



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง

ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของทรีฟอยล์แฟกเตอร์ชนิดต่าง ๆ ในเนื้อเยื่อเหงือกและ
น้ำลายกับระดับความรุนแรงของโรคปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรัง

**Association between the expression of various types of trefoil factors (TFFs) in gingival
tissues and saliva and the degree of disease severity of chronic periodontitis**

โดย พลธรรม ไชยฤทธิ์ และคณะ

31 พฤษภาคม 2553

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง

ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของทรีฟอยล์แฟกเตอร์ชนิดต่างๆ ในเนื้อเยื่อเหงือกและน้ำลายกับ
ระดับความรุนแรงของโรคปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรัง

Association between the expression of various types of trefoil factors (TFFs) in gingival tissues
and saliva and the degree of disease severity of chronic periodontitis

	คณะผู้วิจัย	สังกัด
1.	รศ.ทพ.ดร. พลธรรม ไชยฤทธิ์	คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
2.	รศ.ทพญ.ดร. นวรัตน์ วราอัศวปติ เจริญ	คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
3.	ผศ.ทพญ. สกัทรพร สิทธิสมวงศ์	สถาบันทันตกรรม กระทรวงสาธารณสุข
4.	ผศ.ทพญ.ดร. ดุษฎี หอมดี	คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
5.	อาจารย์.ทพ.ดร. อเนก ชยสดมภ์	คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณอาสาสมัครทุกท่านที่ได้ให้ความร่วมมือเป็นกลุ่มตัวอย่างสำหรับโครงการวิจัยนี้ ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยที่ได้ให้ทุนอุดหนุนการวิจัย ทำให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างสมบูรณ์ ขอขอบคุณ Professor Ebba Nexø จาก Department of Clinical Biochemistry, Aarhus University ประเทศเดนมาร์ก ที่ให้ข้อแนะนำและช่วยเหลือในการเตรียม ELISA ขอขอบคุณ Professor Andy Giraud จาก Murdoch Childrens Research Institute The Royal Children's Hospital ประเทศออสเตรเลีย ที่ได้จัดส่งแอนติบอดีสำหรับการทดสอบด้วยวิธีอิมมูโนเคมี ขอขอบคุณ ผศ.ดร.ทพญ.วราณัฐ ปิติพัฒน์ ที่ได้ให้คำปรึกษาทางสถิติ ขอขอบคุณ คุณเทียมหทัย ชูพันธ์ และ คุณ วราภรณ์ พันธุ์พรหม ที่มีส่วนช่วยในการจัดเตรียมตัวอย่างสำหรับการทดสอบด้วยวิธีอิมมูโนฮีสโตเคมี และขอขอบคุณ นายแพทย์ ทนตแพทย์ วิเชียร เชาว์ศรีกุล ที่จัดหาชิ้นเนื้อตัวควบคุมบวกสำหรับวิธีอิมมูโนฮีสโตเคมี คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านจากภาควิชาวินิจฉัยโรคช่องปากและภาควิชาปริทันตวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความร่วมมือในการทำวิจัยครั้งนี้

วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เพื่อตรวจระดับของทรีฟอยแฟคเตอร์ชนิดต่างๆ ได้แก่ TFF1, TFF2 และ TFF3 ในเนื้อเยื่อเหงือกและในน้ำลายของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรัง และ ตรวจปริมาณเชื้อก่อโรคปริทันต์จาก น้ำเหลืองเหงือก จำนวนอาสาสมัครในการวิจัยครั้งนี้ประกอบด้วย ผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรัง 25 ราย และ อาสาสมัครที่มีสุขภาพช่องปากปกติจำนวน 25 ราย วิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีถูกนำมาใช้เพื่อตรวจหาการแสดงออกของ TFF1, TFF2 และ TFF3 ในเนื้อเยื่อเหงือก สำหรับการวัดระดับ TFF1, TFF2 และ TFF3 ในน้ำลายใช้วิธี ELISA ปริมาณเชื้อก่อโรคปริทันต์จากน้ำเหลืองเหงือก ได้แก่ เชื้อพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิวัลลิส (*Porphyromonas gingivalis*) เชื้อแอคทีนโอบาคทีเรีย แอคทีนอมัยซีเทมคอมิตันส์ (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) และเชื้อ แทนเนอเรลลา ไฟโซเทนซิส (*Tannerella forsythensis*) ถูกตรวจวัดด้วยวิธี real time polymerase chain reaction ผลการวิจัย บ่งชี้ว่า ระดับ TFF1 และ TFF3 ในน้ำลายของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรัง มีปริมาณต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.032$ และ $p = 0.037$ ตามลำดับ) อีกทั้งระดับการแสดงออกของ TFF3 ในเนื้อเยื่อเหงือกของ ผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุม ($p = 0.041$) สำหรับปริมาณเชื้อ *Porphyromonas gingivalis* และ *Tannerella forsythensis* จากน้ำเหลืองเหงือกของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังมีปริมาณสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$ และ $p < 0.001$ ตามลำดับ) ผลการวิจัยบ่งชี้ว่ามีความสัมพันธ์แบบผกผันระหว่างระดับ TFF3 ในน้ำลายกับปริมาณเชื้อพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิวัลลิส ($r = -0.383$; $p = 0.006$) และแทนเนอเรลลา ไฟโซเทนซิส ($r = -0.462$; $p = 0.001$) นอกจากนี้ระดับ TFF3 ในน้ำลายยังมีความสัมพันธ์แบบผกผันกับระดับสภาวะปริทันต์อักเสบ ได้แก่ อาการเลือดออก ($r = -0.531$; $p < 0.001$) ร่องลึกปริทันต์ ($r = -0.391$; $p = 0.005$) และการยืดเกาะของอวัยวะปริทันต์ ($r = -0.490$; $p < 0.001$) โดยสรุปการศึกษาค้นคว้านี้แสดงหลักฐานว่ามีการเปลี่ยนแปลงระดับ TFFs ทั้งในน้ำลายและเนื้อเยื่อเหงือกของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังและพบว่าการเปลี่ยนแปลงระดับ TFF3 ในน้ำลายมีความสัมพันธ์แบบผกผันกับปริมาณเชื้อก่อโรคปริทันต์และสภาวะปริทันต์อักเสบ ข้อมูลดังกล่าวบ่งชี้ถึงความสำคัญทางคลินิกของ TFF3 ในพยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์และข้อมูลจากการศึกษาค้นคว้านี้สามารถนำไปทบทวนทางคลินิกต่อไปในอนาคตเพื่อประโยชน์ต่อการดูแลรักษาผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ

Abstract

The objective of this study was to investigate the levels of TFF1, TFF2, and TFF3 in gingival tissues and saliva from chronic periodontitis patients, and to measure the amount of periodontopathic bacteria in gingival crevicular fluid. Twenty five chronic periodontitis patients and 25 healthy subjects were included in this study. Immunohistochemical method was used to detect the expression of TFF1, TFF2, and TFF3 in biopsy specimens derived from gingival tissues. Levels of TFF1, TFF2, and TFF3 in saliva were measured by ELISA. The amount of periodontopathic bacteria including *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, and *Tannerella forsythensis* in gingival crevicular fluid were measured by real time polymerase chain reaction. Our results demonstrated that salivary TFF1 and TFF3 peptides from chronic periodontitis patients were significantly decreased than those from controls ($p = 0.032$ and $p = 0.037$, respectively). Expression of TFF3 in biopsy specimens from chronic periodontitis patients was significantly different in comparison to controls ($p = 0.041$). Levels of *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in gingival crevicular fluid from chronic periodontitis patients were significantly higher than those in controls ($p < 0.001$ and $p < 0.001$, respectively). Levels of TFF3 in saliva were negatively correlated with amount of periodontopathic bacteria including *Porphyromonas gingivalis* ($r = -0.383$; $p = 0.006$) and *Tannerella forsythensis* ($r = -0.462$; $p = 0.001$). Moreover, Levels of TFF3 in saliva were negatively correlated with levels of periodontal status including bleeding on probing ($r = -0.531$; $p < 0.001$), pocket depth ($r = -0.391$; $p = 0.005$), and clinical attachment loss ($r = -0.490$; $p < 0.001$). In conclusion, our study demonstrated an alteration of TFF expression both in gingival tissues and saliva from chronic periodontitis patients. Negative correlations between salivary TFF3 concentrations, periodontopathic bacteria, and periodontal status indicate the clinical significance of TFF3 peptides in pathogenesis of periodontal diseases. The present findings imply for future clinical research on the potential use of TFF3 peptides in management of patients with periodontal diseases.

