ฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดใบจักรนารายณ์ต่อเซลล์แมคโครฟาจ ที่กระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อก่อโรคปริทันต์

ANTI-INFLAMMATORY EFFECT OF GYNURA PROCUMBENS LEAF EXTRACTS ON A.A. LPS-STIMULATED MACROPHAGE CELLS

ธนัชญา วีรวุฒิไกร

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2565

ฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดใบจักรนารายณ์ต่อเซลล์แมคโครฟาจ ที่กระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อก่อโรคปริทันต์

ธนัชญา วีรวุฒิไกร

ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาทันตกรรมคลินิก
คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2565
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ANTI-INFLAMMATORY EFFECT OF GYNURA PROCUMBENS LEAF EXTRACTS ON A.A. LPS-STIMULATED MACROPHAGE CELLS

THANATCHAYA WEERAWUTHIKRAI

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of MASTER OF SCIENCE

(Clinical Dentistry)

Faculty of Dentistry, Srinakharinwirot University

2022

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

ฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดใบจักรนารายณ์ต่อเซลล์แมคโครฟาจ

ที่กระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อก่อโรคปริทันต์

ของ

ธนัชญา วีรวุฒิไกร

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาทันตกรรมคลินิก

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก

(อาจารย์ ดร.พริมา บูรณสิน)

..... ประธาน

(รองศาสตราจารย์ ดร.ณรงค์ศักดิ์ เหล่าศรีสิน)

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร.รุ่งทิวา ศรีสุวรรณฑา)

ชื่อเรื่อง	ฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดใบจักรนารายณ์ต่อเซลล์แมคโครฟาจที่กระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อก่อโรคปริทันต์
ผู้วิจัย	ธนัชญา วีรวุฒิไกร
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2565
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร. พริมา บูรณสิน

จักรนารายณ์เป็นพืชสมุนไพรขนาดเล็กที่พบได้มากในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จีน และแอฟริกา มีการศึกษาทางวิทยาศาสตร์หลายงานรายงานว่าสารสกัดจากจักรนารายณ์มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ลดความดันโลหิต ต้านมะเร็ง ลดระดับน้ำตาลในกระแสเลือด รวมทั้ง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ในขณะที่โรคปริทันต์อักเสบ เป็นโรคการอักเสบเรื้อรังที่เกิดจากการก่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์และมีความเกี่ยวข้องกับโรคทางระบบร่างกายหลายชนิด การศึกษาครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจักรนารายณ์ต่อการแสดงออกของทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา (TNF-α) และอินเตอร์ลิวคิน-1 เบตา (IL-1β) ในระดับ mRNA ในเซลล์แมคโครฟาจหนูที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ (LPS) ของเชื้อแอกกริเกทิแบกเทอร์ แอกทิโนไมซีเทมคอมิแทนส์ (*A.a.*) ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคปริทันต์ การสกัดใบจักรนารายณ์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เตรียมด้วยวิธีการสกัดโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลายก่อนนำมาทดลองกับเซลล์แมคโครฟาจหนูที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และสารสกัดใบจักรนารายณ์ที่ความเข้มข้น 25 50 100 250 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ไปวิเคราะห์การแสดงออกของ TNF-α และ IL-1β ในระดับ mRNA ด้วยวิธี quantitative RT-PCR และศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจักรนารายณ์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อเซลล์ ด้วยวิธี Cell Counting Kit-8 (WST-8) ผลการศึกษา พบว่า สารสกัดใบจักรนารายณ์ที่ความเข้มข้นระหว่าง 10 - 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่เป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจหนู เมื่อพิจารณาผลของสารสกัดใบจักรนารายณ์ต่อการแสดงออกของระดับ TNF-α และ IL-1β พบว่า แม้สารสกัดจักรใบนารายณ์เพียงอย่างเดียวไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนของระดับ TNF-α และ IL-1β เมื่อเทียบกลุ่มควบคุม แต่สารสกัดใบจักรนารายณ์ที่ความเข้มข้น 100 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการแสดงออกของ TNF-α และ IL-1β ในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ของเชื้อ *A.a.* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สรุปได้ว่า สารสกัดใบจักรนารายณ์ที่ความเข้มข้น 100 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ต้านการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นโดย LPS ของเชื้อ *A.a.* และไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์

คำสำคัญ : โรคปริทันต์อักเสบ, จักรนารายณ์, ทูเมอร์เนกโครซิสแฟกเตอร์แอลฟา, อินเตอร์ลิวคิน-1 เบตา

Title	ANTI-INFLAMMATORY EFFECT OF GYNURA PROCUMBENS LEAF EXTRACTS ON A.A. LPS-STIMULATED MACROPHAGE CELLS
Author	THANATCHAYA WEERAWUTHIKRAI
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2022
Thesis Advisor	Dr. Prima Buranasin

Gynura procumbens (GP) is a small plant found in Southeast Asia, China, and Africa. Several studies have reported that *Gynura procumbens* extract solution (GPE) has anti-inflammatory, antihypertensive, anticancer, antihyperglycemic, and anti-oxidative properties. Periodontitis is a bacterial-induced host-responsive inflammatory disease related to several systemic diseases. This study aimed to investigate the effect of GPE on tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) and interleukin-1 beta (IL-1β) mRNA expression induced by lipopolysaccharide (LPS) of a periodontal pathogen in macrophages. The GPE was prepared for investigating its effect on macrophage cells by the aqueous extraction technique. Mice macrophages RAW 264.7 cells were stimulated by the combination of LPS of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A.a.*) and GPE (25, 50, 100, 250, 500 and 1,000 μg/mL) for three hours. The cells were collected and analyzed mRNA expression of TNF-α and IL-1β by quantitative RT-PCR. The toxicity of GPE to cells was examined by Cell Counting Kit-8 (WST-8) assay. The WST-8 result showed that GPE concentrations between 10 - 250 μg/mL were biocompatible with RAW 264.7 cells. Although GPE alone does not affect a remarkable change in TNF-α and IL-1β levels, we found that GPE (100 and 250 μg/ mL) significantly suppressed TNF-α and IL-1β mRNA expression induced by *A.a.* LPS. In summary, the GPE 100 and 250 μg/mL presented anti-inflammatory effects on significantly reduced TNF-α and IL-1β mRNA levels activated by LPS of *A.a.* with no toxicity to mice macrophage cells.

Keyword : Periodontitis, Gynura procumbens, Tumor necrosis factor-alpha, Interleukin-1 beta

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จด้วยดี ด้วยความเมตตาและกรุณาจาก อ.ดร.ทพญ.พริมา บูรณสิน อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ที่ได้ให้การดูแลและคำแนะนำตลอดการทำปริญญานิพนธ์นี้อย่างใกล้ชิด ตลอดจนการให้กำลังใจ ข้อคิด ข้อเสนอแนะในการปรับปรุงให้ปริญญานิพนธ์นี้เป็นที่เรียบร้อย ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.ทพ.ณรงค์ศักดิ์ เหล่าศรีสิน อ.พทญ.จามรี เสมา ผศ.ดร.ทพญ.ชื่นชีวิต ทองศิริ และ อ.ดร.ทพญ.รุ่งทิวา ศรีสุวรรณฑา สำหรับความรู้และคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ รวมทั้งกำลังใจที่มีให้ผู้วิจัยตลอดการศึกษาปริญญาโทนี้ และขอบพระคุณโรงพยาบาลคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สำหรับทุนอุดหนุนในการทำปริญญานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ อ.ทพ.กุญชร เกิดมณี และคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต สำหรับความเอื้อเฟื้อในการสกัดสารสกัดใบจักรนารายณ์เพื่อนำมาใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ รวมทั้งคำแนะนำและความช่วยเหลือตลอดการทำงาน

ขอขอบพระคุณ อ.ดร.ทพญ.วิชิดา ฉวีวรรณากร อาจารย์ประจำภาควิชาทันตกรรมสำหรับเด็กและทันตกรรมป้องกัน และ คุณศิริพงศ์ ตั้งประเสริฐกิจ (นักวิทยาศาสตร์) สำหรับความเอื้อเฟื้อด้านอุปกรณ์ รวมทั้งการให้คำแนะนำอย่างอารี

ขอขอบพระคุณ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สำหรับการเอื้อเฟื้ออุปกรณ์ในการทำวิจัย ทำให้ได้ผลการศึกษาสำเร็จลุล่วง

ขอขอบพระคุณ สุทธิธร ญาณรังสี ระพีพรรณ นะภิใจ และ กมนพร บุณยฤทธิ์ รุ่นพี่สาขาปริทันตวิทยา สำหรับวัสดุอุปกรณ์ รวมทั้ง คำแนะนำและกำลังใจอย่างสม่ำเสมอตลอดการทำปริญญานิพนธ์นี้ ขอขอบคุณ กนกวรรณ นิพขันธุ์ เพื่อนร่วมสาขา และ ชนันพร เตียวเจริญโสภา เพื่อนที่คอยให้กำลังใจและคำปรึกษาตลอดการทำงาน

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่เคยประสาทวิชาความรู้ ผู้มีพระคุณทุกท่าน โดยเฉพาะครอบครัว ที่มอบความรัก ความห่วงใย ให้ข้าพเจ้ามาโดยตลอดจวบจนกระทั่งมีวันนี้ ขออาราธนาคุณพระศรีรัตนตรัยเพื่ออวยพรแก่ทุกท่านไม่ว่าจะมีหรือไม่มีชื่อ ณ ที่นี้ก็ตาม

ธนัชญา วีรวุฒิไกร

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ญ

สารบัญรูปภาพ ..... ฎ

บทที่ 1 บทนำ 1

ภูมิหลัง 1

ความมุ่งหมายงานวิจัย 3

ความสำคัญของการวิจัย 4

ขอบเขตของการวิจัย 4

ประชากรที่ใช้ในการวิจัย 4

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย 4

ตัวแปรที่ศึกษา 4

นิยามศัพท์เฉพาะ 5

กรอบแนวคิดงานวิจัย 6

สมมติฐานในการวิจัย 6

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 8

จักรนารายณ์ (*Gynura procumbens* Merr) 8

โรคปริทันต์อักเสบ (Periodontitis) 13

บทบาทของทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา (Tumor necrosis factor alpha: TNF-α) ต่อโรคปริทันต์อักเสบ 19
บทบาทของอินเตอร์ลิวคิน-1 เบตา (Interleukin-1 beta: IL-1β) ต่อโรคปริทันต์อักเสบ 21
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 22
การกำหนดประชากรและการสุ่มกลุ่มตัวอย่าง 22
ประชากร 22
การเลือกกลุ่มตัวอย่าง 22
การสร้างเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย 23
การเตรียมสารสกัดใบจักรนารายณ์ 23
การเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 25
การเก็บรักษาเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 โดยการแช่แข็งเซลล์ 25
การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดใบจักรนารายณ์ต่อเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 26
การศึกษาฤทธิ์การต้านอักเสบของสารสกัดใบจักรนารายณ์ต่อเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ของ *A. actinomycetemcomitans* 27
การศึกษาผลของสารสกัดใบจักรนารายณ์ต่อการแสดงออกของยีน TNF-α และ IL-1β 27
ขั้นตอนการสกัดอาร์เอ็นเอ (Total RNA) จากเซลล์ 27
ขั้นตอนการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอต้นแบบ (Complementary DNA: cDNA) 28
ขั้นตอนการทำ Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) 29
การเก็บรวบรวมข้อมูล 30
Cell Counting Kit-8 assay 30
Reverse Transcription Quantitative PCR 30
การจัดกระทำข้อมูลและการวิเคราะห์ข้อมูล 30

บทที่ 4 ผลการดำเนินงานวิจัย 31
ผลของการตรวจสอบความเป็นพิษของสารสกัดใบจักนารายณ์ต่อเซลล์แมคโครฟาจหนู 31
ผลของสารสกัดใบจักรนารายณ์ต่อการแสดงออกของ TNF-α และ IL-1β เซลล์ แมคโครฟาจ 32
ผลในการต้านการอักเสบของสารสกัดใบจักรนารายณ์..... 33
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ 36
สรุปผลการวิจัย..... 36
อภิปรายผลการวิจัย 37
ข้อเสนอแนะ 40
บรรณานุกรม 42
ประวัติผู้เขียน..... 50

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 ไพรเมอร์สำหรับตรวจการแสดงออกของ TNF-α, IL-1β, และ GAPDH 29

ตาราง 2 ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์แมคโครฟาจเมื่อได้รับสารสกัดใบจักรนารายณ์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 32

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพประกอบ 1 ลักษณะของต้นจักรนารายณ์ (ลำต้น ใบ และดอก) [29] 9

ภาพประกอบ 2 ฟลาโวนอยด์ที่พบในสารสกัดจักรนารายณ์[30] 10

ภาพประกอบ 3 สารประกอบฟีนอลที่พบในสารสกัดจักรนารายณ์ 11

ภาพประกอบ 4 แผนภาพการเกิดโรคปริทันต์[42] 15

ภาพประกอบ 5 การก่อตัวของเชื้อ *A.a.* ในบริเวณร่องเหงือก[25] 16

ภาพประกอบ 6 การตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะและแบบจำเพาะในระหว่างการเกิดโรคปริทันต์[23] 18

ภาพประกอบ 7 ใบจักรนารายณ์ที่ได้รับการอบแห้ง (ซ้าย) และบดเป็นผง (ขวา) 23

ภาพประกอบ 8 การสกัดใบจักรนารายณ์ด้วยวิธีแช่หมักโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย (ซ้าย) และสารสกัดใบจักรนารายณ์ (ขวา) 24

ภาพประกอบ 9 การเก็บรักษาสารสกัดใบจักรนารายณ์ 25

ภาพประกอบ 10 แสดงร้อยละความมีชีวิตของเซลล์แมคโครฟาจหนู (RAW 264.7) เมื่อได้รับ สารสกัดใบจักรนารายณ์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เปรียบเทียบข้อมูลด้วยสถิติ independent *t*-test; **P*<0.01 32

ภาพประกอบ 11 แสดงผลของสารสกัดใบจักรนารายณ์ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการแสดงออกของเซลล์แมคโครฟาจเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ LPS โดยใช้สถิติ one-way ANOVA (** *P*<0.01) (a) การแสดงออกของ TNF-α mRNA (b) การแสดงออกของ IL-1β mRNA 33

ภาพประกอบ 12 แสดงผลของสารสกัดใบจักรนารายณ์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการแสดงออกของ TNF-α ในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS เพียงอย่างเดียวด้วยสถิติ one-way ANOVA และ multiple comparison; ** *P*<0.01 34

ภาพประกอบ 13 แสดงผลของสารสกัดใบจักรนารายณ์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการแสดงออกของ IL-1β ในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS เพียงอย่างเดียวด้วยสถิติ one-way ANOVA และ multiple comparison; ** *P*<0.01 35

บทที่ 1
บทนำ

ภูมิหลัง

จักรนารายณ์เป็นสมุนไพรพื้นบ้านที่พบได้มากในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ไทย มาเลเซีย และอินโดนีเซีย เป็นต้น ถูกใช้ในการประกอบอาหารและเป็นยาพื้นบ้านสำหรับอาการเจ็บป่วยหลายประเภทมาเป็นเวลายาวนาน เช่น ลดความดันโลหิต[1, 2] ลดน้ำตาลในเลือด[3] ลดคอเรสเตอรอล[4] บรรเทาอาการอักเสบ[5-10] ป้องกันมะเร็ง[11] ต้านเชื้อไวรัส[12, 13] เป็นต้น ประโยชน์ที่หลากหลายดังที่กล่าวมาจึงส่งผลให้จักรนารายณ์เป็นพืชที่ได้รับความสนใจในการศึกษาทางวิทยาศาสตร์เพื่อหาสารออกฤทธิ์สำคัญ[6-8, 10, 14, 15] ที่ทำให้จักรนารายณ์มีคุณสมบัติดังกล่าว และพบว่าสมุนไพรจักรนารายณ์มีองค์ประกอบที่เป็นสารสำคัญ 2 ชนิด ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติในการต่อต้านอนุมูลอิสระ ป้องกันโรคที่เกิดจากการทำลายออกซิเดชัน (Oxidation damage) รวมทั้งยังมีความสามารถในการยับยั้งการอักเสบ (Anti-inflammation)[16, 17] และสารประกอบฟีนอล (Phenolic compounds) ซึ่งมีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับฟลาโวนอยด์ ได้แก่ ฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระ ต้านมะเร็ง และ ต้านการอักเสบ[18] การศึกษาจำนวนหนึ่งพบว่า สารสกัดใบจักรนารายณ์สามารถต่อต้านการอักเสบ โดยสามารถลดระดับทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา (Tumor necrosis factor alpha: TNF-α) ในเซลล์แมคโครฟาจ[7, 9] เซลล์ตับและชีรัมของหนูทดลอง[5] ลดระดับอินเตอร์ลิวคิน-1 เบตา (Interleukin-1 beta: IL-1β)[9] และเพิ่มปริมารการหลั่งสารต้านการอักเสบ (Anti-inflammation cytokines)[5] อีกทั้งยังสามารถออกฤทธิ์ต้านการอักเสบได้เทียบเท่าสารไฮโดรคอร์ติโซน (Hydrocortisone) ขนาด 6 มิลลิกรัม[19] ถึงแม้ว่าปัจจุบัน การใช้ประโยชน์จากสมุนไพรจักรนารายณ์ยังไม่เป็นที่รู้จักโดยทั่วไปในประเทศไทย แต่ด้วยคุณสมบัติที่เปี่ยมด้วยประโยชน์อันหลากหลาย ตลอดจนข้อดีที่สามารถปลูกเพาะพันธุ์ได้ง่ายในไทย[15] และมีข้อมูลว่า ในประเทศจีนได้มีการพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่แปรรูปจากใบจักรนารายณ์และจดสิทธิบัตรแล้วหลายชนิด ไม่ว่าจะเป็นสเปรย์ฆ่าเชื้อในช่องปาก[20] เจลล้างมือ[21] และครีมบำรุงผิว[22] เป็นต้น

โรคปริทันต์อักเสบ (Periodontitis) เป็นโรคที่มีลักษณะของการอักเสบที่เรื้อรัง (Chronic inflammation) ของอวัยวะปริทันต์ ก่อให้เกิดความเสียหายต่อเหงือก เคลือบรากฟัน (Cementum) เอ็นยึดปริทันต์ (Periodontal ligament) และกระดูกเบ้าฟัน (Alveolar bone) ซึ่งเป็นผลจากภูมิคุ้มกันร่างกายที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์ (Periodontal pathogen) ที่สะสมอยู่ในคราบจุลินทรีย์ที่มากเกิน โดยเฉพาะเมื่อมีการก่อตัวของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์

ชนิดหลัก ได้แก่ พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส (*Porphyromonas gingivalis*: *P.g.*) ทรีโพนีมา เดนทิโคลา (*Treponema denticola*: *T.d.*) แทนเนอเรลลา ฟอร์ไซเธีย (*Tannerella forsythia*: *T.f.*) พรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย (*Prevotella intermedia*: *P.i.*) และ แอกกริเกทิแบกเทอร์ แอกทิโนไมซีเทมคอมิแทนส์ (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: *A.a.*) เชื้อแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์ส่วนมากเป็นเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งมีองค์ประกอบที่เป็นพิษต่อภูมิคุ้มกันร่างกาย ได้แก่ ไลโปโพลีแซคคาไรด์ (Lipopolysaccharide: LPS) ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายถูกกระตุ้นผ่านตัวรับสัญญาณโทลล์ไลค์รีเซปเตอร์ 4 (Toll-like receptor 4: TLR4) ทำให้มีการตอบสนองเบื้องต้นโดยการเรียกรวมตัวของเซลล์โพลีมอร์โฟนิวเคลียร์ นิวโทรฟิล (Polymorphomuclear neutrophils: PMNs) และเซลล์แมคโครฟาจ (Macrophage) เพื่อมากำจัดเชื้อโรคโดยการจับกิน (Phagocytes) ในกระบวนการนี้จะมีการเหนี่ยวนำให้เกิดการหลั่งสารสื่อการอักเสบหรือไซโตไคน์ (Cytokines) ชนิดต่าง ๆ เช่น TNF-α และ IL-1β นอกจากนี้ เชื้อแบคทีเรียก่อโรคยังสามารถเข้าไปกระตุ้นให้เซลล์สร้างเส้นใยเหงือก (Gingival fibroblasts) และเซลล์สร้างกระดูก (Osteoblasts) หลั่ง TNF-α และ IL-1β เพิ่มขึ้น เป็นการส่งเสริมการอักเสบให้รุนแรงเพิ่มขึ้นได้อีกด้วย[23]

