพรอสตาแกลนดิน และเซลล์

สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์ (Periodontal ligament fibroblast) อยู่ระหว่างฟันและกระดูกเบ้าฟัน เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ โดยสร้างสารสื่อกลางการอักเสบ เช่น พรอสตาแกลนดิน เอนไซม์ ย่อยโปรตีน และปัจจัยที่ส่งผลต่อการละลายของกระดูก⁽⁷³⁾

3.3 บทบาทของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก

เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ (Human gingival fibroblast; HGF) เป็นเซลล์ที่มีจำนวนมากที่สุดในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเหงือก มีบทบาทในการควบคุมการอักเสบในรอยโรคปริทันต์ โดยเพิ่มระดับไซโตไคน์ ทำให้เกิดโรคปริทันต์อักเสบ⁽⁷⁴⁾

จากการศึกษาของ Ara และคณะ (2009) พบว่า HGF ไม่แสดงความทนต่อ LPS (LPS tolerance) กล่าวคือมีการสร้างไซโตไคน์ ได้แก่ IL-6 และ IL-8 ตอบสนองต่อการกระตุ้นของ LPS ตลอดเวลา ต่างจากโมโนไซต์และแมคโครฟาจที่แสดงความทนต่อ LPS เพื่อป้องกันร่างกาย ไม่ให้มีการตอบสนองที่ยาวนานและมากเกินไป ซึ่งจะนำไปสู่การอักเสบและการทำลายเนื้อเยื่อ โดยกลไกที่ทำให้ HGF ไม่แสดงความทนต่อ LPS เกิดจาก (1) HGF ที่กระตุ้นด้วย LPS ไม่มีการแสดงออกของตัวยับยั้งการส่งสัญญาณ TLR ได้แก่ ตัวยับยั้งการส่งสัญญาณไซโตไคน์-1 (Suppressor of cytokine signalling-1; SOCS-1), ไคเนสเอ็มที่เกี่ยวข้องกับตัวรับ IL-1 (IL-1 receptor-associated kinase M; IRAK-M) และโดเมนเอสเซช 2 ที่ประกอบด้วยอินซิทอล 5 ฟอสฟาเตส (SH2 domain-containing inositol-5-phosphatase; SHIP-1) (2) HGF ที่กระตุ้นด้วย LPS มีการสร้าง TGF- β_1 ไม่เพียงพอดต่อการลดการสร้างไซโตไคน์ และ IL-10 ไม่มีผลต่อการสร้างไซโตไคน์ของ HGF ที่กระตุ้นด้วย LPS (3) HGF ไม่มีการลดการแสดงออกของ TLR4 ที่ผิวเซลล์ กลไกเหล่านี้ทำให้ HGF สามารถสร้างไซโตไคน์กระตุ้นการอักเสบได้อย่างน้อย 7 วันเมื่อมีการกระตุ้นด้วย LPS บ่งชี้ถึงคุณสมบัติของ HGF ในการคงสภาพการอักเสบ และเป็นเซลล์สำคัญในการก่อโรคปริทันต์อักเสบ⁽²⁹⁾

สอดคล้องกับการศึกษาของ Kang, Hu และ Ge (2016) ที่พบว่า HGF จากเนื้อเยื่อเหงือกที่อักเสบและไม่อักเสบไม่แสดงความทนต่อ LPS โดย HGF จากเนื้อเยื่อเหงือกอักเสบสามารถกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของไซโตไคน์ ได้แก่ IL-6, IL-8, IL-1 β และ TNF- α โดยใช้ LPS และเวลา (1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, 12 ชั่วโมง) ที่น้อยกว่าการกระตุ้น HGF จากเนื้อเยื่อเหงือกที่ไม่อักเสบ (5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, 24 ชั่วโมง)⁽⁷⁵⁾

นอกจากนี้ HGF ยังมีการส่งสัญญาณแทรกข้าม (Crosstalk) กับเซลล์ภูมิคุ้มกัน ซึ่งส่งผลต่อการหลั่งของโรคปริทันต์อักเสบ โดยนิวโทรฟิลในเนื้อเยื่อปริทันต์อักเสบจะสร้างแคลโพโรเทคติน (Calprotectin) เหนี่ยวนาการสร้างตัวรับ IL-6 แบบละลายได้ (Soluble form of IL-6

receptor; sIL-6R) โดยแมคโครฟาจ และเหนี่ยวนำการสร้าง IL-6 โดย HGF ซึ่ง IL-6 จะจับกับ sIL-6R เหนี่ยวนำ HGF ให้เกิดการสร้างวาสคิวลาร์ เอนโดทีเลียล โกรทแฟกเตอร์ (Vascular Endothelial Growth Factor; VEGF) MMP-1 และคาเทปซินแอล (Cathepsin L) ส่งผลให้เกิดการลุกลามของโรคปริทันต์อักเสบ⁽⁷⁶⁾

4. ความสัมพันธ์ของโรคเบาหวานกับโรคปริทันต์อักเสบ

ผู้ป่วยโรคเบาหวานมีความเสี่ยงของการเกิดโรคปริทันต์อักเสบสูงกว่าผู้ที่ไม่เป็นโรคเบาหวาน 2-3 เท่า⁽¹⁾ โดยขึ้นอยู่กับ การควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด เช่นเดียวกับภาวะแทรกซ้อนอื่น ๆ ของโรคเบาหวาน⁽⁷⁷⁾

กระบวนการที่เชื่อมโยงทั้งสองโรคเข้าด้วยกันนั้นได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก และมีแนวโน้มว่าการอักเสบอย่างรุนแรงที่เกิดขึ้นจากโรคหนึ่งจะส่งผลเสียต่ออีกโรค

4.1 กลไกที่โรคเบาหวานส่งผลต่อโรคปริทันต์

โรคเบาหวานเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคปริทันต์อักเสบ โดยเพิ่มการอักเสบในเนื้อเยื่อปริทันต์ เนื่องจากการเพิ่มการสะสมของ AGEs ในเนื้อเยื่อปริทันต์ และเพิ่มปฏิกิริยาระหว่าง AGEs และ RAGE ซึ่งนำไปสู่การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและการอักเสบ⁽⁷⁸⁾ ทำให้เพิ่มการผลิตไซโตไคน์ เช่น IL-1 β , IL-6 และ TNF- α เพิ่มภาวะเครียดออกซิเดชัน และเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของ RANKL/OPG ในลักษณะที่นำไปสู่การละลายตัวของกระดูก^(6, 79) ปัจจัยทั้งหมดเหล่านี้ส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อเนื้อเยื่อ เพิ่มการสลายของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และการละลายของกระดูกเข้าฟัน ทำให้เกิดโรคปริทันต์อักเสบ นอกจากนี้ความอ้วน (Adiposity) และอดีพไคน์ (Adipokine) หรือไซโตไคน์กระตุ้นการอักเสบที่หลั่งมาจากเนื้อเยื่อไขมัน ยังช่วยส่งเสริมให้เกิดสภาพแวดล้อมที่ทำให้เกิดการอักเสบ⁽⁷⁹⁾ ผู้ที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบและโรคเบาหวานจะมีระดับ TNF- α , CRP และตัวชี้วัด (Marker) ของภาวะเครียดออกซิเดชันในกระแสเลือดเพิ่มขึ้น และจะลดลงภายหลังการรักษาโรคปริทันต์⁽⁶⁾

4.2 กลไกที่โรคปริทันต์อักเสบส่งผลต่อภาวะโรคเบาหวาน

กลไกที่เชื่อมโยงทั้งสองโรคคือ แบคทีเรียก่อโรคปริทันต์และผลิตภัณฑ์ของแบคทีเรีย รวมถึงไซโตไคน์และสารสื่ออักเสบอื่น ๆ ในเนื้อเยื่อปริทันต์ที่อักเสบมีการเข้าสู่กระแสเลือด และทำให้เกิดการอักเสบทางระบบที่นำไปสู่ความบกพร่องในการส่งสัญญาณของอินซูลินและภาวะดื้ออินซูลิน และก่อให้เกิดโรคเบาหวาน ซึ่งจะมีการเพิ่มของระดับ HbA1c ทำให้เพิ่มความเสี่ยงของภาวะแทรกซ้อนของเบาหวาน รวมถึงโรคปริทันต์อักเสบ เป็นความสัมพันธ์แบบสองทางระหว่างสองโรค⁽⁶⁾

4.3 ผลของการรักษาโรคปริทันต์ต่อโรคเบาหวาน

ในช่วง 2-3 ทศวรรษที่ผ่านมา มีการศึกษาจำนวนมากเกี่ยวกับผลของการรักษาโรคปริทันต์ต่อการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดในผู้ป่วยเบาหวาน โดยผลการศึกษาส่วนใหญ่มีความสอดคล้องกันในการลดลงของ HbA1c หลังจากการรักษาโรคปริทันต์ เช่น ในวิจยเชิงสังเคราะห์ (Cochrane review) ปี ค.ศ. 2010 และ 2015 ได้รายงานการลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของ HbA1c ประมาณ 3-4 มิลลิโมล/โมล (ร้อยละ 0.3-0.4) ในระยะสั้น (3-4 เดือน) หลังการรักษาปริทันต์^(80, 81) และในการวิเคราะห์ห่อภิมาณ (Meta-analysis) พบว่า การรักษาโรคปริทันต์แบบไม่ผ่าตัดทำให้มีการลดลงของ HbA1c อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่ 3 เดือนหลังการรักษา HbA1c มีการลดลง 4 มิลลิโมล/โมล (ร้อยละ 0.4) หรือมีการลดลงอยู่ในช่วง 3-7 มิลลิโมล/โมล (ร้อยละ 0.27-0.65) และการลดลงของ HbA1c ที่ 6 เดือนจะน้อยกว่าที่ 3 เดือน⁽¹⁸⁾

การรักษาโรคปริทันต์โดยการขูดหินน้ำลายและเกลารากฟัน ร่วมกับการดูแลอนามัยช่องปากอย่างเหมาะสม ช่วยลดแบคทีเรียได้เหงือก และส่งผลในการลดการอักเสบของอวัยวะปริทันต์ โดยการลดแบคทีเรียได้เหงือกจะนำไปสู่การลดระดับของแบคทีเรียและผลิตภัณฑ์แบคทีเรียในกระแสเลือด นอกจากนี้ยังมีรายงาน การลดลงของระดับไซโตไคน์และสารสื่อการอักเสบทางระบบ เช่น TNF- α และ CRP ภายหลังการรักษาปริทันต์⁽¹⁷⁾ กลไกที่นำไปสู่การลดลงของ HbA1c และการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดภายหลังการรักษาปริทันต์ในผู้ป่วยโรคเบาหวานนั้นยังไม่ชัดเจน แต่อนุมานว่าเกิดจากการลดการอักเสบและแบคทีเรียทางระบบ ซึ่งช่วยแก้ไขภาวะดื้ออินซูลินและการส่งสัญญาณของอินซูลิน⁽⁶⁾

4.4 ผลของระดับน้ำตาลสูงต่อการทำงานของเซลล์

ระดับน้ำตาลสูงมีผลต่อการทำงานของเซลล์ แต่ความเข้มข้นของน้ำตาลที่จะเริ่มเกิดผลเสียนั้นแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับอวัยวะ เนื้อเยื่อ และชนิดของเซลล์

จากการศึกษาของ Ohgi และ Johnson (1996) ในสภาวะน้ำตาลสูงคือ กลูโคส 20 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเทียบเท่ากับระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยเบาหวานที่ควบคุมไม่ได้ พบว่า HGF ยังคงมีการเพิ่มจำนวน ในขณะที่เซลล์เอ็นยัดปริทันต์ (Periodontal ligament; PDL) มีการยับยั้งการเจริญเติบโต⁽³⁵⁾

พริมา บุรณสิน และคณะ (2018) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบการเพิ่มจำนวน (Cell proliferation) และการเคลื่อนที่ (Cell migration) ของ HGF ในสภาวะจำลองโรคเบาหวาน พบว่า เมื่อเหนี่ยวนำ HGF ที่ระดับน้ำตาลสูงคือ 50 และ 75 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จะทำให้ HGF เกิดความบกพร่องในการเคลื่อนที่ มีการลดปริมาณและลดอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ มีการเพิ่มระดับเอนไซม์แลคเตตดีไฮโดรจีเนส (Lactate dehydrogenase; LDH) ซึ่งแสดงความเป็นพิษ

ของน้ำตาลต่อเซลล์ และการเพิ่ม ROS อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มน้ำตาลปกติคือ 5.5 มิลลิโมลาร์ และพบว่า เมื่อมีการให้สารต้านอนุมูลอิสระเอ็น-อะเซทิลซิสเทอีน (N-acetylcysteine; NAC) สามารถเพิ่มการเคลื่อนที่ของเซลล์ เพิ่มอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ และลดระดับ LDH ได้อย่างมีนัยสำคัญ จากผลการศึกษาจึงสรุปได้ว่า สภาวะน้ำตาลสูงเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน ทำให้ HGF ทำงานผิดปกติ และส่งผลต่อการหายของแผลในการรักษาปริทันต์ จากกลไกนี้ ระดับน้ำตาลที่เพิ่มสูงขึ้นอาจเป็นสาเหตุของการเพิ่มอุบัติการณ์ของโรคปริทันต์อักเสบในผู้ป่วยเบาหวาน⁽³²⁾

สอดคล้องกับการศึกษาของ Kim และคณะ (2006) ซึ่งศึกษาในเซลล์ PDL พบว่า สภาวะน้ำตาลสูงคือ กลูโคส 4500 มิลลิกรัม/ลิตร หรือ 25 มิลลิโมลาร์ ยับยั้งการทำงานของเซลล์ PDL ทั้งการเพิ่มจำนวน และการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์คล้ายเซลล์สร้างกระดูก (Osteoblast-like cell) เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะน้ำตาลปกติคือ กลูโคส 1100 มิลลิกรัม/ลิตร หรือ 6 มิลลิโมลาร์ และเนื่องจากการเพิ่มจำนวนและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์จำเป็นสำหรับการหายของแผล และการสร้างเนื้อเยื่อปริทันต์ใหม่ ดังนั้น การทำงานของเซลล์ที่ลดลงจากสภาวะน้ำตาลสูงก่อให้เกิดผลเสียต่อการหายและการสร้างเนื้อเยื่อปริทันต์ในผู้ป่วยเบาหวาน⁽³⁴⁾

เช่นเดียวกับการศึกษาของ Turner และ Bierman (1978) และการศึกษาของ Hehenberger และ Hansson (1997) ในเซลล์สร้างเส้นใยผิวหนังมนุษย์ (Human dermal fibroblast) ซึ่งพบว่า กลูโคสมีความสำคัญต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ โดยการเพิ่มระดับกลูโคสจนถึง 18 และ 15.5 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ มีผลเพิ่มการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใย แต่ระดับกลูโคสที่สูงกว่านั้นจะยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์^(33, 36)

จากการศึกษาของ Yang และคณะ (2014) พบว่า เนื้อเยื่อเหงือกของหนูที่เป็นเบาหวานมีการแสดงออกของ TLR2 และ TLR4 เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อเหงือกของหนูที่ไม่เป็นเบาหวาน และในเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกมนุษย์ (Human gingival epithelial cell; HGEC) ที่เลี้ยงในสภาวะน้ำตาลสูงคือ 25 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีการแสดงออกของ TLR4 มากกว่าที่เลี้ยงในสภาวะน้ำตาลปกติ (กลูโคส 5.5 มิลลิโมลาร์ และแมนนิทอล 19.5 มิลลิโมลาร์) อย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อกระตุ้น HGEC ด้วย LPS 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 8 ชั่วโมง พบว่า กลุ่มที่เลี้ยงในสภาวะน้ำตาลสูงมีการแสดงออกของไซโตไคน์กระตุ้นการอักเสบ ได้แก่ IL-6, IL-8 และ MCP-1 มากกว่าที่เลี้ยงในสภาวะน้ำตาลปกติอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้เมื่อใส่อนุพันธ์ไซโคลเฮกซีน (Ethyl(6R)-6-[(2-chloro-4-fluorophenyl)sulfamoyl]cyclohexene-1-carboxylate; TAK-242) ซึ่งเป็นตัวยับยั้ง TLR4 ก่อนการกระตุ้นด้วย LPS พบว่า TAK-242 ยับยั้งการแสดงออก

ของ IL-6, IL-8 และ MCP-1 ใน HGEC ที่เลี้ยงในสภาวะน้ำตาลสูง ดังนั้น สภาวะน้ำตาลสูงเพิ่มการแสดงออกของ TLR4 ของ HGEC ทำให้เกิดการเพิ่มการตอบสนอง (Hyper-responsiveness) ต่อการกระตุ้นที่ผ่าน TLR4 และส่งเสริมภาวะไวต่อการเกิดโรคปริทันต์อักเสบ⁽³⁷⁾

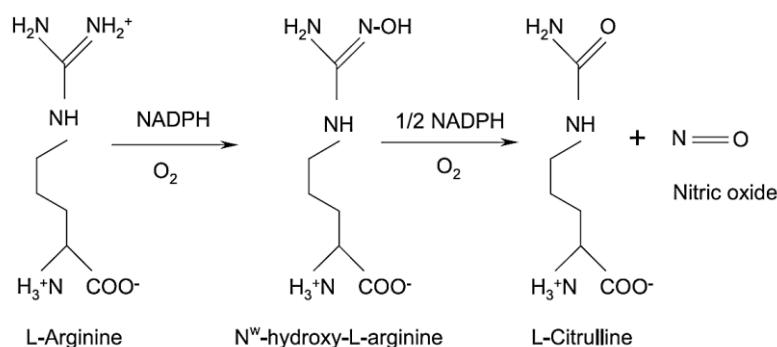
นอกจากนี้สภาวะน้ำตาลสูงยังมีผลต่อการส่งสัญญาณแทรกข้ามระหว่าง HGF และแมคโครฟาจ โดยนิวโทรฟิลในเนื้อเยื่อปริทันต์อักเสบของผู้ป่วยเบาหวานจะสร้างแคลโพเทคตินเหนี่ยวนำการสร้าง sIL-6R โดยแมคโครฟาจ และสภาวะน้ำตาลสูงจะเหนี่ยวนำการสร้าง IL-1 β และ sIL-6R โดยแมคโครฟาจ จากนั้น IL-1 β จะเหนี่ยวนำการสร้าง IL-6 โดย HGF และเหนี่ยวนำการสร้าง sIL-6R โดยแมคโครฟาจ เมื่อ IL-6 จับกับ sIL-6R จะกระตุ้น HGF ให้เกิดสร้าง MMP-1 นำไปสู่การลุกลามของโรคปริทันต์อักเสบ⁽⁸²⁾

