



ผลของสารสกัดหยาบขมิ้นชันต่อการแสดงออกของทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา
และอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้าของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ที่กระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์
ในสภาวะน้ำตาลสูง

EFFECTS OF CURCUMA LONGA CRUDE EXTRACT ON TNF-ALPHA AND IL-1 BETA IN
LPS-STIMULATED HUMAN GINGIVAL FIBROBLAST IN HIGH GLUCOSE CONDITION

รพีพรรณ นะภีใจ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2564

ผลของสารสกัดหยาบขมิ้นชันต่อการแสดงออกของทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา
และอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้าของเซลล์สร้างเส้นใยเหนือกมุษย์ที่กระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์
ในสภาวะน้ำตาลสูง



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาทันตกรรมคลินิก
คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2564
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

EFFECTS OF CURCUMA LONGA CRUDE EXTRACT ON TNF-ALPHA AND IL-1 BETA IN
LPS-STIMULATED HUMAN GINGIVAL FIBROBLAST IN HIGH GLUCOSE CONDITION



RAPEEPAN NAPIJAI

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

ผลของสารสกัดหยาบขมิ้นชันต่อการแสดงออกของทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา และอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้าของเซลล์สร้างเส้นใยเหนือกมมนุษย์ที่กระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ ในสภาวะน้ำตาลสูง

ของ

รพีพรรณ นะภิไจ

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาทันตกรรมคลินิก

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก ประธาน

(รองศาสตราจารย์ ดร.ณรงค์ศักดิ์ เหล่าศรีสิน)

(รองศาสตราจารย์ ดร.ดุษฎี หอมดี)

..... ที่ปรึกษาร่วม

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร.ปริมา บุญสิน)

(อาจารย์ ดร.รุ่งทิภา ศรีสุวรรณษา)

ชื่อเรื่อง	ผลของสารสกัดหยาบขมิ้นชันต่อการแสดงออกของทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา และอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้าของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ที่กระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ ในสภาวะน้ำตาลสูง
ผู้วิจัย	รพีพรรณ นะภิกิจ
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2564
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. ณรงค์ศักดิ์ เหล่าศรีสิน
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ ดร. พริมา บุรณดิน

ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์แอลฟา (TNF- α) และอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า (IL-1 β) เป็นไซโตไคน์ที่มีส่วนในการทำลายเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน กระดูกเบ้าฟัน และส่งผลต่อภาวะดื้อต่ออินซูลิน ปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับขมิ้นชัน (*Curcuma longa* หรือ Turmeric; TUR) อย่างกว้างขวาง เนื่องจากมีฤทธิ์ลดการอักเสบในโรคปริทันต์อักเสบและเบาหวาน ในการศึกษาครั้งนี้จึงต้องการศึกษาผลของสารสกัดหยาบ (Crude extract) ขมิ้นชันต่อการแสดงออกของ TNF- α และ IL-1 β ในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ (Human gingival fibroblasts; HGF) ที่กระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ (LPS) ในสภาวะน้ำตาลสูง โดยสกัดขมิ้นด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 และเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารระดับน้ำตาลปกติ (5.5 มิลลิโมลาร์; NG) หรือน้ำตาลสูง (50 มิลลิโมลาร์; HG) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นในอีก 24 ชั่วโมงต่อมา ทั้งสองกลุ่มจะมีการเติมขมิ้นชัน 15 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร LPS 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และเติมขมิ้นชันร่วมกับ LPS ร่วมด้วย ต่อมาตรวจสอบความมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT และวิเคราะห์การแสดงออกของยีนโดยวิธี qRT-PCR พบว่า สภาวะน้ำตาลสูงทำให้ความมีชีวิตของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (P-value<0.05) ในกลุ่ม HG ทั้งหมด เมื่อเทียบกับกลุ่ม NG ที่ถูกกระตุ้นในสภาวะเดียวกัน นอกจากนี้ขมิ้นชันสามารถลดการแสดงออกของยีน IL-1 β ในกลุ่ม NG+TUR และ HG+TUR เมื่อเทียบกับกลุ่ม NG และ HG อย่างมีนัยสำคัญ อาจสรุปได้ว่า ขมิ้นชันจะสามารถเพิ่มความมีชีวิตของเซลล์ให้กลับขึ้นมาได้ แม้จะมีผลในการลดระดับการแสดงออกของยีน IL-1 β ในบางสภาวะแต่ไม่ส่งผลต่อยีน TNF- α อย่างมีนัยสำคัญ

คำสำคัญ : โรคปริทันต์อักเสบ ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า สารสกัดหยาบขมิ้นชัน

Title	EFFECTS OF CURCUMA LONGA CRUDE EXTRACT ON TNF-ALPHA AND IL-1 BETA IN LPS-STIMULATED HUMAN GINGIVAL FIBROBLAST IN HIGH GLUCOSE CONDITION
Author	RAPEEPAN NAPIJAI
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2021
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Narongsak Laosrisin
Co Advisor	Dr. Prima Buranasin

Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and Interleukin-1 beta (IL-1 β) are pro-inflammatory cytokines, and commonly promote connective tissue destruction, alveolar bone resorption, and insulin resistance. Curcuma longa (Turmeric; TUR) has been extensively studied recently, with the aim of reducing inflammation in both periodontitis and diabetes. Hence, this study aims to analyze the effects of turmeric crude extract on TNF- α and IL-1 β expression in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human gingival fibroblasts (HGF) under high glucose conditions. Turmeric was extracted with 95% ethanol. HGF were cultured in normal glucose (5.5 mM; NG) or high glucose (50mM; HG) for 72 h. Then, cells were cultured for another 24 h with or without 1 μ g/ml Lipopolysaccharides (LPS) together with or without 15 μ g/ml turmeric. Subsequently, MTT assay or gene expression analysis by qRT-PCR was performed. Based on the given results, the HG condition can significantly impair cell viability in all HG groups (P-value<0.05) when compared to NG groups that have the same stimulants. In addition, turmeric significantly decreased the expression of IL-1 β in NG+TUR and HG+TUR groups when compared to NG and HG groups. In conclusion, turmeric crude extract is capable to increases cell viability. Even though its properties can decrease the expression of IL-1 β in some conditions, it does not have an effect on TNF- α .

Keyword : Periodontitis, Tumor necrosis factor-alpha, Interleukin-1 beta, Turmeric crude extract

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.ทพ.ณรงค์ศักดิ์ เหล่าศรีสิน อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก และ อ.ดร.ทพญ.พริมา บุรณสิน อาจารย์ที่ปรึกษาของ ที่ให้ความรู้และดูแลด้วยความเอาใจใส่อย่างใกล้ชิด ตั้งแต่การคิดหัวข้อปริญญานิพนธ์ ไปจนถึงการดำเนินการวิจัยให้ทุกอย่างสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี นอกจากนี้ขอขอบพระคุณอาจารย์ในภาควิชาปริทัศน์วิทยา ได้แก่ อ.ดร.ทพญ.รุ่งทิwa ศรีสุวรรณทา อ.ทพญ.จามรี เสมา และ ผศ.ดร.ทพญ.ชื่นชีวิต ทองศิริ สำหรับคำแนะนำและให้ความอนุเคราะห์ ด้านอุปกรณ์ให้แก่ผู้วิจัย

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ สำหรับคำแนะนำและแนวทางแก้ไข เพื่อให้โครงร่างวิจัยมีความสมบูรณ์มากที่สุด ขอขอบคุณคณะทันตแพทยศาสตร์ และสถาบัน ยุทธศาสตร์ทางปัญญาและวิจัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สำหรับทุนสนับสนุนการวิจัย

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.ทพ.ณัฐวุธ แก้วสุทธา คณบดีคณะทันตแพทยศาสตร์ รศ.ดร.นันทนา อรุณฤกษ์ หัวหน้าภาคโษษุวิทยา และ อ.ดร.ดวงพร ศรีสุภาพ สำหรับคำแนะนำในการวิจัย และเชื้อเพื่อสถานที่ให้เข้ามาทดลองที่ห้องปฏิบัติการเลี้ยงเซลล์ในช่วงที่มีมาตรการจำกัดการเข้าออก ของบุคลากร

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร คณบดีคณะวิทยาศาสตร์ และ จนิษฐา ชูเลิศ นิสิตปริญญาเอกคณะวิทยาศาสตร์ สำหรับคำแนะนำในการวิจัย และความเอื้อเฟื้อในการหยิบยืม อุปกรณ์เป็นกรณีพิเศษ

ขอขอบพระคุณ ศิริพงศ์ ตั้งประเสริฐกิจ (นักวิทยาศาสตร์) และ วรณี ผลสมหวัง (พนักงาน ประจำห้องปฏิบัติการ) สำหรับคำแนะนำในการวิจัย และความเอื้อเฟื้ออุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

ขอขอบพระคุณเพื่อนร่วมสาขา กมนพร บุณยฤทธิ์ และ สุทธิธร ญาณรังสี ที่ร่วมกันฝ่าฟัน อุปสรรค และเป็นกำลังใจให้กันจนปริญญานิพนธ์สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณพ่อแม่ ครูบาอาจารย์รวมทั้งทุกคนที่มีส่วนเกี่ยวข้อง ขออาราธนา คุณพระรัตนตรัยเพื่ออวยพรแก่ทุกคนไม่ว่าจะมีหรือไม่มีชื่อ ณ ที่นี้ก็ตาม

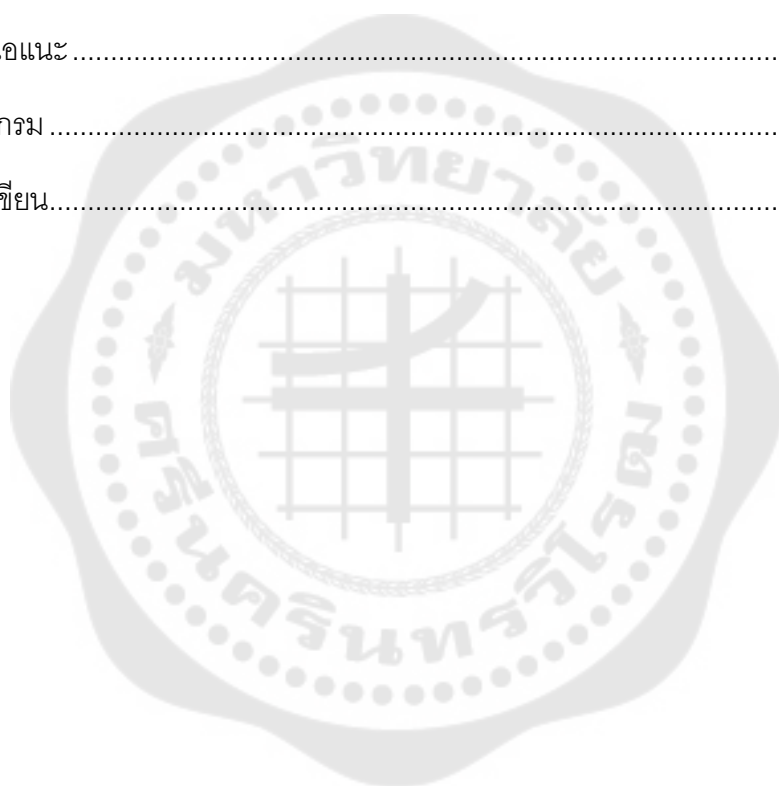
รพีพรรณ นะภิไจ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูปภาพ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	5
ความสำคัญของการวิจัย	5
ขอบเขตของการวิจัย	5
ประชากรที่ใช้ในการวิจัย.....	5
กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย.....	5
ตัวแปรที่ศึกษา	6
นิยามคำศัพท์เฉพาะ	6
กรอบแนวคิดการวิจัย	7
สมมุติฐานในการวิจัย.....	7
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	8
ขมื่นชั้น	8
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์	9
สารประกอบสำคัญ	10

ฤทธิ์ทางชีวภาพของไขมันชั้น (Biological activity)	14
โรคเบาหวาน	23
ผลของโรคเบาหวานที่ส่งผลต่อโรคปริทันต์	28
ผลของโรคปริทันต์ที่ส่งผลต่อโรคเบาหวาน	33
โรคปริทันต์อักเสบ	35
ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา	40
อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า	49
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	56
การกำหนดประชากรและการสุ่มกลุ่มตัวอย่าง	56
ประชากร	56
การเลือกกลุ่มตัวอย่าง	56
การสร้างเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	57
วิธีการหาคุณภาพเครื่องมือ	63
การวิเคราะห์การตอบสนองต่อสารสกัดหยาบไขมันชั้น (Dose-response analysis).....	63
การทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ด้วย MTT assay	64
ขั้นตอนการแยกสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมด (Total RNA) จากเซลล์	65
ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ และคุณภาพ RNA ที่สกัดได้	66
ขั้นตอนการแยกสกัดดีเอ็นเอต้นแบบ (complementary DNA: cDNA)	66
ขั้นตอนการวิเคราะห์การแสดงออกของ mRNA	67
การเก็บรวบรวมข้อมูล	68
การจัดกระทำข้อมูลและการวิเคราะห์ข้อมูล	69
บทที่ 4 ผลการดำเนินงานวิจัย	70
ส่วนที่ 1 ผลการวิเคราะห์การตอบสนองต่อสารสกัดหยาบไขมันชั้น	70

ส่วนที่ 2 ผลการวิเคราะห์ความมีชีวิตของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์	71
ส่วนที่ 3 การแสดงออกในระดับ mRNA ของยีน TNF- α โดยเทคนิค RT-PCR.....	73
ส่วนที่ 4 การแสดงออกในระดับ mRNA ของยีน IL-1 β โดยเทคนิค RT-PCR.....	75
บทที่ 5 อภิปรายผล การสรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ	77
อภิปรายผลการวิจัย	77
สรุปผลการวิจัย.....	82
ข้อเสนอแนะ	82
บรรณานุกรม	83
ประวัติผู้เขียน.....	99



สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 การจำแนกชั้นทางวิทยาศาสตร์ของไขมันชั้น ⁽³⁸⁾	8
ตาราง 2 การแปลผลระดับพลาสมากลูโคสและ HbA1C เพื่อการวินิจฉัย ^(81, 86)	27
ตาราง 3 การแบ่งกลุ่มการทดลอง	57
ตาราง 4 แสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ในการวิเคราะห์ด้วย PCR	67



สารบัญรูปภาพ

	หน้า
ภาพประกอบ 1 ลักษณะของต้น ใบ ดอก และเหง้าของขมิ้นชันที่พบในประเทศไทย ⁽⁴⁰⁾	9
ภาพประกอบ 2 โครงสร้างทางเคมีของเคอร์คิวมิน และอนุพันธ์ ⁽⁴³⁾	11
ภาพประกอบ 3 โครงสร้างทางเคมีของเคอร์คิวมิน enolic form และ β -diketonic form ⁽⁴⁵⁾	12
ภาพประกอบ 4 โครงสร้างทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย ⁽⁴⁷⁾	13
ภาพประกอบ 5 ฤทธิ์ของเคอร์คิวมินต่อการยับยั้งการรวมตัวของ NLRP3 inflammasome ในเซลล์แมคโครฟาจ ⁽⁶⁹⁾	19
ภาพประกอบ 6 บทบาทของเคอร์คิวมินต่อการยับยั้งทรานสคริปชันแฟกเตอร์ NF-kB ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย TNF- α และ IL-1 β ⁽²⁵⁾	20
ภาพประกอบ 7 แผงผังแสดงความสัมพันธ์ระหว่างโรคเบาหวานและโรคปริทันต์อักเสบ ⁽¹⁰⁵⁾	35
ภาพประกอบ 8 การทำงานของระบบไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับพยาธิกำเนิด (Pathogenesis) ของการเกิดโรคปริทันต์ ⁽³⁾	37
ภาพประกอบ 9 การตอบสนองของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อก่อโรคปริทันต์โดยมีการหลั่งไซโตไคน์และเอนไซม์ย่อยโปรตีน ⁽¹¹¹⁾	38
ภาพประกอบ 10 การเปลี่ยนแปลงของไซโตไคน์และเอนไซม์จากเหงือกปกติสู่การเกิดโรคปริทันต์ ⁽¹¹¹⁾	39
ภาพประกอบ 11 การสร้าง TNF- α จากเซลล์ต้นกำเนิด ⁽¹¹⁹⁾	42
ภาพประกอบ 12 โครงสร้างของ TNF- α ⁽¹²⁰⁾	42
ภาพประกอบ 13 การจับกับตัวรับของ TNF- α และการส่งสัญญาณผ่าน adaptor protein ⁽⁷⁰⁾ ...	44
ภาพประกอบ 14 การทำงานของตัวรับชนิด TNF type I (TNFR1) ⁽¹²²⁾	45
ภาพประกอบ 15 การทำงานของ TNF- α ที่เหนี่ยวนำให้มีการอักเสบ ผ่านการทำงานของวิถีการส่งสัญญาณ NF-kB ⁽¹²³⁾	46
ภาพประกอบ 16 การทำงานของ TNF- α ที่มีผลต่อกระบวนการสร้างเซลล์สลายกระดูก ⁽⁵⁾	48

ภาพประกอบ 17 โครงสร้างของ IL-1 β ⁽¹²⁷⁾	49
ภาพประกอบ 18 การทำงานของ NLRP3 Inflammasome ในโรคที่มีการอักเสบ ⁽¹²⁸⁾	51
ภาพประกอบ 19 การทำงานของ IL-1 α หรือ IL-1 β เมื่อจับกับตัวรับบนผิวเซลล์ ⁽⁷¹⁾	53
ภาพประกอบ 20 การทำงานของ IL-1 α หรือ IL-1 β ที่เหนี่ยวนำให้มีการอักเสบผ่านการทำงานของ NF-kB และ AP-1 ⁽⁷⁰⁾	53
ภาพประกอบ 21 บทบาทของ IL-1 β ต่อการเกิดโรคปริทันต์อักเสบ ⁽¹²⁸⁾	54
ภาพประกอบ 22 กลไกของกระบวนการสร้างเซลล์สลายกระดูก ⁽¹³⁸⁾	55
ภาพประกอบ 23 ขั้นตอนการสกัดสารสกัดหยาบไขมันชั้น	58
ภาพประกอบ 24 ผลการวิเคราะห์โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง	59
ภาพประกอบ 25 แผนภาพการเลี้ยงเซลล์เพื่อทำการทดลอง.....	63
ภาพประกอบ 26 ผลการวิเคราะห์การตอบสนองต่อสารสกัดหยาบไขมันชั้น	71
ภาพประกอบ 27 ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ในกลุ่มน้ำตาลปกติและน้ำตาลสูงในแต่ละสภาวะ	72
ภาพประกอบ 28 อัตราส่วนการแสดงออกของ TNF- α ในระดับ mRNA เทียบกับ β -actin (เท่า)	74
ภาพประกอบ 29 อัตราส่วนการแสดงออกของ IL-1 β ในระดับ mRNA เทียบกับ β -actin (เท่า)	76

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

โรคปริทันต์อักเสบ (Periodontitis) เป็นโรคติดเชื้อที่มีการอักเสบบริเวณเหงือก ซึ่งทำให้เกิดการลุกลามโดยพบการทำลายอวัยวะปริทันต์ ได้แก่ เอ็นยึดปริทันต์ (Periodontal ligament) เคลือบรากฟัน (Cementum) และกระดูกเบ้าฟัน (Alveolar bone) โดยมีสาเหตุหลักมาจากเชื้อแบคทีเรียจำเพาะที่เป็นแบคทีเรียก่อโรค (Periodontal pathogen) ที่สะสมอยู่ในคราบจุลินทรีย์บริเวณคอฟัน⁽¹⁾ ภายในเนื้อเยื่อปริทันต์ประกอบด้วยเซลล์หลากหลายชนิด โดยมีเซลล์ที่สำคัญคือ เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ (Human gingival fibroblast)⁽²⁾ ซึ่งเป็นเซลล์ที่เป็นองค์ประกอบหลักในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือก (Gingival connective tissue) อีกทั้งยังทำหน้าที่พวง ส่วนประกอบในบริเวณใกล้เคียง นอกจากนี้ยังสร้างเมทริกซ์นอกเซลล์ (Extracellular matrix: ECM) โดยเฉพาะคอลลาเจนจึงทำให้เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกเป็นเซลล์ที่มีบทบาทในการคงอยู่และการหายของแผลในเนื้อเยื่อปริทันต์ เมื่อมีการเข้ามาของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์ เช่น พอร์ไฟโรโมนัส จิงจิวาริส (*Porphyromonas gingivalis*: Pg) จะมีการปล่อยไลโปโพลีแซ็กคาไรด์ (Lipopolysaccharides: LPS) แทรกเข้ามาในอวัยวะปริทันต์และกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย จากนั้นจะเกิดการหลั่งสารสื่อการอักเสบหรือไซโตไคน์ (Cytokine)^(5,6) เช่น ทูเมอร์เนโครซิส แฟกเตอร์ แอลฟา (Tumor necrosis factor- α : TNF- α) และอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า (Interleukin: IL-1 β) นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียก่อโรคนั้นยังเข้าไปกระตุ้นให้เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเซลล์สร้างกระดูกหลั่ง TNF- α และ IL-1 β เพิ่มขึ้นจึงทำให้เกิดการสะสมของไซโตไคน์ดังกล่าวในเนื้อเยื่อปริทันต์

เมื่อ TNF- α และ IL-1 β จับกับตัวรับ (Receptor) บนผิวเซลล์จะเกิดการส่งสัญญาณให้เกิดการทำงานของนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปตาปี (Nuclear factor-kappa B: NF-kB) และแอคทีเวเตอริโปรตีน-1 (Activating protein-1: AP-1) จนทำให้เกิดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องต่อการอักเสบ เช่น เอนไซม์ไซโคลออกซีจีเนส 2 (Cyclooxygenase-2: COX-2) เอนไซม์ไลโปออกซีจีเนส (Lipoxygenase) โมเลกุลการยึดเกาะ (Cell adhesion molecule: CAM) ไซโตไคน์ คีโมไคน์ (Chemokine) และเอนไซม์ไนตริกออกไซด์ซินเทสชนิดเหนี่ยวนำ (Inducible nitric oxide synthase: iNOS) จากนั้นส่งผลให้มีการทำงานของเอนไซม์ย่อยคอลลาเจน (Collagenolytic enzymes) เช่น เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส (Matrix metalloproteinases: MMP)^(3,4) ก่อให้เกิดการอักเสบในระยะเริ่มแรกที่เรียกว่า โรคเหงือกอักเสบ (Gingivitis) นอกจากนี้เอนไซม์ข้างต้นยังมีผล

ต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของกระดูก (Bone metabolism) โดยเข้าไปกระตุ้นรีเซปเตอร์ แอคทีเวเตอร์ ออฟ เอ็นเอฟแคปป์ปายี ไลแกน (Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand: RANKL) และแมคโครฟาจ โคลนีสติมิวเลตติง แฟกเตอร์ (Macrophage colony-stimulation factor: M-CSF) ทำให้สร้างเซลล์สลายกระดูกที่สามารถทำงานได้ (Active Osteoclast) และยับยั้งการพัฒนาของเซลล์สร้างกระดูก (Osteoblast) ผ่านการยับยั้งอินซูลินไลค์โกรทแฟกเตอร์วัน (Insulin-like growth factor 1: IGF-1) และ runt-related transcription factor 2 (RUNX2)⁽⁵⁻⁷⁾ ต่อมาจึงเกิดการทำลายเนื้อเยื่อและกระดูกล้อมรอบฟันจนนำไปสู่การเกิดโรคปริทันต์อักเสบ ดังนั้น จะพบว่า TNF- α และ IL-1 β เป็นไซโตไคน์ที่มีบทบาทสำคัญต่อการดำเนินไปของโรคปริทันต์

ทั้งนี้ผู้ที่เป็โรคปริทันต์อักเสบจึงมีความจำเป็นที่จะต้องได้รับการรักษาด้วยการขูดหินน้ำลายและการเกลารากฟันร่วมกับการส่งเสริมการรักษาสุขภาพช่องปากของผู้ป่วยซึ่งถือว่าเป็นวิธีการรักษาโรคปริทันต์ขั้นแรก (Initial/Hygienic/Disease control phase)⁽⁸⁾ เพื่อยุติั้งการดำเนินโรค อีกทั้งยังช่วยเพิ่มการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์และป้องกันการกลับมาเป็นซ้ำอีกครั้ง นอกจากนี้ยังมีการแนะนำให้ผู้ป่วยใช้น้ำยาบ้วนปากคลอเฮกซิดีน กลูโคเนต (Chlorhexidine gluconate) เข้มข้นร้อยละ 0.12 เพื่อควบคุมปริมาณจุลินทรีย์ (Antiplaque action) และต้านเชื้อแบคทีเรีย (Antibacterial action) อย่างไรก็ตามน้ำยาบ้วนปากชนิดนี้ยังมีข้อเสียหลายด้าน ยกตัวอย่างเช่น การติดคราบสีที่ฟันและเนื้อเยื่อในช่องปาก การเปลี่ยนแปลงการรับรส การหลุดลอกของเยื่อช่องปากและอาจมีอาการปวดแสบปวดร้อนได้⁽⁹⁾ ทั้งนี้การรักษาเบื้องต้นนั้นอาจจะไม่สามารถกำจัดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้หมด โดยเฉพาะในตำแหน่งที่มีร่องลึกปริทันต์ลึกเนื่องจากไม่สามารถใช้เครื่องมือเข้าไปทำความสะอาดได้หมด ดังนั้นผู้ป่วยจึงควรได้รับการรักษาร่วมกับวิธีอื่น ๆ เช่น การรักษาด้วยวิธีศัลยกรรมปริทันต์ (Periodontal surgery) ร่วมกับการให้ยาปฏิชีวนะในการรักษา (Antibiotics therapy) เพื่อเสริมการขูดหินน้ำลายและเกลารากฟัน เช่น ด็อกซีไซคลิน ไฮคลาต (Doxycycline hyclate) ในขนาดต่ำเป็นเวลาอย่างน้อย 3 เดือน โดยยานี้เป็นยาที่ได้รับอนุมัติจากองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (United States Food and drug Administration) อย่างไรก็ตามการรับประทานยานั้นอาจก่อให้เกิดอาการข้างเคียงที่สำคัญ เช่น การแพ้ยา คลื่นไส้ ท้องร่วง การเกิดอีนามเอล ไฮโปเพลเซีย (Enamel hypoplasia) และภาวะเชื้อดื้อยา⁽¹⁰⁾ จากปัญหาที่กล่าวมาข้างต้นจึงได้มีการนำสมุนไพรมาศึกษาและวิจัยแทนที่การใช้ยาปฏิชีวนะเพื่ออาศัยฤทธิ์การต้านการอักเสบและฆ่าเชื้อแบคทีเรีย โดยการเลือกใช้สมุนไพรทั้งจากสารบริสุทธิ์หรือสารสกัดหยาบที่มีประสิทธิภาพสูงและให้ผลข้างเคียงต่อการรักษาต่ำเพื่อนำมารักษาโรคปริทันต์

โรคเบาหวาน (Diabetes mellitus) เป็นกลุ่มโรคที่ไม่สามารถขนส่งกลูโคสเข้าไปในเซลล์ได้ จึงทำให้กลูโคสคงอยู่ในกระแสเลือดกลายเป็นภาวะน้ำตาลในเลือดสูง ผู้ป่วยเบาหวานบางรายจะสามารถพบภาวะแทรกซ้อนในช่องปาก ได้แก่ โรคปริทันต์ ภาวะน้ำลายน้อย อัตรารฟันผุสูงขึ้น และพบเชื้อราได้ในช่องปาก⁽¹¹⁾ นอกจากนี้พบว่าการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด (Glycemic control) ของผู้ป่วยเบาหวานเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อความรุนแรงของโรคปริทันต์ โดยระดับน้ำตาลในกระแสเลือดที่สูงขึ้นมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของเชื้อแบคทีเรีย ดังเช่นพบเชื้อ *Pg* สูงในน้ำเหลืองเหงือก (Gingival crevicular fluid) จากผู้ที่ไม่สามารถควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดได้อีกทั้งยังทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวจึงส่งผลต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์ ในขณะเดียวกันยังเพิ่มการหลั่งของ **TNF- α** และ **IL-1 β** ออกมาสู่น้ำเหลืองเหงือกในปริมาณที่มากกว่าปกติเพื่อตอบสนองต่อแบคทีเรียเช่นกัน^(12, 13) นอกจากนี้ยังมีการเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน (Lipid peroxidation: LPO) ร่วมด้วยจนส่งผลให้เกิดความเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) จึงนำไปสู่การอักเสบที่มีความรุนแรงของเนื้อเยื่อปริทันต์⁽¹⁴⁾ จากผลของระดับน้ำตาลและความเครียดออกซิเดชันที่เพิ่มขึ้นจะทำให้มีการก่อตัวของผลิตภัณฑ์แอดวานซ์ ไกลเคชั่น เอ็น โปรดัคส์ (Advanced glycation end products: AGEs) ซึ่งกระตุ้นวิถีการส่งสัญญาณ NF- κ B จึงนำไปสู่การพัฒนาของโรคปริทันต์ในผู้ป่วยเบาหวานได้⁽¹⁵⁾ ในทางกลับกันหากเป็นโรคปริทันต์อักเสบอาจส่งผลต่อโรคทางระบบ (Systemic environment) โดยพบการเพิ่มขึ้นของ **TNF- α** และ **IL- β** ที่ผลิตในบริเวณเนื้อเยื่อปริทันต์เพื่อตอบสนองต่อการติดเชื้อซึ่งสารเหล่านี้จะเพิ่มการอักเสบในระดับต่ำ (Low-grade inflammation) และส่งผลให้ภาวะดื้ออินซูลินเลวร้ายลง จึงทำให้ผู้ป่วยควบคุมระดับน้ำตาลได้ยากขึ้น ส่งผลให้การรักษาโรคเบาหวานมักไม่ค่อยได้ผล^(16, 17) จะเห็นได้ว่าเมื่อมีระดับน้ำตาลที่เพิ่มขึ้นในกระแสเลือดจากการเป็นโรคเบาหวาน และพบการติดเชื้อจากแบคทีเรียในเนื้อเยื่อปริทันต์จะทำให้มีการหลั่งของ **TNF- α** และ **IL-1 β** เพิ่มขึ้นโดยไซโตไคน์ดังกล่าวจะมีบทบาทในการพัฒนาของโรคเบาหวานและโรคปริทันต์ ดังนั้นหากมีสารที่สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับน้ำตาล และระดับสารสื่อการอักเสบได้ย่อมส่งผลดีในการรักษาทั้งโรคเบาหวานและโรคปริทันต์อักเสบ

ในปัจจุบันผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรได้รับความนิยมเนื่องจากเป็นสารที่ได้จากธรรมชาติ มีผลข้างเคียงและอันตรายน้อยกว่ายาในแผนปัจจุบันที่ทำจากการสังเคราะห์ทางเคมีดังเช่น ขมิ้นชัน ซึ่งเป็นเครื่องเทศและสมุนไพรที่ใช้กันทั่วไปในประเทศไทย จีน อินเดีย และอินโดนีเซีย⁽¹⁸⁾ ในส่วนของเหง้าขมิ้นชันมีองค์ประกอบสำคัญได้แก่ สารเคอร์คิวมินอยด์ (Curcuminoid) และน้ำมันหอมระเหย (Essential oils) โดยสารเคอร์คิวมินอยด์ประกอบด้วยเคอร์คิวมิน (Curcumin) และอนุพันธ์

ของเคอร์คิวมิน⁽¹⁹⁾ ซึ่งมีขึ้นถูกใช้เป็นยาในการแพทย์อายุรเวท (Ayurvedic medicine)⁽²⁰⁾ เนื่องจากขมิ้นชันเป็นพืชที่ไม่มีพิษและมีคุณสมบัติได้หลากหลาย เช่น ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ต้านเชื้อแบคทีเรีย ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ส่งเสริมการทำงานของระบบหายใจและระบบไหลเวียนโลหิต^(21, 22) ซึ่งฤทธิ์ต้านการอักเสบเป็นฤทธิ์ที่มีความสำคัญอย่างยิ่งหากนำมาใช้ในรักษาโรคปริทันต์อักเสบ โดยมีการค้นพบว่าเคอร์คิวมินสามารถยับยั้งการผลิตของ TNF- α และ IL- β ในเซลล์โมโนไซต์ (Monocytes) และเซลล์แอลวีโอลาร์ แมคโครเฟจ (Alveolar macrophages) ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS⁽²³⁾ ต่อมาจะเกิดการยับยั้งการส่งสัญญาณของ NF-kB และ ไมโทเจน-แอคทีเวเตดโปรตีนไคเนส (Mitogen activated protein kinase pathway: MAPK) ซึ่งเป็นทรานสคริปชันแฟกเตอร์ที่มีบทบาทสำคัญในการเกิดขบวนการอักเสบ^(24, 25) อ้างอิงผลจากการศึกษาของ Xioa C-J และคณะ (2018)⁽²⁶⁾ ที่ทำการกระตุ้นเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกหนูด้วย LPS เพื่อจำลองสภาวะที่มีการอักเสบของโรคปริทันต์ จากนั้นให้เคอร์คิวมินที่ความเข้มข้น 10 และ 20 ไมโครโมลาร์พบว่าที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าวไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์ นอกจากนี้ยังลดการแสดงออกของ TNF- α และ IL- β โดยยับยั้งการส่งสัญญาณของ NF-kB อีกทั้งยังลดอัตราส่วนระหว่าง RANKL และออสทีโอโปรทีจีรีน (Osteoprotegerin: OPG) จึงลดการทำลายเส้นใยคอลลาเจนและกระดูกล้อมรอบฟัน ปัจจุบันจึงได้มีการพัฒนาสารสกัดจากเคอร์คิวมินเพื่อใช้ในการรักษาโรคปริทันต์อย่างแพร่หลาย เช่น เจล น้ำยาบ้วนปาก น้ำยาฉีดล้างใต้เหงือก (Subgingival irrigation)⁽²⁷⁾ ร่วมกับการขูดหินน้ำลายและเกลารากฟันเพื่อประสิทธิภาพในการรักษาที่ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Jain K. และคณะ (2009)⁽²⁸⁾ ซึ่งได้จำลองสภาวะเบาหวานโดยให้น้ำตาลกลูโคส 35 มิลลิโมลาร์แก่เซลล์โมโนไซต์ พร้อมกับให้เคอร์คิวมินที่ความเข้มข้น 1.75 ไมโครโมลาร์พบว่า เซลล์โมโนไซต์หลัง TNF- α IL-6 IL-8 MCP-1 และ LPO ลดลง ในระดับความเข้มข้นของเคอร์คิวมินเดียวกันนี้ยังสามารถลดระดับน้ำตาลกลูโคส และ HbA1C ในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานได้อีกด้วย จากผลการทดลองข้างต้นจึงสามารถอนุมานได้ว่าเคอร์คิวมินมีประสิทธิภาพในการลดการอักเสบและลดระดับน้ำตาลได้ จากคุณสมบัติของเคอร์คิวมินที่ได้กล่าวมาข้างต้น จึงเป็นที่มาของการศึกษานี้ที่เลือกใช้สารสกัดหยาบขมิ้นชัน (Crude extract) เนื่องจากสามารถสกัดและสังเคราะห์ง่ายแทนการใช้เคอร์คิวมินเพียงอย่างเดียว เนื่องด้วยขมิ้นชันเป็นสมุนไพรหนึ่งที่มีภายในประเทศซึ่งได้รับการบรรจุอยู่ในตำรายา และนำมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านการอักเสบเพื่อรักษาโรคปริทันต์อยู่หลายการศึกษา อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาในห้องปฏิบัติการที่นำสารสกัดหยาบจากขมิ้นชันมาใช้ทดสอบการยับยั้งการแสดงออกของ TNF- α และ IL- β ในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ของเชื้อ *Pg* ใน

สภาวะน้ำตาลสูงเพื่อจำลองการเกิดโรคปริทันต์อักเสบร่วมกับโรคเบาหวาน โดยผู้ศึกษาหวังว่าผลการศึกษาที่ได้นี้จะนำมาใช้เป็นข้อมูลเพื่อเพิ่มทางเลือกของการรักษาโรคปริทันต์อักเสบในผู้ป่วยเบาหวาน อีกทั้งยังช่วยเพิ่มมูลค่าให้สารสกัดหยาบเข้มข้นขึ้นได้

ความมุ่งหมายของการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ได้ตั้งความมุ่งหมายดังนี้

1. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดหยาบเข้มข้นต่อการแสดงออกของ TNF- α ในระดับเมสเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอ (mRNA) ในเซลล์สร้างเส้นใยเหือกมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบโดย LPS ในสภาวะน้ำตาลปกติและน้ำตาลสูง
2. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดหยาบเข้มข้นต่อการแสดงออกของ IL-1 β ในระดับ mRNA ในเซลล์สร้างเส้นใยเหือกมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบโดย LPS ในสภาวะน้ำตาลปกติและน้ำตาลสูง

ความสำคัญของการวิจัย

ผลการศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดหยาบเข้มข้นที่มีต่อการแสดงออกของ TNF- α และ IL-1 β ในระดับ mRNA จากเซลล์สร้างเส้นใยเหือกมนุษย์จะสามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลเพื่อเพิ่มแนวทางการรักษาโรคปริทันต์ในผู้ป่วยเบาหวาน อีกทั้งยังช่วยเพิ่มมูลค่าของเข้มข้นที่ถือว่าเป็นพืชสมุนไพรของไทยอีกด้วย

ขอบเขตของการวิจัย

ประชากรที่ใช้ในการวิจัย

เซลล์สร้างเส้นใยเหือกมนุษย์จากเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหือกจากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาด้วยวิธีศัลยกรรมปริทันต์ โดยฟันซี่นั้นและเนื้อเยื่อโดยรอบไม่มีการอักเสบ ไม่มีร่องลึกปริทันต์ และไม่มีรอยโรคใด ๆ ที่คลินิกหลังปริญญา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ซึ่งได้รับความยินยอมจากผู้ป่วยและผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ (SWUEC/F-314/2563)

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

ทำการสุ่มเลือกเซลล์สร้างเส้นใยที่ได้จากผู้เข้าร่วมวิจัย 3 คน โดยใช้เซลล์สร้างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงได้ในรุ่นที่ 3-6 โดยกำหนดเกณฑ์การคัดเลือกดังนี้

1. เกณฑ์การคัดเลือก (Inclusion criteria)

1.1 ผู้ที่มีอายุระหว่าง 20 ถึง 60 ปี

1.2 ไม่มีประวัติสูบบุหรี่

1.3 มีสุขภาพดี ไม่มีโรคประจำตัว ไม่อยู่ระหว่างการตั้งครรภ์หรือให้นมบุตร

2. เกณฑ์การคัดออก (Exclusion criteria)

2.1 ผู้ที่ไม่ยินยอมเข้าร่วมการวิจัย

2.2 ผู้ที่รับประทานยาที่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน การอักเสบ และการติดเชื้อ

ภายใน 1 เดือนก่อนเข้าร่วมงานวิจัย

ตัวแปรที่ศึกษา

1. ตัวแปรอิสระ ได้แก่

1.1 สารสกัดหยาบขมิ้นชัน

1.2 สภาวะน้ำตาล

2. ตัวแปรตาม ได้แก่

2.1 การแสดงออกของ TNF- α ในระดับ mRNA

2.2 การแสดงออกของ IL-1 β ในระดับ mRNA

นิยามคำศัพท์เฉพาะ

โรคปริทันต์อักเสบ (Periodontitis) หมายถึง โรคติดเชื้อที่มีสภาวะการอักเสบของอวัยวะรอบ ๆ ฟัน ที่เรียกว่า อวัยวะปริทันต์ เมื่อเกิดการทำลายอวัยวะปริทันต์มากขึ้นจะทำให้เกิดฟันโยก และนำไปสู่การสูญเสียฟัน โดยมีสาเหตุก่อโรคที่สำคัญ คือ แบคทีเรียก่อโรคปริทันต์ที่มายึดเกาะกับผิวรากฟันในลักษณะที่เป็นแผ่นคราบจุลินทรีย์ (Dental plaque)^(29, 30)

ทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา (Tumor necrosis factor α : TNF- α) หมายถึง ไซโตไคน์ที่มีบทบาทสำคัญในการต่อสู้กับเชื้อโรคโดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรียซึ่งเข้ามากระตุ้นแมคโครฟาจ (Macrophage) ให้เกิดการสร้างและหลั่ง TNF- α IL-1 β และ IL-6 มากขึ้นในขณะที่มีการอักเสบ ซึ่งเมื่อการอักเสบเสร็จสิ้นลงแล้ว TNF- α จะก่อให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis^(31, 32)

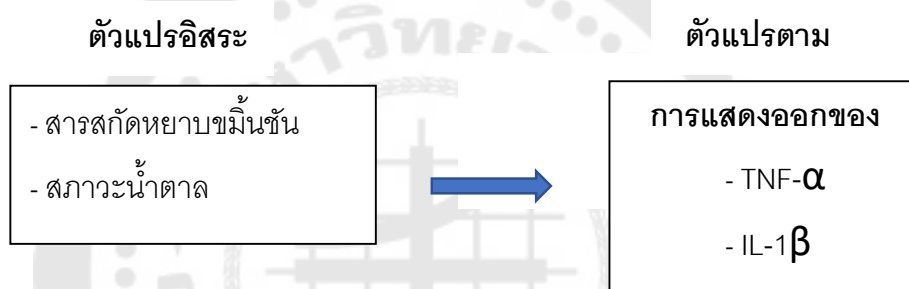
อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า (Interleukin-1 β : IL-1 β) หมายถึง ไซโตไคน์ที่มีบทบาทสำคัญในการต่อสู้กับเชื้อโรค และก่อให้เกิดการอักเสบซึ่งจะทำงานร่วมกับ TNF- α และมีเซลล์ต้นกำเนิดเหมือนกันนั่นคือเซลล์โมโนไซต์/แมคโครฟาจ^(33, 34)