ปริมาณของ TNF-α และ IL-1β ที่ถูกหลั่งเพิ่มขึ้น จะส่งผลให้หลอดเลือดขยายตัว กระตุ้นเซลล์เนื้อเยื่อบุโพรง (Endothelial cells) ให้ทำการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน เพิ่มการสร้างคีโมไคน์ (Chemokines) จากเซลล์ชนิดต่าง ๆ มีส่วนเกี่ยวข้องในการกระตุ้นนิวโทรฟิล (Neutrophils) และยังกระตุ้นการหลั่งและการทำงานของเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส (Matrix metalloproteinase: MMP) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายคอลลาเจนได้ด้วย ทั้ง TNF-α และ IL-1β จึงมีความเกี่ยวข้องกับการละลายของกระดูกทางอ้อม โดยไซโตไคน์ทั้ง 2 ชนิดนี้จะกระตุ้นให้เนื้อเยื่อปริทันต์มีการอักเสบต่อเนื่อง บีเซลล์ (B-cells) เกิดการหลั่งอิมมูโนโกลบูลิน อี (Immunoglobulin E: IgE) ออกฤทธิ์เสริมในการกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจ และเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของรีเซ็บเตอร์ แอคทิเวเตอร์ ออฟ นิวเคลียร์แฟกเตอร์ แคปปาบี (Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B: RANK) จากต้นกำเนิดของเซลล์สลายกระดูก (Osteoclast progenitor cells) และรีเซ็บเตอร์ แอคทิเวเตอร์ ออฟ นิวเคลียร์แฟกเตอร์ แคปปาบี ไลแกนด์ (Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand: RANKL) จาก Osteoblasts นำไปสู่กระบวนการสร้างเซลล์สลายกระดูก (Osteoclastogenesis) นอกจากนี้ ยังพบว่า TNF-α สามารถขัดขวางการพัฒนาของ osteoblast ในระยะต่าง ๆ และเหนี่ยวนำให้เซลล์สร้างกระดูกเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส (Apoptosis) ได้อีกด้วย

วิธีการรักษาโรคปริทันต์อักเสบในขั้นแรก ทำได้โดยการขูดหินน้ำลายและการเกลารากฟันเพื่อกำจัดคราบจุลินทรีย์และหินปูนสะสมในช่องปาก ร่วมกับการส่งเสริมการควบคุมคราบจุลินทรีย์และการรักษาสุขภาพช่องปากของผู้ป่วย[24] เพื่อควบคุมการดำเนินของโรคและการอักเสบให้ได้ แต่การรักษาในขั้นนี้ไม่สามารถกำจัดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ทั้งหมด โดยเฉพาะเชื้อ *A. actinomycetemcomitans* ที่สามารถแทรกตัวซ่อนในเนื้อเยื่อเหงือกเพื่อหลบหลีกการกำจัดเชื้อ มีรายงานว่าการขูดหินน้ำลายและเกลารากฟันไม่สามารถกำจัดเชื้อนี้ได้ หรือกำจัดได้น้อย[25] ทั้งนี้มีสาเหตุจากข้อจำกัดหลายอย่าง เช่น ในด้านเครื่องมือเกลารากฟันที่ไม่สามารถเข้าไปทำความสะอาดในบริเวณร่องลึกปริทันต์ที่ลึกมากกว่า 6 มิลลิเมตรได้ จึงต้องมีการพิจารณาเสริมการรักษาขั้นต้นด้วยวิธีอื่น ๆ เช่น การทำศัลยกรรมปริทันต์ (Periodontal surgery) หรือการให้ยาปฏิชีวนะเพื่อเสริมผลการรักษาขั้นต้นจากการขูดหินน้ำลายและเกลารากฟัน (Adjunctive antibiotics therapy) เป็นต้น ยาปฏิชีวนะที่ใช้สำหรับเสริมในการรักษาโรคปริทันต์ ได้แก่ ยาด็อกซีไซคลิน (Doxycycline) ในขนาดต่ำ ซึ่งเป็นยาที่องค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกาให้การรับรอง อย่างไรก็ตาม ยาชนิดนี้อาจทำให้ผู้รับประทานมีอาการแพ้ยา คลื่นไส้ ท้องร่วง หรือหากมีการใช้ยาชนิดนี้ในหญิงตั้งครรภ์อาจทำให้ทารกเกิดอีนาเมล ไฮโปเพลเซีย (Enamel hypoplasia)[26] นอกจากนี้ ยาปฏิชีวนะเป็นยาที่ควรระมัดระวังในการใช้ เนื่องจากความกังวลในเรื่องการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย ทำให้มีความสนใจศึกษาการใช้สมุนไพรซึ่งมีฤทธิ์ช่วยในการยับยั้งการอักเสบและฆ่าเชื้อแบคทีเรียมาทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะเพิ่มขึ้น

ข้อมูลจากหลายการศึกษาที่แล้วมา แสดงให้เห็นฤทธิ์ของสารสกัดใบจักรนารายณ์ต่อการอักเสบ โดยสามารถลดระดับ TNF-α IL-1β และเพิ่มปริมาณสารต้านการอักเสบได้ จึงมีความเป็นได้ว่าสารสกัดใบจักรนารายณ์อาจช่วยในการลดการอักเสบของโรคปริทันต์ได้ อย่างไรก็ตาม ยังไม่ปรากฏผลการศึกษาของสารสกัดใบจักรนารายณ์ต่อการแสดงออกของ TNF-α และ IL-1β ในเซลล์แมคโครฟาจหนูที่จำลองให้เกิดสภาวะโรคปริทันต์อักเสบโดยการกระตุ้นด้วย LPS ของเชื้อ *A. actinomycetemcomitans* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคปริทันต์ที่สำคัญชนิดหนึ่ง การศึกษานี้จึงจัดทำขึ้นเพื่อศึกษาการตอบสนองของเซลล์แมคโครฟาจที่มีต่อสภาวะปริทันต์อักเสบเพื่อเป็นทางเลือกเพิ่มเติมแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ หรือช่วยในการควบคุมการอักเสบซึ่งเป็นเป้าหมายสำคัญในการรักษาโรคปริทันต์

ความมุ่งหมายงานวิจัย

1. เพื่อตรวจหาความเป็นพิษของสารสกัดใบจักรนารายณ์ต่อเซลล์แมคโครฟาจ และความเข้มข้นที่เหมาะสมในการลดระดับการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจ

2. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดใบจักรนารายณ์ต่อการแสดงออกของ TNF-α ในเซลล์แมคโครฟาจหนูที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบโดย LPS ของเชื้อก่อโรคปริทันต์

3. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดใบจักรนารายณ์ต่อการแสดงออกของ IL-1β ในเซลล์แมคโครฟาจหนูที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบโดย LPS ของเชื้อก่อโรคปริทันต์

ความสำคัญของการวิจัย

ผลการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอักเสบของสารสกัดใบจักรนารายณ์ที่ได้จากการวิเคราะห์การแสดงออกของ TNF-α และ IL-1β ในระดับ mRNA ของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 จากการศึกษานี้จะสามารถนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ หรือแนวทางการรักษาเพิ่มเติม โดยใช้เสริมจากการรักษาโรคปริทันต์ขั้นต้นด้วยการขูดหินปูนและเกลารากฟัน เพื่อช่วยควบคุมการอักเสบและมีการหายที่ดีขึ้น

ขอบเขตของการวิจัย

ประชากรที่ใช้ในการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากใบจักรนารายณ์ต่อการยับยั้งการอักเสบที่เกี่ยวข้องกับโรคปริทันต์ จึงมีการเลือกกลุ่มประชากรในการศึกษาเป็นเซลล์แมคโครฟาจ ซึ่งเป็นเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันที่ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการเกิดโรคปริทันต์ โดยเซลล์ไลน์แมคโครฟาจ ชนิด RAW 264.7 ได้รับมาจาก American Type Culture Collection (ATCC) เป็นเซลล์แมคโครฟาจจากน้ำในช่องท้องของหนู *(Mus musculus)* มักถูกนำมาใช้ในการศึกษาเพื่อดูการตอบสนองในระดับเซลล์ต่อการติดเชื้ออย่างแพร่หลาย

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

กลุ่มตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้ จะถูกสุ่มจากเซลล์ที่เก็บรักษาไว้โดยการแช่แข็ง โดยนำมาแบ่งเป็น 2 กลุ่มเพื่อศึกษาผลในการต้านการอักเสบของสารสกัดใบจักรนารายณ์ ได้แก่

กลุ่มควบคุม คือ เซลล์แมคโครฟาจที่ไม่ได้รับการกระตุ้นจากทั้ง LPS ของเชื้อก่อโรคปริทันต์และสารสกัดใบจักรนารายณ์

กลุ่มทดลอง คือ เซลล์แมคโครฟาจที่ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS ของเชื้อก่อโรคปริทันต์และเซลล์แมคโครฟาจที่ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS ของเชื้อก่อโรคปริทันต์ร่วมกับสารสกัดใบจักรนารายณ์

ตัวแปรที่ศึกษา

ตัวแปรอิสระ ได้แก่ ความเข้มข้นของสารสกัดใบจักรนารายณ์

ตัวแปรตาม ได้แก่

1. การแสดงออกของ TNF-α ของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ในระดับ mRNA จากการกระตุ้นด้วย LPS และสารสกัดใบจักรนารายณ์

2. การแสดงออกของ IL-1β ของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ในระดับ mRNA จากการกระตุ้นด้วย LPS และสารสกัดใบจักรนารายณ์

นิยามศัพท์เฉพาะ

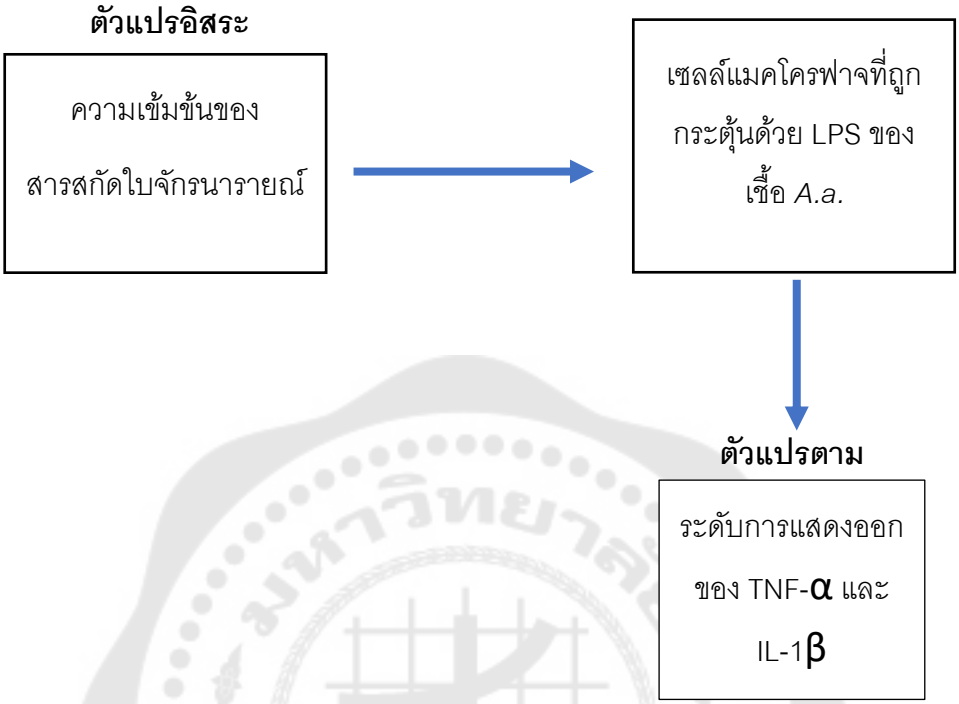
1. ปริทันต์อักเสบ (Periodontitis) หมายถึง โรคที่เกิดการอักเสบเรื้อรังจากผลของการมีแบคทีเรียก่อโรคในคราบจุลินทรีย์ ส่งผลให้เกิดการทำลายของเนื้อเยื่อที่ล้อมรอบฟัน (อวัยวะปริทันต์ ซึ่งได้แก่ เอ็นยึดปริทันต์ เหงือก เคลือบรากฟัน และกระดูกเบ้าฟัน) เกิดฟันโยก และนำไปสู่การสูญเสียฟันในที่สุด

2. ไลโปโพลีแซคคาไรด์ (Lipopolysaccharide: LPS) หมายถึง ปัจจัยที่ทำให้เกิดโรค (Virulence factor) ของเชื้อแบคทีเรีย มักพบอยู่ที่ผนังเซลล์ชั้นนอกของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งเชื้อก่อโรคปริทันต์มักเป็นแบคทีเรียในกลุ่มนี้

3. ทูเมอร์เนกโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา (Tumor necrosis factor α: TNF-α) หมายถึง ไซโตไคน์ที่มีบทบาทหน้าที่สำคัญในกระบวนการอักเสบ ถูกสร้างและหลั่งได้จากเซลล์หลายชนิด โดยเซลล์ที่มีบทบาทหลักในการหลั่ง TNF-α คือ เซลล์แมคโครฟาจ เมื่อถูกหลั่งออกมาแล้วจะกระตุ้นให้ร่างกายเกิดการตอบสนองโดยเกิดการรวมตัวของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน นำไปสู่การทำลายของเนื้อเยื่อและการละลายของกระดูก

4. อินเตอร์ลิวคิน-1 เบตา (Interleukin-1β: IL-1β) หมายถึง ไซโตไคน์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการอักเสบเช่นเดียวกัน IL-1β ถูกหลั่งได้จากเซลล์หลายชนิด โดยเซลล์ที่มีบทบาทหลักในการหลั่ง IL-1β คือ เซลล์แมคโครฟาจเช่นเดียวกัน โดยเหนี่ยวนำให้เกิดการตอบสนองของร่างกายร่วมกับ TNF-α ในกระบวนการอักเสบ

กรอบแนวคิดงานวิจัย



ฤทธิ์ของสารสกัดจักรนารายณ์ที่ศึกษามาในอดีต แสดงให้เห็นความสามารถในการยับยั้งการอักเสบได้ทั้งการศึกษาด้วยเซลล์ และด้วยสัตว์ทดลอง โดยมีการแสดงออกของสารสื่ออักเสบ เช่น TNF-α และ IL-1β ลดลง การศึกษาในครั้งนี้ จึงต้องการสำรวจว่าสารสกัดใบจักรนารายณ์สามารถต้านการอักเสบ โดยลดระดับการแสดงออกของ TNF-α และ IL-1β ภายหลังจากการถูกกระตุ้นด้วย LPS ของเชื้อ *A.a.* ได้หรือไม่ โดยทำการศึกษาในเซลล์แมคโครฟาจซึ่งเป็นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการเกิดโรคปริทันต์อักเสบ

สมมติฐานในการวิจัย

สมมติฐานที่ 1

H_0: สารสกัดใบจักรนารายณ์ไม่มีความเป็นพิษต่อความมีชีวิตและการเจริญเติบโตของเซลล์แมคโครฟาจ

H_1: สารสกัดใบจักรนารายณ์มีความเป็นพิษต่อความมีชีวิตและการเจริญเติบโตของเซลล์แมคโครฟาจ

สมมติฐานที่ 2

H_0: เซลล์แมคโครฟาจที่ได้รับสารสกัดใบจักรนารายณ์มีการแสดงออกของ TNF-α ในระดับ mRNA เมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS ของเชื้อ *A.a.* ไม่แตกต่างจากเซลล์แมคโครฟาจที่ไม่ได้รับการกระตุ้นอย่างมีนัยสำคัญ

H_1: เซลล์แมคโครฟาจที่ได้รับสารสกัดใบจักรนารายณ์มีการแสดงออกของ TNF-α ในระดับ mRNA เมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS ของเชื้อ *A.a.* น้อยกว่าเซลล์แมคโครฟาจที่ไม่ได้รับการกระตุ้นอย่างมีนัยสำคัญ

สมมติฐานที่ 3

H_0: เซลล์แมคโครฟาจที่ได้รับสารสกัดใบจักรนารายณ์มีการแสดงออกของ IL-1β ในระดับ mRNA เมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS ของเชื้อ *A.a.* ไม่แตกต่างจากเซลล์แมคโครฟาจที่ไม่ได้รับการกระตุ้นอย่างมีนัยสำคัญ

H_1: เซลล์แมคโครฟาจที่ได้รับสารสกัดใบจักรนารายณ์มีการแสดงออกของ IL-1β ในระดับ mRNA เมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS ของเชื้อ *A.a.* น้อยกว่าเซลล์แมคโครฟาจที่ไม่ได้รับการกระตุ้นอย่างมีนัยสำคัญ

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ทบทวนเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง จากนั้นทำการสรุปข้อมูลนำเสนอตามหัวข้อต่อไปนี้

1. จักรนารายณ์ (*Gynura procumbens* Merr)

2. โรคปริทันต์อักเสบ (Periodontitis)

3. บทบาทของทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา (Tumor necrosis factor alpha: TNF-α) ต่อโรคปริทันต์อักเสบ

4. บทบาทของอินเตอร์ลิวคิน-1 เบตา (Interleukin-1 beta: IL-1β) ต่อโรคปริทันต์อักเสบ

จักรนารายณ์ (*Gynura procumbens* Merr)

จักรนารายณ์ (Longevity spinach) หรือ แปะตำปึง ชื่อวิทยาศาสตร์ คือ ไจนูรา โพรคัมเบนส์ เมอร์ (*Gynura procumbens* Merr) เป็นพืชในวงศ์ทานตะวัน (Asterceae-Senecioneae) ซึ่งมีทั้งหมด 44 สปีชีส์ มีการกระจายพันธุ์จากแอฟริกาเขตร้อนมาสู่เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ตลอดจนทางตอนใต้ของจีน ญี่ปุ่น และ ปาปัวนิวกินี เข้าไปสู่ตอนเหนือของออสเตรเลีย โดยพบในประเทศไทย 10 สายพันธุ์[27] ชื่อพ้องทางวิทยาศาสตร์ของจักรนารายณ์มีหลายชื่อ เช่น ไจนูรา ซาร์เมนโทซา ดีซี (*Gynura sarmentosa* DC) และ คาคาเลีย ซาร์เมนโทซา บลูม (*Cacalia sarmentosa* Blume) เป็นต้น ในเอเชียแถบตะวันออกเฉียงใต้ เช่น มาเลเซีย อินโดนีเซีย เวียดนาม และไทย มีการนำจักนารายณ์มาใช้ประโยชน์ในการปรุงอาหาร โดยใบของจักรนารายณ์สามารถรับประทานได้ทั้งแบบสดและนำไปปรุงสุก และยังมีการใช้ในตำรับยาสมุนไพรเพื่อบรรเทาอาการเจ็บป่วยหลายประเภท เช่น ลดความดันโลหิต[1, 2] ลดน้ำตาลในเลือด[3] ลดคอเรสเตอรอล[4] บรรเทาอาการอักเสบ[5-7] ต้านมะเร็ง[11] ต้านไวรัส[12, 13] เป็นต้น นอกจากนี้ มีการพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่แปรรูปจากใบจักรนารายณ์และจดสิทธิบัตรแล้วหลายชนิดในประเทศจีน เช่น สเปรย์ฆ่าเชื้อในช่องปาก[20] เจลล้างมือ[21] และครีมบำรุงผิว[22] เป็นต้น

ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์

จักรนารายณ์เป็นพืชล้มลุกที่ออกดอกและผลได้ตลอดทั้งปี มีลักษณะรากเป็นรากฝอย ลำต้นตั้งตรงหรือเลื้อยขึ้นที่สูง มีความสูงได้ 2-5 เมตร ใบเป็นใบเดี่ยว รูปร่างรีจนถึงรูปร่างคล้ายสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัด ออกเวียนสลับตามลำต้น มีขนเล็กน้อย ปลายใบแหลม ขอบใบหยัก

เล็กน้อยจนถึงหยักซี่ฟันถี่ ดอกมีลักษณะเป็นช่อแบบกระจุกแน่น มีใบประดับ ลักษณะกลีบดอกเป็นฝอย สีเหลืองจนถึงส้มแดง หรือสีม่วง ผลมีลักษณะเป็นผลแห้งเมล็ดล่อน สีน้ำตาล มีผิวเรียบหรือมีขนยาว[27, 28]

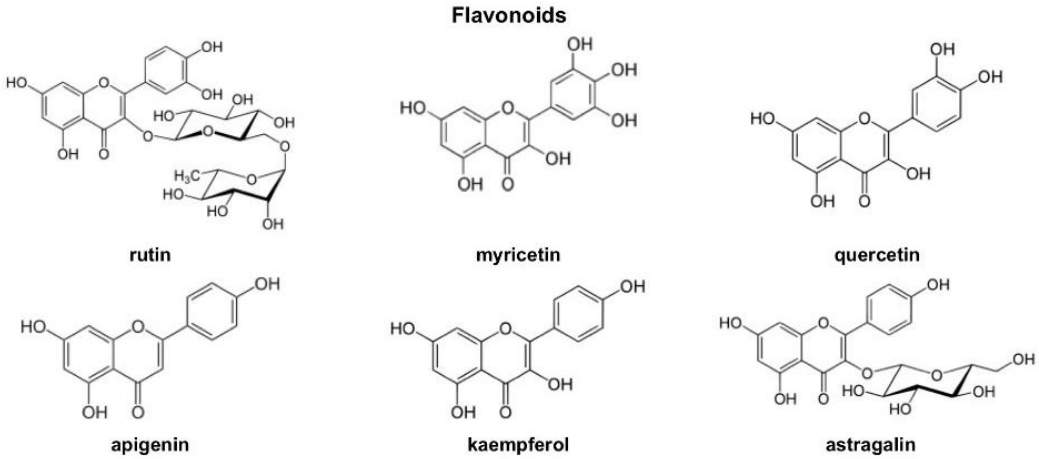
ภาพประกอบ 1 ลักษณะของต้นจักรนารายณ์ (ลำต้น ใบ และดอก) [29]

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive constituents)

เนื่องจากจักรนารายณ์ถูกใช้เป็นยาสมุนไพรพื้นบ้านในการรักษาโรคหลายชนิด จึงมีการศึกษาเพื่อหาส่วนประกอบทางเคมีและสารออกฤทธิ์ที่สำคัญของจักรนารายณ์ พบว่า สารสกัดจากใบจักรนารายณ์ประกอบด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลัก 2 ชนิด คือ ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)[14, 15] และ สารประกอบฟีนอล (Phenolic compounds) นอกจากนี้ ยังพบ ซาโปนิน (Saponins), แทนนิน (Tannins), เทอร์ปีนอยด์ (Terpenoids) และ ไกลโคไซด์ (Glycosides)[15] เป็นองค์ประกอบรองด้วย

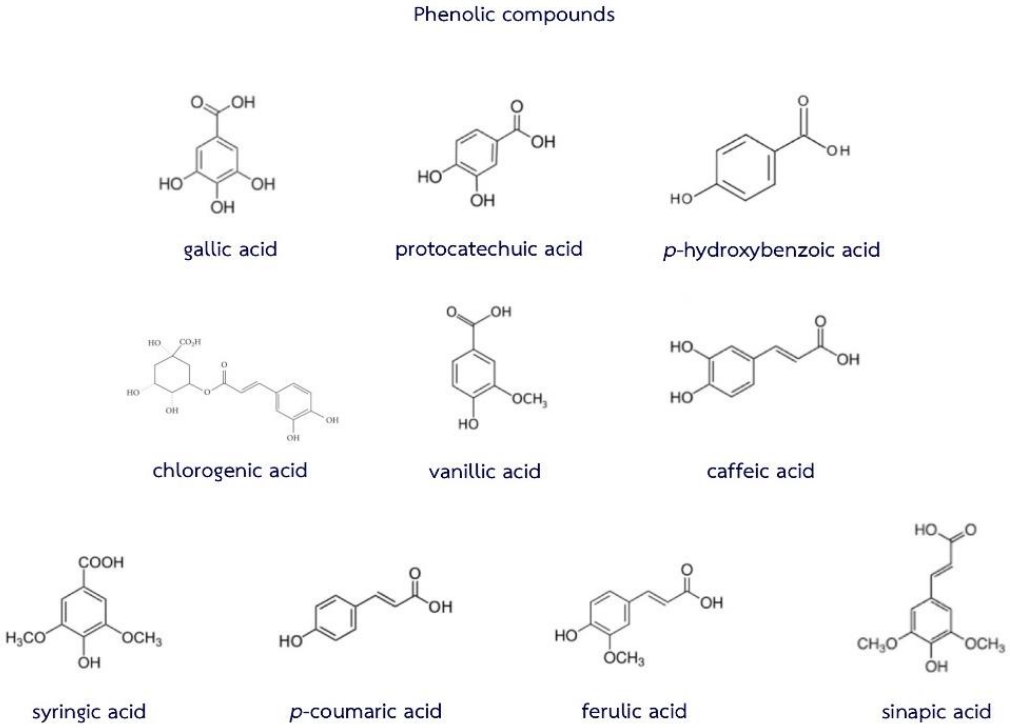
ฟลาโวนอยด์ เป็นสารประกอบโพลีฟีนอล (Polyphenolic compounds) ที่พบได้มากที่สุดในอาหารของมนุษย์ ได้มาจากการเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (Secondary metabolite) ของพืช พบมากในผลไม้ ผัก และเครื่องดื่มบางชนิด ฟลาโวนอยด์มีความเชื่อมโยงต่อการส่งเสริมสุขภาพในหลายด้าน ไม่ว่าจะเป็นการต่อต้านอนุมูลอิสระ ช่วยป้องกันหลายโรคที่เกิดจากการทำลายออกซิเดชัน (Oxidation damage) เช่น โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน และโรคเรื้อรังอื่น ๆ อีกทั้งยังมีผลลดการอักเสบด้วย[16, 17] จากการศึกษาของ Kaewseejan และคณะในปี 2015[15] พบฟลาโวนอยด์ 5 ชนิดจากสารสกัดหยาบของใบจักรนารายณ์ซึ่งสกัดด้วยเอทานอล ได้แก่ รูติน

(Rutin) ไมริซิติน (Myricetin) เคอร์ซิติน (Quercetin) อาพิจินิน (Apigenin) และ แคมป์เฟอรอล (Kaempferol) คล้ายคลึงกับการศึกษาก่อนหน้าของ Akowuah และคณะในปี 2002[14] ที่พบฟลาโวนอยด์จากสารสกัดหยาบของใบจักรนารายณ์ซึ่งสกัดด้วยเมทานอล 4 ชนิด ได้แก่ รูติน แคมป์เฟอรอล เคอร์ซิติน และแอสตรากาลิน (Astragalin)



ภาพประกอบ 2 ฟลาโวนอยด์ที่พบในสารสกัดจักรนารายณ์[30]

สารประกอบฟีนอล เป็นสารที่ได้จากการเมแทบอไลต์ทุติยภูมิของพืชเช่นเดียวกับฟลาโวนอยด์ และมีความสำคัญต่อสุขภาพของมนุษย์เนื่องจากมีคุณประโยชน์ที่สำคัญหลากหลายคล้ายคลึงกัน เช่น คุณสมบัติเป็นสารต่อต้านอนุมูลอิสระ ป้องกันมะเร็ง, ลดการอักเสบ และมีผลทำให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือด[18] จากการศึกษาของ Kaewseejan และคณะในปี 2015[15] พบสารประกอบ ฟีนอล 10 ชนิดจากสารสกัดของใบจักรนารายณ์ ได้แก่ กรดแกลลิก (Gallic acid) กรดโพรโตคาทีคูอิก (Protocatechuic acid) กรดพาราไฮดรอกซีเบนโซอิก (*p*-hydroxybenzoic acid) กรดคลอโรจีนิก (Chlorogenic acid) กรดวานิลิก (Vanillic acid) กรดคาเฟอิก (Caffeic acid) กรดไซรินจิก (Syringic acid) กรดพาราคูมาริก (*p*-coumaric acid) กรดเฟอรูลิก (Ferulic acid) และ กรดสินาปิก (Sinapic acid)



ภาพประกอบ 3 สารประกอบฟีนอลที่พบในสารสกัดจักรนารายณ์

อย่างไรก็ตาม สัดส่วนและปริมาณของสารออกฤทธิ์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับส่วนของพืชที่นำมาสกัด ตัวทำละลาย รวมถึงระบบที่ใช้ในการสกัดด้วย ส่วนประกอบของพืชที่ได้รับการศึกษามากที่สุด คือ ใบ นอกจากนั้น ยังมีการศึกษาโดยสกัดจากส่วนของลำต้น[31] ลำต้นและใบ[19] และทุกส่วนของต้นจักรนารายณ์[4]ด้วย ซึ่งอาจทำให้ได้ปริมาณของสารประกอบฟีนอลที่แตกต่างกันจากองค์ประกอบในส่วนต่าง ๆ ของพืช ตัวทำละลายที่เหมาะในการใช้สกัดฟลาโวนอยด์และสารประกอบฟีนอลจากต้นจักรนารายณ์ควรเป็นตัวทำละลายอินทรีย์และมีน้ำเป็นส่วนประกอบน้อย เนื่องจากสารทั้ง 2 ชนิดนี้มีลักษณะโครงสร้างเป็นวงแหวนเบนซิน มีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้จำกัด[3] โดยตัวทำละลายที่ใช้แล้วได้สารประกอบฟีนอลมากที่สุด คือ เมทานอล รองลงมา คือ เอทานอล[4] แต่เมื่อพิจารณาถึงความปลอดภัย โดยเฉพาะการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์สุขภาพ ทำให้หลายการศึกษาเลือกใช้ตัวทำละลายเป็นเอทานอลมากกว่า [32] ในขณะที่ การศึกษาของ Amin และคณะ[8] ได้ทำการสกัดสารจากใบจักรนารายณ์โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย พบว่า สารสกัดที่ได้มีองค์ประกอบทั้งฟลาโวนอยด์ สารประกอบฟีนอล แทนนิน และซาโปนิน รวมถึงมีความปลอดภัยมากกว่าการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เอทานอล หรือเมทานอลในการสกัด นอกจากส่วนที่กล่าวมาแล้ว อุณหภูมิขณะทำการสกัดก็มีอิทธิพลต่อ

องค์ประกอบในสารที่สกัดได้เช่นกัน Akowuah และคณะ[33] ทำการสกัดสารจากใบจักรนารายณ์ด้วยเมทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 80 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ แล้ววัดสารประกอบฟีนอลที่ได้ พบว่าช่วงอุณหภูมิที่ทำการสกัดสารแล้วได้สารประกอบฟีนอลมากที่สุดคือ 40 องศาเซลเซียส และลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อใช้อุณหภูมิมากกว่า 60 องศาเซลเซียสในการสกัด

ฤทธิ์ทางชีวภาพ (Biological activity) ของจักรนารายณ์

ฤทธิ์ต้านการติดเชื้อแบคทีเรีย

สารสกัดที่ได้จากจักรนารายณ์มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลัก คือ ฟลาโวนอยด์และสารประกอบฟีนอล ซึ่งมีรายงานผลทางวิทยาศาสตร์ว่ามีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย Rahman และ Asad[34] จึงทำการวิเคราะห์ผลของสารสกัดจากใบจักรนารายณ์โดยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน 4 ชนิดต่อการต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา พบว่า สารสกัดใบจักรนารายณ์โดยตัวทำละลายชนิดไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane) และเอทิลอะซิเตท (Ethyl acetate) มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราได้หลายชนิด เช่น บาซิลลัส ซีเรียส (*Bacillus cereus)*, ซูโดโมแนส แอรูจีโนซา (*Pseudomonas aeruginosa*) ซัลโมเนลลา พาราไทฟี (*Salmonella* Paratyphi) วิบริโอ พาราฮีโมไลติคัส (*Vibrio parahemolyticus*) แคนดิดา อัลบิแคน (*Candida albican*) และแอสเปอร์จิลลัส ไนเจอร์ (*Aspergillus niger*)

มีรายงานว่าสารสกัดจากใบจักรนารายณ์ที่ใช้น้ำในการสกัดมีผลต่อการต้านเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์พลาสโมเดียม ฟัลซิปารัม 3 ดี 7 (*Plasmodium falciparum* 3D7) และพลาสโมเดียม เบิร์กไฮ เอ็นเค 65 (*Plasmodium berghei* NK65) ผ่านการยับยั้งกลไกไกลโคเจนซินเทสไคเนส 3 (Glycogen synthase kinase 3: GSK3) โดยตรง หรือยับยั้งกลไกฟอสฟาติดิลอิโนซิทอล 3 ไคเนส/โปรตีนไคเนส บี (Phosphatidylinositol 3 kinase/Protein kinase B: PI3K/Akt) โดยอ้อม[35] ข้อมูลจากการศึกษาของ Wong และคณะ[5] ช่วยสนับสนุนผลการศึกษาที่ผ่านมา โดยรายงานผลว่าสารสกัดจักรนารายณ์สามารถยับยั้งเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ *P. falciparum* 3D7 ได้เช่นเดียวกัน และมีการเปรียบเทียบกับการใช้สารแคมป์เฟอรอลในการรักษาด้วย ซึ่งแคมป์เฟอรอลเป็นหนึ่งในสารที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อมาลาเรียเช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตาม ทั้งสารสกัดจากใบจักรนารายณ์และสารแคมป์เฟอรอลไม่สามารถลดจำนวนแบคทีเรียในตับของหนูทดลองที่ติดเชื้อแบคทีเรียเบอร์โคลเดอเรีย ซูโดมัลลิไอ (*Burkholderia pseudomallei*: *B. Pseudomallei*) ได้

ฤทธิ์ต้านการอักเสบ

จักรนารายณ์เป็นยาพื้นบ้านที่ให้ผลดีมากในการรักษาอาการอักเสบ โดยมีการใช้ในรูปแบบเป็นยาทาภายนอก ทั้งนี้ เนื่องจากสารสกัดหยาบของใบจักรนารายณ์มีส่วนประกอบ

หลักเป็นฟลาโวนอยด์ซึ่งมีการศึกษาพบว่ามีฤทธิ์ต้านการอักเสบ การศึกษาหนึ่งในหนูทดลองได้ทำการกระตุ้นหูหนูด้วยน้ำมันสลอด (Croton oil) เพื่อให้เกิดการอักเสบ พบว่า สารสกัดจักรนารายณ์มีคุณสมบัติในการลดการอักเสบบริเวณหูหนูได้เทียบเท่าสารไฮโดรคอร์ติโซน ขนาด 6 มิลลิกรัม[19] และยังมีการแสดงผลของการใช้เจลสารสกัดใบจักรนารายณ์ทาที่แผลของหนูทดลองเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ทาแผลด้วยเจลผสมน้ำเกลือ พบว่า กลุ่มที่ใช้เจลสารสกัดจักรนารายณ์ช่วยส่งเสริมให้แผลมีการหายที่เร็วขึ้น ลดการเกิดแผลเป็น และมีจำนวนเซลล์อักเสบในบริเวณแผลน้อยกว่า รวมทั้งยังมีการสร้างคอลลาเจนและหลอดเลือดเพิ่มมากขึ้นด้วย[36]

การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดใบจักรนารายณ์เปรียบเทียบกับสารแคมป์เฟอรอลบริสุทธิ์ ในหนูทดลองที่ถูกทำให้ติดเชื้อ *B. pseudomallei* พบว่า นอกจากช่วยเพิ่มอัตรารอดชีวิตของหนูที่ติดเชื้อแล้ว ยังส่งผลให้เกิดการยับยั้งกลไกไกลโคเจนซินเทสไคเนส 3 เบตา (Glycogen synthase kinase-3β: GSK3β)[5] ซึ่งทำหน้าที่สำคัญในการขัดขวางการติดเชื้อไวรัส เชื้อรา ปรสิต ตลอดจนเชื้อมาลาเรีย มีรายงานการศึกษาว่า สารสกัดจักรนารายณ์ มีความสามารถในการควบคุมระดับสารอักเสบ โดยลดระดับ TNF-α และอินเตอร์ฟีรอน แกมมา (Interferon gamma: IFN-γ) ในตับและในกระแสเลือดหนู ในขณะที่พบการเพิ่มปริมาณสารต้านการอักเสบ ได้แก่ อินเตอร์ลิวคิน-10 (Interleukin-10: IL-10) โดยมีกระบวนการต้านการอักเสบผ่านทางการยับยั้ง PI3K/Akt

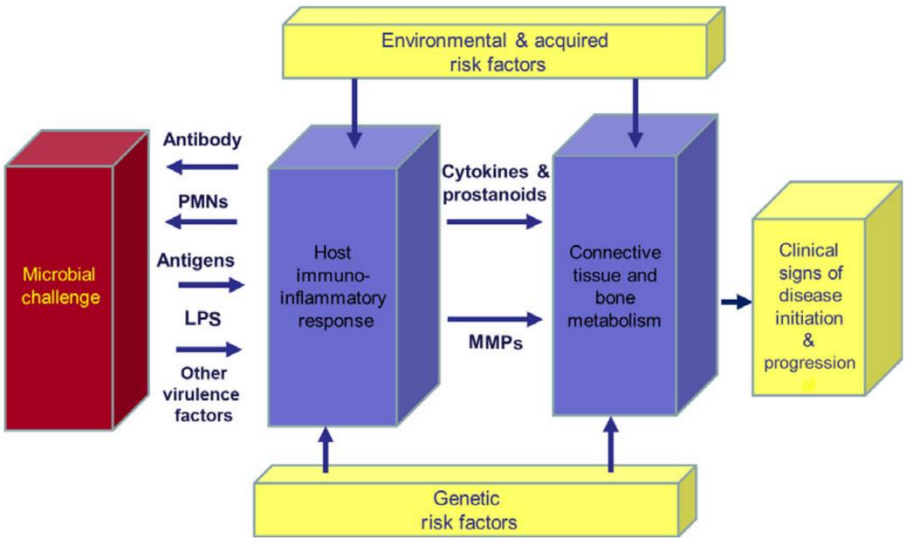
นอกจากนี้ ยังมีรายงานทางวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับผลของสารสกัดจักรนารายณ์ต่อฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอีกหลายงาน ไม่ว่าจะเป็นฤทธิ์ในการลดน้ำตาลในเลือด, ฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระ, ลดความดันโลหิตและคอเรสเตอรอล, ฤทธิ์ต้านมะเร็ง รวมถึงฤทธิ์เพิ่มความสามารถในการสืบพันธุ์ด้วย

โรคปริทันต์อักเสบ (Periodontitis)