5. ไนตริกออกไซด์

ไนตริกออกไซด์ เป็นโมเลกุลส่งสัญญาณภายในเซลล์และระหว่างเซลล์ที่สำคัญ มีการสร้างจากเซลล์หลายชนิด และเกี่ยวข้องกับการควบคุมกลไกทางสรีรวิทยา เช่น ทำให้หลอดเลือดคลายตัว เป็นสารสื่อประสาท และยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด นอกจากนี้ไนตริกออกไซด์ยังมีความเกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและการอักเสบ โดยในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด ไนตริกออกไซด์เป็นสารพิษที่กำจัดจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อ และในระบบภูมิคุ้มกันที่มีความจำเพาะไนตริกออกไซด์มีบทบาทในการเหนี่ยวนำให้เกิดการตาย หรือควบคุมการทำงานของเซลล์ภูมิคุ้มกันของร่างกาย นอกจากนี้ไนตริกออกไซด์ปริมาณมากในสภาวะอักเสบยังเหนี่ยวนำปฏิกิริยาที่เป็นพิษต่อเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของร่างกาย⁽⁷⁾

5.1 การสร้างไนตริกออกไซด์

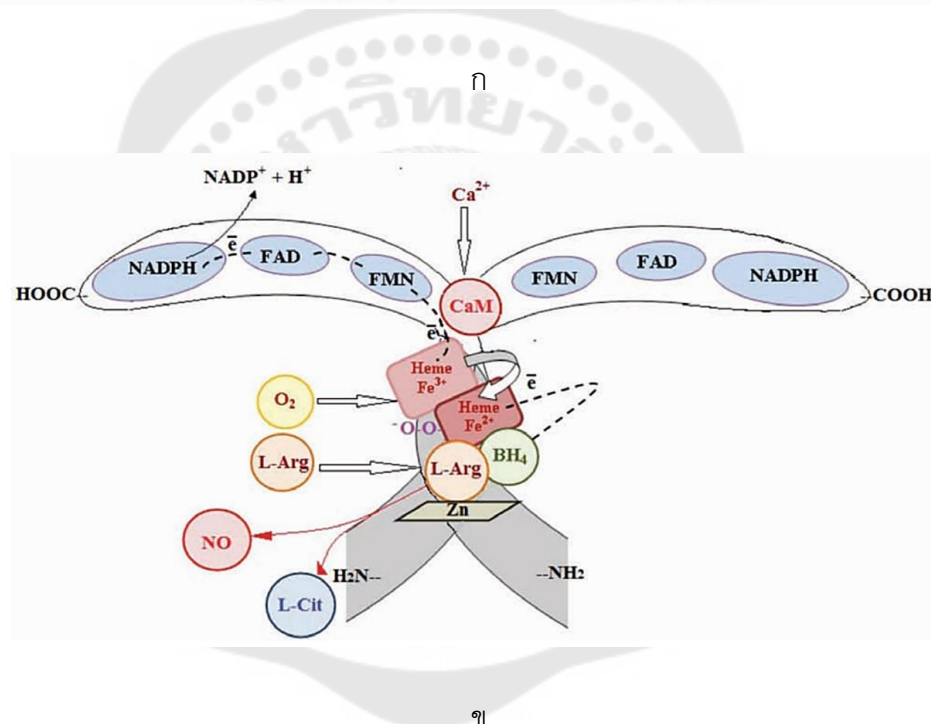
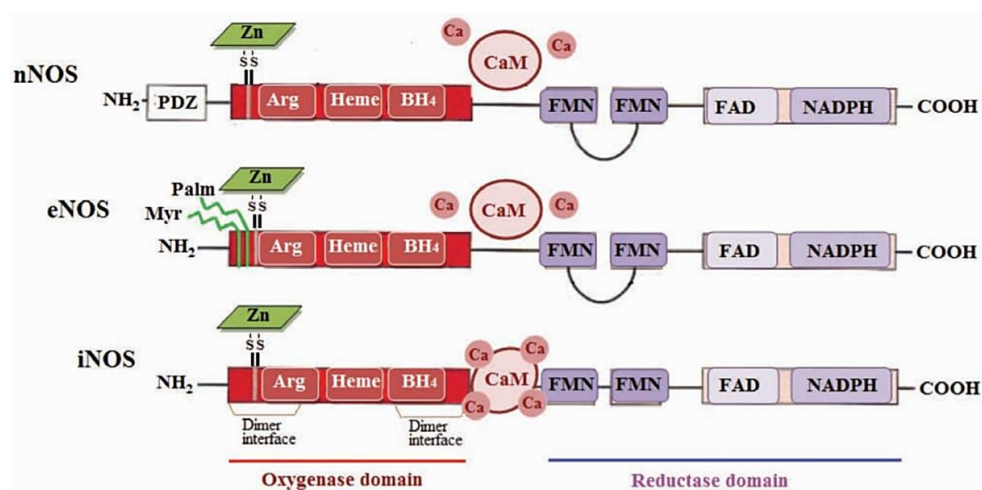
ไนตริกออกไซด์สร้างจากแอลอาร์จินีน และโมเลกุลออกซิเจน ด้วยเอนไซม์ NOS โดยได้รับอิเล็กตรอนจากนิโคตินาไมด์ อะดีนีน ไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟต (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NADPH) และมีฮีม (Heme) ฟลาวินโมโนนิวคลีโอไทด์ (Flavin mononucleotide; FMN) ฟลาวินอะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ (Flavin adenine dinucleotide; FAD) และ BH₄ เป็นปัจจัยร่วม ได้ผลิตภัณฑ์เป็นไนตริกออกไซด์ และแอลซิทรูลีน (L-citrulline)⁽⁸³⁻⁸⁵⁾ (ภาพประกอบ 2)



ภาพประกอบ 2 ปฏิกิริยาการสร้างไนตริกออกไซด์

ที่มา: Aktan F. (2004). iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation.

NOS แบ่งเป็น 3 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์ที่มีการแสดงออกตลอดเวลา (cNOS) 2 ชนิดคือ nNOS/NOS1 และ eNOS/NOS3 และเอนไซม์ที่แสดงออกเมื่อถูกกระตุ้นคือ iNOS/NOS2 ทั้ง 3 ไอโซฟอร์มของ NOS มีลำดับกรดอะมิโนร้อยละ 50 เหมือนกัน (Homology) เอนไซม์ NOS เป็นโปรตีนขนาดใหญ่และซับซ้อน ประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์ 2 สายที่เหมือนกัน (Homodimers) แต่ละสายแบ่งเป็น 3 ส่วน (ภาพประกอบ 3) คือ ปลายคาร์บอน (C-terminal) เป็นโดเมนรีดักเทส (Reductase) ที่มีตำแหน่งสำหรับจับกับ NADPH FAD และ FMN ทำหน้าที่ให้อิเล็กตรอน ปลายไนโตรเจน (N-terminal) เป็นโดเมนออกซิจีเนส (Oxygenase) ที่มีตำแหน่งสำหรับจับกับฮีม BH_4 และแอลอาร์จินีน เป็นบริเวณที่สร้างไนตริกออกไซด์ และบริเวณตรงกลางเป็นที่จับของแคลโมดูลิน (Calmodulin; CaM) การทำงานของ cNOS ขึ้นอยู่กับสัญญาณแคลเซียม (Calcium signal) ซึ่งจะจับกับ CaM แล้วกระตุ้นเอนไซม์อย่างรวดเร็วและชั่วคราว และเกิดการสร้างไนตริกออกไซด์ในลักษณะชั่วคราวเช่นเดียวกัน ส่วนใน iNOS CaM จะจับแน่นกับเอนไซม์โดยไม่ขึ้นกับระดับแคลเซียม แต่จะถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS หรือไฮโดรโคโรน และเกิดการสร้างไนตริกออกไซด์ความเข้มข้นสูง เป็นระยะเวลายาวนาน^(65, 86)



ภาพประกอบ 3 โครงสร้างของ NOS (ก) และลักษณะของ NOS ที่พร้อมทำงาน (ข)

ที่มา: Danylovyh G, Bohach T, Danylovyh YV. (2018). The biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. Nitric oxide formation features and its functional role in mitochondria.

5.2 ชีวิตเคมีของไนตริกออกไซด์

ไนตริกออกไซด์ เป็นโมเลกุลขนาดเล็ก ไม่มีประจุ มีอิเล็กตรอนไม่มีคู่จึงเป็นอนุมูลอิสระที่ไวต่อปฏิกิริยาเคมี มีสถานะเป็นแก๊สในสภาวะบรรยากาศ (Atmospheric condition) แต่

ละลายภายในเซลล์และเนื้อเยื่อ สามารถแพร่ไปในของเหลวในร่างกายและเนื้อเยื่อ และสามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้อย่างอิสระ⁽⁸⁷⁾

ชีวเคมีของไนตริกออกไซด์ แบ่งเป็น 2 ประเภท ได้แก่ ผลทางตรงและผลทางอ้อม ผลทางตรงคือ ไนตริกออกไซด์ทำปฏิกิริยาโดยตรงกับสารชีวโมเลกุล ส่วนผลทางอ้อมนั้นเกิดจากผลของอนุมูลอิสระไนโตรเจนออกไซด์ (Reactive nitrogen oxide species; RNOS) ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาของไนตริกออกไซด์กับซูเปอร์ออกไซด์หรือออกซิเจน การแบ่งประเภทผลทางตรงและผลทางอ้อมของปฏิกิริยาไนตริกออกไซด์ ขึ้นอยู่กับ ความเข้มข้นเฉพาะที่ของไนตริก ออกไซด์ โดยพบว่า ผลทางตรงเกิดเมื่อไนตริกออกไซด์มีความเข้มข้นต่ำกว่า 1 ไมโครโมลาร์ ในขณะที่ผลทางอ้อมเกิดเมื่อไนตริกออกไซด์มีความเข้มข้นที่สูงกว่า 1 ไมโครโมลาร์ ซึ่งสามารถแบ่งย่อยผลทางอ้อมได้เป็นไนโตรเซชัน (Nitrosation) ออกซิเดชัน (Oxidation) และไนเตรชัน (Nitration)^(87, 88)

นอกจากนี้การแบ่งหมวดหมู่ปฏิกิริยาทางเคมีของไนตริกออกไซด์ให้เป็นผลทางตรงหรือทางอ้อมนั้น สามารถพิจารณาจากปริมาณและระยะเวลาที่ไนตริกออกไซด์อยู่ในสภาพแวดล้อม ไนตริกออกไซด์ในสิ่งมีชีวิตนั้นสร้างจากเอนไซม์ NOS โดยเซลล์ที่มี cNOS จะสร้างไนตริกออกไซด์ปริมาณน้อย ในระยะเวลาดัง ๆ จึงแสดงผลทางตรงเป็นหลัก และแสดงผลทางอ้อมอย่างจำกัด ในขณะที่เมื่อมี iNOS จะเกิดการสร้างไนตริกออกไซด์มากขึ้น และเกิดผลทางอ้อม

อีกหนึ่งข้อพิจารณาที่สำคัญคือ ระยะห่างระหว่างแหล่งกำเนิดไนตริกออกไซด์และเป้าหมาย เซลล์หรือเนื้อเยื่อที่อยู่ใกล้กับแหล่งกำเนิดไนตริกออกไซด์อาจได้รับทั้งผลทางตรงและผลทางอ้อม ส่วนเซลล์ที่อยู่ห่างไกลอาจได้รับเฉพาะผลทางตรงเท่านั้น เนื่องจากความเข้มข้นของไนตริกออกไซด์ลดลงจากการแพร่และการบริโภคทางชีวภาพ (Biological consumption)⁽⁸⁹⁾

5.3 การควบคุมการสร้างไนตริกออกไซด์ด้วย iNOS

การทำงานของ iNOS ในแมคโครฟาจถูกควบคุมโดยตัวรับสัญญาณ เช่น TLR และ ซีดี 14 (CD14) โดยซีดี 14 เป็นตัวรับสำหรับ LPS และมีบทบาทสำคัญในการตอบสนองต่อการอักเสบในโมโนไซต์และแมคโครฟาจ โดยกระตุ้นการทำงานของวิถี NF- κ B⁽⁹⁰⁾ ส่วน INF- γ จะเหนี่ยวนำ iNOS ผ่านทางวิถีส่งสัญญาณจันส์ไคเนส-โปรตีนส่งสัญญาณและกระตุ้นการถอดรหัส (Janus kinases-signal transducer and activator of transcription proteins; Jak-STAT)⁽⁹¹⁾

5.4 บทบาทของไนตริกออกไซด์ในโรคปริทันต์อักเสบ

ไนตริกออกไซด์ในเนื้อเยื่อปริทันต์เป็นส่วนหนึ่งของกลไกการป้องกันตามธรรมชาติที่ไม่เฉพาะเจาะจงของช่องปากต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรค โดยไนตริกออกไซด์ปริมาณมากเกินไปอาจ

นำไปสู่การทำลายเนื้อเยื่อในโรคปริทันต์อักเสบ จากการศึกษาพบว่า มีการสร้างไนตริกออกไซด์ และการแสดงออกของ iNOS เพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อปริทันต์ที่อักเสบ^(11-14, 92, 93)

จากการศึกษาของ Matejka และคณะ (1998) พบว่า เนื้อเยื่อเหงือกของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบมีปริมาณแอลอาร์จินีนและแอลซีทรูลีนสูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อเหงือกที่สุขภาพดี และเนื่องจากแอลซีทรูลีนเป็นผลพลอยได้ (By product) จากการสร้างไนตริกออกไซด์ ฉะนั้น การเพิ่มขึ้นของแอลซีทรูลีน จึงแสดงถึงการเพิ่มขึ้นของไนตริกออกไซด์ในเนื้อเยื่อปริทันต์ที่อักเสบ⁽¹⁴⁾

จากการศึกษาโดยการย้อมภูมิโมโนโคลนัลของ Lappin และคณะ (2000) พบว่า เนื้อเยื่อเหงือกของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบมีการแสดงออกของ iNOS มากกว่าเนื้อเยื่อเหงือกสุขภาพดี และเซลล์ที่สร้าง iNOS ได้แก่ แมคโครฟาจ และเซลล์บุผนังหลอดเลือด⁽¹³⁾

จากการศึกษาโดยการย้อมภูมิโมโนโคลนัลเนื้อเยื่อเหงือกของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อเหงือกสุขภาพดี และการย้อมภูมิโมโนโคลนัลเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ที่กระตุ้นด้วย INF- γ และ/หรือ LPS ของเชื้อ *Pg* ของ Kendall และคณะ (2000) พบว่า มีการแสดงออกของ iNOS เพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อเหงือกอักเสบ ตรงบริเวณเซลล์อักเสบ เซลล์สร้างเส้นใยเหงือก และเคอราติโนไซต์ชั้นในสุด (Basal keratinocyte) ส่วนเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกที่กระตุ้นด้วย INF- γ และ LPS มีการแสดงออกของ iNOS มากกว่าที่กระตุ้นด้วย INF- γ หรือ LPS เพียงอย่างเดียว ผลของการศึกษานี้ แสดงบทบาทของไนตริกออกไซด์ต่อพยาธิสรีรวิทยา (Pathophysiology) ของโรคปริทันต์อักเสบ⁽¹²⁾

Hirose และคณะ (2001) ศึกษาการแสดงออกของไซโตไคน์ และ iNOS ในเนื้อเยื่อเหงือกของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อเหงือกสุขภาพดี โดยสกัด RNA แล้ววิเคราะห์การแสดงออกด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบย้อนกลับ (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction; RT-PCR) แบบขั้นตอนเดียว และศึกษาการสร้างไนตริกออกไซด์ในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ที่กระตุ้นด้วยสารสกัด (Sonicate) ของเชื้อ *Pg* หรือ *Aa* ผลการศึกษาพบว่า เนื้อเยื่อเหงือกของผู้ที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบมีการแสดงออกของ mRNA ของ IL-6 และ iNOS สูงกว่าเนื้อเยื่อเหงือกที่มีสุขภาพดี และในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดของ *Pg* หรือ *Aa* ไม่พบการสร้างไนตริกออกไซด์⁽¹¹⁾

จากการศึกษาของ Daghigh และคณะ (2002) พบว่า เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์มีการแสดงออกของ iNOS ในระดับ mRNA และการสร้างไนตริกออกไซด์เพิ่มขึ้นสูงสุด เมื่อกระตุ้นด้วยไซโตไคน์ 3 ชนิด ได้แก่ TNF- α , IL-1 β และ INF- γ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง

ตามลำดับ นอกจากนี้เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์มีการสร้างไนตริกออกไซด์เพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อกระตุ้นด้วยไฮโดรโคโรน 2 ชนิด ได้แก่ IL-1 β และ INF- γ และมีการสร้างไนตริกออกไซด์เพียงเล็กน้อยหรือไม่มีเลยเมื่อกระตุ้นด้วยไฮโดรโคโรนเพียงชนิดเดียว ส่วน iNOS ไม่มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อกระตุ้นด้วยไฮโดรโคโรน 1 หรือ 2 ชนิด และเมื่อใส่เมอร์แคปโทเอทิล กวานิดีน (Mercaptoethyl guanidine; MEG) ซึ่งเป็นตัวยับยั้งจำเพาะของ iNOS พบว่าการสร้างไนตริกออกไซด์จากการเหนี่ยวนำของไฮโดรโคโรนลดลง ซึ่งให้เห็นว่าไอโซฟอร์มที่เกี่ยวข้องในโรคปริทันต์อักเสบคือ iNOS ไม่ใช่ cNOS และการเพิ่มการสร้างไนตริกออกไซด์อาจมีบทบาทในพยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์อักเสบ⁽⁹²⁾

การศึกษาในหนูที่ทำให้เกิดโรคปริทันต์อักเสบโดยการมัดฟันของ Lohinai และคณะ (1998) พบว่า เหงือกบริเวณที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบมีการทำงานของ iNOS เพิ่มขึ้น โดยเซลล์ที่มีการแสดงออกของ iNOS ได้แก่ แมคโครฟาจ ลิมโฟไซต์ นิวโทรฟิล เซลล์บุผนังหลอดเลือด เซลล์สร้างเส้นใย และเซลล์ชั้นในสุดของเยื่อบุผิว และมีการละลายของกระดูกเบ้าฟัน จากนั้นเมื่อให้ MEG ในกลุ่มทดลอง พบว่า การละลายตัวของกระดูกลดลง ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า การเพิ่มการสร้างไนตริกออกไซด์มีส่วนในการกระตุ้นการอักเสบและการละลายกระดูก ซึ่งเป็นพยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์อักเสบ⁽⁹³⁾

5.5 บทบาทของไนตริกออกไซด์ในโรคเบาหวานและโรคปริทันต์อักเสบ

Pan และคณะ (2010) ศึกษาการแสดงออกของ iNOS ในเนื้อเยื่อเหงือกของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบที่เป็นและไม่เป็นเบาหวานชนิดที่ 2 โดยแบ่งผู้เข้าร่วมเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มปริทันต์อักเสบและเบาหวาน กลุ่มปริทันต์อักเสบ กลุ่มเบาหวาน และกลุ่มควบคุม บันทึกตัวชี้วัดทางปริทันต์ และตรวจการอักเสบและการแสดงออกของ iNOS ในเนื้อเยื่อเหงือกด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี พบว่า ทุกกลุ่มทดลองมีจำนวนเซลล์อักเสบ เซลล์ที่มีการแสดงออกของ iNOS และการแสดงออกของ iNOS ในเนื้อเยื่อเหงือกเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยกลุ่มปริทันต์อักเสบและเบาหวาน มีการอักเสบและแสดงออกของ iNOS ที่เด่นชัด แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มปริทันต์อักเสบ ดังนั้น สภาวะปริทันต์ของกลุ่มปริทันต์อักเสบและเบาหวานมีสาเหตุมาจากโรคปริทันต์อักเสบ ส่วนผลจากโรคเบาหวานไม่ได้มีนัยสำคัญต่อลักษณะทางคลินิกในการศึกษานี้⁽¹⁵⁾

Shaker และคณะ (2013) ศึกษาการแสดงออกของ iNOS ในเนื้อเยื่อเหงือกของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบที่เป็นและไม่เป็นเบาหวานชนิดที่ 2 ด้วยการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมี เพื่อวิเคราะห์ร้อยละของพื้นที่ที่มีการแสดงออกของ iNOS และจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของ iNOS และ

วิเคราะห์การแสดงออกของ iNOS ในระดับ mRNA ด้วย RT-PCR เมื่อเปรียบเทียบกลุ่มทดลอง ได้แก่ กลุ่มปริทันต์อักเสบและเบาหวาน กลุ่มปริทันต์อักเสบ และกลุ่มเบาหวาน กับกลุ่มควบคุม พบว่า กลุ่มทดลองมีพื้นที่ที่มีการแสดงออกของ iNOS จำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของ iNOS และการแสดงออกของ iNOS ในระดับ mRNA มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบภายในกลุ่มทดลอง พบว่า พื้นที่ที่มีการแสดงออกของ iNOS ในเนื้อเยื่อเหงือกของทั้งสามกลุ่มไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ จำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของ iNOS ของกลุ่มปริทันต์อักเสบและเบาหวาน และกลุ่มเบาหวาน มากกว่า กลุ่มปริทันต์อักเสบ โดยเซลล์เป้าหมายที่มีการแสดงออก iNOS คือ เซลล์อักเสบซึ่งมีลักษณะคล้ายแมคโครฟาจ และเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก และการแสดงออกของ iNOS ในระดับ mRNA ของกลุ่มปริทันต์อักเสบและเบาหวาน มากกว่า กลุ่มเบาหวาน และกลุ่มปริทันต์อักเสบ โดยทั้งสองกลุ่มหลังไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ การแสดงออกที่มากกว่าในระดับ mRNA ของกลุ่มปริทันต์อักเสบและเบาหวาน อาจบ่งชี้ถึงการมีส่วนร่วมของ iNOS ในการทำลายเนื้อเยื่อปริทันต์จากกลไกของโรคเบาหวานชนิดที่ 2⁽¹⁶⁾

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ดำเนินการตามขั้นตอนดังนี้

1. การกำหนดประชากรและการสุ่มกลุ่มตัวอย่าง
2. การสร้างเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย
3. การเก็บรวบรวมข้อมูล
4. การจัดกระทำและการวิเคราะห์ข้อมูล

การกำหนดประชากรและการสุ่มกลุ่มตัวอย่าง

ประชากร

เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ จากเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือกบริเวณเพดานปากที่ไม่มีการอักเสบ และไม่มีรอยโรคใด ๆ ของผู้ป่วยที่เข้ารับการผ่าตัดที่คลินิกหลังปริญญา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ โดยได้รับการยินยอมจากผู้ป่วย และผ่านการรับรองจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์จากคณะกรรมการจริยธรรมแล้ว (หมายเลขรับรอง SWUEC/F-313/2563)

เกณฑ์ในการคัดเลือกประชากรเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัย

1. เกณฑ์การคัดเข้า (Inclusion criteria)

- 1.1 อายุระหว่าง 20 ถึง 60 ปี
- 1.2 ไม่มีโรคประจำตัว
- 1.3 เหงือกสุขภาพดี

2. เกณฑ์การคัดออก (Exclusion criteria)

- 2.1 มีภาวะโรคประจำตัวที่ไม่สามารถผ่าตัดได้
- 2.2 มีการอักเสบ หรือติดเชื้อในช่องปาก
- 2.3 ได้รับเคมีบำบัด หรือฉายรังสีรักษาบริเวณศีรษะและลำคอ
- 2.4 รับประทานยาปฏิชีวนะภายใน 1 เดือน ก่อนเข้าร่วมวิจัย
- 2.5 รับประทานยาที่มีผลต่อการอักเสบของเหงือก หรือการทำงานของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก เช่น กลูโคคอร์ติคอยด์ (Glucocorticoid) ยาด้านการชัก (Anticonvulsant) ยากดภูมิ (Immunosuppressant) และยาด้านแคลเซียม (Calcium channel blocker) เป็นต้น
- 2.6 ตั้งครรภ์ หรือให้นมบุตร

2.7 สุนัข

การเลือกกลุ่มตัวอย่าง

สุ่มเลือกเซลล์สร้างเส้นใยเหลืองที่ได้จากผู้เข้าร่วมวิจัย 3 คน โดยใช้เซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้ในวันที่ 3-6 นำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีระดับน้ำตาลต่างกันคือ กลูโคส 5.5 มิลลิโมลาร์ ในสภาวะน้ำตาลปกติ และกลูโคส 50 มิลลิโมลาร์ ในสภาวะน้ำตาลสูง มีการกระตุ้นและไม่กระตุ้นด้วย LPS และได้รับและไม่ได้รับสารสกัดหยาดไขมันชั้น โดยแบ่งออกเป็นกลุ่มต่าง ๆ ดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมภาวะปกติ (NG)

กลุ่มที่ 2 กลุ่มน้ำตาลปกติ และได้รับสารสกัดหยาดไขมันชั้น (NG+TUR)

กลุ่มที่ 3 กลุ่มน้ำตาลปกติ และกระตุ้นด้วย LPS (NG+LPS)

กลุ่มที่ 4 กลุ่มน้ำตาลปกติ กระตุ้นด้วย LPS และได้รับสารสกัดหยาดไขมันชั้น (NG+LPS+TUR)

กลุ่มที่ 5 กลุ่มควบคุมภาวะน้ำตาลสูง (HG)

กลุ่มที่ 6 กลุ่มน้ำตาลสูง และได้รับสารสกัดหยาดไขมันชั้น (HG+TUR)

กลุ่มที่ 7 กลุ่มน้ำตาลสูง และกระตุ้นด้วย LPS (HG+LPS)

กลุ่มที่ 8 กลุ่มน้ำตาลสูง กระตุ้นด้วย LPS และได้รับสารสกัดหยาดไขมันชั้น (HG+LPS+TUR)

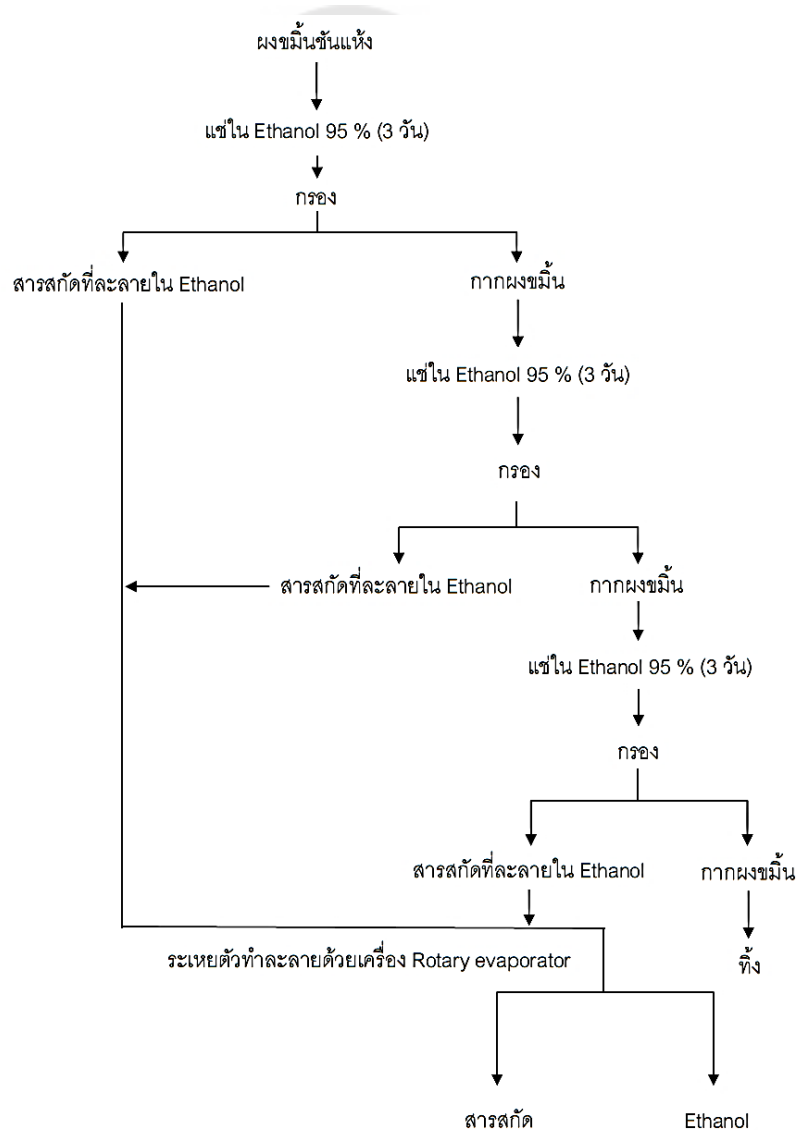
การสร้างเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

การสกัดหยาดไขมันชั้น

ผงไขมันชั้นถูกซื้อมาจากบริษัทเวชพงศ์โอสด (ฮกอันตั้ง) จำกัด ตั้งอยู่ในกรุงเทพฯ ประเทศไทย นำมาสกัดในห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีสมุนไพรและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์โดยผงไขมันชั้นน้ำหนัก 300 กรัม ถูกสกัดด้วยการหมักกับตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 95 เป็นเวลา 3 วัน อัตราส่วนระหว่างของแข็งต่อของเหลวคือ 1 ต่อ 10 จะได้สารสกัดที่ละลายในเอทานอล และส่วนกากของไขมันชั้น นำกากที่แยกได้มาทำการสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง จากนั้นทั้งส่วนกาก และนำสารสกัดที่ละลายในเอทานอลทั้งหมดมาระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส⁽⁹⁴⁾ จะได้สารสกัดประเภทกึ่งของแข็ง นำไปเก็บไปไว้ในโถดูดความชื้น (Desiccator) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อรอการใช้งานต่อไป (ภาพประกอบ 4) โดยมีปริมาณสารสกัดหยาดไขมันชั้น (%Yield) อยู่ที่ร้อยละ 22.16 ± 0.84 ซึ่งคำนวณด้วยสมการ

$$\% \text{ Yield} = \frac{\text{น้ำหนักสารสกัด (กรัม)}}{\text{น้ำหนักแห้งของสมุนไพร (กรัม)}} \times 100$$

เมื่อวิเคราะห์ห้องค์ประกอบด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography; HPLC) พบว่า มีสารกลุ่มเคอร์คิวมินอยด์ร้อยละ 16.583 ± 0.57 ประกอบด้วย เคอร์คิวมินร้อยละ 5.694 ± 0.182 ดีเมทอกซีเคอร์คิวมินร้อยละ 3.521 ± 0.107 และบิสดีเมทอกซีเคอร์คิวมินร้อยละ 7.368 ± 0.282



ภาพประกอบ 4 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดหยาบขมิ้นชัน

การเตรียมสารสกัดหยาบไขมันชั้นสำหรับการทดลอง

ละลายสารสกัดหยาบไขมันชั้นในอาหารเลี้ยงเซลล์ไม่ผสมซีรัม ให้ได้ความเข้มข้น 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl Sulphoxide; DMSO) (Panreac, Barcelona, Spain) ร้อยละ 1 เป็นตัวทำละลาย กรองผ่านแผ่นกรองทำให้ปราศจากเชื้อความละเอียด 0.22 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 32 มิลลิเมตร (Acrodisc® Syringe Filters-0.2 µm Supor® membrane, Pall Corporation, NY, USA) จากนั้นนำไปเจือจาง 10 เท่าด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ไม่ผสมซีรัม ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดหยาบไขมันชั้น 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน DMSO ร้อยละ 0.1 ซึ่งไม่พบว่าเป็นพิษต่อเซลล์^(95, 96)

การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์

ส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเซลล์ผสมซีรัมจากตัวอ่อนวัว ระดับน้ำตาลปกติ

1. สารดัลเบคโคโมดิฟายด์อีเกิลมีเดียม ที่ไม่มีฟีนอลเรด (Phenol red) ระดับน้ำตาลปกติ 5.5 มิลลิโมลาร์ (Dulbecco's Modified Eagle Medium; DMEM, Gibco, Grand Island, NY, USA)
2. ซีรัมจากตัวอ่อนวัวความเข้มข้นร้อยละ 10 (Fetal bovine serum; FBS, Gibco, Grand Island, NY, USA) โดยในอาหารเลี้ยงเซลล์ไม่ผสมซีรัม (DMEM serum-free) จะตัดส่วนนี้ออก
3. แอลกลูตามีน 2 มิลลิโมลาร์ (L-Glutamine, GLUTAMAX 200 mM, Gibco, Grand Island, NY, USA)
4. ยาปฏิชีวนะผสมยาฆ่าเชื้อราความเข้มข้นร้อยละ 1 (Antibiotic-antimycotic mixture 100x, Gibco, Grand Island, NY, USA)

ส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเซลล์ผสมซีรัมจากตัวอ่อนวัว ระดับน้ำตาลสูง

1. DMEM ที่ไม่มีฟีนอลเรด ระดับน้ำตาล 25 มิลลิโมลาร์ (DMEM high glucose, Gibco, Grand Island, NY, USA)
2. น้ำตาลดีกลูโคส 25 มิลลิโมลาร์ (D-glucose, Glucose Solution 200 g/l, Gibco, Grand Island, NY, USA)
3. FBS แอลกลูตามีน และยาปฏิชีวนะผสมยาฆ่าเชื้อรา ความเข้มข้นเดียวกับอาหารเลี้ยงเซลล์ผสมซีรัม ระดับน้ำตาลปกติ

อาหารเลี้ยงเซลล์ทุกชนิดที่ผสมแล้วจะเก็บในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการนำมาเลี้ยงเซลล์ให้ปรับอุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเซลล์ให้อยู่ที่ 37 องศาเซลเซียสด้วยอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

การเก็บเซลล์ปฐมภูมิและการเพาะเลี้ยงเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก⁽⁹⁷⁻⁹⁹⁾

1. เก็บชิ้นเนื้อเยื่อเหงือกบริเวณเนื้อเยื่อเกี่ยวพันจากเพดานปากของผู้ป่วยที่มารับการรักษาศัลยกรรมปริทันต์
2. นำชิ้นเนื้อที่ได้ในท้องผ้าตัดใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 15 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ผสมซีรัมจากตัวอ่อนวัว ระดับน้ำตาลปกติ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ปริมาณ 3 มิลลิลิตร
3. ล้างชิ้นเนื้อด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลาไลน์ (Phosphate Buffer Saline; PBS) ปราศจากเชื้อ ปริมาณ 5 มิลลิลิตร 2 ครั้ง
4. ย้ายชิ้นเนื้อลงบนจานแก้วปราศจากเชื้อ จากนั้นตัดชิ้นเนื้อด้วยใบมีดขนาด 15 ซี ให้ได้ขนาดชิ้นเนื้อประมาณ 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร
5. วางชิ้นเนื้อ 3-5 ชิ้นลงบนจานเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 35 มิลลิเมตร จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาณ 1 มิลลิลิตร
6. บ่มชิ้นเนื้อในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะความชื้นร้อยละ 50 และคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2 วัน
7. เมื่อเซลล์ที่ออกมาจากชิ้นเนื้อเจริญเติบโตจนได้ความหนาแน่นร้อยละ 80 ของพื้นที่จานเลี้ยงเซลล์ (80% confluence) จึงย้ายเซลล์ออกจากจานเดิมเพื่อขยายจำนวนเซลล์ต่อไป