สารสกัดหยาบขมิ้นชัน (Curcumin crude extract) หมายถึง สารสกัดจากขมิ้นชันที่ได้จากการสกัดหยาบด้วยตัวทำละลาย (Solvent extraction) โดยมีการแยกสารบางชนิดออกมาจากสารผสมที่เป็นของแข็งโดยใช้ตัวทำละลายสกัดออกมา ซึ่งอาศัยสมบัติของการทำละลายของสารที่

ต่างกันในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ เช่น เอทานอล (Ethanol) ซึ่งวิธีนี้เป็นการสกัดที่ง่าย มีจุดเดือดต่ำ ระเหยง่าย ไม่เป็นพิษ และราคาถูก เป็นเทคนิคที่ใช้กันมากในเคมีอินทรีย์^(35, 36)

เคอร์คิวมิน (Curcumin) หมายถึง สารโพลีฟีนอล (Polyphenolic compound) ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของสารเคอร์คิวมินอยด์ที่ได้จากขมิ้นชัน มีลักษณะเป็นผงสีเหลืองส้มที่ไม่ละลายน้ำแต่ละลายในตัวทำละลาย เช่น เอทานอล และ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethylsulfoxide: DMSO) เคอร์คิวมินเป็นองค์ประกอบที่ถูกนำมาใช้มากที่สุด และได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีฤทธิ์ทางชีวภาพ และเภสัชวิทยาในวงกว้างซึ่งรวมถึงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบและต้านเชื้อแบคทีเรีย เป็นต้น⁽³⁷⁾

กรอบแนวคิดการวิจัย



สมมุติฐานในการวิจัย

สมมุติฐานที่ 1

H₀: กลุ่มที่เลี้ยงเซลล์ด้วยขมิ้นชันพบการแสดงออกของ TNF- α ในระดับ mRNA ของเซลล์สร้างเส้นใยเหนือกมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบโดย LPS ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ได้รับการเลี้ยงเซลล์ด้วยขมิ้นชันอย่างมีนัยสำคัญ

H₁: กลุ่มที่เลี้ยงเซลล์ด้วยขมิ้นชันพบการแสดงออกของ TNF- α ในระดับ mRNA ของเซลล์สร้างเส้นใยเหนือกมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบโดย LPS แตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ได้รับการเลี้ยงเซลล์ด้วยขมิ้นชันอย่างมีนัยสำคัญ

สมมุติฐานที่ 2

H₀: กลุ่มที่เลี้ยงเซลล์ด้วยขมิ้นชันพบการแสดงออกของ IL-1 β ในระดับ mRNA ของเซลล์สร้างเส้นใยเหนือกมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบโดย LPS ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ได้รับการเลี้ยงเซลล์ด้วยขมิ้นชันอย่างมีนัยสำคัญ

H₁: กลุ่มที่เลี้ยงเซลล์ด้วยขมิ้นชันพบการแสดงออกของ IL-1 β ในระดับ mRNA ของเซลล์สร้างเส้นใยเหนือกมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบโดย LPS แตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ได้รับการเลี้ยงเซลล์ด้วยขมิ้นชันอย่างมีนัยสำคัญ

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และได้เสนอตามหัวข้อต่อไปนี้

1. ขมิ้นชัน (Turmeric)
2. โรคเบาหวาน (Diabetes mellitus)
3. โรคปริทันต์อักเสบ (Periodontitis)
4. ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา (Tumor necrosis factor-alpha: TNF- α)
5. อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า (Interleukin-1 beta: IL-1 β)

ขมิ้นชัน

ขมิ้นชัน (Turmeric) หรือที่รู้จักกันในชื่อของขมิ้น (ทั่วไป) ขมิ้นแกง ขมิ้นหยวก ขมิ้นหัว ขี้ขมิ้น สะยอ และหมิ้น⁽²²⁾ โดยมีการจำแนกชั้นทางวิทยาศาสตร์ตามตารางที่ 1⁽³⁸⁾ ขมิ้นชันเป็นหนึ่งในสมุนไพรที่ได้รับความนิยมมากที่สุดโดยได้รับการจัดอันดับให้เป็น 1 ใน 10 ของสมุนไพรที่นำมาใช้ในทางการแพทย์และเครื่องสำอางของประเทศไทย⁽³⁹⁾ นอกจากนี้ยังพบการนำขมิ้นชันมาใช้ประโยชน์โดยนำมาเป็นเครื่องเทศ สารแต่งสีในอาหารและยาสามัญประจำบ้าน ปัจจุบันยังนำขมิ้นชันมาใช้อย่างกว้างขวางในอาหารเสริม สารแต่งสีในยา และเป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอาง⁽¹⁹⁾

ตาราง 1 การจำแนกชั้นทางวิทยาศาสตร์ของขมิ้นชัน⁽³⁸⁾

ลำดับชั้น	การจำแนกตามหมวดหมู่ทางอนุกรมวิธาน
ชื่อสามัญภาษาไทย	ขมิ้นชัน
ชื่อสามัญภาษาอังกฤษ	Turmeric
ชื่อวิทยาศาสตร์	Curcuma longa Linn.
ชั้น (Class)	Liliopsida
ชั้นย่อย (Subclass)	Commelinids
อันดับ (Order)	Zingiberales
วงศ์ (Family)	Zingiberaceas
สกุล (Genus)	Curcuma
ชนิด (Species)	Curcuma longa

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ต้น ขมิ้นชันเป็นพืชล้มลุก มีเหง้าใต้ดิน (Rhizome) ในเหง้ามีเนื้อขมิ้นชันที่มีสีเหลือง ส้มถึงแสดจัด มีรสฝาดหวาน และมีกลิ่นหอมเฉพาะตัว

ใบ โคนก้านใบเรียงเป็นวงรอบลำต้นติดกับผิวดิน ใบรูปรียาว ยาว 30-40 เซนติเมตร ปลายแหลมยาว 8-10 เซนติเมตร ก้านใบยาว 8-15 เซนติเมตร

ดอก เป็นช่อดอก (Inflorescence) ก้านช่อดอกยาว 5-8 เซนติเมตรซึ่งแทงออกมาจากเหง้า กลีบดอกสีขาวอมเหลือง ใบประดับเป็นรูปหอกเรียงซ้อนกันมีสีเขียวอ่อนหรือขาวอมชมพู ใบประดับ 1 ใบมี 2 ดอก ใบประดับย่อยรูปขอบขนานยาว 3-3.5 เซนติเมตร ด้านนอกมีขน เกสรตัวผู้มีลักษณะคล้ายกับกลีบดอกแต่มีขน เกสรตัวเมียมียอดเป็นรูปปากแตรเกลี้ยง รังไข่มี 3 ช่อง ๆ ละ 2 ไข่อ่อน

ผล มี 3 พู แต่ละพูมี 2 เมล็ด⁽²²⁾



ภาพประกอบ 1 ลักษณะของต้น ใบ ดอก และเหง้าของขมิ้นชันที่พบในประเทศไทย⁽⁴⁰⁾

ถิ่นกำเนิดและการกระจายพันธุ์

พืชในสกุล Curcuma มีอยู่ประมาณ 40-50 ชนิด เป็นพืชพื้นเมืองในอินเดีย อินโดนีเซีย ใต้หวัน และไทย รวมทั้งในพื้นที่แถบมหาสมุทรแปซิฟิกและตอนเหนือของออสเตรเลีย ในตอนล่างของภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มีพืชสกุลนี้อยู่ประมาณ 20 ชนิด อีกทั้งยังพบการนำไปปลูกในพื้นที่อื่น ๆ ในเขตร้อนและเขตกึ่งร้อน โดยมีศูนย์กลางของความหลากหลายทางพันธุกรรมอยู่ในประเทศอินเดีย และมีประวัติยาวนานในการนำมาใช้เป็นสมุนไพร และเครื่องเทศ⁽⁴¹⁾

การขยายพันธุ์ การปลูก และการเก็บเกี่ยว

พืชในสกุล *Curcuma* ขยายพันธุ์โดยการแยกเหง้าหลักหรือแขนงเหง้า ขมิ้นชันสามารถปลูกได้ทุกภูมิภาคของประเทศไทย เหง้าของขมิ้นชันสามารถทนต่อดินที่มีความชื้นสูงได้ดี และสามารถปลูกโดยใช้ปริมาณเหง้าในอัตราที่ต่ำ ขมิ้นชันจะเจริญเติบโตได้รวดเร็วในช่วงฤดูฝน ตั้งแต่พฤษภาคม-กรกฎาคม เมื่อเข้าสู่ฤดูหนาวและร้อนจะทิ้งใบ แต่ยังคงมีเหง้าอยู่ใต้ดิน พอถึงฤดูฝนจะงอกใบใหม่และเติบโตอีกครั้ง ขมิ้นชันที่ปลูกโดยใช้เหง้าหลักทั้งหัวสามารถเก็บเกี่ยวได้ภายใน 8-12 เดือนหลังการปลูก แต่ถ้าปลูกโดยการแยกเหง้าจะเก็บเกี่ยวหลังปลูกใน 2 ปี ฤดูเก็บเกี่ยวหลักจะเริ่มตั้งแต่ธันวาคมขยายไปจนถึงกุมภาพันธ์⁽⁴²⁾

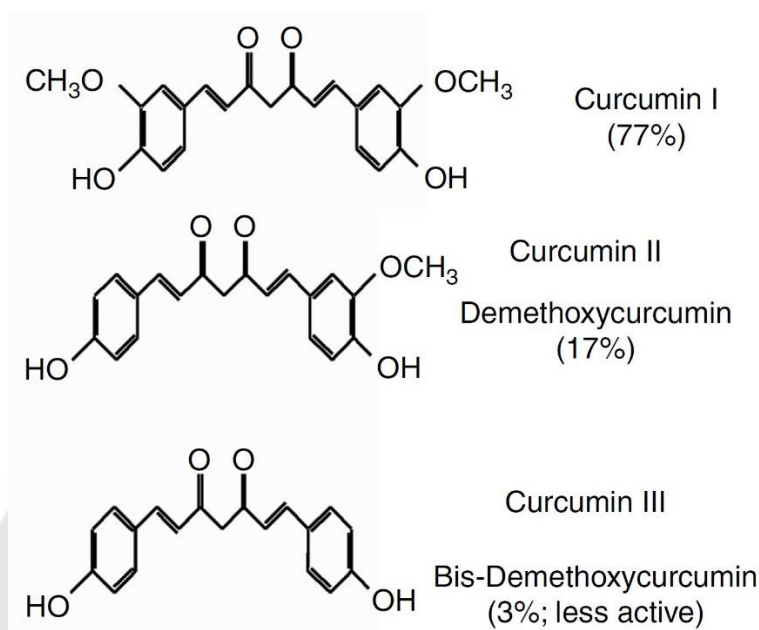
สารประกอบสำคัญ

เหง้าของขมิ้นชันประกอบด้วย โปรตีน ไขมัน แร่ธาตุ คาร์โบไฮเดรต และน้ำเท่ากับ ร้อยละ 6.3 5.1 3.5 69.4 และ 13.1 ตามลำดับ⁽³⁸⁾ หากแบ่งตามสารประกอบสำคัญในขมิ้นชันจะแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

1. สารเคอร์คิวมินอยด์ (Curcuminoid) พบได้ร้อยละ 3-5 ของขมิ้นชันซึ่งประกอบด้วย เคอร์คิวมิน (Curcumin) และอนุพันธ์ของสารได้แก่ ดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน (Demethoxycurcumin หรือ curcumin II) บิสดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน (Bisdemethoxycurcumin หรือ curcumin III) เท่ากับร้อยละ 77 17 และ 3 ตามลำดับ โดยล่าสุดพบอนุพันธ์ชนิดใหม่คือ ไฮโคลเคอร์คิวมิน (Cyclocurcimin)^(37, 43)

เคอร์คิวมินถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1815 โดย Vogel และ Pellatier (2017)⁽⁴⁴⁾ มีสูตรโครงสร้างทางเคมีคือ $C_{21}H_{20}O_6$ ดังในภาพประกอบที่ 2 จากนั้นในปี ค.ศ. 1910 Lampe⁽⁴³⁾ ได้กำหนดชื่อทางเคมีคือ Diferuloylmethane หรือ 1,6-heptadiene-3,5-dione-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-(1E,6E) เคอร์คิวมินเป็นสารโพลีฟีนอล มีลักษณะเป็น crystalline powder ซึ่งเป็นผงสีเหลืองส้มที่ไม่ละลายน้ำแต่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ (Organic solvent) ได้แก่ เอทานอล เมทานอล (Methanol) เอทิลอะซิเตท (Ethyl acetate) อะซิโตน (Acetone) และ DMSO จึงนำคุณสมบัติดังกล่าวนี้มาใช้ในการสกัดสารจากขมิ้นชันโดยอาศัยตัวทำละลาย (Solvent extraction) ซึ่งตัวทำละลายต้องแยกออกจากสารที่ต้องการสกัดได้ง่าย มีจุดเดือดต่ำ ระเหยง่าย ไม่เป็นพิษ และราคาถูก โดยจะทำการแช่หรือต้มในตัวทำละลายก่อนในช่วงระยะเวลาหนึ่ง จากนั้นกรองเอาส่วนของแข็งออก และนำสารละลายที่ได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกจึงเกิดเป็นสารสกัดหยาบซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่นิยมสกัดสารผสมที่มาจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ⁽³⁵⁾ จากการศึกษาของ Yadav K. และคณะ (2017)⁽³⁶⁾ ได้ทดสอบประสิทธิภาพของตัวทำละลายที่

ต่างกันพบว่า เมื่อนำขมิ้นชันมาละลายในเอทานอลจะให้ปริมาณของสารสกัดขมิ้นชัน (% yield) มากที่สุดหากเทียบกับเอทิลอะซิเตทและอะซิโตน แต่ถ้าเทียบกับค่าความบริสุทธิ์ที่ได้จากทั้ง 3 ตัวทำละลายพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน

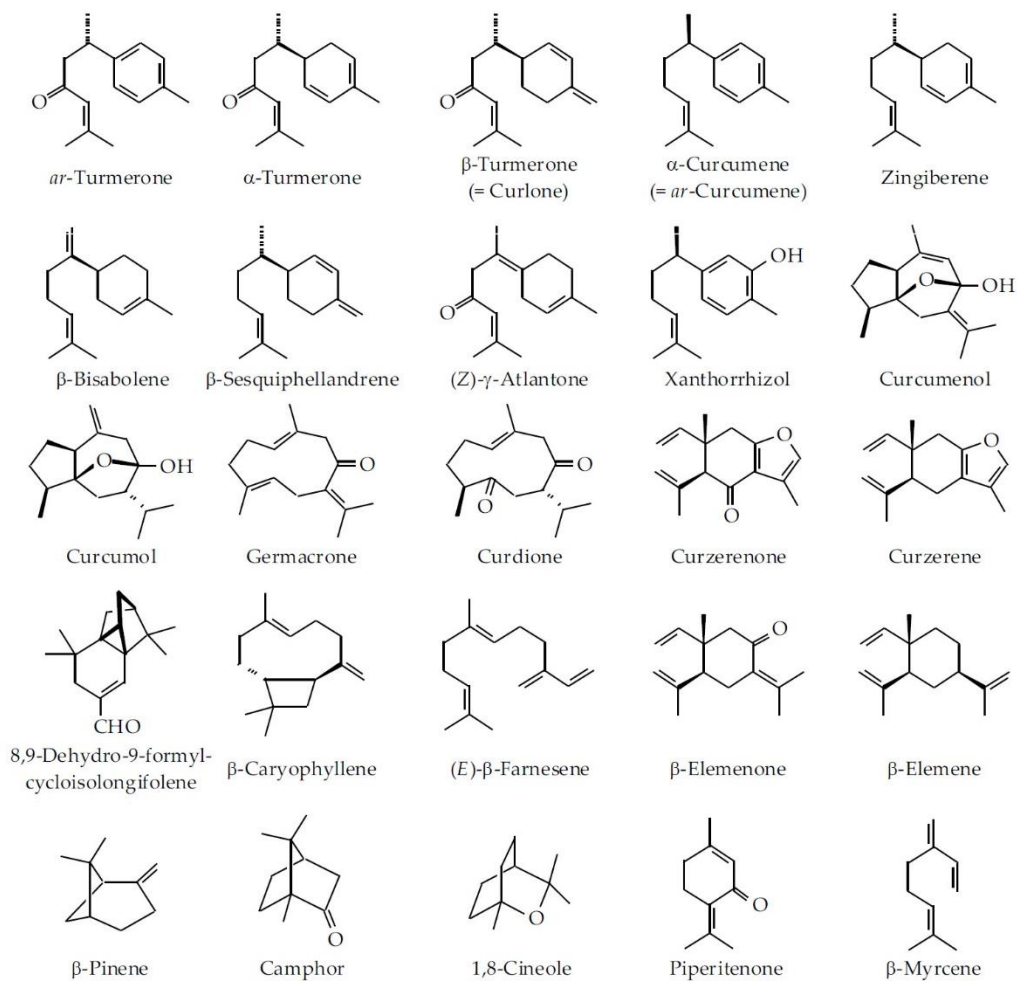


ภาพประกอบ 2 โครงสร้างทางเคมีของเคอร์คิวมิน และอนุพันธ์⁽⁴³⁾

เคอร์คิวมินเป็นองค์ประกอบที่ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายและได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมา เนื่องจากมีฤทธิ์ทางชีวภาพและเภสัชวิทยาในวงกว้างซึ่งรวมถึงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านเชื้อรา เชื้อไวรัสและต้านการแข็งตัวของเลือด ฯลฯ⁽³⁷⁾ เคอร์คิวมินมีปริมาณร้อยละ 2-8 ของขมิ้นชันทั้งหมด มีน้ำหนักโมเลกุล 368.37 และมีจุดหลอมเหลว 183 องศาเซลเซียส ส่วนดีเมทอกซีเคอร์คิวมินและบิสดีเมทอกซีเคอร์คิวมินมีน้ำหนักโมเลกุล 338 308 ตามลำดับ เมื่อเคอร์คิวมินมีค่า pH 2.5-7 จะให้สีเหลือง หากค่า pH มากกว่า 7 จะให้สีแดง ลักษณะทางเคมีของเคอร์คิวมินอยู่ใน 2 รูป ได้แก่ enolic form และ β -diketonic form โดยในสารละลายเคอร์คิวมินจะพบรูปของ enolic form ซึ่งทำให้เคอร์คิวมินมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ^(23, 45)

เทส (Superoxide dismutase: SOD) ในตับ อีกทั้งยังมีฤทธิ์ลดการอักเสบทั้งในแบบเฉียบพลัน และเรื้อรังที่ได้จากผลการทดสอบซึ่งเหนี่ยวนำให้หุ้มเท้าของหนูบวมด้วยสารเดกซ์แทรน (Dextran-induced oedema) และฟอร์มาลีน (Formalin-induced oedema) ตามลำดับ

นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำมันหอมระเหยขมิ้นชันยังมีฤทธิ์ต้านเชื้อราในกลุ่มเดอร์มาโตไฟท์ (Dermatophyte) ที่ก่อให้เกิดโรคกลาก (Dermatophytosis)⁽⁵¹⁾ และมีสรรพคุณในการรักษาโรคทางระบบทางเดินหายใจ ซึ่งช่วยขับเสมหะ ลดอาการไอ พร้อมกับช่วยป้องกันโรคหอบหืด⁽⁵²⁾ อีกทั้งเมื่อนำน้ำมันหอมระเหยรวมกับเคอร์คิวมินอยด์พบว่า มีฤทธิ์ช่วยลดอาการแสบร้อนในช่องปาก (Burning sensation) และลดความเจ็บปวดได้ในกลุ่มรอยโรคความผิดปกติที่เสี่ยงต่อมะเร็งในช่องปาก (Precancerous lesion)⁽²⁷⁾ เช่น ลิวโคเพลเคีย (Leukoplakia) ซับมิวคัสไฟโบรซิสในช่องปาก (Oral submucous fibrosis) และไลเคนแพลนัส (Lichen planus)



ภาพประกอบ 4 โครงสร้างทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย⁽⁴⁷⁾

จากการศึกษาของวีระยุทธ โพธิ์ฐิติรัตน์ และวันดี กฤษณพันธ์ (2006)⁽⁵³⁾ ซึ่งได้สุ่มตัวอย่างของขมิ้นชันจาก 13 แหล่งทั้งภาคเหนือ ตะวันออกเฉียงเหนือ กลาง และใต้ในช่วงเดือนมกราคม พ.ศ.2545 พบว่าขมิ้นชันที่ปลูกในภาคเหนือจะมีปริมาณน้ำมันหอมระเหยมากกว่าแหล่งที่ปลูกในภาคใต้ ขณะที่ปริมาณของเคอร์คิวมินอยด์ทางภาคใต้จะมีปริมาณมากกว่า จากการนำขมิ้นชันในแต่ละภาคมาทดสอบพบว่า ค่าเฉลี่ยของน้ำมันหอมระเหยเท่ากับร้อยละ 7.77 ± 1.20 โดยมวล และค่าเฉลี่ยของปริมาณเคอร์คิวมินอยด์เท่ากับร้อยละ 6.24 ± 1.95 ขณะที่ค่าเฉลี่ยของน้ำมันหอมระเหยและปริมาณเคอร์คิวมินอยด์ตามมาตรฐานองค์การอนามัยโลกได้กำหนดไว้ที่ร้อยละ 4 และ ร้อยละ 3 ตามลำดับ

ประโยชน์ของขมิ้นชันตามตำรายาไทยโบราณ

ในตำรายาไทยโบราณได้มีการนำเหง้าขมิ้นมาเพื่อใช้เป็นยาภายในโดยช่วยให้เจริญอาหาร แก้อาการวิงเวียน แก่หวัด แก้อาการชัก ลดไข้ ขับปัสสาวะ รักษาอาการท้องมาน แก่เสมหะ โลหิตเป็นพิษ โลหิตออกทางทวาร แก่ตกลือด แก้อาการตาบวม ต้านวัณโรคและป้องกันโรคหนองใน นอกจากนี้ยังนำเหง้าขมิ้นมาใช้เป็นยาภายนอกซึ่งช่วยลดอาการฟกช้ำบวม สมานแผลสดและแผลถลอก ผสมยานวดคลายเส้นเพื่อแก้เคล็ดขัดยอก แก่น้ำกัดเท้า แก่ชันนะตุและแก้กลากเกลื้อน ใบขมิ้นนำมาปรุงใช้เป็นยาภายในเพื่อบำรุงโลหิต เจริญอาหาร แก่ริดสีดวงทวาร รักษา มะเร็ง แก่ไข้ซาง แก่อุจจาระเป็นมูกเลือด แก่ท้องเดิน ปวดมวนท้อง ธาตุพิการ แก่ไข้ ถอนพิษ แก่เลือดเสีย แก่อาเจียนเป็นเลือด ผสมยาแก้โรคกระเพาะลำไส้ และรักษาริดสีดวงลำไส้ อีกทั้งยังนำใบขมิ้นมาใช้เป็นยาภายนอก โดยนำมารักษาอาการผม่ว้ง รังแค เหา บำรุงผิว และรักษาผิวหนังผื่นคัน⁽²²⁾

ฤทธิ์ทางชีวภาพของขมิ้นชัน (Biological activity)

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

เคอร์คิวมินและอนุพันธ์สามารถป้องกันการเกิดออกซิเดชัน (Oxidation) ของฮีโมโกลบินที่เกิดจากการเหนี่ยวนำของไนไตรต์ (Nitrite) โดยใช้เคอร์คิวมินที่มีความเข้มข้นต่ำสุดเพียง 0.8 ไมโครโมลาร์⁽⁵⁴⁾ นอกจากนี้เคอร์คิวมินยังสามารถยับยั้งปฏิกิริยา LPO ซึ่งมีบทบาทหลักในการเกิดการอักเสบ เกิดโรคหัวใจและมะเร็ง เนื่องจากเคอร์คิวมินเข้าไปควบคุมเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น คอะตาเลส (Catalase: CAT) กลูตาไทโอน เปอร์ออกซิเดส (Glutathione peroxidase: GPx) และ SOD ให้มีปริมาณเพิ่มขึ้น อีกทั้งยังสามารถยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระ เช่น ซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน (Superoxide anions) และไฮดรอกซิล แรดิคัล (Hydroxyl radicals)^(55, 56)

เมื่อมีภาวะน้ำตาลในเลือดสูงทำให้มีการเกิดปฏิกิริยาออกโทซิเดชัน (Autoxidation) ของกลูโคส การเกิดไกลเคชัน (Glycation) ของโปรตีน และทำให้มีการทำงานของ วิถีโพลอล (Polyol metabolism) ซึ่งเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสให้เป็นฟรุกโตส การเปลี่ยนแปลง ดังกล่าวจะเร่งการสร้างอนุมูลอิสระในกลุ่ม ROS ในไมโทคอนเดรีย เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide: H_2O_2) และ Superoxide anions จึงทำให้เกิดความเครียดออกซิเดชันและ เพิ่มการปรับเปลี่ยนทางเคมีออกซิเดชัน (Oxidative chemical modification) ของไขมัน ดีเอ็นเอ (DNA) และโปรตีนในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ส่งผลให้มีการเพิ่มขึ้นของกรดไขมันอิสระ (Free fatty acids: FFA) ระดับโฮโมซิสเตอีนในเลือด (Hyperhomocysteinemia) ภาวะนี้ต่ออินซูลินและความดันโลหิตในหลอดเลือดซึ่งสิ่งเหล่านี้จะเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะแทรกซ้อนในเบาหวานได้^(57, 58) เมื่อได้รับเคอร์คิวมินจะยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระในกลุ่ม ROS โดยจะเข้าไปรบกวนการเข้าของ แคลเซียม และการทำงานของโปรตีนไคเนสซี (Protein kinase C: PKC) นอกจากนี้เคอร์คิวมินจะ ปรับระดับของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระทั้ง SOD และ CAT อีกทั้งยังปรับระดับของวิตามินซี (Vitamin C) วิตามินอี (Vitamin E) และ LPO ให้อยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกับระดับปกติ พร้อมทั้งลดระดับของน้ำตาลในเลือด⁽⁵⁹⁾

ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

ฤทธิ์ของเคอร์คิวมินต่อเชื้อแบคทีเรียที่พบช่องปากโดยมีรายงานว่า เคอร์คิวมิน สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซอร์เทสเอ (Sortes A) ซึ่งทำหน้าที่ยึดติดโปรตีน Pac กับผนังเซลล์ด้วยพันธะโควาเลนต์ของสเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์ (*Streptococcus mutans: S.mutans*) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคฟันผุ (Cariogenic bacteria) จึงส่งผลให้การก่อตัวของไบโอฟิล์มจากเชื้อดังกล่าวลดลง⁽⁶⁰⁾ สำหรับแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคปริทันต์พบว่า เคอร์คิวมิน สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Pg* ฟรีโวลลลา อินเตอมีเดีย (*Prevotella Intermedia: Pi*) ฟิวไซแบคทีเรียม นิวคลีเอตัม (*Fusobacterium nucleatum: Fn*) และทรีโพนีมา เดนทิกอล่า (*Treponema denticola : Td*) ในลักษณะที่สัมพันธ์กับความเข้มข้นของเคอร์คิวมิน โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดเคอร์คิวมินในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (Minimal Inhibitory Concentration: MIC) เช่น Type I และ II FimA ของเชื้อ *Pg* มีค่า 10-15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกับเชื้อ *Pi Fn* และ *Td* ที่พบว่าค่า MIC < 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของเคอร์คิวมิน นั้นสามารถยับยั้งเชื้อเหล่านี้ได้สมบูรณ์ แต่ในเชื้อแอกกริเกทิแบกเทอร์ แอกทิโนไมซีเทมคอมมิแทนส์ (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans: Aa*) พบว่าต้องมีค่า MIC > 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรถึงจะสามารถยับยั้งได้ ในกรณีของเชื้อ *Pg* พบว่าเคอร์คิวมินสามารถยับยั้งอาร์จีเนน จิงจี

เพน (Arginine-specific cysteine proteinase: Arg-gingipain) และไลซีน ิจิงิเพน (Lysine-specific cysteine proteinase: Lys-gingipain) ซึ่งเป็นปัจจัยที่ก่อให้เกิดความรุนแรง (Virulence factor) สำคัญที่ก่อให้เกิดโรคปริทันต์ นอกจากนี้ยังยับยั้งการก่อตัวของไบโอฟิล์มของ Type II Fim A จากเชื้อ *Pg* อย่างเดียวและจากการก่อตัวรวมกับเชื้อสเตรปโตค็อกคัส กอร์โดเนีย (*Streptococcus gordonii*: Sg) ในลักษณะสัมพันธ์กับความเข้มข้นของเคอร์คิวมิน⁽⁶¹⁾

จากการศึกษาของ Sukumaran SK. และคณะ (2020)⁽⁶²⁾ ซึ่งได้ทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของเชื้อ *S.mutans* และ *E.faecalis* ระหว่างเคอร์คิวมินและคลอเฮกซิดีนพบว่าค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ที่ร้อยละ 50 (MIC₅₀) ของเคอร์คิวมินเท่ากับร้อยละ 0.003 (30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และคลอเฮกซิดีนเท่ากับร้อยละ 0.1 หากทั้งสองมีความเข้มข้นมากขึ้นจะมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้มากขึ้นเช่นกัน ซึ่งค่า MIC₅₀ ของเคอร์คิวมินมีค่าต่ำกว่าคลอเฮกซิดีนแสดงให้เห็นว่าเคอร์คิวมินมีคุณสมบัติในการต้านแบคทีเรียมากกว่าคลอเฮกซิดีน จากนั้นนำความเข้มข้นดังกล่าวไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกที่ได้มาจากเซลล์ต้นกำเนิดของเนื้อเยื่อในโพรงประสาทฟันของมนุษย์ (Human dental pulp stem cells) ในช่วงเวลา 1-10 นาที พบว่าเคอร์คิวมินมีพิษต่อเซลล์น้อยกว่าคลอเฮกซิดีน กล่าวคือเคอร์คิวมินพบร้อยละความมีชีวิตรอดของเซลล์ (% Cell viability) อยู่ในช่วงร้อยละ 68.6-99.04 แต่คลอเฮกซิดีนมีค่าร้อยละ 38.85-48.75 เนื่องจากพบว่าคลอเฮกซิดีนส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์โดยทำให้เกิดการหดตัวของเซลล์ จากนั้นจะทำให้เซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis นอกจากนี้เคอร์คิวมินยังทำให้เกิดการเคลื่อนที่ (Cell migration) และการเพิ่มจำนวน (Cell proliferation) ของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกได้มากกว่าคลอเฮกซิดีนทั้งในช่วงเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมงจึงส่งเสริมให้มีการหายของแผลที่เร็วขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และการควบคุมระบบภูมิคุ้มกันจากเคอร์คิวมิน

ฤทธิ์ต้านการอักเสบ

เนื่องจากมีการศึกษาจำนวนมากที่รายงานว่าขมิ้นชันเป็นสารที่มีศักยภาพในการต้านการอักเสบ ซึ่งตัวอย่างการศึกษาการอักเสบมี 2 ประเภท คือ การอักเสบเฉียบพลัน (Model of acute inflammation) เช่น ทดสอบการยับยั้งอาการบวม (Edema) ที่อุ้งเท้าของหนู และการอักเสบเรื้อรัง (Model of chronic inflammation) เช่น ทดสอบในบริเวณที่มีการเกิด granuloma ในช่วงระยะเวลาหนึ่งซึ่งจะบ่งบอกถึงระยะการเจริญ (Proliferation phase) ของการอักเสบได้⁽⁵⁶⁾

จากการศึกษาของ Srimal และ Dhawan (1973)⁽⁶³⁾ ซึ่งศึกษาฤทธิ์การต้านการอักเสบแบบเฉียบพลัน และเรื้อรังของเคอร์คิวมินเปรียบเทียบกับฟีนิลบิวทาโซน

(Phenylbutazone) ซึ่งเป็นยาที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ แก้ปวด (Analgesic activity) และลดไข้ (Antipyretic activity) ในกลุ่มหนูขาว (Rat) หนูถีบจักร (Mice) และแมว พบว่าเคอร์คิวมินมีฤทธิ์เทียบเท่ากับ Phenylbutazone ในการทดสอบที่เหนียวนำไปหุ้มเท้าบวมด้วยสารคาราจีแนน (Carrageenan-induced oedema) แต่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบแบบเรื้อรังเพียงครั้งหนึ่ง และมีค่าความเป็นพิษเฉียบพลัน (Acute toxicity) น้อยกว่า Phenylbutazone นอกจากนี้ยังพบว่าเคอร์คิวมินมีค่าดัชนีแผลในกระเพาะอาหาร (Ulcerogenic index) น้อย อีกทั้งไม่ก่อให้เกิดภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ (Leukopenia) และไม่เกิดการลดจำนวนลิมโฟไซต์ (Lymphocytopenia) เช่นเดียวกับ Phenylbutazone ดังนั้นจึงเป็นสมุนไพรที่มีความปลอดภัย นอกจากนี้เคอร์คิวมินทำให้ระดับของเอนไซม์กลูตามิก ออกซาโลอะซิติก ทรานอะมิเนสในกระแสเลือด (Serum glutamic oxaloacetic transaminase: SGOT) และเอนไซม์กลูตามิก ไพรูวิก แทรนส์อะมิเนสในกระแสเลือด (Serum glutamic pyruvic transaminase: SGPT) ที่สูงขึ้นเมื่อมีการอักเสบกลับเข้าสู่ระดับปกติ อีกทั้งเคอร์คิวมินยังไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์เอทีพีเอส (ATPase) ในตับ ไม่มีฤทธิ์แก้ปวด และลดไข้ในระหว่างที่มีการอักเสบ

สารเคอร์คิวมินจากขมิ้นชันทำปฏิกิริยากับโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบได้หลากหลายจึงสามารถเข้าไปควบคุมการตอบสนองต่อการอักเสบได้ เช่น ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ COX-2 LOX และ iNOS เนื่องจากมีการยับยั้งการผลิตไซโตไคน์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบชนิด TNF- α IL-1 IL-2 IL-6 IL-8 และ IL-12 นอกจากนี้ยังยับยั้งการผลิตโมโนไซต์ คีโมแทกซิส โปรตีน (Monocyte chemoattractant protein: MCP) และไมเกรซิน อินฮิบิทอรี โปรตีน (Migration inhibitory protein: MIP)^(21, 23) โดยสอดคล้องกับการศึกษาของ Yoshiaki Abe และคณะ (1999)⁽⁶⁴⁾ ซึ่งพบว่าเคอร์คิวมินยับยั้งการผลิตของ IL-8 MIP-1a MCP-1 IL-1 β และ TNF- α ในเซลล์โมโนไซต์และเซลล์แอลวีโอลา แมคโครเฟจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS โดยสัมพันธ์กับความเข้มข้นและระยะเวลาที่ได้รับเคอร์คิวมิน

ฤทธิ์ของเคอร์คิวมินต่อการทำงานของนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย TNF- α และ IL-1 β

นิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบี (NF-kB) เป็นทรานสคริปชันแฟกเตอร์ที่มีบทบาทสำคัญในการเกิดขบวนการอักเสบ การเพิ่มจำนวนเซลล์ (Cell proliferation) การเปลี่ยนแปลงพันธุกรรม (Transformation) การเกิดเนื้องอก (Tumorigenesis) และการรอดชีวิตของเซลล์ (Cell survival) NF-kB ประกอบด้วยส่วนของ Rel homology domain ซึ่งมีหน้าที่จับกับ DNA จากนั้นจึงทำให้เกิดการถอดรหัส (Transcription) ของยีนต่อไป โดยปกติแล้ว NF-kB จับกับ I κ B α ซึ่งจะ

ยับยั้งไม่ให้ NF- κ B สามารถทำงานได้ แต่ถ้าหากว่ามีการจับกันของไซโตไคน์และตัวรับ หรือ ตัวกระตุ้นจากภายนอก ได้แก่ รังสีอัลตราไวโอเล็ต (Ultraviolet radiation) รังสีแกมมาไอออน (ionizing radiation) เชื้อไวรัส LPS จากเชื้อแบคทีเรีย และ ROS⁽⁶⁵⁾ จะทำให้เกิดการสร้าง IKK kinase หรือ IKK complex ที่จะเหนี่ยวนำให้มีเกิดการเติมหมู่ฟอสเฟต (Phosphorylation) และ เติมนิวคลีโอไทด์ยูบิควิติน (Ubiquitination) ของ I κ B α ที่โปรตีโอะโซม (Proteasome) ทำให้มีการปล่อย NF- κ B เป็นอิสระจากนั้นเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสซึ่งทำให้เกิดการถอดรหัสของยีนตามมา⁽⁶⁶⁾

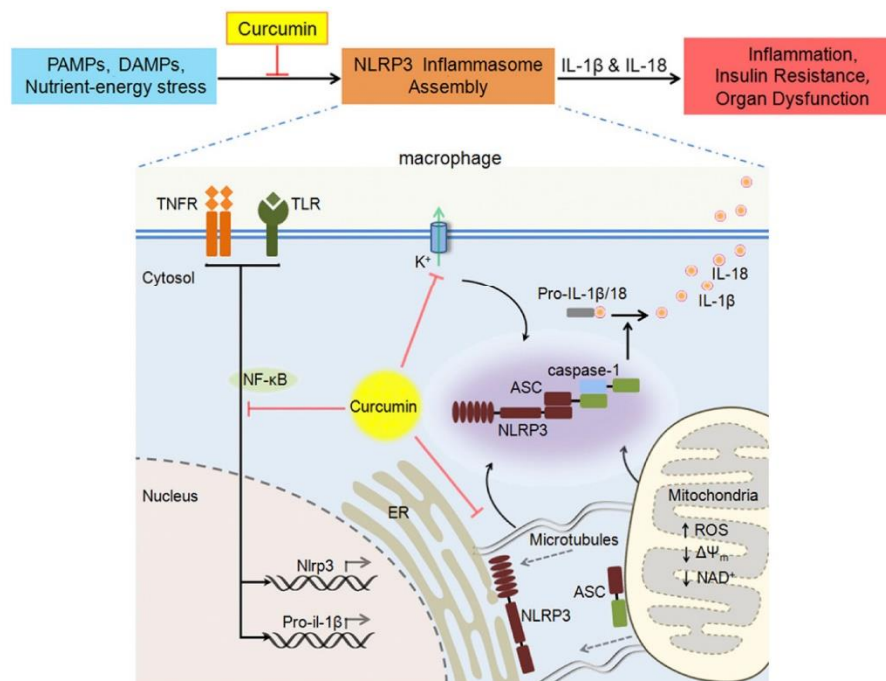
TNF- α ทำให้เกิดการสร้าง IL-1 β ซึ่งไซโตไคน์ทั้งคู่มีบทบาทสำคัญในโรคที่มีการอักเสบแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง ดังเช่น โรคที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อปรสิตภายในเซลล์ (Intracellular parasitic infections) โรคหลอดเลือดแดงแข็ง โรคเอดส์ และโรคแพ้ภูมิตัวเอง จาก การศึกษาของ Chan MM-Y. (1995)⁽⁶⁷⁾ พบว่าสารเคอร์คิวมินที่ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ สามารถยับยั้งการสร้าง TNF- α และ IL-1 β ที่เกิดจากการกระตุ้นของ LPS ในเซลล์โมโนไซต์ิก แมคโครฟาจเพาะเลี้ยงที่ได้จากมนุษย์ (Human monocytic macrophage: Mono Mac 6) และใน ความเข้มข้นของเคอร์คิวมินเดียวกันนี้ยังสามารถยับยั้งการทำงานของทรานสคริปชันแฟกเตอร์ ของ NF- κ B

จากการศึกษาของ Cho WJ. และคณะ (2007)⁽²⁴⁾ ได้ศึกษาผลการยับยั้ง (Inhibitory effect) ของเคอร์คิวมินต่อไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบในเซลล์เคราติโนไซต์ เพาะเลี้ยงที่ได้จากมนุษย์ (Human keratinocyte immortal cells: HaCaT) ที่ได้รับ TNF- α 20 นา โนกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าเมื่อเซลล์ HaCaT ได้รับ TNF- α จะเพิ่มการสร้าง IL-1 β IL-6 และ TNF- α เอง จึงมีการทำงานของทรานสคริปชันแฟกเตอร์ของ NF- κ B, p38 MAPK และซีจูนเอ็นเทอมี นอลไคเนส (c-Jun N-terminal kinase: JNK) แต่เมื่อได้รับเคอร์คิวมินเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์จะ ยับยั้งการสร้างไซโตไคน์ดังกล่าว เนื่องจากเคอร์คิวมินเข้าไปยับยั้งการทำงานของ p65 NF- κ B ที่ เกิดจากการกระตุ้นของ TNF- α จึงยับยั้งไม่ให้ NF- κ B เคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียส ขณะเดียวกันพบว่า เคอร์คิวมินที่ความเข้มข้นดังกล่าวนี้สามารถยับยั้งการเติมหมู่ฟอสเฟตของ p38 MAPK และ JNK แต่เมื่อให้ MAPK inhibitor หรือ JNK inhibitor แก่เซลล์ HaCaT พบว่า TNF- α ยังคงส่งสัญญาณ เพื่อให้มีการทำงานของ NF- κ B ต่อไปได้เนื่องจากพบการสร้าง IL-1 β IL-6 และ TNF- α จากเซลล์ ดังกล่าว

เคอร์คิวมินมีผลต่อขั้นตอนการหลัง IL-1 β และยับยั้งการทำงานของ เอ็นแอล อาร์พี 3 อินฟลามมาโซม (NLRP3 inflammasome) ในเซลล์แมคโครฟาจทำให้ลดการอักเสบได้ โดยทั่วไปเมื่อมีการกระตุ้นจากเชื้อก่อโรค เช่น Pathogen-associated molecular patterns