โรคปริทันต์อักเสบเป็นโรคที่มีการอักเสบเรื้อรังของบริเวณโดยรอบของฟัน ซึ่งประกอบด้วย เหงือก เอ็นยึดปริทันต์ เคลือบรากฟัน และกระดูกเบ้าฟัน ทำให้เนื้อเยื่อเหล่านั้นถูกทำลาย พบร่องลึกปริทันต์ นำไปสู่การเกิดฟันโยกและสูญเสียฟันในที่สุด โรคปริทันต์อักเสบถือเป็นหนึ่งในปัญหาสุขภาพสำคัญของทั่วโลก โดยพบความชุกมากถึงร้อยละ 50 ของประชากร[37] และมีการเพิ่มขึ้นของผู้เป็นโรคปริทันต์อักเสบขั้นรุนแรง (Severe periodontitis) อย่างต่อเนื่องในช่วงสามสิบปีที่ผ่านมา[38] จากผลการสำรวจสภาวะสุขภาพช่องปากแห่งชาติ ครั้งที่ 8[39] ในปีพ.ศ. 2560 ซึ่งจัดทำโดยกรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข พบว่า ประชากรไทยในกลุ่มวัยทำงาน (อายุ 35-44 ปี) เป็นโรคปริทันต์อักเสบร้อยละ 25.9 ในจำนวนนี้เป็นโรคปริทันต์ขั้นรุนแรง (ร่องลึกระดับ

มากกว่า 6 มิลลิเมตรขึ้นไป) ร้อยละ 6.1 ขณะที่กลุ่มวัยสูงอายุ (60-74 ปี) เป็นโรคปริทันต์อักเสบร้อยละ 36.3 และเป็นโรคปริทันต์ขั้นรุนแรง ร้อยละ 12.2 แสดงให้เห็นแนวโน้มว่ามีความรุนแรงของโรคเพิ่มขึ้นตามอายุ ซึ่งอาจนำไปสู่การสูญเสียฟัน และส่งผลให้ประชากรมีคุณภาพชีวิตที่แย่ลงได้

โรคปริทันต์อักเสบเป็นโรคที่เกิดจากหลายสาเหตุ โดยมีปัจจัยหลักคือการสะสมของคราบจุลินทรีย์ (Bacterial plaque) บริเวณร่องเหงือกและบริเวณใต้เหงือก จนเกิดภาวะไม่สมดุล (Dysbiosis) ทำให้ร่างกายมีการตอบสนองโดยการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้มากำจัดเชื้อแบคทีเรีย ส่งผลให้เกิดกระบวนการอักเสบและการทำลายของเนื้อเยื่อโดยรอบฟัน กระบวนการเกิดโรคปริทันต์สามารถแบ่งตามลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาได้เป็น 4 ระยะ[40] ได้แก่ ระยะเริ่มต้น (Initial stage) เป็นระยะที่เกิดภายใน 2-4 วันภายหลังมีการสะสมของคราบจุลินทรีย์ พบการอักเสบของหลอดเลือดขนาดเล็ก มีการเคลื่อนตัวของ PMNs ผ่านเยื่อบุผิวเชื่อมต่อ (Junctional epithelium) ออกมาสู่ร่องเหงือก ร่วมกับการมีน้ำเหลืองเหงือก (Gingival crevicular fluid: GCF) ไหลออกมามากกว่าปกติ และอาจพบการสูญเสียคอลลาเจนบริเวณโดยรอบหลอดเลือด จากนั้นเข้าสู่ระยะแรก (Early stage) ภายใน 4-10 วัน รอยโรคในระยะนี้จะพบการสะสมของทีลิมโฟไซต์ (T lymphocytes) และเซลล์แมคโครฟาจจำนวนมาก เส้นใยคอลลาเจนของเหงือกเริ่มถูกทำลาย และมีการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของ fibroblasts หากมีการดำเนินของโรคต่อไปอีก 14-21 วันจะเข้าสู่ระยะคงสภาพ (Established stage) ซึ่งจะพบการอักเสบที่เพิ่มขึ้นของเนื้อเยื่อเหงือก มีการขยายขนาดของเส้นเลือด มีการกระตุ้นบีเซลล์ให้เปลี่ยนเป็นพลาสมาเซลล์ (Plasma cell) รวมทั้งมีการสูญเสียเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือกเพิ่มขึ้นโดยที่ยังไม่พบการละลายของกระดูกเบ้าฟัน ในระยะคงสภาพนี้ อาจมีการคงอยู่โดยไม่มีการลุกลามต่อเนื่องของรอยโรคได้เป็นเวลาหลายปี หรืออาจมีการลุกลามของโรคต่อไปจนเกิดการสูญเสียการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์จนเข้าสู่ระยะรุนแรง (Advanced stage) เกิดเป็นโรคปริทันต์อักเสบก็ได้ ทั้งนี้ แม้จะยังไม่ทราบสาเหตุที่ชัดเจนที่นำไปสู่การลุกลามของโรค แต่ก็มีการสันนิษฐานว่าอาจเกี่ยวข้องกับแบคทีเรียบางชนิดในคราบจุลินทรีย์และการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย[41]

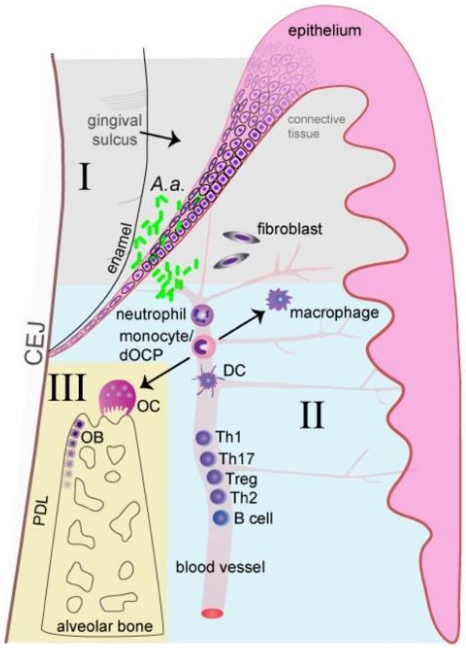


ภาพประกอบ 4 แผนภาพการเกิดโรคปริทันต์[42]

จากการศึกษาก่อนหน้า พบว่า เชื้อแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดโรคปริทันต์ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ชนิดไม่พึ่งออกซิเจน (Gram negative anaerobic bacteria) อยู่ในกลุ่มสีแดง (Red complex) ได้แก่ พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส *(Porphyromonas gingivalis*: *P.g.)* ทรีโพนีมา เดนทิโคลา (*Treponema denticola*: *T.d.*) และแทนเนอเรลลา ฟอร์ไซเธีย (*Tannerella forsythia*: *T.f.*) และมีรายงานว่า เชื้อพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย (*Prevotella intermedia*: *P.i.*) และ แอกกริเกทิแบกเทอร์ แอกทิโนไมซีเทมคอมิแทนส์ (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: *A.a.*) ก็มีความสำคัญกับโรคปริทันต์อักเสบเช่นกัน มีการศึกษาพบว่าการมีอยู่ของเชื้อ *A.a. P.g.* และ *T.d.* ในน้ำลายมีความสัมพันธ์กับการมีร่องลึกปริทันต์[43] การรวมตัวกันของเชื้อ *A.a. P.g.* และ *P.i.* มีความเกี่ยวข้องกับโรคปริทันต์เป็นอย่างมาก[44] นอกจากนี้ยังพบว่า เชื้อ *A.a.* มักถูกพบในผู้ที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบขั้นรุนแรงมากกว่าขั้นต้น[45] และในผู้ป่วยที่พบลักษณะการละลายของกระดูกในแนวดิ่ง (Vertical bone defect) จากภาพถ่ายรังสี ร้อยละ 91.7 สามารถตรวจพบเชื้อ *A.a.* ในช่องปากได้[46]

ปัจจัยที่ทำให้เกิดโรคของเชื้อ *A.a.* มีหลายชนิด เช่น ลิวโคท็อกซิน เอ (Leukotoxin A: LtxA), LPS และ ไซโตลีธัล ดิสเทนดิง ท็อกซิน (Cytolethal distending toxin: CDT) เป็นต้น ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ทำให้เกิดการตอบสนองโดยการอักเสบ กระตุ้นให้เกิดการทำลายของเนื้อเยื่อ และขัดขวางการซ่อมแซมของเนื้อเยื่อ[47] เมื่อเชื้อ *A.a.* มีการก่อตัวในร่องเหงือกจะมีการยึดกับเซลล์เยื่อบุผิวเชื่อมต่อและบุกรุกเข้ามายังชั้นเยื่อบุผิว โดยกลไกที่ทำให้เซลล์เกิดการตายแบบ

apoptosis จากนั้นจะแทรกเข้าไปที่ชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน กระตุ้นให้เซลล์เยื่อบุผิวและเซลล์สร้างเส้นใยหลั่งไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เป็นสัญญาณให้นิวโทรฟิลและโมโนไซต์มารวมตัวกันในบริเวณที่มีการติดเชื้อและกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันร่างกายตามมา[25] นอกจากนี้ พบว่า เชื้อ *A.a.* และ LPS ของเชื้อยังส่งผลให้กระดูกเบ้าฟันเกิดการละลายได้ผ่านการเหนี่ยวนำให้มีการสร้างเซลล์สลายกระดูก (Osteoclast)[48] และรบกวนกระบวนการสร้างเซลล์สร้างกระดูก (Osteoblastogenesis) อีกด้วย[49]

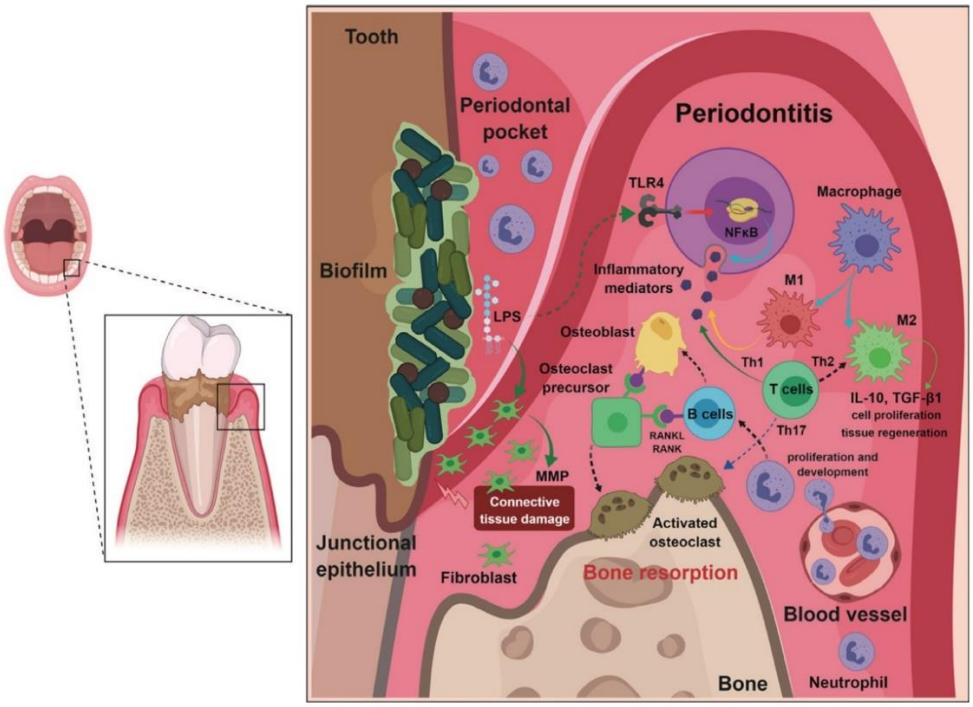


ภาพประกอบ 5 การก่อตัวของเชื้อ *A.a.* ในบริเวณร่องเหงือก[25]

การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันร่างกายเป็นอีกกลไกหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบเรื้อรัง ซึ่งเป็นลักษณะทางคลินิกที่สำคัญของโรคปริทันต์อักเสบ การอักเสบเป็นกระบวนการป้องกันหนึ่งของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (Innate immune system) เพื่อตอบสนองต่อทั้งปัจจัยภายในและภายนอก เช่น การติดเชื้อ ความเครียด หรือการบาดเจ็บต่าง ๆ และแสดงออกมาในลักษณะอาการปวด บวม แดง ร้อน และรบกวนการทำงานปกติ เมื่อเกิดการสะสมของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในแผ่นคราบจุลินทรีย์ แบคทีเรียจะสามารถผ่านจากเยื่อบุผิวเชื่อมต่อซึ่งเป็นปราการแรกเข้าสู่ชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือก (Gingival connective tissue) กระตุ้นเซลล์เยื่อบุผิวเหงือก (Gingival epithelial cells) และเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกให้เริ่มมีการอักเสบ โดยแบคทีเรียจะปล่อยสารพิษ เช่น LPS ซึ่งร่างกายจะสามารถตรวจจับได้ผ่านโทลไลค์รีเซปเตอร์ 2

หรือ 4 (Toll-like receptor 2 หรือ 4: TLR2 หรือ TLR4) จากนั้น จะมีการรวมกันของนิวโทรฟิล และเคลื่อนไปยังร่องเหงือก ผ่านเยื่อบุผิวเชื่อมต่อซึ่งมีการในการสร้างคีโมไคน์ และไซโตไคน์ชนิดต่าง ๆ นิวโทรฟิลสามารถเหนี่ยวนำการสร้างและรวมตัวของเฮลเปอร์ทีเซลล์ 17 มายังตำแหน่งที่เกิดการติดเชื้อหรืออักเสบ นอกจากนี้ ยังสามารถส่งเสริมการเพิ่มจำนวนของบีเซลล์ และกระตุ้นให้เปลี่ยนไปเป็นพลาสมาเซลล์ด้วย ในขณะเดียวกัน มีการศึกษาพบว่า นิวโทรฟิลที่ถูกกระตุ้นเหล่านี้จะมีการแสดงออกของ RANKL ที่ผิวเซลล์ด้วย ซึ่งแสดงให้เห็นว่านิวโทรฟิลสามารถเหนี่ยวนำให้กระดูกเกิดการละลายโดย osteoclast ได้

เซลล์ที่สำคัญในกระบวนการอักเสบอีกชนิด คือ เซลล์แมคโครฟาจ เนื่องจากเป็นเซลล์ที่เป็นแหล่งผลิตไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบและโมเลกุลที่เกี่ยวข้องในการทำลายเนื้อเยื่อหลายชนิด เช่น IL-1β, TNF-α, MMP และพรอสตาแกลนดิน อี 2 (Prostaglandin E_2: PGE_2) ในผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ จะพบว่ามีปริมาณของไซโตไคน์หรือโมเลกุลเหล่านี้เพิ่มขึ้นทั้งในเนื้อเยื่อเหงือกและน้ำเหลืองเหงือก และยังพบว่าการรวมตัวกันของเซลล์แมคโครฟาจมีความสัมพันธ์โดยตรงกับระดับความรุนแรงของโรคปริทันต์ด้วย[23] กล่าวคือ เมื่อเซลล์แมคโครฟาจมีการรวมตัวกันในจำนวนที่มากขึ้น จะพบว่าคอลลาเจนในชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันถูกสลายเพิ่มมากขึ้น เซลล์แมคโครฟาจจะมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานและไปทำหน้าที่ที่แตกต่างกันเมื่อถูกกระตุ้นผ่านกลไกที่แตกต่างกัน แมคโครฟาจ M1 จะถูกกระตุ้นผ่านทางกลไกคลาสสิค (Classical activation) จากสารต่าง ๆ ของเชื้อโรค เช่น LPS หรือ ไซโตไคน์ Th1 เป็นแมคโครฟาจชนิดที่มีความสามารถในการ phagocytic สูง และเพิ่มการแสดงออกของไซโตไคน์ที่ชักนำให้เกิดการอักเสบ รวมทั้งโมเลกุลที่ช่วยในการกำจัดเชื้อ ในขณะที่เซลล์แมคโครฟาจซึ่งถูกกระตุ้นจากไซโตไคน์ Th2, IL-4 และ IL-13 ผ่านทางกลไกอัลเทอร์เนทีฟ (Alternative activator) เป็นแมคโครฟาจ M2 จะมีการหลั่ง IL-10 และทรานส์ฟอร์มมิงโกรทแฟคเตอร์ เบตา 1 (Transforming growth factor beta 1: TGF-β_1) ในระดับสูง ทำให้ยับยั้งกระบวนการอักเสบ และส่งเสริมการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ ในการอักเสบของโรคปริทันต์ สามารถพบแมคโครฟาจได้ทั้ง M1 และ M2 โดยพบว่ามีการแสดงออกของ M1 ที่เด่นกว่า แสดงให้เห็นว่า แมคโครฟาจ M1 อาจเป็นชนิดที่มีความเกี่ยวกับโรคปริทันต์อักเสบ



ภาพประกอบ 6 การตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะและแบบจำเพาะในระหว่างการเกิดโรคปริทันต์[23]

เมื่อเกิดการอักเสบที่เรื้อรัง จะทำให้เกิดการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ ซึ่งเป็นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (Specific or adaptive immune system) มายังเนื้อเยื่อปริทันต์ มีการหลั่งสารสื่ออักเสบและโมเลกุลที่เกี่ยวข้อง ทำให้สูญเสียสมดุลในการสร้างและสลายกระดูกเบ้าฟัน เปลี่ยนจากโรคเหงือกอักเสบเป็นโรคปริทันต์อักเสบ การกระตุ้นของลิมโฟไซต์นี้จำเป็นต้องอาศัยสัญญาณ 2 ชนิด ได้แก่ สัญญาณจาก antigen receptor พร้อมกับสัญญาณจากแอนติเจนพรีเซนติ้งเซลล์ (Antigen presenting cells: APCs) การกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะนี้จะส่งผลอย่างมากต่อการสูญเสียกระดูกในโรคปริทันต์อักเสบ เนื่องจากบีเซลล์และทีเซลล์เป็นแหล่งสำคัญของ RANKL โดยเซลล์ทั้งสองชนิดจะมีการสร้าง RANKL ในรูปแบบที่ยึดกับผิวเซลล์ (Membrane-bound) และรูปแบบที่ละลายได้ (Soluble) RANKL เป็นไซโตไคน์ในกลุ่ม TNF family ซึ่งสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการสร้าง osteoclast และกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงเพื่อไปทำหน้าที่ของเซลล์ (Differentiation) นำไปสู่การเหนี่ยวนำให้เกิดการละลายของกระดูก ในบริเวณที่อยู่โดยรอบฟัน สมดุลในการสร้างและสลายของกระดูกจะถูกควบคุมโดยระบบ RANKL/OPG/RANK คือมี RANKL ทำหน้าที่กระตุ้นการทำงานของเซลล์สลายกระดูกและ

โมเลกุลที่ส่งสัญญาณในการละลายของกระดูก โดยทำงานร่วมกับตัวรับสัญญาณ RANK ซึ่งอยู่บนผิวของ osteoclast และต้นกำเนิดของเซลล์สร้างกระดูก (Osteoblast precursor) ในขณะที่ออสทีโอโปรเทเจริน (Osteoprotegerin: OPG) เป็นโปรตีนที่มีความสามารถในการขัดขวางการทำงานของ RANKL โดยการแย่งจับกับตัวรับสัญญาณ ในโรคปริทันต์อักเสบ การมีอัตราส่วนของ RANKL ต่อ OPG เพิ่มขึ้น จะช่วยเสริมให้เกิดการรวมตัวของต้นกำเนิดเซลล์สลายกระดูก (Osteoclast precursor) และถูกกระตุ้นต่อมาจนเกิดการละลายของกระดูก