การย้ายเซลล์ (Subculture)^(97, 99)

1. ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกแล้วล้างด้วยสารละลาย PBS
2. เติมสารละลายทริปซิน-อีดีทีเอ (Trypsin-EDTA 1x, Gibco, Grand Island, NY, USA) ร้อยละ 0.05 ปริมาณน้อยกว่าหรือเท่ากับ 1 มิลลิลิตร แล้วบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 2 นาที⁽¹⁰⁰⁾
3. ตรวจสอบการหลุดของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์หัวกลับ เมื่อพบว่าเซลล์ลอยออกจากจานเลี้ยงเซลล์แล้ว ทำการเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ แล้วนำสารละลายทั้งหมดใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยง แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
4. ดูดของเหลวเหนือตะกอนทิ้งให้เหลือตะกอนเซลล์ เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ ดูดสารละลายขึ้นลงเบา ๆ แล้วถ่ายเซลล์ลงในจานเลี้ยงเซลล์ใหม่

การเลี้ยงเซลล์เพื่อทำการทดลอง

1. ถ่ายเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกลงในจานเลี้ยงเซลล์ โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ผสมซีรัม ระดับน้ำตาลปกติ เพื่อเพิ่มจำนวนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ตามกลุ่มน้ำตาล แล้วบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง⁽³²⁾ โดยอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับกลุ่มน้ำตาลปกติและกลุ่มน้ำตาลสูง ได้แก่

2.1 อาหารเลี้ยงเซลล์ผสมซีรัม ระดับน้ำตาลปกติ 5.5 มิลลิโมลาร์ สำหรับกลุ่ม NG, NG+TUR, NG+LPS และ NG+LPS+TUR

2.2 อาหารเลี้ยงเซลล์ผสมซีรัม ระดับน้ำตาลสูง 50 มิลลิโมลาร์ สำหรับกลุ่ม HG, HG+TUR, HG+LPS และ HG+LPS+TUR

3. เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ตามกลุ่มการได้รับสารสกัดหยาบไขมันชั้นความเข้มข้นสุดท้าย 15 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร⁽³⁸⁾ และกลุ่มการกระตุ้นด้วย PG-LPS (InvivoGen, San Diego, CA, USA) ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แล้วบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง^(30, 101) โดยอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับกลุ่มต่าง ๆ ได้แก่

3.1 อาหารเลี้ยงเซลล์ไม่ผสมซีรัมที่มี DMSO ร้อยละ 0.1 สำหรับกลุ่ม NG และ HG

3.2 อาหารเลี้ยงเซลล์ไม่ผสมซีรัม ที่มีสารสกัดหยาบไขมันชั้นความเข้มข้นสุดท้าย 15 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรและ DMSO ร้อยละ 0.1 สำหรับกลุ่ม NG+TUR และ HG+TUR

3.3 อาหารเลี้ยงเซลล์ไม่ผสมซีรัม ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายของ LPS 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ DMSO ร้อยละ 0.1 สำหรับกลุ่ม NG+LPS และ HG+LPS

3.4 อาหารเลี้ยงเซลล์ไม่ผสมซีรัม ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายของ LPS 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดหยาบไขมันชั้น 15 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ DMSO ร้อยละ 0.1 สำหรับ NG+LPS+TUR และ HG+LPS+TUR

วิธีการหาคุณภาพเครื่องมือ

การวิเคราะห์การตอบสนองต่อสารสกัดหยาบไขมันชั้น

ทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ไม่ผสมซีรัม ที่มีสารสกัดหยาบไขมันชั้นความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วย MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) assay⁽¹⁰²⁾ (Dose-response analysis) โดยเซลล์ที่มีชีวิตจะเปลี่ยนสาร MTT เป็นฟอร์มazan (Formazan) ในขณะที่เซลล์ตายจะไม่มีเปลี่ยนแปลง เมื่อทำการละลายผลึกฟอร์มazanด้วย DMSO จะเกิดสีม่วง ซึ่งสามารถวิเคราะห์ผลจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร⁽³¹⁾

ถ่ายเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ ปริมาณ 1×10^4 เซลล์ต่อหลุม ในอาหารเลี้ยงเซลล์ผสมซีรัม ระดับน้ำตาลปกติ 100 ไมโครลิตร ในถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (96-well plate) เป็น

เวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ไม่มีฟีนอลเรดไม่ผสมซีรัมที่มีสารสกัดหยาบไขมันชั้นความเข้มข้นสุดท้าย 3.75, 7.5, 15, 30 และ 60 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO น้อยกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 0.1 ในขณะที่กลุ่มควบคุมจะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ไม่ผสมซีรัมที่มี DMSO ร้อยละ 0.1 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทดสอบการตอบสนองของเซลล์ต่อความเข้มข้นของสารสกัดหยาบไขมันชั้นด้วย MTT assay (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) โดยเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์แบบไม่ผสมซีรัม 100 ไมโครลิตร และสารละลาย MTT (5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาณ 10 ไมโครลิตร แล้วบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ 2 ชั่วโมง ดูอาหารเลี้ยงเซลล์ออกแล้วเติม DMSO 100 ไมโครลิตร บ่มต่อ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท Asys UVM 340 (Biochrom, Cambridge, UK) ที่ 570 นาโนเมตร ตัวอย่างจากผู้เข้าร่วมวิจัยทั้ง 3 คน จะถูกทำการทดลองแยกกัน 2 ครั้ง ในแต่ละครั้งจะทำซ้ำ 3 หลุมในแต่ละกลุ่ม

การวิเคราะห์ความมีชีวิตของเซลล์

ทดสอบความมีชีวิตของเซลล์เมื่อเลี้ยงเซลล์ในเงื่อนไขต่าง ๆ 8 กลุ่ม ด้วย MTT assay โดยถ่ายเซลล์สร้างเส้นใยเชิงอกมนุษย์ ปริมาณ 1×10^4 เซลล์ต่อหลุม ในอาหารเลี้ยงเซลล์ผสมซีรัม ระดับน้ำตาลปกติ 100 ไมโครลิตร ในภาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ตามกลุ่มน้ำตาล 72 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ตามกลุ่มการได้รับสารสกัดหยาบไขมันชั้นและการกระตุ้นด้วย LPS 24 ชั่วโมง ทำการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ด้วย MTT assay โดยมีขั้นตอนเช่นเดียวกับการวิเคราะห์การตอบสนองต่อความเข้มข้นของสารสกัดหยาบไขมันชั้น ตัวอย่างจากผู้เข้าร่วมวิจัยทั้ง 3 คน จะถูกทำการทดลองแยกกัน 3 ครั้ง ในแต่ละครั้งจะทำซ้ำ 3 หลุมในแต่ละกลุ่ม

การวิเคราะห์การสร้างไนตริกออกไซด์

ใส่เซลล์สร้างเส้นใยเชิงอกในภาดเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 6 หลุม (6-well plate) ปริมาณ 2×10^5 เซลล์ต่อหลุม จำนวน 8 หลุม เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ผสมซีรัม ระดับน้ำตาลปกติ 1 มิลลิลิตร เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ตามกลุ่มน้ำตาลเป็นเวลา 72 ชั่วโมง และเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ตามกลุ่มการได้รับสารสกัดหยาบไขมันชั้นและการกระตุ้นด้วย LPS เมื่อครบ 24 ชั่วโมง จึงนำน้ำเลี้ยงเซลล์ในเงื่อนไขต่าง ๆ มาวิเคราะห์การสร้างไนตริกออกไซด์ด้วย Nitric Oxide (total) detection kit (Enzo Life Sciences, NY, USA) ซึ่งเป็นการทดสอบทางอ้อม โดยวัดปริมาณไนเตรต (NO_3^-) และไนไตรต์ (NO_2^-) ที่มีความเสถียร และเกิดจากการออกซิเดชันของไนตริกออกไซด์ แบ่งเป็น 2 ขั้นตอนคือ เปลี่ยนไนเตรตเป็นไนไตรต์ด้วยไนเตรตรีดักเทส (Nitrate reductase) จากนั้นใช้สารกรีส (Griess reagent)

เปลี่ยนไนไตรต์เป็นสารประกอบอโซ (Azo compound) ซึ่งมีสีม่วง แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท Multiskan Sky Microplate Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) ตัวอย่างจากผู้เข้าร่วมวิจัยทั้ง 3 คน จะถูกทำการทดลองแยกกัน 2 ครั้ง ในแต่ละครั้งทำการทดสอบสารตัวอย่างและสารมาตรฐานซ้ำ 2 ครั้งในถาดแบบ 96 หลุม โดยมีขั้นตอนตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต ดังนี้

1. เติมน้ำบัฟเฟอร์ (Reaction buffer) 200 ไมโครลิตร ลงในหลุมสารละลาย (Blank well)
2. เติมสารมาตรฐานไนเตรต 50 ไมโครลิตร หมายเลข 1-6 (100, 50, 25, 12.5, 6.25 และ 3.125 ไมโครโมลาร์) ลงในหลุมเทียบมาตรฐาน (Standard well)
3. เติมน้ำบัฟเฟอร์ 50 ไมโครลิตร ลงในหลุมเทียบศูนย์ (Zero well)
4. เติมสารตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร ลงในหลุมทดสอบสารตัวอย่าง (Sample well)
5. เติมสารเอ็นเอดีเอช (NADH) 25 ไมโครลิตร ลงในหลุมเทียบศูนย์ หลุมเทียบมาตรฐาน และหลุมทดสอบสารตัวอย่าง
6. เติมนิเตรตรีดักเทส 25 ไมโครลิตร ลงในหลุมเทียบศูนย์ หลุมเทียบมาตรฐาน และหลุมทดสอบสารตัวอย่าง
7. เคา่ถาดหลุมเบา ๆ เพื่อผสมสาร ปิดฝานิ่ถาดหลุม แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
8. เติมสารกรีน I 50 ไมโครลิตร ในทุกหลุม ยกเว้นหลุมสารละลาย
9. เติมสารกรีน II 50 ไมโครลิตร ในทุกหลุม ยกเว้นหลุมสารละลาย
10. เคา่ถาดหลุมเบา ๆ เพื่อผสมสาร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที
11. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

การวิเคราะห์การแสดงออกของ iNOS ในระดับ mRNA

ใส่เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 มิลลิเมตร (60 mm culture dish) ปริมาณ 3×10^5 เซลล์ต่อจาน จำนวน 8 จาน เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ผสมซีรัมระดับน้ำตาลปกติ 3 มิลลิลิตร เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ตามกลุ่มน้ำตาลเป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากนั้น 24 ชั่วโมง เลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ตามกลุ่มการได้รับสารสกัดหยาบขมิ้นชันและการกระตุ้นด้วย LPS จากนั้นนำเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงในเงื่อนไขต่าง ๆ มาวิเคราะห์การแสดงออกของ iNOS ในระดับ mRNA โดยสกัด RNA รวม (Total RNA) ด้วย TRIzol™ Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) และวัด

ปริมาณ RNA (RNA concentration) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A260) ด้วยเครื่อง UV-1800 Spectrophotometer (Shimadzu, Tokyo, Japan) แล้วนำไปสังเคราะห์ดีเอ็นเอต้นแบบ (Complementary DNA; cDNA) ด้วย PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time) (Takara Bio, Shiga, Japan) และเครื่อง Dry bath incubator (Major Science, Taueun city, Taiwan) จากนั้นเพิ่มจำนวน DNA และวิเคราะห์การแสดงออกของ iNOS ในระดับ mRNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบเวลาจริง (Real-time PCR) โดยใช้ LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche, Indianapolis, IN, USA) และเครื่อง LightCycler® 480 Instrument II (Roche, Indianapolis, IN, USA) ตัวอย่างจากผู้เข้าร่วมวิจัยทั้ง 3 คน จะถูกทำการทดลองแยกกัน 3 ครั้ง แต่ละตัวอย่าง cDNA ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง ในถาด PCR แบบ 96 หลุม (LightCycler® 480 Multiwell Plate 96) แต่ละกระบวนการมีขั้นตอน ดังนี้

การสกัด RNA รวม

1. ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก แล้วล้างด้วย PBS
2. ใส่ TRIzol 1 มิลลิลิตร เพื่อทำให้เซลล์แตกตัว ทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นใช้ปลายปิเปตดูดเซลล์ให้ทั่ว แล้วดูดสารละลายใส่หลอดทดลอง ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
3. ใส่คลอโรฟอร์ม (Chloroform) 200 ไมโครลิตร เพื่อให้สารละลายแยกชั้น เขย่าอย่างแรงด้วยมือ แล้วทิ้งไว้ 3 นาที จากนั้นปั่นด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
4. ดูดส่วนใสด้านบนปริมาณ 500 ไมโครลิตร ใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่
5. ใส่ไอโซโพรพานอล (Isopropanol) ปริมาณเท่ากันคือ 500 ไมโครลิตร เพื่อให้ RNA ตกตะกอน ทำการคว่ำหางหลอดทดลอง แล้วทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นปั่นด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
6. จะเห็นตะกอน RNA (Pellet) สีขาวที่ก้นหลอด เทส่วนน้ำออก แล้วล้างตะกอน RNA ด้วยเอทานอลเย็นความเข้มข้นร้อยละ 75 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร จากนั้นปั่นด้วยความเร็ว 7,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
7. เทส่วนน้ำออก ตากตะกอน RNA ให้แห้ง ซึ่งเมื่อ RNA แห้งจะใส
8. ละลายตะกอน RNA ด้วยน้ำปราศจากนิวคลีเอส (Nuclease-free water) 20 ไมโครลิตร แล้ววิเคราะห์ปริมาณ RNA โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร

การสังเคราะห์ cDNA

1. เตรียมสาร ดังตาราง 3 บนน้ำแข็ง

2. ใส่น้ำปราศจากอาร์เอ็นเอส (RNase free water), RNA (1 ไมโครกรัมต่อปฏิกิริยา) และสารละลายผสม (Master mix) ตามลำดับ ลงในหลอดทดลองขนาด 600 ไมโครลิตร จากนั้นปั่นให้สารตกลงมา (Spin down) และผสมกัน

3. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอเรสแบบย้อนกลับ

4. บ่มที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วินาที เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์รีเวิร์สทรานสคริปเทส (Reverse transcriptase)

5. เก็บ cDNA ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ตาราง 3 สารตั้งคราะห์ cDNA

องค์ประกอบ	ปริมาณ (ไมโครลิตร) / ปฏิกิริยา
5x PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time)	2
Total RNA (1 ไมโครกรัม) และ RNase Free dH ₂ O	8
	10

Real-time PCR

1. เตรียม cDNA โดยเจือจางกับ EASY Dilution (for Real-Time PCR) (PrimeScript™ RT Master Mix, Takara Bio, Shiga, Japan) ในอัตราส่วน 1:5

2. เตรียมไพรเมอร์ (Primer) (Macrogen, Seoul, Republic of Korea) ได้แก่ iNOS และเบตา-แอคติน (β -actin) ความเข้มข้น 10x และมีลำดับเบส ดังตาราง 4

3. เตรียมสารละลายผสมสำหรับปฏิกิริยา PCR (PCR mix) ในหลอดทดลอง 1.5 มิลลิลิตร ดังตาราง 5

4. ปิเปต cDNA 2 ไมโครลิตร ใส่หลอดทดสอบยีนเป้าหมาย (Target gene; iNOS) และหลอดทดสอบยีนควบคุม (Reference gene; β -actin) ส่วนในหลอดควบคุมลบ (Negative control) ใส่น้ำกลั่น 2 ไมโครลิตร จากนั้นใส่ PCR mix 18 ไมโครลิตร แล้วปิดฝินี้หลอด

5. ปั่นเหวี่ยงที่ความแรง 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

6. นำหลอดใส่เครื่องควบคุมอุณหภูมิ แล้วเริ่มปฏิกิริยา Real-time PCR ดังนี้

6.1 Pre-incubation อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

6.2 Amplification จำนวน 45 รอบ ประกอบด้วย

- Denaturation อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที
- Annealing อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที
- Extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที

ตาราง 4 ลำดับเบสของไพรเมอร์

ไพรเมอร์	ลำดับเบส	ขนาด
iNOS ⁽¹¹⁾	Forward; 5' - CAG TAC GTT TGG CAA TGG AGA CTG - 3' Reverse; 5' - GTG TAG AGC TTG GGG ATC TGA ATG - 3'	327 bp
β -actin ⁽³²⁾	Forward; 5' - GGC ATC CTC ACC CTG AAG TA - 3' Reverse; 5' - GGG GTG TTG AAG GTC TCA AA - 3'	203 bp

ตาราง 5 องค์ประกอบของ PCR mix

องค์ประกอบ	ปริมาณ (ไมโครลิตร) / ปฏิกิริยา
Water, PCR-grade (vial 2)	7
Primer Forward 10x	0.5
Primer Reverse 10x	0.5
Master mix (vial 1)	10
	18

การเก็บรวบรวมข้อมูล

MTT assay

นำค่าการดูดกลืนแสง มาคำนวณร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ ด้วยสมการ

$$\% \text{ Cell viability} = \frac{(\text{ODs} - \text{blank})}{(\text{ODctrl} - \text{blank})} \times 100$$