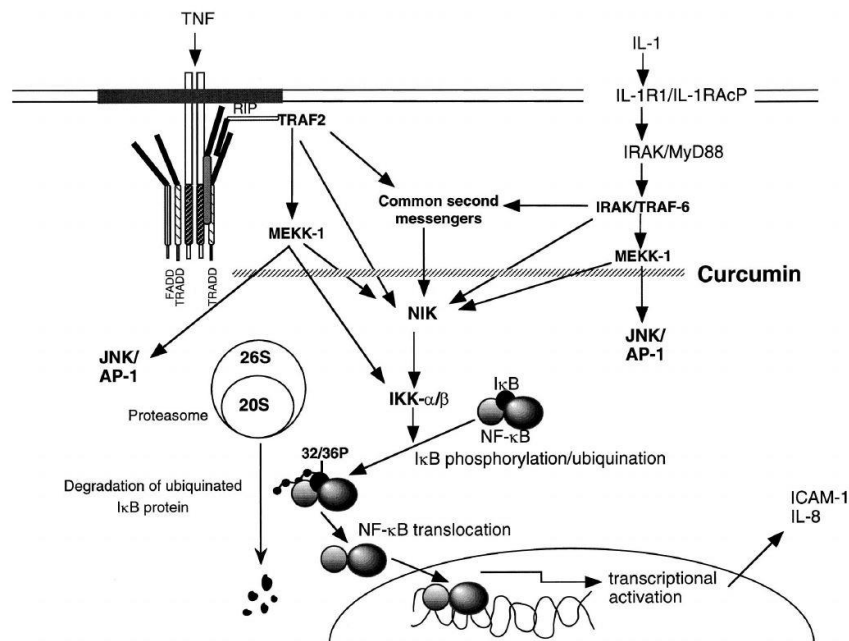
(PAMPs) Damage-associated molecular patterns (DAMPs) และผลผลิตที่เกิดจากเมตาบอลิซึมในร่างกาย (Metabolic products) จะทำให้เกิดการรวมกันของ NLRP3 inflammasome จากนั้นเกิดการหลั่งของ IL-1 β และ IL-18 ตามมา ซึ่งก่อให้เกิดโรคอ้วน เกิดความผิดปกติที่เกี่ยวข้องกับภาวะดื้อต่ออินซูลิน⁽⁶⁸⁾ และเกิดการทํางานผิดปกติของอวัยวะอื่น ๆ ในระหว่างที่มีการอักเสบ แต่เมื่อได้รับเคอร์คิวมินเข้าไปจะเกิดการยับยั้ง NLRP3 inflammasome ผ่าน 3 ช่องทางตามภาพประกอบ 5 ได้แก่

1. ขั้นตอน signal 1 priming และ signal 2 activation ซึ่งเป็นขั้นตอนที่ทำให้เกิดการถอดรหัส และการแปลรหัส (Translation) ของ NLRP3 และ pro-IL-1 β
 2. ขั้นตอนการขั้บการขั้บโพแทสเซียมออกนอกเซลล์ ซึ่งเป็นขั้นตอนที่ช่วยสร้าง IL-1 β
 3. ขั้นตอนการขนส่ง ASC จากไมโทคอนเดรียผ่านทางไมโครทิวบูล ซึ่งทำให้ไม่เกิดการรวมกันของ NLRP3 inflammasome
- ดังนั้นจะเห็นว่าเคอร์คิวมินเป็นสารที่เกิดประโยชน์ต่อโรคเบาหวานและโรคอักเสบอื่น ๆ ที่ขับเคลื่อนด้วย NLRP3 inflammasome⁽⁶⁹⁾



ภาพประกอบ 5 ฤทธิ์ของเคอร์คิวมินต่อการยับยั้งการรวมตัวของ NLRP3 inflammasome ในเซลล์แมคโครฟาจ⁽⁶⁹⁾

เมื่อไซโตไคน์ เช่น TNF- α เข้ามาจับกับตัวรับบนผิวเซลล์ (TNF-R1) จึงเกิดการส่งสัญญาณให้มีการรวมกันของ TNFR-adaptor protein with a dead domain (TRADD) receptor-interacting serine/threonine-protein kinase (RIP หรือ RIPK) และ TNFR-associated factors 2 (TRAF2) ขณะเดียวกันเมื่อ IL-1 β เข้ามาจับกับตัวรับบนผิวเซลล์ (IL-1R1) จากนั้น IL-1R3 (IL-1AcP) ซึ่งเป็นตัวรับร่วม (Coreceptor) จะเคลื่อนที่เข้ามารวมกันทำให้เกิดการทำงานของเอนไซม์ IL-1 receptor activated kinase (IRAKs) และส่งสัญญาณต่อไปยัง TRAF6 ต่อมาไซโตไคน์ทั้งสองเกิดการส่งสัญญาณผ่านทาง TRAF-2 (จาก TNF- α) และ TRAF6 (จาก IL-1 β) เข้ามากระตุ้นการทำงานของ IKK- $\alpha\beta$ ผ่านทางเอนไซม์ NIK เพื่อให้เกิดการทำงานของทรานสคริปชันแฟกเตอร์ของ NF- κ B ต่อไป^(70, 71)



ภาพประกอบ 6 บทบาทของเคอร์คิวมินต่อการยับยั้งทรานสคริปชันแฟกเตอร์ NF- κ B ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย TNF- α และ IL-1 β ⁽²⁵⁾

จากภาพประกอบ 6 เมื่อได้รับเคอร์คิวมินพบว่าเคอร์คิวมินจะไม่ได้เข้าไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ NF- κ B binding kinase (NIK) หรือตำแหน่งของ IKK- $\alpha\beta$ โดยตรง แต่จะเข้าไปยับยั้งการทำงานในกระบวนการขั้นต้น (Upstream process) ก่อนการสร้างเอนไซม์ NIK กล่าวคือ เคอร์คิวมินเข้าไปยับยั้งการส่งสัญญาณของ adaptor protein ทั้ง RIP TRAF2 และ TRAF6 ที่ทำให้เกิดการสร้าง Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase-1 (MEKK-

1) NIK และ IKK α/β จึงไม่ทำให้เกิดการสลายของ I κ B α นอกจากนี้พบว่าเคอร์คิวมินสามารถยับยั้งการทำงานของ second messenger ที่เกิดจากการกระตุ้นของ TNF- α และ IL-1 β จึงขัดขวางการสร้างเอนไซม์ NIK และ/หรือ IKK α/β ได้เช่นเดียวกัน เคอร์คิวมินสามารถยับยั้งการเข้ามาของเอนไซม์ IRAKs ที่ไปยัง IL-1R1 อีกทั้งยังยับยั้งการเติมหมู่ฟอสเฟตของเอนไซม์ดังกล่าว และใน IL-1R3 สูดทำยแล้วจะไม่เกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตและการเติมโปรตีนยูบิควิตินที่โมเลกุลของ I κ B α จาก IKK- β จึงไม่เกิดการทำลาย I κ B α ที่ proteasome และไม่มีการปล่อย NF-kB (RelA และ P50) จาก I κ B α ทำให้ไม่เกิด NF-kB อีกระยะเข้าไปสู่นิวเคลียสของเซลล์⁽²⁵⁾

เมื่อทราบสคริปชันแฟกเตอร์ NF-kB ไม่สามารถเข้าไปในนิวเคลียสได้ส่งผลให้มีการลดการทำงานของ IL-8 intercellular adhesion molecule (ICAM-1) cyclinD1 COX-2 และ MMP-9 ตามมาจึงมีผลต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ การมีชีวิตอยู่ และ metastatic gene product นอกจากนี้ยังพบว่าเคอร์คิวมินมีผลต่อ epidermal growth factor, extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK) ใน MAPK และ phosphoinositide-3-kinase-protein kinase B/Akt (PI3K-PKB/Akt) pathway ได้⁽⁷²⁾

ปัจจุบันมีการนำเคอร์คิวมินมาใช้ในการรักษาโรคปริทันต์ พบว่าเคอร์คิวมินสามารถลดการอักเสบของเหงือกโดยควบคุมการสร้างเส้นใยคอลลาเจน และลดการสลายของกระดูกล้อมรอบฟัน ดังเช่นการศึกษาของ Xiao C-J. และคณะ (2008)⁽²⁶⁾ ได้ทำการทดสอบฤทธิ์การต้านการอักเสบของเคอร์คิวมินในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกของหนูขาวพันธุ์วิสตา (Wistar rat) ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และในหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดโรคปริทันต์อักเสบโดยการมัดฟัน (Ligature-induced experimental periodontitis) โดยให้เคอร์คิวมินก่อนการทดสอบ 24 ชั่วโมงพบว่าเคอร์คิวมินที่ความเข้มข้น 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ ไม่มีพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก อีกทั้งยังสามารถยับยั้งการสร้าง TNF- α และ IL-1 β ในระดับโปรตีน โดยในกลุ่มที่ได้รับเคอร์คิวมิน 20 ไมโครโมลาร์มีการลดระดับการแสดงออกมากกว่าในกลุ่มที่ได้รับ 10 ไมโครโมลาร์ ซึ่งการลดลงจะเกิดผลดีต่อเซลล์เนื่องจากไซโตไคน์ทั้งสองชนิดนั้นมีส่วนเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ นอกจากนี้ยังพบว่าเคอร์คิวมินที่ความเข้มข้น 10 และ 20 ไมโครโมลาร์สามารถลดการทำงานของ NF-kB และลดอัตราส่วนของ OPG/RANKL สำหรับหนูที่ถูกมัดฟันพบว่าเมื่อได้รับเคอร์คิวมินเข้มข้น 30 และ 100 ไมโครกรัมต่อกรัมจะพบการอักเสบของเหงือกและการสูญเสียกระดูกล้อมรอบฟันลดลง ซึ่งกลุ่มที่ได้รับเคอร์คิวมิน 100 ไมโครกรัมต่อกรัมมีการสูญเสียกระดูกน้อยกว่า จากผลการทดลองดังกล่าวทำให้ทราบว่าเคอร์คิวมินสามารถลดการสร้างเอนไซม์ที่มาทำลายเส้นใยคอลลาเจน และลดการทำงานของเซลล์สลายกระดูกโดยยับยั้งการสลายของ

กระดุกล้อมรอบพันได้ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเคอร์คิวมินมีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยนแปลงการตอบสนองของภูมิคุ้มกันที่เกี่ยวข้องกับโรคปริทันต์

จากการศึกษาของ Hu P. และคณะ (2013)⁽⁷³⁾ ได้ทดสอบการแสดงออกของ COX-2 ในระดับ mRNA และโปรตีนจากเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ที่ได้รับการกระตุ้นให้มีการอักเสบด้วย LPS 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจากเชื้อ *Pg* โดยให้เคอร์คิวมินเป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนการทดสอบ พบว่าเคอร์คิวมินสามารถยับยั้งการแสดงออกของ COX-2 ได้ทั้งในระดับ mRNA และโปรตีน ซึ่งความเข้มข้นของเคอร์คิวมิน 20 และ 30 ไมโครโมลาร์สามารถยับยั้งการแสดงออกของ COX-2 ในระดับ mRNA ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$ และ $p < 0.01$ ตามลำดับ แต่ความเข้มข้นที่ 5 และ 10 ไมโครโมลาร์พบว่าการเปลี่ยนแปลงระดับ COX-2 น้อยมาก นอกจากนี้ได้ทดสอบการแสดงออกของ NF- κ B พบว่าเคอร์คิวมินที่ความเข้มข้น 10 20 และ 30 ไมโครโมลาร์สามารถยับยั้งการทรานสคริปชันของ NF- κ B ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.01$ เนื่องจาก NF- κ B สามารถตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นโดยในการทดลองนี้คือ LPS จากนั้น NF- κ B จะเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องต่อการอักเสบและสร้างเอนไซม์ COX-2 ตามมา เมื่อใส่เคอร์คิวมินในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ เคอร์คิวมินจะเข้าไปยับยั้งการทรานสคริปชันของ NF- κ B ส่งผลให้ลดการแสดงออกของ COX-2 จากเหตุผลดังกล่าวนี้จึงอนุมานได้ว่าเคอร์คิวมินสามารถชะลอการดำเนินของโรคปริทันต์อักเสบได้

นอกจากนี้ยังพบการศึกษาของ Lantz R.C. และคณะ (2005)⁽⁷⁴⁾ ซึ่งทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของขมิ้นชัน โดยใช้สารสกัดหยาบขมิ้นชันที่ถูกละลายด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน เมทานอล (Dichloromethane-methanol) เคอร์คิวมิน ดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน บิสดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน และน้ำมันหอมระเหยขมิ้นชันเป็นเวลา 24 ชั่วโมงในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงที่ได้จากมนุษย์ (Human promyelotic leukemia cell: HL-60 cell) ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจากเชื้อ *E. coli* พบว่าความเข้มข้นสารสกัดหยาบที่มากกว่า 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ จากนั้นทดสอบการแสดงออกของ TNF- α และพรอสตาแกลนดิน อี 2 (Prostaglandins E2: PGE2) พบว่าค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบขมิ้นชันที่ทำให้ TNF- α และ PGE2 ลดลงร้อยละ 50 (Median inhibitory concentration: IC₅₀) มีค่าเท่ากับ 15.2 และ 0.92 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่เมื่อนำสารสกัดหยาบมาทำการละลายในน้ำจะไม่เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์และไม่เกิดฤทธิ์ทางชีวภาพใด ๆ เมื่อเปรียบเทียบเฉพาะการยับยั้ง PGE2 พบว่าเคอร์คิวมินบริสุทธิ์มีฤทธิ์ในการยับยั้งได้ดีที่สุด รองลงมาคือสารสกัดหยาบ ดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน และบิสดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน เมื่อนำสารสกัด

หยาบมาแยกเป็นส่วนสกัดย่อย (Subfraction) โดยวิธีโครมาโตกราฟีเหลวความดันสูง (High pressure liquid chromatography) ได้เป็นอีก 10 แฟรกชัน (Fractions) พบว่าสารสกัดย่อย บางส่วนไม่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารประกอบในแต่ละแฟรกชันซึ่งทำให้เกิดฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยพบว่าน้ำมันหอมระเหยสามารถยับยั้งการแสดงออกของ PGE2 ได้ดีกว่าเคอร์คิวมินอยด์ แต่ในขณะเดียวกันพบว่าน้ำมันหอมระเหยไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง COX-2 ในระดับ mRNA ซึ่งต่างจากเคอร์คิวมินที่สามารถยับยั้ง COX-2 ได้จากนั้นจึงส่งผลให้มีการยับยั้ง PGE2

นอกจากฤทธิ์ของขมิ้นชันที่กล่าวมาข้างต้นแล้วยังพบว่าเคอร์คิวมินมีบทบาทสำคัญในการป้องกันและรักษาโรคเบาหวาน พร้อมทั้งยับยั้งภาวะแทรกซ้อนที่เกิดขึ้นจากเบาหวาน โดยสามารถลดโอกาสการพัฒนากลุ่มที่กำลังจะเป็นเบาหวานซึ่งทำให้เป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ได้ช้าลง อีกทั้งยังลดภาวะดื้อต่ออินซูลิน ลดระดับน้ำตาลในเลือด ลดระดับไขมันในเลือดที่สูง (Hyperlipidemia) ส่งเสริมการทำงานและป้องกันการตายของเบต้าเซลล์ (Beta cell) ในตับอ่อน โดยอาศัยฤทธิ์ต้านการอักเสบของเคอร์คิวมิน⁽⁷⁵⁾ นอกจากนี้พบว่าเคอร์คิวมินสามารถยับยั้งการอักเสบของหลอดเลือด (Vascular inflammation) ในโรคเบาหวาน จากการศึกษาของ Jain K. และคณะ (2009)⁽²⁸⁾ ได้จำลองสภาวะเบาหวานโดยให้น้ำตาลกลูโคส 35 มิลลิโมลาร์แก่เซลล์ไมโนไซท์ ซึ่งถือว่าเป็นระดับน้ำตาลที่สูง⁽⁷⁶⁾ จากนั้นได้ให้เคอร์คิวมินที่ถูกลดโดยใช้ตัวทำละลาย แอลกอฮอล์ซึ่งมีความเข้มข้นเคอร์คิวมิน 1.75 ไมโครโมลาร์ ซึ่งเป็นระดับของเคอร์คิวมินในกระแสเลือดของคนที่ได้รับเคอร์คิวมินเสริม 4-8 กรัมเมื่อผ่านไปแล้ว 1 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ไมโนไซท์มีการหลั่ง TNF- α IL-6 IL-8 MCP-1 และมีการทำงานของ LPO ลดลง เช่นเดียวกับการจำลองสภาวะเบาหวานในหนูที่ได้รับสเตรปโตไซโทซิน (Streptozotocin: STZ) จากนั้นให้เคอร์คิวมินที่ความเข้มข้นเท่ากันพบว่าระดับของ TNF- α IL-6 IL-8 MCP-1 HbA1C กลูโคส และความเครียดออกซิเดชันในกระแสเลือดลดลง จึงกล่าวได้ว่าเคอร์คิวมินมีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในกระแสเลือด ลดระดับความเครียดออกซิเดชัน พร้อมทั้งยับยั้งพยาธิกำเนิดของการอักเสบของหลอดเลือด เนื่องจากยับยั้งการหลั่งของไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้อง

โรคเบาหวาน

ความหมายของโรคเบาหวาน

โรคเบาหวานเป็นโรคเรื้อรังที่เกิดจากพันธุกรรม และ/หรือมีความผิดปกติของกระบวนการเมตาบอลิซึม (Metabolic disorder) โดยจะพบว่ามียกระดับกลูโคสในเลือดสูงผิดปกติที่เป็นผลมาจากความบกพร่องในการผลิตอินซูลิน (Insulin) ซึ่งเกิดจากความผิดปกติของเบต้าเซลล์

ในตับอ่อน หรือมีภาวะดื้อต่ออินซูลินในตับและกล้ามเนื้อ หรือเกิดทั้ง 2 ประการรวมกัน ความชุกของโรคเบาหวานจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับภูมิศาสตร์ อายุ เพศ และเชื้อชาติ⁽⁷⁷⁾ ในภาวะน้ำตาลในเลือดสูงอาจนำไปสู่ความเสียหายในระยะยาวต่ออวัยวะต่าง ๆ เช่น

1. ภาวะแทรกซ้อนเฉียบพลันของโรคเบาหวาน เช่น ภาวะเลือดเป็นกรดจากสารคีโตน (Diabetic ketoacidosis: DKA) ภาวะโคม่าจากน้ำตาลในเลือดสูง (Hyperglycemic hyperosmolar syndrome: HHS) และภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำ (Hypoglycemia)^(78, 79)

2. ภาวะแทรกซ้อนของโรคหลอดเลือดใหญ่ในสมองเรื้อรัง เช่น โรคหัวใจและหลอดเลือด (Cardiovascular disease)⁽⁸⁰⁾

3. ภาวะแทรกซ้อนของโรคหลอดเลือดเล็กเรื้อรัง เช่น โรคไต (Nephropathy) โรคจอประสาทตา (Retinopathy) และเส้นประสาทถูกทำลาย (Neuropathy)⁽⁸⁰⁾

4. ภาวะแทรกซ้อนในช่องปาก พบความผิดปกติของน้ำลาย และเกิดภาวะน้ำลายน้อย (Salivary dysfunction and xerostomia) เนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงในชั้นฐานรองเนื้อเยื่อ (Basement membrane) ของต่อมน้ำลายและเป็นผลจากยาที่ได้รับจึงทำให้น้ำลายน้อย พบอัตราฟันผุสูงขึ้นซึ่งอาจสัมพันธ์กับความผิดปกติของน้ำลาย อีกทั้งในผู้ป่วยที่มีภาวะน้ำตาลในเลือดสูงจะพบระดับกลูโคสสูงในน้ำเหลืองเหงือก ซึ่งปัจจัยดังกล่าวอาจเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคฟันผุใหม่และเกิดฟันดำได้ นอกจากนี้ในผู้ป่วยเบาหวานยังพบความผิดปกติของเยื่อเมือก (Oral mucosa) และเชื้อราได้ในช่องปาก (Oral candidiasis) อีกทั้งส่งผลต่อสภาวะปริทันต์ซึ่งจะกล่าวต่อไป⁽¹¹⁾

การจำแนกชนิดของโรคเบาหวาน

เบาหวานชนิดที่ 1 (Type I Diabetes mellitus)

รูปแบบของโรคเบาหวานชนิดนี้เป็นผลมาจากการทำลายเซลล์ที่สร้างฮอร์โมนอินซูลินจากภาวะภูมิคุ้มกันตนเอง โดยพบการทำลายเบต้าเซลล์ของตับอ่อนจึงทำให้มีการสร้างอินซูลินลดลง หรือสร้างไม่ได้เลย พบได้ประมาณร้อยละ 5-10 ของผู้ป่วยเบาหวานทั้งหมดซึ่งมักจะพบในกลุ่มเด็กและวัยรุ่น เด็กที่เป็นโรคนี้อาจมีอาการเด่นชัดของเบาหวาน ได้แก่ มีปัสสาวะมาก (Polyuria) และดื่มน้ำมาก (Polydipsia) โดยการพัฒนาของโรคจะแตกต่างกันไปในแต่ละคน ผู้ป่วยที่เป็นโรคนี้อาจจำเป็นต้องอาศัยอินซูลินจากภายนอกเพื่อการดำรงชีวิต จึงเรียกโรคเบาหวานชนิดนี้ว่า โรคเบาหวานชนิดพึ่งอินซูลิน (Insulin-dependent diabetes) หากว่าขาดอินซูลินจะเกิดภาวะเลือดเป็นกรดจากสารคีโตน ซึ่งเป็นภาวะฉุกเฉินที่พบได้ 1 ใน 3 ของผู้ป่วยเบาหวานประเภทนี้ นอกจากนี้ผู้ป่วยมีแนวโน้มที่จะเกิดโรคภูมิคุ้มกันผิดปกติอื่น ๆ เช่น Graves disease, Hashimoto's thyroiditis, Addison's disease, vitiligo, celiac sprue, autoimmune hepatitis

และ myasthenia gravis ในกรณีของ Idiopathic Type-1 Diabetes จะไม่พบความผิดปกติของ เบต้าเซลล์จากตับอ่อน พบได้ในคนแอฟริกาและเอเชีย โรคเบาหวานในรูปแบบนี้ได้รับการสืบทอด มาจากพันธุกรรม และไม่มีมีความเกี่ยวข้องกับ human leukocyte antigen (HLA)⁽⁷⁷⁾

เบาหวานชนิดที่ 2 (Type II Diabetes mellitus)

เดิมเรียกว่า โรคเบาหวานชนิดไม่พึ่งอินซูลิน (Noninsulin-dependent diabetes) หรือเบาหวานในผู้ใหญ่ (Adult-onset diabetes) ซึ่งพบได้ประมาณร้อยละ 90-95 ของ ผู้ป่วยเบาหวานทั้งหมด⁽⁸¹⁾ สาเหตุเกิดจากความบกพร่องในการผลิตอินซูลินและภาวะดื้อต่อ อินซูลิน ในการดำเนินไปของโรคจะพบการผลิตกลูโคสจากตับเพิ่มขึ้นและมีการหลั่งอินซูลินลดลง การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้นำไปสู่ภาวะน้ำตาลในเลือดสูงที่ควบคุมระดับน้ำตาลไม่ได้ (Sustained hyperglycemia) ซึ่งในผู้ป่วยบางรายไม่จำเป็นต้องได้รับอินซูลินในการรักษา ความเสี่ยงในการ เกิดโรคเบาหวานชนิดนี้จะเพิ่มขึ้นในผู้ที่มีโรคอ้วน มีประวัติทางพันธุกรรม มีประวัติก่อนหน้าว่าเคย เป็นโรคเบาหวานขณะตั้งครรภ์ ขาดการออกกำลังกาย และมีอายุที่เพิ่มขึ้น^(82, 83) โรคเบาหวานชนิด นี้มักไม่ค่อยได้รับการวินิจฉัยในระยะแรกเนื่องจากจะมีการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดแบบค่อยเป็น ค่อยไป และไม่แสดงอาการรุนแรงพอที่ผู้ป่วยจะสังเกตอาการของตนเองได้ พบอุบัติการณ์ของการ เกิดภาวะเลือดเป็นกรดจากสารคีโตนน้อยเมื่อเทียบกับโรคเบาหวานชนิดที่ 1 แต่อาจเกิดขึ้นได้เมื่อ มีความเครียดจากการเจ็บป่วย เช่น การติดเชื้อ (Infection) หรือการใช้ยาบางชนิด เช่น corticosteroids, atypical antipsychotics และ sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors⁽¹²⁾

เบาหวานที่เกิดขณะตั้งครรภ์ (Gestational diabetes mellitus: GDM)

เบาหวานขณะตั้งครรภ์เป็นอาการที่ทนต่อการเพิ่มขึ้นของกลูโคสไม่ได้ทุกระดับ (Glucose intolerance) ซึ่งวินิจฉัยได้เป็นครั้งแรกในขณะตั้งครรภ์ พบได้ประมาณร้อยละ 1-14 ของหญิงตั้งครรภ์⁽⁸⁴⁾ โดยผู้ป่วยจะเริ่มมีอาการในไตรมาสที่ 3 ของการตั้งครรภ์ดังนั้นจึงควรรีบเข้า รับการรักษาเพื่อลดอัตราการตายปริกำเนิด (Perinatal mortality rate) ของทารกในครรภ์ หญิง ตั้งครรภ์ที่มีความเสี่ยงสูง ได้แก่ ผู้ที่มีอายุมากกว่า 25 ปี มีประวัติครอบครัวเป็นโรคเบาหวานมา ก่อนหรือเคยเป็นโรคเบาหวานขณะตั้งครรภ์ และมีโรคอ้วน ผู้หญิงส่วนใหญ่ที่เป็นโรคเบาหวาน ขณะตั้งครรภ์แม้จะกลับสู่สภาวะปกติหลังจากคลอดบุตรแต่มีโอกาสในการพัฒนาเป็น โรคเบาหวานชนิดที่ 2 ได้ ผู้หญิงที่เป็นเบาหวานขณะตั้งครรภ์มีความถี่เพิ่มขึ้นในการเกิดโรคความ ดันโลหิตสูง⁽⁸⁵⁾ นอกจากนี้โรคเบาหวานขณะตั้งครรภ์จะเพิ่มความเสี่ยงที่ทำให้ทารกพิการแต่กำเนิด (Fetal congenital anomalies) ภาวะตายคลอด (Stillbirth) ภาวะทารกในครรภ์ตัวใหญ่กว่าปกติ (Macrosomia) ภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำ (Hypoglycemia) ดีซ่าน (Jaundice) กลุ่มอาการหายใจ

ลำบากเฉียบพลัน (Respiratory distress syndrome) ภาวะเลือดข้น (Polycythemia) และภาวะแคลเซียมต่ำ (Hypocalcemia)⁽⁷⁷⁾

การวินิจฉัยโรคเบาหวาน

วินิจฉัยโรคเบาหวานสามารถทำได้โดยวิธีใดวิธีหนึ่งใน 4 วิธี ดังต่อไปนี้^(77, 81)

1. ผู้ที่มีอาการของโรคเบาหวานชัดเจนคือ หิวน้ำบ่อย บัสสาวะบ่อยและมาก น้ำหนักตัวลดลงโดยที่ไม่มีสาเหตุ ในกลุ่มนี้จะสามารถตรวจระดับพลาสมากลูโคส (Plasma glucose) เวลาใดก็ได้โดยไม่จำเป็นต้องอดอาหาร หากมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 200 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ให้การวินิจฉัยว่าเป็นโรคเบาหวาน

2. การตรวจระดับพลาสมากลูโคสตอนเช้าหลังอดอาหารข้ามคืนมากกว่า 8 ชั่วโมง (Fasting plasma glucose: FPG) โดยตรวจจากหลอดเลือดดำ หากมีค่า 126 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตรในคนทั่วไปที่มาตรวจสุขภาพ และผู้ที่ไม่มีอาการ ให้การวินิจฉัยว่าเป็นโรคเบาหวาน

3. การตรวจความทนต่อกลูโคส (75 กรัม Oral Glucose Tolerance Test: OGTT) โดยระดับพลาสมากลูโคส หลังดื่มน้ำตาล 2 ชั่วโมง หากมีค่า 200 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ให้การวินิจฉัยว่าเป็นโรคเบาหวาน

4. การตรวจวัดระดับฮีโมโกลบินเอวันซี (Hemoglobin A1C: HbA1C) ถ้าค่าเท่ากับหรือมากกว่าร้อยละ 6.5 ให้การวินิจฉัยว่าเป็นโรคเบาหวาน วิธีนี้นิยมใช้กันมากขึ้นในปัจจุบัน เพราะไม่จำเป็นต้องอดอาหาร

สำหรับผู้ที่ไม่มีอาการของโรคเบาหวานชัดเจนควรตรวจเลือดซ้ำโดยวิธีเดิมอีกครั้งหนึ่งในวันหรือสัปดาห์ถัดไปเพื่อเป็นการยืนยันและป้องกันความผิดพลาดจากการตรวจห้องปฏิบัติการ โดยมีรายละเอียดการแปลผลระดับพลาสมากลูโคสและ HbA1C ดังตารางที่ 2

ตาราง 2 การแปลผลระดับพลาสมากลูโคสและ HbA1C เพื่อการวินิจฉัย^(81, 86)

	ปกติ	ระดับน้ำตาลในเลือดที่เพิ่มความเสี่ยงต่อการเป็นโรคเบาหวาน		โรคเบาหวาน
		Impaired fasting glucose	Impaired glucose tolerance	
พลาสมากลูโคสขณะอดอาหาร	< 100 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร	100-125 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร	-	≥ 126 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร
พลาสมากลูโคสที่ 2 ชั่วโมงหลังดื่มกลูโคส 75 กรัม	< 140 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร	-	140-199 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร	≥ 200 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร
พลาสมากลูโคสที่เวลาใดๆ ในผู้ที่มีอาการชัดเจน	-	-	-	≥ 200 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร
HbA1C	< ร้อยละ 5.7	ร้อยละ 5.7-6.4	-	≥ ร้อยละ 6.5

หมายเหตุ (1) Impaired Fasting Glucose (IFG) คือภาวะที่มีระดับน้ำตาลในเลือดขณะอดอาหารผิดปกติ (2) Impaired glucose tolerance (IGT) คือภาวะที่มีความทนต่อน้ำตาลลดลง

ความสำคัญของโรคเบาหวาน

โรคเบาหวานเป็นหนึ่งในกลุ่มโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง (Non-communication diseases) จากข้อมูลทะเบียนการเสียชีวิต ของสำนักบริหารทะเบียน กระทรวงมหาดไทย ที่ได้รับการให้สาเหตุการเสียชีวิตตามมาตรฐานทางการแพทย์แล้ว พบว่าในระหว่างปีพ.ศ. 2555-2558 มีอัตราการตายของประชากรในช่วงอายุ 30-69 ปีของโรคในกลุ่มนี้มีแนวโน้มสูงขึ้น ดังเช่นในโรคเบาหวาน จาก 13.2 ต่อแสนประชากร เพิ่มเป็น 17.8 ต่อแสนประชากร และเมื่อพิจารณาความแตกต่างระหว่างเพศพบว่า โรคเบาหวานพบการเสียชีวิตในกลุ่มอายุ 30-69 ปี ในเพศหญิงสูงกว่าเพศชาย จากรายงานการสำรวจสุขภาพประชาชนไทยโดยการตรวจร่างกายครั้งที่ 5 ในปีพ.ศ. 2557 พบว่าความชุกเบาหวานเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 6.9 ในปีพ.ศ. 2552 เป็นร้อยละ 8.9 คิดเป็นจำนวนประมาณ 4.8 ล้านคนในช่วง 5 ปีที่ผ่านมา ซึ่งเพิ่มขึ้นปีละประมาณ 300,000 คน

นอกจากนี้พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงในสังคม เช่น การขยายตัวของสังคมเมือง กลยุทธ์ทางการตลาด ความก้าวหน้าทางเทคโนโลยี และการสื่อสารส่งผลต่อวิถีชีวิตทำให้ป่วยด้วยกลุ่มโรคไม่ติดต่อเพิ่มมากขึ้น⁽⁸⁷⁾

เบาหวานมีบทบาทสำคัญในการเกิดโรคปริทันต์ เนื่องจากพบว่ามี ความชุก ความรุนแรง และการดำเนินโรคปริทันต์อักเสบเพิ่มขึ้นในผู้ป่วยเบาหวาน โดยเฉพาะผู้ที่ไม่สามารถควบคุมน้ำตาลในเลือด (Uncontrolled glycemia) โรคปริทันต์และโรคเบาหวานมีกระบวนการที่ทำให้เกิดโรค (Pathological process) ร่วมกัน รวมถึงมีการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันที่เพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าทั้งสองโรคมีสื่อกลางทางชีวภาพ (Biological mediator) ที่คล้ายกัน⁽⁸⁸⁾

ผลของโรคเบาหวานที่ส่งผลต่อโรคปริทันต์

1. ปัจจัยด้านจุลินทรีย์ (Microbial factor)

พบการเปลี่ยนแปลงชนิดของเชื้อแบคทีเรียเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของน้ำลาย และมีระดับน้ำตาลในน้ำเหลืองเหงือกสูงในกลุ่มเบาหวาน จากการศึกษาของปิยะมาศ เอมอิมอนันต์ และคณะ (2013)⁽⁸⁹⁾ พบการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียในกลุ่ม red complex ซึ่งประกอบด้วย *Pg* *Td* และ *Tf* ในคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือกจากกลุ่มผู้ป่วยเบาหวานไม่สามารถควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดได้ (Poor glycemic control) และพบว่ามีความสัมพันธ์เชิงบวกกับระดับ HbA1c จากนั้นทำการเปรียบเทียบระหว่างตำแหน่งที่เกิดโรคเหงือกอักเสบ (Gingivitis site) และตำแหน่งที่เกิดโรคปริทันต์อักเสบ (Periodontitis site) โดยในตำแหน่งที่เป็นโรคเหงือกอักเสบ พบ *Pg* ในกลุ่มเบาหวานที่ควบคุมได้และไม่สามารถควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดได้ และพบ *Tf* ในกลุ่มที่ไม่สามารถควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดได้สูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้เป็นเบาหวานอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับตำแหน่งที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบพบ *Pg* สูงมากขึ้นในกลุ่มที่ไม่สามารถควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Demmer และคณะ (2015)⁽⁹⁰⁾ พบว่ามีการเพิ่มจำนวนของ *Aa* *Pg* *Td* *Tf* และแอคติโนมัยเซส แนสลันดีโอ (*Actinomyces naeslundii*: *A. naeslundii*) อย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่กำลังจะเป็นเบาหวาน (Prediabetes) มากกว่ากลุ่มที่ไม่มีโรคประจำตัว

2. ปัจจัยทางด้านไซโตไคน์ และอะดิพอกิน (Adipokines)

โรคเบาหวานและภาวะน้ำตาลในเลือดสูงทำให้เกิดการอักเสบในเนื้อเยื่อปริทันต์ที่มีการติดเชื้อ เนื่องจากการหลั่งไซโตไคน์ เช่น TNF- α IL-1 β และ IL-6 ในน้ำเหลืองเหงือกออกมาในปริมาณที่สูงกว่าปกติซึ่งเป็นผลมาจากการตอบสนองต่อ LPS ของแบคทีเรีย โดยพบเซลล์โมโนไซต์มากขึ้นในผู้ป่วยโรคเบาหวานทำให้เกิดการตอบสนองต่อการอักเสบที่มากขึ้น เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง AGEs และ Receptor of AGEs (RAGE) หรือ AGE-RAGE

interaction บนเซลล์โมโนไซต์/แมคโครฟาจจึงส่งผลให้เกิดการสร้างเซลล์ที่มากทำลายสิ่งกระตุ้น โดยพบว่า มีความไว (Sensitivity) ต่อสิ่งกระตุ้นเพิ่มขึ้นจึงทำให้มีการหลั่งไซโตไคน์ที่มากเกินไป⁽⁹¹⁾ นอกจากนี้ในการศึกษาของ Bastos และคณะ (2012)⁽¹⁴⁾ พบการทำงานของ LPO เพิ่มขึ้นในเลือด และน้ำเหลืองเหลืองของผู้ป่วยเบาหวาน ซึ่งจะเกิดการสร้าง ROS และทำให้เกิดความเครียดออกซิเดชันตามมา โดย LPO จะเพิ่มความรุนแรงในตำแหน่งที่มีการอักเสบ และพบการหลั่งสารสื่ออักเสบมากขึ้นโดยเฉพาะเช่น TNF- α ในผู้ที่ไม่สามารถควบคุมระดับน้ำตาลได้

จากการศึกษาของ Lew J.H. และคณะ (2018)⁽⁹²⁾ พบว่าผู้ป่วยเบาหวานที่มีระดับ HbA1C สูงจะสัมพันธ์กับระดับ IL-1 β และ sIL-6 ในน้ำเหลืองเหลืองที่สูงเช่นกัน เนื่องจากในโรคเบาหวานจะมีการเติมหมู่น้ำตาลกลูโคสบนโมเลกุลโปรตีนอัลบูมิน (Albumin) เกิดเป็นไกลเคเทด อัลบูมิน (Glycated albumin) ซึ่งอาจเพิ่มการสร้าง IL-1 β และ sIL-6 receptor (sIL-6R) ในเนื้อเยื่อปริทันต์ที่มีการอักเสบอยู่แต่เดิม ดังนั้นเมื่อไม่สามารถควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดได้จึงส่งผลต่อความรุนแรงของโรคปริทันต์ นอกจากนี้ยังได้จำลองสภาวะเบาหวานในห้องปฏิบัติการ โดยให้กลูโคส 25 มิลลิโมลาร์แก่เซลล์แมคโครฟาจเพาะเลี้ยงที่ได้จากมนุษย์ (Human monocytic cell line: THP-1 macrophage) จึงทำให้เซลล์ดังกล่าวหลั่ง IL-1 β และ sIL-6R จากนั้น IL-1 β ที่หลั่งออกมาจะไปกระตุ้นเซลล์สร้างเส้นใยเหลืองให้มีการสร้าง MMP-1 และวาสคูลาร์ เอนโดทีเลียล โกรทแฟกเตอร์ (Vascular endothelial growth factor: VEGF) ทำให้เพิ่มความรุนแรงของโรคปริทันต์มากขึ้น อีกทั้งยังพบว่า IL-1 β จะย้อนกลับไปกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจให้มีการสร้าง IL-6 จากนั้นจะมีการรวมระหว่าง IL-6 และ sIL-6R เกิดเป็นกลุ่ม IL-6-sIL-6R complex โดยการรวมกลุ่มนี้จะเข้าไปกระตุ้นให้มีการทำงานของ gp130 พบผิวเซลล์สร้างเส้นใยเหลืองอีกครั้ง จากนั้นจะมีการส่งสัญญาณผ่านทาง MAPK โดยพบว่าระดับน้ำตาลกลูโคสที่สูงขึ้นจะสามารถกระตุ้นให้มีการเพิ่มการแสดงออก (Overexpression) ของ gp130 บนเซลล์สร้างเส้นใยเหลือง และเพิ่มการสร้าง sIL-6R บนเซลล์แมคโครฟาจ ต่อมาจะเพิ่มการสร้าง MMP-1 และ VEGF ได้ ซึ่งทำให้เกิดความผิดปกติของหลอดเลือดนำไปสู่ภาวะแทรกซ้อนที่ตามมา ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการส่งสัญญาณแทรกข้ามจากเซลล์แมคโครฟาจที่ได้รับน้ำตาลสูงไปยังเซลล์สร้างเส้นใยเหลืองได้

3. ปัจจัยต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด polymorphonuclear leukocyte (PMN)

ในสภาวะที่มีน้ำตาลสูงทำให้การทำงานของนิวโทรฟิล แมคโครฟาจ และโมโนไซต์เปลี่ยนแปลงไป เช่น มีความบกพร่องในการเคลื่อนที่ไปยังบริเวณที่มีสิ่งแปลกปลอม (Chemotaxis) การเกาะติดกับบริเวณนั้น (Adherence) และการเก็บกินสิ่งแปลกปลอม (Phagocytosis) ของนิวโทรฟิล ซึ่งอาจจะยับยั้งการทำลายแบคทีเรียจึงทำให้มีการคงอยู่ของ

แบคทีเรีย (Bacterial persistence) ในร่องลึกปริทันต์ส่งผลให้มีการทำลายอวัยวะปริทันต์ที่รุนแรงขึ้น แม้ว่าการทำงานของนิวโทรฟิลจะลดลงในผู้ป่วยเบาหวาน แต่ในเซลล์โมโนไซต์/แมคโครฟาจกลับมีการทำงานเพิ่มขึ้นเพื่อตอบสนองต่อแอนติเจนของแบคทีเรีย โดยจะเพิ่มการผลิตไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น เซลล์โมโนไซต์จากผู้ป่วยเบาหวานจะผลิต TNF- α ในการตอบสนองต่อแอนติเจนจาก *Pg* เมื่อเทียบกับผู้ที่ไม่ได้มีโรคประจำตัว^(12, 13)

จากการศึกษาของ Preshaw PM. และคณะ (2012)⁽⁹³⁾ พบว่าผู้ป่วยเบาหวานที่มีโรคปริทันต์อักเสบรุนแรงนั้นนิวโทรฟิลจะลดการเคลื่อนที่ไปยังบริเวณที่มีสิ่งแปลกปลอม เมื่อเทียบกับผู้ป่วยเบาหวานที่มีโรคปริทันต์อักเสบเล็กน้อย และยังพบว่าการเกิดความผิดปกติในการตายของนิวโทรฟิลจึงทำให้มีการสะสมของนิวโทรฟิลเพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อปริทันต์ ซึ่งอาจนำไปสู่การทำลายเนื้อเยื่อเนื่องจากการหลั่ง MMPs และ ROS อย่างต่อเนื่อง

4. ปัจจัยจาก Advanced glycation end products (AGEs)