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร (Executive summary)

ชื่อโครงการวิจัยเรื่อง

ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของทรีฟอยล์แฟกเตอร์ชนิดต่างๆ ในเนื้อเยื่อเหงือกและน้ำลายกับระดับความรุนแรงของโรคปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรัง

Association between the expression of various types of trefoil factors (TFFs) in gingival tissues and saliva and the degree of disease severity of chronic periodontitis

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เปรียบเทียบการแสดงออกของ TFF ชนิดต่างๆ ในเนื้อเยื่อเหงือกและในน้ำลายระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรังกับกลุ่มอาสาสมัครปกติ
2. เปรียบเทียบรูปแบบความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ TFF ชนิดต่างๆ ในเนื้อเยื่อเหงือกและในน้ำลายระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรังกับกลุ่มอาสาสมัครปกติ
3. เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ TFF ชนิดต่างๆ ในเนื้อเยื่อเหงือกและในน้ำลายกับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับโรคปริทันต์อักเสบ
4. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ TFF ชนิดต่างๆ ในเนื้อเยื่อเหงือกและในน้ำลายกับค่าสภาวะปริทันต์ที่เกี่ยวข้องกับโรคปริทันต์อักเสบ

ความสำคัญและที่มาของการวิจัย

โรคปริทันต์อักเสบ (periodontitis) เป็นโรคอักเสบเรื้อรังที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อจุลินทรีย์ในช่องปาก โรคปริทันต์อักเสบเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการสูญเสียฟันในผู้ใหญ่ การอักเสบที่เกิดขึ้นจากโรคชนิดนี้จะลุกลามไปยังอวัยวะปริทันต์ในช่องปาก ได้แก่ เหงือก (gingiva), เอ็นยึดปริทันต์ (periodontal ligament) เคลือบรากฟัน (cementum) และ กระดูกเบ้าฟัน (alveolar bone) ผลจากการอักเสบเรื้อรังทำให้เกิดอาการปวดบวมที่บริเวณเหงือก อาจพบฝีปริทันต์ รวมถึงการละลายของกระดูกเบ้าฟัน ฟันโยก และนำไปสู่การสูญเสียฟันในที่สุด นอกจากนี้การติดเชื้อจุลินทรีย์ที่สัมพันธ์กับโรคปริทันต์อักเสบยังสามารถแพร่กระจายเข้าสู่ระบบเลือดและมีความเกี่ยวข้องกับโรคทางระบบอื่นๆ เช่น โรคของระบบทางเดินหายใจ โรคของระบบหลอดเลือดและหัวใจ และ โรคเบาหวาน

พยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์อักเสบและความรุนแรงของโรคเกี่ยวข้องกับปัจจัยหลายอย่าง ปัจจัยหลักที่สำคัญได้แก่ เชื้อจุลินทรีย์ที่สัมพันธ์กับโรคปริทันต์อักเสบและการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อเชื้อจุลินทรีย์ชนิดดังกล่าว เชื้อจุลินทรีย์ที่สำคัญและเป็นที่ยอมรับว่าเกี่ยวข้องกับพยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์อักเสบคือ เชื้อพอร์ไฟโรโมนัส จิงจิวัลลิส (*Porphyromonas gingivalis*) เชื้อแอคทีโนมัยซีเทมคอมิตันส์ (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) และเชื้อ แทนนอร์เรลลา โฟไซเทนซิส (*Tannerella forsythensis*) ซึ่งเป็นเชื้อชนิดแกรมลบ (Gram-negative bacteria) ส่วนประกอบของเชื้อจุลินทรีย์และสารพิษที่ถูกสร้างและปล่อยออกมาสามารถลุกลามเข้าสู่ร่องเหงือกและอวัยวะปริทันต์และสารพิษเหล่านี้จะกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในช่องปากและมีบทบาทสำคัญต่อพยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์อักเสบ ถ้าระบบภูมิคุ้มกันร่างกายมีการผลิตสารอักเสบออกมาอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานานจะส่งผลในด้านลบต่ออวัยวะปริทันต์ทั้งนี้เพราะสารอักเสบเหล่านี้จะกระตุ้นให้เกิดการทำลายของอวัยวะปริทันต์และส่งผลให้เกิดการละลายของกระดูกเบ้าฟันตามมา ถ้าสารพิษจากเชื้อจุลินทรีย์หรือสิ่งกระตุ้นดังกล่าวถูกกำจัดออกไปการสร้างสารอักเสบก็จะลดลงและหยุดยั้งการทำลายของอวัยวะปริทันต์และการละลายของกระดูกเบ้าฟัน อย่างไรก็ตามในผู้ป่วยที่มีระดับความรุนแรงของโรคปริทันต์อักเสบใกล้เคียงกันและได้รับการรักษาแบบเดียวกันแต่การตอบสนองในการซ่อมแซมเนื้อเยื่อเหงือกและการกลับคืนสู่ภาวะปกติของอวัยวะปริทันต์ภายหลังการ

รักษาโรคปริทันต์อักเสบอาจให้ผลที่แตกต่างกันทั้งนี้ยังไม่มีคำอธิบายที่ชัดเจนเกี่ยวกับกลไกหรือปัจจัยที่ควบคุมการซ่อมแซมเนื้อเยื่อเหงือกและอวัยวะปริทันต์ ดังนั้นการศึกษาถึงกลไกหรือปัจจัยที่ควบคุมการซ่อมแซมเนื้อเยื่อเหงือกและอวัยวะปริทันต์จึงมีความสำคัญต่อการรักษาและการพยากรณ์โรคในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ

ทรีฟอยล์แฟกเตอร์ (Trefoil factors or TFFs) จัดอยู่ในกลุ่ม secretory molecules ถูกสร้างขึ้นโดย mucous epithelial cells โครงสร้างโมเลกุลของทรีฟอยล์แฟกเตอร์ แบ่งย่อยออกได้ 3 ชนิดคือ TFF1, TFF2 และ TFF3 ในทางเดินอาหารมักพบว่า mucous cells มีการสร้าง TFF ชนิดต่างๆ และถูกหลั่งออกมาใน mucosal fluid มีรายงานบ่งชี้ว่าต่อมน้ำลายและเซลล์บุผิวช่องปากของมนุษย์สามารถสร้าง TFF ชนิดต่างๆและหลั่งออกมาในน้ำลาย บทบาทและหน้าที่ทางชีวภาพของ TFF ชนิดต่างๆจะเกี่ยวข้องกับ mucosal regeneration, tissue repairing process, inflammatory process และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน การศึกษาในหนูทดลองที่มีการปรับเปลี่ยนทางพันธุกรรมเพื่อยับยั้งการแสดงออกของ TFF gene แสดงให้เห็นว่าหนูทดลองดังกล่าวมีการตอบสนองต่อการอักเสบบริเวณลำไส้เล็กที่ผิดปกติไปจากหนูทดลองที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุม การศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าระดับการแสดงออกของ TFF1 และ TFF3 ใน serum ของผู้ป่วยที่เป็นโรค chronic inflammatory bowel disease เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ การศึกษาทางอิมมูโนฮิสโตเคมีแสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของ TFF ชนิดต่างๆที่บริเวณเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารลดลง ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *Helicobacter pylori* ร่วมกับการอักเสบของกระเพาะอาหารเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารของผู้ป่วยที่มีการอักเสบแต่ไม่ติดเชื้อมีผลดังกล่าว อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของ TFF ชนิดต่างๆในเนื้อเยื่อเหงือกและในน้ำลายของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบมาก่อน อีกทั้งยังไม่มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับโรคปริทันต์อักเสบกับการแสดงออกของ TFF ชนิดต่างๆ ดังนั้น การศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ TFF ชนิดต่างๆในเนื้อเยื่อเหงือกและในน้ำลายกับระดับสภาวะปริทันต์ที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรคปริทันต์อักเสบ ตลอดจนการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ TFF ชนิดต่างๆกับเชื้อจุลินทรีย์ที่สัมพันธ์โรคปริทันต์อักเสบจึงเป็นที่น่าสนใจและผลการศึกษาที่ได้จะนำมาซึ่งองค์ความรู้ใหม่และเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญที่จะนำไปสู่การวิจัยต่อยอดเกี่ยวกับกลไกหรือปัจจัยที่ควบคุมการซ่อมแซมเนื้อเยื่อเหงือกและอวัยวะปริทันต์เพื่อหาแนวทางการรักษาและการพยากรณ์โรคในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบต่อไป

ระเบียบวิธีวิจัย

การศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาการแสดงออก TFF ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ TFF1, TFF2 และ TFF3 ในเนื้อเยื่อเหงือกและในน้ำลายของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบและอาสาสมัครปกติ โดยการศึกษาครั้งนี้ใช้วิธี อิมมูโนฮิสโตเคมี เพื่อตรวจหาการแสดงออกของ TFF1, TFF2 และ TFF3 ในเนื้อเยื่อเหงือกและใช้วิธี ELISA เพื่อตรวจหาระดับ soluble TFF1, TFF2 และ TFF3 ในน้ำลายผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ ตลอดจนการใช้เทคนิค real-time PCR เพื่อหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับโรคปริทันต์อักเสบได้แก่เชื้อ *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* และ *Tannerella forsythensis* จากร่องลึกปริทันต์ของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรัง

การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

1. ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นของ TFF ชนิดต่าง ๆ ในน้ำลาย ค่าการย้อมติดสีของ TFFs ชนิดต่างๆในเนื้อเยื่อเหงือก และปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับโรคปริทันต์อักเสบจะถูกนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังและกลุ่มอาสาสมัครที่เป็นกลุ่มควบคุม ด้วยค่าทางสถิติโดยใช้ Mann-Whitney test

2. ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ TFF ชนิดต่างๆ ในน้ำลายและค่าคะแนนการติดสีของ TFF ชนิดต่างๆ ในเนื้อเยื่อเหงือกจากกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังและกลุ่มอาสาสมัครที่เป็นกลุ่มควบคุมจะถูวิเคราะห์โดยค่าสถิติชนิด Spearman's rank correlation coefficient
3. ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ TFF ชนิดต่างๆ ในน้ำลายและค่าคะแนนการติดสีของ TFF ชนิดต่างๆ ในเนื้อเยื่อเหงือกกับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับโรคปริทันต์จากกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังและกลุ่มอาสาสมัครที่เป็นกลุ่มควบคุมกับจะถูวิเคราะห์โดยค่าสถิติชนิด Spearman's rank correlation coefficient
4. ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ TFF ชนิดต่างๆ ในน้ำลายและค่าคะแนนการติดสีของ TFF ชนิดต่างๆ ในเนื้อเยื่อเหงือกกับค่าสภาวะปริทันต์จากกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังและกลุ่มอาสาสมัครที่เป็นกลุ่มควบคุมจะถูวิเคราะห์โดยค่าสถิติชนิด Spearman's rank correlation coefficient