ODs คือ ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของกลุ่มทดลอง

ODctrl คือ ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม

Blank คือ ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของหลุมที่ทดสอบโดยไม่มีเซลล์

Nitric oxide assay

สร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่หักลบ Blank แล้วและค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐานในเตรต จากนั้นนำค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างที่หักลบ Blank แล้วมาเทียบกับกราฟมาตรฐาน จะได้ปริมาณไนตริกออกไซด์ (ไมโครโมลาร์) ของสารตัวอย่าง จากนั้นนำค่าที่ได้ไปปรับ (Normalize) กับร้อยละความมีชีวิตของเซลล์จาก MTT assay เพื่อกำจัดปัจจัยความแตกต่างของจำนวนเซลล์ในแต่ละกลุ่ม

Real-time PCR

การวิเคราะห์เชิงปริมาณสัมพัทธ์ (Relative quantification analysis)

โปรแกรมจะคำนวณและสร้างกราฟความสัมพันธ์ (Amplification curve) ระหว่างปริมาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ตรวจวัดได้ กับจำนวนรอบของปฏิกิริยา ซึ่งจะทำให้ได้ค่าจำนวนรอบของปฏิกิริยาที่ทำให้สัญญาณสารเรืองแสงสูงกว่าระดับเริ่มเปลี่ยน (Cycle threshold; C_T) จากนั้นนำมาคำนวณสัดส่วนการเปลี่ยนแปลง (Fold change)⁽¹⁰³⁾ ด้วยสมการ

$$\text{Fold change} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

$$\text{โดยที่ } \Delta C_T = C_T(\text{Target gene}) - C_T(\text{Reference gene})$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T(\text{Target sample}) - \Delta C_T(\text{Reference sample})$$

Target gene คือ ยีนที่สนใจ ได้แก่ iNOS

Reference gene คือ ยีนควบคุม ได้แก่ β -actin

Target sample คือ กลุ่มทดลอง

Reference sample คือ กลุ่มควบคุม

การจัดกระทำข้อมูลและการวิเคราะห์ข้อมูล

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

1. วิเคราะห์สถิติด้วยโปรแกรมเอสพีเอสเอส (SPSS Statistics Base 20.0) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) แสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
2. ทดสอบการแจกแจงของข้อมูลด้วยชาปีโร-วิลค์ (Shapiro-Wilk test) และทดสอบความแปรปรวนด้วยเลวิน (Levene's test)

3. วิเคราะห์การตอบสนองต่อสารสกัดหยาบไขมันชั้น ด้วยครัสคัล-วอลลิส (Kruskal-Wallis test) หากพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่ม จะทำการทดสอบรายคู่ด้วยดัน-บอนเฟอโรนี (Dunn-Bonferroni post hoc test)

4. วิเคราะห์ความมีชีวิตของเซลล์ วิเคราะห์การสร้างไนตริกออกไซด์ และวิเคราะห์การแสดงออกของ iNOS ในระดับ mRNA ด้วยการทดสอบรายคู่ (Paired sample t-test)



บทที่ 4

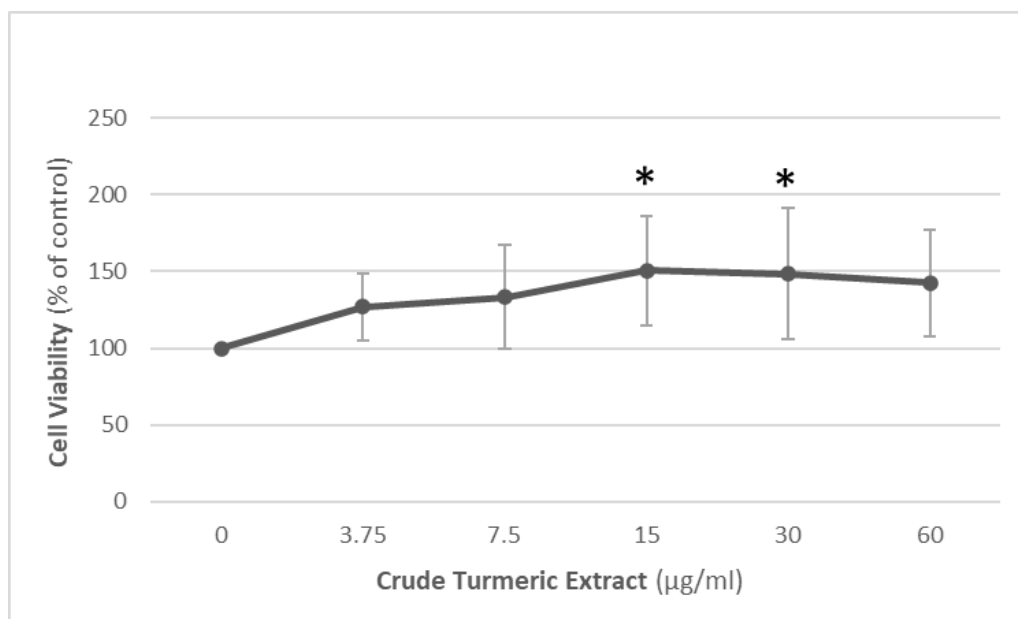
ผลการศึกษา

การวิจัยเพื่อให้ได้มาซึ่งผลของสารสกัดหยาบขมิ้นชันต่อไนตริกออกไซด์ และอินดิคิเบิลไนตริกออกไซด์ซินเทสของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ที่กระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ในสถานะน้ำตาลสูง ผู้วิจัยได้ดำเนินการวิจัยโดยการศึกษาตามขอบวนการและขั้นตอนต่าง ๆ จนกระทั่งวิเคราะห์ข้อมูลให้เป็นไปตามวัตถุประสงค์ที่ได้กำหนดไว้ ดังนี้

1. การวิเคราะห์การตอบสนองต่อสารสกัดหยาบขมิ้นชัน
2. การวิเคราะห์ความมีชีวิตของเซลล์
3. การวิเคราะห์การสร้างไนตริกออกไซด์
4. การวิเคราะห์การแสดงออกของ iNOS ในระดับ mRNA

การวิเคราะห์การตอบสนองต่อสารสกัดหยาบขมิ้นชัน

ทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ไม่ผสมซีรัม ที่มีสารสกัดหยาบขมิ้นชันความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ 0, 3.75, 7.5, 15, 30 และ 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วย MTT assay โดยตัวอย่างจากผู้เข้าร่วมวิจัยทั้ง 3 คน จะถูกทำการทดลองแยกกัน 2 ครั้ง แต่ละครั้งจะทำซ้ำ 3 หลุมในแต่ละกลุ่ม พบว่าเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ไม่ผสมซีรัม ที่มีสารสกัดหยาบขมิ้นชัน 3.75, 7.5, 15, 30 และ 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ 126.97 ± 22.09 , 133.32 ± 34.04 , 150.51 ± 35.95 , 148.46 ± 42.92 และ 142.43 ± 34.43 ตามลำดับ ซึ่งเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัดหยาบขมิ้นชัน (0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เมื่อทดสอบการแจกแจงของข้อมูลด้วย Shapiro-Wilk test พบว่าการแจกแจงปกติ และเมื่อทดสอบความแปรปรวนด้วย Levene's test พบว่ามีความแปรปรวนไม่เท่ากันระหว่างกลุ่ม จึงวิเคราะห์ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ด้วย Kruskal-Wallis test และ Dunn-Bonferroni post hoc test พบว่ากลุ่มที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นของสารสกัดหยาบขมิ้นชัน 15 และ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีร้อยละความมีชีวิตของเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยที่ความเข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์สูงสุด จึงเลือกใช้เป็นความเข้มข้นของสารสกัดหยาบขมิ้นชันสำหรับการทดสอบต่อไป

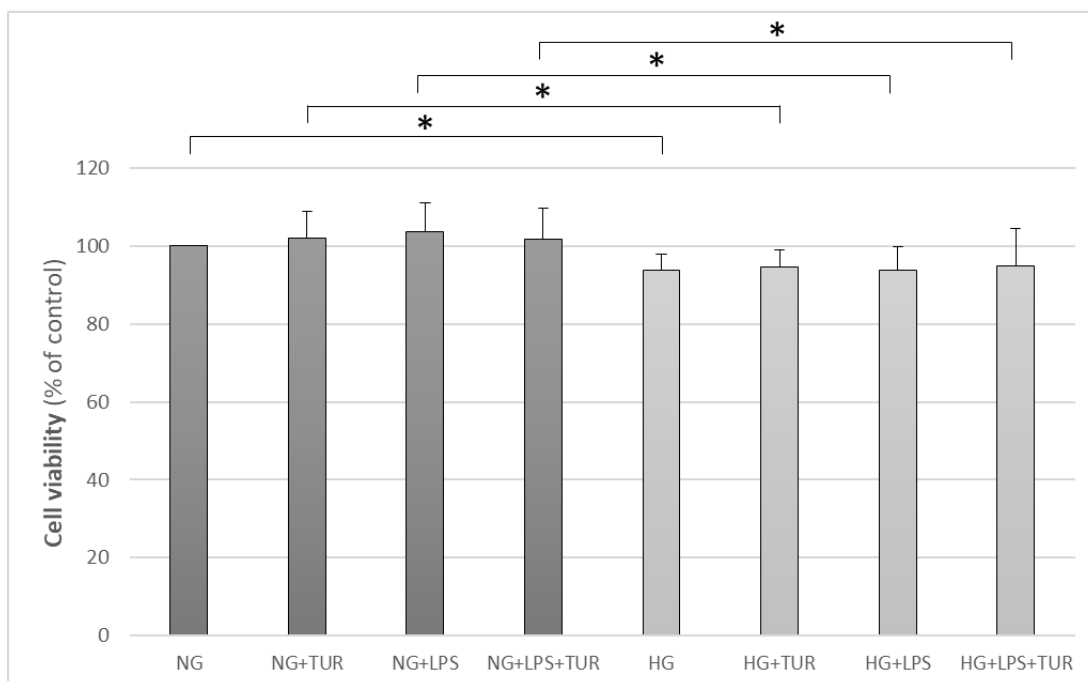


ภาพประกอบ 5 ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์เมื่อตอบสนองต่อสารสกัดหยาบขมิ้นชัน (* $p < 0.05$)

การวิเคราะห์ความมีชีวิตของเซลล์

ทดสอบความมีชีวิตของเซลล์เมื่อเลี้ยงในเงื่อนไขต่าง ๆ ได้แก่ NG, NG+TUR, NG+LPS, NG+LPS+TUR, HG, HG+TUR, HG+LPS และ HG+LPS+TUR โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ตามกลุ่มน้ำตาล 72 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ตามกลุ่มการได้รับสารสกัดหยาบขมิ้นชันและการกระตุ้นด้วย LPS 24 ชั่วโมง ตัวอย่างของผู้เข้าร่วมวิจัยทั้ง 3 คน จะถูกทำการทดลองแยกกัน 3 ครั้ง แต่จะครั้งจะทำซ้ำ 3 หลุมในแต่ละกลุ่ม จากการทดสอบพบว่า กลุ่มน้ำตาลปกติ ได้แก่ NG+TUR, NG+LPS และ NG+LPS+TUR มีร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ 101.94 ± 6.95 , 103.51 ± 7.61 และ 101.72 ± 7.87 ตามลำดับ ซึ่งเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมคือ NG ส่วนกลุ่มน้ำตาลสูง ได้แก่ HG, HG+TUR, HG+LPS และ HG+LPS+TUR มีร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ 93.66 ± 4.35 , 94.55 ± 4.33 , 93.76 ± 5.99 และ 94.75 ± 9.76 ตามลำดับ ซึ่งลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เมื่อทดสอบการแจกแจงของข้อมูลด้วย Shapiro-Wilk test พบว่าการแจกแจงปกติ และเมื่อวิเคราะห์ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ด้วย Paired sample t-test โดยจับคู่เปรียบเทียบปัจจัยน้ำตาล การกระตุ้นด้วย LPS และการได้รับสารสกัดหยาบขมิ้นชัน ที่ระดับปัจจัย พบว่าสภาวะน้ำตาลสูงสามารถลดร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ โดยร้อยละความมีชีวิตของเซลล์กลุ่มน้ำตาลสูง ได้แก่ HG, HG+TUR, HG+LPS และ HG+LPS+TUR ลดลงจากกลุ่มน้ำตาลปกติ ได้แก่ NG, NG+TUR, NG+LPS และ NG+LPS+TUR ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญ

ทางสถิติ ($p < 0.05$) ขณะที่การกระตุ้นด้วย LPS หรือการได้รับสารสกัดหยาบขมิ้นชันไม่ทำให้เกิดความแตกต่างของร้อยละความมีชีวิตของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

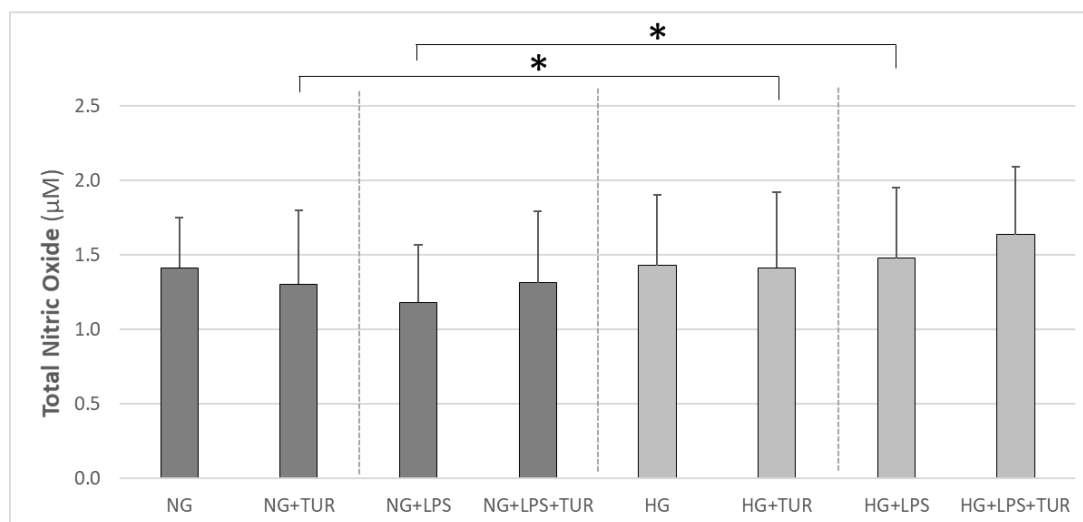


ภาพประกอบ 6 ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์กลุ่มต่าง ๆ (* $p < 0.05$)

การวิเคราะห์การสร้างไนตริกออกไซด์

นำน้ำเลี้ยงเซลล์ในเงื่อนไขต่าง ๆ มาวิเคราะห์การสร้างไนตริกออกไซด์ด้วย Nitric Oxide (total) detection kit ตัวอย่างของผู้เข้าร่วมวิจัยทั้ง 3 คน จะถูกทำการทดลองแยกกัน 2 ครั้ง แต่ละครั้งจะทำซ้ำ 2 หลุมในแต่ละกลุ่ม พบว่ากลุ่ม NG, NG+TUR, NG+LPS, NG+LPS+TUR, HG, HG+TUR, HG+LPS และ HG+LPS+TUR มีปริมาณไนตริกออกไซด์ 1.41 ± 0.34 , 1.31 ± 0.49 , 1.18 ± 0.39 , 1.31 ± 0.48 , 1.43 ± 0.48 , 1.41 ± 0.51 , 1.48 ± 0.47 และ 1.64 ± 0.46 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ เมื่อทดสอบการแจกแจงของข้อมูลด้วย Shapiro-Wilk test พบว่ามีการแจกแจงปกติ เมื่อวิเคราะห์ปริมาณไนตริกออกไซด์ด้วย Paired sample t-test พบว่า สภาวะน้ำตาลสูงทำให้เซลล์มีการสร้างไนตริกออกไซด์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในกลุ่ม HG+TUR และ HG+LPS และเพิ่มขึ้นอย่างไม่มีนัยสำคัญในกลุ่ม HG และ HG+LPS+TUR เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม NG+TUR, NG+LPS, NG และ NG+LPS+TUR ตามลำดับ เช่นเดียวกับการกระตุ้นด้วย LPS ที่ทำให้เกิดการสร้างไนตริกออกไซด์เพิ่มขึ้นในกลุ่ม NG+LPS+TUR, HG+LPS และ HG+LPS+TUR อย่างไม่มีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม NG+TUR, HG และ HG+TUR

ตามลำดับ ยกเว้นกลุ่ม NG+LPS ที่ LPS ไม่กระตุ้นการสร้างไนตริกออกไซด์ ส่วนสารสกัดหยาบไขมันชั้นนั้นไม่ทำให้เกิดความแตกต่างของการสร้างไนตริกออกไซด์อย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่ได้รับและไม่ได้รับสารสกัดหยาบไขมันชั้น โดยกลุ่ม NG+TUR และ HG+TUR มีแนวโน้มการสร้างไนตริกออกไซด์ลดลง ขณะที่กลุ่ม NG+LPS+TUR และ HG+LPS+TUR มีแนวโน้มการสร้างเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม NG, HG, NG+LPS และ HG+LPS ตามลำดับ

