



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษากลไกยับยั้งการแปรสภาพเซลล์สลายกระดูก

โดยเพ็พไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล 37

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ชยารพ สุพรรณชาติ

สังกัดมหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ตุลาคม 2562

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษากลไกยับยั้งการแปรสภาพเซลล์สลายกระดูก
โดยเพ็พไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล 37

ผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ชยาพร สุพรรณชาติ สังกัดมหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

และมหาวิทยาลัยเชียงใหม่

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัยสกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

กระดูกเป็นอวัยวะสำคัญในการพยุงร่างกายและมีระบบเมตะบอลิซึมของแร่ธาตุที่จำเป็นต่อสิ่งมีชีวิต กระดูกเป็นอวัยวะที่มีสภาวะแบบพลวัต จึงมีเซลล์กระดูกที่มีหน้าที่สร้างและสลายกระดูกเพื่อคงรักษารูปร่างและสะสมสารอินทรีย์ที่จำเป็นต่อร่างกาย เซลล์กระดูกมีการพัฒนาหรือแปรสภาพมาจากการสื่อสารจากเซลล์อื่นที่อยู่ในนิเวศน์เดียวกันหรือจากสารสื่อสารจากแหล่งกำเนิดห่างไกล การเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากพยาธิสภาพอาจส่งผลกระทบต่อเซลล์กระดูก เช่นเดียวกับสภาวะที่มีการติดเชื้อที่ชักนำให้เกิดการตอบสนองโดยกระบวนการอักเสบทำให้เซลล์กระดูกต้องปรับหน้าที่เพื่อตอบสนองต่อการอักเสบ เพ็พไทด์ต้านจุลชีพถูกสร้างและปล่อยจากเซลล์ที่อาศัยอยู่บริเวณที่เกิดการติดเชื้อแล้วสามารถไปออกฤทธิ์ต่อเซลล์กระดูกได้ Cathelicidin หรือเพ็พไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 นอกจากสามารถออกฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพแล้วยังสามารถต้านการแปรสภาพของเซลล์สลายกระดูกโดยผ่านการออกฤทธิ์ที่ตัวรับสัญญาณภายในโมโนไซท์ Toll-like receptor 9 และทำให้มีการสังเคราะห์ IL-12 เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ในทางตรงกันข้ามเพ็พไทด์ต้านจุลชีพ Human beta-defensin-1 กลับมีผลเสริมฤทธิ์ของ RANKL ในการกระตุ้นกระบวนการแปรสภาพเซลล์สลายกระดูกและเร่งการสลายกระดูกได้เร็วขึ้น จากการศึกษานี้ทำให้ทราบว่าเพ็พไทด์ต้านจุลชีพมีหลายโมเลกุลซึ่งสามารถออกฤทธิ์ต่อเซลล์สลายกระดูกได้แตกต่างกันไป การประยุกต์ใช้เพ็พไทด์ต้านจุลชีพแต่ชนิดต้องถูกกำหนดตามฤทธิ์ที่จำเพาะต่อเซลล์เป้าหมาย ทั้งนี้เพ็พไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 น่าจะเกิดประโยชน์ในการรักษาพยาธิสภาพที่มีการทำลายกระดูก ในขณะที่เพ็พไทด์ต้านจุลชีพ Human beta-defensin-1 น่าจะถูกเลือกไปใช้ส่งเสริมการรักษาที่ต้องการเร่งกระบวนการสลายกระดูก เป็นต้น

Abstract

Bone is an essential organ in vertebrates to be a framework of whole body as well as maintenance of mineral metabolism. As a dynamic organ, bone contains matrix-associated cells and nonosseous occupants which serve different function. Generally, activities of bone cells mostly depend on the communication of either local or remote organ. In Infection-induced inflammation, a pathologic condition, leads the regional cells perform crosstalks to the adjacent bone cells to react and ready to be involved in defense state. Antimicrobial peptides are products of many primary cells in the infection zone. These peptides can activate bone cells and their progenitors in different manners. Beside antimicrobial effect, previously, we found that cathelicidin or LL-37 can inhibit RANKL-induced osteoclastogenesis in human monocyte. Intracellular induction of LL-37 mechanism is remaining unclear, however, the inactivation of Toll-like receptor by LL-37 associated with expression of IL-12 could regulate the osteoclastogenesis of human monocyte. Furthermore, our study demonstrates that not only LL-37 can affect bone metabolism, but human beta-defensin 1 can stimulate osteoclast differentiation and accelerate mineral resorption in vitro. As downstream of infection response, antimicrobial peptides have multiple effects to bone metabolism that can be selectively used in clinical applications. LL-37 would probably be used in treatment of degenerative disease of bone whereas human beta-defensin 1 may be applied to treat attenuated osteoclast.

บทสรุปผู้บริหาร (Executive Summary)

ที่มาและความสำคัญของปัญหา-ทบทวนวรรณกรรม

กระดูกเป็นอวัยวะหนึ่งของสัตว์มีกระดูกสันหลังซึ่งรวมถึงมนุษย์ ที่มีทำหน้าที่หลากหลาย ในสภาวะปกติกระดูกจะมีการเปลี่ยนแปลงแบบพลวัต (dynamic) ของมวลและโครงสร้างอยู่ตลอดเวลา ตามการเปลี่ยนแปลงสภาวะต่าง ๆ ของร่างกาย แต่ในบางสภาวะ ความสมดุลของการสร้างและการทำลายกระดูกสูญเสียไป ซึ่งจะทำให้เกิดพยาธิสภาพตามมา เช่น ในสภาวะที่มีการสร้างกระดูกน้อยเกินไปหรือทำลายมากเกินไปทำให้เกิดโรคหรือภาวะทางระบบ เช่น โรคกระดูกและข้อต่ออักเสบ (osteoarthritis) โรคกระดูกอ่อน (rickets) ภาวะกระดูกพรุน (osteoporosis) เป็นต้น เซลล์สลายกระดูกเป็นเซลล์ชนิดหนึ่งในกระดูก ซึ่งทำหน้าที่ในการสลายแร่ธาตุและสารอินทรีย์ของกระดูก ในสภาวะปกติ (physiologic condition) เซลล์สลายกระดูกพัฒนามาจากโมโนไซต์ที่มาจากเซลล์ไขกระดูก โดยถูกควบคุมจากเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast) ซึ่งในการทำงานร่วมกันกับเซลล์สร้างกระดูกจะทำให้เกิดการปรับแต่ง (remodeling) ของกระดูก เพื่อใช้ในการพัฒนารูปร่างและโครงสร้างของกระดูกในระยะที่ร่างกายมีการเจริญเติบโต แต่ในสภาวะที่มีการกระตุ้นจากการอักเสบ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีการติดเชื้อร่วมด้วย จะทำให้กระดูกมีการสลายตัวมากกว่าปกติ เช่น ที่เกิดในโรคปริทันต์อักเสบ (periodontitis) ที่เกิดการติดเชื้อบริเวณปลายรากฟัน หรือที่เกิดการอักเสบในกระดูก (osteomyelitis) เป็นต้น ณ ปัจจุบันเป็นที่ทราบแล้วว่าเพปไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 ส่งผลยับยั้งการพัฒนามาเป็นเซลล์สลายกระดูกจากโมโนไซต์และทำให้อัตราการสลายเนื้อเยื่อสะสมแร่ธาตุลดลง ซึ่งสอดคล้องกับระดับแอลแอล-37 ที่ลดลงในโรคปริทันต์ชนิดที่มีการสลายกระดูกหุ้มรากฟันอย่างรวดเร็ว

ณ ปัจจุบันยังไม่มียานวิจัยที่อธิบายกลไกของเพปไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 ต่อกระบวนการยับยั้งการสร้างเซลล์สลายกระดูกในระดับโมเลกุล อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของคณะผู้วิจัยพบว่าการกระตุ้นด้วยเพปไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 ทำให้เกิดการขัดขวาง NFAT2 กลับเข้าสู่นิวเคลียสจนเป็นเหตุไม่ก่อให้เกิดการแปรสภาพเซลล์สลายกระดูก NFAT2 เองถูกควบคุมโดย Calcineurin และเพปไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 ไปกด Calcineurin จึงสันนิษฐานได้ว่าเพปไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 น่าจะมีบทบาทในการควบคุมการเคลื่อนที่เข้าออกภายในเซลล์ (Ca^{++} flux) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่พบว่า P2X7 เป็นสมาชิกของตระกูล P2X โดยทำงานกับที่ตัวรับ P2X7R อันปรากฏที่เยื่อหุ้มเซลล์และมีความสำคัญต่อการเชื่อมเซลล์และทำให้เซลล์สลายกระดูกมีหลายนิวเคลียส ซึ่งลักษณะหลายนิวเคลียสนี้เป็นลักษณะจำเพาะของเซลล์สลายกระดูก เนื่องจากเพปไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 มีผลยับยั้งการแปรสภาพเซลล์

สลายกระดูกโดยไม่เกิดกระบวนการเชื่อมเซลล์ขึ้น อีกทั้งเคยมีการศึกษาของ Elssner และคณะในปี 2004 ที่พบว่าเพ็พไทด์ด้านจุลชีพ LL-37 จำเพาะต่อการทำงานของ P2X7 จึงสันนิษฐานได้ว่าเพ็พไทด์ด้านจุลชีพ LL-37 น่าจะรบกวนสัญญาณของ P2X7 ขณะที่เซลล์กำลังแปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูกเต็มวัย ทั้งนี้ ATP และ Adenosine ที่เยื่อหุ้มเซลล์เป็นโมเลกุลจำเป็นต่อการเชื่อมเซลล์ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของกระบวนการแปรสภาพของเซลล์สลายกระดูกที่กำกับโดย P2X7 ดังนั้นจึงอาจสันนิษฐานได้ว่าเพ็พไทด์ด้านจุลชีพ LL-37 น่าจะไปออกฤทธิ์ที่ตัวรับ P2X7 โดยสัมพันธ์กับสัญญาณ ATP และ Adenosine อีกทางหนึ่งด้วย ดังนั้นหากทราบกลไกดังกล่าวพร้อมกับผลกระทบในเชิงการยับยั้งการสลายกระดูกและนำไปสู่การป้องกันการลดลงของมวลกระดูกหรือการกระตุ้นมวลกระดูกให้เพิ่มขึ้น (anabolic effect) แล้ว เพ็พไทด์ด้านจุลชีพ LL-37 น่าจะเข้ามามีบทบาทร่วมกับการรักษาโรคที่เกิดจากการสลายกระดูกได้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อหากลไกการรับสัญญาณ P2X7 จากเพ็พไทด์ด้านจุลชีพ LL-37 บนเยื่อหุ้มเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สลายกระดูก
2. เพื่อหากลไกการรับสัญญาณที่เกี่ยวข้องอื่นจากเพ็พไทด์ด้านจุลชีพ LL-37 บนเยื่อหุ้มเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สลายกระดูก

วิธีทดลอง

เพื่อศึกษากลไกภายในเซลล์จากฤทธิ์ของเพ็พไทด์ด้านจุลชีพ LL-37 ระหว่างที่มีการกระตุ้นให้โมโนไซต์แปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูก การทดลองถูกกำหนดให้โดยการสกัดโมโนไซต์จากเลือดของอาสาสมัครซึ่งได้รับการรับรองจากคณะกรรมการพิทักษ์สิทธิสวัสดิภาพและป้องกันอันตรายของผู้ถูกวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตัวอย่างเลือดจะถูกนำไปปั่นแยกโดยวิธี density gradient centrifugation กับสารละลาย Ficoll-Paque™ จำนวน 10 มิลลิลิตร โมโนไซต์ถูกนำไปเลี้ยงในสารละลายเพาะเลี้ยงเซลล์ในห้องปฏิบัติการบนหลุมเลี้ยงเซลล์ในสัดส่วน 500,000 เซลล์ต่อพื้นที่ผิวของพื้นหลุม 1 ตารางเซนติเมตรและได้รับการกระตุ้นด้วย M-CSF และ RANKL ในปริมาณที่เหมาะสม

ในระหว่างที่กระตุ้นการแปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูก เพ็พไทด์ด้านจุลชีพ LL-37 หรือสารทดสอบด้านฤทธิ์ของเพ็พไทด์ด้านจุลชีพ LL-37 หรือตำแหน่งตัวรับสัญญาณที่สนใจเช่น P2X7 หรือ

TLR-9 จะถูกเติมไปพร้อมกัน จากนั้นจะทำการสังเกตจำนวนเซลล์สลายกระดูกที่เปลี่ยนแปลงไปโดยการย้อมสังเกตการแสดงออกของเอนไซม์ TRAcP และจำนวนนิวเคลียสด้วยการย้อมสังเกต PCNA ซึ่งเป็นลักษณะจำเพาะของเซลล์สลายกระดูก หากเพ็พไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 มีฤทธิ์ที่ตัวรับสัญญาณนั้น เมื่อมีการเติมสารต้านฤทธิ์ที่ตำแหน่งตัวรับนั้นจะทำให้เพ็พไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 ไม่สามารถต้านกระบวนการแปรสภาพเป็นเซลล์สลายได้ เมื่อทราบตำแหน่งที่เพ็พไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 ออกฤทธิ์ จึงทำการศึกษาหากลไกต่อเนื่องโดยการสังเกตการเปลี่ยนแปลงโมเลกุลที่เกี่ยวข้องและศึกษาเพื่อสังเกตตำแหน่งซ้อนทับกันระหว่างเพ็พไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 และโมเลกุลที่เพ็พไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 ไปออกฤทธิ์โดยการทำ Immunofluorescence ที่ย้อมสังเกตการแสดงออกของโมเลกุลทั้งสองชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ confocal laser microscope