AGEs เป็นสารประกอบระหว่างน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) เช่น กลูโคส จับกับ amine residues บนโปรตีน ไขมัน หรือกรดนิวคลีอิก ผ่านทางปฏิกิริยาทางเคมีที่ไม่ใช้เอนไซม์ (Nonenzymatic reaction) การก่อตัวของ AGEs เกิดระหว่างกระบวนการชราภาพ (Ageing process) ซึ่งถูกกระตุ้นจากสภาวะที่มีน้ำตาลในเลือดสูงและความเครียดออกซิเดชันที่เพิ่มขึ้น ดังเช่นในผู้ป่วยเบาหวานมีการกระตุ้นให้เกิดการสะสม AGEs ในหลาย ๆ อวัยวะ การก่อตัวของ AGEs ยังทำให้เกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับอายุและโรคเบาหวาน เช่น ข้ออักเสบ (Arthritis) หลอดเลือดแดงแข็ง (Atherosclerosis) ไตวาย (Chronic renal insufficiency) อัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) ไต (Kidney disease) เส้นประสาทเสื่อม (Neuropathy) และต้อกระจก (Cataract)⁽⁹⁴⁾ นอกจากนี้ยังพบว่ามีผลเกี่ยวข้องกับโรคปริทันต์อักเสบดังเช่นการศึกษาของ Yu S. และคณะ (2012)⁽¹⁵⁾ ซึ่งทำการทดลองในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์จากตำแหน่งที่ไม่มีอาการอักเสบ โดยให้สาร AGE-human serum albumin (HSA) เป็นเวลา 9 สัปดาห์ พบว่า AGEs กระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของ MMP-1 อย่างมากทั้งในระดับโปรตีนและ mRNA โดยขึ้นอยู่กับเวลาและความเข้มข้นที่ได้รับ กล่าวได้ว่าการสะสมของ AGEs อาจทำให้มีการแสดงออกของ MMP-1 เพิ่มขึ้นในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก ซึ่งอาจมีบทบาทในการพัฒนาของโรคปริทันต์อักเสบจากโรคเบาหวาน และศึกษาการแสดงออกของ RAGEs NF-kB และ MMP-1 ในระดับโปรตีนและ mRNA จากเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือกในผู้ที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรัง โรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังร่วมกับเบาหวาน และผู้ไม่มีโรคประจำตัว พบว่าระดับ mRNA ของ RAGEs และ NF-kB สูงขึ้นในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรัง โรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังร่วมกับเบาหวานมากกว่าผู้ที่ไม่ได้มีโรค

ประจำตัว ทำให้ทราบว่าการทำงานของ AGEs เกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง RAGEs และ RAGE-ligand ซึ่งกระตุ้นให้มีการทำงานของ NF- κ B อย่างต่อเนื่อง ส่งผลให้มีการถอดรหัสยีนเป้าหมายรวมถึงไซโตไคน์ แอดฮีชันโมเลกุล (Adhesion molecules) และ RACEs เอง

ในโรคปริทันต์อักเสบเมื่อเซลล์สร้างเส้นใยเหนือกได้รับการกระตุ้นจาก LPS ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของ Toll-like receptors (TLRs)-2, 4 ซึ่งเป็นตัวรับที่สำคัญในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (Innate immune system) ส่งผลให้มีการเพิ่มขึ้นของไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ⁽⁹⁵⁾ โดยในสภาวะที่มีน้ำตาลสูงจะมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของตัวรับเหล่านี้เช่นกัน ซึ่งในการศึกษาของ Jiang Z. และคณะ (2012)⁽⁹⁶⁾ ได้จำลองสภาวะเบาหวานในเซลล์สร้างเส้นใยเหนือกมนุษย์ โดยแบ่งเป็น (1) กลุ่มระดับน้ำตาลปกติที่ได้รับน้ำตาลกลูโคส 5.5 มิลลิโมลาร์ซึ่งเทียบเท่ากับความเข้มข้นของระดับน้ำตาลในกระแสเลือด 100 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร^(76, 97) (2) กลุ่มระดับน้ำตาลสูงที่ได้รับน้ำตาล 25 มิลลิโมลาร์ โดยเป็นกลุ่มที่จำลองสภาวะเบาหวาน จากนั้นติดตามผลใน 6-72 ชั่วโมงพบว่าในกลุ่มน้ำตาลสูงมีการแสดงออกของ TLR2 เพิ่มขึ้นในช่วงเวลา 24 ชั่วโมง และได้ทดสอบการแสดงออกของ NF- κ B TNF- α และ IL-1 β ในระดับโปรตีน พบว่าในช่วง 6 ชั่วโมงแรกกลุ่มน้ำตาลสูงจะเกิดการเพิ่มขึ้นเฉพาะ TNF- α แต่ในระยะเวลา 24 ชั่วโมงพบว่าการเพิ่มขึ้นของ NF- κ B TNF- α และ IL-1 β อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มระดับน้ำตาลปกติ จากนั้นได้ทำการยับยั้งการแสดงออกของยีนที่ระดับ RNA ของ PKC- α และ PKC- β ด้วย small interfering RNA (siRNA) พบว่าการลดการแสดงออกของ TLR2 และ NF- κ B ต่อมาได้ทำการยับยั้งการแสดงออกของ TLR2 พบว่าการลดการแสดงออกของ NF- κ B TNF- α และ IL-1 β ทำให้ทราบว่าระดับน้ำตาลกลูโคสที่สูงขึ้นจะเข้ามกระตุ้น TLR2 ให้มีการแสดงออกมากขึ้นผ่านการทำงานของ PKC- α และ PKC- β จากนั้น TLR2 จะเกิดการส่งสัญญาณผ่านทาง NF- κ B จึงมีการหลั่งของ TNF- α และ IL-1 β ในเซลล์สร้างเส้นใยเหนือกมนุษย์ ดังนั้นสามารถกล่าวได้ว่าการที่มีระดับน้ำตาลสูงขึ้นจะมีโอกาสทำให้เกิดการพัฒนาของโรคปริทันต์อักเสบในผู้ป่วยเบาหวานได้

นอกจากนี้ในการศึกษาของ Willershausen-Zonnchen B. และคณะ (1991)⁽⁹⁸⁾ ซึ่งได้ศึกษาผลการเพิ่มขึ้นของระดับน้ำตาลกลูโคสต่อการสร้างโปรตีน คอลลาเจน และไกลโคซามิโนไกลแคน (Glycosaminoglycans: GAGs) ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือก โดยให้น้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 5-50 มิลลิโมลาร์แก่เซลล์สร้างเส้นใยเหนือกมนุษย์เป็นเวลา 72 ชั่วโมงพบว่า ที่ระดับน้ำตาล 50 มิลลิโมลาร์ไม่มีผลต่อการสังเคราะห์โปรตีน และไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใยเหนือก แต่พบการสร้างคอลลาเจนลดลงเมื่อได้รับน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 25-50 มิลลิโมลาร์ โดยในกลุ่มที่ได้รับน้ำตาล 50 มิลลิโมลาร์พบการลดลงของ

คอลลาเจนถึงร้อยละ 60 เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับน้ำตาล 5 มิลลิโมลาร์ และพบการลดลงของ GAGs เมื่อได้รับน้ำตาลความเข้มข้น 5-20 มิลลิโมลาร์ ในการทดลองนี้พบว่าระดับน้ำตาลที่สูงขึ้นส่งผลต่อการลดลงของคอลลาเจนและ GAGs ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของส่วนเมทริกซ์ที่อยู่นอกเซลล์จึงอาจจะเป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดโรคปริทันต์อักเสบในผู้ป่วยเบาหวานได้

นอกจากนี้ในการศึกษาของ Li L. และคณะ (2019)⁽⁹⁹⁾ ซึ่งให้น้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 5.5 10 15 และ 25 มิลลิโมลาร์แก่เซลล์เคราติโนไซต์เป็นระยะเวลา 12-36 ชั่วโมง พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 5.5 10 15 มิลลิโมลาร์จะไม่ส่งผลกระทบต่อเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์ แต่ที่เวลา 36 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ที่ได้รับน้ำตาล 25 มิลลิโมลาร์เริ่มมีจำนวนเซลล์ลดลง และมีความเร็วในการเคลื่อนที่ของเซลล์ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มที่มีระดับน้ำตาลปกติ (5.5 มิลลิโมลาร์) จึงทำให้ทราบว่าระดับของน้ำตาลที่เพิ่มขึ้นส่งผลกระทบต่อเคลื่อนที่ของเซลล์เคราติโนไซต์ ซึ่งขั้นตอนนี้จะขั้นตอนที่สำคัญในระหว่างการสร้างเยื่อผิว (Re-epithelization) เมื่อเกิดความบกพร่องดังกล่าวจะทำให้ไม่เกิดการปิดแผล (Wound closure) ในผู้ป่วยเบาหวาน และจากการศึกษาของ Ho F.M. และคณะ (2000)⁽¹⁰⁰⁾ ซึ่งได้ศึกษาผลของสภาวะที่มีน้ำตาลสูงต่อเซลล์บุผนังหลอดเลือด (Endothelial cells) โดยให้น้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 5.5 19 และ 33 มิลลิโมลาร์ในระยะเวลา 24-48 ชั่วโมงพบว่า ในเซลล์ที่ได้รับน้ำตาล 19 และ 33 มิลลิโมลาร์มีการสร้าง H_2O_2 ที่เวลา 36 และ 48 ชั่วโมงซึ่งทำให้เซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis แต่เมื่อได้รับวิตามินซี 100 มิลลิโมลาร์ ซึ่งมีฤทธิ์ต้านการเกิดอนุมูลอิสระกลับไม่พบการตายของเซลล์ จึงทำให้ทราบว่าในระดับน้ำตาลที่สูงจะเพิ่มการสร้าง ROS และส่งผลให้มีการตายของเซลล์บุผนังหลอดเลือดซึ่งจะเพิ่มโอกาสในการเกิดภาวะแทรกซ้อนจากหลอดเลือดในผู้ป่วยเบาหวานได้ โดยสารต้านการเกิดอนุมูลอิสระจะช่วยลดโอกาสในการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ (Coronary artery disease) และช่วยให้หลอดเลือดทำงานได้ดีขึ้น จากการศึกษาที่ได้กล่าวไปทำให้ทราบว่าเมื่อมีน้ำตาลสูงขึ้นไปในเซลล์จะทำให้เกิดผลเสียต่อการทำหน้าที่ของเซลล์ ซึ่งสัมพันธ์กับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส ระยะเวลาที่ได้รับ และชนิดของเซลล์

จากการศึกษาของพริมา นูรณสินและคณะ (2018)⁽¹⁰¹⁾ ซึ่งได้ทดสอบการเพิ่มจำนวนและการเคลื่อนที่ของเซลล์สร้างเส้นใยเหนือกมนุษย์ที่ได้รับน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 5.5 มิลลิโมลาร์ซึ่งเป็นกลุ่มระดับน้ำตาลปกติ และในกลุ่มที่มีน้ำตาลเข้มข้นสูงได้แก่ 25 50 และ 75 มิลลิโมลาร์ พบว่าในระยะเวลา 6-48 ชั่วโมงในกลุ่มที่ได้รับน้ำตาล 50 และ 75 มิลลิโมลาร์ พบการเคลื่อนที่ของเซลล์สร้างเส้นใยเหนือกน้อยลงจึงส่งผลให้การหายของแผลช้าขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่น แต่ในช่วงเวลาเหล่านี้จะไม่พบความแตกต่างของการเพิ่มจำนวนเซลล์ ติดตามผลต่อไปอีก 24

ชั่วโมง (72 ชั่วโมงตั้งแต่ได้รับน้ำตาล) พบว่าในกลุ่มที่ได้รับน้ำตาล 50 และ 75 มิลลิโมลาร์มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ลดลงทั้งยังพบความเสียหายเกิดขึ้นต่อเซลล์ ในขณะที่กลุ่ม 25 มิลลิโมลาร์เกิดการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับกลุ่มระดับน้ำตาลปกติ รวมถึงศึกษาการแสดงออกของ Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) Heme oxygenase 1 (HO-1) SOD1 และ CAT ซึ่งเป็น Antioxidant Marker ที่สำคัญเพื่อศึกษาการเกิด ROS โดยพบว่ากลุ่มที่มีน้ำตาลเข้มข้นสูงจะสร้างความเครียดออกซิเดชัน เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของ marker ดังกล่าวในระดับ mRNA โดยพบว่ากลุ่มที่ได้รับน้ำตาล 50 และ 75 มิลลิโมลาร์มีการเพิ่มขึ้นของ ROS ภายในเซลล์ (Intracellular ROS) แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างทั้ง 2 กลุ่ม จากผลดังกล่าวนี้ทำให้ทราบว่า ROS มีความเกี่ยวข้องในการเกิดความบกพร่องของเซลล์ที่เกิดจากสภาวะน้ำตาลสูงทั้งในการเคลื่อนที่ การเพิ่มจำนวน และเกิดความเปราะบางต่อเซลล์ ต่อมาได้เติม N-acetyl-L-cysteine (NAC) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านการเกิดอนุมูลอิสระ โดยเมื่อเติม NAC 1 มิลลิโมลาร์แก่กลุ่มที่ได้รับน้ำตาล 50 มิลลิโมลาร์พบว่าสามารถยับยั้งความเสียหายต่อเซลล์ที่เกิดจากสภาวะน้ำตาลสูงได้ จึงเป็นการยืนยันว่าระดับน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูงจะยับยั้งการเคลื่อนที่ และการเพิ่มจำนวนของเซลล์ สร้างเส้นใยเหนียว ผ่านการสร้าง ROS ซึ่งหากมีระดับน้ำตาลเพิ่มขึ้นดังเช่นในผู้ป่วยเบาหวานจะมีแนวโน้มทำให้การหายของแผลในเนื้อเยื่อหึงอกช้าลง ทั้งนี้ทางผู้จัดทำได้นำมางานวิจัยดังกล่าวนี้ มาเป็นต้นแบบในการกำหนดความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสและระยะเวลาที่เซลล์ได้รับน้ำตาลดังกล่าว โดยกำหนดให้ระดับน้ำตาลกลูโคส 5.5 มิลลิโมลาร์เป็นกลุ่มความเข้มข้นปกติ และระดับน้ำตาลกลูโคส 50 มิลลิโมลาร์เป็นกลุ่มความเข้มข้นสูง เนื่องจากเซลล์สร้างเส้นใยเหนียวที่ได้รับน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ที่เวลา 72 ชั่วโมงพบการเคลื่อนที่ของเซลล์ที่ช้าลง เซลล์มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ลดลง และมีการเพิ่มของ ROS ภายในเซลล์ไม่ต่างจากกลุ่มที่ได้รับน้ำตาล 75 มิลลิโมลาร์ ดังนั้นจึงเลือกน้ำตาลกลูโคสที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์มาเป็นตัวแทนของสภาวะน้ำตาลสูงในเซลล์สร้างเส้นใยเหนียวเพื่อจำลองสภาวะเบาหวานในห้องปฏิบัติการ

ผลของโรคปริทันต์ที่ส่งผลต่อโรคเบาหวาน

แม้ว่ามีการศึกษาในมนุษย์ที่แสดงให้เห็นว่าการควบคุมโรคเบาหวาน โดยวัดจากระดับ HbA1c หรือระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดนั้นได้รับผลกระทบจากโรคปริทันต์ แต่ก็มีหลักฐานไม่มากพอที่สนับสนุนความน่าเชื่อถือทางชีวภาพดังกล่าว โดยผลกระทบของโรคปริทันต์อักเสบต่อการควบคุมโรคเบาหวานอาจเกิดจากการซึมผ่านของสารเหนียวนำการอักเสบ (Inflammatory mediator) จากเนื้อเยื่อปริทันต์เข้าสู่กระแสเลือดจึงทำให้เกิดการอักเสบในระบบ ซึ่งสารที่สำคัญระหว่างเนื้อเยื่อปริทันต์กับสมดุลของน้ำตาลกลูโคส ได้แก่ IL-6 TNF- α และ C-reactive protein

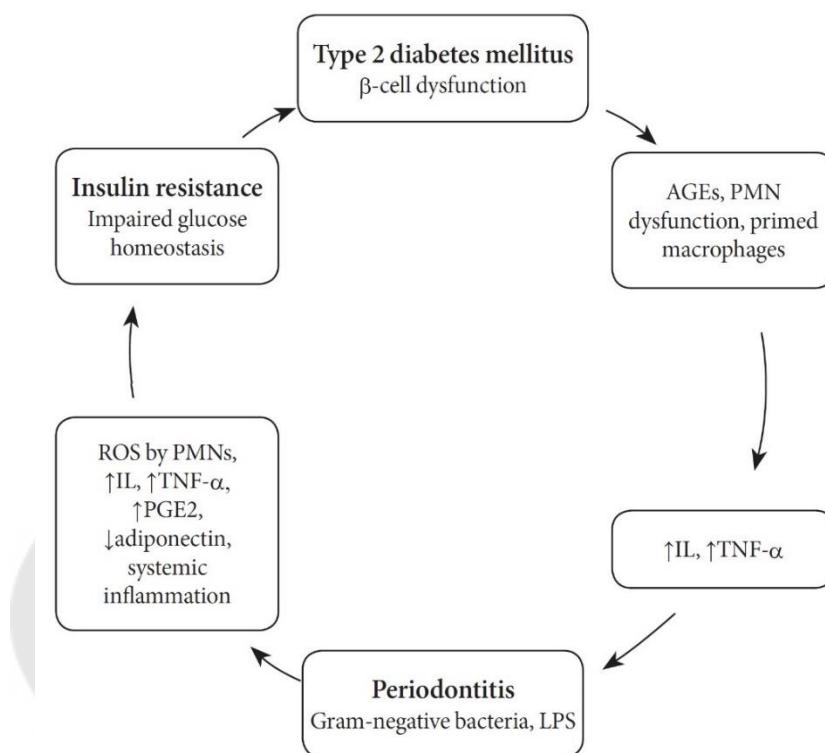
(CRP) รวมถึง oxygen radicals สุดท้ายทำให้เกิดความบกพร่องในการส่งสัญญาณของอินซูลิน (Insulin signaling) และเกิดภาวะดื้อต่ออินซูลิน⁽¹⁰²⁾ นอกจากนี้พบว่ามีแบคทีเรียจำนวนมากในโรคปริทันต์มีโอกาสเข้าสู่กระแสเลือดจึงเกิดภาวะที่มีแบคทีเรียในเลือด (Bacteremia) จากนั้นจึงมีการปล่อย LPS เข้าสู่ระบบหมุนเวียนเลือดทำให้เพิ่มการเกิดภาวะดื้อต่ออินซูลินได้เช่นกัน⁽⁸⁸⁾

การชูดหินน้ำลายและเกลารากฟันสามารถกำจัดเชื้อแบคทีเรียส่งผลให้มีการลดลงของสารเหนียวจากการอักเสบในกระแสเลือดในผู้ที่ไม่มีโรคประจำตัว เช่นเดียวกับผู้ที่เป็เบาหวานชนิดที่ 2 จากการศึกษาของ Sun WL. และคณะ (2011)⁽¹⁰³⁾ ซึ่งทำการสอนการดูแลช่องปาก ร่วมกับการรักษาด้วยวิธีการชูดหินน้ำลาย เกลารากฟัน ศัลย์ปริทันต์ และถอนฟันในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ที่ควบคุมระดับน้ำตาลสะสมในเลือดได้ไม่ดี และเป็นโรคปริทันต์เป็นระยะเวลา 3 เดือน โดยหลังการรักษาพบว่าการลดลงของค่าความลึกร่องลึกปริทันต์ (Probing depth: PD) ค่าการทำลายการยึดเกาะทางคลินิก (Clinical attachment loss: CAL) ค่าเลือดออกเมื่อหยั่งด้วยโพรบ (Bleeding index: BI) และค่าดัชนีคราบจุลินทรีย์ (Plaque index: PI) ในกระแสเลือดพบว่า ค ่า High-sensitivity C reactive protein (hsCRP) TNF- α IL-6 Fasting plasma glucose HbA1c Fasting insulin (FINS) และ homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR index) ลดลง และ adiponectin เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการรักษา ($p < 0.05$ หรือ $p < 0.01$)

เป็นที่ทราบกันดีว่าในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบนั้นจะมีปริมาณไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องต่อการอักเสบสูงมากกว่าคนที่ไม่มีโรค เช่น TNF- α ซึ่ง TNF- α จะสัมพันธ์กับภาวะดื้อต่ออินซูลิน เนื่องจาก TNF- α สามารถเหนี่ยวนำให้มีการเติมหมู่ฟอสเฟตของ serine (Serine phosphorylation) ใน insulin receptor substrate-1 (IRS-1) ผ่านทางการยับยั้งเอนไซม์ serine phosphatases หรือกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ serine kinases ให้ออกฤทธิ์มากกว่า protein kinase C การเติมหมู่ฟอสเฟตของ serine ที่เพิ่มขึ้นนี้จะยับยั้งการเติมหมู่ฟอสเฟตของ tyrosine (Tyrosine phosphorylation) ใน IRS-1 และทำให้การทำงานของอินซูลินบกพร่องจึงเกิดการภาวะดื้อต่ออินซูลินในที่สุด⁽¹⁰⁴⁾

จากที่กล่าวมาข้างต้นทำให้ทราบว่าเมื่อเป็นโรคเบาหวานแล้วจะส่งผลต่อกระบวนการอักเสบ และการทำงานของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน เมื่อมีการสะสมของแบคทีเรียในอวัยวะปริทันต์จึงทำให้เกิดการติดเชื้อขึ้นได้ ซึ่งการตอบสนองของภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นจะนำไปสู่การทำลายอวัยวะปริทันต์จนเกิดเป็นโรคปริทันต์อักเสบ ในทางกลับกันเมื่อเป็นโรคปริทันต์อักเสบแล้วจะมีการหลั่งสารเหนียวจากการอักเสบออกมาในกระแสเลือดส่งผลให้เกิดภาวะ

ดื้อต่ออินซูลิน และมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงขึ้นจึงเกิดเป็นโรคเบาหวานได้ ดังนั้นจึงทำให้ทราบว่าความสัมพันธ์ระหว่างโรคเบาหวานและโรคปริทันต์เป็นความสัมพันธ์แบบสองทาง (Two-way relationship)^(93, 102, 105) ดังภาพประกอบ 7



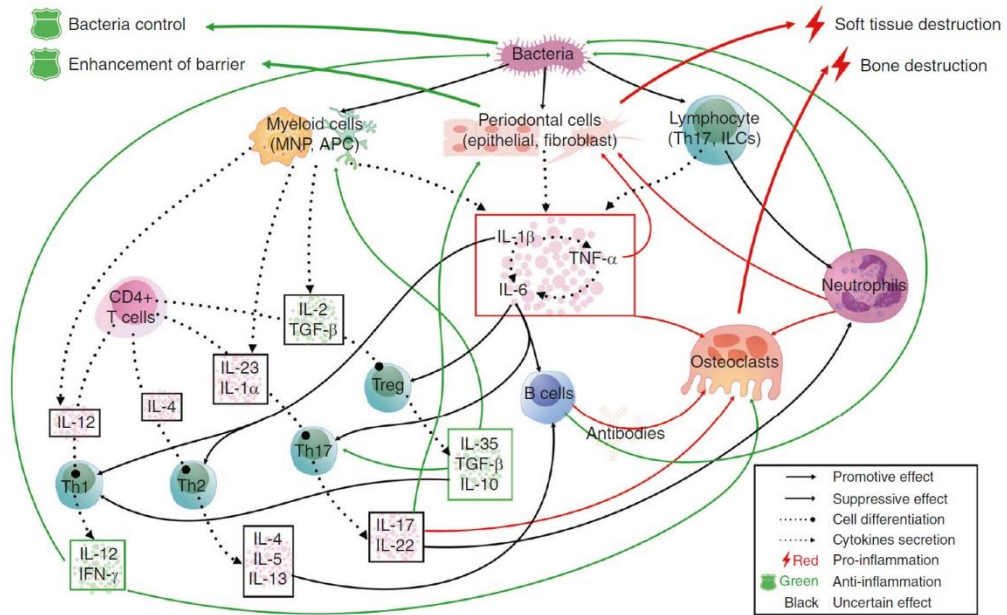
ภาพประกอบ 7 แผงผังแสดงความสัมพันธ์ระหว่างโรคเบาหวานและโรคปริทันต์อักเสบ⁽¹⁰⁵⁾

โรคปริทันต์อักเสบ

โรคปริทันต์อักเสบเป็นโรคที่มีการอักเสบ (Inflammation) ของเหงือก พบการทำลายของเอ็นยึดปริทันต์และเกิดการสลายของกระดูกที่รองรับฟัน โรคปริทันต์เป็นโรคที่มีการอักเสบเรื้อรังพบมากเป็นอันดับที่ 6 ของโลก⁽¹⁰⁶⁾ ซึ่งมีการแพร่กระจายอย่างกว้างขวาง จากผลการสำรวจสุขภาพและโภชนาการโดยการตรวจร่างกายระดับชาติของสหรัฐอเมริกา (National Health and Nutrition Examination Survey: NHANES)⁽¹⁰⁷⁾ พบว่าประชากรสหรัฐอเมริกามากกว่า 64.7 ล้านคน และประชากรทั่วโลกมากกว่า 700 ล้านคน หรือคิดเป็นร้อยละ 11 ของประชากรโลกทั้งหมดเป็นโรคปริทันต์อักเสบขั้นรุนแรง ซึ่งส่งผลต่อคุณภาพชีวิตจึงก่อให้เกิดภาวะทางสังคมและเศรษฐกิจอย่างมาก จากผลการสำรวจสุขภาพช่องปากแห่งชาติ ครั้งที่ 8 พ.ศ. 2560 ของกองทันตสาธารณสุข กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข⁽¹⁰⁸⁾ โดยใช้ดัชนีสำรวจปริทันต์ทางชุมชน

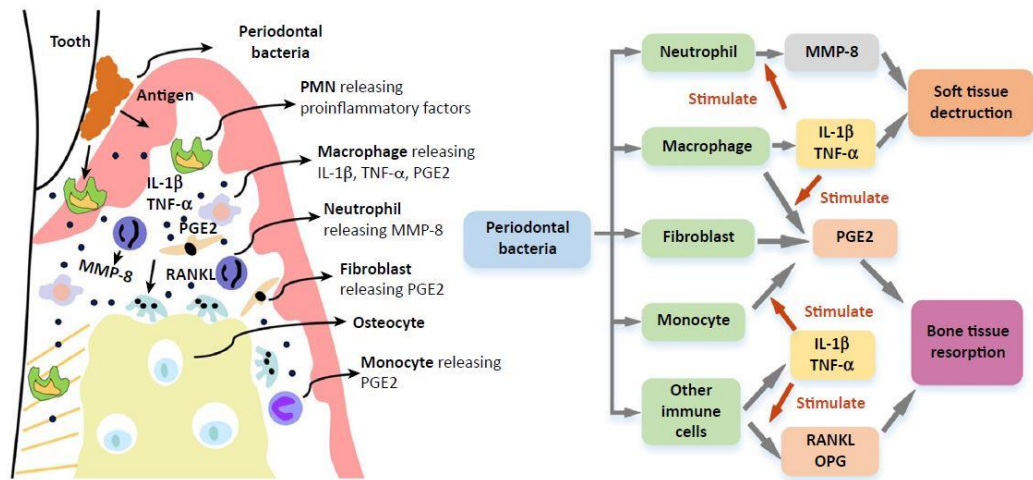
(Community periodontal index: CPI) พบว่าประชากรไทยในกลุ่มวัยทำงาน (35-44 ปี) เป็นโรคปริทันต์ที่มีร่องลึกระดับ 4-5 มิลลิเมตร พบได้ร้อยละ 19.8 และที่ร่องลึกระดับ 6 มิลลิเมตรขึ้นไป พบร้อยละ 6.1 และพบเพิ่มขึ้นในกลุ่มผู้สูงอายุ (60-74 ปี) ซึ่งผู้สูงอายุจำนวน 1 ใน 3 หรือร้อยละ 36.3 มีการอักเสบและการทำลายของอวัยวะปริทันต์ที่อยู่รอบฟัน โดยร้อยละ 12.2 มีสภาวะปริทันต์อักเสบรุนแรง โดยในกลุ่มนี้มีฟันเหลืออยู่ในช่องปากเฉลี่ย 4 ใน 6 ส่วนต่อคน (4 sextants)

โรคปริทันต์เกิดจากหลายสาเหตุ (Multifactorial disease) โดยกระบวนการในการเกิดโรคเกิดจากปฏิกริยาระหว่างเชื้อโรคบางชนิดในคราบจุลินทรีย์ (Dental plaque) กับภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Host response) ทำให้เกิดภาวะที่ไม่สมดุล (Dysbiosis) โดยพบแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์ (Periodontal pathogen) สะสมอยู่บริเวณร่องเหงือกซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม red complex ประกอบด้วย *Pg* *Td* และ *Tf* ร่วมกับแบคทีเรียแกรมลบที่ไม่ต้องใช้ออกซิเจน (Gram-negative anaerobic bacteria) ได้แก่ *Pi* และ *Aa* ในคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือก (Subgingival biofilm)^(29, 30) จึงมีการปล่อยสารพิษของเชื้อ (Endotoxin) และเศษแบคทีเรีย (Bacteria debris) ได้แก่ LPS Diacyl lipopeptides เพปติโดไกลแคน (Peptidoglycan) แฟล็กเจลลิน (Flagellin) และดีเอ็นเอของแบคทีเรีย (Bacterial DNA) ผ่านทาง Toll-like receptor^(95, 109) เพื่อกระตุ้นให้เกิดการรวมกันของ Mononuclear phagocytes (MNPs) หรือ แมคโครฟาจ Antigen presenting cells (APCs) และ specific T cell subsets เช่น เฮลเปอร์ทีเซลล์ชนิดที่ 17 (Type 17 helper T cells: Th17 cells) นอกจากนี้ยังกระตุ้นเซลล์เยื่อเมือก (Mucosal epithelial cells) และเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกให้เกิดการหลั่งสารสื่อการอักเสบหรือไซโตไคน์ในกลุ่ม IL-1 family IL-6 family และ TNF- α family ซึ่งมีผลต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว (Lymphocyte) โดยทำให้เกิดการรวมตัว (Recruitment) การทำงาน (Activation) และการเปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่เฉพาะ (Differentiation) อีกทั้งสามารถทำลายเนื้อเยื่อได้ ดังนั้นไซโตไคน์เหล่านี้จึงได้รับการยกย่องว่าเป็นไซโตไคน์ที่มีบทบาทสำคัญในการเหนี่ยวนำให้เกิดขบวนการอักเสบ (Pro-inflammatory cytokine) จากนั้นจึงเกิดการกระตุ้น naïve T cell ให้เปลี่ยนเป็นเฮลเปอร์ทีเซลล์ชนิด Th1 Th2 Th17 และ regulatory T cells (Treg) พร้อมกับกระตุ้นเซลล์บี (B cell) ให้เปลี่ยนเป็นเซลล์พลาสมา (Plasma cell) นอกจากนี้ยังกระตุ้นการทำงานของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก เซลล์สลายกระดูก และนิวโทรฟิลจึงผลให้เกิดการตอบสนองในเชิงส่งเสริมฤทธิ์กระตุ้นการอักเสบ (Pro-inflammatory effect) โดยมีการทำลายเนื้อเยื่ออ่อนและกระดูก พร้อมทั้งส่งเสริมฤทธิ์ต่อต้านการอักเสบ (Anti-inflammatory effect) โดยทำลายเชื้อก่อโรคและเพิ่มการป้องกันในชั้นเยื่อเมือก จากที่กล่าวไปนั้นทำให้ทราบว่าการทำงานของไซโตไคน์มีส่วนเกี่ยวข้องต่อการอักเสบที่เกิดขึ้นได้^(3, 110) ดังแสดงในภาพประกอบ 8



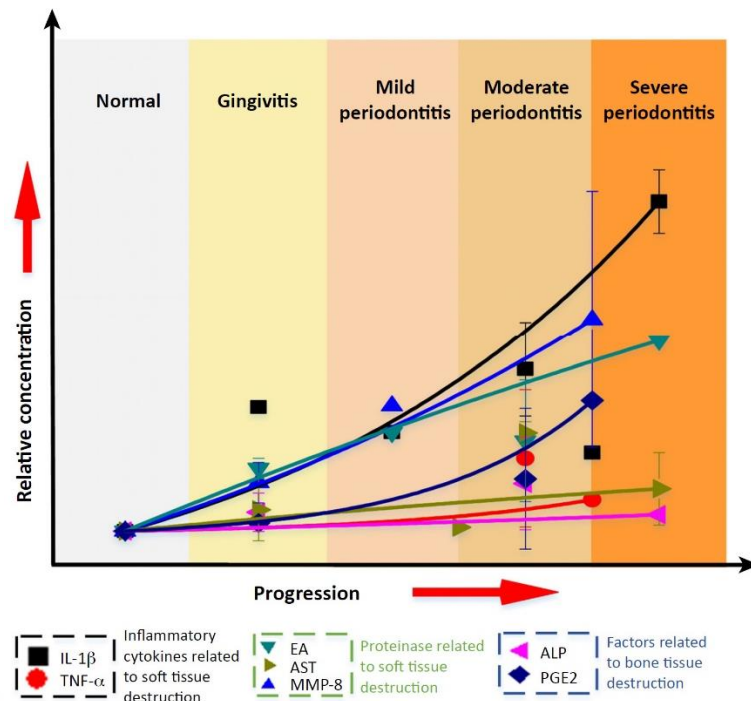
ภาพประกอบ 8 การทำงานของระบบไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับพยาธิกำเนิด (Pathogenesis) ของการเกิดโรคปริทันต์⁽³⁾

ในระยะเวลาที่มีการเกิดเหงือกอักเสบจะมีการทำลายของเนื้อเยื่ออ่อน (Periodontal soft tissue destruction) พบเหงือกมีลักษณะบวมแดง และมีเลือดออกเมื่อหยั่งด้วยโพรบ (Bleeding on probing: BOP) โรคเหงือกอักเสบสามารถกลับมาเป็นเหงือกสุขภาพดีได้หากรักษาสุขภาพอนามัยช่องปากได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากการกำจัดคราบจุลินทรีย์ในสภาวะที่เป็นเหงือกอักเสบนี้จะทำให้เกิดสภาวะสมดุลระหว่างเชื้อแบคทีเรียก่อโรคกับภูมิคุ้มกันของร่างกายในเนื้อเยื่อปริทันต์ (Host-microbe homeostasis) ส่งผลให้เกิดการตอบสนองของร่างกายอย่างจำกัด และเฉพาะที่โดยไม่เกิดความเสียหายต่ออวัยวะปริทันต์อย่างถาวร ซึ่งจะพบว่าการอักเสบเพียงเล็กน้อย (Mild inflammation) จากภาพประกอบ 9 ในระยะที่เกิดเหงือกอักเสบ นิวโทรฟิลและแมคโครฟาจจะเข้ามาทำลายแบคทีเรีย โดยมีการปล่อยไซโตไคน์ เช่น IL-1 β และ TNF- α รวมถึงเอนไซม์ย่อยโปรตีน (Proteases) เช่น เอนไซม์อีลาสเทส (Elastase: EA) เอนไซม์แคสพาเซต อะมิโนทรานเฟอเรส (Aspartate aminotransferase: AST) MMP-8 และ PGs ทำให้คอลลาเจน และไฟโบรเนคติน (Fibronectin) ถูกทำลายจึงเกิดการทำลายเนื้อเยื่ออ่อนได้ ซึ่งการพบไซโตไคน์และเอนไซม์เหล่านี้ อาจเป็นตัวชี้วัด (Biomarker) ของการวินิจฉัยแยกโรค การดำเนินโรค และการกลับมาเป็นซ้ำของโรคปริทันต์อักเสบได้⁽¹¹¹⁾



ภาพประกอบ 9 การตอบสนองของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อก่อโรคปริทันต์โดยมีการหลั่งไซโตไคน์และเอนไซม์ย่อยโปรตีน⁽¹¹¹⁾

เมื่อผู้ป่วยไม่ได้รับการรักษาจะเกิดการดำเนินโรคต่อไปทำให้มีการทำลายของอวัยวะปริทันต์ และเกิดการสลายของกระดูกเบ้าฟัน สุดท้ายจะพบฟันโยกและสูญเสียฟันในที่สุด⁽³⁰⁾ โดยจะมีการเพิ่มขึ้นของ $\text{TNF-}\alpha$ และ $\text{IL-1}\beta$ ซึ่งส่งเสริมให้มีการสลายของกระดูก จากนั้นจะกระตุ้นให้มีการหลั่งปัจจัยต่าง ๆ ที่มาส่งเสริมขบวนการสร้างเซลล์สลายกระดูก (Osteoclastogenesis) ได้แก่ Pyridinoline crosslinked C-terminal telopeptide of type I collagen RANKL และ OPG ซึ่งพบได้ในน้ำเหลืองเหงือก ในขณะที่เดียวกันพบว่ามีระดับของ PGE_2 และอัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส (Alkaline phosphatase: ALP) สูงขึ้นดังในภาพประกอบ 10 ซึ่งสัมพันธ์กับการอักเสบของอวัยวะปริทันต์และสามารถบ่งบอกถึงการทำลายของกระดูกได้ นอกจากนี้ยังพบว่าโรคปริทันต์อักเสบทำให้มีการหลั่งสารเหนี่ยวนำการอักเสบในเลือดมากขึ้นจึงเกิดการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันทั่วร่างกาย (Systemic inflammatory response) ได้^(111, 112)



ภาพประกอบ 10 การเปลี่ยนแปลงของไซโตไคน์และเอนไซม์จากเหงือกปกติ
สู่การเกิดโรคปริทันต์⁽¹¹¹⁾

(EA: elastase, AST: aspartate aminotransferase, MMP-8 : matrix metalloproteinases-8, ALP: alkaline phosphatase, PGE2: prostaglandins E2)

ในเนื้อเยื่อปริทันต์ประกอบด้วยเซลล์จำนวนมาก ได้แก่ เซลล์สร้างเส้นใยเหงือก เซลล์เยื่อ
บุผิวเหงือก เซลล์โมโนไซต์ และ PMN ซึ่งเซลล์ทั้งหมดล้วนมีความเกี่ยวข้องในกระบวนการอักเสบ
โดยเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกจะทำหน้าที่ป้องกันทางกายภาพ (Physical barrier) และเป็น
องค์ประกอบหลักในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือกจึงเปรียบเสมือนเป็นโครงสร้างหลักให้กับเนื้อเยื่อ
ปริทันต์ เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกพัฒนามาจากเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ (Mesenchymal
stem cell) มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการเสื่อมสภาพของเซลล์ (Cell degradation) การตายของ
เซลล์แบบ necrosis การเกิดความบกพร่องของเนื้อเยื่อและกระดูก อีกทั้งยังสามารถซ่อมแซม
ตัวเองได้ (Self-healing) และแบ่งตัวเพื่อสร้างเซลล์ตัวเองใหม่ได้ (Self-renew) นอกจากนี้ยังทำให้
เกิดการรวมตัวของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน (Immune cell) ซึ่งนำไปสู่การอักเสบที่เกี่ยวข้องต่อ
การดำเนินไปของโรคปริทันต์^(2, 113)

ในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์มีไซโตไคน์จากเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน และเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์เองเข้ามาควบคุมการทำงานที่ต่าง ๆ ซึ่งหลังจากที่เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ได้รับการกระตุ้นด้วย TNF- α และ IL-1 β พบว่าเซลล์มีความสามารถในการสร้าง TNF- α IL-1 β IL-6 IL-8 และ PGE 2 เนื่องจากพบว่ามี TNF- α และ IL-1 β ในน้ำเหลืองเหงือกและเนื้อเยื่อปริทันต์ ดังนั้นเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์จึงทำหน้าที่เป็นเซลล์เป้าหมายของไซโตไคน์ในระหว่างที่มีการเกิดเหงือกอักเสบ โดยพบว่าเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์สามารถเพิ่มตัวรับของ IL-1 (Interleukin -1 receptor) บนผิวเซลล์ในเหงือกที่มีการอักเสบเมื่อเทียบกับเหงือกสุขภาพดี⁽¹¹⁴⁾ นอกจากนี้เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ยังมีบทบาทสำคัญในการควบคุมสมดุลระหว่างการสร้าง และการสลายเมทริกซ์ที่อยู่นอกเซลล์ที่ประกอบด้วยคอลลาเจน ซึ่งถ้าหากมีการเปลี่ยนแปลงสมดุลนี้จะนำไปสู่การเกิดพยาธิสภาพ ดังเช่นพบการทำลายของเหงือก และกระดูกในโรคปริทันต์อักเสบ⁽¹¹⁵⁾

จากที่กล่าวมาข้างต้นพบว่าไซโตไคน์เข้ามามีบทบาทสำคัญในการดำเนินโรคปริทันต์ ซึ่งถือว่าเป็นด่านแรกที่เข้ามาตอบสนองต่อเชื้อก่อโรค และทำหน้าที่ส่งสัญญาณไปยังเซลล์เม็ดเลือดขาว และเซลล์อื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องในระบบภูมิคุ้มกันซึ่ง TNF- α และ IL-1 β เป็นไซโตไคน์ที่มีความเกี่ยวข้องทั้งในส่วนของอวัยวะปริทันต์ และทั้งระบบร่างกาย ทั้งคู่ได้รับการยอมรับว่าเป็นไซโตไคน์ที่มีบทบาทสำคัญในการเหนี่ยวนำให้เกิดขบวนการอักเสบซึ่งมีคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์ที่มาทำลายเนื้อเยื่อ (Tissue-degradation proteinase) กระตุ้นให้มีการทำลายของเนื้อเยื่อปริทันต์ และการสลายของกระดูก ดังนั้นหากมีสารชีวภาพที่มีฤทธิ์ยับยั้งหรือทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของระดับ TNF- α และ IL-1 β ในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก และไม่เกิดผลข้างเคียงอาจจะมีผลในการลดความรุนแรงและยับยั้งการเกิดโรคปริทันต์อักเสบได้

ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา

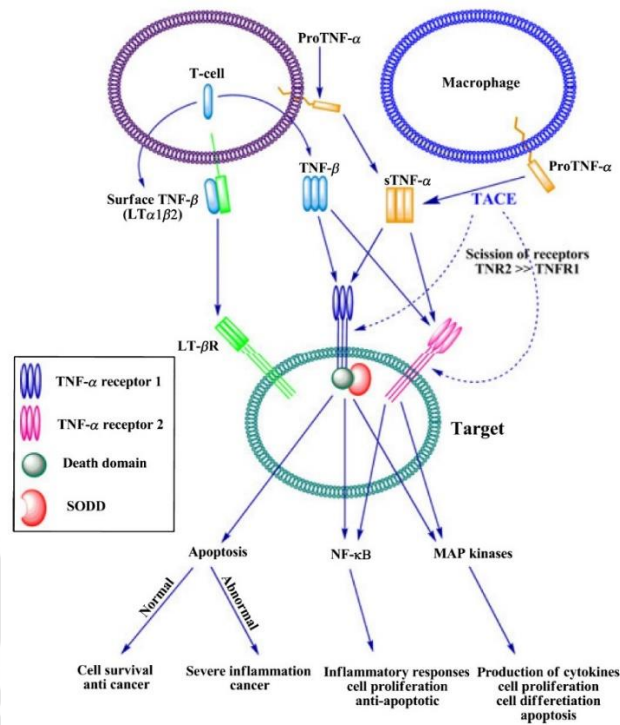
ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา (Tumor necrosis factor alpha: TNF- α หรือ cachectin) เป็นไซโตไคน์ที่มีบทบาทสำคัญในการเหนี่ยวนำให้เกิดขบวนการอักเสบ ถูกค้นพบในช่วงปลาย ค.ศ.1970⁽¹¹⁶⁾ พบว่าเป็นไซโตไคน์ที่ผลิตจากเซลล์ภูมิคุ้มกัน และมีบทบาทในการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ต่อมามีการศึกษาอย่างกว้างขวางทำให้ทราบบทบาทของ TNF- α ทั้งในสภาวะปกติ เช่น การพัฒนาของร่างกายและระบบภูมิคุ้มกัน และบทบาทในสภาวะที่มีพยาธิสภาพ เช่น การอักเสบ การเกิดมะเร็ง (Tumorigenesis) ภาวะต่อต้านอวัยวะใหม่ (Transplant rejection) ภาวะช็อกจากการติดเชื้อ (Septic shock) การเพิ่มจำนวนของไวรัส (Viral

replication) การสลายของกระดูก โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (Rheumatoid arthritis) และเบาหวาน จึงเปรียบเทียบการทำงานของ TNF- α ได้เหมือนกับตาบอดสองคม⁽³¹⁾

แหล่งกำเนิด

TNF- α ถูกสร้างจากเซลล์ที่เกี่ยวข้องในระบบภูมิคุ้มกัน เมื่อมีการตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้น โดยมีเซลล์หลักได้แก่ โมโนไซต์/แมคโครฟาจ และพบได้ใน เซ็นเคเซลล์ (Natural killer cells: NK cells) เซลล์คัพเฟอร์ (Kupffer cells) เซลล์บี เซลล์ที เบซิฟิล (Basophils) อีโอสิโนฟิล (Eosinophils) เซลล์ค้ำจุนระบบประสาท (Glial cells) และเซลล์แมสต์ (Mast cells) ส่วนเซลล์ที่ไม่ได้เกี่ยวข้องในระบบภูมิคุ้มกัน (Non-immune cell) ได้แก่ แอสโตรไซต์ (Astrocytes) เซลล์แกรนูโลซา (Granulosa cells) เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ (Cardiac myocytes) เซลล์ประสาท (Neurons) เซลล์สร้างเม็ดสีเยื่อบุจอประสาทตา (Retinal pigment epithelial cells) เซลล์กล้ามเนื้อเรียบ (Smooth muscle cells) เซลล์สร้างอสุจิ (Spermatogenic cells) เซลล์มะเร็ง (Tumor cells) เซลล์สร้างกระดูก เซลล์สร้างเส้นใย และเซลล์เคราติโนไซต์ โดยมีสิ่งกระตุ้น (Stimuli) ได้แก่ LPS ในเซลล์โมโนไซต์ T-cell receptor activation ในเซลล์ที การเชื่อมโยง (Crosslinking) ของ surface immunoglobulin (sIg) ในเซลล์บี รังสีอัลตราไวโอเล็ต (Ultraviolet light) ในเซลล์เยื่อบุผิว และไวรัส (Viral infections)^(32, 117)

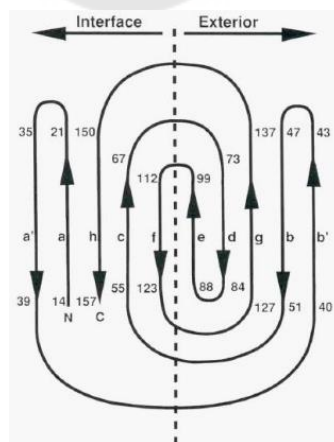
ยีนของ TNF- α อยู่ในตำแหน่ง Major histocompatibility complex (MHC region) ซึ่งเป็นบริเวณที่เป็นที่ตั้งของกลุ่มยีนที่อยู่บนโครโมโซม 6p21.3⁽¹¹⁸⁾ โปรตีน TNF- α เริ่มแรกถูกสังเคราะห์จาก type II transmembrane precursor ในบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (Plasma membrane) เกิดเป็น Pro-TNF- α (Membrane-bound protein) ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 26 กิโลดัลตัน ซึ่งมีส่วนปลายอะมิโน (N-terminus) อยู่ภายในไซโตพลาสซึม และส่วนปลายคาร์บอกซิล (C-terminus) อยู่บริเวณนอกเซลล์ จากนั้นจะมีการแยกโปรตีน (Proteolytic cleavage) ระหว่าง alanine-66 และ valine-67 โดยใช้ เอนไซม์ TNF-converting enzyme (TACE) หรือ a disintegrin and metalloprotease containing enzyme (ADAM) 17 หรือ CD156q เกิดเป็น Mature TNF หรือ soluble TNF (sTNF) ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 17 กิโลดัลตัน ซึ่งเป็นรูปแบบที่สามารถออกฤทธิ์ได้ (Active form) จากนั้น sTNF เข้าไปจับกับตัวรับแล้วเข้าสู่เซลล์เป้าหมาย⁽¹¹⁹⁾ ดังภาพประกอบที่ 11



ภาพประกอบ 11 การสร้าง TNF- α จากเซลล์ต้นกำเนิด⁽¹¹⁹⁾

โครงสร้าง

โครงสร้างของ TNF- α มีลักษณะเป็น trimeric molecule หรือ homotrimer ซึ่งแต่ละหน่วย (Subunit) ประกอบด้วย β -sheet 10 สายที่เรียงตัวไม่ขนานกัน (Antiparallel β -sandwich) จากนั้นแต่ละหน่วยมาเรียงต่อกันในลักษณะหัวต่อหางเพื่อสร้างเป็นโครงสร้าง trimer ที่มีลักษณะคล้ายระฆัง (Bell-shaped homotrimers)⁽¹²⁰⁾ ตามภาพประกอบ 12



ภาพประกอบ 12 โครงสร้างของ TNF- α ⁽¹²⁰⁾

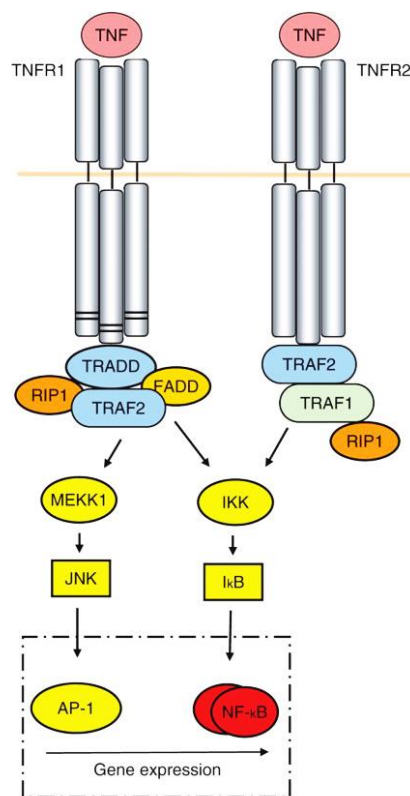
การควบคุมการแสดงออกและตัวรับของ TNF- α

TNF- α ทำงานโดยการจับกับ TNF receptor (Type III receptor) เป็นตัวรับไซโตไคน์ที่เป็นส่วนหนึ่งของกลุ่มตัวรับไซโตไคน์กลุ่มใหญ่ มีรูปร่างเป็น trimer และมี conserved cysteine residues จำนวนมาก (Conserved cysteine-rich extracellular domain) โดยทั่วไปตัวรับของ TNF- α มีอยู่ 2 ชนิด คือ TNF receptor type I (TNFR1) หรือ p55 receptor มีโมเลกุลขนาด 55 กิโลดาลตัน โดยจะพบ death domain ได้ภายในเซลล์ ตัวรับชนิดนี้พบได้ในเซลล์เกือบทุกประเภทและเป็นตัวรับที่ทำหน้าที่หลักของ TNF- α ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับความเป็นพิษต่อเซลล์ การเพิ่มจำนวนของสร้างเส้นใย การสังเคราะห์ PGE₂ และฤทธิ์ต้านไวรัส และตัวรับอีกชนิดคือ TNF receptor type II (TNFR2) หรือ p75 receptor มีโมเลกุลขนาด 75 กิโลดาลตัน พบเฉพาะในเซลล์โอลิโกเดนโดรไซต์ (Oligodendrocytes) เซลล์แอสโตรไซต์ (Astrocytes) เซลล์กล้ามเนื้อ (Myocytes) เซลล์ที่จากต่อมไทมัส (Thymocytes) เซลล์บุผนังหลอดเลือด เซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ และเซลล์ที่ โดยตัวรับชนิดนี้ไม่พบ death domain ภายในเซลล์

ตัวรับของ TNF- α จะไม่สามารถทำให้เกิดการตอบสนองทางชีวภาพ (Biologic response) ด้วยการทำงานของตัวรับเพียงอย่างเดียว แต่ต้องอาศัยการจับกันระหว่าง Adaptor protein ที่อยู่ภายในเซลล์เกิดเป็น receptor complex เพื่อกระตุ้นให้เกิดการทำงานภายในเซลล์ต่อไป โดย adaptor protein แบ่งเป็น 2 กลุ่มที่ต่างกัน ได้แก่

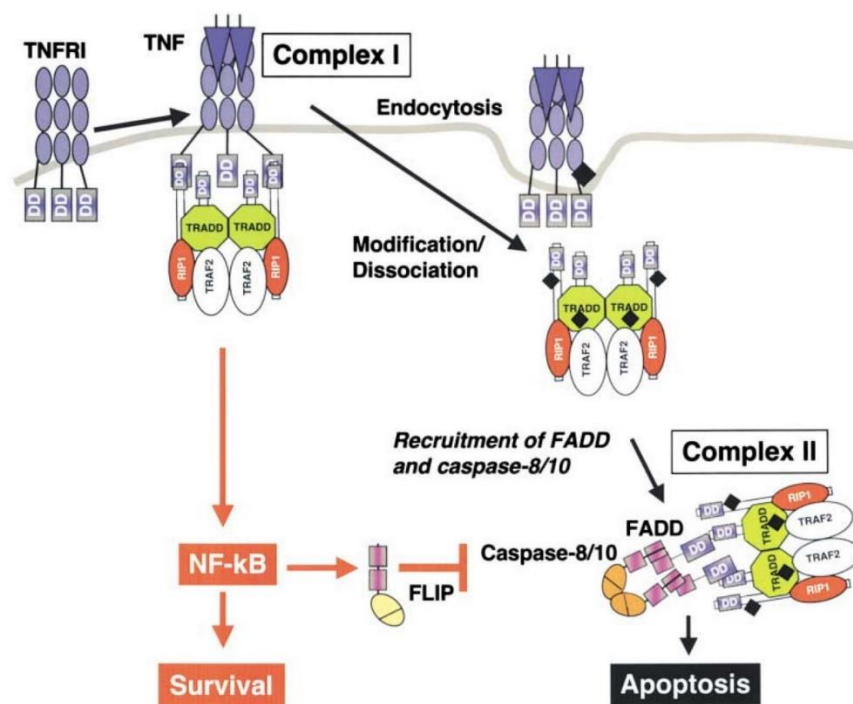
1. กลุ่มที่มี Death domain เช่น TRADD และ Fas-associated protein with a dead domain (FADD) พบอยู่ภายในเซลล์ซึ่งจะเหนี่ยวนำให้มีการตายของเซลล์
2. กลุ่มที่ไม่มี Death domain เช่น TRAF ซึ่งจะทำงานทางตรงผ่าน TIM domain หรือทำงานทางอ้อมร่วมกับ adaptor protein ชนิดอื่นที่เป็นตัวกลาง

หากว่าตัวรับจับกับ adaptor protein ดังกล่าวจะกระตุ้นให้เกิดการทำงานที่ต่างกันได้ นำไปสู่การกระตุ้นการส่งสัญญาณผ่านทาง NF- κ B หรือ AP-1 เช่นเดียวกับการกระตุ้น death domain ที่ทำให้เกิดกระบวนการตายของเซลล์แบบ apoptosis หรือ necrosis⁽¹²¹⁾



ภาพประกอบ 13 การจับกับตัวรับของ TNF- α และการส่งสัญญาณผ่าน adaptor protein⁽⁷⁰⁾

ในภาพประกอบที่ 13 เมื่อ TNF- α มาจับกับตัวรับ TNFR1 และ TNFR2 ที่อยู่ในรูปของ trimerization จะเกิดการส่งสัญญาณให้ TRADD เข้ามาจับ จากนั้น TRADD จะเหนี่ยวนำให้มีการรวมกันของ RIP-1 FADD และ TRAF-2 จากนั้น TRAF-2 จะเหนี่ยวนำ TRAF-1 เพื่อกระตุ้นให้มีการทำงานของ IKK complex สุดท้ายจึงเกิดการส่งสัญญาณผ่านทาง NF- κ B นอกจากนี้ TNFR-1 สามารถกระตุ้นผ่านอินเตอร์มีเดียทโปรตีน (Intermediate protein) MEKK-1 และ JNK ทำให้เกิดการ ทำงานของ AP-1 อีกทั้งยังพบว่าการเกิดการส่งสัญญาณแทรกข้าม (Crosstalk) ระหว่าง MEKK-1 กับ RIP-1 หรือ TRAF-2 จึงทำให้มีการทำงานของ IKK complex ต่อไป ดังนั้นจะเห็นว่าตัวรับทั้ง TNFR1 และ TNFR2 สามารถที่จะทำให้เกิดการทำงานของทรานสคริปชันแฟกเตอร์ของ NF- κ B ได้ทั้งคู่^(70, 121)

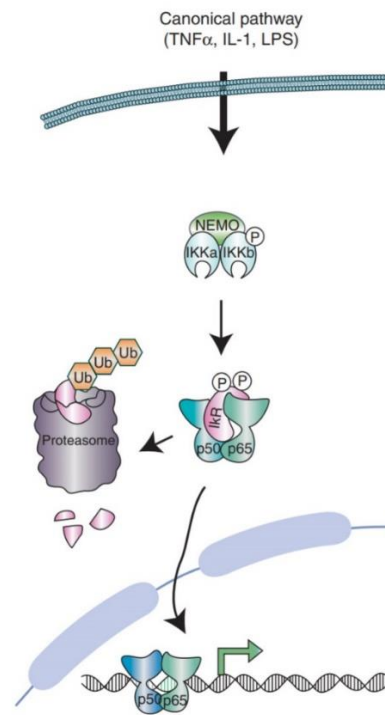


ภาพประกอบ 14 การทำงานของตัวรับชนิด TNF type I (TNFR1)⁽¹²²⁾

การทำงานของ TNFR1 จะเกี่ยวข้องกับ TNF receptor signaling complex ที่ต่างกัน 2 รูปแบบ ดังในภาพประกอบที่ 14 คือ

Complex I เกิดจาก TNFR1 ส่งสัญญาณให้มีการรวม TRADD RIP-1 และ TRAF2 มีผลให้เกิดการกระตุ้นการแตกตัวของ IKK complex จึงเกิดการทำงานของ NF-κB ดังที่กล่าวไปข้างต้น ส่งผลให้มีการเพิ่มการแสดงออกของยีนจึงทำให้เซลล์มีชีวิตรอดอยู่ (Anti-apoptosis) และเกิดการตอบสนองต่อการอักเสบขึ้นได้ นอกจากนี้ยังพบว่ามีการรวมกันของ inhibitor of apoptosis proteins (IAP) ซึ่งส่งผลให้กลไกนี้ทำงานได้ดีขึ้น

Complex II เกิดการเปลี่ยนแปลงให้ TRADD และ RIP-1 แยกตัวออกจาก TNFR1 จากนั้นจึงมาจับกับ FADD เพื่อไปกระตุ้น caspase-8/10 ทำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis ขึ้นได้ และเมื่อมีการทำงานของ NF-κB จะทำให้เกิดการย้าย FLICE (FADD-like IL-1β-converting enzyme)-inhibitory protein หรือ FLIP เข้าไปยัง complex II เพื่อยับยั้งการทำงานของ caspase-8/10 จึงทำให้เซลล์มีชีวิตรอด (Cell survival) ต่อไป⁽¹²²⁾



ภาพประกอบ 15 การทำงานของ TNF- α ที่เหนี่ยวนำให้มีการอักเสบ ผ่านการทำงานของวิถีการส่งสัญญาณ NF- κ B⁽¹²³⁾

โดยทั่วไปแล้ว I κ B α (Inhibitory κ B α) จะจับกับ NF- κ B (RelA หรือ P65 และ P50) ในบริเวณไซโตพลาสซึม จากภาพประกอบ 15 เมื่อ TNF- α จับกับตัวรับ TNFR1 จึงส่งสัญญาณมายัง RIP1 TRADD และ TRAF2 ที่อยู่ภายในไซโตพลาสซึมทำให้กระตุ้นการสร้างโมเลกุล I κ B kinase หรือ IKK complex ซึ่งประกอบด้วยโปรตีน 3 ชนิด ได้แก่ IKK- α IKK- β และ NF- κ B essential modulator (NEMO) ผ่านการทำงานของเอนไซม์ NF- κ B inducing kinase (NIK) ซึ่งจะเหนี่ยวนำให้มีการเติมหมู่ฟอสเฟต และการเติมโปรตีนยูบิควิตินที่โมเลกุลของ I κ B α ของ IKK- β จากนั้น I κ B α จึงปล่อย NF- κ B อีสาระ ทั้งส่วนของ RelA และ P50 เข้าไปสู่นิวเคลียสของเซลล์ ส่วน I κ B α จะถูกทำลายที่ proteasome ซึ่งกระบวนการดังกล่าวอยู่ใน classical หรือ cononical pathway ของ NF- κ B โดยปฏิกริยานี้จะเกิดได้อย่างรวดเร็วภายในไม่กี่นาทีจึงนำไปสู่การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (Inflammatory gene) ได้แก่ COX-2 LOX-2 Cell adhesion molecule ไซโตไคน์ คีโมไคน์ และ iNOS จึงทำให้มีการอักเสบได้ นอกจากนี้ยังพบว่า TNF- α ยังเป็นโกรทแฟกเตอร์ (Growth factor) ที่สำคัญต่อการเกิดเนื้องอกได้อีกด้วย⁽⁶⁵⁾

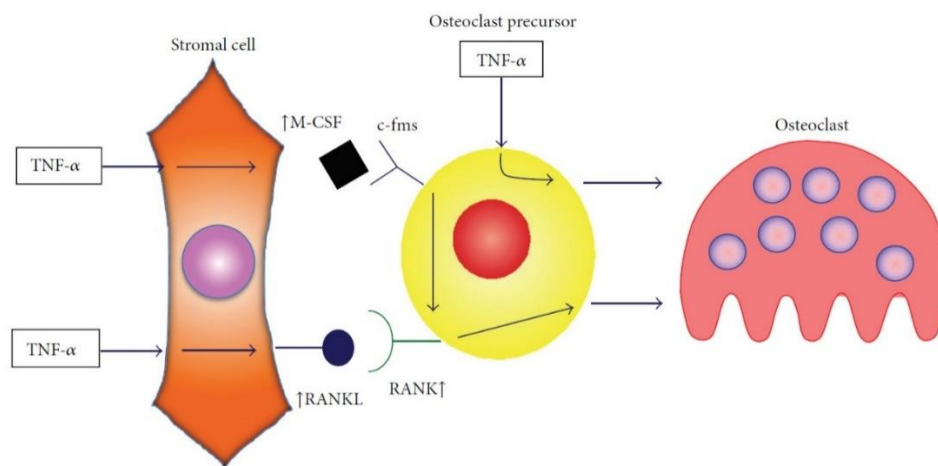
บทบาทของ TNF- α ต่อการเกิดโรคปริทันต์อักเสบ

จากการศึกษาของ Nakao S. และคณะ (2002)⁽¹²⁴⁾ ในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ พบว่า TNF- α ทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของ NF- κ B เข้าไปยังนิวเคลียส ต่อมาจะมีการเหนี่ยวนำให้มีการสร้าง COX-2 และ PGE2 ตามมา ผ่านทาง tyrosine kinase pathway ซึ่งสัมพันธ์กับเวลาและความเข้มข้นของ TNF- α โดยการเพิ่มขึ้นและการคงอยู่ของ COX-2 ภายในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือกอาจจะเป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดโรคเหงือกอักเสบ และโรคปริทันต์อักเสบได้ ดังนั้นการควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ดังกล่าวนี้เป็นขั้นตอนที่สำคัญในการป้องกันโรคที่มีการอักเสบได้ ดังเช่น โรคปริทันต์ และโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์

โดยทั่วไปแล้วเมื่อ TNF- α เข้าไปกระตุ้นเซลล์เป้าหมายมากขึ้นจะทำให้เซลล์หลั่งสารยับยั้งของ TNF- α (Inhibitory of TNF- α) และ soluble TNF receptors (sTNFR) เพื่อรักษาสมดุลของเซลล์ โดย sTNFR เกิดจากการจับกันระหว่าง TNF- α และตัวรับ จากนั้นจึงเกิดการตัดบางส่วนของโมเลกุลตัวรับออกไปเพื่อให้สามารถทำงานได้ โดยตัดในส่วนที่อยู่นอกเซลล์ (Extracellular domain) ของ TNFR1 (TNFR55) และ TNFR2 (TNFR75) จึงเกิดเป็น sTNFR55 และ sTNFR75 ตามลำดับ โดย sTNFR มีหน้าที่แย่งจับกับ TNF- α จากตัวรับบนผิวเซลล์ โดยจะพบ sTNFR ได้ในเนื้อเยื่อที่มีการอักเสบ ซีรัม และสารคัดหลั่ง⁽¹¹⁷⁾ จากการศึกษาของ Ohe H. และคณะ (2000)⁽¹¹⁴⁾ พบว่าการส่งสัญญาณผ่านเข้าไปในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์เกิดจากการกระตุ้นผ่านทาง TNFR75 โดยเมื่อมีการกระตุ้นจาก TNF- α และ IL-1 β จะทำให้เกิดการสะสมของ TNFR75 mRNA จากนั้นจึงตัดส่วนที่อยู่นอกเซลล์ของ TNFR75 เพื่อสร้าง sTNFR75 ออกจากเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ เช่นเดียวกับในเซลล์ PMN และ mononuclear cells เมื่อ sTNFR75 อยู่นอกเซลล์จะเข้าไปแย่งจับกับ TNF- α จาก TNFR75 ที่อยู่บนผิวเซลล์ ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่า sTNFR75 มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของตัวรับอื่น ๆ (Antagonist) และลดความไวของ TNF- α ได้ ผ่านทางการเหนี่ยวนำและการปล่อย sTNFR75 ออกจากเซลล์ซึ่งหลักการดังกล่าวนี้จะเป็นการตอบสนองของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกในสภาวะที่มีการอักเสบ ดังเช่นในโรคปริทันต์อักเสบ

TNF- α มีผลต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของกระดูก แม้ว่า TNF- α ไม่ได้เกี่ยวข้องโดยตรงต่อการพัฒนาของเซลล์สลายกระดูก (Osteoclast differentiation) แต่จะเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของ Receptor activator of nuclear factor kappa-B (RANK) จากต้นกำเนิดของเซลล์สลายกระดูก (Osteoclast precursors) และ RANKL จากเซลล์สร้างกระดูก ดังในภาพประกอบ 16 กล่าวคือ TNF- α สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ RANKL และ Macrophage colony-stimulation factor (M-CSF) จากเซลล์สโตรมาล (Stromal cell) หรือ เซลล์สร้างกระดูก

เพื่อเข้าสู่กระบวนการสร้างเซลล์สลายกระดูก โดย M-CSF จะเข้าไปจับกับ Colony-stimulating factor-1 receptor (c-fms) ที่เป็นตัวรับของ M-CSF บนต้นกำเนิดของเซลล์สลายกระดูกทำให้มีการแสดงออกของ RANK มากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า TNF- α สามารถเข้าไปกระตุ้นที่ต้นกำเนิดของเซลล์สลายกระดูกได้โดยตรง เพื่อให้เกิดการพัฒนาไปเป็นเซลล์สลายกระดูกที่สามารถทำงานได้ โดยมีลักษณะเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ที่พบหลายนิวเคลียส (Multinucleated giant cell) และมีขอบเซลล์เป็นคลื่น (Ruffled border) เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวในการย่อยสลายกระดูก^(3, 5, 6)



ภาพประกอบ 16 การทำงานของ TNF- α ที่มีผลต่อกระบวนการสร้างเซลล์สลายกระดูก⁽⁵⁾

TNF- α ยับยั้งการพัฒนาของเซลล์สร้างกระดูกในระยะต่าง ๆ โดยในระยะแรก TNF- α ยับยั้ง insulin-like growth factor 1 (IGF-1) ที่มีหน้าที่เพิ่มการเปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่ต่าง ๆ ของเซลล์ต้นกำเนิด (Stem cell) ไปเป็นต้นกำเนิดของเซลล์สร้างกระดูก (Osteoblast precursor cell) นอกจากนี้ยังยับยั้งการถอดรหัสของ runt-related transcription factor 2 (RUNX2) ซึ่งเป็นทรานสคริปชันแฟกเตอร์หลักของการพัฒนาไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก จึงทำให้เกิดการเสื่อมสลายของ RUNX2 mRNA ไปในที่สุด ยิ่งกว่านั้น TNF- α ยังลดการแสดงออกของ osterix (OSX) ในการส่งสัญญาณผ่านทาง MAPK และเพิ่มการแสดงออกของ Fas ซึ่งเป็นตัวรับในกลุ่มของ death domain จึงเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis จากผลลัพธ์ทั้งหมดนี้แสดงให้เห็นว่า TNF- α ทำให้เกิดการสลายกระดูกมากขึ้น โดยการเพิ่มการทำงานของเซลล์สลายกระดูก (Osteoclastic activity) และลดการทำงานของเซลล์สร้างกระดูก (Osteoblastic activity) จึงมีผลต่อกระบวนการเกิดโรคปริทันต์อักเสบ^(3, 5, 125, 126)

อินเตอรฺลิวคิน-1 เบต้า

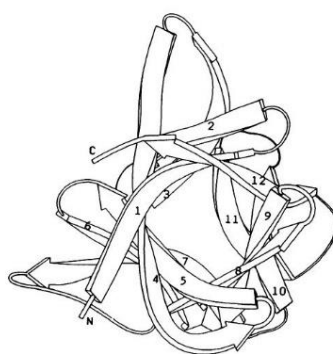
อินเตอรฺลิวคิน-1 เบต้า (Interleukin-1 β : IL-1 β) เป็นไซโตไคน์ที่อยู่ในกลุ่มของ interleukin-1 superfamily ประกอบด้วย IL-1 α IL-1 β พร้อมด้วยอินเตอรฺลิวคิน-1 รีเซพเตอร์ แอนตาโกนิสต์ (Interleukin-1 receptor antagonist: IL-1RA) IL-18 และ IL-33 ส่วนใหญ่แล้วไซโตไคน์ในกลุ่มนี้ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบซึ่งช่วยกระตุ้นการแสดงออกของยีนจำนวนมากที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบและโรคแพ้ภูมิตัวเอง (Autoimmune disease) รวมถึงการทำงานของเอนไซม์ต่าง ๆ เช่น เอนไซม์ COX-2 iNOS และฟอสโฟลิเพส เอ ประเภทที่ 2 (Phospholipase A type 2)^(33, 34)

แหล่งกำเนิด

ยีนของ IL-1 β ในมนุษย์พบอยู่บนโครโมโซมที่ 2q14 โดย IL-1 β ถูกสร้างจากเซลล์ที่เกี่ยวข้องในระบบภูมิคุ้มกันเมื่อมีการตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นซึ่งมีเซลล์หลักได้แก่ แมคโครฟาจ และเซลล์เดนไดรติก (Dendritic cell) นอกจากนี้ยังพบได้ในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก เซลล์เอ็นไยด์ปริทันต์ เซลล์สร้างกระดูก เซลล์เคราติโนไซต์ และเซลล์แลงเกอร์ฮานส์ (Langerhans cell)⁽³⁴⁾

โครงสร้าง

กลุ่ม IL-1 superfamily ทั้งหมดล้วนมีโครงสร้างคล้ายคลึงกันมีลักษณะเป็นสาย β -strand 12 สายเรียงตัวไม่ขนานกัน (Antiparallel β -strand) แต่ละสายยึดกันด้วยพันธะไฮโดรเจน แต่สำหรับ IL-1 β พบว่ามี β -strand 6 สายที่เรียงตัวในลักษณะเป็นทรงกระบอก (β -barrel shaped configuration) และอีก 6 สายจะอยู่ปิดบริเวณปลายซึ่งลักษณะโครงสร้างดังกล่าวนี้จะเป็นโครงสร้างหลักของ IL-1 β ⁽¹²⁷⁾ ดังภาพประกอบ 17



ภาพประกอบ 17 โครงสร้างของ IL-1 β ⁽¹²⁷⁾

การควบคุมการแสดงออก

เริ่มแรก IL-1 β อยู่ในรูปที่ไม่สามารถทำงานได้ (Proprotein หรือ pro-IL- β) ซึ่งถูกสร้างขึ้นเมื่อมีการกระตุ้นของเชื้อก่อโรคที่เรียกว่า PAMPs เช่น LPS หรือจากการกระตุ้นของ DAMPs เช่น โปรตีน High mobility group box 1 (HMGB1) และแอดดีโนซีนไตรฟอสเฟต (Adenosine triphosphate: ATP) ทั้ง PAMPs และ DAMPs จะเข้าไปจับกับตัวรับบนผิวเซลล์ คือ pattern recognition receptors (PRRs) เช่น Toll-like receptors (TLRs) ที่เรียกว่า Toll-like/IL-1 receptor domain หรือ TIR domain จึงเกิดการส่งสัญญาณต่าง ๆ เข้าไปในเซลล์ (TLR signaling)⁽¹²⁸⁾ จากการศึกษาของ Wang และคณะ (2000)⁽¹²⁹⁾ พบว่า LPS จากเชื้อ *Pg* ทำงานผ่านทาง TLR4 ในการสร้างไซโตไคน์ทั้ง IL-1 และ IL-6 จากนั้นจึงมีการกระตุ้นการทำงานผ่าน Myeloid differentiation primary response 88 (MyD88) ซึ่งทำหน้าที่เป็น signaling adaptor จะทำให้เกิดการส่งสัญญาณผ่านไปยังทรานสคริปชันแฟกเตอร์ของ NF- κ B ส่งผลให้มีการสลายตัวของ I κ B α จึงมีการปล่อย NF- κ B อีสาระเข้าไปสู่นิวเคลียสของเซลล์เพื่อส่งเสริมการแสดงออก Pro-IL-1 β

Pro-IL-1 β มีน้ำหนักโมเลกุล 31 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นรูปที่ไม่สามารถทำงานได้ จากนั้นจะเกิดการแยกโปรตีนในบริเวณ aspartic acid (Asp)-116 และ alanine (Ala)-117 โดยใช้เอนไซม์เปปติเดอินเตอริลิวคิน-1 (IL-1-converting enzyme: ICE) หรือแคสเปส-1 (Caspase-1) จนเกิดเป็น Mature IL-1 β ในรูปที่สามารถทำงานได้ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 17 กิโลดาลตัน การทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวมีความสำคัญอย่างมากในการส่ง IL-1 β ผ่านไปยังเยื่อหุ้มเซลล์⁽¹³⁰⁾ นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ย่อยโปรตีน (Proteolytic enzyme) ที่สามารถทำงานได้ เช่น trypsin chymotrypsin bacterial enzymes leukocyte elastase granzyme A และ MMPs โดยเฉพาะ stromelysin-1 (MMP3) gelatinases A (MMP2) และ gelatinases B (MMP9) จะถูกเหนี่ยวนำโดย IL-1 β ในบริเวณที่มีการอักเสบเฉียบพลัน และเร่งทำให้สามารถกระตุ้น และทำลาย IL-1 β ตามมาได้^(131, 132)

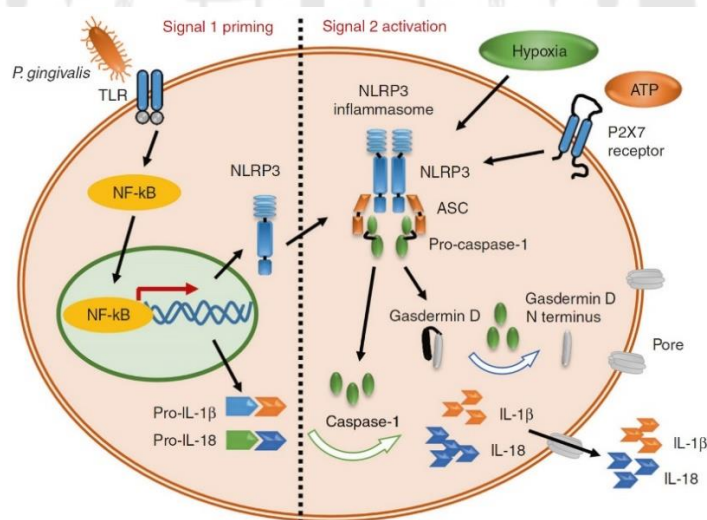
เอนไซม์ IL-1-converting enzyme หรือ Caspase-1 มีการทำงานผ่านทางอินฟลามมาโซม (Inflammasome หรือ Caspase-1-activating complex) ซึ่งประกอบด้วย 3 โมเลกุลรวมกัน ได้แก่ หน่วยรับ (Sensor) เช่น โปรตีนที่ประกอบด้วยโดเมนไพรีน ลิวซิน และโนด (NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3: NLRP3) หน่วยแปลง (Adaptor) เช่น โปรตีนอะปโตซิสของเอเอสซี (Apoptosis-associated spec-like protein containing a CARD: ASC)

และหน่วยปฏิบัติงาน (Effector) เช่น โปรแคสเปส-1 (Pro-caspase-1 หรือ inflammatory protease caspase-1)

ในโรคที่มีการอักเสบ เช่น โรคปริทันต์อักเสบพบว่า PAMPs และ DAMPs จะกระตุ้นแมคโครฟาจและเซลล์เยื่อเมือกให้เกิดการทำงานของ NLRP3 Inflammasome ซึ่งออกฤทธิ์ได้ 2 ทาง ได้แก่

1. Signal 1 priming เกิดจากการกระตุ้นของเชื้อจุลินทรีย์ หรือสิ่งเร้าภายในเซลล์ (Endogenous stimuli) ทำให้มีสร้าง NLRP3 และ pro-IL-1 β ผ่านการทำงานของทรานสคริปชันแฟกเตอร์ของ NF-kB

2. Signal 2 activation เกิดจากการกระตุ้นของ ATP ผ่าน P2X7 receptor และ pore-forming toxin ทำให้เกิดการทำงานของ NLRP3 Inflammasome และ caspase-1 จึงเปลี่ยน pro-IL-1 β ให้อยู่ในรูป mature-IL-1 β ที่สามารถทำงานได้ นอกจากนี้ยังเกิดการตัด gasdermin D ในตำแหน่ง N terminus ทำให้สร้างรูบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์จึงเกิดการตายของเซลล์แบบไพโรโตซิส (Pyroptosis)^(128, 133) ดังภาพประกอบ 18



ภาพประกอบ 18 การทำงานของ NLRP3 Inflammasome ในโรคที่มีการอักเสบ⁽¹²⁸⁾

เซลล์สร้างเส้นใยเยื่อเมือกมนุษย์มีความพิเศษในการตอบสนองของต่อ LPS จากเชื้อ *Pg* ในขั้นตอนการสร้าง IL-1 β โดยในคราบจุลินทรีย์เหนือเยื่อเมือก (Supragingival biofilms) พบว่ามีการเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ caspase-1 และเพิ่มการแสดงออกของ IL-1 β และ IL-18 แต่ในคราบจุลินทรีย์ใต้เยื่อเมือกจะลดการทำงานของ NLRP3 และ IL-1 β ในทางกลับกันพบว่าภาวะพร่อง

ออกซิเจน (Hypoxia condition) กลับมีการกระตุ้นการทำงานของ caspase-1 เพิ่มขึ้นจึงทำให้เกิด IL-1 β มากขึ้นตามมาได้^(134, 135)

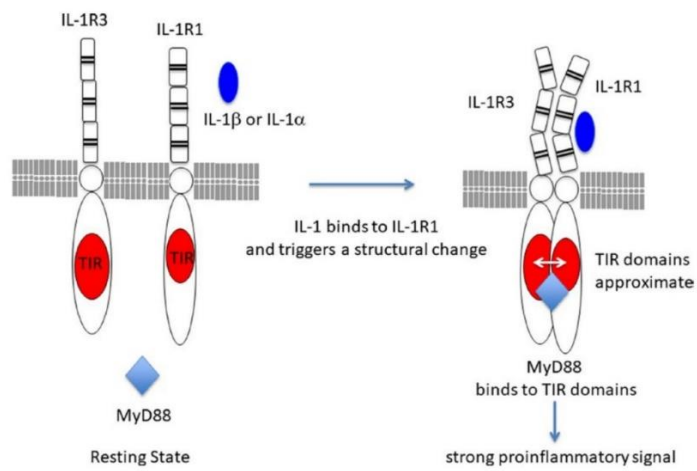
ตัวรับของ IL-1 β

ตัวรับของ IL-1 family พบได้ 6 ชนิดซึ่งมีอยู่ 2 ชนิดที่เกี่ยวข้องต่อการทำงานของ IL-1 β คือ

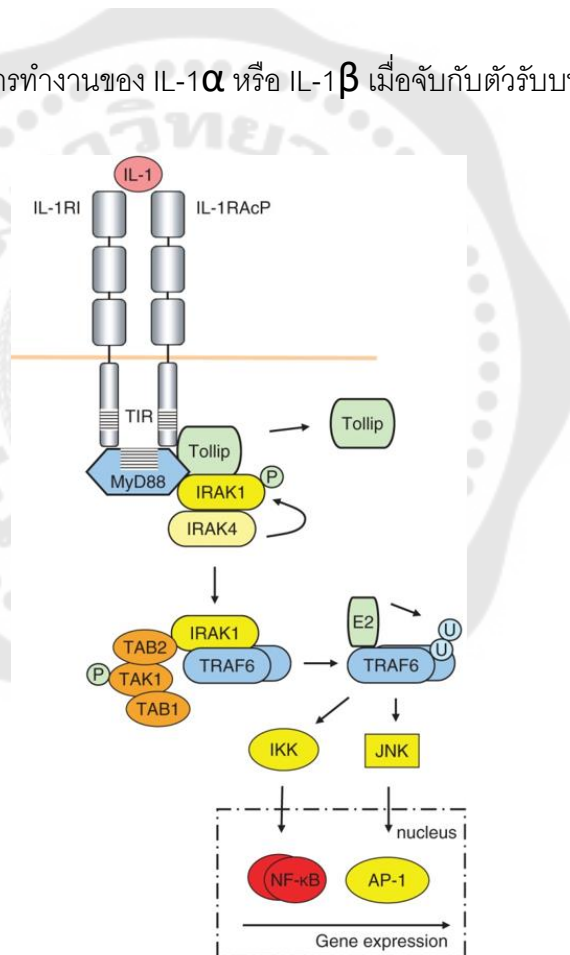
1. IL-1 receptor Type I (IL-1R1) เป็นตัวรับชนิดผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (Transmembrane receptor) ซึ่งประกอบด้วยไกลโคโปรตีน (Glycoprotein) ขนาด 80 กิโลดาลตัน พบได้ในเซลล์ที่เซลล์สร้างเส้นใย เซลล์บุผนังหลอดเลือด เซลล์กระดูกอ่อน (Chondrocytes) และ เซลล์กล้ามเนื้อเรียบ (Smooth muscle cell) ตัวรับชนิดนี้สามารถจับกับ IL-1 α , IL-1 β และ IL-1 receptor antagonist

2. IL-1 receptor accessory protein (IL-1RAcP) หรือ IL-1R3 ทำหน้าที่เป็นตัวรับร่วม ซึ่งจะรวมกับ IL-1R1 เพื่อสร้าง trimeric signaling complex เมื่อมีการเข้ามาของ IL-1 α หรือ IL-1 β จะกระตุ้นการส่งสัญญาณต่อไปภายในเซลล์ ซึ่งมีการทำงานดังนี้

จากภาพประกอบ 19 ในระยะพัก (Resting state) พบ IL-1R1 และ IL-1R3 บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ เมื่อ IL-1 α หรือ IL-1 β เข้ามาจับกับ IL-1R1 จะทำให้ IL-1R3 เคลื่อนเข้ามาจับกับ IL-1R1 (ไม่มีการจับกันโดยตรงระหว่าง IL-1R3 กับ IL-1) จากนั้นจึงเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง เกิดเป็น trimeric signaling complex ซึ่งมีส่วนของ Toll/interleukin-1 receptor (TIR) complex เข้ามาชิดกันมากขึ้นจึงทำให้ adaptor protein MyD88 สามารถเข้าจับในตำแหน่ง TIR complex ต่อมาจะเกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตโดยการทำงานของเอนไซม์ IRAKs-1, 4 ดังในภาพประกอบที่ 20 จากนั้นจะเหนี่ยวนำให้มีการรวมกันของ TRAF6 ส่งผลให้มีส่งสัญญาณเข้าไปยังนิวเคลียสทำให้มีการทำงานของ NF-kB และ AP-1^(70, 71, 132)