ในอีกทางหนึ่ง Th1 ลิมโฟไซต์มีหน้าที่พื้นฐานในการเกิดและลุกลามของโรคปริทันต์อักเสบผ่านการเพิ่มระดับของ IFN-γ[23] การทดลองในหนูทดลองที่ไม่มี IFN-γ พบว่า มีไซโตไคน์ที่เหนี่ยวนำการอักเสบ, คีโมไคน์ และการรวมตัวของแมคโครฟาจบริเวณเนื้อเยื่อปริทันต์ในระดับต่ำ และมีลักษณะการทำลายของกระดูกเบ้าฟันที่น้อยกว่าหนูปกติ Th1 ลิมโฟไซต์ยังสามารถหลั่งไซโตไคน์ TNF-α และ IL-1β ได้ ซึ่งไซโตไคน์ทั้งสองชนิดนี้มีเป็นไซโตไคน์ที่จำเป็นต่อการอักเสบ ทำให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือด กระตุ้นเซลล์เนื้อเยื่อบุโพรงให้มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน เพิ่มการสร้างคีโมไคน์ในเซลล์ชนิดต่าง ๆ มีส่วนช่วยในการกระตุ้นนิวโทรฟิล และยังกระตุ้นการหลั่งและการทำงานของ MMP ได้ด้วย แสดงให้เห็นว่า ทั้ง TNF-α และ IL-1β ไม่ได้เกี่ยวข้องเพียงแค่การละลายของกระดูกโดยตรง แต่มีส่วนเกี่ยวข้องทางอ้อมด้วย การกระตุ้นให้เนื้อเยื่อปริทันต์มีการอักเสบต่อเนื่อง Th2 ลิมโฟไซต์ เป็นเซลล์หลักที่ผลิต IL-4 ซึ่งส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงการหลั่ง IgE ในบีเซลล์ และส่งเสริมการกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจผ่านกลไกที่ไม่พึ่งพา IFN-γ หน้าที่ของ Th2 ลิมโฟไซต์จึงเป็นการควบคุมการอักเสบในทางลบและการตอบสนองของ Th1 ลิมโฟไซต์ เพื่อที่การมีขั้วของการตอบสนองโดยเซลล์ชนิด Th2 ลิมโฟไซต์ในโรคปริทันต์อักเสบแสดงให้เห็นการตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะที่เสียหาย นอกจากนี้ Th17 ลิมโฟไซต์ ซึ่งได้มาจาก Th1 ลิมโฟไซต์ยังสามารถหลั่ง RANKL ออกมาได้ด้วย ทำให้เกิดการสลายกระดูกมากกว่าการสร้าง

บทบาทของทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา (Tumor necrosis factor alpha: TNF-α) ต่อโรคปริทันต์อักเสบ

ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา (Tumor necrosis factor alpha: TNF-α) หรือ cachectin เป็นหนึ่งในไซโตไคน์ที่ทำหน้าที่หลากหลาย ถูกสร้างขึ้นมาจากเซลล์ที่เกี่ยวข้องในระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ เซลล์โมโนไซต์ที่ถูกกระตุ้น (Activated monocytes) หรือ แมคโครฟาจ ซึ่งเป็นแหล่งผลิตหลัก เอ็นเคเซลล์ (Natural killer cells: NK-cells) ทีเซลล์ และนิวโทรฟิล[50] นอกจากนี้ยังสามารถพบได้ในเซลล์ที่ไม่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันได้อีกหลายชนิด เช่น เซลล์

ประสาท เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ เซลล์มะเร็ง เซลล์สร้างกระดูก เซลล์สร้างเส้นใย เป็นต้น[51, 52] TNF-α ถูกพบครั้งแรกในปี 1975[53] ในการศึกษาการตอบสนองของทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ต่อการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง และมีการศึกษาต่อเนื่องมาเรื่อย ๆ จนทราบว่า TNF-α เป็นไซโตไคน์ที่สามารถพบได้จากทุกส่วนของร่างกาย มีการทำหน้าที่ที่หลากหลาย ทั้งเป็นตัวกลางในการตอบสนองต่อการติดเชื้อแบคทีเรียของระบบภูมิคุ้มกันร่างกาย ทำให้เกิดการอักเสบเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง ภาวะช็อกจากการติดเชื้อ (Septic shock) โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (Rheumatoid arthritis) โรคเบาหวาน และโรคที่มีการอักเสบแบบเรื้อรัง เช่น โรคปริทันต์อักเสบ

TNF-α เป็นโปรตีนที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาจากทรานส์เมมเบรน พรีเคอร์เซอร์ ชนิดที่ 2 (Type II transmembrane precursor) ที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ เกิดเป็น Pro-TNF-α จากนั้น จะถูกตัดแต่งจนอยู่ในรูปที่ละลายได้ (soluble TNF) ซึ่งเป็นรูปแบบที่สามารถทำงานได้โดยการไปจับกับตัวรับแล้วผ่านเข้าเซลล์เป้าหมาย[54] ตัวรับของ TNF-α (TNF receptor: TNFR) มีอยู่ 2 ชนิด คือ ตัวรับ TNF ชนิดที่ 1 (TNF receptor type I: TNFRI) เป็นตัวรับที่พบได้ส่วนใหญ่ ทำหน้าที่เกี่ยวกับสิ่งเป็นพิษต่อเซลล์ การเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใย การสังเคราะห์ PGE2 รวมถึงการต้านไวรัส ส่วนตัวรับ TNF ชนิดที่ 2 (TNF receptor type II: TNFRII) มักพบอยู่บนเซลล์ของระบบเลือด

ในโรคปริทันต์อักเสบ จะพบการเพิ่มขึ้นของ TNF-α โดยการสร้างของเซลล์แมคโครฟาจที่รวมตัวกันในบริเวณที่ติดเชื้อของเนื้อเยื่อปริทันต์ รวมทั้งจาก fibroblast ในบริเวณนั้นด้วย อีกทั้ง TNF-α เองยังเหนี่ยวนำให้มีการสร้างตัวเองเพิ่มขึ้นด้วย TNF-α จะกระตุ้นกลไก NF-kB ส่งผลให้เกิดการเหนี่ยวนำการสร้าง COX-2 และ PGE2 ผ่านกลไกไทโรซีน ไคเนส (Tyrosine kinase pathway) การมี TNF-α เป็นเวลานานและความเข้มข้นที่มากขึ้น ทำให้มีการค้างอยู่ของเอนไซม์ COX-2 ภายในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือก ซึ่งอาจเป็นปัจจัยหนึ่งของการเกิดโรคเหงือกอักเสบรวมถึงโรคปริทันต์อักเสบได้ มีการศึกษาพบว่า TNF-α มีผลต่อกระบวนการสร้างและละลายของกระดูกในทางอ้อม ผ่านการเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของ RANK จากต้นกำเนิดของเซลล์สลายกระดูก และ RANKL จากเซลล์สร้างกระดูก นำไปสู่กระบวนการสร้างเซลล์สลายกระดูก นอกจากนี้ ยังพบว่า TNF-α สามารถขัดขวางการพัฒนาของเซลล์สร้างกระดูกในระยะต่าง ๆ ได้อีกด้วย TNF-α สามารถยับยั้งอินซูลินไลค์โกรทแฟคเตอร์ 1 (Insulin-like growth factor-1: IGF-1) ในการเปลี่ยนแปลงไปเป็น osteoblast precursor ยับยั้งการถอดรหัสของ runt-related transcription factor 2 (RUNX2) ซึ่งเป็นทรานสคริปชันแฟกเตอร์หลักของการพัฒนาเซลล์สร้างกระดูก และ TNF-α ยังมีผลต่อการลดการแสดงออกของออซทีริกซ์ (Osterix: OSX) ในการส่ง

สัญญาณผ่านกลไก MAPK จนนำไปสู่การเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์สร้างกระดูกแบบ apoptosis

ข้อมูลจากการศึกษาเกี่ยวกับ TNF-α ที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่า TNF-α มีอิทธิพลให้เกิดการทำลายกระดูก ผ่านการเพิ่มการทำงานของ osteoclast และลดการทำงานของ osteoblast จึงมีผลต่อกระบวนการเกิดโรคปริทันต์อักเสบ

บทบาทของอินเตอร์ลิวคิน-1 เบตา (Interleukin-1 beta: IL-1β) ต่อโรคปริทันต์อักเสบ

อินเตอร์ลิวคิน-1 เบตา (Interleukin-1β: IL-1β) เป็นไซโตไคน์ที่อยู่ในกลุ่ม interleukin-1 superfamily ซึ่งมีหลายชนิด เช่น IL-1α IL-1β และอินเตอร์ลิวคิน-1 รีเซพเตอร์แอนตาโกนิสต์ (Interleukin-1 receptor antagonist: IL-1RA) เป็นต้น ส่วนใหญ่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องการการอักเสบ โดยการกระตุ้นให้มีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้อง ตลอดจนการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น เอนไซม์ COX-2 iNOS และฟอสโฟลิเพส เอ ประเภทที่ 2 (Phospholipase A type 2)[55, 56] เป็นต้น IL-1β ถูกสร้างจากเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ เซลล์โมโนไซต์ที่ถูกกระตุ้น หรือ แมคโครฟาจ และเซลล์เดนไดรติก (Dendritic cell) และยังสามารถสร้างได้จากเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก เซลล์เอ็นยึดปริทันต์ (Periodontal ligament cells) osteoblast และเซลล์เคราติโนไซต์[56] เป็นต้น

เริ่มแรก IL-1β จะถูกสร้างมาในรูปแบบที่ยังไม่พร้อมทำงาน (Pro- IL-β) เมื่อถูกกระตุ้นจากเชื้อโรค เช่น จาก LPS ของเชื้อแบคทีเรีย จากนั้นจะมีการตัดแต่งโปรตีนจนอยู่ในรูปที่พร้อมทำงาน (Mature IL-1β) เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นจากการตอบสนองต่อ LPS ของเชื้อ *A.a.* ในคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือก จะพบว่ามีการกระตุ้นของเอนไซม์แคสเปส 1 (Caspase-1) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เปลี่ยนให้ IL-1β พร้อมทำงาน จึงมีการทำงานของ IL-1β เพิ่มมากขึ้นได้

ในโรคปริทันต์อักเสบ พบว่า IL-1β มีผลทำให้เกิดการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของเอนไซม์ย่อยคอลลาเจนหลายชนิด เช่น MMP-9, MMP-1 และ MMP-3 โดยตัวที่สำคัญ คือ MMP-9 ซึ่งเป็นตัวที่บ่งชี้ว่าเกิดความรุนแรง และมีการดำเนินโรคปริทันต์อักเสบ นอกจากนี้ IL-1β ยังเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้าง osteoclast โดยเพิ่มการแสดงออกของ RANKL ทำให้สามารถจับกับ RANK ได้มากขึ้น จึงเกิดการเปลี่ยนแปลงเพื่อไปทำหน้าที่ต่าง ๆ และการทำงานของ osteoclast ที่เพิ่มมากขึ้น[25, 57-59] จะเห็นได้ว่า IL-1β ส่งผลให้เกิดการละลายของกระดูกเบ้าฟันและมีการอักเสบของเนื้อเยื่อโดยรอบ ซึ่งเป็นลักษณะการเกิดและดำเนินโรคของโรคปริทันต์อักเสบ

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยมีวิธีการดำเนินงานเพื่อเก็บรวบรวมข้อมูลตามขั้นตอนดังนี้

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

การกำหนดประชากรและการสุ่มกลุ่มตัวอย่าง

ประชากร

กลุ่มประชากรที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นเซลล์ไลน์แมคโครฟาจ ชนิด RAW 264.7 ซึ่งได้รับมาจาก American Type Culture Collection (ATCC) ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็ม (Dulbecco's Modified Eagle Medium: DMEM, Gibco, Grand Island, NY, USA) ที่ผสมด้วยซีรัมของตัวอ่อนวัว (Fetal bovine serum: FBS) ความเข้มข้นร้อยละ 10 และทำการ subculture ทุก 2-3 วัน เริ่มการทดลองในสัปดาห์ที่ 2 หลังจากละลายเซลล์จากการแช่แข็ง ในขั้นตอนการกระตุ้นเซลล์ด้วย LPS และสารสกัดใบจักรนารายณ์ จะทำการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่ผสมด้วย FBS ความเข้มข้นร้อยละ 5 เพื่อให้เซลล์มีการตอบสนองต่อสารที่ใช้กระตุ้นชัดเจนมากขึ้น

การเลือกกลุ่มตัวอย่าง

ทำการสุ่มตัวอย่างจากเซลล์ที่เก็บรักษาไว้โดยการแช่แข็ง นำมาแบ่งกลุ่มเพื่อศึกษาผลในการต้านการอักเสบของสารสกัดใบจักรนารายณ์ ดังนี้

กลุ่มควบคุม คือ เซลล์แมคโครฟาจที่ไม่ได้รับการกระตุ้นจากทั้ง LPS ของเชื้อก่อโรคปริทันต์และสารสกัดใบจักรนารายณ์

กลุ่มทดลอง คือ เซลล์แมคโครฟาจที่กระตุ้นด้วย LPS ของเชื้อก่อโรคปริทันต์ และเซลล์แมคโครฟาจที่กระตุ้นด้วย LPS ของเชื้อก่อโรคปริทันต์ร่วมกับสารสกัดใบจักรนารายณ์

การสร้างเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

การเตรียมสารสกัดใบจักรนารายณ์

ใบจักรนารายณ์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ทำการซื้อจากแหล่งเพาะปลูกในกรุงเทพมหานคร และได้รับความอนุเคราะห์จากทีมวิจัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิตในการสกัด โดยมีการเตรียมและการสกัดดังต่อไปนี้

การเตรียมก่อนทำการสกัด

1. ล้างทำความสะอาดใบจักรนารายณ์ด้วยน้ำสะอาดเพื่อขจัดสิ่งปะปน และตากให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

2. นำใบจักรนารายณ์ที่แห้งแล้วไปอบในตู้อบลมร้อน (Hot air oven, Memmert UM 400, Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Germany) เป็นเวลาประมาณ 3 วันในอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสจนใบมีลักษณะแห้งกรอบ

3. ทำการบดใบจักรนารายณ์ที่กรอบแล้วให้เป็นผงโดยใช้เครื่องปั่น

4. นำใบจักรนารายณ์ในรูปแบบผงที่ได้ไปสกัดด้วยวิธีแช่หมัก (Maceration)

ภาพประกอบ 7 ใบจักรนารายณ์ที่ได้รับการอบแห้ง (ซ้าย) และบดเป็นผง (ขวา)

การสกัดใบจักรนารายณ์ด้วยวิธีแช่หมักโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย[8]

1. นำผงใบจักรนารายณ์ที่เตรียมไว้มาสกัดใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย (Aqueous extraction) ตามอัตราส่วนผงใบจักรนารายณ์ 200 กรัมต่อน้ำ 1.5 ลิตร ด้วยวิธีการแช่หมักในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath, Eyela OSB-2000, Tokyo Rikakikai Co. Ltd, Tokyo, Japan) เป็นเวลา 3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

2. คนสารละลายทุก 20 นาที จนครบเวลา

3. กรองสารละลายที่ได้ผ่านผ้าขาวบาง 4 ชั้น และผ่านกระดาษกรอง Whatman no. 1 ด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ (Vacuum filter) จนได้สารสกัดหยาบ (Crude extract) ของใบจักรนารายณ์

ภาพประกอบ 8 การสกัดใบจักรนารายณ์ด้วยวิธีแช่หมักโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย (ซ้าย) และสารสกัดใบจักรนารายณ์ (ขวา)

การเก็บรักษาสารสกัดใบจักรนารายณ์

นำสารสกัดหยาบใบจักรนารายณ์ที่ได้ไปเข้าเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dryer, Faithful FSF-12N, Hebei, China) เพื่อกำจัดตัวทำละลายและเหลือเพียงสารสกัดหยาบใบจักรนารายณ์ที่เข้มข้นขึ้น เก็บในรูปแบบผงในโถที่บรรจุสารดูดความชื้นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ภาพประกอบ 9 การเก็บรักษาสารสกัดใบจักรนารายณ์

การเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7

นำเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ได้มาจาก ATCC เพาะเลี้ยงในอาหารประเภท DMEM ที่ผสมด้วยซีรัมจากตัวอ่อนวัว (Fetal bovine serum) ความเข้มข้นร้อยละ 10 และยาปฏิชีวนะ (Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL), Gibco, Grand Island, NY, USA) ความเข้มข้นร้อยละ 1 ทำการเลี้ยงในตู้บ่ม (CO_2 incubator) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 การแยกเซลล์จากจานเพาะเลี้ยงเดิมและขยายจำนวนไปยังจานเพาะเลี้ยงใหม่ (Subcultured) จะทำเมื่อเซลล์มีความหนาแน่นประมาณร้อยละ 80 ของพื้นที่จานเพาะเลี้ยงเซลล์ (80% confluent) หรือทุก 3 วัน

การเก็บรักษาเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 โดยการแช่แข็งเซลล์

การเก็บรักษาเซลล์โดยวิธีการแช่แข็ง (Cryopreservation) มีขั้นตอน ดังนี้

1. ทำการเก็บเซลล์ที่เลี้ยงจนเต็มจานเพาะขนาด 10 เซนติเมตร ใส่หลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีในเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

2. ทิ้งอาหารเลี้ยงเซลล์ส่วนบนออกทั้งหมดโดยปิเปตต์ ให้เหลือไว้เฉพาะเซลล์ก้นหลอดทดลอง

3. เติมอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์แช่แข็ง (Bambanker™, GC LYMPHOTEC Inc., Tokyo, Japan) 1 มิลลิลิตร ใช้ปิเปตต์ดูดขึ้นลงเบา ๆ เพื่อให้เซลล์แตกตัวออกจากกัน จากนั้นดูดสารผสมที่ได้ไปใส่ในหลอดแช่แข็ง (Cryovial tube) ขนาด 2 มิลลิลิตร

4. เก็บรักษาเซลล์ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาทดลอง

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดใบจักรนารายณ์ต่อเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7

การทดสอบเพื่อศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดใบจักรนารายณ์ มีวัตถุประสงค์เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดใบจักรนารายณ์ที่สามารถใช้ได้โดยไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ในการศึกษานี้ทำการทดสอบโดยใช้ Cell Counting Kit 8 (WST-8, Abcam, Cambridge, UK) ซึ่งเป็นชุดทดสอบที่สามารถตรวจความเป็นพิษต่อเซลล์โดยการวัดปริมาณของเซลล์ที่ยังคงมีชีวิตภายหลังการได้รับสารสกัดใบจักรนารายณ์ เซลล์ที่มีชีวิตจะเปลี่ยนสารละลายเกลือเตตระโซเลียม (Water soluble tetrazolium salt: WST-8) ในชุดทดสอบให้เป็นผลึกฟอร์มาซานสีส้ม (Orange formazan) วัดปริมาณของเซลล์ที่มีชีวิตโดยการอ่านค่าดูดกลืนแสง การทดสอบโดยใช้ Cell Counting Kit 8 มีขั้นตอน[60] ดังนี้

1. นำเซลล์แมคโครฟาจที่จะทดสอบ ใส่ในไมโครเพลทจำนวน $5x10^4$ เซลล์ต่อหลุม เติมสารสกัดใบจักรนารายณ์ที่ความเข้มข้น 1,000 500 250 100 50 25 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรใส่ในไมโครเพลต ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม โดยมีกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่สารสกัดใบจักรนารายณ์ ทำซ้ำกลุ่มละ 3 หลุม

2. บ่มเซลล์ในตู้บ่ม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3. เติมสารละลายสำหรับย้อม WST-8 ปริมาตร 10 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลุม จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ต่ออีกเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในที่ปราศจากแสง

4. นำไมโครเพลทไปเข้าเครื่องไมโครเพลท รีดเดอร์ (Microplate reader, MULTISKAN sky, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) เพื่อวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร

5. ทดสอบซ้ำ 2 ครั้ง (Duplicate) เพื่อยืนยันผลความมีพิษของสารสกัดใบจักรนารายณ์ต่อเซลล์แมคโครฟาจ

การศึกษาฤทธิ์การต้านอักเสบของสารสกัดใบจักรนารายณ์ต่อเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS **ของ** *A. actinomycetemcomitans*

1. นำเซลล์แมคโครฟาจมาเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 6 หลุม (6-well plate) ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ผสม FBS ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยมีปริมาณเซลล์ 1.2 x 10^6 เซลล์ต่อหลุม นำไปนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและมีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 คืน