นอกเหนือจากเพ็พไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 ยังมีเพ็พไทด์ต้านจุลชีพ HBD-1 ที่ถูกนำมาศึกษาเพื่อสังเกตฤทธิ์ต่อกระบวนการแปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูกโดยเติม HBD-1 ปริมาณที่ทดสอบแล้วว่าไม่เป็นพิษต่อโมโนไซต์ไประหว่างการกระตุ้นแปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูกเป็นระยะเวลา 7 วัน แล้วเซลล์จะถูกตรึงสภาพด้วย 4% พาราฟอร์มาลดีไฮด์ เซลล์ที่ตรึงสภาพไว้จะถูกนำไปย้อมพิเศษเพื่อยืนยันการแปรสภาพของเซลล์กับสารเรืองแสงและ 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) เพื่อดูการแสดงออกของ F-actin และนิวเคลียส ตามลำดับ รวมทั้งย้อมทางเคมีเพื่อดูการแสดงออกของ TRAcP หลังจากย้อมสีเซลล์แล้ว ตัวอย่างเซลล์ถูกนำไปถ่ายรูปโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดาที่แหล่งกำเนิดแสงฟลูออเรสเซนต์พร้อมแผ่นกรองแสงซึ่งติดกล้องถ่ายรูปที่บันทึกภาพเป็นระบบดิจิตอล เพื่อสังเกตปริมาณการย่อยสลายแร่ธาตุ เซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสารต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 14 วันบนเนื้อฟ้นจะถูกกำจัดออก แล้วนำแผ่นเนื้อฟ้นไปย้อมด้วยหมึกสีดำและเช็ดด้วยผ้าชุบน้ำหมาดๆ สีดำที่ติดอยู่หลังจากเช็ดจะคงเคลือบบนผิวของหลุมที่เกิดจากการสลายเนื้อฟ้นของเซลล์สลายกระดูก นำแผ่นเนื้อฟ้นไปสำรวจและบันทึกภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาซึ่งติดกล้องถ่ายรูปที่บันทึกภาพเป็นระบบดิจิตอล นำภาพที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณพื้นที่เนื้อฟ้นถูกสลายไปโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ภาพ ImageJ เวอร์ชัน 1.45g จากนั้นคำนวณสัดส่วนพื้นที่การสลายเนื้อฟ้นต่อพื้นที่ทั้งหมด แล้วนำไปเทียบเป็นอัตราส่วนกับค่าที่คำนวณได้ในกลุ่มควบคุม

แผนการดำเนินงาน

เป้าหมาย	ขั้นตอน	ระยะเวลาปฏิบัติงาน								ผลที่คาดว่าจะได้รับ
		1 st year				2 nd year				
		1	2	3	4	1	2	3	4	
1. เตรียมการวิจัย	- จัดหาเครื่องมือและอุปกรณ์									-
	- ยื่นคำร้องขอทำวิจัยโดยใช้เนื้อเยื่อจากมนุษย์									ได้รับอนุมัติให้ใช้เนื้อเยื่อจากมนุษย์ได้
2. ศึกษาตำแหน่งของแอลแอล 37	- คัดเซลล์ปฐมภูมิ - เพาะเลี้ยงเซลล์ - ย้อมเซลล์และดูแอลแอล 37 จากกล้อง Confocal									เห็นตำแหน่งแอลแอล 37 ที่จำเพาะ
3. ศึกษากลไกการยับยั้งการแปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูกโดยแอลแอล 37	- คัดเซลล์ปฐมภูมิ - เพาะเลี้ยงเซลล์									ได้ปริมาณเซลล์ปฐมภูมิเพียงพอต่อการทดลอง
	- Ca++ flux assay									แอลแอล 37 ชัดขวางสัญญาณแคลเซียมในเซลล์
	- นับปริมาณเซลล์สลายกระดูก (Cytochemistry; TRAcP assay)									กระบวนการแปรสภาพเซลล์ถูกยับยั้งโดยแอลแอล 37 สัมพันธ์กับสัญญาณแคลเซียม
4. ศึกษาการออกฤทธิ์ของแอลแอล 37 ที่เยื่อหุ้มเซลล์	- คัดเซลล์ปฐมภูมิ - เพาะเลี้ยงเซลล์ - ชัดขวางการรับสัญญาณที่ตัวรับโดยใช้ antagonists or antibodies									Receptor antagonist ไปชัดเจนการส่งสัญญาณของแอลแอล 37 ทำให้เซลล์มีการแปรสภาพได้ปกติ
	- นับปริมาณเซลล์สลายกระดูก (Cytochemistry; TRAcP assay)									
	- วัดปริมาณ RNAs and proteins ที่แสดงออกของเซลล์สลายกระดูก									
5. วิเคราะห์ข้อมูล	- Descriptive analysis									-
	- Statistic analysis									ผลของข้อมูลสอดคล้องกัน
6. เผยแพร่ข้อมูลและการตีพิมพ์	- จัดทำต้นฉบับ									ผลงานได้รับกายอมรับให้ตีพิมพ์
	- รายงานการวิจัยกับผู้ให้ทุน									-

ผลการทดลอง

เพ็พไทด์ด้านจุลชีพแอลแอล-37 ยับยั้งการแปรสภาพไปเป็นเซลล์สลายกระดูกในระยะแรกของกระบวนการแปรสภาพ

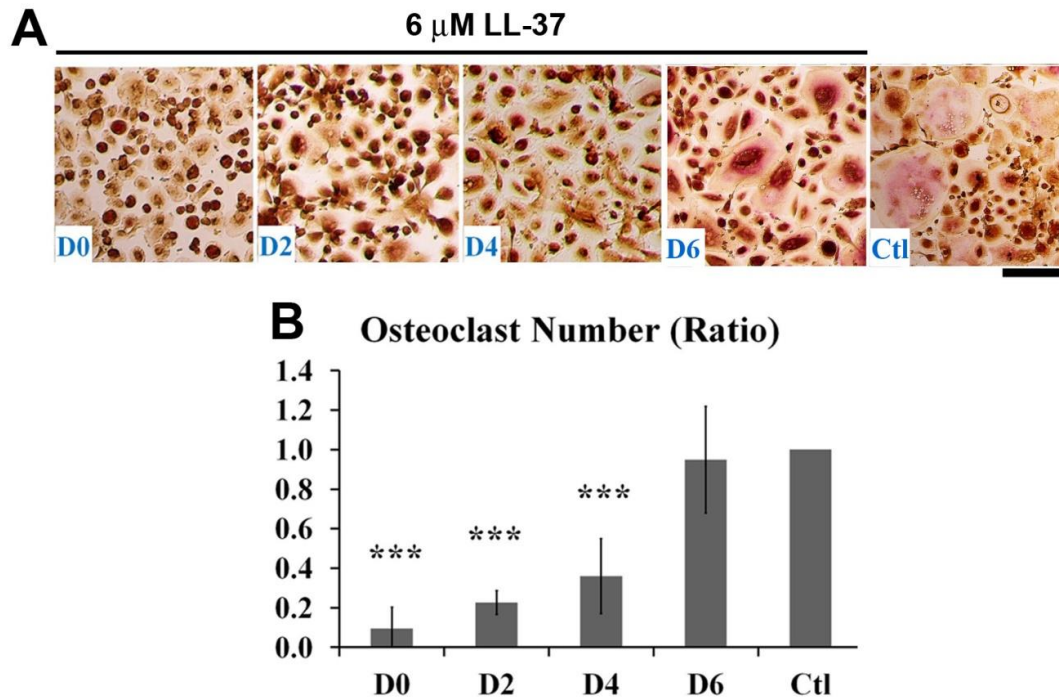
พบว่าเซลล์กลุ่มที่เริ่มได้รับการกระตุ้นด้วยเพ็พไทด์ด้านจุลชีพแอลแอล-37 ในวันที่ 6 มีจำนวนเซลล์สลายกระดูกไม่ต่างจากกลุ่มควบคุมที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วยเพ็พไทด์ด้านจุลชีพแอลแอล-37 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 1) ในขณะที่เซลล์กลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยเพ็พไทด์ด้านจุลชีพแอลแอล-37 มาก่อนในวันที่เริ่มต้นกระตุ้นการแปรสภาพ วันที่ 2 และวันที่ 4 มีจำนวนเซลล์สลายกระดูกน้อยกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วยเพ็พไทด์ด้านจุลชีพแอลแอล-37 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าความน่าจะเป็น 0.005

เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยเพ็พไทด์ด้านจุลชีพแอลแอล-37 หลังจากกระตุ้นการแปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูกไป 2 วัน (D2) ถึงแม้ว่ามีค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ที่แปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูกมากกว่ากระตุ้นไปพร้อมกัน (D0) แต่ไม่แตกต่างกันจากการคำนวณทางสถิติ และเซลล์กลุ่มที่เริ่มกระตุ้นด้วยเพ็พไทด์ด้านจุลชีพแอลแอล-37 ในวันที่ 4 (D4) จะมีค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่แปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูกมากกว่ากลุ่มที่ถูกกระตุ้นไปพร้อมกับเริ่มกระตุ้นการแปรสภาพหรือกลุ่มที่ถูกกระตุ้นหลังจากเริ่มแปรสภาพไปแล้ว 2 วัน แต่ไม่แตกต่างกันจากการคำนวณทางสถิติ

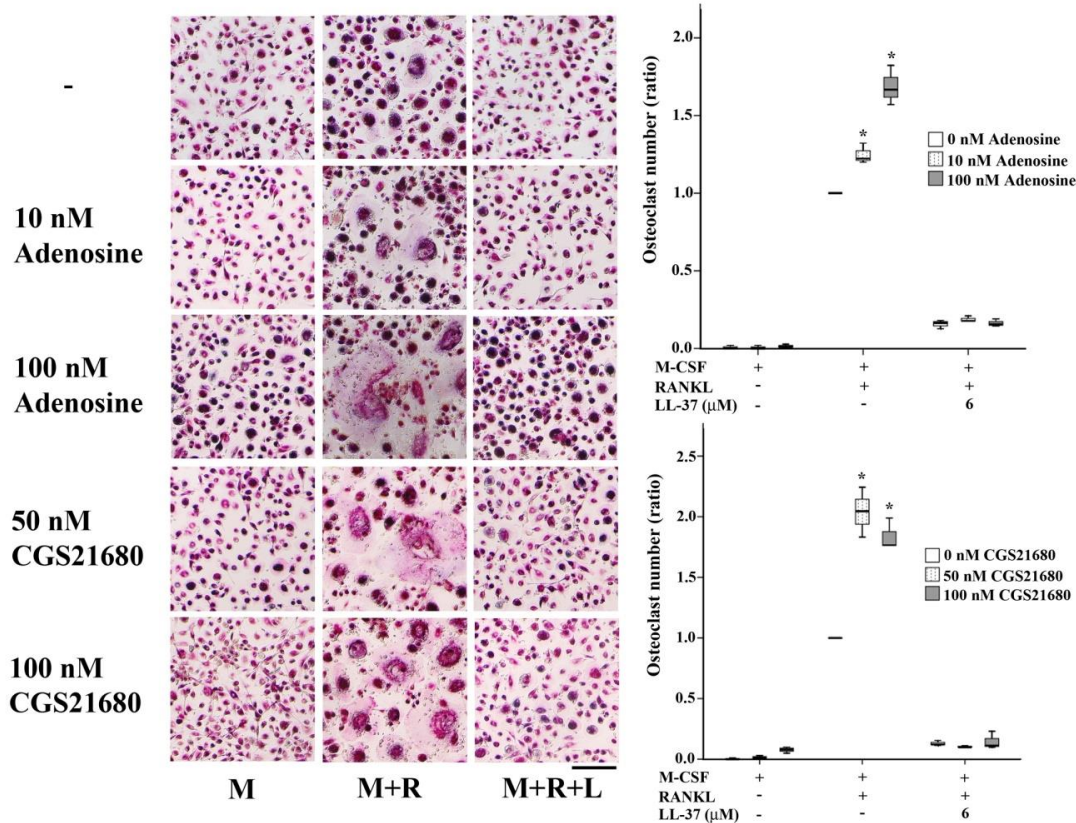
สารกระตุ้นตัวรับ A2A ไม่สามารถขัดเซกการยับยั้งแปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูกในสภาวะที่มีเพ็พไทด์ด้านจุลชีพ LL-37 ได้