ภาพประกอบ 19 การทำงานของ IL-1 α หรือ IL-1 β เมื่อจับกับตัวรับบนผิวเซลล์⁽⁷¹⁾

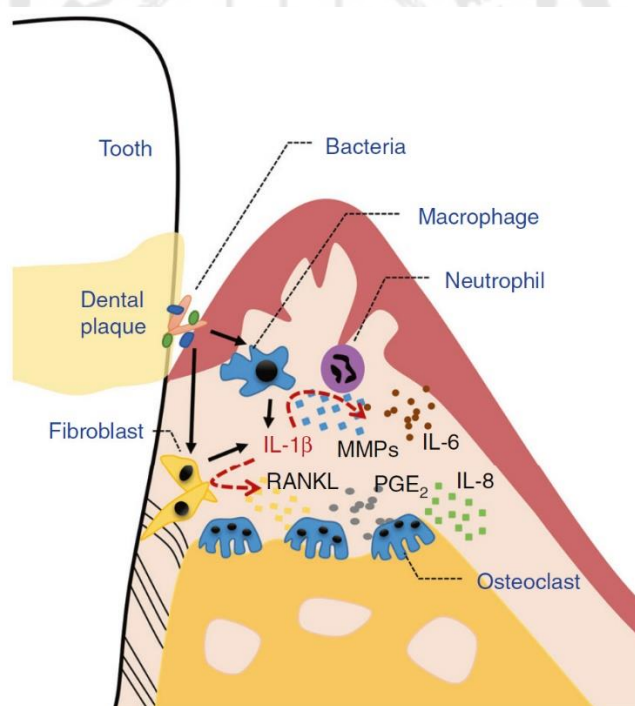


ภาพประกอบ 20 การทำงานของ IL-1 α หรือ IL-1 β ที่เหนี่ยวนำให้มีการอักเสบผ่านการทำงานของ NF- κ B และ AP-1⁽⁷⁰⁾

บทบาทของ IL-1 β ต่อการเกิดโรคปริทันต์อักเสบ

หลังจากที่มีการหลั่ง IL-1 β ออกมาจากเซลล์ต้นกำเนิดจะพบการสะสมของ IL-1 β และก่อให้เกิดการตอบสนองต่อการอักเสบจึงทำให้เกิดโรคปริทันต์อักเสบขึ้นได้ ดังภาพประกอบ 21 IL-1 β มีฤทธิ์ในการเพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ย่อยคอลลาเจน เช่น MMPs ซึ่งมีส่วนทำให้เกิดการเสื่อมสภาพของเมทริกซ์ที่อยู่นอกเซลล์จึงนำไปสู่การทำลายเนื้อเยื่อปริทันต์ และเกิดการสลายกระดูกตามมา

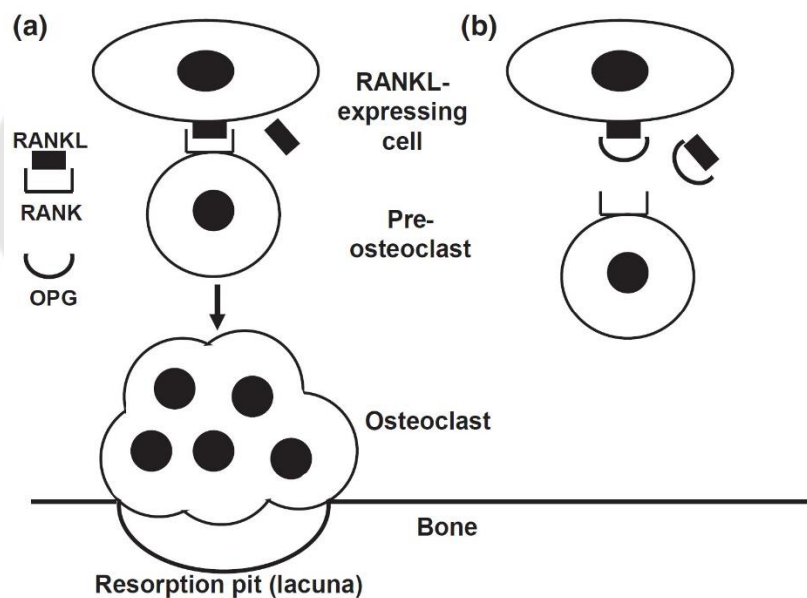
MMP-9 เป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญเมื่อเกิดความรุนแรง และการดำเนินโรคปริทันต์อักเสบซึ่ง IL-1 β สามารถเพิ่มการแสดงออกของ MMP-9 ในเซลล์ชนิดต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบของอวัยวะปริทันต์รวมถึงเซลล์สร้างกระดูก เซลล์สลายกระดูก นิวโทรฟิล และเซลล์สร้างเคลือบรากฟัน (Cementoblasts) นอกจากนี้ IL-1 β ยังกระตุ้นการผลิต MMPs อื่น ๆ เช่น MMP-1 และ/หรือ MMP-3 ในเซลล์เอ็นดอทีลปริทันต์ และเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์^(4, 71, 128)



ภาพประกอบ 21 บทบาทของ IL-1 β ต่อการเกิดโรคปริทันต์อักเสบ⁽¹²⁸⁾

กระบวนการสร้างเซลล์สลายกระดูกเป็นกลไกหลักในการกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงของกระดูก ประกอบด้วย RANKL ซึ่งเป็นโปรตีนบนผิวเซลล์ของเซลล์สโตรมา หรือเซลล์สร้างกระดูก ในเวลาเดียวกันเซลล์สร้างกระดูกหลัง OPG ที่เป็น decoy receptor มาจับกับ RANKL

เพื่อป้องกันการจับกันระหว่าง RANKL จากต้นกำเนิดของเซลล์สลายกระดูกจึงทำให้มีการลดจำนวนเซลล์สลายกระดูกลง ดังภาพประกอบ 22 ในโรคปริทันต์อักเสบพบว่าการที่มี TNF- α และ IL-1 β สามารถเพิ่มการแสดงออกของ RANKL จึงทำให้สัดส่วนระหว่าง RANKL/OPG เพิ่มขึ้น จากนั้น RANKL จับกับ RANK มากขึ้นส่งผลให้เกิดการถอดรหัสของยีนที่เกี่ยวข้องกับ NF- κ B อีกทั้งยังควบคุมการเพิ่มจำนวน การเปลี่ยนแปลงเพื่อไปทำหน้าที่ต่าง ๆ และการทำงานของเซลล์สลายกระดูกจึงเกิดการดำเนินของโรคปริทันต์อักเสบขึ้น นอกจากนี้พบว่า IL-1 β สามารถเพิ่มการสร้าง OPG ได้ในเซลล์เอ็นดีปรีทันต์แต่ถูกยับยั้งโดย PGE2 ที่สร้างจาก IL-1 β เช่นกัน ดังนั้นจึงทำให้เกิดการทำงานของ RANKL มากขึ้น⁽¹³⁶⁾ และในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกพบว่า IL-1 β ทำให้เกิดการสร้าง IL-6 IL-8 TNF- α และเพิ่ม IL-1 β ดังนั้น IL-1 β จึงทำให้เกิดโรคปริทันต์อักเสบเนื่องจากมีการทำลายของเนื้อเยื่อและกระดูกล้อมรอบฟัน^(7, 137, 138)



ภาพประกอบ 22 กลไกของกระบวนการสร้างเซลล์สลายกระดูก⁽¹³⁸⁾

(a) RANKL จับกับ RANK จึงทำให้มีการสร้างเซลล์สลายกระดูกใน lacuna

(b) OPG จับกับ RANKL เพื่อป้องกันการสร้างเซลล์สลายกระดูกใน lacuna

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ดำเนินการตามขั้นตอนต่อไปนี้

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

การกำหนดประชากรและการสุ่มกลุ่มตัวอย่าง

ประชากร

เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์จากเนื้อเยื่อเกี่ยวพันบริเวณเพดานปากของผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาด้วยวิธีศัลยกรรมที่คลินิกหลังปริญญา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ซึ่งได้รับความยินยอมจากผู้ป่วย และผ่านการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ (SWUEC/F-314/2563) โดยฟันซี่นั้นและเนื้อเยื่อโดยรอบไม่มีพยาธิสภาพใด ๆ เช่น ไม่พบอาการปวด บวม กดเจ็บ มีเลือดหรือหนองออกจากร่องเหงือกเมื่อตรวจด้วยเครื่องมือตรวจปริทันต์ (Periodontal probe) ไม่พบการละลายตัวของกระดูกรองรับรากฟันทั้งทางคลินิกและภาพรังสี ร่องลึกปริทันต์ และไม่มีเนื้อเยื่อเหงือกส่วนเกิน โดยผู้ป่วยจะต้องมีสุขภาพดี ไม่มีประวัติสูบบุหรี่ ไม่อยู่ระหว่างการตั้งครรภ์หรือให้นมบุตร และไม่รับประทานยาที่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน ยาที่ระงับการอักเสบและการติดเชื้อภายใน 1 เดือน

การเลือกกลุ่มตัวอย่าง

ในการวิจัยครั้งนี้ได้เตรียมเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกจากผู้ร่วมวิจัย 3 คนมาใช้ในการทดลอง ทำการแบ่งเซลล์ในแต่ละตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่มหลัก โดยแยกเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีระดับน้ำตาลต่างกัน คือกลุ่มน้ำตาลปกติ (5.5 มิลลิโมลาร์) และกลุ่มน้ำตาลสูง (50 มิลลิโมลาร์) จากนั้นแต่ละกลุ่มจะแบ่งเป็นกลุ่มทดลองย่อย ดังในตาราง 3 โดยแต่ละกลุ่มจะใช้เซลล์จากผู้เข้าร่วมวิจัย 3 คน ดังตารางต่อไปนี้

ตาราง 3 การแบ่งกลุ่มการทดลอง

ระดับน้ำตาลปกติ 5.5 มิลลิโมลาร์	กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมภาวะปกติ (Normal Control: NG)
	กลุ่มที่ 2 ได้รับไขมันชั้น (TUR)
	กลุ่มที่ 3 ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS และไม่ได้รับไขมันชั้น (LPS)
	กลุ่มที่ 4 ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS และได้รับไขมันชั้น (LPS+TUR)
ระดับน้ำตาลสูง 50 มิลลิโมลาร์	กลุ่มที่ 5 กลุ่มควบคุมภาวะน้ำตาลสูง (High Control: HG)
	กลุ่มที่ 6 ได้รับไขมันชั้น (HG+TUR)
	กลุ่มที่ 7 ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS และไม่ได้รับไขมันชั้น (HG+LPS)
	กลุ่มที่ 8 ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS และได้รับไขมันชั้น (HG+LPS+TUR)

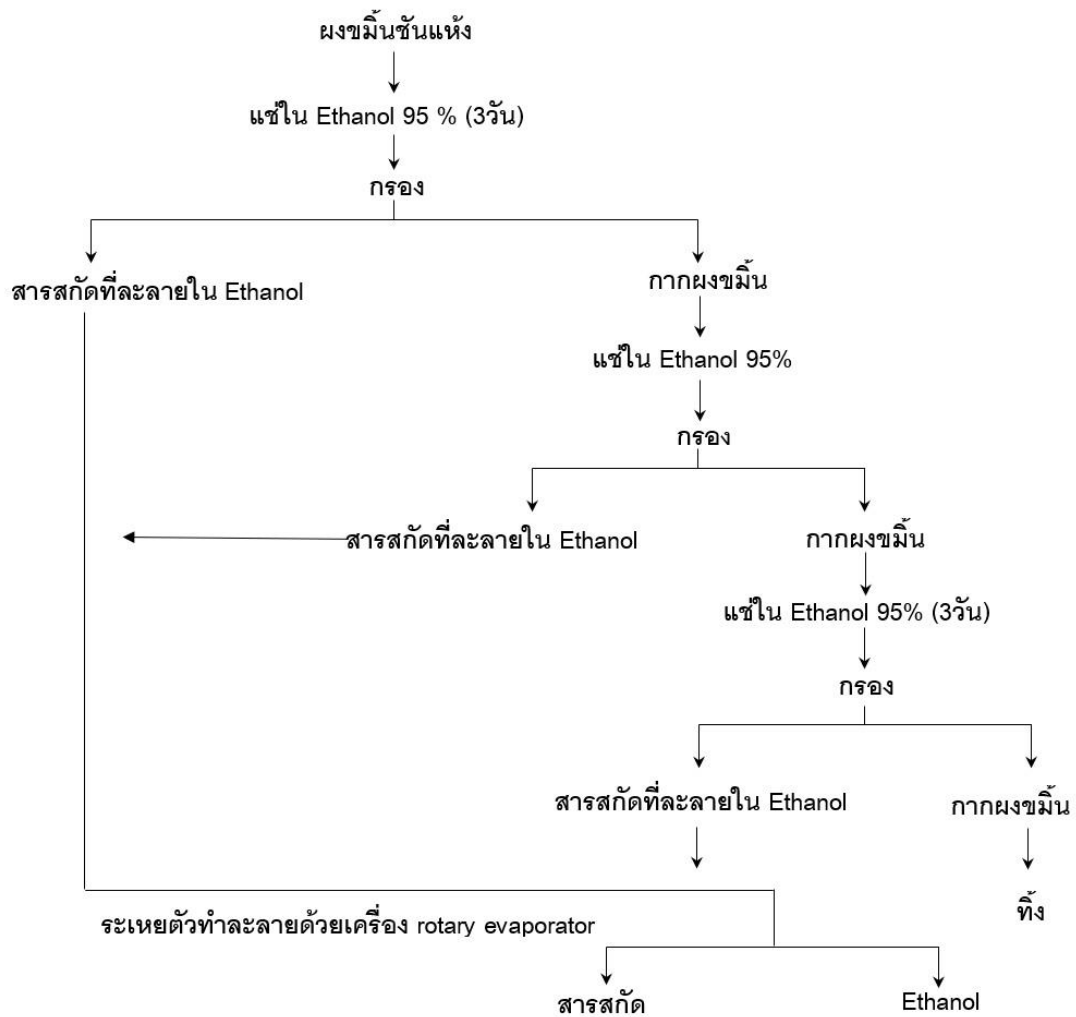
การสร้างเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

ขั้นตอนการสกัดหยาดไขมันชั้น

สารสกัดหยาดไขมันชั้นได้รับการเตรียมจากในห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีสมุนไพรและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ซึ่งซื้อผงไขมันชั้นแห้งมาจากบริษัทเวทพงศ์โอเอส (ฮกอันตั้ง) จำกัด กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย มีขั้นตอนการเตรียมดังภาพประกอบ 23 โดยนำไขมันชั้นน้ำหนัก 300 กรัมถูกสกัดด้วยการหมักกับตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 95 เป็นเวลา 3 วัน ในอัตราส่วนระหว่างของแข็งต่อของเหลวคือ 1 ต่อ 10 ได้เป็นสารสกัดที่ละลายในเอทานอล และกากของไขมันชั้น จากนั้นนำกากมาสกัดซ้ำอีก 2 รอบจนทิ้งกากนั้นไป ต่อมานำสารสกัดที่ละลายในเอทานอลจากทั้ง 3 รอบรวมกับตัวทำละลายด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนได้สารสกัดประเภทกึ่งของแข็ง จากนั้นเก็บสารสกัดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสในโถดูดความชื้น (Desiccator) เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

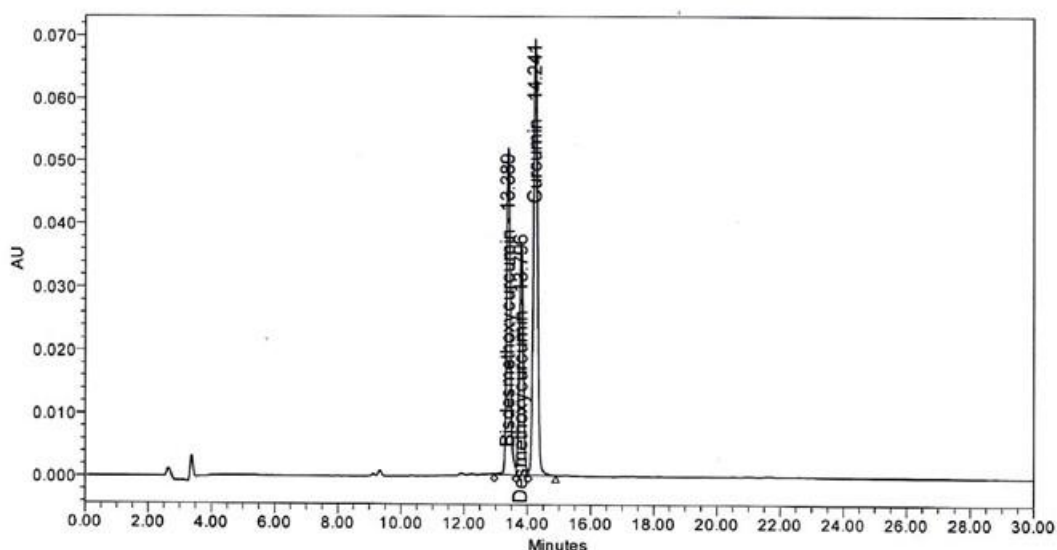
โดยมีค่า % yield ของสารสกัดไขมันชั้น เท่ากับ 22.16 ± 0.84 ซึ่งได้จากการคำนวณดังสมการต่อไปนี้

$$\% \text{ yield} = \frac{\text{น้ำหนักสารที่สกัดได้}}{\text{น้ำหนักสารที่ใช้สกัด}} \times 100\%$$



ภาพประกอบ 23 ขั้นตอนการสกัดสารสกัดหยาบขมิ้นชัน

ผลการวิเคราะห์โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบขมิ้นชันประกอบด้วยสารสำคัญ (ร้อยละ โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก) ได้แก่ เคอร์คิวมิน 5.694 ± 0.182 , ดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน 3.521 ± 0.107 และ บิสดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน 7.368 ± 0.282 ซึ่งทั้ง 3 รวมเป็นเคอร์คิวมินอยด์ 16.583 ± 0.57



ภาพประกอบ 24 ผลการวิเคราะห์โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ขั้นตอนการเตรียมสารละลายจากสารสกัดหยาบไขมันชั้น

1. ละลายสารสกัดจากไขมันชั้นในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ผสมซีรัมให้ได้ความเข้มข้น 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide: DMSO: Panreac, Barcelone, Spain) ร้อยละ 1 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ไม่ผสมซีรัมเป็นตัวทำละลาย
2. กรองผ่านแผ่นกรอง Acrodisc® Syringe Filters (0.2 µm Supor® membrane, Pall Corporation, NY, USA) เส้นผ่านศูนย์กลาง 32 มิลลิเมตร ขนาดช่อง 0.22 ไมโครเมตร เพื่อให้ปราศจากเชื้อก่อนผสมลงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมไว้
3. เจือจาง 10 เท่าด้วยอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ไม่ผสมซีรัมจนได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดหยาบไขมันชั้น 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน DMSO ร้อยละ 0.1 ซึ่งไม่พบว่าเป็นพิษต่อเซลล์⁽⁷⁴⁾

ขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีฟีนอลเรด(Phenol red) ผสมซีรัมจากตัวอ่อนวัวระดับน้ำตาลปกติ⁽¹³⁹⁾

เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ในขั้นตอนการเพิ่มจำนวน และใน 24 ชั่วโมงแรกของการทดลอง ซึ่งส่วนผสมในอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งหมดผลิตจาก Gibco, Grand Island, NY, USA โดยมีส่วนประกอบ ดังนี้

1. สารดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟีนอลเรดระดับน้ำตาลปกติ 5.5 มิลลิโมลาร์ (Dulbecco's Modified Eagle Medium: DMEM)
2. ซีรัมจากตัวอ่อนวัวความเข้มข้นร้อยละ 10 (Fetal bovine serum: FBS)

3. แอล-กลูตามีน (L-glutamine) 2 มิลลิโมลาร์ (GLUTAMAX 200 mM)

4. ยาปฏิชีวนะผสมยาฆ่าเชื้อราความเข้มข้นร้อยละ 1 (Antibiotic-antimycotic mixture (100X))

ขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีฟินอลเรด ผสมซีรัมหรือไม่ผสมซีรัม จากตัวอ่อนวัชระดับน้ำตาลปกติ

อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีฟินอลเรดและผสมกับซีรัมนำไปใช้ในขั้นตอนการกระตุ้นเซลล์ ด้วยภาวะน้ำตาลต่าง ๆ กันเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในขณะที่อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีฟินอลเรด และไม่ผสมซีรัมนำไปใช้ในขั้นตอนการกระตุ้นเซลล์ด้วย LPS ทั้งในสภาวะที่มีหรือไม่มีไขมันชั้น โดยมี ส่วนประกอบ ดังนี้

1. สารดีเอ็มอีเอ็มที่ไม่มีฟินอลเรดระดับน้ำตาลปกติ 5.5 มิลลิโมลาร์
2. ผสมหรือไม่ผสมซีรัมจากตัวอ่อนวัชความเข้มข้นร้อยละ 10
3. แอล-กลูตามีน 2 มิลลิโมลาร์
4. ยาปฏิชีวนะผสมยาฆ่าเชื้อราความเข้มข้นร้อยละ 1

ขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีฟินอลเรด ผสมซีรัมจากตัวอ่อนวัช ระดับน้ำตาลสูง

1. สารดีเอ็มอีเอ็มที่ไม่มีฟินอลเรดระดับน้ำตาลสูง 25 มิลลิโมลาร์
2. น้ำตาล ดี-กลูโคส (D-Glucose) 25 มิลลิโมลาร์ (Glucose Solution 200 g/l)
3. ผสมซีรัมจากตัวอ่อนวัช, แอล-กลูตามีน และยาปฏิชีวนะผสมยาฆ่าเชื้อรา ที่ความเข้มข้นเช่นเดียวกับอาหารเลี้ยงเซลล์ผสมซีรัมจากตัวอ่อนวัชระดับน้ำตาลปกติ

ขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับแช่แข็ง

1. สารดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟินอลเรดระดับน้ำตาลปกติ 5.5 มิลลิโมลาร์
2. ซีรัมจากตัวอ่อนวัชความเข้มข้นร้อยละ 30
3. ไดมิลิตัลฟอกไซด์ร้อยละ 10

ขั้นตอนการเก็บเซลล์ปฐมภูมิและเลี้ยงเซลล์สร้างเส้นใยเหนียว⁽¹³⁹⁾

1. ทำการเก็บชิ้นเนื้อบริเวณเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในตำแหน่งเพดานปากที่ต้องผ่าตัดออก ในตำแหน่งที่ได้รับการรักษาด้วยวิธีศัลยกรรมปริทันต์

2. ใส่ชิ้นเนื้อเหนียวลงในหลอดปั่นเหวี่ยงที่ปราศจากเชื้อขนาด 15 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเลี้ยงเซลล์ผสมซีรัมจากตัวอ่อนวัชความเข้มข้นร้อยละ 10 ระดับน้ำตาลปกติ (5.5 มิลลิโมลาร์) ในปริมาตร 3 มิลลิลิตร และเก็บในกล่องบรรจุน้ำแข็งเพื่อคงอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส รอการเคลื่อนย้ายสู่ห้องปฏิบัติการ

3. นำชิ้นเนื้อย้ายลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากเชื้อ ล้างชิ้นเนื้อด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffered saline: PBS) ที่ปราศจากเชื้อ ปริมาตร 5-10 มิลลิลิตร อย่างน้อย 2 ครั้งเพื่อล้างเซลล์และสิ่งปนเปื้อนออกให้ได้มากที่สุด

4. ใช้มีดผ่าตัดปราศจากเชื้อเบอร์ 15 ซี ตัดชิ้นเนื้อให้มีขนาด 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร จากนั้นวางชิ้นเนื้อ 3 ชิ้นห่างกันลงบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 35 มิลลิเมตร แล้วทำการเติมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เพิ่มเข้าไป

5. บ่มชิ้นเนื้อในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 และสภาวะความชื้นร้อยละ 50

6. เปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ทุก 3 หรือ 4 วัน โดยการดูดสารละลายเดิมในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ทิ้ง แล้วเติมอาหารใหม่จนครบปริมาตร 2 มิลลิลิตร และบ่มในสภาวะเดิมต่อไป จนกว่าเซลล์จะเจริญเติบโตหนาแน่นร้อยละ 80 (80% confluent) ของพื้นที่ทั้งหมด

7. แยกเซลล์ออกจากจานเพาะเลี้ยงเซลล์เดิมลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ใหม่เพื่อขยายจำนวนเซลล์ต่อไป และใช้เซลล์ในรุ่นที่ 3-6 เพื่อทำการทดลอง

ขั้นตอนการย้ายเซลล์สร้างเส้นใยเหนือกมนุษย์จากจานเพาะเลี้ยงเซลล์ (Subculture)⁽¹³⁹⁾

1. นำจานเพาะเลี้ยงออกมาจากตู้บ่มเพาะเลี้ยงเซลล์ หากพบว่ามีการหลุดลอกของเซลล์จำนวนมากหรือตรวจพบเซลล์ที่มีการปนเปื้อน เช่น พบเชื้อแบคทีเรีย หรือเชื้อราให้ทิ้งและไม่ควรนำมาใช้ต่อ

2. เชียงจานเพาะเลี้ยงเพื่อดูอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์เดิมออกทิ้ง ห้ามดูที่เซลล์โดยตรง และไม่ดูจนจานเพาะเลี้ยงแห้งสนิท จากนั้นล้างเซลล์ด้วยสารละลาย PBS 2 หรือ 5 มิลลิลิตร ในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 35 หรือ 100 มิลลิเมตรตามลำดับ โดยเชียงจานเพาะเลี้ยงเซลล์ไปมาก่อนดูดสารละลาย PBS ที่เพิ่งเติมนี้อีก ล้างซ้ำ 2 รอบก่อนเข้าสู่ขั้นตอนต่อไป

3. เติมทริปซิน-อีดีทีเอ (Trypsin-EDTA) ปริมาตร 1 หรือ 3 มิลลิลิตรลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 35 หรือ 100 มิลลิเมตรตามลำดับ จากนั้นใส่จานเพาะเลี้ยงเซลล์กลับคืนตู้บ่มเพาะเลี้ยงเซลล์โดยทิ้งไว้ประมาณ 2 นาที

4. ตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ หากพบว่าเซลล์ส่วนใหญ่หลุดจากจานเพาะเลี้ยงเซลล์แล้วให้เติมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ 6-8 มิลลิลิตร จากนั้นดูดสารละลายทิ้งลงเบา ๆ 2-5 ครั้งก่อนดูดสารละลายทั้งหมดใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 15 มิลลิลิตร จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

5. ดูดสารละลายทั้งหมดทิ้งโดยให้เหลือแต่ส่วนของตะกอนเซลล์ด้านล่าง จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงชนิดมีฟินอลเรดผสมซีรัมจากตัวอ่อนวัวระดับน้ำตาลปกติ ดูดสารละลายขึ้นลงเบา ๆ 2-5 ครั้งเพื่อให้เซลล์กระจายตัว ก่อนถ่ายแยกเซลล์ที่ได้ลงในจานเลี้ยงเซลล์ใหม่ หากต้องการเก็บเซลล์ในคลัง (ใช้เซลล์ในรุ่นที่ 2 ที่เจริญเติบโตจนถึง 90 ของพื้นที่จานเลี้ยงเซลล์) ให้เติมอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับแช่แข็ง โดยให้มีจำนวนเซลล์ประมาณ 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นแบ่งเซลล์ลงในหลอดแช่แข็ง (Cryovial tube) หลอดละ 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ในอุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นย้ายไปไว้ในอุณหภูมิต่ำ -80 องศาเซลเซียส

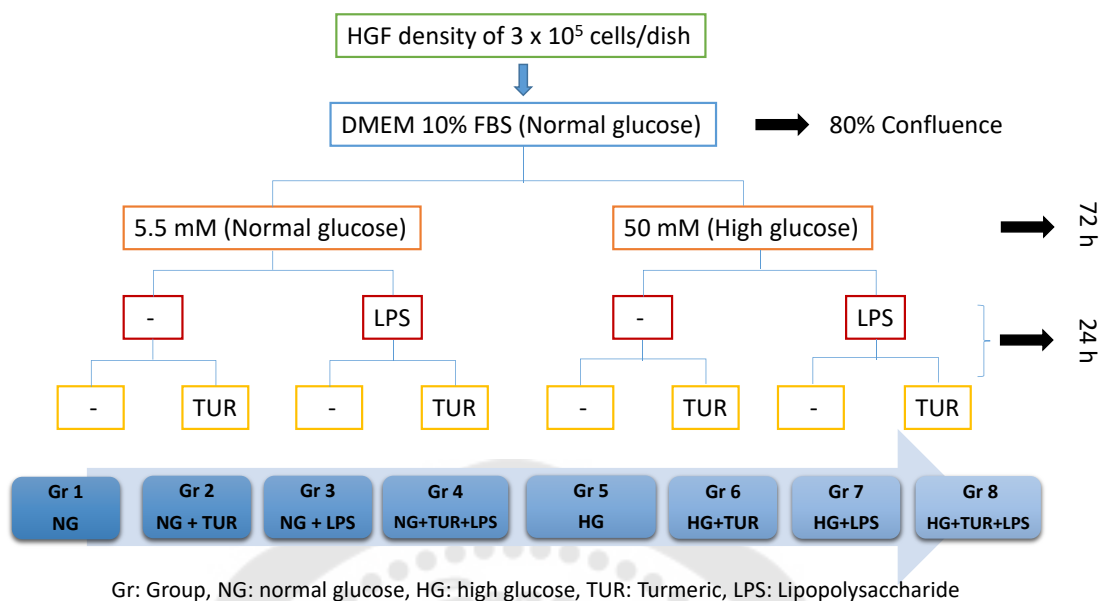
6. เมื่อต้องการใช้เซลล์ในคลัง เซลล์จะถูกละลายในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส และถ่ายลงในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 15 มิลลิลิตร จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 5-7 มิลลิลิตรต่อเซลล์ 1 มิลลิลิตรทันที ทำการปั่นเหวี่ยงและดูของเหลวเหนือตะกอนออก แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ ก่อนถ่ายเซลล์ลงในจานเลี้ยงเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวนต่อไป

ขั้นตอนการเลี้ยงเซลล์เพื่อทำการทดลอง

1. นำเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ที่มีปริมาณ 3×10^5 เซลล์ ถ่ายลงในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 มิลลิเมตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ผสมซีรัมจากตัวอ่อนวัวร้อยละ 10 ที่ระดับน้ำตาลปกติ 5.5 มิลลิโมลาร์ และรอเซลล์เติบโตจนมีความหนาแน่นร้อยละ 80 ของพื้นที่จานเลี้ยงเซลล์ (24 ชั่วโมง)

2. เปลี่ยนมาเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ผสมซีรัมจากตัวอ่อนวัวร้อยละ 10 ที่ระดับน้ำตาล 5.5 มิลลิโมลาร์ในกลุ่มควบคุมภาวะปกติ หรือที่ระดับน้ำตาลสูง 50 มิลลิโมลาร์ในกลุ่มทดลอง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง⁽¹⁰¹⁾

3. เมื่อครบ 72 ชั่วโมง ในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดหยาบขมชั้นจะเปลี่ยนมาเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์แบบไม่มีซีรัมที่มีสารสกัดหยาบขมชั้นความเข้มข้นสุดท้าย 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร⁽⁷⁴⁾ โดยใช้ DMSO ร้อยละ 0.1 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ไม่ผสมซีรัมเป็นกลุ่มควบคุมภาวะปกติ ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มี LPS ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง^(26, 73) โดยแบ่งเป็นกลุ่มดังภาพประกอบที่ 25



ภาพประกอบ 25 แผนภาพการเลี้ยงเซลล์เพื่อทำการทดลอง

วิธีการหาคุณภาพเครื่องมือ

การวิเคราะห์การตอบสนองต่อสารสกัดหยาดขมิ้นชัน (Dose-response analysis)

ทำการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ในขมิ้นชันความเข้มข้นต่าง ๆ กัน โดยใช้เทคนิค MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) assay (Invitrogen, USA) เพื่อสร้างกราฟการตอบสนองของเซลล์ต่อขนาดยา ในการทดลองนี้จะนำเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์จากผู้ทดสอบทั้ง 3 คน โดยจะถูกทำการทดลองแยกกัน 2 ครั้ง ในแต่ละครั้งจะทำ 3 ซ้ำในแต่ละกลุ่ม มีขั้นตอนการทดลองดังนี้

1. เตรียมการสกัดหยาดขมิ้นชันที่มีความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ไม่ผสมซีรัมที่มี DMSO ร้อยละ 5 นำมากรองผ่านแผ่นกรองทำให้ปราศจากเชื้อ Acrodisc® จากนั้นเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ไม่ผสมซีรัม เพื่อให้ได้ขมิ้นชันที่มีความเข้มข้น 3.75, 7.5, 15, 30 และ 60 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO เหลืออยู่น้อยกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 0.1

2. ใช้เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ ปริมาณ 1×10^4 เซลล์ต่อหลุมในอาหารเลี้ยงเซลล์ 10% FBS ระดับน้ำตาลปกติ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เลี้ยงในภาควัฒนเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม รอให้มีความหนาแน่นร้อยละ 80 ของพื้นที่จานเลี้ยงเซลล์ถึงเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีฟินอลเรด ไม่ผสมซีรัมที่มีขมิ้นชันความเข้มข้น 3.75, 7.5, 15, 30 และ 60 ไมโครกรัม/

มิลลิลิตร ในขณะที่กลุ่มควบคุมภาวะปกติจะถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดเดียวกันที่มี DMSO ร้อยละ 0.1 จากนั้นนำเซลล์ไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์แบบไม่ผสมซีรัม 100 ไมโครลิตรที่มีสารละลาย MTT ปริมาตร 10 ไมโครลิตร (สารละลาย MTT ได้จากการผสมผง MTT น้ำหนัก 5 มิลลิกรัมต่อ PBS 1 มิลลิลิตร) ลงในแต่ละหลุม บ่มต่อในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ 4 ชั่วโมง

4. ดูค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท (Tecan US, Durham, NC, USA) ที่

570 นาโนเมตร⁽⁷³⁾

การทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ด้วย MTT assay

ในการทดลองนี้จะนำเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์จากผู้ทดสอบทั้ง 3 คน โดยจะถูกทำการทดลองแยกกัน 3 ครั้ง ในแต่ละครั้งจะทำ 3 ซ้ำในแต่ละกลุ่ม มีขั้นตอนการทดลองดังนี้

1. นำเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์จำนวนประมาณ 1×10^4 เซลล์ต่อหลุม ในอาหารเลี้ยงเซลล์ผสมซีรัมจากตัวอ่อนวัวร้อยละ 10 ระดับน้ำตาลปกติ (5.5 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ถ่ายลงถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม รอจนได้เซลล์ที่มีความหนาแน่นร้อยละ 80 ของพื้นที่จานเลี้ยงเซลล์ จากนั้นดูอาหารเลี้ยงเซลล์ออกแล้วล้างด้วย PBS และเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 100 ไมโครลิตร ดังนี้

(1) อาหารเลี้ยงเซลล์ระดับน้ำตาลปกติ 5.5 มิลลิโมลาร์ (กลุ่มน้ำตาลปกติ)

(2) อาหารเลี้ยงเซลล์ระดับน้ำตาลสูง 50 มิลลิโมลาร์ (กลุ่มน้ำตาลสูง)

จากนั้นเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะต่าง ๆ กันเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

2. เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นแบบไม่ผสมซีรัมที่มีสารสกัดหยาดขมิ้นชั้นความเข้มข้นสุดท้าย 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร⁽⁷⁴⁾ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ซึ่งใช้ DMSO ร้อยละ 0.1 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ไม่ผสมซีรัมเป็นกลุ่มควบคุมภาวะปกติ ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มี LPS ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นบ่มเซลล์ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง^(26, 73)

3. เมื่อครบกำหนดเวลาจึงทำการดูอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมทิ้งแล้วเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์แบบไม่ผสมซีรัม 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย MTT ที่ละลายใน PBS 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์นาน 4 ชั่วโมง

4. เมื่อครบเวลาแล้วดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกแล้วเติม DMSO ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม เพื่อละลายผลึกฟอร์มazan (Formazan) ที่เกิดขึ้น นำไปป่มในตู้เพาะเลี้ยง เซลล์นาน 30 นาที

5. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (Microplate reader) ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร⁽⁷³⁾ ซึ่งความเข้มของสีที่เกิดขึ้นจะสัมพันธ์กับจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิต จากนั้นจึงทำการคำนวณร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ต่อไป

ขั้นตอนการแยกสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมด (Total RNA) จากเซลล์

ตัวอย่างจากผู้ทดสอบทั้ง 3 คน จะถูกทำการทดลองแยกกัน 2 ครั้ง โดยในแต่ละครั้ง จะทำ 3 ซ้ำในแต่ละกลุ่ม เมื่อครบกำหนดเวลา 24 ชั่วโมงหลังจากได้รับ LPS และขม้นชั้นจะทำการวิเคราะห์ปริมาณของ mRNA ด้วย TRIzol™ Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) ซึ่งมีขั้นตอนตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต ดังนี้

1. ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออกจาก และล้างด้วย PBS 3 มิลลิลิตร
2. เติม TRIzol reagent 1 มิลลิลิตร ลงในจานเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 60 มิลลิเมตรเป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เซลล์แตกตัว จากนั้นใช้ปิเปตดูดจานเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อถ่ายลงใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร
3. เติมคลอโรฟอร์ม (Chloroform) 200 ไมโครลิตร เขย่าแล้ววางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที
4. นำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยง ด้วยแรงเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนใสซึ่งเป็นของเหลวเหนือตะกอนที่มี RNA ถ่ายใส่หลอดใหม่
5. เติมไอโซโพรพานอล (Iso-propanol) ปริมาตรเท่ากันผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที
6. นำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยง ด้วยแรงเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลาจะพบตะกอบเซลล์ (Pellet cell) สีขาวอยู่ที่ก้นหลอดทดลอง
7. เติมเอทานอล ร้อยละ 75 (75 % Ethanol) 1 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยแรงเหวี่ยง 7,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
8. ต่อมาทะกอบของเหลวทิ้ง นำหลอดไปเก็บในที่แห้งเป็นเวลา 5-10 นาที จนตะกอน RNA ใส

9. ละลายตะกอน RNA ในน้ำที่ปราศจาก RNase (RNase-free water) 20 ไมโครลิตร จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร (A260) และ 280 นาโนเมตร (A280) เพื่อหาค่าปริมาณ และความเข้มข้นของ RNA

ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ และคุณภาพ RNA ที่สกัดได้

ทำการวิเคราะห์ปริมาณ และคุณภาพ RNA โดยการนำ RNA ที่สกัดไว้ 2 ไมโครลิตร มาเติมด้วย RNase-free water 500 ไมโครลิตรลงในหลอดคิวเวทท์ (Cuvette) แล้วนำมาส่องผ่าน การดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ที่ค่า A260 และ A280 จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาปริมาณความเข้มข้นของ RNA จากสูตร

ความเข้มข้น RNA = A260 x dilution factor x 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากนั้นนำค่าความเข้มข้น RNA มาคำนวณปริมาตรที่ต้องการใน RNA 1 ไมโครกรัม จากสูตร

ปริมาตรที่ต้องการ (ไมโครลิตร) = $1 / A260 \times 10$

สำหรับการตรวจวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของ RNA ทำโดยการวัดค่าอัตราส่วนการดูดกลืนแสง A260/A280 ซึ่งถ้าได้มากกว่า 1.8 (ช่วง 1.9-2.2) ก็ถือว่า RNA นั้นมีความบริสุทธิ์ (Purity)

ขั้นตอนการแยกสกัดดีเอ็นเอต้นแบบ (complementary DNA: cDNA)

เป็นการสังเคราะห์ DNA สายแรก (First strand DNA) ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูปยี่ห้อ PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time: Takara, Shiga, Japan) ซึ่งมีขั้นตอนตามคำแนะนำของผู้ผลิตดังต่อไปนี้

1. ผสมสารที่ใช้ในปฏิกิริยา reverse transcription ทั้งหมดบนแท่นวางหลอด PCR เย็น (Cooling PCR-Rack) โดยให้สารทั้งหมดมีปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตรต่อ 1 ปฏิกิริยา (Reaction) ดังนี้

1.1. 5XPrimeScript RT Master Mix ปริมาตร 2 ไมโครลิตร

1.2. RNA 1 ไมโครกรัม โดยปริมาตรของแต่ละตัวอย่างขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ RNA

1.3. RNase Free dH2O ซึ่งเมื่อรวมกับ RNA แล้วมีปริมาตรรวมเท่ากับ 8 ไมโครลิตร

2. กระตุ้นปฏิกิริยา reverse transcription ด้วยการให้ความร้อนบนเครื่องอุ่นหลอดทดลอง (Heating Block) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ตามด้วยอุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วินาทีเพื่อหยุดปฏิกิริยา

3. เก็บ cDNA ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส หรือใช้ในปฏิกิริยา PCR ต่อไป
ขั้นตอนการวิเคราะห์การแสดงออกของ mRNA

ด้วยเทคนิคเรียลไทม์ รีเวอร์สทรานส์คริปเทส โพลีเมอเรสเชนรีแอคชั่น (Real Time reverse transcriptase polymerase chain reaction: RT-PCR) โดยทำการเตรียมไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบการแสดงออกของ mRNA ของ TNF- α IL-1 β และ β -actin ซึ่งเป็นยีนกลุ่มควบคุมภายใน (Internal control หรือ Reference gene) มีลำดับเบส ดังตารางต่อไปนี้

ตาราง 4 แสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ในการวิเคราะห์ด้วย PCR

ยีนเป้าหมาย	ลำดับเบส (5'-3')	ขนาด
TNF- α ⁽¹⁴⁰⁾	F: TCTTCTCGAACCCCGAGTGA R: CCTCTGATGGCACCACCAG	229 bp
IL-1 β ⁽¹⁴¹⁾	F: ATGATGGCTTATTACAGTGGCAA R: GTCGGAGATTCGTAGCTGGA	132 bp
β -actin ⁽¹⁰¹⁾	F: GGCATCCTCACCCCTGAAGTA R: GGGGTGTTGAAGGTCTCAA	203 bp