2. กลุ่มควบคุม ทำการเลี้ยงเซลล์ต่อเนื่องโดยบ่มในตู้บ่ม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและมีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ไม่มีการใส่สารใดเพื่อกระตุ้นเซลล์

3. กลุ่มทดลอง กลุ่มแรก ใส่สารสกัดใบจักรนารายณ์ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กลุ่มที่สอง ทำการกระตุ้นให้เซลล์มีการอักเสบโดยใส่ LPS ของเชื้อ *A.a.* (lyophilized cells of *A.a.*, Division of Periodontology, Kyushu Dental university) ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และกลุ่มที่สาม ทำการกระตุ้นเซลล์ให้เกิดการอักเสบโดยใส่ LPS ของเชื้อ *A.a.* ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ร่วมกับใส่สารสกัดใบจักรนารายณ์ที่ความเข้มข้น 25 - 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้น นำไปบ่มในตู้บ่ม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและมีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

3. ทำการเก็บเซลล์และนำเซลล์เข้าสู่กระบวนการสกัดสารพันธุกรรม เพื่อศึกษาผลการแสดงออกของ TNF-α และ IL-1β ในระดับ mRNA ต่อไป

การศึกษาผลของสารสกัดใบจักรนารายณ์ต่อการแสดงออกของยีน TNF-α **และ** IL-1β

ขั้นตอนการสกัดอาร์เอ็นเอ (Total RNA) **จากเซลล์**

หลังจากทำการกระตุ้นเซลล์ ครบเวลา 3 ชั่วโมงแล้ว ทำการเก็บเซลล์มาสกัด RNA โดยใช้ชุดสกัด RNeasy mini kit (Qiagen Inc., Maryland, USA) โดยมีขั้นตอน[61] ดังนี้

1. การเก็บเซลล์ ทำให้เซลล์หลุดจากจานเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยที่ขูดเซลล์ จากนั้น ดูดเซลล์และอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากจานเพาะเลี้ยงไปใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออกจนหมด เหลือเพียงตะกอนเซลล์

2. ขั้นตอนการทำให้เซลล์แตกตัว โดยเติมบัฟเฟอร์ RLT ปริมาตร 500 ไมโครลิตรในหลอดปั่นเหวี่ยงที่มีตะกอนเซลล์ จากนั้น ทำให้ผสมเข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer) หรือใช้ปิเปตต์ดูดขึ้นลงเบา ๆ จนผสมกัน แล้วจึงเติมเอทานอลร้อยละ

70 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที จากนั้น ย้ายเซลล์ที่ถูกทำลายแล้ว ปริมาตร 700 ไมโครลิตรไปยัง RNeasy spin column ที่ใส่อยู่กับหลอดเก็บตัวอย่าง (Collection tube) ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 วินาที ทิ้งของเหลวที่อยู่ในหลอดเก็บตัวอย่าง

3. ทำการเติมบัฟเฟอร์ RW1 700 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 วินาที ทิ้งของเหลวที่อยู่ในหลอดเก็บตัวอย่าง

4. ทำการเติมบัฟเฟอร์ RPE 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 วินาที ทิ้งของเหลวที่อยู่ในหลอดเก็บตัวอย่าง จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ RPE 500 ไมโครลิตรอีกครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 นาที ทิ้งของเหลวที่อยู่ในหลอดเก็บตัวอย่าง

5. ทำให้ RNeasy spin column แห้ง โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที จากนั้น ทิ้งหลอดเก็บตัวอย่างเดิม แล้วนำ RNeasy spin column มาใส่ในหลอดเก็บตัวอย่างหลอดใหม่ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

6. ทำการเติมน้ำที่ปราศจากเอนไซม์ RNase ปริมาตร 40 ไมโครลิตรไปตรงกลางของคอลัมน์ รออย่างน้อย 1 นาทีเพื่อให้น้ำที่ปราศจาก RNase ถูกดูดซึม จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 g เป็นเวลา 1 นาที เพื่อแยก RNA ที่บริสุทธิ์ออกมา

7. วัดปริมาณ RNA ที่ได้

ขั้นตอนการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอต้นแบบ (Complementary DNA: cDNA)

การนำ RNA ที่ได้ไปศึกษาการแสดงออกของ TNF-α และ IL-1β ด้วยวิธี PCR จำเป็นที่จะต้องมีการเปลี่ยน RNA ให้เป็น cDNA ก่อน ในการศึกษานี้ ทำการสังเคราะห์ cDNA โดยใช้ Revertra ACE^{TM} qPCR RT Master Mix kit (Toyobo Co.Ltd., Osaka, Japan) ซึ่งมีขั้นตอนการเตรียม[62] ดังนี้

1. ทำการเตรียมสารละลายโดยใช้ RNA 1 ไมโครกรัม, 5x RT Master Mix 2 ไมโครลิตร และเติมน้ำที่ปราศจากเอนไซม์ RNase จนได้ปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองขนาด 0.5 มิลลิลิตร ผสมสารให้เข้ากัน

2. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ตามด้วยอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที และอุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

3. นำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 หรือ -20 องศาเซลเซียส

ขั้นตอนการทำ Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)

ทำการเตรียมไพรเมอร์ในการตรวจการแสดงออกของ mRNA ของ TNF-α, IL-1β, และ Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase (GAPDH) มีลำดับเบสดังแสดงในตาราง 1

ตาราง 1 ไพรเมอร์สำหรับตรวจการแสดงออกของ TNF-α, IL-1β, และ GAPDH

ยีน	ลำดับเบส	ขนาด (base pairs)
1. TNF-α[63]	Forward primer 5' CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA 3' Reverse primer 5' TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC 3'	175
2. IL-1β[64]	Forward primer 5' AAGCTCTCCACCTCAATGGACAG 3' Reverse primer 5' CTCAAACTCCACTTTGCTCTTGA 3'	260
3. GAPDH[65]	Forward primer 5' GAGAAACCTGCCAAGTATGATGAC 3' Reverse primer 5' TAGCCGTATTCATTGTCATACCAG 3'	212

ใช้ cDNA ที่เตรียมไว้มาเป็นสายต้นแบบสำหรับการทำ PCR เพื่อวิเคราะห์การแสดงออกของ mRNA ของยีน TNF-α, IL-1β และใช้ GAPDH เป็นยีนกลุ่มควบเจ้าบ้าน (Housekeeping gene) เทคนิค RT-qPCR ทำโดยใช้เครื่อง Real-Time PCR รุ่น ไลท์ไซเคลอร์ 480 (LightCycler 480®) ร่วมกับน้ำยาทดสอบสำเร็จรูป (LightCycler 480 SYBR Green I Master, Roche Applied Science, Rotkreuz, Switzerland) ซึ่งประกอบด้วย Taq DNA polymerase และสีย้อม SYBR green ที่เป็นสีย้อมฟลูออเรสเซนต์ ทำการทดสอบในถาดพลาสติกหลุมขนาด 96 หลุม (LightCycler 480 Multiwell plate 96)

การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนโดยวิธี RT-qPCR นี้ จะใช้สารละลายปริมาตร 10 ไมโครลิตร ซึ่งเตรียมจากการผสมน้ำยาทดสอบสำเร็จรูป น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ และรีเวิร์สไพรเมอร์ รวม 8 ไมโครลิตร และ cDNA 2 ไมโครลิตร ทำการ Pre-incubation

ที่ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาทีก่อนเริ่มปฏิกิริยา เริ่มปฏิกิริยาโดย denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที อุณหภูมิ annealing 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที และอุณหภูมิ extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที จำนวน 40 รอบ และ cooling 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที วิเคราะห์ผลที่ได้ด้วยโปรแกรมของบริษัท (LightCycler 480®)

การเก็บรวบรวมข้อมูล

Cell Counting Kit-8 assay

คำนวณร้อยละความมีชีวิตของเซลล์จากค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้ ด้วยสมการ

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{\text{mean } (OD_{sam}) \times 100}{\text{mean } (OD_{ct})}$$

OD_{sam} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มทดลอง

OD_{ct} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม

Reverse Transcription Quantitative PCR

หาปริมาณสัมพัทธ์ (Relative quantification) ของปริมาณ mRNA ของยีน TNF-α และ IL-1β โดยใช้ค่า Cycle threshold (CT) ซึ่งเป็นจำนวนของรอบของปฏิกิริยาที่ทำให้ปริมาณแสงฟลูออเรสเซนส์สูงกว่า baseline threshold ของยีนกลุ่มควบคุมภายใน ได้แก่ GAPDH เป็นค่าอ้างอิง คำนวณจำนวนเท่า (Fold change) ของการแสดงออกของยีนโดยใช้โปรแกรม LightCycler® 480 SW 1.5 จากสมการต่อไปนี้

จำนวนเท่าการแสดงออกของยีน = $2^{-\Delta\Delta CT}$

การจัดกระทำข้อมูลและการวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์สถิติทั้งหมดจัดทำโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS statistics version 28.0.0 (IBM) วิเคราะห์ข้อมูลความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองด้วยสถิติ *t*-test และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างข้อมูลหลายกลุ่มด้วย one-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P-value < 0.5)

บทที่ 4
ผลการดำเนินงานวิจัย

การศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์การต้านการอักเสบของสารสกัดใบจักรนารายณ์ในเซลล์แมคโครฟาจของหนูเมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS ของเชื้อ *A. actinomycetemcomitans* โดยวิเคราะห์จากการแสดงออกของ TNF-α และ IL-1β ในระดับ mRNA รวมทั้งตรวจสอบความเป็นพิษของสารสกัดใบจักรนารายณ์ต่อเซลล์แมคโครฟาจของหนู ตามการดำเนินวิจัยที่กำหนดไว้ จากนั้นดำเนินการเก็บข้อมูลและวิเคราะห์ตามวัตถุประสงค์งานวิจัย ดังต่อไปนี้

1. ผลของการตรวจสอบความเป็นพิษของสารสกัดใบจักนารายณ์ต่อเซลล์แมคโครฟาจ

2. ผลของสารสกัดใบจักรนารายณ์ต่อการแสดงออกของ TNF-α และ IL-1β ในเซลล์แมคโครฟาจ

3. ผลในการต้านการอักเสบของสารสกัดใบจักรนารายณ์ จากการวิเคราะห์การแสดงออกของ TNF-α และ IL-1β ในระดับ mRNA ของเซลล์แมคโครฟาจที่ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS

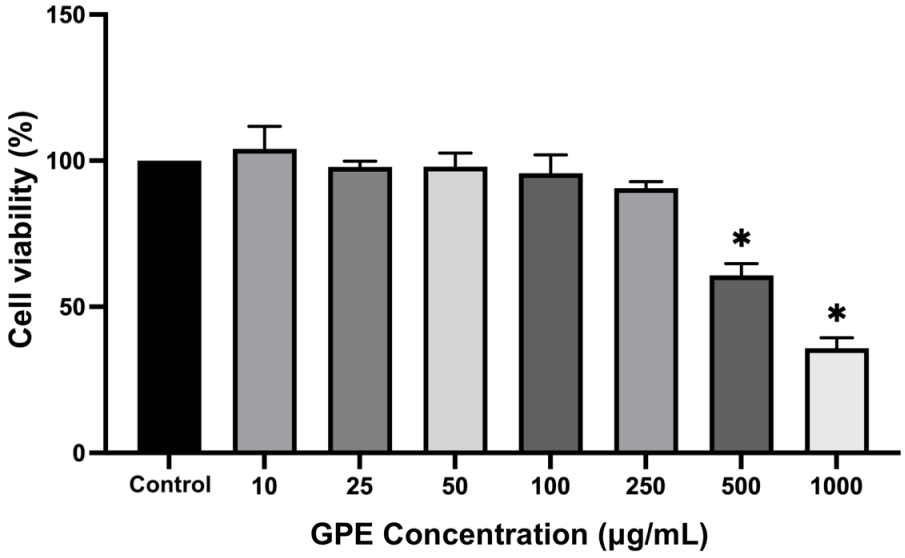
ผลของการตรวจสอบความเป็นพิษของสารสกัดใบจักนารายณ์ต่อเซลล์แมคโครฟาจหนู

ในการศึกษานี้ ทำการตรวจสอบความเป็นพิษของสารสกัดใบจักรนารายณ์ต่อเซลล์แมคโครฟาจด้วยชุดทดสอบ CCK-8 วัดปริมาณของเซลล์ที่มีชีวิตโดยการอ่านค่าดูดกลืนแสง นำค่าดูดกลืนแสงของเซลล์แมคโครฟาจเมื่อได้รับสารสกัดใบจักรนารายณ์ความเข้มข้นต่าง ๆ มาเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุมเพื่อคำนวณร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ ซึ่งกลุ่มควบคุมคือเซลล์แมคโครฟาจปกติที่ไม่ได้รับสารกระตุ้นใด ๆ ซึ่งถูกกำหนดให้มีร้อยละความมีชีวิตของเซลล์เป็นร้อยละ 100 ดังแสดงผลในตารางที่ 2

เมื่อทำการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างร้อยละความมีชีวิตของเซลล์แมคโครฟาจกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบจักรนารายณ์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (ภาพประกอบที่ 10) พบว่า กลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบจักรนารายณ์ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 10-250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงผลร้อยละความมีชีวิตของเซลล์มากกว่าร้อยละ 90 ในขณะที่เซลล์กลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบจักรนารายณ์ความเข้มข้น 500 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงผลร้อยละความมีชีวิตของเซลล์เป็นร้อยละ 60.78$\pm$3.98 และ 35.86$\pm$3.59 ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (P-value<0.01)

ตาราง 2 ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์แมคโครฟาจเมื่อได้รับสารสกัดใบจักรนารายณ์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความมีชีวิตของเซลล์	**ความเข้มข้นของสารสกัดใบจักรนารายณ์** (µg/mL)							
	0	10	25	50	100	250	500	1,000
ค่าเฉลี่ย (ร้อยละ)	100	104.09	97.87	97.92	95.69	90.58	60.78	35.86
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0	7.65	2.01	4.67	6.34	2.26	3.98	3.59

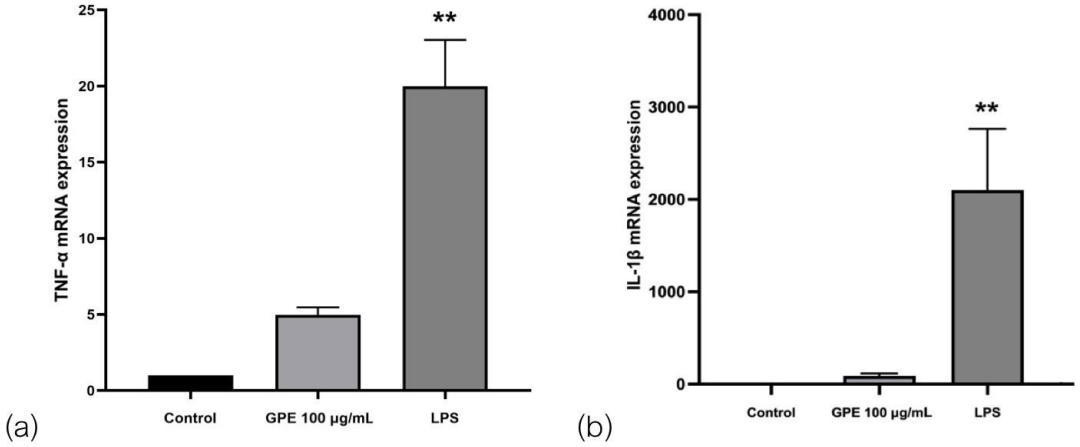


ภาพประกอบ 10 แสดงร้อยละความมีชีวิตของเซลล์แมคโครฟาจหนู (RAW 264.7) เมื่อได้รับสารสกัดใบจักรนารายณ์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เปรียบเทียบข้อมูลด้วยสถิติ independent *t*-test; $^{*}P<0.01$

ผลของสารสกัดใบจักรนารายณ์ต่อการแสดงออกของ TNF-α และ IL-1β เซลล์แมคโครฟาจ

เมื่อศึกษาผลของสารสกัดใบจักรนารายณ์ต่อการแสดงออกของ TNF-α และ IL-1β ของเซลล์แมคโครฟาจด้วยวิธี RT-qPCR พบว่า สารสกัดใบจักรนารายณ์ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่งผลให้ TNF-α และ IL-1β ในระดับ mRNA มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นจาก

กลุ่มควบคุมเล็กน้อยแต่ไม่พบนัยสำคัญทางสถิติ แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับ LPS ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งแสดงให้เห็นการแสดงออกของ TNF-α และ IL-1β ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (P-value<0.01)



ภาพประกอบ 11 แสดงผลของสารสกัดใบจักรนารายณ์ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการแสดงออกของเซลล์แมคโครฟาจเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ LPS โดยใช้สถิติ one-way ANOVA (** *P*<0.01)

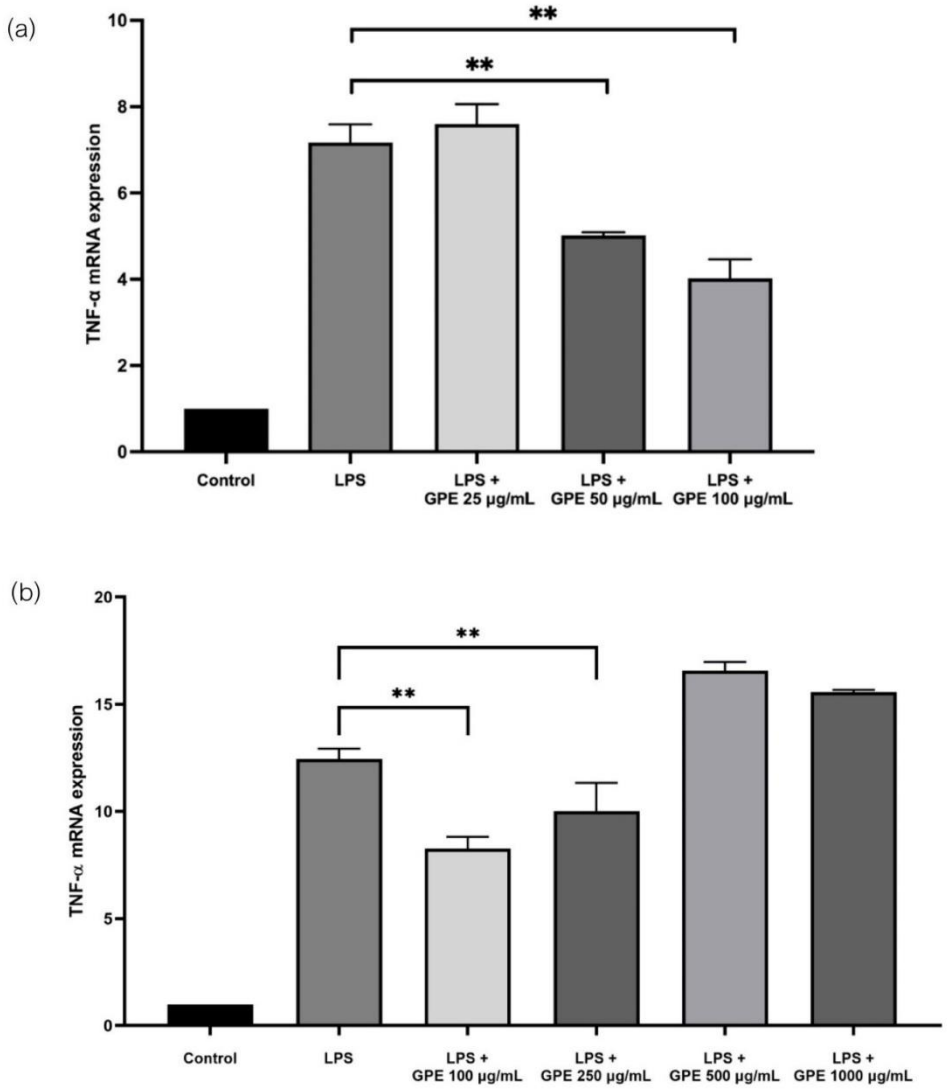
(a) การแสดงออกของ TNF-α mRNA

(b) การแสดงออกของ IL-1β mRNA

ผลในการต้านการอักเสบของสารสกัดใบจักรนารายณ์

การศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งการอักเสบของสารสกัดใบจักรนารายณ์ ทำโดยศึกษาระดับการแสดงออกของ TNF-α และ IL-1β ในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นการอักเสบด้วย LPS และวิเคราะห์ผลด้วยวิธี RT-qPCR พบว่า เซลล์แมคโครฟาจซึ่งกระตุ้นด้วย LPS ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีการแสดงออกของ TNF-α mRNA ในระดับที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (P-value<0.01) และเมื่อให้สารสกัดใบจักรนารายณ์ร่วมกับการกระตุ้นด้วย LPS พบว่า สารสกัดใบจักรนารายณ์สามารถลดการแสดงออกของ TNF-α อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติได้ตั้งแต่ความเข้มข้น 50-250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตาม ในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบจักรนารายณ์ที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรขึ้นไป เซลล์แมคโครฟาจกลับมีการ