เพื่อศึกษาการตำแหน่งของกลไกการทำงานของเพ็พไทด์ด้านจุลชีพ LL-37 บนตัวรับ P2X7 ภายในโมโนไซต์ระหว่างการแปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูก Adenosine ความเข้มข้น 10 นาโนโมลาร์ หรือ 100 นาโนโมลาร์ หรือสาร CGS21680 ความเข้มข้น 50 นาโนโมลาร์หรือ 100 นาโนโมลาร์ถูกเติมลงในสารละลายเลี้ยงโมโนไซต์ระหว่างกระตุ้นให้เกิดการแปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูก โดยใช้สภาวะที่ปราศจาก RANKL เป็นสภาวะควบคุมลบ และมี RANKL เป็นกลุ่มควบคุมบวก เมื่อกระตุ้นการแปรสภาพเซลล์ครบ 7 วัน เซลล์ทุกกลุ่มถูกนำไปตรึงสภาพและย้อมเพื่อสังเกตจำนวนเซลล์ที่แปรสภาพเป็นเซลล์ขนาดใหญ่หลายนิวเคลียสและมีการติดสีที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ TRAcP ถูกพบว่าในทุกกลุ่มที่ปราศจากเพ็พไทด์ด้านจุลชีพ LL-37 แต่มีสาร Adenosine หรือ CGS21680 มีจำนวนเซลล์ที่แปรสภาพมากกว่ากลุ่มควบคุมลบหรือบวก แต่ไม่พบว่าในสภาวะที่มีการเติม adenosine หรือ

CGS21680 ในสภาวะที่มีเพ็พไทด์ด้านจุลชีพ LL-37 กลับมามีจำนวนเซลล์ที่แปรสภาพเท่ากับกลุ่มควบคุมบวก และมีจำนวนน้อยกว่ากลุ่มควบคุมบวกอย่างมีนัยสำคัญ $P < 0.05$ แต่ไม่ได้มีจำนวนต่างจากกลุ่มควบคุมลบ ที่ทำจากการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง ($n=3$) (รูปที่ 2)



รูปที่ 1 การศึกษาผลของเพ็พไทด์ด้านจุลชีพแอลแอล-37 ความเข้มข้น 6 ไมโครโมลาร์ต่อการแปรสภาพของเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สลายกระดูก เซลล์ถูกเลี้ยงบนวัสดุพลาสติกเป็นระยะเวลา 7 วัน A) ภาพของการแปรสภาพเซลล์ที่ถูกเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเมื่อเริ่มถูกกระตุ้นด้วยเพ็พไทด์ด้านจุลชีพแอลแอล-37 ในวันที่เริ่มกระตุ้นการแปรสภาพ (D0) วันที่ 2 (D2) วันที่ 4 (D4) วันที่ 6 (D6) และไม่ถูกกระตุ้นด้วยเพ็พไทด์ด้านจุลชีพแอลแอล-37 (Ctl) หลังจากจากนั้นได้รับการตรึงสภาพและย้อมสีทางเคมีพิเศษสำหรับการแสดงออกของเอนไซม์ TRAcP (สีม่วงแดง) ที่จำเพาะต่อเซลล์สลายกระดูก และถูกย้อมเพื่อสังเกตการแสดงออกของ PCNA ที่แสดงตำแหน่งของนิวเคลียส แท่งสีดำแนวนอนแสดงสัดส่วนระยะ 100 ไมครอน B) กราฟแท่งปริมาณสัดส่วนจำนวนเซลล์ที่แปรสภาพไปเป็นเซลล์สลายกระดูกในแต่ละกลุ่มที่เริ่มถูกกระตุ้นด้วยเพ็พไทด์ด้านจุลชีพแอลแอล-37 ในวันที่ต่าง ๆ หลังจากกระตุ้นให้เซลล์แปรสภาพ โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นด้วยเพ็พไทด์ด้านจุลชีพแอลแอล-37 (relative ratio) แท่งบอกความคลาดเคลื่อน (error bar) แสดงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) สัญลักษณ์ *** แทนการเปรียบเทียบความน่าจะเป็นของความแตกต่างกันระหว่างกลุ่ม (p -value) น้อยกว่า 0.005 โดยทำการศึกษาจากเซลล์จำนวน 5 ชุด



รูปที่ 2 การศึกษาทำหน้าที่ของเพปไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 บนตำแหน่งตัวรับ A2A ของ P2X7 โดยการชดเชย adenosine และการใช้สารกระตุ้นตัวรับ A2A ที่คาดว่าส่งผลต่อการแปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูกจากการยับยั้งด้วยเพปไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 ทั้ง adenosine และ CGS21680 ถูกเติมในสภาวะที่ทำการกระตุ้นการแปรสภาพโมโนไซต์เป็นเซลล์สลายกระดูกด้วย M-CSF และ RANKL ในสภาวะที่มีหรือปราศจากเพปไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 ปริมาณ 6 ไมโครโมลาร์ เซลล์ถูกเลี้ยงบนวัสดุพลาสติกเป็นระยะเวลา 7 วัน แล้วนำไปสังเกตจำนวนเซลล์ที่แปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูก ภาพของการแปรสภาพเซลล์ที่ถูกเลี้ยงในห้องปฏิบัติการที่มีหรือปราศจากเพปไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 เมื่อถูกตรึงสภาพและถูกนำไปย้อมสีทางเคมีพิเศษสำหรับการแสดงออกของเอนไซม์ TRAcP (สีม่วงแดง) ที่จำเพาะต่อเซลล์สลายกระดูก และถูกย้อมเพื่อสังเกตการแสดงออกของ PCNA ที่แสดงตำแหน่งของนิวเคลียส แท่งสีดำแนวนอนแสดงสัดส่วนระยะ 100 ไมครอน ที่ด้านขวาเป็นภาพการลงจุดแบบกล่อง (Box plot) แสดงสัดส่วนจำนวนเซลล์ที่แปรสภาพไปเป็นเซลล์สลายกระดูกในแต่ละกลุ่มที่มีหรือปราศจากเพปไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 และที่มี adenosine หรือสารกระตุ้น A2A (CGS21680) โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นด้วย เพปไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 (relative ratio) เครื่องหมาย + คือสภาวะที่มีสารกระตุ้น เครื่องหมาย - คือสภาวะที่ไม่มีสารกระตุ้น แท่งบอกความคลาดเคลื่อน (error bar) แสดงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) สัญลักษณ์ * แทนการเปรียบเทียบความน่าจะเป็นของความแตกต่างกันระหว่างกลุ่ม (p-value) น้อยกว่า 0.05 โดยทำการศึกษาจากเซลล์จำนวน 3 ชุด

Toll-Like Receptor 9 เป็นเป้าหมายของเพปไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 ในการยับยั้งกระบวนการแปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูก

เพื่อศึกษากลไกของเพปไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 ต่อกระบวนการแปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูกผ่านการทำงานของ Toll-Like Receptor 9 จึงใช้เติมสาร Oligonucleotides (ODN) ที่ปฏิบัติต่อตัวกระตุ้น Toll-Like Receptor 9 ในขณะที่กระตุ้นด้วยเพปไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 ระหว่างที่ชักนำการแปรสภาพโมโนไซต์เป็นเซลล์สลายกระดูกด้วย M-CSF และ RANKL เมื่อครบระยะเวลากระตุ้นในวันที่ 7 เซลล์จะถูกตรึงสภาพและนำไปย้อมเพื่อสังเกตการแสดงออกของเอนไซม์ TRAcP และสังเกตจำนวนนิวเคลียส พบว่ากลุ่มเซลล์ที่ได้รับการเติม ODN 1 ไมโครโมลาร์ลงไปในสภาวะที่มีเพปไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 6 ไมโครโมลาร์มีจำนวนเซลล์ขนาดใหญ่หลายนิวเคลียสที่มีการแสดงของเอนไซม์ TRAcP สูงกว่าในกลุ่มที่ไม่ได้เติม ODN หรือเติมด้วย ODN หลอก (รูปที่ 3)

เพปไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 กระตุ้นการปล่อย IL-12p40 จากโมโนไซต์ที่ถูกชักนำให้แปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูก

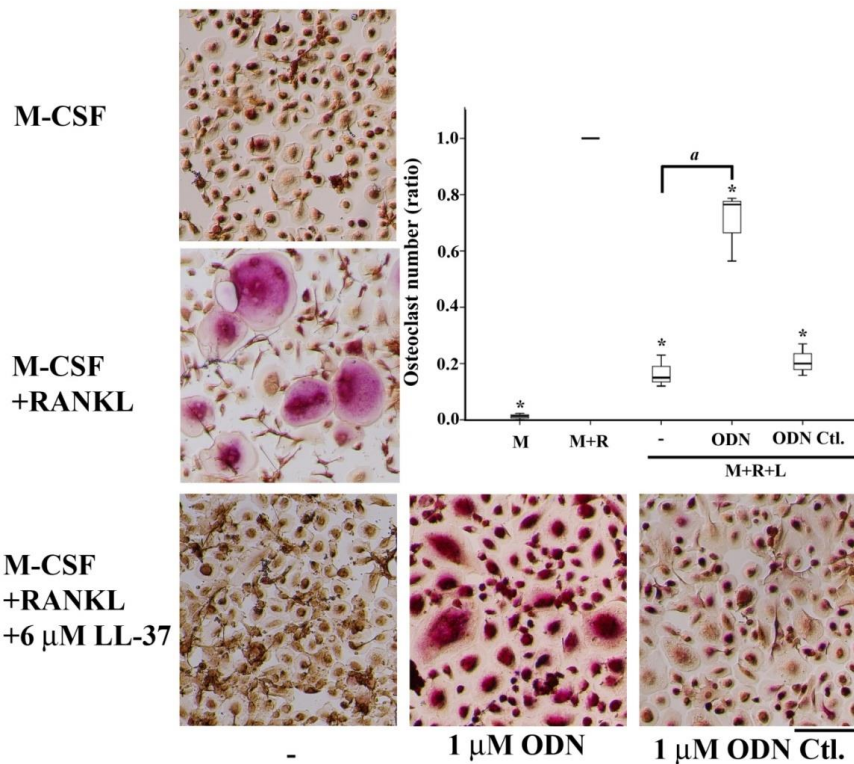
ระดับปริมาณ IL-12p40 ถูกวัดในสารละลายเพาะเลี้ยงเซลล์ในขณะที่โมโนไซต์ถูกชักนำให้แปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูกจากการกระตุ้นด้วย M-CSF และ RANKL ในสภาวะที่ปราศจากเพปไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 หรือมีปริมาณเพปไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 2 ไมโครโมลาร์ 4 ไมโครโมลาร์ และ 8 ไมโครโมลาร์ ที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังการกระตุ้น จากการวัดปริมาณโดยอาศัยวิธี ELISA พบว่าระดับของ IL-12p40 ในสารละลายเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีเพปไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ปราศจากเพปไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และยังมีปริมาณสูงขึ้นตามปริมาณเพปไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 ที่เพิ่มขึ้น (รูปที่ 4)

เพื่อเป็นการยืนยันผลของ IL-12 ต่อกระบวนการแปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูกที่เป็นผลพวงจากการกระตุ้นด้วยเพปไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 จึงเติม IL-12p40 neutralizing antibody ซึ่งเป็นสารต้านการทำหน้าที่ของ IL-12p40 ในระหว่างการกระตุ้นการแปรสภาพจากโมโนไซต์เป็นเซลล์สลายกระดูกด้วย M-CSF และ RANKL ในสภาวะที่มีหรือปราศจากเพปไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 ปริมาณ 8 ไมโครโมลาร์ พบว่าในสภาวะที่มีการเติม IL-12p40 neutralizing antibody ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรระหว่างกระตุ้นการแปรสภาพที่มีเพปไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 เป็นระยะเวลา 7 วัน แล้วนำเซลล์ไปตรึงสภาพและย้อมดูการแสดงออกของเอนไซม์ TRAcP มีจำนวนเซลล์ที่เป็นลักษณะขนาดใหญ่หลายนิวเคลียสและมีการแสดงออกของ TRAcP มากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้เติม IL-12p40

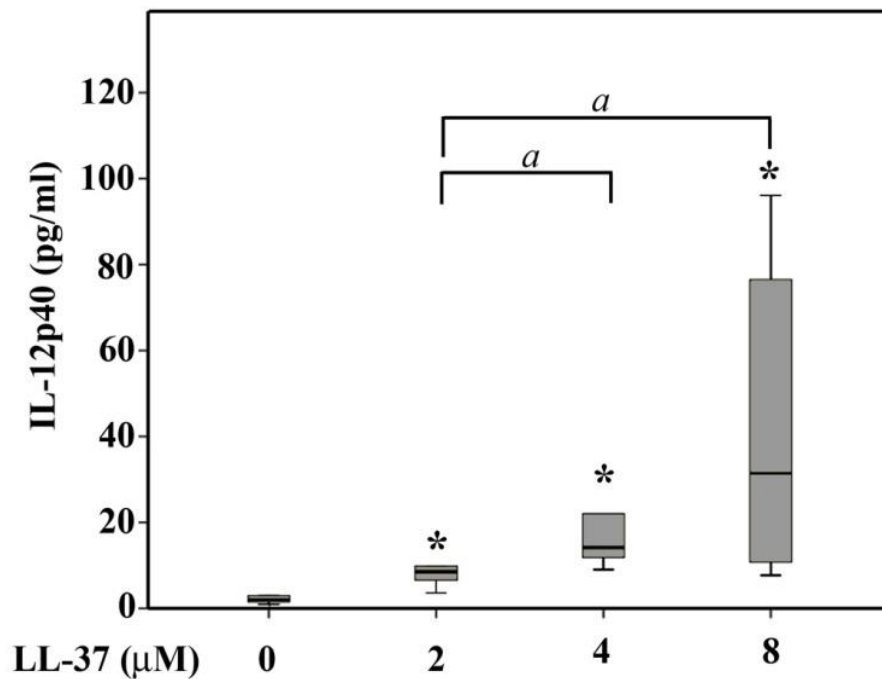
neutralizing antibody อย่างมีนัยสำคัญ แต่อย่างไรก็ตามจำนวนเซลล์สลายกระดูกไม่ได้สูงเท่ากับในสภาวะที่ปราศจากเพปไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 (รูปที่ 5)

การแสดงออกของเพปไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 น่าจะอยู่ในตำแหน่งเดียวกับ TLR9

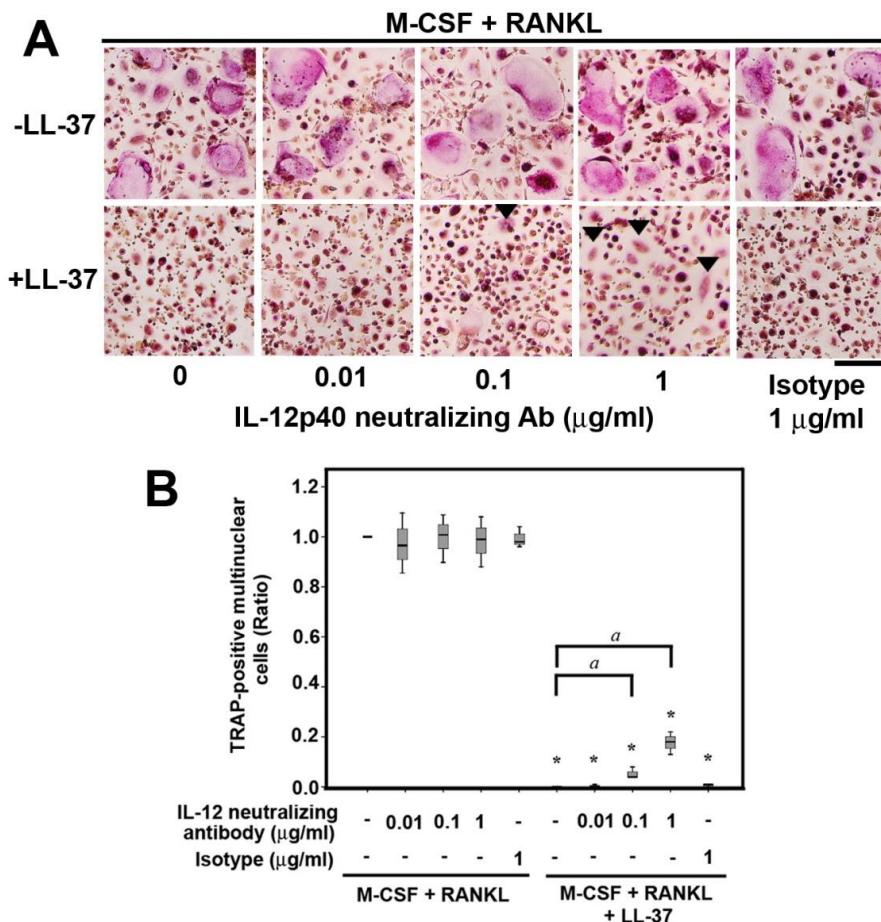
เพปไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 ถูกทำให้เข้าไปภายในเซลล์โดยกระบวนการ internalization โดยอาศัยการกระตุ้น A2A คาดว่าจะไปออกฤทธิ์บน TLR9 จึงทำการทดลองโดยสังเกตตำแหน่งการแสดงออกของเพปไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 และ TLR9 บนโมโนไซต์ที่ถูกกระตุ้นให้แปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูก เมื่อกระตุ้นครบ 5 วัน เซลล์จะถูกนำไปตรึงสภาพและถูกบ่มด้วยแอนติบอดีที่เกี่ยวข้อง และถูกตรวจการแสดงออกด้วยวิธี Immunofluorescence โดยการใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิด confocal ที่สามารถตรวจหาสัญญาณช่วงคลื่นการเรืองแสง พบว่ามีสัญญาณการเรืองแสงที่เกิดจากการติดสีสารเรืองแสง NorthernLights 493-conjugated anti-rabbit IgG บน rabbit anti-TLR9 polyclonal antibody (รูปที่ 6 แสงสีเขียว) ทั้งในเซลล์ที่อยู่ในสภาวะที่มีและปราศจากเพปไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 ปริมาณ 6 ไมโครโมลาร์ในระหว่างการกระตุ้นโมโนไซต์ให้แปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูกด้วย M-CSF และ RANKL ไปแล้ว 5 วัน ในขณะที่มีสัญญาณการเรืองแสงที่เกิดจากการติดสีสารเรืองแสง NorthernLights 557-conjugated anti-mouse IgG บน mouse anti-LL-37 monoclonal antibody เพียงในกลุ่มเซลล์ที่ได้รับการเติมเพปไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 (รูปที่ 6 แสงสีแดง) เท่านั้น และเมื่อนำภาพที่มีสัญญาณของการเรืองแสงทั้งสองช่วงคลื่นมาซ้อนทับกัน พบว่ามีสัญญาณซ้อนทับกัน (รูปที่ 6 แสงสีเหลือง)



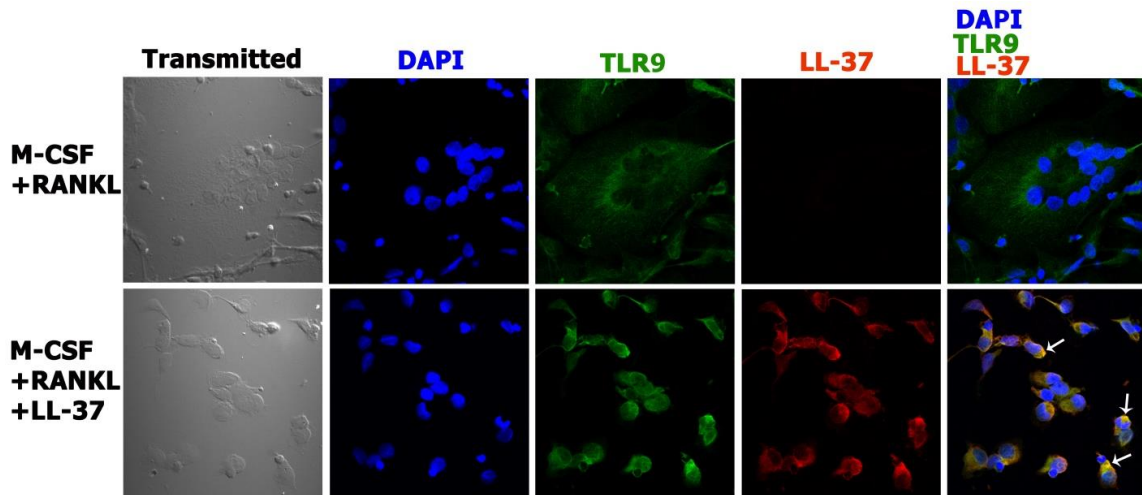
รูปที่ 3 การศึกษาการต้านฤทธิ์ของ ODN TTAGGG ชนิดที่เป็นสารปฏิชีวนะต่อตัวกระตุ้น TLR 9 เมื่อทำการกระตุ้นการแปรสภาพโมโนไซต์เป็นเซลล์สลายกระดูกด้วย M-CSF และ RANKL ในสถานะที่มีหรือปราศจากเพปไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 ปริมาณ 6 ไมโครโมลาร์ โดยใช้ ODN TTAGGG หลอกเป็นสารควบคุม เซลล์ถูกเลี้ยงบนวัสดุพลาสติกเป็นระยะเวลา 7 วัน แล้วนำไปสังเกตจำนวนเซลล์ที่แปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูก ภาพของการแปรสภาพเซลล์ที่ถูกเลี้ยงในห้องปฏิบัติการที่มีหรือปราศจากเพปไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 เมื่อถูกตรึงสภาพและถูกนำไปย้อมสีทางเคมีพิเศษสำหรับการแสดงออกของเอนไซม์ TRAcP (สีม่วงแดง) ที่จำเพาะต่อเซลล์สลายกระดูก และถูกย้อมเพื่อสังเกตการแสดงออกของ PCNA ที่แสดงตำแหน่งของนิวเคลียส แท่งสีดำแนวนอนแสดงสัดส่วนระยะ 100 ไมครอน ที่มุมขวาบนเป็นภาพการลงจุดแบบกล่อง (Box plot) สัดส่วนจำนวนเซลล์ที่แปรสภาพไปเป็นเซลล์สลายกระดูกในแต่ละกลุ่มที่มีหรือปราศจากเพปไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 และที่มี ODN ชนิดต้านและชนิดหลอก โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นด้วย เพปไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 (relative ratio) เครื่องหมาย + คือสถานะที่มีสารกระตุ้น เครื่องหมาย - คือสถานะที่ไม่มีสารกระตุ้น แท่งบอกความคลาดเคลื่อน (error bar) แสดงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) สัญลักษณ์ * แทนการเปรียบเทียบความน่าจะเป็นของความแตกต่างกันระหว่างกลุ่ม (p-value) น้อยกว่า 0.05 โดยทำการศึกษาจากเซลล์จำนวน 3 ชุด



รูปที่ 4 ภาพการลงจุดแบบกล่อง (Box plot) แสดงผลการศึกษาฤทธิ์ของเพปไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการหลั่ง IL-12p40 ของโมโนไซต์ระหว่างที่ถูกชักนำให้แปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูกด้วย M-CSF และ RANKL ที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังจากกระตุ้น IL-12p40 ในสารละลายเพาะเลี้ยงเซลล์ถูกวัดเป็นปริมาณหน่วยฟิโคกรัมต่อมิลลิลิตร (pg/ml) โดยวิธี ELISA ที่คำนวณได้จากเส้นมาตรฐานที่ทราบค่าความเข้มข้นของ IL-12p40 แท่งบอกความคลาดเคลื่อน (error bar) แสดงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เส้นแนวนอนภายในกล่องแทนค่ากลาง (median) เส้นแนวนอนขอบบนและล่างของกล่องแทนช่วงระหว่างควอไทล์ สัญลักษณ์ * แทนการเปรียบเทียบความน่าจะเป็นของความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุม (p-value) น้อยกว่า 0.05 *a* แทนการเปรียบเทียบความน่าจะเป็นของความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่มีความเข้มข้นของเพปไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 ต่าง ๆ (p-value) น้อยกว่า 0.05 โดยทำการศึกษาจากเซลล์จำนวน 4 ชุด



รูปที่ 5 การศึกษาฤทธิ์ของ IL-12p40 neutralizing antibody ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการแปรสภาพของ ไมโนไซต์เป็นเซลล์สลายกระดูกด้วย M-CSF และ RANKL ในสภาวะที่มีหรือปราศจากเพ็พไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 ปริมาณ 8 ไมโครโมลาร์ โดยใช้ IgG1 isotype เป็นสารควบคุม เซลล์ถูกเลี้ยงบนวัสดุ พลาสติกเป็นระยะเวลา 7 วัน แล้วนำไปสังเกตจำนวนเซลล์ที่แปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูก A) ภาพของการแปรสภาพเซลล์ที่ถูกเลี้ยงในห้องปฏิบัติการที่มีหรือปราศจากเพ็พไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 และมีระดับความเข้มข้นของ IL-12p40 neutralizing antibody ต่าง ๆ เมื่อเซลล์ถูกเลี้ยงครบ 7 วันเซลล์จะถูกตรึงสภาพและถูกนำไปย้อมสีทางเคมีพิเศษสำหรับการแสดงออกของเอนไซม์ TRAcP (สีม่วงแดง) ที่จำเพาะต่อเซลล์สลายกระดูก และถูกย้อมเพื่อสังเกตการแสดงออกของ PCNA ที่แสดงตำแหน่งของ นิวเคลียส แท่งสีดำแนวนอนแสดงสัดส่วนร้อยละ 100 ไมครอน B) ภาพการลงจุดแบบกล่อง (Box plot) สัดส่วนจำนวนเซลล์ที่แปรสภาพไปเป็นเซลล์สลายกระดูกในแต่ละกลุ่มที่มีหรือปราศจากเพ็พไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 และมีระดับความเข้มข้นของ IL-12p40 neutralizing antibody ต่าง ๆ โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นด้วย IL-12p40 neutralizing antibody (relative ratio) เครื่องหมาย + คือสภาวะที่มีสารกระตุ้น เครื่องหมาย - คือสภาวะที่ไม่มีสารกระตุ้น แท่งบอกความคลาดเคลื่อน (error bar) แสดงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) สัญลักษณ์ * แทนการเปรียบเทียบความน่าจะเป็นของความแตกต่างกันระหว่างกลุ่ม (p-value) น้อยกว่า 0.05 โดยทำการศึกษาจากเซลล์จำนวน 4 ชุด