วิเคราะห์การแสดงออกของ mRNA โดยนำ DNA ที่ได้มาใช้เป็น cDNA โดยใช้เทคนิค RT-PCR ซึ่งใช้เครื่อง real time PCR รุ่นไลท์ไซเคิลเลอร์ 480 (LightCycler[®] 480 System: F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Switzerland) และใช้น้ำยาทดสอบสำเร็จรูป (Life-cycle[®] 480 SYBR Green I Master: Roche, UK)⁽¹⁴²⁾ ซึ่งเป็นสารละลายผสม (PCR Master Mix) ที่มี SYBR Green ซึ่งมีสี fluorescent dye เป็นตัวตรวจปฏิกิริยา โดยทำการทดสอบในภาตพลาสติกหลุมขนาด 96 หลุม (LightCycler[®] 480 Multiwell plate 96) ในการวิเคราะห์จะเตรียมสารละลายตามคำแนะนำของผู้ผลิตดังนี้

1. เจือจาง cDNA และไพรเมอร์ 10 เท่า ด้วย EASY Dilution (PrimeScript RT Master Mix, Takara, Shiga, Japan)
2. หยอด cDNA ปริมาตร 2 ไมโครลิตรต่อ 1 หลุม ลงในภาตพลาสติกหลุมขนาด 96 หลุม
3. หยอด PCR Master Mix ปริมาตร 18 ไมโครลิตรต่อ 1 หลุม ตามลงไป โดยมีส่วนผสมที่ประกอบด้วย

3.1 Master Mix ปริมาตร 10 ไมโครลิตร

3.2 น้ำกลั่น (PCR grade) ปริมาตร 7 ไมโครลิตร

3.3 ฟอว์เวิร์ดไพร์เมอร์ (10 ไมโครโมลาร์) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร

3.4 รีเวิร์สไพร์เมอร์ (10 ไมโครโมลาร์) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร

4. วิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง real time PCR โดยอาศัยหลักการวิเคราะห์สัญญาณแสงที่วัดได้ด้วยโปรแกรมของบริษัท โดยกำหนดอุณหภูมิดังต่อไปนี้

4.1 Pre-incubation 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

4.2 Amplification จำนวน 40 รอบ ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนดังนี้

4.2.1 Denaturation 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที

4.2.2 Annealing 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที

4.2.3 Extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที

4.3 Cooling 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

การเก็บรวบรวมข้อมูล

MTT

นำค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้มาคำนวณร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ด้วยสมการ⁽¹⁴³⁾

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

ODs คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตรของกลุ่มทดลอง

ODctrl คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตรของกลุ่มควบคุม

Real-time PCR

การวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Quantification analysis)

โปรแกรมจะคำนวณและสร้างกราฟความสัมพันธ์ (Amplification curve) ระหว่างปริมาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence) ที่ตรวจวัดได้กับจำนวนรอบของปฏิกิริยา (Cycle) จากนั้นจะทราบจำนวนรอบของปฏิกิริยาที่ทำให้ปริมาณแสงฟลูออเรสเซนซ์สูงกว่าระดับเริ่มเปลี่ยน ซึ่งค่าดังกล่าวนี้เรียกว่า Cycle threshold (CT value หรือ C_t) ต่อมานำค่า CT มาวัดปริมาณสัมพันธ์ (Relative quantification) ซึ่งเป็นการหาปริมาณ mRNA ที่ต่างกันระหว่าง TNF- α หรือ IL-1 β และ β -actin โดยนำค่า CT ของ β -actin ซึ่งเป็นยีนควบคุมภายในมาใช้เป็นค่าอ้างอิงในการเปรียบเทียบจำนวนเท่าในการแสดงออกของยีน (Expression level) ซึ่งจะได้ออกมาเป็นจำนวนเท่า (Fold change) โดยได้จากการคำนวณต่อไปนี้

$$\Delta CT = CT_{\text{target}} - CT_{\text{ref}}$$

$$\Delta \Delta CT = \Delta CT_{\text{treated}} - \Delta CT_{\text{control}}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta \Delta CT}$$

การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยา (Melting curve analysis)

วิเคราะห์จุดสูงสุด (Peak) ของกราฟระหว่างค่าแสงฟลูออเรสเซนซ์ (dF/dT) และ อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) เพื่อยืนยันว่าเป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ

การจัดกระทำข้อมูลและการวิเคราะห์ข้อมูล

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

1. ทำการวิเคราะห์สถิติทั้งหมดด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Statistical package for the social services (SPSS Statistics Base 22.0)
2. ทดสอบการแจกแจงด้วยชาปีโร-วิลค์ (Shapiro-Wilk test) เมื่อกลุ่มตัวอย่างน้อยกว่า 50 จากนั้นวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยการทดสอบของเลวีเน (Levene's test)
3. การวิเคราะห์การตอบสนองต่อสารสกัดหยาบไขมันชั้น ด้วยการทดสอบครุสคัล-วอลลิส (Kruskal-Wallis test) หากพบนัยสำคัญระหว่างกลุ่มทำการทดสอบรายคู่ด้วยวิธีดันทัน-บอนเฟอโรน (Dunn-Bonferroni test) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P-value < 0.05)
4. การทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ โดยทดสอบความแตกต่างของปัจจัยในแต่ละคู่ ด้วยวิธี Paired Samples t-Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P-value < 0.05)
5. การวิเคราะห์ความแตกต่างของการแสดงออกในยีน TNF- α และ IL-1 β โดยทดสอบความแตกต่างของปัจจัยในแต่ละคู่ด้วยวิธี Paired Samples t-Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P-value < 0.05)

บทที่ 4

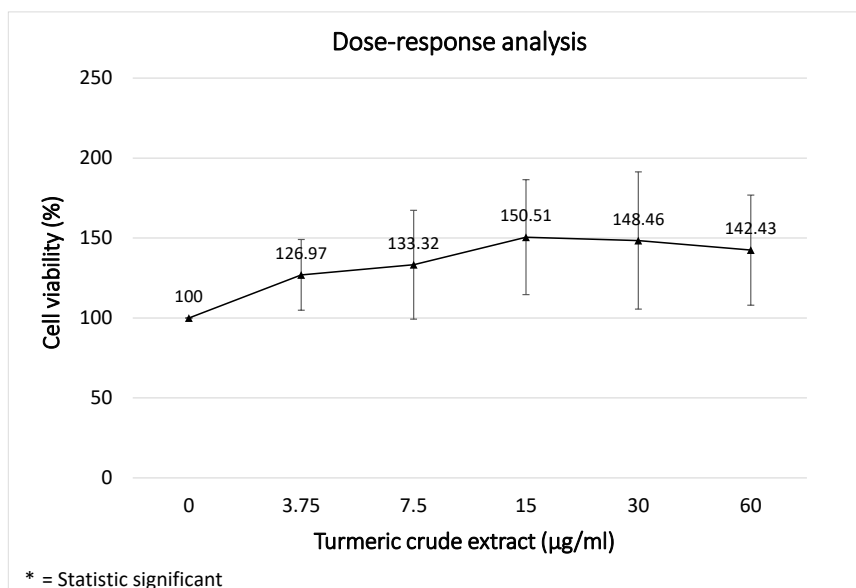
ผลการดำเนินงานวิจัย

ส่วนที่ 1 ผลการวิเคราะห์การตอบสนองต่อสารสกัดหยาบไขมันชั้น

ในการทดสอบการตอบสนองต่อสารสกัดหยาบไขมันชั้นของเซลล์ที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ไม่ผสมซีรัมที่มีสารสกัดหยาบไขมันชั้นความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ 0, 3.75, 7.5, 15, 30 และ 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยวิธี MTT assay โดยการทดสอบจะกำหนดให้เก็บเซลล์สร้างเส้นใยเหียงอกจากผู้ทดสอบทั้ง 3 คน และเซลล์ที่เก็บได้จากผู้ทดสอบแต่ละคนนั้นจะนำไปทดสอบแยกกันในแต่ละสภาวะ 2 ครั้ง ซึ่งแต่ละครั้งจะทำ 3 ซ้ำในแต่ละกลุ่ม จากผลการทดสอบในแต่ละกลุ่มพบว่า กลุ่มตัวอย่างทดสอบที่มีการให้สารสกัดหยาบไขมันชั้นจะมีค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์สูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับ ซึ่งค่าเฉลี่ยในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดหยาบไขมันชั้นจะอยู่ในช่วงระหว่างร้อยละ 120 – 150 โดยกลุ่มที่ได้รับสารสกัดหยาบไขมันชั้นเท่ากับ 15 และ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะมีค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์สูงสุดที่ร้อยละ 150.51 และ 148.46 ตามลำดับ ดังภาพประกอบที่ 26

เมื่อนำผลการทดลองข้างต้นมาทดสอบการแจกแจงของข้อมูลด้วยวิธี Shapiro-Wilk test พบว่าข้อมูลมีการแจกแจงแบบปกติ แต่เมื่อทดสอบความแปรปรวนด้วยวิธี Levene's test พบว่ามีความแปรปรวนไม่เท่ากันระหว่างกลุ่ม

เมื่อทดสอบสมมติฐานค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มด้วยวิธี Kruskal-Wallis test จากทั้ง 6 กลุ่ม ทำให้ทราบว่าในแต่ละกลุ่มมีค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P\text{-value} < 0.05$) จึงทดสอบทางสถิติว่า กลุ่มใดให้ค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ต่างจากกลุ่มอื่นด้วยวิธี Dunn-Bonferroni test พบว่า ในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดหยาบไขมันชั้นที่ความเข้มข้นระดับ 15 และ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นั้นแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอื่น อีกทั้งในกลุ่มที่เข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจะให้ค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์สูงกว่ากลุ่มอื่น จึงตัดสินใจเลือกกลุ่มนี้มาทดสอบในขั้นตอนถัดไป



ภาพประกอบ 26 ผลการวิเคราะห์การตอบสนองต่อสารสกัดหยาบขมิ้นชัน

หมายเหตุ [*] ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ส่วนที่ 2 ผลการวิเคราะห์ความมีชีวิตของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์

ทดสอบความมีชีวิตของเซลล์เมื่อเลี้ยงในสภาวะต่าง ๆ โดยแบ่งเป็น กลุ่มน้ำตาลปกติ ได้แก่ NG, NG+TUR, NG+LPS และ NG+LPS+TUR กลุ่มน้ำตาลสูง ได้แก่ HG, HG+TUR, HG+LPS และ HG+LPS+TUR โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ตามกลุ่มน้ำตาล 72 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ตามกลุ่มการได้รับสารสกัดหยาบขมิ้นชันและการกระตุ้นด้วย LPS 24 ชั่วโมง ตัวอย่างของผู้ทดสอบทั้ง 3 คน ซึ่งถูกทดลองแยกกัน 3 ครั้ง ด้วยการทดสอบซ้ำทั้งสิ้น 3 ซ้ำ ในแต่ละกลุ่ม

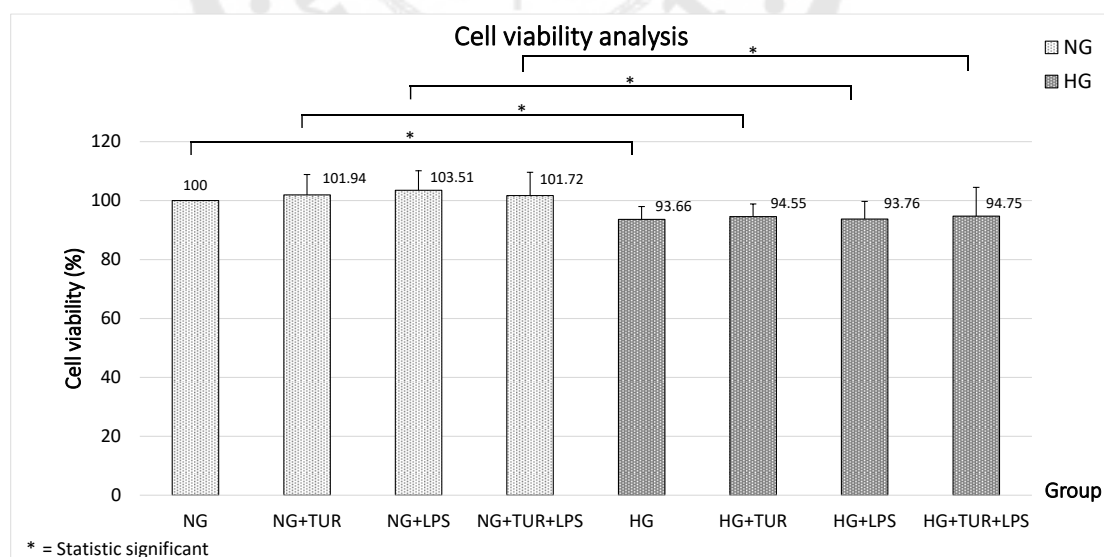
จากภาพประกอบที่ 27 แสดงผลการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ในกลุ่มน้ำตาลปกติในแต่ละสภาวะพบว่า เมื่อใส่สารสกัดหยาบขมิ้นชันที่ระดับ 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรจะช่วยเพิ่มค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ในกลุ่ม NG+TUR เมื่อเทียบกับ NG ตรงข้ามกับกลุ่มที่ได้รับ LPS แม้จะได้รับสารสกัดขมิ้นชันดังในกลุ่ม NG+TUR+LPS กลับไม่พบการเพิ่มขึ้นของค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์

อีกด้านหนึ่งเมื่อพิจารณาผลการทดสอบในกลุ่มน้ำตาลสูงในแต่ละสภาวะพบว่า เมื่อใส่สารสกัดหยาบขมิ้นชันที่ระดับ 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรจะมีค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์

เพิ่มขึ้นเฉลี่ยร้อยละ 1 ในกลุ่ม HG+TUR เมื่อเทียบกับ HG เช่นเดียวกับ HG+TUR+LPS เทียบกับ HG+LPS

เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของเซลล์ในกลุ่มทดสอบที่มีน้ำตาลปกติและน้ำตาลสูง โดยแบ่งการวิเคราะห์แยกเป็น 4 คู่คือ (NG เทียบกับ HG), (NG+TUR เทียบกับ HG+TUR), (NG+LPS เทียบกับ HG+LPS) และ (NG+TUR+LPS เทียบกับ HG+TUR+LPS) พบว่า กลุ่มที่มีน้ำตาลปกติจะมีค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ที่มากกว่ากลุ่มเซลล์ที่มีน้ำตาลสูงประมาณร้อยละ 10

ด้านการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่า ผลการทดสอบที่ได้นั้นมีการแจกแจงปกติด้วยวิธีการทดสอบของ Shapiro-Wilk test ต่อมาทดสอบสมมติฐานความแตกต่างของปัจจัยระดับน้ำตาล โดยกำหนดให้ทดสอบความแตกต่างของปัจจัยในแต่ละคู่ด้วยวิธี Paired Samples t-Test คือกลุ่ม (NG เทียบกับ HG), (NG+TUR เทียบกับ HG+TUR), (NG+LPS เทียบกับ HG+LPS) และ (NG+TUR+LPS เทียบกับ HG+TUR+LPS) พบว่า ในกลุ่มทดสอบที่มีน้ำตาลสูงจะส่งผลให้ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มน้ำตาลปกติ ($P\text{-value} < 0.05$) บ่งบอกได้ว่า เมื่อเซลล์ได้รับน้ำตาลสูงถึง 50 มิลลิโมลาร์ นาน 72 ชั่วโมงจะลดร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญ



ภาพประกอบ 27 ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ในกลุ่มน้ำตาลปกติและน้ำตาลสูงในแต่ละสภาวะ

หมายเหตุ [*] ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ส่วนที่ 3 การแสดงออกในระดับ mRNA ของยีน TNF- α โดยเทคนิค RT-PCR

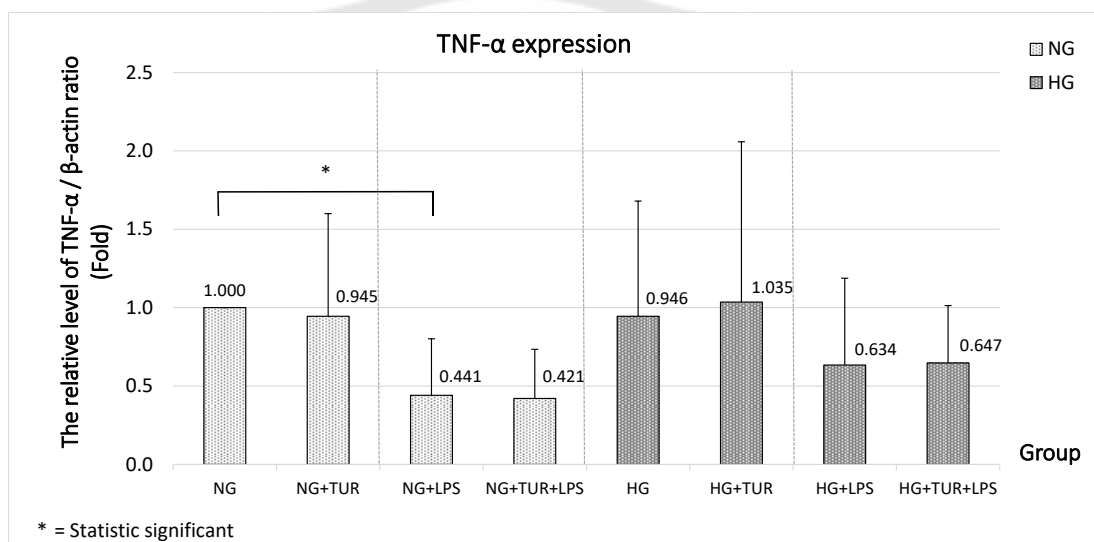
จากผลการทดสอบค่าการแสดงออกของ TNF- α ในระดับ mRNA ของเซลล์สร้างเส้นใย เหนือกมนุษย์ด้วยวิธี RT-PCR โดยนำเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงในเงื่อนไขต่าง ๆ จากตัวอย่างของผู้ทดสอบทั้ง 3 คน ซึ่งถูกทดลองแยกกัน 2 ครั้ง ด้วยการทดสอบซ้ำทั้งสิ้น 3 ซ้ำในแต่ละกลุ่ม ผลปรากฏว่าทั้งกลุ่ม NG+TUR และ HG+TUR ที่มีการเติมสารสกัดหยาบไขมันชั้นเข้าไปในแต่ละกลุ่มจะวัดระดับการแสดงออกของ TNF- α ได้เฉลี่ย 1 เท่า จากนั้นเมื่อเทียบกับกลุ่มที่มีการเติม LPS ร่วมด้วยจะได้ค่าเฉลี่ยของ TNF- α ประมาณ 0.5 เท่าเมื่อเทียบกับ β -actin

โดยผลการทดสอบที่ได้จากกลุ่มตัวอย่างในสภาวะน้ำตาลปกติพบว่า กลุ่ม NG+TUR จะส่งผลให้มีการแสดงออกของ TNF- α ลดลงเฉลี่ยร้อยละ 5.5 เมื่อเทียบกับกลุ่ม NG ซึ่งให้ผลในทิศทางเดียวกันกับกลุ่ม NG+TUR+LPS ที่มีค่า TNF- α ลดลงร้อยละ 4.5 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม NG+LPS หากพิจารณาเฉพาะปัจจัยของ LPS ในกลุ่มน้ำตาลปกติพบว่า กลุ่ม NG+LPS จะส่งผลให้มีการแสดงออกของ TNF- α ลดลงเฉลี่ยร้อยละ 56 เมื่อเทียบกับกลุ่ม NG ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับกลุ่ม NG+TUR+LPS ที่มีค่า TNF- α ลดลงร้อยละ 55 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม NG+TUR

เมื่อพิจารณาผลการทดสอบที่ได้จากกลุ่มตัวอย่างในสภาวะน้ำตาลสูงพบว่า กลุ่ม HG+TUR จะส่งผลให้มีการแสดงออกของ TNF- α เพิ่มขึ้นร้อยละ 9.4 เมื่อเทียบกับกลุ่ม HG โดยให้ผลไปในทิศทางเดียวกันกับกลุ่มที่เติมสารสกัดหยาบไขมันชั้นและ LPS ร่วมด้วย ซึ่งก็ไม่ทำให้การแสดงออกของ TNF- α ลดลง แต่พบว่าการแสดงออกของ TNF- α ในกลุ่ม HG+TUR+LPS เพิ่มขึ้นร้อยละ 2.1 เมื่อเทียบกับกลุ่ม HG+LPS หากพิจารณาเฉพาะปัจจัยของ LPS ในกลุ่มน้ำตาลสูงพบว่า กลุ่ม HG+LPS จะส่งผลให้มีการแสดงออกของ TNF- α ลดลงเฉลี่ยร้อยละ 33 เมื่อเทียบกับกลุ่ม HG ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับกลุ่ม HG+TUR+LPS ที่มีค่า TNF- α ลดลงร้อยละ 37 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม HG+TUR

จากการวิเคราะห์ทางสถิติ เมื่อทดสอบการแจกแจงของข้อมูลด้วย Shapiro-Wilk test พบว่าข้อมูลที่ได้จากการทดสอบนั้นมีการแจกแจงแบบปกติ ต่อมาทดสอบสมมติฐานความแตกต่างของปัจจัยสารสกัดหยาบไขมันชั้นที่ความเข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยกำหนดให้ทดสอบความแตกต่างของปัจจัยในแต่ละคู่ด้วยวิธี Paired Samples t-Test คือกลุ่ม (NG เทียบกับ NG+TUR), (NG+LPS เทียบกับ NG+TUR+LPS), (HG เทียบกับ HG+TUR) และ (HG+LPS เทียบกับ HG+TUR+LPS) ทำให้ทราบว่าสารสกัดหยาบไขมันชั้นลงไปในแต่ละกลุ่ม ไม่ส่งผลให้การแสดงออกของ TNF- α มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P-value < 0.05)

จากนั้นทดสอบสมมติฐานความแตกต่างของปัจจัย LPS ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตรโดยกำหนดให้ทดสอบความแตกต่างของปัจจัยในแต่ละคู่ด้วยวิธี Paired Samples t-Test คือกลุ่ม (NG เทียบกับ NG+LPS), (NG+TUR เทียบกับ NG+TUR+LPS), (HG เทียบกับ HG+LPS) และ (HG+TUR เทียบกับ HG+TUR+LPS) จากผลทดสอบแสดงให้เห็นว่าเฉพาะกลุ่ม NG+LPS มีการแสดงออกของ TNF- α แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P-value < 0.05) เมื่อเทียบกับกลุ่ม NG บ่งบอกได้ว่า เมื่อเซลล์ในกลุ่มน้ำตาลปกติได้รับ LPS ที่ ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจะลดค่าการแสดงออกของยีน TNF- α ได้อย่างมีนัยสำคัญ



ภาพประกอบ 28 อัตราส่วนการแสดงออกของ TNF- α ในระดับ mRNA เทียบกับ β -actin (เท่า)

หมายเหตุ [*] ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ส่วนที่ 4 การแสดงออกในระดับ mRNA ของยีน IL-1 β โดยเทคนิค RT-PCR

จากผลการตรวจสอบการแสดงออกของ IL-1 β ในระดับ mRNA ของเซลล์สร้างเส้นใย เหนือกมนุษย์ด้วยวิธี RT-PCR โดยนำเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงในเงื่อนไขต่าง ๆ จากตัวอย่างของผู้ทดสอบทั้ง 3 คน ซึ่งถูกทดลองแยกกัน 2 ครั้ง ด้วยการทดสอบซ้ำทั้งสิ้น 3 ซ้ำในแต่ละกลุ่ม ผลปรากฏว่าทั้งกลุ่ม NG+TUR และ HG+TUR ที่มีการเติมสารสกัดหยาบไขมันชั้นเข้าไปในแต่ละกลุ่มจะวัดระดับการแสดงออก IL-1 β ได้เฉลี่ย 0.6-0.8 เท่า จากนั้นเมื่อเทียบกับกลุ่มที่มีการเติม LPS ร่วมด้วยจะได้ค่าเฉลี่ยของ IL-1 β ประมาณ 0.8-1 เท่าเมื่อเทียบกับ β -actin

โดยผลการทดสอบที่ได้จากกลุ่มตัวอย่างในสภาวะน้ำตาลปกติพบว่า กลุ่ม NG+TUR จะส่งผลให้มีการแสดงออกของ IL-1 β ลดลงเฉลี่ยร้อยละ 45 เมื่อเทียบกับกลุ่ม NG อย่างไรก็ตามยังไม่เห็นผลจากการให้สารสกัดหยาบไขมันชั้นที่จะช่วยลดการแสดงออกของ IL-1 β ในกลุ่มตัวอย่างที่เพิ่ม LPS ดังเช่นในกลุ่ม NG+TUR+LPS เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม NG+LPS หากพิจารณาเฉพาะปัจจัยของ LPS ในกลุ่มน้ำตาลปกติพบว่า กลุ่ม NG+LPS จะส่งผลให้มีการแสดงออกของ IL-1 β ลดลงเฉลี่ยร้อยละ 26 เมื่อเทียบกับกลุ่ม NG ซึ่งให้ผลตรงกันข้ามกับกลุ่ม NG+TUR+LPS ที่มีค่า IL-1 β เพิ่มขึ้นร้อยละ 47 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม NG+TUR

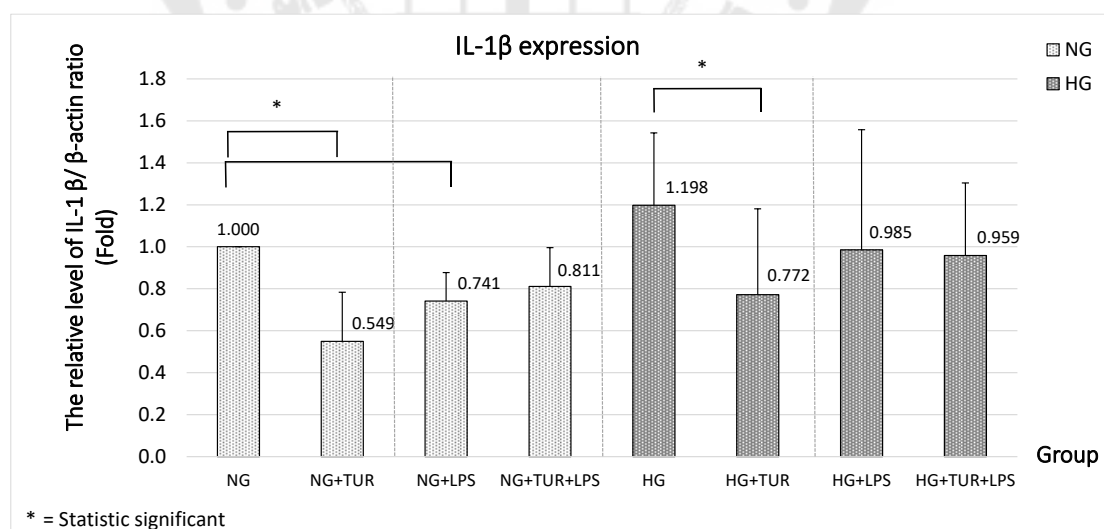
เมื่อพิจารณาผลการทดสอบที่ได้จากกลุ่มตัวอย่างในสภาวะน้ำตาลสูงพบว่าให้ผลลัพธ์ในทิศทางเดียวกันกับกลุ่มทดสอบในสภาวะน้ำตาลปกติ กล่าวคือ ผลจากการใส่สารสกัดหยาบไขมันชั้นลงไปดังในกลุ่ม HG+TUR จะช่วยลดการแสดงออกของ IL-1 β ได้ราวร้อยละ 36 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม HG แต่ทั้งนี้กลับยังไม่เห็นผลลัพธ์การเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนของการใส่สารสกัดหยาบไขมันชั้นในกลุ่มที่ได้รับ LPS ดังในกลุ่ม HG+TUR+LPS เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม HG+LPS หากพิจารณาเฉพาะปัจจัยของ LPS ในกลุ่มน้ำตาลสูงพบว่า กลุ่ม HG+LPS จะส่งผลให้มีการแสดงออกของ IL-1 β ลดลงเฉลี่ยร้อยละ 18 เมื่อเทียบกับกลุ่ม HG ซึ่งให้ผลขัดแย้งกับกลุ่ม HG+TUR+LPS ที่มีค่า IL-1 β เพิ่มขึ้นร้อยละ 24 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม HG+TUR

จากที่กล่าวมาข้างต้นแสดงให้เห็นว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดหยาบไขมันชั้นเพียงอย่างเดียวมีแนวโน้มลดการแสดงออกของ IL-1 β ทั้งในสภาวะน้ำตาลปกติ และน้ำตาลสูง นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่ม HG ที่ได้รับน้ำตาลสูงเพียงอย่างเดียวมีการแสดงออกของ IL-1 β เพิ่มขึ้นร้อยละ 19.8 เมื่อเทียบกับกลุ่ม NG

จากการวิเคราะห์ทางสถิติ เมื่อทดสอบการแจกแจงของข้อมูลด้วยวิธี Shapiro-Wilk test พบว่าข้อมูลที่ได้จากการทดสอบนั้นมีการแจกแจงแบบปกติ ต่อมาทดสอบสมมติฐานความแตกต่างของปัจจัยสารสกัดหยาบไขมันชั้นที่ความเข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยกำหนดให้

ทดสอบความแตกต่างของปัจจัยในแต่ละคู่ด้วยวิธี Paired Samples t-Test คือกลุ่ม (NG เทียบกับ NG+TUR), (NG+LPS เทียบกับ NG+TUR+LPS), (HG เทียบกับ HG+TUR) และ (HG+LPS เทียบกับ HG+TUR+LPS) ทำให้ทราบว่า เฉพาะกลุ่ม NG+TUR และ HG+TUR มีการแสดงออกของ IL-1 β แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P-value < 0.05) เมื่อเทียบกับกลุ่ม NG และ HG ตามลำดับ บ่งบอกได้ว่า เมื่อเซลล์ได้รับสารสกัดหยาบไขมันชั้นที่เข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจะลดค่าการแสดงออกของยีน IL-1 β ได้อย่างมีนัยสำคัญทั้งในกลุ่มน้ำตาลปกติและน้ำตาลสูง

จากนั้นทดสอบสมมุติฐานความแตกต่างของปัจจัย LPS ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยกำหนดให้ทดสอบความแตกต่างของปัจจัยในแต่ละคู่ด้วยวิธี Paired Samples t-Test คือกลุ่ม (NG เทียบกับ NG+LPS), (NG+TUR เทียบกับ NG+TUR+LPS), (HG เทียบกับ HG+LPS) และ (HG+TUR เทียบกับ HG+TUR+LPS) จากผลทดสอบแสดงให้เห็นว่าเฉพาะกลุ่ม NG+LPS มีการแสดงออกของ IL-1 β แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P-value < 0.05) เมื่อเทียบกับกลุ่ม NG บ่งบอกได้ว่า เมื่อเซลล์ในกลุ่มน้ำตาลปกติได้รับ LPS ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจะลดค่าการแสดงออกของยีน IL-1 β ได้อย่างมีนัยสำคัญ



ภาพประกอบ 29 อัตราส่วนการแสดงออกของ IL-1 β ในระดับ mRNA เทียบกับ β -actin (เท่า)

หมายเหตุ [*] ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

บทที่ 5

อภิปรายผล การสรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

ในการวิจัยเรื่องผลของสารสกัดหยาบขมิ้นชันต่อการแสดงออกของทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา และอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้าของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ที่กระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ในสภาวะน้ำตาลสูง ผู้วิจัยได้จำลองสภาวะโรคปริทันต์อักเสบและเบาหวานภายในห้องปฏิบัติการ และศึกษาผลของสารสกัดหยาบขมิ้นชันต่อการตอบสนองของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์โดยตัวชี้วัดที่ถูกใช้ในการทดสอบ คือ การแสดงออกในระดับ mRNA ของยีน TNF- α และ IL-1 β ในการศึกษาสามารถสรุปผลการดำเนินงาน โดยแบ่งหัวข้อในการสรุปผลได้ดังต่อไปนี้

1. อภิปรายผลการวิจัย
2. สรุปผลการวิจัย
3. ข้อเสนอแนะ

อภิปรายผลการวิจัย

ขมิ้นชันเป็นสมุนไพรที่มีคุณสมบัติด้านการอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระ และต้านแบคทีเรีย อีกทั้งยังสามารถนำมารักษาโรคที่มีการอักเสบเรื้อรัง เช่น โรคปริทันต์อักเสบ โรคเบาหวาน โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ โรคอ้วน โรคหลอดเลือดหัวใจ เป็นต้น^(21, 23) ซึ่งการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ผู้วิจัยได้ทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดหยาบขมิ้นชันต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ของเชื้อ *Pg* ในสภาวะน้ำตาลสูงภายในห้องปฏิบัติการ เพื่อจำลองสภาวะของเซลล์ในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบและโรคเบาหวาน โดยเปรียบเทียบการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีน TNF- α และ IL-1 β เนื่องจากไซโตไคน์ดังกล่าวจะพบมากเมื่อกระบวนการอักเสบเริ่มก่อตัว และมีการทำงานดังเช่นในโรคปริทันต์อักเสบและโรคเบาหวาน⁽⁵⁻⁷⁾ ในการศึกษา ผู้วิจัยได้มุ่งเน้นไปที่เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ เนื่องจากเป็นเซลล์ที่พบได้ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือก ซึ่งสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อปริทันต์ อีกทั้งเซลล์สร้างเส้นใยยังสามารถช่วยสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างอย่างคอลลาเจน และอีลาสติน (Elastin) อีกทั้งยังมีบทบาทสำคัญต่อการสร้างสารสื่ออักเสบจำนวนมากเช่น IL-1 β , IL-6, IL-8 และ TNF- α ภายในเนื้อเยื่อเหงือกเมื่อมีการรุกรานของแบคทีเรียหรือในสภาวะที่มีน้ำตาลสูง⁽¹⁴⁴⁾

ในการวิเคราะห์ความมีชีวิตของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดหยาบขมมีชั้นความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงพบว่า ทุกความเข้มข้นจะเพิ่มร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ และสารสกัดหยาบขมมีชั้นที่ความเข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีร้อยละความมีชีวิตของเซลล์สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\text{-value} < 0.05$) จากนั้นร้อยละความมีชีวิตของเซลล์จะมีแนวโน้มที่ลดลงเมื่อได้รับขมมีชั้นที่เข้มข้นสูงขึ้นเป็น 30 และ 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับการทดลองต่อไป โดยผลดังกล่าวนี้มีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Lantz R.C. และคณะ (2005)⁽⁷⁴⁾ ที่พบว่า สารสกัดหยาบขมมีชั้นที่น้อยกว่า 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะไม่เกิดพิษต่อเซลล์ และไม่เกิดฤทธิ์ทางชีวภาพใด ๆ ต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงเมื่อได้รับขมมีชั้นนาน 24 ชั่วโมง

หากพิจารณาในเรื่องการเจริญเติบโตของเซลล์ (Cell growth) ในการศึกษานี้ได้ทดสอบการตอบสนองของเซลล์ต่อขมมีชั้นที่ความเข้มข้นต่าง ๆ หลังจากที่ได้รับเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง กล่าวคือ หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เซลล์จะถูกบ่มด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีขมมีชั้นความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงทำการวัดร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ ซึ่งช่วงเวลาดังกล่าวเป็นช่วงที่กำลังเข้าสู่ระยะแบ่งตัวทวีคูณ (Log or exponential phase) ส่งผลให้มีการเพิ่มจำนวนเซลล์มากกว่าหากเปรียบเทียบกับ การวัดที่ระยะ 120 ชั่วโมงหลังจากเริ่มเพาะเลี้ยงเซลล์ ดังเช่นการทดลองที่ 2 ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่กำลังจะเข้าสู่ระยะคงจำนวนเซลล์ (Stationary phase) เนื่องจากระยะดังกล่าวเซลล์จะเจริญเติบโตเต็มที่ ความหนาแน่นของเซลล์มากขึ้น มีขอบของเซลล์อยู่ชิดกันเต็มพื้นที่จานเพาะเลี้ยงเซลล์ และขาดสารอาหารที่จำเป็นจึงทำให้มีเซลล์ตายเกิดขึ้น^(145, 146) ส่งผลให้มีจำนวนเซลล์ลดลงได้ ด้วยเหตุผลดังกล่าวนี้จึงพบร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ลดลงเมื่อได้รับสารสกัดขมมีชั้นในช่วงเวลาที่ต่างกัน

จากการทดลองนี้ได้มีการจำลองสภาวะของเซลล์ในผู้ป่วยโรคเบาหวาน โดยให้เซลล์ได้รับน้ำตาลสูงถึง 50 มิลลิโมลาร์ นาน 72 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์น้ำตาลปกติ ไม่ผสมซีรัม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะพบว่า ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ลดลงได้อย่างมีนัยสำคัญ ($P\text{-value} < 0.05$) แต่ก็มีการศึกษาอื่นที่พบว่า เมื่อบ่มเซลล์ในระดับน้ำตาลสูงที่มีเข้มข้นน้อยลงเป็น 25 มิลลิโมลาร์ นาน 72 ชั่วโมงกลับไม่พบความแตกต่างของร้อยละความมีชีวิตของเซลล์เมื่อเทียบกับกลุ่มน้ำตาลปกติอย่างมีนัยสำคัญ⁽¹⁴⁷⁾ นอกจากนี้ผลการทดสอบยังสอดคล้องกับการศึกษาของพริมา บูรณสิน และคณะ (2018)⁽¹⁰¹⁾ ที่พบว่า เมื่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ได้รับน้ำตาลสูงในระดับ 50 มิลลิโมลาร์ ในระยะเวลา 72 ชั่วโมงจะส่งผลให้เกิดความเครียด

ออกซิเดชัน จากนั้นจะเพิ่มอนุมูลอิสระในกลุ่ม ROS ภายในเซลล์ ซึ่งจะทำให้เซลล์เกิดความบกพร่องในการเคลื่อนที่ การเพิ่มจำนวน และเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ นอกจากนี้ยังทำให้เซลล์เกิดการตอบสนองต่อการรุกรานของเชื้อแบคทีเรียได้มากขึ้น ก็ย่อมส่งผลให้มีการหลั่งไซโตไคน์เพิ่มขึ้น จนนำไปสู่สภาวะการอักเสบของอวัยวะปริทันต์ที่เพิ่มขึ้นตามมาในผู้ป่วยเบาหวานได้⁽¹⁴⁸⁾ ในส่วนของการกระตุ้นด้วย LPS ที่เพิ่มเข้ามาในการทดลองนี้ เพื่อเป็นการจำลองสภาวะของเซลล์ในโรคปริทันต์อักเสบทำให้ทราบว่า กลุ่มที่มีการกระตุ้นด้วย LPS สามารถเพิ่มควมมีชีวิตของเซลล์ได้ อาจจะเป็นเนื่องมาจากเมื่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS จะเพิ่มกิจกรรมการเผาผลาญ (Metabolic activity) ภายในเซลล์เพื่อตอบสนองต่อ LPS ที่เพิ่มเข้ามา ส่งผลให้มีจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญ⁽¹⁴⁸⁾ แต่ก็ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ สอดคล้องกับการศึกษาของ Chiu H-C และคณะ (2017)⁽¹⁴⁹⁾ ที่ทำการบ่ม Pg LPS ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีระดับน้ำตาลปกติพบว่า มีร้อยละควมมีชีวิตเซลล์มีชีวิตเพิ่มขึ้น ตรงข้ามกับในระดับน้ำตาลสูงที่พบแนวโน้มว่ามีเซลล์ตายเพิ่มขึ้น ซึ่งเหมือนกับผลการทดลองนี้เมื่อได้รับ Pg LPS 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเช่นเดียวกัน

จากการวิเคราะห์การแสดงออกของ TNF- α และ IL-1 β ในระดับ mRNA ของการศึกษา นี้ ได้ทำการใส่สารสกัดหยาบขมิ้นชันเข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรกระตุ้นต่อเซลล์ HGF เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทั้งในกลุ่ม NG+TUR และกลุ่ม HG+TUR พบว่า การแสดงออกของยีน IL-1 β ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (P-value < 0.05) เมื่อเทียบกับกลุ่ม NG และกลุ่ม HG แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงนี้ในยีน TNF- α จากการศึกษาของ Xiao C-J และคณะ (2018)⁽²⁶⁾ แสดงให้เห็นว่า สารเคอร์คิวมินในขมิ้นชันมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ NF- κ B ส่งผลให้มีการสร้าง TNF- α IL-1 β และ COX-2 ลดลงในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ที่ได้รับ Pg LPS เนื่องจากเคอร์คิวมินเข้าไปขัดขวางการสร้างเอนไซม์ NF- κ B binding kinase (NIK) จึงไม่เกิดการเติมหมู่ฟอสเฟต และการเติมโปรตีนยูบิควิตินที่โมเลกุลของ I κ B α (Inhibitory KB α) จาก IKK complex จากนั้นจะไม่เกิดการปล่อย NF- κ B (RelA และ P50) อีสาระเข้าไปสู่นิวเคลียสของเซลล์ ส่งผลให้ไม่เกิดการ ทำงานของทรานสคริปชันแฟคเตอร์ NF- κ B⁽²⁵⁾ และจากการศึกษาเพิ่มเติมของ Yin H. และคณะ (2018)⁽⁶⁹⁾ พบว่าเคอร์คิวมินเข้าไปรบกวนการสร้าง IL-1 β ในหลาย ๆ ขั้นตอน ซึ่งต่างจาก TNF- α ที่เข้าไปยับยั้งการทำงานของ NF- κ B เท่านั้น โดยเคอร์คิวมินสามารถยับยั้งการถอดรหัสและแปลรหัสของโปรตีน NLRP3 และ pro IL-1 β ที่เป็นผลจากการยับยั้งของ NF- κ B นอกจากนี้เคอร์คิวมินนี้ยังขัดขวางการปล่อย ASC จากไมโตคอนเดรีย และป้องกันไม่ให้โปรตีนไซโตโครมออกซิเดสออกไปนอกเซลล์ สุดท้ายแล้วจะไม่เกิดการรวมตัวของ NLRP3 ACS และ pro caspase-1 เพื่อสร้าง NLRP3

inflammasome ที่สามารถเปลี่ยน pro-IL-1 β ให้เป็น IL-1 β ในรูปแบบที่ทำงานได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษานี้ที่พบการลดลงของยีน IL-1 β อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P-value < 0.05) เฉพาะในกลุ่มกลุ่มน้ำตาลปกติและน้ำตาลสูงที่ได้รับสารสกัดหยาบไขมันชั้นเข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยกระตุ้นต่อเซลล์ HGF เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