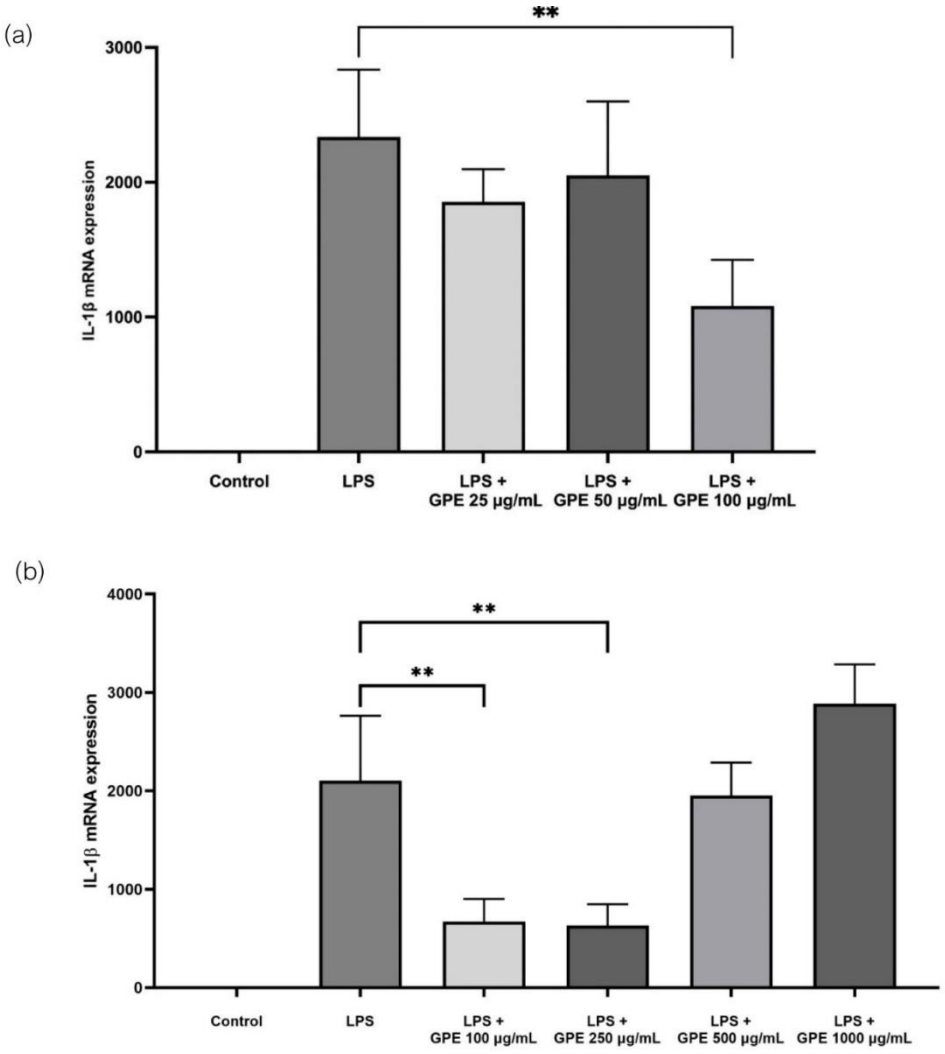
แสดงออกของ TNF-α เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS เพียงอย่างเดียว (P-value<0.01) ดังแสดงในภาพประกอบที่ 12



ภาพประกอบ 12 แสดงผลของสารสกัดใบจักรนารายณ์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการแสดงออกของ TNF-α ในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS เพียงอย่างเดียวด้วยสถิติ one-way ANOVA และ multiple comparison; ** *P*<0.01

ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของ IL-1β mRNA (ภาพประกอบที่ 13) พบว่า การแสดงออกของ IL-1β มีรูปแบบเช่นเดียวกับการแสดงออกของ TNF-α โดยเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะทำให้ mRNA ของ IL-1β มีการ

แสดงออกเพิ่มขึ้นจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (P-value<0.01) ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบจักรนารายณ์ 25 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้ mRNA ของ IL-1β มีการแสดงออกที่ลดลงจากกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS เพียงอย่างเดียวเล็กน้อยแต่ไม่มีนัยสำคัญ และลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้น 100 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้นจนมากกว่าหรือเท่ากับ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า เซลล์แมคโครฟาจมีการแสดงออกของ IL-1β เพิ่มขึ้นในระดับใกล้เคียงหรือสูงกว่ากลุ่มที่กระตุ้นด้วย LPS เล็กน้อยแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ



ภาพประกอบ 13 แสดงผลของสารสกัดใบจักรนารายณ์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการแสดงออกของ IL-1β ในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS เพียงอย่างเดียวด้วยสถิติ one-way ANOVA และ multiple comparison; ** *P*<0.01

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

ในการวิจัยเรื่องผลของฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดใบจักรนารายณ์ต่อเซลล์แมคโครฟาจที่กระตุ้นด้วย LPS ของเชื้อ *A. actinomycetemcomitans* ผู้วิจัยได้ทำการจำลองสภาวะการอักเสบจากเชื้อก่อโรคปริทันต์ในเซลล์แมคโครฟาจ จากนั้น ทำการตรวจสอบผลของสารสกัดใบจักรนารายณ์ต่อการเซลล์แมคโครฟาจนั้น และวิเคราะห์การตอบสนองโดยการแสดงออกของระดับ TNF-α และ IL-1β หลังจากดำเนินการเรียบร้อยแล้ว สามารถสรุปผลได้ตามหัวข้อดังต่อไปนี้

1. สรุปผลการวิจัย
2. อภิปรายผลการวิจัย
3. ข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

สารสกัดใบจักรนารายณ์ซึ่งได้จากการสกัดด้วยวิธีแช่หมักโดยมีน้ำเป็นตัวทำละลายนั้น เมื่อทดสอบพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ พบว่า สารสกัดใบจักรนารายณ์ความเข้มข้นระหว่าง 10-250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงผลร้อยละความมีชีวิตของเซลล์แมคโครฟาจมากกว่าร้อยละ 90 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับสารสกัดใบจักรนารายณ์ อย่างไรก็ตาม ในสารสกัดใบจักรนารายณ์ที่มีความเข้มข้นมากกว่า 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรขึ้นไป พบว่า แมคโครฟาจมีร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งแสดงถึงความเป็นพิษ หรือมีผลที่รบกวนการเจริญเติบโตของเซลล์ให้ผิดไปจากปกติ จึงกล่าวได้ว่า ความเข้มข้นของสารสกัดที่เหมาะสมต่อเซลล์แมคโครฟาจ คือ 10 - 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับการศึกษาในครั้งนี้

เมื่อวิเคราะห์ผลของสารสกัดใบจักรนารายณ์ในการแสดงออกของยีน TNF-α และ IL-1β ในระดับ mRNA พบว่า สารสกัดใบจักรนารายณ์ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่งผลให้เซลล์มีระดับการแสดงออกของยีนทั้งสองชนิดเพิ่มขึ้นจากกลุ่มควบคุมเล็กน้อยอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่กลุ่มเซลล์แมคโครฟาจที่กระตุ้นด้วย LPS ของเชื้อ *A.a.* ซึ่งเป็นปัจจัยก่อโรคสำคัญ สามารถกระตุ้นการหลั่งไซโตไคน์ที่ทำหน้าที่เสริมการอักเสบ เป็นผลให้มีการแสดงออกของ TNF-α และ IL-1β เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้สารสกัดใบจักรนารายณ์

เมื่อวิเคราะห์ผลของสารสกัดใบจักรนารายณ์ต่อเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย LPS ของเชื้อ *A.a.* พบว่า สารสกัดใบจักรนารายณ์ที่ความเข้มข้นระหว่าง 50-250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่งผลให้มีการแสดงออกของ TNF-α ในระดับ mRNA ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และสารสกัดใบจักรนารายณ์ที่ความเข้มข้น 100 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่งผลให้มีการแสดงออกของ IL-1β ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่กระตุ้นด้วย LPS เพียงอย่างเดียว

สรุปได้ว่า สารสกัดใบจักรนารายณ์ที่ความเข้มข้น 100 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลในการต้านการอักเสบของเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ของเชื้อ *A. a.* ได้เหมาะสมที่สุด โดยสามารถลดระดับการแสดงออกของ TNF-α และ IL-1β ในระดับ mRNA ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และไม่เป็นพิษต่อเซลล์

อภิปรายผลการวิจัย

จักรนารายณ์เป็นสมุนไพรที่พบได้มาก โดยเฉพาะในประเทศไทย มาเลเซีย อินโดนีเซีย และจีน ในตำรับยาพื้นบ้านมักใช้ใบของจักรนารายณ์ในการรักษาต่าง ๆ เช่น ใช้เป็นยาทาภายนอกเพื่อบรรเทาการอักเสบ ใช้เป็นยารับประทานสำหรับลดความดันโลหิต หรือลดน้ำตาลในเลือด นอกจากถูกใช้ในทางการแพทย์พื้นบ้านมายาวนานแล้ว ยังพบว่ามีการศึกษาทางวิทยาศาสตร์ที่ยืนยันคุณสมบัติของจักรนารายณ์อันหลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านการอักเสบ[5-8] ต่อต้านอนุมูลอิสระ[15, 33] ลดน้ำตาลในกระแสเลือด[3] ต้านมะเร็ง[11] รวมถึงต้านเชื้อแบคทีเรีย[8, 34] เป็นต้น ในการศึกษาครั้งนี้ ทำการทดสอบความสามารถของสารสกัดใบจักรนารายณ์ต่อการต้านการอักเสบทางปริทันต์ โดยจำลองสภาวะการอักเสบโดยการกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจซึ่งเป็นเซลล์ภูมิคุ้มกันหลัก ด้วย LPS ของเชื้อ *A. actinomycetemcomitans* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคปริทันต์ สารสกัดใบจักรนารายณ์นั้นสามารถลดระดับการอักเสบที่เกิดจากการกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจด้วย LPS โดยลดระดับการแสดงออกของ TNF-α รวมถึง IL-1β ในระดับ mRNA จนลดลงกว่ากลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่า สารสกัดใบจักรนารายณ์ในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมนั้น มีฤทธิ์ลดระดับสารสื่อการอักเสบ ซึ่งนำไปสู่การอักเสบที่น้อยลงได้ สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Amin และคณะ[8] ที่ พบว่า สารสกัดจักรนารายณ์สามารถลดการอักเสบได้ร้อยละ 76 ถึงร้อยละ 92 เมื่อศึกษาด้วยวิธีการยับยั้งการเสียสภาพของอัลบูมิน (Albumin denaturation assay) นอกจากนี้ ยังคล้ายคลึงกับการศึกษาของ Liu และคณะ[7] ที่พบว่า เมื่อกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจด้วย LPS ร่วมกับสารสกัดจักรนารายณ์ที่ความเข้มข้น 600-800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้เซลล์แมคโครฟาจมีการแสดงออกของ TNF-α IL-6 และ

ไนตริกออกไซด์ลดน้อยลง และการศึกษาของ Manogaran และคณะ[9] ซึ่งทำการกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจด้วย oxidized LDL ร่วมกับสารสกัดจักรนารายณ์ พบว่า เซลล์แมคโครฟาจมีการแสดงออกของ TNF-α และ IL-1β ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ รวมถึงการศึกษาของ Cao และคณะ[66] ที่ทำการกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจด้วย LPS ร่วมกับสารสกัดใบจักรนารายณ์ พบว่าสามารถยับยั้งการแสดงออกของ COX-2 iNOS และ TNF-α ได้อีกด้วย จากข้อมูลดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจักรนารายณ์สามารถลดระดับการอักเสบได้ผ่านกระบวนการที่หลากหลาย

เมื่อพิจารณาถึงความเข้มข้นของสารสกัดใบจักรนารายณ์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดต่อการต้านการอักเสบ ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า สารสกัดใบจักรนารายณ์ที่ความเข้มข้น 100 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรให้ผลในการลดระดับการแสดงออกของ TNF-α และ IL-1β ได้ดีที่สุด ในขณะที่ ความเข้มข้นของสารสกัดใบจักรนารายณ์ที่มากกว่า 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กลับพบว่าไม่สามารถลดการอักเสบได้ อีกทั้งยังทำให้มีการแสดงออกของ TNF-α และ IL-1β ที่เพิ่มขึ้น การสูญเสียสมบัติการต้านการอักเสบนี้ อาจเนื่องมาจากความเป็นพิษต่อแมคโครฟาจโดยมีสาเหตุคือสารที่มีความเข้มข้นมากเกินไป อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นของสารที่เหมาะสมที่สุดของการศึกษานี้ ใกล้เคียงกับการศึกษาก่อนหน้า ซึ่งพบว่าสารสกัดจักรนารายณ์ที่ความเข้มข้น 50-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดระดับของ TNF-α และ IL-1β รวมไปถึง COX-2 PGE IL-6 และ iNOS ที่ออกมาจากเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบได้[9, 66, 67] และสารสกัดจักรนารายณ์ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถลดการอักเสบได้ผ่านการลดระดับการสร้างไนตริกออกไซด์[67] นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาที่พบว่า สารสกัดใบจักรนารายณ์ที่ความเข้มข้นต่ำ (15-45 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ก็สามารถยับยั้งการอักเสบได้เช่นกัน[8]

การจะนำสารสกัดจากธรรมชาติมาใช้เพื่อการรักษาโรคต่าง ๆ ได้นั้น จำเป็นต้องมีความเข้ากันได้และปราศจากความเป็นพิษต่อเซลล์ การศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดใบจักรนารายณ์ต่อแมคโครฟาจด้วยวิธี CCK-8 พบว่า สารสกัดใบจักรนารายณ์ที่ความเข้มข้น 10-250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรไม่มีผลเป็นพิษต่อเซลล์ และความเข้มข้นของสารสกัดใบจักรนารายณ์ที่มากกว่า 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีผลทำให้ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ลดลงจากกลุ่มควบคุมอย่างมากจนเริ่มมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นถึงความเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อสารสกัดมีความเข้มข้นที่มากเกินไป นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจักรนารายณ์ต่อเซลล์อย่างกว้างขวางด้วยวิธีต่าง ๆ เช่น การตรวจสอบด้วยวิธี MTT assay พบว่า สารสกัดใบจักรนารายณ์ที่สกัดโดยใช้น้ำไม่เป็นพิษต่อเซลล์ แม้มีความเข้มข้นสูงถึง 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเมื่อทดสอบในเซลล์ตับของหนู[68] ในขณะที่สารสกัดใบจักรนารายณ์ที่สกัดโดยใช้เอทา

นอลจะแสดงความเป็นพิษอ่อน ๆ ต่อเซลล์ตับของหนูตั้งแต่ความเข้มข้นประมาณ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วิธีการตรวจสอบโดยการวัดปริมาณความเป็นพิษต่อไรทะเล (Brine shrimp lethality test) พบว่า ความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้ไรทะเลร้อยละ 50 ตาย ได้แก่ ความเข้มข้น 500 และ 50-125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับสารสกัดที่ใช้น้ำและสารสกัดที่ใช้สารอินทรีย์ในการสกัดตามลำดับ[8, 69] รวมถึง มีการตรวจหาพิษของสารสกัดใบจักรนารายณ์ในหนูทดลอง ก็พบว่า ไม่แสดงความเป็นพิษกับหนูเช่นเดียวกัน[70] จากข้อมูลที่กล่าวมา แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของสารสกัดใบจักรนารายณ์มีการส่งผลที่แตกต่างกันไปในเซลล์ที่ต่างชนิดกัน อย่างไรก็ตาม สารสกัดใบจักรนารายณ์นี้ค่อนข้างมีความปลอดภัยสำหรับการใช้กับเซลล์และสิ่งมีชีวิตจึงค่อนข้างชัดเจนว่าสารสกัดจักรนารายณ์สามารถลดระดับการอักเสบของเซลล์ได้โดยไม่เป็นพิษต่อเซลล์และสิ่งมีชีวิต

ในหลายการศึกษาที่ผ่านมาได้รายงานถึงองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดใบจักรนารายณ์ พบว่า ฟลาโวนอยด์และสารประกอบฟีนอลเป็นสารประกอบหลักที่ออกฤทธิ์ของพืชชนิดนี้ และเมื่อทำการศึกษาจำแนกโดยละเอียดด้วยวิธี HPLC หรือวิธีทางโมเลกุลอื่น ๆ พบว่าสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์และสารประกอบฟีนอลที่พบเป็นองค์ประกอบในสารสกัดจักรนารายณ์ ได้แก่ กรดคลอโรเจนิก แคมป์เฟอรอล รูติน แอสตราแกลลิน และเคอร์ซีติน เป็นต้น[8, 15] ซึ่งสารแต่ละชนิดมีการศึกษาทางวิทยาศาสตร์ยืนยันว่ามีผลในการต่อต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบ และมีปริมาณที่แตกต่างกันออกไป ขึ้นอยู่กับวิธีหรือตัวทำละลายที่ใช้สกัด มีความพยายามในการศึกษาผลของสารสกัดที่แยกออกมาเฉพาะส่วน โดย Cao และคณะในปี 2021[66] พบว่า สารสกัดหยาบของใบจักรนารายณ์มีความสามารถในการต้านการอักเสบสูงกว่าสารที่สกัดแยกออกมาเฉพาะกรดคลอโรเจนิก แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบมีฤทธิ์ในการลดการอักเสบได้มากกว่า อาจเป็นผลจากการที่มีส่วนประกอบทางเคมีหลายชนิด และสารเหล่ามีการทำงานที่เสริมกัน ดังเช่นในการศึกษานี้ที่เลือกใช้สารสกัดหยาบของใบจักรนารายณ์ อย่างไรก็ตาม ควรมีการศึกษาเพื่อตรวจหาส่วนประกอบที่ออกฤทธิ์ของสารสกัดเพิ่มเติมในการศึกษาต่อไป

การศึกษาเกี่ยวกับการใช้สมุนไพรในการยับยั้งการอักเสบ มักเลือกทำการศึกษาในแมคโครฟาจหนู ซึ่งเป็นโมเดลที่ใช้ในการศึกษาที่เกี่ยวเนื่องกับการอักเสบอย่างกว้างขวาง และเลือกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบโดยใช้ LPS ของเชื้อ *A. actinomycetemcomitans* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคปริทันต์ LPS เป็นปัจจัยก่อโรคของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มแกรมลบที่กระตุ้นการทำงานของเซลล์แมคโครฟาจผ่านทาง TLR4 ที่ผิวเซลล์เป็นช่องทางหลัก นำไปสู่การเหนี่ยวนำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆ รวมตัวกัน เกิดการหลั่งสารสื่อการอักเสบและไซโตไคน์หลากหลายชนิด เช่น TNF-α IL-1α IL-1β IL-6 และ IL-8 เป็นต้น ดังนั้น การศึกษาเกี่ยวกับการยับยั้งการผลิตหรือหลั่งไซโต