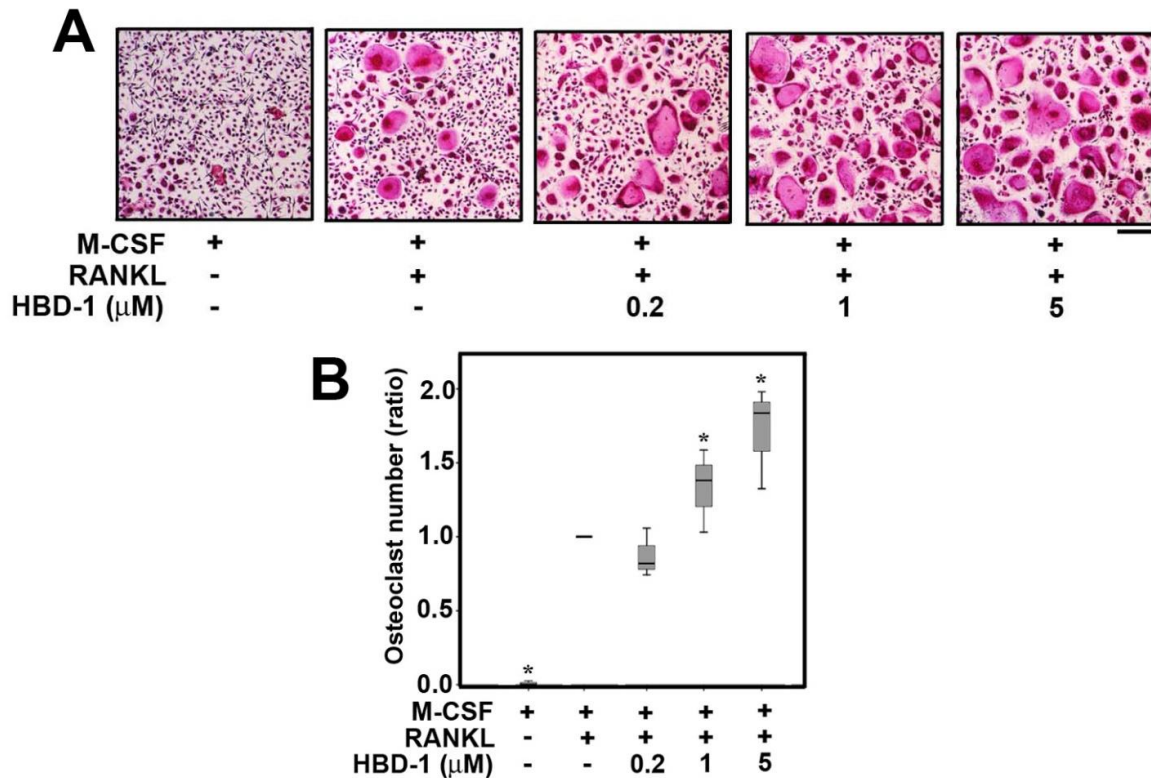
รูปที่ 6 ภาพถ่ายตัวแทนภาพจากกล้องจุลทรรศน์ชนิด confocal เพื่อสังเกตสัญญาณของคลื่นแสงที่เกิดจากการทำ Immunofluorescence บนโมโนไซต์ที่ถูกกระตุ้นให้แปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูกในสภาวะที่มีหรือปราศจากเพปไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 ปริมาณ 6 ไมโครโมลาร์ เซลล์ถูกเลี้ยงบนวัสดุแก้วเป็นระยะเวลา 5 วัน แล้วถูกตรึงสภาพและนำไปย้อม ตำแหน่งของนิวเคลียสถูกย้อมให้เกิดสัญญาณการเรืองแสงด้วย DAPI (สัญญาณสีน้ำเงิน) ในขณะที่ TLR9 ถูกสังเกตสัญญาณโดยการป่นด้วยการติดสีสารเรืองแสง NorthernLights 493-conjugated anti-rabbit IgG (1:1000) บน rabbit anti-TLR9 polyclonal antibody (1:500) (สัญญาณสีเขียว) และเพปไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 ถูกสังเกตสัญญาณโดยการป่นด้วยการติดสีสารเรืองแสง NorthernLights 557-conjugated anti-mouse IgG (1:1000) บน mouse anti-LL-37 monoclonal antibody (1:500) (สัญญาณสีแดง) ภาพแนวตั้งขวาสุดเป็นภาพที่เกิดจากการซ้อนทับกันเพื่อสังเกตตำแหน่งของทั้งสองสัญญาณ โดยตำแหน่งที่มีสัญญาณซ้อนทับกันถูกแสดงโดยสีเหลือง เครื่องหมายลูกศรชี้ไปยังเซลล์ที่มีการแสดงสัญญาณการซ้อนทับในตำแหน่งเดียวกัน โดยทำการศึกษาจากเซลล์จำนวน 3 ชุด

เพปไทด์ต้านจุลชีพ HBD-1 ออกฤทธิ์ส่งเสริมการแปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูก

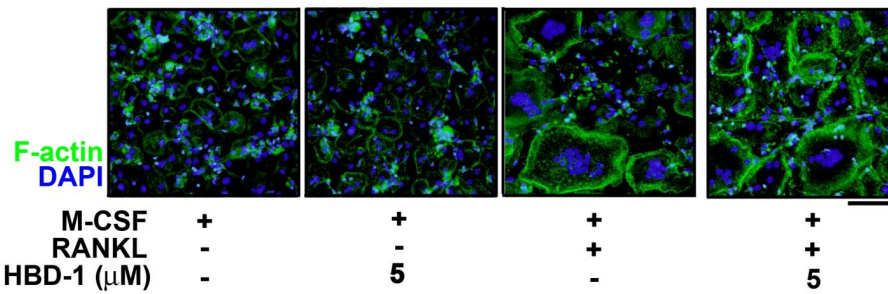
เพปไทด์ต้านจุลชีพ HBD-1 ปริมาณ 0.2 ไมโครโมลาร์ 1 ไมโครโมลาร์ และ 5 ไมโครโมลาร์ ถูกนำมาใช้กระตุ้นร่วมกับการกระตุ้นให้เกิดการแปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูก สังเกตได้ว่าเมื่อใส่ M-CSF เพียงอย่างเดียวไม่สามารถชักนำให้เกิดการแปรสภาพให้เป็นเซลล์สลายกระดูกที่สมบูรณ์ได้เลยเมื่อเทียบกับการกระตุ้นด้วย M-CSF และ RANKL ดังนั้นจึงสามารถใช้วิธีนี้ในการศึกษาฤทธิ์ของเพปไทด์ต้านจุลชีพ HBD-1 ได้ พบว่าเพปไทด์ต้านจุลชีพ HBD-1 ปริมาณตั้งแต่ 1-5 ไมโครโมลาร์ สามารถออกฤทธิ์ส่งเสริมให้มีจำนวนเซลล์สลายกระดูกมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่เพปไทด์ต้านจุลชีพ HBD-1 ปริมาณ 0.2 ไมโครโมลาร์ ไม่มีฤทธิ์ต่อจำนวนของเซลล์สลายกระดูกเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นด้วยเพปไทด์ต้านจุลชีพ HBD-1 (รูปที่ 7)

ปัจจัยสำคัญของการทำหน้าที่สลายกระดูกของเซลล์สลายกระดูกคือความสามารถในการยึดเกาะกับเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ต้องอาศัยโครงสร้างเส้นใยแอกติน (Filamentous actin, F-actin) เพ็พไทด์ต้านจุลชีพ HBD-1 ปริมาณความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ถูกนำไปกระตุ้นระหว่างเซลล์โมโนไซต์ที่ถูกชักนำให้แปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูกและสังเกตการแสดงออกของเส้นใยแอกติน เมื่อเซลล์กลุ่มควบคุมที่ถูกกระตุ้นเพียง M-CSF และ RANKL จนพัฒนาเป็นเซลล์สลายกระดูกในวันที่ 7 ถูกนำไปตรึงสภาพและย้อมการติดสีเรืองแสงที่นิวเคลียสด้วย DAPI และแอกตินด้วย Phalloidine พบว่าเซลล์มีการแสดงออกของเส้นใยแอกตินที่ชัดเจนมากกว่าเซลล์กลุ่มที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นด้วย RANKL ในขณะที่เซลล์กลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยเพ็พไทด์ต้านจุลชีพ HBD-1 ยังคงมีสัญญาณการแสดงออกของเส้นใยแอกตินคล้ายคลึงกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม (รูปที่ 8)

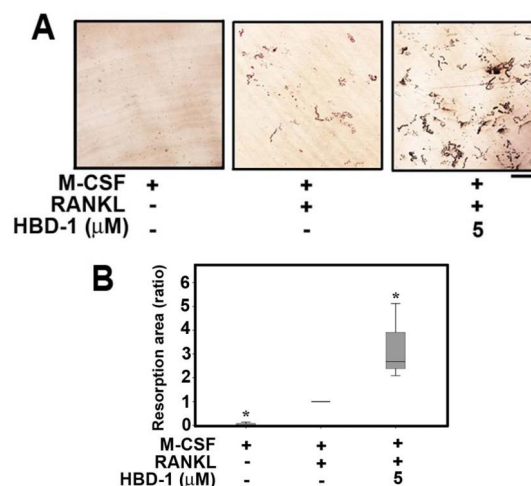
การทำหน้าที่ย่อยสลายกระดูกของเซลล์สลายกระดูกที่ถูกกระตุ้นแปรสภาพมาจากโมโนไซต์โดย M-CSF และ RANKL ในสภาวะที่มีเพ็พไทด์ต้านจุลชีพ HBD-1 ถูกทดสอบด้วยการเลี้ยงเซลล์โมโนไซต์ให้ถูกกระตุ้นด้วย M-CSF และ RANKL บนเนื้อพื้นเป็นระยะเวลา 14 วันแล้วสังเกตปริมาณพื้นที่ของหลุมที่เกิดจากการย่อยโดยเซลล์ที่ถูกพัฒนาเป็นเซลล์สลายกระดูก ในกลุ่มที่ถูกกระตุ้นเพียง M-CSF ไม่พบหลุมที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายของเซลล์ ในขณะที่ในสภาวะที่มีเพ็พไทด์ต้านจุลชีพ HBD-1 ปริมาณ 5 ไมโครโมลาร์จะมีปริมาณของหลุมถูกย่อยมากกว่าในสภาวะที่ไม่มีเพ็พไทด์ต้านจุลชีพ HBD-1 แต่ได้ถูกกระตุ้นด้วย M-CSF และ RANKL (รูปที่ 9)



รูปที่ 7 การศึกษาผลของเพปไทด์ต้านจุลชีพ HBD-1 ความเข้มข้น 0.2 ความเข้มข้น 1 และความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ต่อการแปรสภาพของเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สลายกระดูก เซลล์ถูกเลี้ยงบนวัสดุพลาสติกเป็นระยะเวลา 7 วัน แล้วนำไปสังเกตจำนวนเซลล์ที่แปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูก A) ภาพของการแปรสภาพเซลล์ที่ถูกเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเมื่อถูกกระตุ้นหรือไม่ถูกด้วยเพปไทด์ต้านจุลชีพ HBD-1 ในสภาวะที่มี M-CSF และ RANKL เมื่อเซลล์ถูกเลี้ยงครบ 7 วันเซลล์จะถูกตรึงสภาพและถูกนำไปย้อมสีทางเคมีพิเศษสำหรับการแสดงออกของเอนไซม์ TRAcP (สีม่วงแดง) ที่จำเพาะต่อเซลล์สลายกระดูก และถูกย้อมเพื่อสังเกตการแสดงออกของ PCNA ที่แสดงตำแหน่งของนิวเคลียส แท่งสีดำแนวนอนแสดงสัดส่วนระยะ 100 ไมครอน B) ภาพการลงจุดแบบกล่อง (Box plot) แสดงปริมาณสัดส่วนจำนวนเซลล์ที่แปรสภาพไปเป็นเซลล์สลายกระดูกในแต่ละกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยเพปไทด์ต้านจุลชีพ HBD-1 ปริมาณต่าง ๆ โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นด้วยเพปไทด์ต้านจุลชีพ HBD-1 (relative ratio) เครื่องหมาย + คือสภาวะที่มีสารกระตุ้น เครื่องหมาย - คือสภาวะที่ไม่มีสารกระตุ้น แท่งบอกความคลาดเคลื่อน (error bar) แสดงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) สัญลักษณ์ * แทนการเปรียบเทียบความน่าจะเป็นของความแตกต่างกันระหว่างกลุ่ม (p-value) น้อยกว่า 0.05 โดยทำการศึกษาจากเซลล์จำนวน 3 ชุด