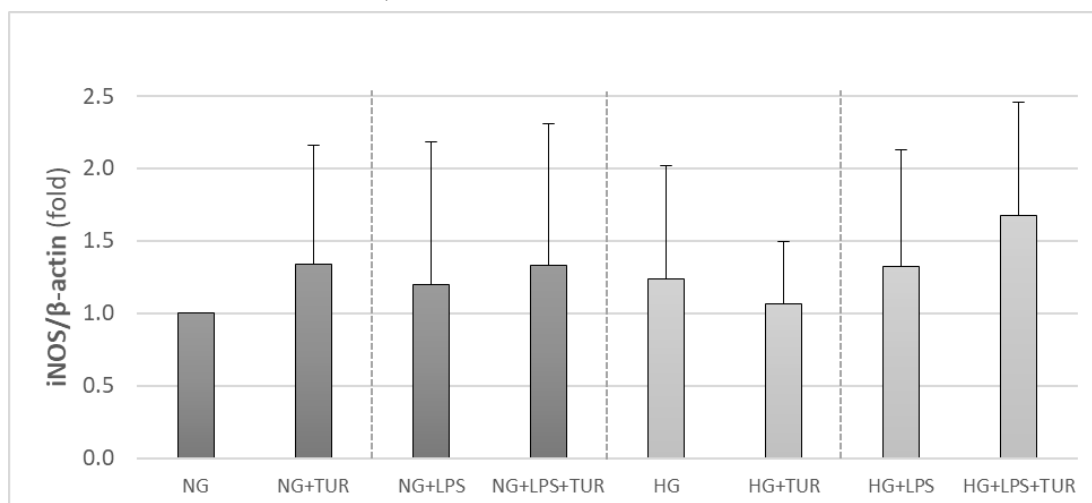


ภาพประกอบ 7 ปริมาณไนตริกออกไซด์ (ไมโครโมลาร์) ในน้ำเลี้ยงเซลล์กลุ่มต่าง ๆ
(*p < 0.05)

การวิเคราะห์การแสดงออกของ iNOS ในระดับ mRNA

นำเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงในเงื่อนไขต่าง ๆ มาวิเคราะห์การแสดงออกของ iNOS ในระดับ mRNA ด้วยวิธี Real-time RT-PCR ตัวอย่างของผู้เข้าร่วมวิจัยทั้ง 3 คน จะถูกทำการทดลองแยกกัน 3 ครั้ง แต่แต่ละครั้งจะทำซ้ำ 3 หลุมในแต่ละกลุ่ม พบว่ากลุ่ม NG, NG+TUR, NG+LPS, NG+LPS+TUR, HG, HG+TUR, HG+LPS และ HG+LPS+TUR มีสัดส่วนการแสดงออกของ iNOS ในระดับ mRNA เทียบกับ β -actin เท่ากับ 1.00, 1.34 ± 0.82 , 1.20 ± 0.98 , 1.33 ± 0.98 , 1.24 ± 0.78 , 1.07 ± 0.43 , 1.32 ± 0.81 และ 1.68 ± 0.78 เท่า ตามลำดับ เมื่อทดสอบการแจกแจงของข้อมูลด้วย Shapiro-Wilk test พบว่ามีการแจกแจงปกติ จึงวิเคราะห์ด้วย Paired sample t-test พบว่าแต่ละกลุ่มแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบ NG+LPS กับ NG และ HG+LPS กับ HG พบว่า LPS มีแนวโน้มเพิ่มการแสดงออกของ iNOS ในระดับ mRNA อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบ HG กับ NG และ HG+LPS กับ NG+LPS พบว่าสถานะน้ำตาลสูงมีแนวโน้มเพิ่มการแสดงออกของ iNOS ในระดับ mRNA อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อพิจารณากลุ่ม NG+TUR, NG+LPS+TUR และ HG+LPS+TUR พบว่าการได้รับสารสกัดหยาดไขมันชั้นมีแนวโน้มเพิ่มการแสดงออกของ iNOS ในระดับ mRNA อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม NG, NG+LPS และ HG+LPS ตามลำดับ ยกเว้นในกลุ่ม HG+TUR ที่การได้รับสารสกัดหยาดไขมันชั้นมีแนวโน้มลดการแสดงออกของ iNOS ในระดับ mRNA อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม HG



ภาพประกอบ 8 อัตราส่วน (เท่า) การแสดงออกของ iNOS ในระดับ mRNA เทียบกับ β -actin ของเซลล์กลุ่มต่าง ๆ

บทที่ 5

อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

ในการวิจัยเรื่องผลของสารสกัดหยาบขมิ้นชันต่อไนตริกออกไซด์ และอินดิคิเบิลไนตริกออกไซด์ซินเทสของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ที่กระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ในสภาวะน้ำตาลสูง ผู้วิจัยได้จำลองสภาวะโรคปริทันต์อักเสบและเบาหวานในห้องปฏิบัติการ จากนั้นศึกษาผลของสารสกัดหยาบขมิ้นชันต่อการตอบสนองของเซลล์ในสภาวะดังกล่าว โดยตัวชี้วัดที่นำมาใช้ในการประเมินคือ ไนตริกออกไซด์ และ iNOS ซึ่งสามารถสรุปผลการดำเนินงาน โดยแบ่งหัวข้อในการสรุปผลได้ดังต่อไปนี้

1. อภิปรายผลการวิจัย
2. สรุปผลการวิจัย
3. ข้อเสนอแนะ

อภิปรายผลการวิจัย

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดหยาบขมิ้นชันต่อการสร้างไนตริกออกไซด์ และการแสดงออกของ iNOS ในระดับ mRNA ในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ที่กระตุ้นด้วย LPS ในสภาวะน้ำตาลสูง

ผงขมิ้นชัน จากเหง้าของต้นขมิ้นชัน มีคุณสมบัติทางชีวภาพมากมาย เช่นฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านจุลชีพ ฤทธิ์ต้านเบาหวาน และฤทธิ์ส่งเสริมการหายของแผล เป็นต้น ที่ผ่านมามีการศึกษาเกี่ยวกับเคอร์คิวมินซึ่งเป็นองค์ประกอบของขมิ้นชันอย่างกว้างขวาง แต่ในช่วงหลังได้มีการจำแนกองค์ประกอบอื่น ๆ ของขมิ้นชันที่นอกเหนือจากเคอร์คิวมิน ซึ่งมีคุณสมบัติทางชีวภาพ⁽¹⁰⁴⁾ เช่น เทอร์เมอโรน (Turmerone) ยับยั้งการแสดงออกของ COX-2 และ iNOS ในเซลล์แมคโครฟาจที่กระตุ้นด้วย LPS⁽¹⁰⁵⁾ และเยอรมาโครน (Germacrone) ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS⁽¹⁰⁶⁾ เป็นต้น จึงทำให้ผู้วิจัยเกิดแนวคิดในการนำสารสกัดหยาบขมิ้นชัน ซึ่งมีวิธีการเตรียมไม่ซับซ้อน และองค์ประกอบอื่น ๆ ของขมิ้นชัน รวมทั้งเคอร์คิวมินมาศึกษาคุณสมบัติในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ ซึ่งเป็นเซลล์หลักในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเหงือก และมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดโรคปริทันต์อักเสบ^(29, 73) โดยเมื่อวิเคราะห์ความมีชีวิตของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดหยาบขมิ้นชันความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ทุกความเข้มข้นของสารสกัดหยาบขมิ้นชันที่ใช้ทดสอบไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ สารสกัดหยาบขมิ้นชันความเข้มข้น 15 และ 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

เพิ่มร้อยละความมีชีวิตของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมีร้อยละความมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 150.51 ± 35.95 และ 148.46 ± 42.92 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และเมื่อวิเคราะห์ความมีชีวิตของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ตามกลุ่มน้ำตาล เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีหรือไม่มี LPS 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และสารสกัดหยาบไขมันชั้น 15 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า การได้รับสารสกัดหยาบไขมันชั้นไม่ทำให้เกิดความแตกต่างของร้อยละความมีชีวิตของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การที่สารสกัดหยาบไขมันชั้นความเข้มข้นเดียวกันคือ 15 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ทำให้อัตราความมีชีวิตของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ใน 2 การทดสอบต่างกันคือ กลุ่มความเข้มข้น 15 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในการวิเคราะห์การตอบสนองต่อความเข้มข้นของสารสกัดหยาบไขมันชั้น มีร้อยละความมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 150.51 ± 35.95 ส่วนกลุ่ม NG+TUR ในการวิเคราะห์ความมีชีวิตของเซลล์ มีร้อยละความมีชีวิตเซลล์เท่ากับ 101.94 ± 6.95 เนื่องมาจากการวิเคราะห์ในช่วงการเจริญเติบโตและความหนาแน่นของเซลล์ที่ต่างกัน โดยการทดสอบแรกทำการวิเคราะห์ในวันที่ 2 ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์ผ่านการปรับตัวกับสิ่งแวดล้อม และเข้าสู่ระยะแบ่งตัวเพิ่มจำนวน (Exponential phase) ในขณะที่การทดสอบที่สองทำการวิเคราะห์ในวันที่ 5 ซึ่งอยู่ในระยะแบ่งตัวเพิ่มจำนวน แต่ผ่านช่วงที่เซลล์มีอัตราการเพิ่มจำนวนสูงสุดมาแล้ว และกำลังเข้าสู่ระยะคงตัว (Stationary phase)⁽¹⁰⁷⁾ รวมทั้งเซลล์ได้มีการเจริญเต็มพื้นที่ของจานเพาะเลี้ยงเซลล์แล้ว จึงส่งผลต่อกิจกรรมของเซลล์^(108, 109) อย่างไรก็ตาม การไม่ลดลงของร้อยละความมีชีวิตของเซลล์เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมก็ยืนยันว่า การนำสารสกัดหยาบไขมันชั้นนี้ไปใช้ร่วมในการรักษาโรคปริทันต์ในรูปแบบยาเฉพาะที่ จะไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ของอวัยวะปริทันต์ โดยเฉพาะเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก

โรคปริทันต์อักเสบ เป็นโรคที่มีการทำลายอวัยวะปริทันต์ และมีความสัมพันธ์สองทางกับโรคเบาหวาน เกิดจากกลไกระหว่างการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อเชื้อก่อโรคปริทันต์ โดยเชื้อ *P. gingivalis* นั้นได้รับการพิสูจน์ว่ามีบทบาทสำคัญ และมีปัจจัยที่ก่อให้เกิดความรุนแรงได้แก่ LPS ซึ่งนำไปสู่การทำลายเนื้อเยื่อปริทันต์ผ่าน TLR โดย LPS จากเชื้อ *Pg* จะเพิ่มการแสดงออกของ TLR2 และ TLR4 ในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ และกระตุ้น NF- κ B, p38/MAPK และ ERK1/2⁽¹¹⁰⁾ เมื่อวิเคราะห์ความมีชีวิตของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ตามกลุ่มน้ำตาล เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี LPS 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า LPS ไม่ทำให้เกิดการลดลงของร้อยละความมีชีวิตของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์น้ำตาลปกติ โดยในกลุ่ม

NG+LPS มีร้อยละความมีชีวิตของเซลล์เป็น 1.035 เท่าของกลุ่มควบคุมภาวะปกติ (NG) ซึ่งมีผลในทิศทางเดียวกันกับเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์น้ำตาลสูง โดยพบว่า LPS ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของร้อยละความมีชีวิตของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมภาวะน้ำตาลสูง (HG) โดย HG+LPS และ HG มีร้อยละความมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 93.76 ± 5.99 และ 93.66 ± 4.35 ตามลำดับ กล่าวคือ การเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี LPS จากเชื้อ *Pg 1* ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงร้อยละความมีชีวิตของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หรือไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ ทั้งเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์น้ำตาลปกติ (NG+LPS) และเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์น้ำตาลสูง (HG+LPS) สอดคล้องกับการศึกษาอื่น ๆ ก่อนหน้านี้⁽¹¹¹⁻¹¹⁵⁾

สภาวะน้ำตาลสูงเรื้อรัง กระตุ้นวิธีการส่งสัญญาณต่าง ๆ ซึ่งนำไปสู่การอักเสบ การหลั่งไซโตไคน์ เซลล์ตาย และการเกิดภาวะแทรกซ้อนของเบาหวานในที่สุด⁽¹¹⁶⁾ เมื่อวิเคราะห์ความมีชีวิตของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ตามกลุ่มน้ำตาล เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์น้ำตาลปกติไม่ผสมซีรัม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสภาวะน้ำตาลสูง (50 มิลลิโมลาร์ 72 ชั่วโมง) ทำให้ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในการศึกษาของ Wu และคณะ (2017) พบว่า สภาวะน้ำตาลสูง 25 มิลลิโมลาร์ ที่ 12, 24 และ 72 ชั่วโมง ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของร้อยละความมีชีวิตของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ⁽¹¹⁷⁾ ในขณะที่การศึกษาของ ปริมา นูรณสิน และคณะ (2018)⁽³²⁾ พบว่า สภาวะน้ำตาลสูง 50 มิลลิโมลาร์ ที่เวลา 72 ชั่วโมง ทำให้เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์มีอัตราการเพิ่มจำนวนลดลง และวัดค่าเอนไซม์ LDH ที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ได้สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ รวมทั้งยังมีการเพิ่มขึ้นของ ROS ภายในเซลล์และการแสดงออกของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งอธิบายการที่ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญนั้นเกิดจากสภาวะน้ำตาลสูง 50 มิลลิโมลาร์ 72 ชั่วโมง ไปเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน

ไนตริกออกไซด์ เป็นโมเลกุลส่งสัญญาณ ซึ่งสร้างโดยเอนไซม์ NOS โดย iNOS จะมีบทบาทสำคัญในการทำลายเชื้อก่อโรค แต่การแสดงออกที่มากเกินไปของ iNOS ซึ่งทำให้เกิดการสร้างไนตริกออกไซด์เป็นจำนวนมากนั้นมีความเกี่ยวข้องกับโรคต่าง ๆ⁽¹¹⁸⁾ จากการศึกษาของ Pan และคณะ (2010) และ Shaker และคณะ (2013) พบว่า เนื้อเยื่อเหงือกของผู้ที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบและเบาหวาน ผู้ที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบอย่างเดียว และผู้ที่เป็นโรคเบาหวานอย่างเดียว มี

การแสดงออกของ iNOS มากกว่ากลุ่มควบคุม และเซลล์ในเนื้อเยื่อเหงือกที่มีการแสดงออกของ iNOS ได้แก่ เซลล์อักเสบ และเซลล์สร้างเส้นใย^(15, 16) สอดคล้องกับการศึกษาของ Kendall และคณะ (2000) และ Ji และคณะ (2006)^(12, 101) นอกจากนี้ในการศึกษาของ Lohinai และคณะ (1998) พบว่า หนูที่เหนี่ยวนำให้เป็นโรคปริทันต์อักเสบโดยการมัดฟันด้วยไหมเย็บแผลมีการแสดงออกของ iNOS ในเนื้อเยื่อเหงือกเพิ่มขึ้น และมีการละลายตัวของกระดูกขาฟัน เมื่อให้เมอร์แคปโทเอทิล กวานิดีน ซึ่งเป็นตัวยับยั้งเฉพาะ iNOS พบว่า สามารถลดการละลายของกระดูกได้แสดงถึงบทบาทของ iNOS ต่อพยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์อักเสบ⁽⁹³⁾ และในการศึกษาของ Nishikawa และคณะ (2012) และ Sun และคณะ (2020) ซึ่งเหนี่ยวนำหนูทดลองให้เป็นโรคเบาหวานและปริทันต์อักเสบโดยการฉีดยาและผูกมัดฟัน พบว่า กลุ่มที่เป็นโรคเบาหวานและปริทันต์อักเสบ มีการละลายของกระดูกมากกว่า กลุ่มที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบอย่างเดียว สอดคล้องกับการแสดงออกของ iNOS, NF- κ B และ TNF- α แสดงถึงการที่โรคเบาหวานทำให้โรคปริทันต์อักเสบมีความรุนแรงขึ้น และ iNOS มีบทบาทสำคัญในกระบวนการนี้^(119, 120)

ในการวิเคราะห์การสร้างไนตริกออกไซด์และการแสดงออกของ iNOS ในระดับ mRNA ของการศึกษานี้ เป็นการจำลองสภาวะโรคปริทันต์อักเสบและโรคเบาหวาน โดยผ่านการกระตุ้นเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก แล้วทำการวิเคราะห์และทดสอบผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ ซึ่งไม่ใช่สภาวะของร่างกายที่แท้จริง โดยผลการทดสอบไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มที่ได้รับและไม่ได้รับสารสกัดหยาบขมิ้นชัน ซึ่งอาจเกิดจากสภาวะการกระตุ้นด้วย *Pg* LPS 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร 24 ชั่วโมง และ/หรือสภาวะน้ำตาลสูง 50 มิลลิโมลาร์ 72 ชั่วโมง นั้นไม่เหมาะสม สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าของ Hirose และคณะ (2001) ที่ได้ทำการกระตุ้น HGF ด้วยสารสกัดของเชื้อ *Pg* 1-100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วไม่พบการสร้างไนตริกออกไซด์⁽¹¹⁾ แต่แตกต่างจากการศึกษาของ Gutiérrez-Venegas และคณะ (2005) และ Ji และคณะ (2006) ที่สามารถกระตุ้นการสร้างไนตริกออกไซด์ของ HGF ด้วย LPS จากเชื้อซัลโมเนลลา เ็นทีโรติดีส (*Salmonella enteritidis*) 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ *Pg* LPS 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร 24 ชั่วโมง ตามลำดับ^(101, 121) อย่างไรก็ตาม มีการศึกษาที่แสดงว่าการกระตุ้น HGF ด้วย LPS อาจต้องทำร่วมกับอย่างอื่น เช่น ไซโตไคน์ หรือต้องกระตุ้นด้วยไซโตไคน์หลายชนิดร่วมกัน จึงจะสามารถเพิ่มการแสดงออกของ iNOS และการสร้างไนตริกออกไซด์ได้มากกว่า โดย Kendall และคณะ (2000) และ Ji และคณะ (2006) กระตุ้น HGF ด้วย *Pg* LPS 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ร่วมกับ INF- γ 20 นาโนกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง^(12, 101) ส่วน Dahigh และคณะ (2002) รายงานการแสดงออกของ iNOS ในระดับ mRNA และการสร้างไนตริกออกไซด์มากที่สุด