แผนการดำเนินงานตลอดโครงการ

พฤษภาคม 2551 - เมษายน 2552

: รวบรวมผู้ป่วยและอาสาสมัคร

: set up immunostaining และ ELISA protocols

พฤษภาคม 2552 - กรกฎาคม 2552

: ตรวจวัดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ด้วยเครื่อง real time PCR

: ทำการทดลองในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี immunohistochemistry และ ELISA

สิงหาคม 2552 – ตุลาคม 2552

: ทำการวิเคราะห์ผล

พฤศจิกายน 2552 - มีนาคม 2553

: สรุปการวิเคราะห์ผล

เมษายน - พฤษภาคม 2553

: เขียนรายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์และจัดเตรียมบทความต้นฉบับเพื่อการตีพิมพ์

ผลงานที่ได้จากการวิจัย

1. รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์
2. บทความต้นฉบับเพื่อตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการระดับนานาชาติที่มี impact factor
3. การเผยแพร่ผลงานการวิจัยในที่ประชุมระดับชาติหรือนานาชาติ

สารบัญ

กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อ	ii
Abstract	iii
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร (Executive summary)	iv
สารบัญตาราง	viii
สารบัญรูปภาพ	ix
บทนำ	1
วัสดุและวิธีการทดลอง	4
ผลการทดลอง	8
บทวิจารณ์	20
เอกสารอ้างอิง	24
ภาคผนวก	27
ภาคผนวก ก. ผลงานการเผยแพร่ทางวิชาการที่เกี่ยวข้องกับโครงงานวิจัย	
ภาคผนวก ข. บทความต้นฉบับสำหรับตีพิมพ์ในวารสาร	

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1	10
ปริมาณ TFF1, TFF2 และ TFF3 ที่ตรวจวัดในน้ำลายจากอาสาสมัครปกติและผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบด้วยวิธี ELISA (หน่วยวัดความเข้มข้นของ TFFs ในน้ำลายเป็น nmol/ gram salivary protein)	
ตารางที่ 2	11
ระดับคะแนนการย้อมติดสีต่อ TFF1, TFF2 และ TFF3 ที่ตรวจวัดในเนื้อเยื่อเหงือกจากอาสาสมัครปกติและผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี	
ตารางที่ 3	12
ปริมาณเชื้อจุลชีพที่เกี่ยวข้องกับโรคปริทันต์อักเสบที่ตรวจวัดในน้ำเหลืองเหงือกจากอาสาสมัครปกติและผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบด้วยวิธี real time PCR	
ตารางที่ 4	13
ความสัมพันธ์ของปริมาณ TFF1, TFF2 และ TFF3 (nmol/g protein) ในน้ำลาย ความสัมพันธ์ระหว่างค่า immunostaining scores ของ TFF1, TFF2 และ TFF3 ในเนื้อเยื่อเหงือก และความสัมพันธ์ระหว่าง TFF1, TFF2 และ TFF3 ในเนื้อเยื่อเหงือกและในน้ำลาย จากผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ (periodontitis) และอาสาสมัครปกติ (control)	
ตารางที่ 5	14
ความสัมพันธ์ของปริมาณ TFF1, TFF2 และ TFF3 (nmol/g protein) ในน้ำลาย กับปริมาณเชื้อก่อโรคปริทันต์ในน้ำเหลืองเหงือก และ ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ TFF1, TFF2 และ TFF3 ในน้ำลายกับสภาวะปริทันต์ จากอาสาสมัครปกติและผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ	
ตารางที่ 6	15
ความสัมพันธ์ระหว่างค่า immunostaining scores ของ TFF1, TFF2 และ TFF3 ในเนื้อเยื่อเหงือก กับปริมาณเชื้อก่อโรคปริทันต์ในน้ำเหลืองเหงือก และ ความสัมพันธ์ระหว่างค่า immunostaining scores ของ TFF1, TFF2 และ TFF3 ในเนื้อเยื่อเหงือก กับสภาวะปริทันต์ จากผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบและอาสาสมัครปกติ	
ตารางที่ 7	16
ความสัมพันธ์ระหว่างค่าสภาวะปริทันต์กับปริมาณ TFF1, TFF2 และ TFF3 ที่ตรวจวัดจากน้ำลายจากอาสาสมัครปกติและผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ	