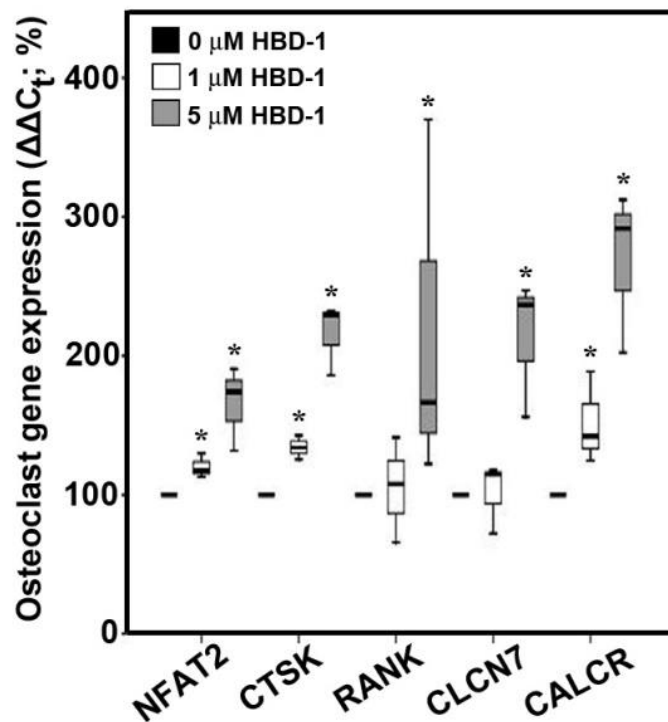
รูปที่ 8 การศึกษาผลของเพปไทด์ต้านจุลชีพ HBD-1 ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ต่อการแสดงออกของเส้นใยแอคตินของเซลล์โมโนไซต์ที่ถูกชักนำให้แปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูก เซลล์ถูกเลี้ยงบนแผ่นวัสดุแก้วเป็นระยะเวลา 7 วัน แล้วนำไปสังเกตจำนวนเซลล์ที่แปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูก ภาพของการแปรสภาพเซลล์ที่ถูกเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเมื่อถูกกระตุ้นหรือไม่ถูกด้วยเพปไทด์ต้านจุลชีพ HBD-1 ในสภาวะที่มี M-CSF หรือ RANKL เมื่อเซลล์ถูกเลี้ยงครบ 7 วันเซลล์จะถูกตรึงสภาพและถูกนำไปย้อมสารเรืองแสงสำหรับการแสดงออกของเกลียวคู่ของสายกรดนิวคลีอิกในนิวเคลียสด้วย DAPI (สีน้ำเงิน) และการแสดงออกของเส้นใยแอคตินด้วย phalloidine (สีเขียว) แท่งสีดำแนวนอนแสดงสัดส่วนระยะ 100 ไมครอน เครื่องหมาย + คือสภาวะที่มีสารกระตุ้น เครื่องหมาย - คือสภาวะที่ไม่มีสารกระตุ้น



รูปที่ 9 แสดงผลการศึกษาฤทธิ์ของเพปไทด์ต้านจุลชีพ HBD-1 ต่อการทำหน้าที่ย่อยเนื้อฟันของเซลล์สลายกระดูก A) ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบย้อนกลับของแผ่นเนื้อฟันที่ถูกสังเกตหลุมย่อยโดยการย้อมด้วยหมึกดำภายหลังจากเลี้ยงเซลล์โมโนไซต์กลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย M-CSF เพียงอย่างเดียว กลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย M-CSF และ RANKL และกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย M-CSF RANKL และเพปไทด์ต้านจุลชีพ HBD-1 ปริมาณ 5 ไมโครโมลาร์ B) ภาพการลงจุดแบบกล่อง (Box plot) แสดงสัดส่วนปริมาณพื้นที่หลุมที่เกิดจากการย่อยโดยเซลล์ที่ได้รับสภาวะการกระตุ้นด้วย M-CSF RANKL และเพปไทด์ต้านจุลชีพ HBD-1 ปริมาณ 5 ไมโครโมลาร์ที่แตกต่างกัน โดยเทียบกับสภาวะที่มี M-CSF และ RANKL เครื่องหมาย + คือสภาวะที่มีสารกระตุ้น เครื่องหมาย - คือสภาวะที่ไม่มีสารกระตุ้น แท่งบอกความคลาดเคลื่อน (error bar) แสดงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) สัญลักษณ์ * แทนการเปรียบเทียบความน่าจะเป็นของความแตกต่างกันระหว่างกลุ่ม (p-value) น้อยกว่า 0.05 โดยทำการศึกษาจากเซลล์จำนวน 3 ชุด

เพ็พไทด์ต้านจุลชีพ HBD-1 กระตุ้นการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับหน้าที่ของเซลล์สลายกระดูก

เพื่อศึกษาการกระตุ้นการแปรสภาพเซลล์โมโนไซต์เป็นเซลล์สลายกระดูกของเพ็พไทด์ต้านจุลชีพ HBD-1 นอกจากสังเกตลักษณะทางกายภาพของเซลล์แล้ว การเปลี่ยนแปลงในระดับโมเลกุลทำให้สามารถยืนยันการแปรสภาพได้ชัดเจนมากขึ้น ยีนที่เกี่ยวข้องกับการทำหน้าที่ของเซลล์สลายกระดูก ได้แก่ ยีน nuclear factor of activated T cells 1 (NFAT2 or NFATc1) ยีน Cathepsin K (CTSK) ยีน Receptor activator of nuclear factor kappa-**B** (RANK) ยีน H⁺/Cl⁻ exchange transporter 7 (CLCN7) ยีน Calcitonin receptor (CALCR) ถูกศึกษาการแสดงออกในระดับ RNA ในขณะที่โมโนไซต์ถูกกระตุ้นเป็นเซลล์สลายกระดูกด้วย M-CSF และ RANKL ในสภาวะที่ปราศจากเพ็พไทด์ต้านจุลชีพ HBD-1 (กลุ่มควบคุม) หรือมีเพ็พไทด์ต้านจุลชีพ HBD-1 ปริมาณ 1 ไมโครโมลาร์ หรือปริมาณ 5 ไมโครโมลาร์ เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นถึงวันที่ 5 พบว่า RNA ของยีนที่เกี่ยวข้องดังกล่าวทุกยีนมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ในสภาวะที่มีเพ็พไทด์ต้านจุลชีพ HBD-1 ปริมาณ 5 ไมโครโมลาร์ เมื่อเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุม ในขณะที่เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยเพ็พไทด์ต้านจุลชีพ HBD-1 ปริมาณ 1 ไมโครโมลาร์มีการแสดงออกของยีน NFAT2 CTSK และ CALCR ในระดับ RNA สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) (รูปที่ 10)



รูปที่ 10 ภาพการลงจุดแบบกล่อง (Box plot) แสดงผลการศึกษาฤทธิ์ของเพปไทด์ต้านจุลชีพ HBD-1 ต่อระดับการแสดงออกของชุดยีนในระดับ RNA ที่เป็ยเือกลักษณ์ของเซลล์สลายกระดูกเทียบกับยีนมาตรฐานภายในเซลล์ ($\Delta\Delta C_t$) ได้แก่ ยีน NFAT2 CTSK RANK CLCN7 และ CALCR ในสภาวะที่เซลล์โมโนไซต์ถูกกระตุ้นเป็นเซลล์สลายกระดูกด้วย M-CSF และ RANKL ที่ปราศจากเพปไทด์ต้านจุลชีพ HBD-1 (กลุ่มควบคุม) ซึ่งถูกตั้งค่าการแสดงออกเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ หรือในสภาวะที่มีเพปไทด์ต้านจุลชีพ HBD-1 ปริมาณ 1 ไมโครโมลาร์ (กล่องว่าง) และในสภาวะที่มีเพปไทด์ต้านจุลชีพ HBD-1 ปริมาณ 5 ไมโครโมลาร์ (กล่องทึบ) ในวันที่ 5 ของการกระตุ้น แท่งบอกความคลาดเคลื่อน (error bar) แสดงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เส้นแนวนอนภายในกล่องแทนค่ากลาง (median) เส้นแนวนอนขอบบนและล่างของกล่องแทนช่วงระหว่างควอไทล์ สัญลักษณ์ * แทนการเปรียบเทียบความน่าจะเป็นของความแตกต่างกันระหว่างกลุ่ม (p-value) น้อยกว่า 0.05 โดยทำการศึกษาจากเซลล์จำนวน 4 ชุด

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง และข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

เพ็พไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 หรือแคทเธลิซิน (Cathelicidin) เป็นสารชีวโมเลกุลที่มีสายโพลีเพ็พไทด์ขนาดเล็ก มีน้ำหนักโมเลกุลจากการคำนวณประมาณ 4,493 ดาลตัน จากการศึกษาคุณสมบัติทางชีววิทยาในระยะเริ่มการค้นพบเพ็พไทด์ชนิดนี้คือทำหน้าที่ต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ จึงถูกจัดกลุ่มอยู่ในสารชีวโมเลกุลที่ต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ แต่ในระยะหลังมีการศึกษาที่แสดงคุณสมบัติต่อการทำงานของเซลล์ของร่างกายมนุษย์ เช่น กระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ กระตุ้นการสร้างเซลล์ผิวหนังใหม่ กระตุ้นการสร้างหลอดเลือดใหม่(Ramos, Silva et al. 2011) เป็นต้น

กระดูกเป็นอวัยวะที่มีอยู่ทั่วร่างกายไม่ว่าจะเป็นมนุษย์หรือสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นในตระกูลสัตว์มีกระดูกสันหลัง กระดูกประกอบด้วยเซลล์และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่มีการสะสมแร่ธาตุ กระดูกมีลักษณะเฉพาะคือสามารถถูกปรับเปลี่ยนสภาพ (remodeling) ได้อยู่ตลอดเวลา (dynamic) ที่เกิดจากการทำงานประสานกันของเซลล์กระดูก ได้แก่ เซลล์สร้างกระดูก เซลล์สลายกระดูก และเซลล์กระดูก บทบาทของเพ็พไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 ต่อการขบวนการสรีรวิทยาของกระดูกได้ถูกศึกษาในภายหลังจากคุณสมบัติต้านจุลชีพ นับตั้งแต่เริ่มมีการศึกษาความสัมพันธ์ของระดับเพ็พไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 ที่ลดลงในโรคปริทันต์อักเสบชนิดรุนแรงที่ส่งผลให้เกิดการสลายกระดูกเข้าฟัน จากนั้นมีการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าเพ็พไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 มีฤทธิ์ในการต้านการแปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูก(Supanchart, Thawanaphong et al. 2012) อย่างไรก็ตามยังไม่มีการวิจัยใดที่ศึกษาฤทธิ์ของเพ็พไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 ในขณะที่เซลล์โมโนไซต์กำลังถูกกระตุ้นให้แปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูก การศึกษานี้พบว่าเพ็พไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 ปริมาณ 6 ไมโครโมลาร์สามารถออกฤทธิ์ขัดขวางการแปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูกในระยะแรกของการขบวนการแปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูก และเมื่อเซลล์ได้แปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูกแล้ว เพ็พไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 ไม่สามารถออกฤทธิ์เปลี่ยนแปลงเซลล์สลายกระดูกให้กลับไปมีสภาพเป็นเซลล์ที่มีลักษณะนิวเคลียสเดี่ยวได้

กระบวนการประสานเซลล์ (Cell fusion) เป็นกระบวนการสำคัญของการแปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูกที่เต็มวัย เกิดขึ้นในระยะท้าย ๆ ของการแปรสภาพ ทำให้เซลล์สลายกระดูกมีลักษณะเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ (Giant cell) ที่ประกอบด้วยหลายนิวเคลียส กระบวนการนี้เกิดขึ้นได้จากการกระตุ้นของ RANKL ผ่านไปกระบวนการภายในเซลล์ที่ต้องอาศัยการเคลื่อนโมเลกุล NFATC1 เข้าไปในนิวเคลียสเพื่อถอดรหัสพันธุกรรมของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเซลล์สลายกระดูก ดังนั้นเมื่อมีการ

แสดงออกและเกิดการทำหน้าที่ของ NFATc1 แล้วจึงทำให้เซลล์โมโนไซต์แปรสภาพการทำหน้าที่ไปเป็นเซลล์สลายกระดูก โมเลกุล DC-STAMP เป็นโปรตีนบนเยื่อหุ้มที่มีบทบาทต่อการประสานเซลล์ ถูกควบคุมการแสดงออกด้วย NFATc1 (Song, Kim et al. 2009)

เพปไทด์ด้านจุลชีพ HBD-1 ถูกเลือกจากกลุ่มสารเพปไทด์ด้านจุลชีพนอกเหนือจากเพปไทด์ด้านจุลชีพแอลแอล-37 เพื่อนำมาใช้ศึกษาเพื่อสังเกตการออกฤทธิ์ต่อกระบวนการแปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูก กลไกการออกฤทธิ์ด้านเชื้อจุลินทรีย์ของเพปไทด์ด้านจุลชีพแอลแอล-37 อาศัยหมู่เพปไทด์ไลซีนและลิวซีนที่เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ของโมเลกุลที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ เพปไทด์ด้านจุลชีพแอลแอล-37 ยังมีฤทธิ์ในการลดความสามารถในการยึดเกาะบนผิวต่าง ๆ ของแบคทีเรีย และทำให้แบคทีเรียเหล่านั้นเกาะเป็นกลุ่มก้อนกันเอง (Hell, Giske et al. 2010) นอกจากนี้ยังลดการสร้างไบโอฟิล์มจากแบคทีเรียได้โดยยับยั้งขบวนการสังเคราะห์ rhamnolipid ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของไบโอฟิล์ม (Kanthawong, Bolscher et al. 2010) เพปไทด์ด้านจุลชีพ HBD-1 นั้นมีการศึกษาที่แสดงสมบัติการมีประจุบวกของโมเลกุลนี้ส่งผลกระทบต่อความสามารถในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ (Pazgier, Hoover et al. 2006) ดังนั้นจึงสันนิษฐานได้ว่าการออกฤทธิ์ยับยั้งการแปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูกของเพปไทด์ด้านจุลชีพแอลแอล-37 ไม่น่าสัมพันธ์กับความเป็นประจุบวกของโมเลกุล