เมื่อกระตุ้น HGF ด้วยไฮโดรโคไน์ร่วมกัน 3 ชนิด ได้แก่ TNF- α 25 นาโนกรัม/มิลลิลิตร, IL-1 β 100 นาโนกรัม/มิลลิลิตร และ INF- γ 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร โดยใช้เวลา 12 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ⁽⁹²⁾ ส่วนการกระตุ้นด้วยน้ำตาล Hua และคณะ (2012) ได้ศึกษาการสร้างไนตริกออกไซด์และการแสดงออกของ iNOS ในเซลล์ RAW 264.7 และรายงานว่า HG เพียงอย่างเดียวไม่สามารถกระตุ้นการสร้างไนตริกออกไซด์ได้ แต่เมื่อใช้ HG 15 มิลลิโมลาร์ 48 ชั่วโมง หรือ 25 มิลลิโมลาร์ 24 ชั่วโมง ร่วมกับ LPS ของเชื้อเอสเชอริเชีย โคไล (*Escherichia coli*; *E. coli*) 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถเพิ่มการสร้างไนตริกออกไซด์และการแสดงออกของ iNOS ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มน้ำตาลปกติ (5.5 มิลลิโมลาร์) ที่กระตุ้นด้วย LPS เนื่องจากสภาวะน้ำตาลสูงเพิ่มการทำงานของ PKC- $\alpha\delta$ และ NF- κ B⁽¹²²⁾ ขณะที่การศึกษาของ Cantuária และคณะ (2018) พบว่า เมื่อกระตุ้นเซลล์ RAW 264.7 ด้วยสภาวะ HG 12 หรือ 24 มิลลิโมลาร์ อย่างเดียวหรือร่วมกับ *E. coli* LPS 3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สามารถเพิ่มการสร้างไนตริกออกไซด์ได้อย่างมีนัยสำคัญ⁽¹²³⁾ ส่วนผลของ HG ต่อ HGF Jiang และคณะ (2012) ได้รายงานว่า เมื่อกระตุ้น HGF ด้วย HG 25 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบการแสดงออกของ TLR2 มากที่สุดและมีการเพิ่มขึ้นของ NF- κ B p65, TNF- α และ IL-1 β อย่างมีนัยสำคัญ โดย HG กระตุ้นการหลั่งไฮโดรโคไน์ด้วยการเหนี่ยวนำ TLR2 ผ่าน PKC- $\alpha\delta$ ⁽¹²⁴⁾ สอดคล้องกับ Vo และคณะ (2021) ที่พบการเพิ่มการแสดงออกของ TLR2 และ TLR4 และการหลั่งของ IL-1 β เมื่อกระตุ้น HGF ด้วย HG 25 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และพบการเพิ่มขึ้นของ NF- κ B p65 และ ROS เมื่อกระตุ้นด้วย HG เป็นเวลา 1 ชั่วโมง⁽¹²⁵⁾ อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาการสร้างไนตริกออกไซด์ในเซลล์ HGF ที่กระตุ้นด้วย HG

ในการวิเคราะห์การแสดงออกของ iNOS ของการศึกษานี้พบว่า สารสกัดหยาบขมิ้นชันมีแนวโน้มเพิ่มการแสดงออกของ iNOS ในกลุ่ม NG, NG+LPS และ HG+LPS และมีแนวโน้มลดการแสดงออกของ iNOS ในกลุ่ม HG อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งมีทั้งส่วนที่แตกต่างและสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่แสดงคุณสมบัติของขมิ้นชันในการต้านการอักเสบ และการต้านอนุมูลอิสระ ในการต้านการอักเสบ ผลของเคอร์คิวมินต่อเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS นั้นทำให้เซลล์ลดการหลั่งไฮโดรโคไน์ ได้แก่ IL-1 β และ TNF- α ⁽⁵⁴⁾ และลดการแสดงออกของ iNOS และการสร้างไนตริกออกไซด์^(27, 51) ด้วยกลไกที่เคอร์คิวมินยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ IKK ทำให้ไม่เกิดการกระตุ้นทรานสคริปชันแฟกเตอร์ NF- κ B⁽²⁷⁾ นอกจากนี้ ในกระบวนการหลังการแปลรหัส เคอร์คิวมินยังมีส่วนส่งเสริมการสลาย iNOS และยับยั้งการทำงานของ iNOS ผ่านการยับยั้งการกระตุ้น ERK1/2⁽⁵¹⁾ ส่วนเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกหนูที่กระตุ้นด้วย LPS พบว่า เคอร์คิว

มีผลลดการสร้าง IL-1 β และ TNF- α ยับยั้งการกระตุ้น NF-kB และยับยั้งการลดลงของอัตราส่วน OPG/RANKL⁽³⁰⁾ และในเซลล์ HGF ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เคอร์คิวมินมีผลยับยั้งการแสดงออกของ COX-2⁽³¹⁾ ในการศึกษาที่สารสกัดหยาบขมิ้นชันมีแนวโน้มเพิ่มการแสดงออกของ iNOS ในกลุ่มที่กระตุ้นด้วย LPS ซึ่งมีทิศทางตรงข้ามกับการศึกษาก่อนหน้านี้ อาจเกิดจากการที่เซลล์ได้รับสารสกัดหยาบขมิ้นชันพร้อมกับการกระตุ้นด้วย LPS ทำให้ไม่เกิดการยับยั้งการกระตุ้น NF-kB ดังในการศึกษาของ Singh และ Aggarwal (1995) ที่รายงานไว้ว่า เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวมนุษย์เพาะเลี้ยง (ML-1a) ที่ได้รับเคอร์คิวมิน 1 ชั่วโมง ก่อนการกระตุ้นด้วย TNF- α จะแสดงการยับยั้งการกระตุ้น NF-kB ขณะที่เซลล์ที่ได้รับเคอร์คิวมินพร้อมกับการกระตุ้นด้วย TNF- α จะไม่เกิดการยับยั้งการกระตุ้น NF-kB⁽⁴⁸⁾ ในการศึกษาของอนุโมลีสระ เคอร์คิวมินสามารถดักจับ ROS ภายในเซลล์⁽¹²⁶⁾ และไนตริกออกไซด์ได้⁽¹²⁷⁾ จากการศึกษาในเซลล์เยื่อบุท่อไตมนุษย์เพาะเลี้ยง (HK-2) ที่กระตุ้นด้วย HG พบว่า เคอร์คิวมินลด ROS และเพิ่มส่วนที่เกี่ยวข้องกับการต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ ได้แก่ กลูตาไทโอน (GSH) SOD และการแสดงออกของ Nrf2⁽¹²⁸⁾ สอดคล้องกับผลในเซลล์เยื่อบุท่อไตหนูเพาะเลี้ยง (NRK-52E) ที่กระตุ้นด้วย HG ซึ่งพบว่า เคอร์คิวมินลดการเพิ่ม ROS และยับยั้งการกระตุ้น TLR4/NF-kB⁽¹²⁹⁾ ดังนั้นในการศึกษานี้ การที่สารสกัดหยาบขมิ้นชันมีแนวโน้มลดการแสดงออกของ iNOS ในกลุ่มควบคุมภาวะน้ำตาลสูง อาจเป็นผลมาจากคุณสมบัติในการดักจับ ROS ที่เพิ่มขึ้นจากการกระตุ้นด้วย HG ทำให้เกิดการยับยั้งวิถี ROS/NF-kB^(116, 125) และเนื่องจากการศึกษานี้ใช้สารทดสอบเป็นสารสกัดหยาบขมิ้นชัน ดังนั้นผลที่ไม่สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้า อาจเป็นผลมาจากสารประกอบอื่น ๆ ของสารสกัดหยาบขมิ้นชัน ซึ่งได้มาจากการสกัดผงขมิ้นชันแห้งด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 โดยสารประกอบอื่นอาจมีผลในเชิงบวกและผลในเชิงลบ อย่างไรก็ตาม ผลการทดสอบทั้งหมดนี้ไม่บ่งบอกความเป็นพิษใด ๆ ของสารสกัดหยาบขมิ้นชันต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์

สรุปผลการวิจัย

สารสกัดหยาบขมิ้นชันความเข้มข้น 15 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ ในการวิเคราะห์ผลของสารสกัดหยาบขมิ้นชันต่อการสร้างไนตริกออกไซด์ และการแสดงออกของ iNOS ในระดับ mRNA ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มที่ได้รับและไม่ได้รับสารสกัดหยาบขมิ้นชัน แต่สารสกัดหยาบขมิ้นชันมีแนวโน้มเพิ่มการแสดงออกของ iNOS ในกลุ่ม NG, NG+LPS และ HG+LPS และมีแนวโน้มลดการแสดงออกของ iNOS ในกลุ่ม HG ดังนั้นการใช้สารสกัดหยาบขมิ้นชันเสริมอาจช่วยป้องกันการเกิด

ภาวะแทรกซ้อน เช่น โรคปริทันต์อักเสบ ในผู้ป่วยเบาหวานที่ควบคุมระดับน้ำตาลได้ไม่ดี ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากในการวิเคราะห์ผลของสารสกัดหยาบขมิ้นชันต่อการสร้างไนตริกออกไซด์ และการแสดงออกของ iNOS ในระดับ mRNA ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่ม แต่มีการศึกษาที่ยืนยันว่า HGF เป็นแหล่งที่พบการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างไนตริกออกไซด์มากเกินจาก iNOS ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับพยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์อักเสบ⁽⁹²⁾ และการที่โรคเบาหวานทำให้โรคปริทันต์อักเสบมีความรุนแรงมากขึ้น⁽¹⁶⁾ จึงควรต้องมีการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการต่อไป โดยปรับเปลี่ยนชนิดตัวกระตุ้น และปรับความเข้มข้น รวมถึงระยะเวลาหรือช่วงเวลาในการกระตุ้น นอกจากนี้ อาจเพิ่มเติมตัวชี้วัดเพื่อให้เข้าใจกลไกการออกฤทธิ์หรือเป้าหมายระดับโมเลกุลภายในเซลล์ของสารสกัดหยาบขมิ้นชัน

บรรณานุกรม

1. Mealey BL, Ocampo GL. Diabetes mellitus and periodontal disease. *Periodontology* 2000. 2007;44(1):127-53.
2. Santilli F, D'Ardes D, Davi G. Oxidative stress in chronic vascular disease: from prediction to prevention. *Vascular pharmacology*. 2015;74:23-37.
3. American Academy of Periodontology, editor Consensus report. Discussion section I. Proceedings of the World Workshop in Clinical Periodontics; 1989: American Academy of Periodontology Chicago.
4. Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontology* 2000. 1997;14(1):9-11.
5. Ryan ME, Carnu O, Kamer A. The influence of diabetes on the periodontal tissues. *The Journal of the American Dental Association*. 2003;134:34S-40S.
6. Polak D, Shapira L. An update on the evidence for pathogenic mechanisms that may link periodontitis and diabetes. *Journal of Clinical Periodontology*. 2018;45(2):150-66.
7. Moncada S. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol rev*. 1991;43:109-42.
8. Kendall H, Marshall R, Bartold P. Nitric oxide and tissue destruction. *Oral diseases*. 2001;7(1):2-10.
9. Nathan C, Xie Q. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;269(19):13725-8.
10. Güllü C, Ozmeric N, Tokman B, Elgün S, Balos K. Effectiveness of scaling and root planing versus modified Widman flap on nitric oxide synthase and arginase activity in patients with chronic periodontitis. *Journal of periodontal research*. 2005;40(2):168-75.
11. Hirose M, Ishihara K, Saito A, Nakagawa T, Yamada S, Okuda K. Expression of cytokines and inducible nitric oxide synthase in inflamed gingival tissue. *Journal of periodontology*. 2001;72(5):590-7.
12. Kendall H, Haase H, Li H, Xiao Y, Bartold PM. Nitric oxide synthase type-II is synthesized by human gingival tissue and cultured human gingival fibroblasts. *Journal of*

periodontal research. 2000;35(4):194-200.

13. Lappin D, Kjeldsen M, Sander L, Kinane D. Inducible nitric oxide synthase expression in periodontitis. *Journal of periodontal research*. 2000;35(6):369-73.

14. Matejka M, Partyka L, Ulm C, Solar P, Sinzinger H. Nitric oxide synthesis is increased in periodontal disease. *Journal of periodontal research*. 1998;33(8):517-8.

15. Pan Z, Guzeldemir E, Toygar HU, Bal N, Bulut S. Nitric oxide synthase in gingival tissues of patients with chronic periodontitis and with and without diabetes. *Journal of periodontology*. 2010;81(1):109-20.

16. Shaker O, Ghallab NA, Hamdy E, Sayed S. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in gingival tissues of chronic periodontitis with and without diabetes: immunohistochemistry and RT-PCR study. *Archives of oral biology*. 2013;58(10):1397-406.

17. Paraskevas S, Huizinga JD, Loos BG. A systematic review and meta-analyses on C-reactive protein in relation to periodontitis. *Journal of clinical periodontology*. 2008;35(4):277-90.

18. Madianos PN, Koromantzos PA. An update of the evidence on the potential impact of periodontal therapy on diabetes outcomes. *Journal of clinical periodontology*. 2018;45(2):188-95.

19. Cunha-Cruz J, Hujoel PP, Maupome G, Saver B. Systemic antibiotics and tooth loss in periodontal disease. *Journal of dental research*. 2008;87(9):871-6.

20. Howell TH, Williams RC. Nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of periodontal disease progression. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 1993;4(2):177-96.

21. Golub L, Lee H-M, Ryan M, Giannobile W, Payne J, Sorsa T. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple non-antimicrobial mechanisms. *Advances in dental research*. 1998;12(1):12-26.

22. Preshaw PM. Host response modulation in periodontics. *Periodontology* 2000. 2008;48(1):92-110.

23. Golub LM, Elburki MS, Walker C, Ryan M, Sorsa T, Tenenbaum H, et al. Non-antibacterial tetracycline formulations: host-modulators in the treatment of periodontitis

and relevant systemic diseases. *International dental journal*. 2016;66(3):127-35.

24. Singh N, Savita S, Rithesh K, Shivanand S. Phytotherapy: A novel approach for treating periodontal disease. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences*. 2016;6(4).

25. Moro M, Silveira Souto M, Franco G, Holzhausen M, Pannuti C. Efficacy of local phytotherapy in the nonsurgical treatment of periodontal disease: A systematic review. *Journal of periodontal research*. 2018;53(3):288-97.

26. Amalraj A, Pius A, Gopi S, Gopi S. Biological activities of curcuminoids, other biomolecules from turmeric and their derivatives—A review. *Journal of traditional and complementary medicine*. 2017;7(2):205-33.

27. Pan M-H, Lin-Shiau S-Y, Lin J-K. Comparative studies on the suppression of nitric oxide synthase by curcumin and its hydrogenated metabolites through down-regulation of **IKB** kinase and **NFKB** activation in macrophages. *Biochemical pharmacology*. 2000;60(11):1665-76.

28. Kim KM, Pae H-O, Zhung M, Ha H-Y, Ha YA, Chai K-Y, et al. Involvement of anti-inflammatory heme oxygenase-1 in the inhibitory effect of curcumin on the expression of pro-inflammatory inducible nitric oxide synthase in RAW264. 7 macrophages. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2008;62(9):630-6.

29. Ara T, Kurata K, Hirai K, Uchihashi T, Uematsu T, Imamura Y, et al. Human gingival fibroblasts are critical in sustaining inflammation in periodontal disease. *Journal of periodontal research*. 2009;44(1):21-7.

30. Xiao C-J, Yu X-J, Xie J-L, Liu S, Li S. Protective effect and related mechanisms of curcumin in rat experimental periodontitis. *Head & face medicine*. 2018;14(1):1-8.

31. Hu P, Huang P, Chen MW. Curcumin attenuates cyclooxygenase-2 expression via inhibition of the **NF-KB** pathway in lipopolysaccharide-stimulated human gingival fibroblasts. *Cell biology international*. 2013;37(5):443-8.

32. Buranasin P, Mizutani K, Iwasaki K, Pawaputanon Na Mahasarakham C, Kido D, Takeda K, et al. High glucose-induced oxidative stress impairs proliferation and migration of human gingival fibroblasts. *PLoS One*. 2018;13(8):e0201855-e.

33. Hehenberger K, Hansson A. High glucose-induced growth factor resistance in human fibroblasts can be reversed by antioxidants and protein kinase C-inhibitors. *Cell Biochemistry and Function: Cellular biochemistry and its modulation by active agents or disease*. 1997;15(3):197-201.
34. Kim HS, Park JW, Yeo SI, Choi BJ, Suh JY. Effects of high glucose on cellular activity of periodontal ligament cells in vitro. *Diabetes research and clinical practice*. 2006;74(1):41-7.
35. Ohgi S, Johnson P. Glucose modulates growth of gingival fibroblasts and periodontal ligament cells: correlation with expression of basic fibroblast growth factor. *Journal of periodontal research*. 1996;31(8):579-88.
36. Turner JL, Bierman EL. Effects of glucose and sorbitol on proliferation of cultured human skin fibroblasts and arterial smooth-muscle cells. *Diabetes*. 1978;27(5):583-8.
37. Yang X, Zhang J, Ni J, Ouyang B, Wang D, Luo S, et al. Toll-Like Receptor 4-Mediated Hyper-Responsiveness of Gingival Epithelial Cells to Lipopolysaccharide in High-Glucose Environments. *Journal of periodontology*. 2014;85(11):1620-8.
38. Lantz RC, Chen G, Solyom A, Jolad S, Timmermann B. The effect of turmeric extracts on inflammatory mediator production. *Phytomedicine*. 2005;12(6-7):445-52.
39. Nathan C, Xie Q-w. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*. 1994;78(6):915-8.
40. Neelapong W, Phonyotin B, Sittikijyothin W. Extraction of Active Compounds from Thai Herbs: Powder and Extract. *Journal of King Mongkut's University of Technology North Bangkok*. 2019.
41. Gupta SC, Sung B, Kim JH, Prasad S, Li S, Aggarwal BB. Multitargeting by turmeric, the golden spice: from kitchen to clinic. *Molecular nutrition & food research*. 2013;57(9):1510-28.
42. Chattopadhyay I, Biswas K, Bandyopadhyay U, Banerjee RK. Turmeric and curcumin: Biological actions and medicinal applications. *CURRENT SCIENCE-BANGALORE*-. 2004;87:44-53.
43. Chanda S, Ramachandra T. Phytochemical and Pharmacological Importance of

Turmeric (*Curcuma longa*): A Review. *Research & Reviews: A Journal of Pharmacology*. 2019;9(1):16-23.