นอกจากนี้ยังมีปัจจัยเรื่องระยะเวลาในการเลี้ยงเซลล์ด้วย โดยจากการศึกษาของ Singh และ Aggarwal (1995)⁽¹⁵⁰⁾ พบว่าระยะเวลาในการได้รับเคอร์คิวมินมีความเป็นไปได้ที่จะส่งผลต่อการแสดงออกของยีน TNF- α เนื่องจากเคอร์คิวมินจะมีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการกระตุ้น NF-kB หากได้รับเคอร์คิวมินเป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อนที่จะมีการกระตุ้นให้เกิดการอักเสบ แต่ในการศึกษานี้ได้ใส่ไขมันพร้อมกับการกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย LPS อาจเป็นอีกเหตุผลหนึ่งที่ทำให้ไม่พบความแตกต่างของยีน TNF- α ในกลุ่มทดสอบเมื่อได้รับสารสกัดหยาบไขมันชั้น

ในการศึกษานี้ ผู้วิจัยได้ใช้สารสกัดหยาบจากไขมันชั้น ซึ่งเป็นสารสกัดชั้นต้นที่ได้จากผงของไขมันชั้นจากตัวทำละลายเอทานอล โดยไม่ได้ใช้สารเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ในการทดสอบเหมือนการวิจัยอื่น ๆ ที่ผ่านมา จึงอาจทำให้ความสามารถในการยับยั้งการอักเสบไม่ปรากฏเด่นชัดนักแตกต่างจากการศึกษาของ R.C. Lantz และคณะ (2005)⁽⁷⁴⁾ ที่ใช้เคอร์คิวมินบริสุทธิ์สามารถพบระดับความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ทำให้ Prostaglandins E2 ลดลงอยู่ที่ร้อยละ 50 (Median inhibitory concentration: IC50) เมื่อได้รับเคอร์คิวมิน ลำดับต่อมาคือ สารสกัดหยาบ บิสตีเมทอกซีเคอร์คิวมิน และดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน แสดงให้เห็นว่าเคอร์คิวมินมีฤทธิ์ในการยับยั้งการอักเสบได้ดีกว่าสารสกัดหยาบ เนื่องจากสามารถยับยั้งการสร้าง PGE2 ได้มากกว่า เมื่อใช้ความเข้มข้นที่เท่ากัน จึงมีความเป็นไปได้ว่าสารสกัดหยาบไขมันชั้นที่ใช้ในการศึกษานี้ อาจมีความเข้มข้นของเคอร์คิวมินไม่เพียงพอที่จะลดการแสดงออกของยีน TNF- α แต่สำหรับยีน IL-1 β ที่มีการแสดงออกที่ลดลงนั้น อาจเป็นผลมาจากตำแหน่งที่เคอร์คิวมินจะเข้าไปยับยั้งยีนนี้มีหลายช่องทาง จึงมีแนวโน้มทำให้ยีน IL-1 β ลดลงได้ทั้งในกลุ่มน้ำตาลปกติ และน้ำตาลสูง แต่ในกรณีที่เกิดมีการอักเสบเพิ่มขึ้น เช่น เมื่อได้รับ LPS การใส่ไขมันชั้นก็ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของยีน IL-1 β ได้แต่อย่างใด

เนื่องจากการศึกษานี้ไม่พบแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในแสดงออกของยีน TNF- α และ IL-1 β ระหว่างกลุ่มน้ำตาลปกติ และกลุ่มน้ำตาลสูง แต่มีการศึกษาที่พบว่า น้ำตาลที่เข้มข้นสูง (25 มิลลิโมลาร์) จะกระตุ้น TLR 2 และ TLR 4 ซึ่งเป็นตัวรับที่สำคัญในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด อีกทั้งน้ำตาลยังเข้าไปกระตุ้นให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระในกลุ่ม ROS ภายในไมโทคอน

เดรีย และ NADPH oxidase ต่อมาจะส่งสัญญาณไปยังทรานสคริปชันแฟกเตอร์ NF- κ B ทำให้เกิดการสร้างยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น TNF- α NLRP3 ASC Caspase-1 และ IL-1 β มากขึ้น เมื่อเทียบกับกลุ่มน้ำตาลปกติอย่างมีนัยสำคัญ (P-value < 0.05) ก็ต่อเมื่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ได้รับน้ำตาลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นการแสดงออกของยีนทั้งหมดจะลดลงใน 72 ชั่วโมง^(96, 147, 151). ในขณะที่เซลล์อื่น ๆ เช่น เซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก⁽¹⁵²⁾ เซลล์แมคโครฟาจ⁽¹⁵³⁾ และเซลล์สร้างกระดูก⁽¹⁵⁴⁾ จะพบการแสดงออกของยีนดังกล่าวมากที่สุด เมื่อได้รับน้ำตาลสูง (25 มิลลิโมลาร์) เป็นเวลานานกว่าถึง 48 ชั่วโมง ดังนั้นจึงอาจจะเป็นข้อสันนิษฐานได้ว่าในการทดลองนี้เข้าไปตรวจสอบการแสดงออกของยีน TNF- α และ IL-1 β ในช่วงเวลา 96 ชั่วโมง ซึ่งอาจเป็นระยะที่มีการอักเสบลดลงแล้ว จึงส่งผลให้ไม่พบความแตกต่างของยีนทั้งคู่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มน้ำตาลปกติ และกลุ่มน้ำตาลสูง เนื่องจากเมื่อเซลล์ได้รับน้ำตาลสูงเป็นเวลามากกว่า 24 ชั่วโมง อาจจะทำให้เกิดกระบวนการแปลรหัสจากลำดับเบสบนสาย mRNA ให้เป็นลำดับกรดอะมิโนเพื่อสังเคราะห์โปรตีน ดังตัวอย่างงานวิจัยของ Mohan R. และคณะ (2007)⁽¹⁵³⁾ ที่ได้จำลองสภาวะน้ำตาลสูงในเซลล์โมโนไซต์ โดยพบการแสดงออกในระดับ mRNA ของ IL-1 β มากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ (P-value < 0.05) ในช่วงเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นจะลดลงในอีก 24 ชั่วโมงต่อมา โดยในช่วงเวลาดังกล่าวนี้กลับมีการเพิ่มขึ้นของ IL-1 β ในระดับโปรตีนอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นทางผู้วิจัยเสนอว่าควรที่จะมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยเลือกตรวจสอบในระยะเวลาที่มีแนวโน้มจะเกิดการแสดงออกของยีนมากที่สุด ดังเช่นในช่วงเวลา 24 ชั่วโมง แทนช่วงเวลา 96 ชั่วโมง อีกทั้งควรที่จะมีการศึกษาในระดับโปรตีนเพิ่มเติมต่อไป

ในการทดลองนี้ได้มีการจำลองสภาวะของเซลล์ในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ โดยให้ LPS จากเชื้อ *P.gingivalis* แก่เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ ซึ่ง LPS สามารถทำให้เกิดการหลั่งสารสื่ออักเสบในเซลล์ จนนำไปสู่การเกิดปฏิกิริยาการอักเสบตามมาได้ ในช่วงเริ่มต้นของการอักเสบจะเกิดการสร้าง TNF- α ซึ่งเป็นสารสื่อการอักเสบที่สามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างซูเปอร์ออกไซด์ จากนั้นจะมีการสร้าง IL-1 β ทำให้มีการทำลายของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและเกิดการสลายของกระดูกเบ้าฟัน^(6, 7) สำหรับผลจากการศึกษานี้พบว่า การแสดงออกของ TNF- α และ IL-1 β ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (P < 0.05) เมื่อได้รับ Pg LPS 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมงในกลุ่มน้ำตาลปกติ ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาที่พบว่า เมื่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ที่ได้รับ Pg LPS 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจะมีการเพิ่มขึ้นของ TNF- α IL-1 β IL-6 และ IL-8 ในระยะ 4-6 ชั่วโมงแรกเท่านั้น ต่อมาสารสื่ออักเสบเหล่านี้จะชักนำให้เกิดการทำงานของตัวควบคุมเชิงลบ (Negative regulator)⁽¹⁵⁵⁾ เช่น miRNA-146 ซึ่งทำหน้าที่ลดการแสดงออกของสารสื่ออักเสบใน

ระยะ 8 ชั่วโมง เนื่องจาก miRNA จะมีหน้าที่ควบคุมหลังการถอดรหัส (Post-transcriptional regulators) โดยจะเข้าไปจับบน mRNA เป้าหมายส่งผลให้หยุดการแสดงออกของยีน (Gene silencing) ต่อมาจะลดการถอดรหัสของสารสื่ออักเสบทั้ง TNF- α และ IL-1 β ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง⁽¹⁵⁶⁾ จึงอาจอนุมานได้ว่า ผลจากการลดลงของยีน IL-1 β และ TNF- α เมื่อได้รับ Pg LPS 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมงดังเช่นในการศึกษานี้มีสาเหตุมาจากการทำงานของ miRNA นอกจากนี้ในระยะเวลาดังกล่าวอาจจะเป็นช่วงที่เกิดกระบวนการแปลรหัสของ mRNA เพื่อสังเคราะห์โปรตีนจึงทำให้ไม่สามารถตรวจพบยีนทั้งสองได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Gang Xiong และคณะ (2019)⁽¹⁵⁷⁾ ที่พบว่าในช่วงเวลาดังกล่าวจะเกิดการหลังโปรตีนของ IL-1 β และ TNF- α เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อได้รับ Pg LPS 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นควรที่จะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในช่วงเวลาเหมาะสมต่อไป

สรุปผลการวิจัย

ความมีชีวิตของเซลล์สร้างเส้นใยเหืองอกมนุษย์ลดลงเมื่ออยู่ในสภาวะน้ำตาลสูง แต่ในสภาวะที่ได้รับไขมันชั้นกลับพบความมีชีวิตของเซลล์เพิ่มขึ้น อีกทั้งไขมันชั้นที่เข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเซลล์ได้รับเป็นเวลา 24 ชั่วโมงนั้นยังส่งผลให้การแสดงออกของ IL-1 β ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P-value < 0.05) แต่พบเฉพาะในสภาวะน้ำตาลปกติและน้ำตาลสูงที่ไม่ได้รับการกระตุ้นใด ๆ เท่านั้น ซึ่งหากได้รับ LPS ร่วมด้วยกลับพบว่าไขมันชั้นจะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของ IL-1 β แต่อย่างใด เช่นเดียวกับ TNF- α ที่ไม่พบการลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยไขมันชั้นที่เข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรทั้งในสภาวะน้ำตาลปกติ น้ำตาลสูง และเมื่อได้รับ LPS ร่วมด้วย

ข้อเสนอแนะ

เพื่อเปรียบเทียบว่าควรใช้สารสกัดหยาบ หรือใช้สารบริสุทธิ์ในการเตรียมการทดสอบเพื่อใช้ในการรักษาโรคปริทันต์อักเสบต่อไป อาจจะต้องทำการศึกษาเพิ่มเติม โดยเลือกเฉพาะสารบริสุทธิ์เคอร์คิวมินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ นำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบในสภาวะน้ำตาลสูงที่ได้รับ Pg LPS ในช่วงเวลาและความเข้มข้นที่ทำให้เกิดการอักเสบมากที่สุด เพื่อจำลองการเกิดโรคปริทันต์อักเสบในผู้ป่วยเบาหวาน

บรรณานุกรม

1. Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2000;27(9):648-57.
2. Zhao J, Liu D, Duan F, Wei Y. Effect of mesenchymal stem cell conditioned medium on human gingival fibroblast proliferation and collagen synthesis. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2017;10:15244-9.
3. Pan W, Wang Q, Chen Q. The cytokine network involved in the host immune response to periodontitis. *International Journal of Oral Science*. 2019;11.
4. Du M, Wang Y, Liu Z, Wang L, Cao Z, Zhang C, et al. Effects of IL-1beta on MMP-9 Expression in Cementoblast-Derived Cell Line and MMP-Mediated Degradation of Type I Collagen. *Inflammation*. 2019;42(2):413-25.
5. Kitaura H, Kimura K, Ishida M, Kohara H, Yoshimatsu M, Takano-Yamamoto T. Immunological reaction in TNF-alpha-mediated osteoclast formation and bone resorption in vitro and in vivo. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:181849.
6. Ross FP, Teitelbaum SL. $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ and macrophage colony-stimulating factor: partners in osteoclast biology. *Immunological reviews*. 2005;208(1):88-105.
7. Agarwal S, Baran C, Piesco NP, Quintero JC, Langkamp HH, Johns LP, et al. Synthesis of proinflammatory cytokines by human gingival fibroblasts in response to lipopolysaccharides and interleukin-1 beta. *J Periodontal Res*. 1995;30(6):382-9.
8. Azouni KG, Tarakji B. The trimeric model: a new model of periodontal treatment planning. *J Clin Diagn Res*. 2014;8(7):Ze17-20.
9. อิชยา เขียมวัฒนา. โรคปริทันต์ด้านการติดเชื้อ. พิมพ์ครั้งที่ 1 ed. พิษณุโลก: มหาวิทยาลัยนเรศวร; 2561.
10. Srinath S. Management of Periodontal Disease with Doxycycline: An Update. *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2015;7(4):252-5.
11. Vernillo AT. Dental considerations for the treatment of patients with diabetes mellitus. *J Am Dent Assoc*. 2003;134 Spec No:24s-33s.

12. Mealey BL, Oates TW. Diabetes mellitus and periodontal diseases. *J Periodontol*. 2006;77(8):1289-303.
13. Mirza BA, Syed A, Izhar F, Ali Khan A. Bidirectional relationship between diabetes and periodontal disease: review of evidence. *J Pak Med Assoc*. 2010;60(9):766-8.
14. Bastos AS, Graves DT, Loureiro APdM, Rossa Júnior C, Abdalla DSP, Faulin TdES, et al. Lipid peroxidation is associated with the severity of periodontal disease and local inflammatory markers in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(8):E1353-E62.
15. Yu S, Li H, Ma Y, Fu Y. Matrix Metalloproteinase-1 of Gingival Fibroblasts Influenced by Advanced Glycation End Products (AGEs) and Their Association With Receptor for AGEs and Nuclear Factor- κ B in Gingival Connective Tissue. *Journal of Periodontology*. 2012;83(1):119-26.
16. Kim J, Amar S. Periodontal disease and systemic conditions: a bidirectional relationship. *Odontology*. 2006;94(1):10-21.
17. Li X, Kolltveit KM, Tronstad L, Olsen I. Systemic diseases caused by oral infection. *Clin Microbiol Rev*. 2000;13(4):547-58.
18. He Y, Yue Y, Zheng X, Zhang K, Chen S, Du Z. Curcumin, inflammation, and chronic diseases: how are they linked? *Molecules* [Internet]. 2015; 20(5):[9183-213 pp.].
19. Pothitirat W, Gritsanapan W. Quantitative Analysis of Curcumin, Demethoxycurcumin and Bisdemethoxycurcumin in the Crude Curcuminoid Extract from *Curcuma longa* in Thailand by TLC- Densitometry. *J Pharm Sci*. 2005;32.
20. Chainani-Wu N. Safety and anti-inflammatory activity of curcumin: a component of tumeric (*Curcuma longa*). *J Altern Complement Med*. 2003;9(1):161-8.
21. Jurenka JS. Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research. *Altern Med Rev* [Internet]. 2009 Jun; 14(2):[141-53 pp.].
22. สมพร ภูติยานันต์. ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับการแพทย์แผนไทย: ว่าด้วยสมุนไพรกับการแพทย์แผนไทย. พิมพ์ครั้งที่ 4 (แก้ไขปรับปรุงใหม่). ed: เชียงใหม่ : สายวิชาวิทยาศาสตร์เภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2546.

23. Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin as "Curecumin": From kitchen to clinic. *Biochemical Pharmacology* [Internet]. 2008 2008/02/15/; 75(4):[787-809 pp.].
24. Cho JW, Lee KS, Kim CW. Curcumin attenuates the expression of IL-1beta, IL-6, and TNF-alpha as well as cyclin E in TNF-alpha-treated HaCaT cells; NF-kappaB and MAPKs as potential upstream targets. *Int J Mol Med*. 2007;19(3):469-74.
25. Jobin C, Bradham CA, Russo MP, Juma B, Narula AS, Brenner DA, et al. Curcumin blocks cytokine-mediated NF-kappa B activation and proinflammatory gene expression by inhibiting inhibitory factor I-kappa B kinase activity. *J Immunol*. 1999;163(6):3474-83.
26. 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.
27. Nagpal M, Sood S. Role of curcumin in systemic and oral health: An overview. *J Nat Sci Biol Med*. 2013;4(1):3-7.
28. Jain SK, Rains J, Croad J, Larson B, Jones K. Curcumin supplementation lowers TNF-alpha, IL-6, IL-8, and MCP-1 secretion in high glucose-treated cultured monocytes and blood levels of TNF-alpha, IL-6, MCP-1, glucose, and glycosylated hemoglobin in diabetic rats. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11(2):241-9.
29. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998;25(2):134-44.
30. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *The Lancet*. 2005;366(9499):1809-20.
31. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(9):745-56.
32. Chiewchengchol D, Wright HL, Thomas HB, Lam CW, Roberts KJ, Hirankarn N, et al. Differential changes in gene expression in human neutrophils following TNF- α stimulation: Up-regulation of anti-apoptotic proteins and down-regulation of proteins involved in death receptor signaling. *Immun Inflamm Dis*. 2015;4(1):35-44.
33. Dinarello CA. The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol*. 2002;20(5 Suppl 27):S1-13.
34. Liu YC, Lerner UH, Teng YT. Cytokine responses against periodontal infection:

protective and destructive roles. *Periodontol* 2000. 2010;52(1):163-206.

35. Pawar H, Gavasane A, Choudhary P. A Novel and Simple Approach for Extraction and Isolation of Curcuminoids from Turmeric Rhizomes. *Advances in Recycling & Waste Management*. 2018;06.

36. Yadav DK, Sharma K, Dutta A, Kundu A, Awasthi A, Goon A, et al. Purity evaluation of curcuminoids in the turmeric extract obtained by accelerated solvent extraction. *Journal of AOAC International*. 2017;100(3):586-91.

37. Kiuchi F, Goto Y, Sugimoto N, AKAO N, KONDO K, TSUDA Y. Nematocidal activity of turmeric: synergistic action of curcuminoids. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1993;41(9):1640-3.

38. Chattopadhyay I, Biswas K, Bandyopadhyay U, Banerjee R. Turmeric and curcumin: Biological actions and medicinal applications. *Current Science [Internet]*. 2004; 87(1):[44-53 pp.].

39. Gritsanapan W. Popular natural cosmetics in Thailand and their natural components. *Journal of Health Research*. 2004;18(1):23-9.

40. สุदारัตน์ หอมหวล. ขมิ้นชันจากฐานข้อมูลเครื่องยาสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี 2553 [สืบค้นเมื่อ 13 เมษายน 2563]. Available from: <http://www.thaicrudedrug.com/main.php?action=viewpage&pid=34>.

41. พีรศักดิ์ วรสุนทรโรสถ. ทรัพยากรพืชในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ 12 (1) : พืชสมุนไพร และพืชพิษ เล่ม 1 = Plant resources of South-East Asia : Prosea. พิมพ์ครั้งที่ 1.. ed: กรุงเทพฯ : สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย; 2546.

42. Prucksunand C, Indrasukhsri B, Leethochawalit M, Hungspreugs K. Phase II clinical trial on effect of the long turmeric (*Curcuma longa* Linn.) on healing of peptic ulcer. *Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*. 2001;32(1):208-15.

43. Aggarwal B, Kumar A, Aggarwal M, Shishodia S. Curcumin Derived from Turmeric (*Curcuma longa*): a Spice for All Seasons. *Phytopharmaceuticals in Cancer Chemoprevention [Internet]*. 2004 10/28; 23.

44. Kunnumakkara AB, Bordoloi D, Padmavathi G, Monisha J, Roy NK, Prasad S, et al. Curcumin, the golden nutraceutical: multitargeting for multiple chronic diseases. *Br J*

Pharmacol [Internet]. 2017; 174(11):[1325-48 pp.].

45. Shen L, Ji HF. Theoretical study on physicochemical properties of curcumin. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2007;67(3-4):619-23.
46. Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP. Curcumin: the story so far. *Eur J Cancer* [Internet]. 2005 Sep; 41(13):[1955-68 pp.].
47. Dosoky NS, Setzer WN. Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oils of Curcuma Species. *Nutrients*. 2018;10(9):1196.
48. Negi PS, Jayaprakasha GK, Jagan Mohan Rao L, Sakariah KK. Antibacterial activity of turmeric oil: a byproduct from curcumin manufacture. *J Agric Food Chem*. 1999;47(10):4297-300.
49. Hans VM, Grover HS, Deswal H, Agarwal P. Antimicrobial Efficacy of Various Essential Oils at Varying Concentrations against Periopathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*. 2016;10(9):ZC16-ZC9.
50. Liju VB, Jeena K, Kuttan R. An evaluation of antioxidant, anti-inflammatory, and antinociceptive activities of essential oil from *Curcuma longa*. *L. Indian journal of pharmacology*. 2011;43(5):526-31.
51. Apisariyakul A, Vanittanakom N, Buddhasukh D. Antifungal activity of turmeric oil extracted from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 1995;49(3):163-9.
52. Li C, Li L, Luo J, Huang N. [Effect of turmeric volatile oil on the respiratory tract]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 1998;23(10):624-5, inside back cover.
53. Pothitirat W, Gritsanapan W. Variation of bioactive components in *Curcuma longa* in Thailand. *Current Science*. 2006;91.
54. Unnikrishnan MK, Rao MN. Inhibition of nitrite induced oxidation of hemoglobin by curcuminoids. *Pharmazie*. 1995;50(7):490-2.
55. Pulla Reddy AC, Lokesh BR. Studies on spice principles as antioxidants in the inhibition of lipid peroxidation of rat liver microsomes. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 1992;111(1):117-24.
56. Araujo CC, Leon LL. Biological activities of *Curcuma longa* L. *Mem Inst Oswaldo*

Cruz [Internet]. 2001 Jul; 96(5):[723-8 pp.].

57. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res*. 2010;107(9):1058-70.

58. Msolly A, Miled A, Kassab A. Hydrogen peroxide: an oxidant stress indicator in type 2 diabetes mellitus. *Journal of Cardiovascular Disease*. 2013;1(2):48-52.

59. Balasubramanyam M, Koteswari A, Kumar R, Monickaraj F, Maheswari J, Mohan V. Curcumin-induced inhibition of cellular reactive oxygen species generation: Novel therapeutic implications. *Journal of biosciences*. 2004;28:715-21.

60. Hu P, Huang P, Chen MW. Curcumin reduces *Streptococcus mutans* biofilm formation by inhibiting sortase A activity. *Arch Oral Biol*. 2013;58(10):1343-8.

61. Izui S, Sekine S, Maeda K, Kuboniwa M, Takada A, Amano A, et al. Antibacterial Activity of Curcumin Against Periodontopathic Bacteria. *Journal of Periodontology*. 2016;87(1):83-90.

62. Sukumaran SK, Vadakkekuttical RJ, Kanakath H. Comparative evaluation of the effect of curcumin and chlorhexidine on human fibroblast viability and migration: An in vitro study. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 2020;24(2):109-16.

63. Srimal RC, Dhawan BN. Pharmacology of diferuloyl methane (curcumin), a non-steroidal anti-inflammatory agent. *J Pharm Pharmacol* [Internet]. 1973 Jun; 25(6):[447-52 pp.].

64. Abe Y, Hashimoto SHU, Horie T. CURCUMIN INHIBITION OF INFLAMMATORY CYTOKINE PRODUCTION BY HUMAN PERIPHERAL BLOOD MONOCYTES AND ALVEOLAR MACROPHAGES. *Pharmacological Research*. 1999;39(1):41-7.

65. Menon VP, Sudheer AR. ANTIOXIDANT AND ANTI-INFLAMMATORY PROPERTIES OF CURCUMIN. In: Aggarwal BB, Surh Y-J, Shishodia S, editors. *The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease*. Boston, MA: Springer US; 2007. p. 105-25.

66. ดิเรกฤทธิ์ เชี่ยวเชิงชด. ภูมิคุ้มกันวิทยาทางการแพทย์. พิมพ์ครั้งที่ 1 ed. กรุงเทพฯ หน่วย ภูมิคุ้มกันวิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2562. 419 p.

67. Chan MM-Y. Inhibition of tumor necrosis factor by curcumin, a phytochemical.

Biochemical Pharmacology. 1995;49(11):1551-6.

68. Vandanmagsar B, Youm YH, Ravussin A, Galgani JE, Stadler K, Mynatt RL, et al. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Med*. 2011;17(2):179-88.

69. Yin H, Guo Q, Li X, Tang T, Li C, Wang H, et al. Curcumin Suppresses IL-1 β Secretion and Prevents Inflammation through Inhibition of the NLRP3 Inflammasome. *J Immunol*. 2018;200(8):2835-46.

70. Williams A. *Immunology : mucosal and body surface defences*. Hussell T, Lloyd C, editors: Chichester, West Sussex, Hoboken, NJ : Wiley-Blackwell; 2012.

71. Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunological reviews*. 2018;281(1):8-27.

72. Sahebkar A, Cicero AFG, Simental-Mendia LE, Aggarwal BB, Gupta SC. Curcumin downregulates human tumor necrosis factor- α levels: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Pharmacol Res*. 2016;107:234-42.

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

74. Lantz RC, Chen GJ, Solyom AM, Jolad SD, Timmermann BN. The effect of turmeric extracts on inflammatory mediator production. *Phytomedicine*. 2005;12(6-7):445-52.

75. Zhang D-W, Fu M, Gao S-H, Liu J-L. Curcumin and diabetes: a systematic review. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013:636053-.

76. Kazmi N. Assessment of blood glucose levels under general anaesthesia in diabetic patients. *International Journal of Medical and Health Research*. 2017;3(3):138-40.

77. Association AD. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2020. *Diabetes Care*. 2020;43(Supplement 1):S14.

78. Charfen MA, Fernandez-Frackelton M. Diabetic ketoacidosis. *Emerg Med Clin North Am*. 2005;23(3):609-28, vii.

79. Kitabchi AE, Umpierrez GE, Murphy MB, Barrett EJ, Kreisberg RA, Malone JI, et al. Management of hyperglycemic crises in patients with diabetes. *Diabetes Care*.

2001;24(1):131-53.

80. Chawla A, Chawla R, Jaggi S. Microvascular and macrovascular complications in diabetes mellitus: Distinct or continuum? *Indian J Endocrinol Metab.* 2016;20(4):546-51.

81. สมาคมโรคเบาหวานแห่งประเทศไทย ในพระราชูปถัมภ์สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี, สมาคมต่อมไร้ท่อแห่งประเทศไทย, กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข, สำนักงานหลักประกันสุขภาพแห่งชาติ. แนวทางเวชปฏิบัติสำหรับโรคเบาหวาน 2560 Clinical Practice Guideline for Diabetes 2017. พิมพ์ครั้งที่ 3 ed. กรุงเทพฯ: บริษัท ร่มเย็น มีเดีย จำกัด; 2560.

82. Lyssenko V, Jonsson A, Almgren P, Pulizzi N, Isomaa B, Tuomi T, et al. Clinical risk factors, DNA variants, and the development of type 2 diabetes. *New England Journal of Medicine.* 2008;359(21):2220-32.

83. Bellamy L, Casas J-P, Hingorani AD, Williams D. Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet.* 2009;373(9677):1773-9.

84. Mealey BL, Ocampo GL. Diabetes mellitus and periodontal disease. *Periodontol* 2000. 2007;44:127-53.

85. Tobias DK, Hu FB, Forman JP, Chavarro J, Zhang C. Increased risk of hypertension after gestational diabetes mellitus: findings from a large prospective cohort study. *Diabetes care.* 2011;34(7):1582-4.

86. Association AD. 2. Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes care.* 2017;40(Supplement 1):S11-S24.

87. กลุ่มยุทธศาสตร์และแผนงาน สำนักโรคไม่ติดต่อ กรมควบคุมโรค. แผนยุทธศาสตร์การป้องกันและควบคุมโรคไม่ติดต่อระดับชาติ 5 ปี (พ.ศ. 2560-2564). กรุงเทพฯ: บริษัท อีโมชัน อาร์ต จำกัด; 2560.

88. Lakschevitz F, Aboodi G, Tenenbaum H, Glogauer M. Diabetes and Periodontal Diseases: Interplay and Links. *Current diabetes reviews.* 2011;7:433-9.

89. Aemaimanan Piyamas, Aemaimanan Piyawan, Suwimol T. Quantification of key periodontal pathogens in insulin-dependent type 2 diabetic and non-diabetic patients with generalized chronic periodontitis. *Anaerobe.* 2013;22:64-8.

90. Demmer RT, Jacobs Jr DR, Singh R, Zuk A, Rosenbaum M, Papapanou P, et al.

Periodontal bacteria and prediabetes prevalence in ORIGINS: the oral infections, glucose intolerance, and insulin resistance study. *Journal of dental research*.

2015;94(9_suppl):201S-11S.

91. Salvi GE, Beck JD, Offenbacher S. PGE2, IL-1 beta, and TNF-alpha responses in diabetics as modifiers of periodontal disease expression. *Ann Periodontol*. 1998;3(1):40-50.

92. Lew JH, Naruishi K, Kajiura Y, Nishikawa Y, Ikuta T, Kido JI, et al. High Glucose-Mediated Cytokine Regulation in Gingival Fibroblasts and THP-1 Macrophage: a Possible Mechanism of Severe Periodontitis with Diabetes. *Cell Physiol Biochem*. 2018;50(3):973-86.

93. 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.

94. Goh S-Y, Cooper ME. The Role of Advanced Glycation End Products in Progression and Complications of Diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2008;93(4):1143-52.

95. Uehara A, Takada H. Functional TLRs and NODs in human gingival fibroblasts. *J Dent Res*. 2007;86(3):249-54.

96. Jiang S-Y, Wei C-C, Shang T-T, Lian Q, Wu C-X, Deng J-Y. High glucose induces inflammatory cytokine through protein kinase C-induced toll-like receptor 2 pathway in gingival fibroblasts. *Biochemical and biophysical research communications*. 2012;427(3):666-70.

97. Guemes M, Rahman S, Hussain K. What is a normal blood glucose? *Archives of Disease in Childhood*. 2015;101.

98. Willershausen-Zonnchen B, Lemmen C, Hamm G. Influence of high glucose concentrations on glycosaminoglycan and collagen synthesis in cultured human gingival fibroblasts. *J Clin Periodontol*. 1991;18(3):190-5.

99. Li L, Zhang J, Zhang Q, Zhang D, Xiang F, Jia J, et al. High Glucose Suppresses Keratinocyte Migration Through the Inhibition of p38 MAPK/Autophagy Pathway. *Frontiers in Physiology*. 2019;10(24).

100. Ho FM, Liu SH, Liau CS, Huang PJ, Lin-Shiau SY. High glucose-induced apoptosis in human endothelial cells is mediated by sequential activations of c-Jun NH(2)-terminal kinase and caspase-3. *Circulation*. 2000;101(22):2618-24.
101. 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.
102. Polak D, Shapira L. An update on the evidence for pathogenic mechanisms that may link periodontitis and diabetes. *J Clin Periodontol*. 2018;45(2):150-66.
103. Sun WL, Chen LL, Zhang SZ, Wu YM, Ren YZ, Qin GM. Inflammatory cytokines, adiponectin, insulin resistance and metabolic control after periodontal intervention in patients with type 2 diabetes and chronic periodontitis. *Intern Med*. 2011;50(15):1569-74.
104. Kanety H, Feinstein R, Papa MZ, Hemi R, Karasik A. Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). Possible mechanism for suppression of insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1. *J Biol Chem*. 1995;270(40):23780-4.
105. Gurav AN. Periodontitis and insulin resistance: casual or causal relationship? *Diabetes Metab J*. 2012;36(6):404-11.
106. Kassebaum NJ, Bernabe E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W. Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: a systematic review and meta-regression. *J Dent Res*. 2014;93(11):1045-53.
107. Eke PI, Dye BA, Wei L, Slade GD, Thornton-Evans GO, Borgnakke WS, et al. Update on Prevalence of Periodontitis in Adults in the United States: NHANES 2009 to 2012. *J Periodontol*. 2015;86(5):611-22.
108. จิราพร ขีดดี, สุรัตน์ มงคลชัยอรัญญา, นพวรรณ โพชนุกูล, พงศธร จินตกานนท์, พัชรวรรณ สุขุมาลินทร์. รายงานผลการสำรวจสถานะสุขภาพช่องปากแห่งชาติ ครั้งที่ 8 ประเทศไทย พ.ศ. 2560. นนทบุรี: สำนักทันตสาธารณสุข กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข; 2560.
109. Graves D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *Journal of periodontology*. 2008;79:1585-91.
110. Hajishengallis G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones,

pathobionts, and host response. *Trends in Immunology*. 2014;35(1):3-11.

111. He W, You M, Wan W, Xu F, Li F, Li A. Point-of-Care Periodontitis Testing: Biomarkers, Current Technologies, and Perspectives. *Trends Biotechnol*. 2018;36(11):1127-44.

112. Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nature Reviews Immunology*. 2015;15(1):30-44.

113. Steffen MJ, Holt SC, Ebersole JL. Porphyromonas gingivalis induction of mediator and cytokine secretion by human gingival fibroblasts. *Oral Microbiology and Immunology*. 2000;15(3):172-80.

114. Ohe H, Takashiba S, Naruishi K, Chou H-H, Yamada H, Nishimura F, et al. Tumor necrosis factor- α (TNF- α)-induced and interleukin-1 β (IL-1 β)-induced shedding of TNF receptors from gingival fibroblasts. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 2000;20(12):1077-82.

115. Takashiba S, Naruishi K, Murayama Y. Perspective of cytokine regulation for periodontal treatment: fibroblast biology. *J Periodontol*. 2003;74(1):103-10.

116. Matthews N, Watkins JF. Tumour-necrosis factor from the rabbit. I. Mode of action, specificity and physicochemical properties. *Br J Cancer*. 1978;38(2):302-9.

117. Wang H, Czura CJ, Tracey KJ. CHAPTER 35 - Tumor necrosis factor. In: Thomson AW, Lotze MT, editors. *The Cytokine Handbook* (Fourth Edition). London: Academic Press; 2003. p. 837-60.

118. Hajeer AH, Hutchinson IV. TNF- α gene polymorphism: Clinical and biological implications. *Microscopy Research and Technique*. 2000;50(3):216-28.

119. Bahia MS, Silakari O. Tumor Necrosis Factor Alpha Converting Enzyme: An Encouraging Target for Various Inflammatory Disorders. *Chemical Biology & Drug Design*. 2010;75(5):415-43.

120. Eck MJ, Sprang SR. The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 A resolution. Implications for receptor binding. *Journal of Biological Chemistry*. 1989;264(29):17595-605.

121. Cabal-Hierro L, Lazo PS. Signal transduction by tumor necrosis factor receptors.

Cellular Signalling. 2012;24(6):1297-305.

122. Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF Receptor I-Mediated Apoptosis via Two Sequential Signaling Complexes. *Cell*. 2003;114(2):181-90.

123. Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009;1(4):a000034.

124. Nakao S, Ogtata Y, Shimizu E, Yamazaki M, Furuyama S, Sugiyama H. Tumor necrosis factor α (TNF- α)-induced prostaglandin E2 release is mediated by the activation of cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription via NF κ B in human gingival fibroblasts. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2002;238(1):11-8.

125. Gilbert L, He X, Farmer P, Rubin J, Drissi H, Van Wijnen AJ, et al. Expression of the osteoblast differentiation factor RUNX2 (Cbfa1/AML3/Pebp2 α A) is inhibited by tumor necrosis factor- α . *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(4):2695-701.

126. Gilbert L, He X, Farmer P, Boden S, Kozlowski M, Rubin J, et al. Inhibition of osteoblast differentiation by tumor necrosis factor- α . *Endocrinology*. 2000;141(11):3956-64.

127. Priestle JP, Schär HP, Grütter MG. Crystal structure of the cytokine interleukin-1 beta. *The EMBO Journal*. 1988;7(2):339-43.

128. Cheng R, Wu Z, Li M, Shao M, Hu T. Interleukin-1 β is a potential therapeutic target for periodontitis: a narrative review. *International Journal of Oral Science*. 2020;12(1):2.

129. Wang PL, Azuma Y, Shinohara M, Ohura K. Toll-like receptor 4-mediated signal pathway induced by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in human gingival fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;273(3):1161-7.

130. Wilson KP, Black JA, Thomson JA, Kim EE, Griffith JP, Navia MA, et al. Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature*. 1994;370(6487):270-5.

131. Schonbeck U, Mach F, Libby P. Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing. *J Immunol*. 1998;161(7):3340-6.

132. Laurincová B. Interleukin-1 family: from genes to human disease. *ACTA-UNIVERSITATIS PALACKIANAE OLOMUCENSIS FACULTATIS MEDICAE*. 2000:19-30.

133. He Y, Hara H, Nunez G. Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. *Trends Biochem Sci.* 2016;41(12):1012-21.
134. Belibasakis GN, Guggenheim B, Bostanci N. Down-regulation of NLRP3 inflammasome in gingival fibroblasts by subgingival biofilms: involvement of *Porphyromonas gingivalis*. *Innate Immun.* 2013;19(1):3-9.
135. Cheng R, Liu W, Zhang R, Feng Y, Bhowmick NA, Hu T. *Porphyromonas gingivalis*-Derived Lipopolysaccharide Combines Hypoxia to Induce Caspase-1 Activation in Periodontitis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:474-.
136. Sakata M, Shiba H, Komatsuzawa H, Fujita T, Uchida Y, Yoshino H, et al. Osteoprotegerin levels increased by interleukin-1beta in human periodontal ligament cells are suppressed through prostaglandin E(2) synthesized de novo. *Cytokine.* 2002;18(3):133-9.
137. Hienz SA, Paliwal S, Ivanovski S. Mechanisms of Bone Resorption in Periodontitis. *J Immunol Res.* 2015;2015:615486-.
138. Belibasakis GN, Bostanci N. The RANKL-OPG system in clinical periodontology. *J Clin Periodontol.* 2012;39(3):239-48.
139. คุษฎฐี หอมดี. บทนำสู่การเพาะเลี้ยงเซลล์ในช่องปาก : เซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกมนุษย์ พิมพ์ครั้งที่ 1 ed. 1, editor. ขอนแก่น: ภาควิชาปริทันตวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2561.
140. Subramani T, Dhanaraj L, Senthilkumar K, Periasamy S, Abraham G, Rao S. Expression of TNF- α and RANTES in drug-induced human gingival overgrowth. *Indian journal of pharmacology.* 2010;42(3):174-7.
141. Costa C, Amorim B, Silva S, Acevedo A, Magalhães P, Guerra E. In vitro evaluation of *Eugenia dysenterica* in primary culture of the human gingival fibroblasts cells. *Brazilian Oral Research.* 2019;33:1-11.
142. Roche. LightCycler® 480 SYBR Green I Master 2005 [cited May 20,2020]. Available from: <https://biochimie.umontreal.ca/wp-content/uploads/sites/37/2015/11/LC480SYBRMasterguide.pdf>.
143. Cree IA. *Cancer cell culture: methods and protocols*: Springer; 2011.

144. Brinson CW, Lu Z, Li Y, Lopes-Virella MF, Huang Y. Lipopolysaccharide and IL-1 β coordinate a synergy on cytokine production by upregulating MyD88 expression in human gingival fibroblasts. *Molecular immunology*. 2016;79:47-54.
145. Salleh LM, Yunus AC, Abd Azis A, Pagarra H, editors. The effect of the swietenia mahagoni seed extracts on the production of collagen in human fibroblast cell (HSF1184). *Journal of Physics: Conference Series*; 2019: IOP Publishing.
146. 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.
147. 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. *Journal of periodontology*. 2017;88(11):e179-e87.
148. Bender O, Weinberg E, Moses O, Nemcovsky CE, Weinreb M. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide and glycated serum albumin increase the production of several pro-inflammatory molecules in human gingival fibroblasts via NF κ B. *Archives of oral biology*. 2020;116:104766.
149. Chiu HC, Fu MMJ, 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. *Journal of periodontal research*. 2017;52(2):268-76.
150. 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.
151. 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.
152. Jiang M, Wang X, Wang P, Peng W, Zhang B, Guo L. Inhibitor of RAGE and

glucose-induced inflammation in bone marrow mesenchymal stem cells: Effect and mechanism of action. *Molecular Medicine Reports*. 2020;22(4):3255-62.

153. Dasu MR, Devaraj S, Jialal I. High glucose induces IL-1 β expression in human monocytes: mechanistic insights. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2007;293(1):E337-E46.

154. García-Hernández A, Arzate H, Gil-Chavarria I, Rojo R, Moreno-Fierros L. High glucose concentrations alter the biomineralization process in human osteoblastic cells. *Bone*. 2012;50(1):276-88.

155. 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.

156. Xie Y, Sun M, Xia Y, Shu R. An RNA-seq screen of *P. gingivalis* LPS treated human gingival fibroblasts. *Archives of oral biology*. 2018;88:77-84.

157. Xiong G, Ji W, Wang F, Zhang F, Xue P, Cheng M, et al. Quercetin inhibits inflammatory response induced by LPS from *Porphyromonas gingivalis* in human gingival fibroblasts via suppressing NF- κ B signaling pathway. *BioMed research international*. 2019;2019.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	รพีพรรณ นะภาใจ
วัน เดือน ปี เกิด	11 ตุลาคม 2532
สถานที่เกิด	น่าน
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2557 ทันตแพทยศาสตรบัณฑิต จาก มหาวิทยาลัยนเรศวร
ที่อยู่ปัจจุบัน	โรงพยาบาลสมเด็จพระยุพราชปัว 70 ม.6 ต.วรนคร อ.ปัว จ.น่าน 55120