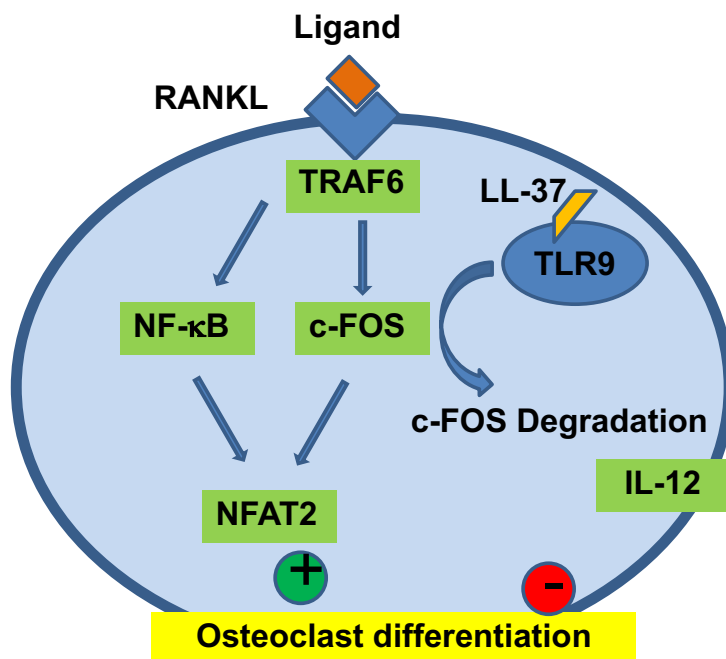
จากผลการทดลองเพื่อศึกษาการแปรสภาพของเซลล์โมโนไซต์เป็นเซลล์สลายกระดูกที่มีสภาวะปรากฏของเพปไทด์ด้านจุลชีพ HBD-1 พบว่าเพปไทด์นี้ไม่สามารถยับยั้งการแปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูกได้ซึ่งตรงกันข้ามกับผลของเพปไทด์ด้านจุลชีพ LL-37 แต่ยังทำหน้าที่กระตุ้นการสร้างเซลล์สลายกระดูกได้มากกว่ากลุ่มควบคุมโดยสังเกตจากจำนวนของเซลล์ขนาดใหญ่ที่มีหลายนิวเคลียส มีการแสดงออกของเอนไซม์ TRAcP และมีการสร้างวงแหวนเส้นใยแอคตินที่ถูกใช้เป็นลิ้งค์ยึดของการทำหน้าที่ย่อยกระดูกของเซลล์สลายกระดูก (Garbe, Roscher et al. 2012, Takito, Otsuka et al. 2015)

การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการแปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูก NFATc1 หรือถูกเรียกว่า NFAT2 (Matsuo, Galson et al. 2004, Kim, Kim et al. 2005) ซึ่งเป็นยีนที่สร้างโมเลกุล NFAT2 ที่ทำหน้าที่กระตุ้นการถอดรหัสของยีนที่เป็นเอกลักษณ์และเกี่ยวข้องกับการทำงานของเซลล์สลายกระดูก การกระตุ้นด้วยเพปไทด์ด้านจุลชีพ HBD-1 ปริมาณ 1 และ 5 ไมโครโมลาร์ทำให้มีการแสดงออกของ NFATc1 มากขึ้น แสดงว่าเพปไทด์ด้านจุลชีพ HBD-1 มีบทบาทในการกระตุ้นให้เซลล์โมโนไซต์สามารถเริ่มต้นแปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูกได้ โปรตีน NFATc1 ที่ถูกสร้างจะกลับเข้าสู่นิวเคลียสเพื่อไปกระตุ้นการแสดงออกของยีนตัวเองอีกทีเรียกว่า (autoamplification) (Takayanagi

2007) รวมถึงยีนที่ทำหน้าที่ของเซลล์สลายกระดูก เช่น CTSK CLCN7 RANK CALCR เป็นต้น CTSK เป็นยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีน Cathepsin K ซึ่งเป็นโมเลกุล protease สำคัญที่ทำหน้าที่ช่วยย่อยโปรตีนเมทริกซ์นอกเซลล์ (Extracellular matrix) หลายชนิดที่เป็นส่วนประกอบของกระดูก (Bossard, Tomaszek et al. 1996) CLCN7 เป็นยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีน CIC-7 ที่เป็นโมเลกุลบนเมมเบรนของไลโซโซมซึ่งเป็นออร์แกเนลล์ภายในเซลล์ที่บรรจุโมเลกุลต่าง ๆ โดยเฉพาะโปรตอน H⁺ ที่ใช้ในการย่อยสลายกระดูก CIC-7 ถูกเชื่อว่าทำหน้าที่ควบคุมการเคลื่อนที่ของประจุ Cl⁻ ที่ผิวเมมเบรนเพื่อรักษาสสมดุลไอออนให้มีเสถียรภาพระหว่างการเคลื่อนที่ประจุ H⁺ เข้าไปยังไลโซโซม อีกทั้งยังทำหน้าที่แลกเปลี่ยนประจุ 2H⁺/Cl⁻ บนไลโซโซมอีกด้วย (Weinert, Jabs et al. 2010) การกระตุ้นด้วย เพ็พไทด์ด้านจุลชีพ HBD-1 ปริมาณ 5 ไมโครโมลาร์ มีส่วนในการกระตุ้นให้มีการแสดงออกของยีน CTSK และ CLCN7 ทำให้ทราบว่าเพ็พไทด์ด้านจุลชีพ HBD-1 ส่งผลต่อการสังเคราะห์โปรตีน Cathepsin และ CIC-7 ที่ทำหน้าที่ช่วยย่อยกระดูก เซลล์สลายกระดูกมีโปรตีนที่อาศัยบนเยื่อหุ้มเซลล์เพื่อทำหน้าที่รับสัญญาณจากโมเลกุลนอกเซลล์ เช่น RANK CALCR เป็นต้น RANK เป็นโปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์ที่รับสัญญาณจากตัวกระตุ้น Ligand ที่ปล่อยมาจากเซลล์สร้างกระดูกคือ RANKL ที่ทำให้เกิดสัญญาณภายในเซลล์ไปกระตุ้นให้เกิดการแปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูกได้ เพ็พไทด์ด้านจุลชีพ HBD-1 ปริมาณ 5 ไมโครโมลาร์สามารถกระตุ้นให้มีการแสดงออกของ RANK จึงส่งผลให้เกิดการรับสัญญาณจาก RANKL ได้มากขึ้น ส่งผลให้เกิดกระแสสัญญาณภายในเซลล์เพียงพอต่อกระบวนการแปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูกหรืออาจเร่งให้เกิดการแปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูกได้มากขึ้น CALCR เป็นยีนที่กำหนดการสังเคราะห์โปรตีน calcitonin receptor ที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ ทำหน้าที่รับสัญญาณจากฮอร์โมน calcitonin ส่งผลต่อเซลล์สลายกระดูกไม่สามารถหลั่ง sphingosine 1-phosphate (S1P) ที่เป็นโมเลกุลกดการสร้างกระดูกจากเซลล์สร้างกระดูก (Keller, Catala-Lehnen et al. 2014) ในระหว่างที่โมโนไซต์กำลังแปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูกและถูกกระตุ้นด้วยเพ็พไทด์ด้านจุลชีพ HBD-1 ทำให้มีระดับการแสดงออกของยีน CALCR สูงขึ้น จึงอาจส่งผลให้สามารถรับสัญญาณจาก calcitonin เพิ่มขึ้นและอาจเพิ่มอัตราการสร้างกระดูกโดยเซลล์สร้างกระดูกเร็วขึ้นได้

จากการทดลองกระตุ้นเซลล์โมโนไซต์ให้แปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูกบนเนื้อฟันเพื่อสังเกตการทำหน้าที่ย่อยสลายแร่ธาตุ เพ็พไทด์ด้านจุลชีพ HBD-1 สามารถกระตุ้นให้เกิดปริมาณการย่อยสลายแร่ธาตุสูงขึ้น ทั้งนี้เป็นเพราะเซลล์สลายกระดูกที่แปรสภาพมามีจำนวนมากขึ้นเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยเพ็พไทด์ด้านจุลชีพ HBD-1 ระหว่างกระบวนการแปรสภาพนั้น IL-12 เป็นโมเลกุลสื่อสารระหว่างเซลล์ที่สามารถยับยั้งการสร้างเซลล์สลายกระดูกได้ (Amcheslavsky and Bar-Shavit 2006)

การทดลองสังเกตระดับของ IL-12p40 เมื่อกระตุ้นด้วยเพปไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 ระหว่างที่กระตุ้น การแปรสภาพโมโนไซต์เป็นเซลล์สลายกระดูก พบว่ามีปริมาณสูงขึ้นตามความเข้มข้นของเพปไทด์ต้าน จุลชีพ LL-37 และเมื่อเติมสารต้านการทำงานของ IL-12p40 ไปมีจำนวนเซลล์สลายกระดูกสูงขึ้นเมื่อ เทียบกับกลุ่มควบคุม ดังนั้นจึงน่าจะเชื่อได้ว่ากระบวนการยับยั้งการแปรสภาพเซลล์สลายกระดูกจาก เพปไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 อาจใช้กลไกผ่านขั้นตอนการผลิตและปล่อย IL-12 ออกมาแล้วกลับมีผลต่อ เซลล์ตนเอง (รูปที่ 11) การศึกษาที่ผ่านมามีการแสดงให้เห็นถึงการขาด transcription factor c-FOS เป็นผลทำให้การแสดงออกของ IL-12 เพิ่มขึ้น (Roy, Charboneau et al. 1999) การสลายตัวของ c-FOS ส่วนหนึ่งมีผลมาจากการกระตุ้นผ่านโมเลกุลภายใน Toll-Like Receptor 9 (TLR9) ที่อยู่ในเซลล์ (Amcheslavsky and Bar-Shavit 2007) จากการทดลองเติม ODN ชนิดต้านต่อตัวกระตุ้น TLR9 ไป ระหว่างที่กระตุ้นด้วยเพปไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 ทำให้เซลล์กลับมามีขนาดใหญ่หลายนิวเคลียสและมีการแสดงออกของเอนไซม์ TRAcP ได้ จึงทำให้อาจเชื่อได้ว่าเพปไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 นั้นสามารถไป ทำหน้าที่กระตุ้นบน TLR9 ได้ และเมื่อทำการสังเกตตำแหน่งการแสดงออกของทั้งสองโมเลกุลโดยใช้ กล้องจุลทรรศน์ชนิด confocal พบว่ามีสัญญาณการแสดงออกในตำแหน่งที่ซ้อนทับกัน จึงสามารถถูก ทำให้เชื่อได้ว่าเพปไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 ไปออกฤทธิ์ได้ที่ TLR9 ได้ แต่อย่างไรก็ตามทางผู้วิจัยไม่ได้ ศึกษาในระดับของโมเลกุล c-FOS จึงไม่สามารถสรุปได้ชัดเจนว่าเพปไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 ส่งผลต่อ กระบวนการกระตุ้น TLR9 ผ่าน c-FOS



รูปที่ 11 ภาพวาดแสดงกลไกการด้านการแปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูกจาก RANKL ที่มีผลกระทบจากเพปไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 ที่อาจไปมีผลต่อตัวรับ TLR9 ภายในเซลล์โมโนไซต์ การกระตุ้นด้วยเพปไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 ที่จับบน TLR9 จะทำให้เกิดการสลายตัวของ c-FOS ที่จำเป็นต่อการชักนำให้ NFAT2 ทำหน้าที่แปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูก ในขณะเดียวกัน c-FOS ที่ถูกสลายไปจะชักนำให้มีการผลิต IL-12 แล้วมีผลกระทบในการยับยั้งการแปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูก

จากการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าเพปไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 ส่งผลต่อการรวมเซลล์ (Fusion) กันของเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สลายกระดูกโดยมีการลดลงของเซลล์ขนาดใหญ่หลายนิวเคลียส (Supanchart, Thawanaphong et al. 2012) จึงถูกเชื่อว่าเพปไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 น่าจะรบกวนกระบวนการรวมเซลล์ และมีการศึกษาผลของ adenosine ภายนอกเซลล์ที่สูงขึ้นส่งผลยับยั้งให้เกิดการรวมตัวของเซลล์นั้น (Pellegatti, Falzoni et al. 2011) ทำให้สามารถตั้งสมมติฐานได้ว่าเพปไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 อาจลดปริมาณ adenosine ที่อยู่ภายนอกเซลล์ได้ อย่างไรก็ตามตัวรับ P2X7 A2A subunit ถูกพบว่าเป็นตำแหน่งที่เมื่อถูกกระตุ้นจะทำให้เพปไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 สามารถถูกชักนำให้เข้าสู่ภายในเซลล์แมคโครฟาจได้ (Tang, Basavarajappa et al. 2015) เมื่อมีการกระตุ้นที่ตัวรับ A2A นี้จะส่งเสริมให้เพปไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 สามารถเคลื่อนที่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าสู่เซลล์เพื่อทำหน้าที่กำจัดเชื้อจุลินทรีย์ภายในเซลล์แมคโครฟาจได้ ตัวรับ A2A ส่งผลต่อเมตาบอลิซึมของกระดูกโดยในสภาวะที่มี adenosine สูงทำให้ A2A กระตุ้นการแสดงออกของ IL-10 ที่ทำให้เกิดการยับยั้งการแปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูกได้ (Csoka, Nemeth et al. 2007, Zhang, Chen et al. 2014) อีกทั้งยังสามารถลดการแสดงออกของ IL-1beta และ TNFalpha ซึ่งเป็นโมเลกุลที่กระตุ้นการแปรสภาพเป็น