ไคน์ที่เสริมการอักเสบภายหลังการกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจด้วย LPS จึงเป็นการศึกษานวัตกรรมการใช้สมุนไพรไทยในการควบคุมภูมิคุ้มกันทำงานเกิน ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญของการอักเสบทางปริทันต์ จากการศึกษา พบว่า เมื่อเซลล์แมคโครฟาจได้รับสารสกัดใบจักรนารายณ์ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะส่งผลให้ระดับการแสดงออกของ TNF-α และ IL-1β เพิ่มขึ้นจากกลุ่มควบคุมเพียงเล็กน้อยอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ LPS ของเชื้อ *A.a.* แม้ใช้ในปริมาณเล็กน้อยที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรก็สามารถกระตุ้นให้เซลล์แมคโครฟาจมีการแสดงออกของ TNF-α และ IL-1β ในระดับ mRNA เพิ่มขึ้นจากกลุ่มควบคุมสูงถึง 4-20 เท่า สอดคล้องกับการศึกษาของ Tanabe และคณะ[71] ซึ่งพบว่า ความเข้มข้นของ LPS ของเชื้อ *A. actinomycetemcomitans* ที่สามารถกระตุ้นให้เซลล์แมคโครฟาจมีการหลั่งไซโตไคน์ที่เสริมการอักเสบ เช่น TNF-α IL-1β IL-6 IL-8 และ PGE_2 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ คือ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเช่นเดียวกัน

แม้ว่าในกระบวนการอักเสบจะประกอบด้วยไซโตไคน์หลากหลายชนิด ไม่ว่าจะเป็น TNF-α IL-1α IL-1β IL-6 หรือ IL-8 แต่ก็มีการศึกษาจำนวนมากที่แสดงให้เห็นว่า TNF-α และ IL-1β เป็นไซโตไคน์ที่สำคัญในกระบวนการอักเสบของโรคปริทันต์ โดยไซโตไคน์ทั้ง 2 ชนิดนี้ มีการสร้างและหลั่งจากเซลล์แมคโครฟาจเป็นหลัก เมื่อถูกหลั่งออกมาแล้ว จะกระตุ้นการทำงานของคีโมไคน์ กระตุ้นการสร้างและหลั่งไซโตไคน์และสารสื่ออักเสบชนิดต่าง ๆ เช่น PGE2 และ IL-6 เพิ่มการสร้างไนตริกออกไซด์ และยังสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างและหลั่งของตัวมันเองได้ด้วย นอกจากนี้ ยังพบว่า TNF-α และ IL-1β มีความสัมพันธ์กับการสลายของเนื้อเยื่อและกระดูกล้อมรอบรากฟัน โดยการเพิ่มการทำงานของ MMP และของ osteoclast ได้ ดังนั้น จากผลการศึกษาครั้งนี้ที่พบว่าสารสกัดใบจักรนารายณ์สามารถทำให้เซลล์แมคโครฟาจมีการแสดงออกของ TNF-α และ IL-1β ในระดับ mRNA ลดลงได้อย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบจักรนารายณ์มีฤทธิ์ช่วยกดการอักเสบ และอาจนำไปสู่การลดลงของการทำลายเนื้อเยื่อปริทันต์และกระดูกล้อมรอบฟันได้อีกด้วย โดยผลการศึกษานี้ถือเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการศึกษาเพิ่มเติมถึงผลของสารสกัดใบจักรนารายณ์ และการประยุกต์ใช้ทางคลินิกในการรักษาโรคปริทันต์อักเสบได้ในอนาคต

ข้อเสนอแนะ

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นต่อผลของสารสกัดใบจักรนารายณ์ต่อแมคโครฟาจในระดับ mRNA เท่านั้น ควรมีการศึกษาเกี่ยวกับปริมาณโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นเพิ่มเติม

เพื่อยืนยันผลในการกดการอักเสบของสารสกัดใบจักรนารายณ์ด้วย นอกจากนี้ การศึกษาครั้งนี้ทำในเซลล์แมคโครฟาจของหนู ซึ่งเป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม อย่างไรก็ตาม หากศึกษาในเซลล์มนุษย์อาจให้ผลการทดลองมีความแตกต่างกันได้ จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในเซลล์แมคโครฟาจมนุษย์ และศึกษาเพิ่มเติมในเซลล์ที่มีความสัมพันธ์กับโรคปริทันต์โดยตรง เช่น เซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือก และ เซลล์เอ็นยึดปริทันต์

บรรณานุกรม

1. Kim MJ, Lee HJ, Wiryowidagdo S, Kim HK. Antihypertensive Effects of Gynura procumbens Extract in Spontaneously Hypertensive Rats. J Med Food. 2006;9(4):587-90.

2. Hoe SZ, Lee CN, Mok SL, Kamaruddin MY, Lam SK. Gynura procumbens Merr. decreases blood pressure in rats by vasodilatation via inhibition of calcium channels. Clinics (Sao Paulo). 2011;66(1):143-50.

3. Algariri K, Meng KY, Atangwho IJ, Asmawi MZ, Sadikun A, Murugaiyah V, et al. Hypoglycemic and anti-hyperglycemic activity study of Gynura procumbens leaf extracts. Asian Pac J Trop Biomed. 2013;3(5):358-66.

4. Ahmad Nazri KA, Fauzi NM, Buang F, Mohd Saad QH, Husain K, Jantan I, et al. Gynura procumbens Standardised Extract Reduces Cholesterol Levels and Modulates Oxidative Status in Postmenopausal Rats Fed with Cholesterol Diet Enriched with Repeatedly Heated Palm Oil. Evid Based Complement Alternat Med. 2019;2019:7246756.

5. Wong SK, Jann MLS, Sudi S, Hassan WRBM, Chin LP, Embi N, et al. Anti-Malarial and Anti-inflammatory Effects of Gynura procumbens are Mediated by Kaempferol via Inhibition of Glycogen Synthase Kinase-3β (GSK3β) Sains Malays. 2015;44(10):1489-500.

6. Huang XL, Li XJ, Qin QF, Li YS, Zhang WK, Tang HB. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of active ingredients in the essential oils from Gynura procumbens, a traditional medicine and a new and popular food material. J Ethnopharmacol. 2019;239:111916.

7. Liu M, He M, Gao H, Guo S, Jia J, Ouyang H, et al. Strategy for rapid screening of antioxidant and anti-inflammatory active ingredients in Gynura procumbens (Lour.) Merr. based on UHPLC-Q-TOF-MS/MS and characteristic ion filtration. Biomed Chromatogr. 2019;33(11):e4635.

8. Amin MZ, Afrin M, Meghla NS, Nur MA, Rahman MM, Uddin MJ. Assessment of antibacterial, anti-inflammatory, and cytotoxic effects of different extracts of Gynura procumbens leaf. Curr Ther Res Clin Exp. 2021;95:100636.

9. Manogaran M, Vuanghao L, Mohamed R. Gynura procumbens ethanol extract and

its fractions inhibit macrophage derived foam cell formation. J Ethnopharmacol. 2020;249:112410.

10. Chandradevan M, Simoh S, Mediani A, Ismail IS, Abas F. 1H NMR-Based Metabolomics Approach in Investigating the Chemical Profile, Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Gynura procumbens and Cleome gynandra. Plant Foods Hum Nutr. 2020;75(2):243-51.

11. Wang H, Zhou JW, Fu DH, Zhou Y, Cheng WZ, Liu ZL. Gynura procumbens ethanolic extract suppresses osteosarcoma cell proliferation and metastasis in vitro. Oncol Lett. 2013;6(1):113-7.

12. สมยศ จารุวิจิตรรัตนา, วีณา จิรัจฉริยากูล. การศึกษาผลทางคลินิกของผลิตภัณฑ์เจลแป๊ะตำปึงในการรักษาเริมที่ปากชนิดเป็นซ้ำ. In: มหาวิทยาลัยมหิดล, editor. 2551.

13. Jarikasem S, Charuwichitratana S, Siritantikorn S, Chantratita W, Iskander M, Frahm AW, et al. Antiherpetic Effects of Gynura procumbens. Evid Based Complement Alternat Med. 2013;2013:394865.

14. Akowuah GA, Sadikun A, Mariam A. Flavonoid Identification and Hypoglycaemic Studies of the Butanol Fraction from Gynura procumbens. Pharm Biol. 2002;40(6):405-10.

15. Kaewseejan N, Sutthikhum V, Siriamornpun S. Potential of Gynura procumbens leaves as source of flavonoid-enriched fractions with enhhanced antioxidant capacity. J Funct Foods. 2015;12:120-8.

16. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. J Nutr Sci. 2016;5:e47.

17. Serafini M, Peluso I, Raguzzini A. Flavonoids as anti-inflammatory agents. Proc Nutr Soc. 2010;69(3):273-8.

18. Naczk M, Shahidi F. Extraction and analysis of phenolics in food. J Chromatogr A. 2004;1054(1-2):95-111.

19. Iskander MN, Song Y, Coupar IM, Jiratchariyakul W. Antiinflammatory screening of the medicinal plant Gynura procumbens. Plant Foods Hum Nutr. 2002;57(3-4):233-44.

20. Xie P, inventorOral Sprays Containing Gynura Extracts and Metronidazole and Sodium Chlorophyllin. China patent 101032539. 2007.

21. Xie P, inventorHand Sanitizer Containing Gynura procumbens Extract. China patent 101036629. 2007.

22. Xie P, inventorSkin Care Creams Containing Gynura Extracts. China patent 101032458. 2007.

23. Muñoz-Carrillo JL, Hernández-Reyes VE, García-Huerta OE, Chávez-Ruvalcaba F, Chávez-Ruvalcaba MI, Chávez-Ruvalcaba KM, et al. Pathogenesis of Periodontal Disease. 2019 [cited 2022 Jan 21]. In: Periodontal Disease - Diagnostic and Adjunctive Non-surgical Considerations [Internet]. London: IntechOpen, [cited 2022 Jan 21]. Available from: https://www.intechopen.com/chapters/67314.

24. Azouni KG, Tarakji B. The Trimeric Model: A New Model of Periodontal Treatment Planning. J Clin Diagn Res. 2014;8(7):17-20.

25. Herbert BA, Novince CM, Kirkwood KL. Aggregatibacter actinomycetemcomitans, a potent immunoregulator of the periodontal host defense system and alveolar bone homeostasis. Mol Oral Microbiol. 2016;31(3):207-27.

26. Srinath S. Management of periodontal disease with doxycycline: An update. IJPCR. 2015;7(4):252-5.

27. Vanijajiva O. The genus Gynura (Asteraceae: Senecioneae) in Thailand. TJB. 2009;1(1):25-36.

28. Vanijajiva O, Kadereit JW. A revision of Gynura (Asteraceae: Senecioneae). J Syst Evol. 2011;49(4):285-314.

29. Jiratchariyakul W. แป๊ะตำปึง [internet]. 2012 [updated 15 เมษายน 2012; cited 2021 21 สิงหาคม]. Available from: สืบค้นจาก https://pharmacy.mahidol.ac.th/th/knowledge/article/93/%E0%B9%81%E0%B8%9B%E0%B9%8A%E0%B8%B0%E0%B8%95%E0%B8%B3%E0%B8%9B%E0%B8%B6%E0%B8%87/.

30. สมมนัส มนัสไพบูลย์, ภาณุพงษ์ ใจวุฒิ, ศราวุฒิ อู่พุฒินันท์. ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของจักรนารายณ์. วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน. 2562;15(3):14-32.

31. Akhi TMN, Adib M, Islam QS, Sultana I, Haider R, Ibrahim M. Preliminary Phytochemical Screening and Assessment of Pharmacological Activities of Leaves and

Stems of Gynura procumbens (Lour.) Merr. Bangladesh Pharm J. 2019;22(1):79-84.

32. Tan JN, Saffian SM, Buang F, Jubri Z, Jantan I, Husain K, et al. Antioxidant and Anti-inflammatory Effects of Genus Gynura: A Systematic Review. Front Pharmacol. 2020;11:504624.

33. Akowuah GA, Mariam A, Chin JH. The effect of extraction temperature on total phenols and antioxidant activity of Gynura procumbens leaf. Pharmacogn Mag. 2009;5(17):81-5.

34. Rahman AFMM, Asad MSA. Chemical and biological investigations of the leaves of Gynura procumbens. Int J Biosci. 2013;3(4):36-43.

35. Vejanan V, Latip J, Chin LP, Embi N, Sidek HM. In vitro and in vivo Anti-plasmodial activities of Gynura procumbens. Sains Malays. 2012;41(12):1535-42.

36. Zahra AA, Kadir FA, Mahmood AA, hadi AAA, Suzy SM, Sabri SZ, et al. Acute toxicity study and wound healing potential of Gynura procumbens leaf extract in rats. J Med Plant Res. 2011;5(12):2551-8.

37. Dumitrescu AL. Editorial: Periodontal Disease – A Public Health Problem. Front Public Health. 2015;3:278.

38. Chen MX, Zhong YJ, Dong QQ, Wong HM, Wen YF. Global, regional, and national burden of severe periodontitis, 1990–2019: An analysis of the Global Burden of Disease Study 2019. J Clin Periodontol. 2021;48(9):1165-88.

39. จิราพร ขีดดี, สุรัตน์ มงคลชัยอรัญญา, นพวรรณ โพชนุกูล, พงศธร จินตกานนท์, พัชรวรรณ สุขุมาลินท์. รายงานผลการสำรวจสภาวะสุขภาพช่องปากแห่งชาติ ครั้งที่ 8 ประเทศไทย พ.ศ. 2560. นนทบุรี: สำนักทันตสาธารณสุข กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข; 2561.

40. Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. Lab Invest. 1976;34(3):235-49.

41. Hasan A, Palmer RM. A clinical guide to periodontology: pathology of periodontal disease. Br Dent J. 2014;216(8):457-61.

42. Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. Periodontol 2000. 1997;14:9-11.

43. Paju S, Pussinen PJ, Suominen-Taipale L, Hyvönen M, Knuuttila M, Könönen E.

Detection of multiple pathogenic species in saliva is associated with periodontal infection in adults. J Clin Microbiol. 2009;47(1):235-8.

44. Hyvärinen K, Laitinen S, Paju S, Hakala A, Suominen-Taipale L, Skurnik M, et al. Detection and quantification of five major periodontal pathogens by single copy gene-based real-time PCR. Innate Immun. 2009;15(4):195-204.

45. Torrungruang K, Jitpakdeebordin S, Charatkulangkun O, Gleebbua Y. Porphyromonas gingivalis, Aggregatibacter actinomycetemcomitans, and Treponema denticola / Prevotella intermedia Co-Infection Are Associated with Severe Periodontitis in a Thai Population. PLoS One. 2015;10(8):e0136646.

46. Fine DH, Markowitz K, Fairlie K, Tischio-Bereski D, Ferrendiz J, Furgang D, et al. A consortium of Aggregatibacter actinomycetemcomitans, Streptococcus parasanguinis, and Filifactor alocis is present in sites prior to bone loss in a longitudinal study of localized aggressive periodontitis. J Clin Microbiol. 2013;51(9):2850-61.

47. Ragavendran R, Ramya V, Paddmanabhan P. Aggregatibacter Actinomycetemcomitans – Its Role in Periodontitis. Biomed Pharmacol J. 2015;8:249-52.

48. Valerio MS, Herbert BA, Basilakos DS, Browne C, Yu H, Kirkwood KL. Critical Role of MKP-1 in Lipopolysaccharide-Induced Osteoclast Formation through CXCL1 and CXCL2. Cytokine. 2015;71(1):71-80.

49. Li X, Zhou L, Takai H, Sasaki Y, Mezawa M, Li Z, et al. Aggregatibacter actinomycetemcomitans lipopolysaccharide regulates bone sialoprotein gene transcription. J Cell Biochem. 2012;113(9):2822-34.

50. Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). Microsc Res Tech. 2000;50(3):184-95.

51. 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.

52. Wang H, Czura C, Tracey K. CHAPTER 35 - Tumor necrosis factor. In: Thomson A, Lotze M, editors. The Cytokine Handbook. 4th ed. London: Academic Press; 2003. p. 837-

60.

53. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1975;72(9):3666-70.

54. Hehlgans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. Immunology. 2005;115(1):1-20.

55. Dinarello CA. The IL-1 family and inflammatory diseases. Clin Exp Rheumatol. 2002;20(5 Suppl 27):S1-13.

56. Liu YC, Lerner UH, Teng YT. Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles. Periodontol 2000. 2010;52(1):163-206.

57. 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.

58. Hienz SA, Paliwal S, Ivanovski S. Mechanisms of Bone Resorption in Periodontitis. J Immunol Res. 2015;2015:615486.

59. Belibasakis GN, Bostanci N. The RANKL-OPG system in clinical periodontology. J Clin Periodontol. 2012;39(3):239-48.

60. abcam. Ab228554 – Cell Counting Kit 8 (WST-8) [cited 2022 Jan 11. Available from: https://www.abcam.com/ps/products/228/ab228554/documents/Cell-Counting-Kit-protocol-book-v2d-ab228554%20(website).pdf.

61. Qiagen. RNeasy® Mini Handbook 2019 [cited 2022 Jan 11]. Available from: https://www.qiagen.com/cn/resources/download.aspx?id=14e7cf6e-521a-4cf7-8cbc-bf9f6fa33e24&lang=en.

62. Toyobo. ReverTra Ace™ qPCR RT Master Mix 2004 [cited 2022 Jan 11]. Available from: https://www.toyobo-global.com/seihin/xr/lifescience/products/cdna_001.html.

63. Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. Methods. 2001;25(4):386-401.

64. Escocard Rde C, Kanashiro MM, Petretski JH, Azevedo-Silva J, Queiroz de Carvalho EC, Dias da Silva W, et al. Neutrophils regulate the expression of cytokines, chemokines and nitric oxide synthase/nitric oxide in mice injected with Bothrops atrox venom. Immunobiology. 2006;211(1-2):37-46.

65. Wang K, Zhang J, Ping S, Ma Q, Chen X, Xuan H, et al. Anti-inflammatory effects of ethanol extracts of Chinese propolis and buds from poplar (Populus×canadensis). J Ethnopharmacol. 2014;155(1):300-11.

66. Cao MY, Wu J, Wu L, Gu Z, Hu JW, Xie CQ, et al. Anti-Inflammatory Effects of Gynura procumbens on RAW264.7 Cells via Regulation of the PI3K/Akt and MAPK Signaling Pathways. Evid Based Complement Alternat Med. 2022;2022:5925626.

67. Ning TJ, Yusoff SD, Jubri Z, Buang F, Song TZ, Budiono A, et al. Inhibitory Effects of Gynura procumbens Ethanolic Extract on Nitric Oxide Production and Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) Protein Expression in Macrophages. Sains Malays. 2019;48(8):1737-44.

68. Vejanan V, Latip J, Lee PC, Embi N, Sidek H. In vitro and in vivo Anti-plasmodial Activities of Gynura procumbens. Sains Malays. 2012;41(12):1535-42.

69. Hossain MS, Maniruzzaman M, Chowdhuary MMR, Ahmed JU, Badal MMR, Yousuf MA. Isolation of Cerebroside from Gynura procumbens Leaves and Biological Activities of the Leaves Extracts

December 2020. J Chem Health Risks. 2020;10(4):353-63.

70. ศศมล ผาสุข, ประเสริฐ มีรัตน์. พิษกึ่งเฉียบพลัน พิษเฉียบพลันและองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบใบสดแป๊ะตำปึง. วารสารวิจัยและพัฒนา วไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมป์. 2557;9(2):19-28.

71. Tanabe SI, Grenier D. Macrophage tolerance response to Aggregatibacter actinomycetemcomitans lipopolysaccharide induces differential regulation of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta and matrix metalloproteinase 9 secretion. J Periodontal Res. 2008;43(3):372-7.

ประวัติผู้เขียน