44. Parthasarathy VA, Chempakam B, Zachariah TJ. *Chemistry of spices*: Wallingford, UK ; Cambridge, MA : CABI Pub.; 2008. 97-123 p.

45. Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Molecular pharmaceutics*. 2007;4(6):807-18.

46. Gupta SC, Patchva S, Aggarwal BB. Therapeutic roles of curcumin: lessons learned from clinical trials. *The AAPS journal*. 2013;15(1):195-218.

47. Noorafshan A, Ashkani-Esfahani S. A review of therapeutic effects of curcumin. *Current pharmaceutical design*. 2013;19(11):2032-46.

48. Singh S, Aggarwal BB. Activation of transcription factor NF- κ B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane). *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270(42):24995-5000.

49. Livada R, Shiloah J, Tipton D, Dabbous M. The Potential Role of Curcumin in Periodontal Therapy: A Review of the Literature. *Journal of the International Academy of Periodontology*. 2017;19(3):70-9.

50. Hong J, Bose M, Ju J, Ryu J-H, Chen X, Sang S, et al. Modulation of arachidonic acid metabolism by curcumin and related β -diketone derivatives: effects on cytosolic phospholipase A 2, cyclooxygenases and 5-lipoxygenase. *Carcinogenesis*. 2004;25(9):1671-9.

51. Ben P, Liu J, Lu C, Xu Y, Xin Y, Fu J, et al. Curcumin promotes degradation of inducible nitric oxide synthase and suppresses its enzyme activity in RAW 264.7 cells. *International immunopharmacology*. 2011;11(2):179-86.

52. Rao M. Nitric oxide scavenging by curcuminoids. *Journal of pharmacy and Pharmacology*. 1997;49(1):105-7.

53. Dinkova-Kostova AT, Talalay P. Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. *Molecular nutrition & food research*. 2008;52(S1):S128-S38.

54. Chen D, Nie M, Fan M-w, Bian Z. Anti-inflammatory activity of curcumin in macrophages stimulated by lipopolysaccharides from *Porphyromonas gingivalis*.

Pharmacology. 2008;82(4):264-9.

55. Shahzad M, Millhouse E, Culshaw S, Edwards CA, Ramage G, Combet E. Selected dietary (poly) phenols inhibit periodontal pathogen growth and biofilm formation. *Food & function*. 2015;6(3):719-29.
56. Guzik T, Korb R, Adamek-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation. *J physiol pharmacol*. 2003;54(4):469-87.
57. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*. 2014;37(Supplement 1):S81-S90.
58. American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2020. *Diabetes Care*. 2020;43(Supplement 1):S14-S31.
59. Rose LF. *Periodontics : medicine, surgery, and implants*. St. Louis, Miss: Elsevier Mosby; 2004.
60. Al-Maskari AY, Al-Maskari MY, Al-Sudairy S. Oral manifestations and complications of diabetes mellitus: a review. *Sultan Qaboos University Medical Journal*. 2011;11(2):179.
61. Cade WT. Diabetes-related microvascular and macrovascular diseases in the physical therapy setting. *Physical therapy*. 2008;88(11):1322-35.
62. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001;414(6865):813-20.
63. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation research*. 2010;107(9):1058-70.
64. Toda N, Imamura T, Okamura T. Alteration of nitric oxide-mediated blood flow regulation in diabetes mellitus. *Pharmacology & therapeutics*. 2010;127(3):189-209.
65. Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European heart journal*. 2012;33(7):829-37.
66. Sena CM, Pereira AM, Seica R. Endothelial dysfunction—a major mediator of diabetic vascular disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2013;1832(12):2216-31.
67. Teodoro JS, Nunes S, Rolo AP, Reis F, Palmeira CM. Therapeutic options targeting

oxidative stress, mitochondrial dysfunction and inflammation to hinder the progression of vascular complications of diabetes. *Frontiers in physiology*. 2019;9:1857.

68. Dokken BB. The pathophysiology of cardiovascular disease and diabetes: beyond blood pressure and lipids. *Diabetes Spectrum*. 2008;21(3):160-5.

69. Fowler MJ. Microvascular and macrovascular complications of diabetes. *Clinical diabetes*. 2008;26(2):77-82.

70. Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW, Koch G, Dunford RG, Machtei EE, et al. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. *Journal of periodontology*. 1994;65(3):260-7.

71. สุทธิชัย ฤกษ์ณะประกกรกิจ. พยาธิวิทยาภูมิคุ้มกันของโรคปริทันต์ = Immunopatholgy of periodontal disease. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2557.

72. Mahanonda R, Pichyangkul S. Toll-like receptors and their role in periodontal health and disease. *Periodontology 2000*. 2007;43(1):41-55.

73. Yucel-Lindberg T, Båge T. Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. *Expert reviews in molecular medicine*. 2013;15.

74. Naruishi K, Takashiba S, Chou HH, Arai H, Nishimura F, Murayama Y. Role of soluble interleukin-6 receptor in inflamed gingiva for binding of interleukin-6 to gingival fibroblasts. *Journal of periodontal research*. 1999;34(6):296-300.

75. Kang W, Hu Z, Ge S. Healthy and inflamed gingival fibroblasts differ in their inflammatory response to *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. *Inflammation*. 2016;39(5):1842-52.

76. Naruishi K, Nagata T. Biological effects of interleukin-6 on gingival fibroblasts: cytokine regulation in periodontitis. *Journal of cellular physiology*. 2018;233(9):6393-400.

77. Preshaw P, Alba A, Herrera D, Jepsen S, Konstantinidis A, Makrilakis K, et al. Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. *Diabetologia*. 2012;55(1):21-31.

78. Lalla E, Lamster IB, Stern DM, Schmidt AM. Receptor for advanced glycation end products, inflammation, and accelerated periodontal disease in diabetes: mechanisms and insights into therapeutic modalities. *Annals of Periodontology*. 2001;6(1):113-8.

79. Taylor JJ, Preshaw PM, Lalla E. A review of the evidence for pathogenic

mechanisms that may link periodontitis and diabetes. *Journal of clinical periodontology*. 2013;40:S113-S34.

80. Simpson TC, Needleman I, Wild SH, Moles DR, Mills EJ. Treatment of periodontal disease for glycaemic control in people with diabetes. *Cochrane database of systematic reviews*. 2010(5).

81. Simpson TC, Weldon JC, Worthington HV, Needleman I, Wild SH, Moles DR, et al. Treatment of periodontal disease for glycaemic control in people with diabetes mellitus. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2015(11).

82. Lew J-H, Naruishi K, Kajiura Y, Nishikawa Y, Ikuta T, Kido J-i, et al. High Glucose-Mediated Cytokine Regulation in Gingival Fibroblasts and THP-1 Macrophage: A Possible Mechanism of Severe Periodontitis with Diabetes. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2018;50(3):973-86.

83. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical journal*. 2001;357(3):593-615.

84. Mayer B, Hemmens B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends in biochemical sciences*. 1997;22(12):477-81.

85. Stuehr DJ, Kwon NS, Nathan CF, Griffith OW, Feldman P, Wiseman J. N omega-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. *Journal of Biological Chemistry*. 1991;266(10):6259-63.

86. Coleman JW. Nitric oxide in immunity and inflammation. *International immunopharmacology*. 2001;1(8):1397-406.

87. Wink DA, Hanbauer I, Grisham MB, Laval F, Nims RW, Laval J, et al. Chemical biology of nitric oxide: Regulation and protective and toxic mechanisms. *Current Topics in Cellular Regulation*. 34: Elsevier; 1996. p. 159-87.

88. Wink DA, Grisham MB, Mitchell JB, Ford PC. Direct and indirect effects of nitric oxide in chemical reactions relevant to biology. *Methods in enzymology*. 268: Elsevier; 1996. p. 12-31.

89. Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radical Biology and*

Medicine. 1998;25(4-5):434-56.

90. Schröder NW, Opitz B, Lamping N, Michelsen KS, Zähringer U, Göbel UB, et al. Involvement of lipopolysaccharide binding protein, CD14, and Toll-like receptors in the initiation of innate immune responses by *Treponema* glycolipids. *The Journal of Immunology*. 2000;165(5):2683-93.

91. Rao KMK. Molecular mechanisms regulating iNOS expression in various cell types. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews*. 2000;3(1):27-58.

92. Daghigh F, Borghaei RC, Thornton RD, Bee JH. Human gingival fibroblasts produce nitric oxide in response to proinflammatory cytokines. *Journal of periodontology*. 2002;73(4):392-400.

93. Lohinai Z, Benedek P, Fehér E, Györfi A, Rosivall L, Fazekas Á, et al. Protective effects of mercaptoethylguanidine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase, in ligature-induced periodontitis in the rat. *British journal of pharmacology*. 1998;123(3):353-60.

94. Sukatta U, Rugthaworn P, Pitpiangchan P, Dilokkunanant U. Development of mangosteen anti-acne gel. *Kasetsart J(Nat Sci)*. 2008;42:163-8.

95. Choresca Jr C, Koo O, Hong S, Oh H, Gomez D, Kim J, et al. Effect of dimethyl sulfoxide on cell cycle synchronization of goldfish caudal fin derived fibroblasts cells. *Reproduction in domestic animals*. 2010;45(5):e73-e7.

96. Zhuang Z, Yu D, Chen Z, Liu D, Yuan G, Yirong N, et al. Curcumin Inhibits Joint Contracture through PTEN Demethylation and Targeting PI3K/Akt/mTOR Pathway in Myofibroblasts from Human Joint Capsule. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2019;2019.

97. Takashima A. Establishment of fibroblast cultures. *Current protocols in cell biology*. 1998(1):2.1.

98. Saczko J, Dominiak M, Kulbacka J, Chwiłkowska A, Krawczykowska H. A simple and established method of tissue culture of human gingival fibroblasts for gingival augmentation. *Folia histochemica et cytobiologica*. 2008;46(1):117-9.

99. Cheung HS. An improved method of establishing human fibroblast cultures from

explants. *Journal of tissue culture methods*. 1980;6(1):39-40.

100. Mala S, Sacharoen A, Surarit R. Effect of schizophyllan on proliferation and migration of human gingival fibroblast. *Mahidol Dental Journal*. 2017;37(1):123-34.

101. Ji S, Kook J-K, Park J-C, Kim H-J, Jang H-S, Kim CK, et al. Effect of aging on expression of nitric oxide and inducible nitric oxide synthase in human gingival fibroblasts. *The Journal of the Korean Academy of Periodontology*. 2006;36(2):361-73.

102. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. 1983;65(1-2):55-63.

103. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature protocols*. 2008;3(6):1101.

104. Aggarwal BB, Yuan W, Li S, Gupta SC. Curcumin-free turmeric exhibits anti-inflammatory and anticancer activities: Identification of novel components of turmeric. *Molecular nutrition & food research*. 2013;57(9):1529-42.

105. Lee SK, Hong CH, Huh SK, Kim SS, Oh OJ, Min HY, et al. Suppressive effect of natural sesquiterpenoids on inducible cyclooxygenase (COX-2) and nitric oxide synthase (iNOS) activity in mouse macrophage cells. *Journal of environmental pathology, toxicology and oncology : official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer*. 2002;21(2):141-8.

106. Matsuda H, Ninomiya K, Morikawa T, Yoshikawa M. Inhibitory effect and action mechanism of sesquiterpenes from *Zedoariae Rhizoma* on D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced liver injury. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 1998;8(4):339-44.

107. Liu X, Wang J, Dong F, Li H, Hou Y. Human gingival fibroblasts induced and differentiated into vascular endothelial-like cells. *Development, growth & differentiation*. 2016;58(9):702-13.

108. Abercrombie M. Contact inhibition in tissue culture. *In vitro*. 1970;6(2):128-42.

109. Abercrombie M, Heaysman JE. Observations on the social behaviour of cells in tissue culture: II. "Monolayering" of fibroblasts. *Experimental cell research*. 1954;6(2):293-

306.

110. Jia L, Han N, Du J, Guo L, Luo Z, Liu Y. Pathogenesis of Important Virulence Factors of *Porphyromonas gingivalis* via Toll-Like Receptors. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019;9:262.

111. Azevedo FP, Morandini ACF, Sipert CR, Dionisio TJ, Santos CF, Damante CA, et al. Palatal mucosa derived fibroblasts present an adaptive behavior regarding cytokine secretion when grafted onto the gingival margin. *BMC Oral Health*. 2014;14(1):21.

112. Bozkurt SB, Hakki SS, Hakki EE, Durak Y, Kantarci A. *Porphyromonas gingivalis* Lipopolysaccharide Induces a Pro-inflammatory Human Gingival Fibroblast Phenotype. *Inflammation*. 2017;40(1):144-53.

113. Chiu HC, Fu MM, Yang TS, Fu E, Chiang CY, Tu HP, et al. Effect of high glucose, *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide and advanced glycation end-products on production of interleukin-6/-8 by gingival fibroblasts. *J Periodontal Res*. 2017;52(2):268-76.

114. Tsai Y-L, Chang M-C, Lin LD, Chan C-P, Wang C-Y, Lin P-S, et al. Stimulation of prostanoids and IL-8 production in human gingival fibroblasts by *Porphyromonas gingivalis* LPS is associated with MEK/ERK signaling. *Journal of Dental Sciences*. 2014;9:78–84.

115. Yiemwattana I, Kaomongkolgit R. Alpha-mangostin suppresses IL-6 and IL-8 expression in *P. gingivalis* LPS-stimulated human gingival fibroblasts. *Odontology*. 2015;103(3):348-55.

116. Volpe CMO, Villar-Delfino PH, Dos Anjos PMF, Nogueira-Machado JA. Cellular death, reactive oxygen species (ROS) and diabetic complications. *Cell death & disease*. 2018;9(2):119.

117. Wu Y, Song LT, Li JS, Zhu DW, Jiang SY, Deng JY. MicroRNA-126 Regulates Inflammatory Cytokine Secretion in Human Gingival Fibroblasts Under High Glucose via Targeting Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor 6. *J Periodontol*. 2017;88(11):e179-e87.

118. Cinelli MA, Do HT, Miley GP, Silverman RB. Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. *Medicinal research reviews*. 2020;40(1):158-89.

119. Nishikawa T, Naruse K, Kobayashi Y, Miyajima S, Mizutani M, Kikuchi T, et al. Involvement of nitrosative stress in experimental periodontitis in diabetic rats. *J Clin Periodontol.* 2012;39(4):342-9.
120. Sun S, Zhang D, Wu Y, Yan L, Liu J, Pan C, et al. The expression of inducible nitric oxide synthase in the gingiva of rats with periodontitis and diabetes mellitus. *Arch Oral Biol.* 2020;112:104652.
121. Gutiérrez-Venegas G, Maldonado-Frías S, Ontiveros-Granados A, Kawasaki-Cárdenas P. Role of p38 in nitric oxide synthase and cyclooxygenase expression, and nitric oxide and PGE2 synthesis in human gingival fibroblasts stimulated with lipopolysaccharides. *Life Sci.* 2005;77(1):60-73.
122. Hua KF, Wang SH, Dong WC, Lin CY, Ho CL, Wu TH. High glucose increases nitric oxide generation in lipopolysaccharide-activated macrophages by enhancing activity of protein kinase C- α/δ and NF- κ B. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society* [et al]. 2012;61(10):1107-16.
123. Cantuária APC, Figueiredo TM, Freire MS, Lima SMF, Almeida JA, Franco OL, et al. The effects of glucose concentrations associated with lipopolysaccharide and interferon-gamma stimulus on mediators' production of RAW 264.7 cells. *Cytokine.* 2018;107:18-25.
124. Jiang SY, Wei CC, Shang TT, Lian Q, Wu CX, Deng JY. High glucose induces inflammatory cytokine through protein kinase C-induced toll-like receptor 2 pathway in gingival fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;427(3):666-70.
125. Vo TTT, Lee CW, Chiang YC, Chen YW, Yu YH, Tuan VP, et al. Protective mechanisms of Taiwanese green propolis toward high glucose-induced inflammation via NLRP3 inflammasome signaling pathway in human gingival fibroblasts. *Journal of Periodontal Research.* 2021.
126. Barzegar A, Moosavi-Movahedi AA. Intracellular ROS Protection Efficiency and Free Radical-Scavenging Activity of Curcumin. *PLoS One.* 2011;6(10):e26012.
127. Sreejayan, Rao MN. Nitric oxide scavenging by curcuminoids. *The Journal of pharmacy and pharmacology.* 1997;49(1):105-7.
128. Guan T, Huang C, Huang Y, Li Y, Liu Y. Effects of curcumin pretreatment on cell

proliferation, oxidative stress, and Nrf2 pathways in HK-2 cells cultured in high glucose medium. INTERNATIONAL JOURNAL OF CLINICAL AND EXPERIMENTAL MEDICINE. 2018;11(12):13422-8.

129. Liu X, Zhang X, Cai X, Dong J, Chi Y, Chi Z, et al. Effects of Curcumin on High Glucose-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Renal Tubular Epithelial Cells Through the TLR4-NF- κ B Signaling Pathway. Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy. 2021;14:929.



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	กมนพร บุญยฤทธิ์
วัน เดือน ปี เกิด	30 เมษายน 2533
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2557 ทันตแพทยศาสตรบัณฑิต สาขาทันตแพทยศาสตร์ จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