เซลล์สลายกระดูก(Mediero, Kara et al. 2012) ในงานวิจัยนี้ทำการเติมสารกระตุ้นตัวรับ A2A ด้วย adenosine หรือ CGS21680 ในระหว่างกระตุ้นการแปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูกสามารถทำให้เพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งการแปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูก เป็นผลทั้งไปในทางเดียวกันกับการศึกษาของ Pellegatti ในปี 2011 และสอดคล้องกับการศึกษาของ Mediero จึงน่าจะสรุปได้ว่า adenosine สามารถกระตุ้นการรวมเซลล์ได้ แต่ไม่สามารถชดเชยการยับยั้งการแปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูกจากเพปไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 ได้ และทำให้ทราบว่าถึงแม้จะมีการเพิ่มการเคลื่อนของเพปไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 เข้าสู่โมโนไซต์โดยอาศัย adenosine หรือการกระตุ้น A2A ก็ไม่สามารถเร่งการแปรสภาพได้เช่นกัน

การออกฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการแปรสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูกโดยเพปไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 น่าจะสามารถถูกประยุกต์นำไปศึกษาต่อในร่างกายสิ่งมีชีวิตเพื่อสังเกตการขัดขวางการแปรสภาพของกระดูกโดยอาจส่งผลทำให้มีมวลกระดูกมากขึ้น ทั้งนี้เพปไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 เป็นโมเลกุลที่มีขนาดเล็ก สังเคราะห์ได้ง่าย และเป็นโมเลกุลที่สร้างจากธรรมชาติภายในสิ่งมีชีวิตอยู่แล้ว จึงน่าจะมีคุณสมบัติในการใช้รักษาโรคที่มีภาวะการทำลายกระดูก เช่น ภาวะกระดูกพรุน ภาวะที่มีการแพร่กระจายของมะเร็งไปที่กระดูก เป็นต้น ในทางตรงกันข้ามเพปไทด์ต้านจุลชีพ HBD-1 ที่มีฤทธิ์ส่งเสริมการสลายกระดูกจึงน่าจะถูกนำไปศึกษาต่อในร่างกายเพื่อสังเกตการสลายกระดูก ทั้งนี้หากเพปไทด์ต้านจุลชีพ HBD-1 มีฤทธิ์สลายกระดูกได้ดีกว่าภาวะปกติ จึงน่าจะถูกนำไปประยุกต์ใช้ในการเร่งกระบวนการสลายกระดูกในกรณีเช่น เร่งการเคลื่อนฟันช่วยให้การรักษาจัดฟันดำเนินไปเร็วขึ้น หรือใช้ในการก่อกำเนิดกระดูกย่อยสลายกระดูกในผู้ป่วยที่ได้รับ bisphosphonate ที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดภาวะกระดูกขากรรไกรตาย เป็นต้น

ภาคผนวก

รายการเอกสารอ้างอิง

1. Amcheslavsky, A. and Z. Bar-Shavit (2006). "Interleukin (IL)-12 mediates the anti-osteoclastogenic activity of CpG-oligodeoxynucleotides." *J Cell Physiol* **207**(1): 244–250.
2. Amcheslavsky, A. and Z. Bar-Shavit (2007). "Toll-like receptor 9 ligand blocks osteoclast differentiation through induction of phosphatase." *J Bone Miner Res* **22**(8): 1301–1310.
3. Bossard, M. J., T. A. Tomaszek, S. K. Thompson, B. Y. Amegadzie, C. R. Hanning, C. Jones, J. T. Kurdyla, D. E. McNulty, F. H. Drake, M. Gowen and M. A. Levy (1996). "Proteolytic activity of human osteoclast cathepsin K. Expression, purification, activation, and substrate identification." *J Biol Chem* **271**(21): 12517–12524.
4. Csoka, B., Z. H. Nemeth, L. Virag, P. Gergely, S. J. Leibovich, P. Pacher, C. X. Sun, M. R. Blackburn, E. S. Vizi, E. A. Deitch and G. Hasko (2007). "A2A adenosine receptors and C/EBPbeta are crucially required for IL-10 production by macrophages exposed to Escherichia coli." *Blood* **110**(7): 2685–2695.
5. Elssner, A., M. Duncan, M. Gavrilin and M. D. Wewers (2004). "A novel P2X7 receptor activator, the human cathelicidin-derived peptide LL37, induces IL-1 beta processing and release." *J Immunol* **172**(8): 4987–4994.
6. Garbe, A. I., A. Roscher, C. Schuler, A. H. Lutter, M. Glosmann, R. Bernhardt, M. Chopin, U. Hempel, L. C. Hofbauer, S. Rammelt, M. Egerbacher, R. G. Erben and R. Jessberger (2012). "Regulation of bone mass and osteoclast function depend on the F-actin modulator SWAP-70." *J Bone Miner Res* **27**(10): 2085–2096.
7. Hell, E., C. G. Giske, A. Nelson, U. Romling and G. Marchini (2010). "Human cathelicidin peptide LL37 inhibits both attachment capability and biofilm formation of Staphylococcus epidermidis." *Lett Appl Microbiol* **50**(2): 211–215.
8. Kanthawong, S., J. G. Bolscher, E. C. Veerman, J. van Marle, K. Nazmi, S. Wongratanacheewin and S. Taweechaisupapong (2010). "Antimicrobial activities of LL-37 and its truncated variants against Burkholderia thailandensis." *Int J Antimicrob Agents* **36**(5): 447–452.
9. Keller, J., P. Catala-Lehnen, A. K. Huebner, A. Jeschke, T. Heckt, A. Lueth, M. Krause, T. Koehne, J. Albers, J. Schulze, S. Schilling, M. Haberland, H. Denninger, M. Neven, I. Hermans-Borgmeyer, T. Streichert, S. Breer, F. Barvencik, B. Levkau, B. Rathkolb, E. Wolf, J. Calzada-Wack, F. Neff, V. Gailus-Durner, H. Fuchs, M. H. de Angelis, S. Klutmann, E. Tsourdi, L. C. Hofbauer, B. Kleuser, J. Chun, T. Schinke and M. Amling (2014). "Calcitonin controls bone formation by inhibiting the release of sphingosine 1-phosphate from osteoclasts." *Nat Commun* **5**: 5215.
10. Kim, K., J. H. Kim, J. Lee, H. M. Jin, S. H. Lee, D. E. Fisher, H. Kook, K. K. Kim, Y. Choi and N. Kim (2005). "Nuclear factor of activated T cells c1 induces osteoclast-associated receptor gene expression during tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine-mediated osteoclastogenesis." *J Biol Chem* **280**(42): 35209–35216.

11. Matsuo, K., D. L. Galson, C. Zhao, L. Peng, C. Laplace, K. Z. Wang, M. A. Bachler, H. Amano, H. Aburatani, H. Ishikawa and E. F. Wagner (2004). "Nuclear factor of activated T-cells (NFAT) rescues osteoclastogenesis in precursors lacking c-Fos." J Biol Chem **279**(25): 26475–26480.
12. Mediero, A., F. M. Kara, T. Wilder and B. N. Cronstein (2012). "Adenosine A(2A) receptor ligation inhibits osteoclast formation." Am J Pathol **180**(2): 775–786.
13. Pazgier, M., D. M. Hoover, D. Yang, W. Lu and J. Lubkowski (2006). "Human beta-defensins." Cellular and Molecular Life Sciences **63**(11): 1294–1313.
14. Pellegatti, P., S. Falzoni, G. Donvito, I. Lemaire and F. Di Virgilio (2011). "P2X7 receptor drives osteoclast fusion by increasing the extracellular adenosine concentration." FASEB J **25**(4): 1264–1274.
15. Ramos, R., J. P. Silva, A. C. Rodrigues, R. Costa, L. Guardao, F. Schmitt, R. Soares, M. Vilanova, L. Domingues and M. Gama (2011). "Wound healing activity of the human antimicrobial peptide LL37." Peptides **32**(7): 1469–1476.
16. Roy, S., R. Charboneau, K. Cain, S. DeTurris, D. Melnyk and R. A. Barke (1999). "Deficiency of the transcription factor c-fos increases lipopolysaccharide-induced macrophage interleukin 12 production." Surgery **126**(2): 239–247.
17. Song, I., J. H. Kim, K. Kim, H. M. Jin, B. U. Youn and N. Kim (2009). "Regulatory mechanism of NFATc1 in RANKL-induced osteoclast activation." FEBS Lett **583**(14): 2435–2440.
18. Supanchart, C., S. Thawanaphong, A. Makeudom, J. G. Bolscher, K. Nazmi, U. Kornak and S. Krisanaprakornkit (2012). "The antimicrobial peptide, LL-37, inhibits in vitro osteoclastogenesis." J Dent Res **91**(11): 1071–1077.
19. Takito, J., H. Otsuka, N. Yanagisawa, H. Arai, M. Shiga, M. Inoue, N. Nonaka and M. Nakamura (2015). "Regulation of Osteoclast Multinucleation by the Actin Cytoskeleton Signaling Network." J Cell Physiol **230**(2): 395–405.
20. Tang, X., D. Basavarajappa, J. Z. Haeggstrom and M. Wan (2015). "P2X7 Receptor Regulates Internalization of Antimicrobial Peptide LL-37 by Human Macrophages That Promotes Intracellular Pathogen Clearance." J Immunol **195**(3): 1191–1201.
21. Weinert, S., S. Jabs, C. Supanchart, M. Schweizer, N. Gimber, M. Richter, J. Rademann, T. Stauber, U. Kornak and T. J. Jentsch (2010). "Lysosomal pathology and osteopetrosis upon loss of H⁺-driven lysosomal Cl⁻ accumulation." Science **328**(5984): 1401–1403.
22. Zhang, Q., B. Chen, F. Yan, J. Guo, X. Zhu, S. Ma and W. Yang (2014). "Interleukin-10 inhibits bone resorption: a potential therapeutic strategy in periodontitis and other bone loss diseases." Biomed Res Int **2014**: 284836.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

Makeudom, A., C. Supanchart, P. Montreekachon, S. Khongkhunthian, T. Sastraruji, J. Krisanaprakornkit and S. Krisanaprakornkit. "The antimicrobial peptide, human beta-defensin-1, potentiates in vitro osteoclastogenesis via activation of the p44/42 mitogen-activated protein kinases." Peptides ปี 2017 เล่มที่ 95 หน้า 33-39 ถูกนำไปอ้างอิง 1 ครั้ง (ถึงวันที่ 7 ตุลาคม 2562)

Rattanakuntee, S., Chaiyawat, P., Pruksakorn D., Kritsanaprakornkit, S., Makeudom, A., Supanchart C., Associations between expression levels of O-GlcNAc Transferase (OGT) and chemo-response in osteosarcoma. J Med Assoc Thai ปี 2020 เล่มที่ 103 (ตอบรับการตีพิมพ์แล้ว)

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- เชิงพาณิชย์
- เชิงสาธารณะ (มีเครือข่ายความร่วมมือ/สร้างกระแสความสนใจในวงกว้าง)
- เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)

นำไปต่อยอดในโครงการพัฒนาแผ่นกันปริทันต์โดยใช้เพปไทด์ต้านจุลชีพแอลแอล-37 เป็นสารกระตุ้นเพื่อส่งเสริมกระบวนการหายของแผลกระดูกในการบูรณะกระดูกขาฟัน

- อื่นๆ (เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หนังสือ การจดสิทธิบัตร)

1. นำเสนอในรูปแบบปากเปล่าในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ หัวข้อ

"TLR9 Involvement in the Inhibition of Osteoclast Formation by LL-37"

การประชุม The 2nd Meeting of the IADR – Asia Pacific Region , ระหว่างวันที่ 21 ถึง 23 สิงหาคม 2556 ที่โรงแรม Plaza Athenaeum กรุงเทพมหานคร

2. นำเสนอในรูปแบบปากเปล่าในการประชุมวิชาการระดับชาติ หัวข้อ

"Osteoclast Biology; Its Roles in Dentistry" การประชุม Thai Society of Oral

Biology ระหว่างวันที่ 21 ถึง 23 พฤศจิกายน 2556 ที่ Patong Paragon Resort & Spa จังหวัดภูเก็ต

3. นำเสนอในรูปแบบปากเปล่าในการประชุมวิชาการระดับชาติ "Osteoclast

Diseases, Lessons for Better Bone" การประชุม The 6th Thailand

Conference on Proteoglycans and Tissue Engineering วันที่ 14 มกราคม
2557 ที่คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่

4. นำเสนอในรูปแบบปากเปล่าในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ หัวข้อ

“Pushing Bone Up: an Application of Immunity” การประชุม The 3rd

Thailand–Korea Mini Symposium on Integrated Materials Research วันที่ 7
มกราคม 2562 ที่โรงแรม Kantary Hills จังหวัดเชียงใหม่