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปภาพที่ 1 การแสดงออกของ TFF1 จากตัวอย่างเนื้อเยื่อเหงือกของอาสาสมัครปกติ (A) และผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ (B). การย้อมติดสีน้ำตาลแดงแสดงความจำเพาะต่อ TFF1 ซึ่งเซลล์ที่ย้อมติดสีจำเพาะพบได้ในชั้นฐานและเหนือฐานของชั้นเซลล์บุผิวช่องปากในเนื้อเยื่อเหงือกของอาสาสมัครปกติและผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ (x100)	17
รูปภาพที่ 2 การแสดงออกของ TFF2 จากตัวอย่างเนื้อเยื่อเหงือกของอาสาสมัครปกติ (A) และผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ (B). การย้อมติดสีน้ำตาลแดงแสดงความจำเพาะต่อ TFF2 ซึ่งเซลล์ที่ย้อมติดสีจำเพาะพบได้ในชั้นฐานและเหนือฐานของชั้นเซลล์บุผิวช่องปากในเนื้อเยื่อเหงือกของอาสาสมัครปกติและผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ (x100)	18
รูปภาพที่ 3 การแสดงออกของ TFF3 จากตัวอย่างเนื้อเยื่อเหงือกของอาสาสมัครปกติ (A) และผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ (B). การย้อมติดสีน้ำตาลแดงแสดงความจำเพาะต่อ TFF3 ซึ่งเซลล์ที่ย้อมติดสีจำเพาะพบได้ในชั้นฐานและเหนือฐานของชั้นเซลล์บุผิวช่องปากในเนื้อเยื่อเหงือกของอาสาสมัครปกติและผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ (x100)	19

บทนำ

โรคปริทันต์อักเสบ (periodontitis) เป็นโรคช่องปากที่พบได้อย่างแพร่หลายในประชากรและเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการสูญเสียฟันในผู้ใหญ่ กระบวนการอักเสบที่เกิดขึ้นในโรคปริทันต์อักเสบจะลุกลามถึงส่วนของอวัยวะปริทันต์อันได้แก่ เหงือก (gingiva) เคลือบรากฟัน (cementum) เอ็นยึดปริทันต์ (periodontal ligament) และกระดูกเบ้าฟัน (alveolar bone) ก่อให้เกิดการละลายของกระดูกเบ้าฟัน ลักษณะทางคลินิกของโรคปริทันต์อักเสบแตกต่างกันตามระดับความรุนแรงของโรค ประกอบด้วยการมีร่องลึกปริทันต์ (pocket formation) การมีเลือดออกเมื่อวัดร่องลึกปริทันต์ (bleeding on probing) การมีรอยวิการบริเวณง่ามรากฟัน (furcation involvement) ฟันโยก อาจมีอาการปวด มีหนองหรือฝีปริทันต์ (periodontal abscess) ร่วมด้วยหากไม่ได้รับการรักษาที่ถูกต้องและเหมาะสม ก็สามารถนำไปสู่การสูญเสียฟันในที่สุด [1]

พยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์อักเสบเกี่ยวข้องกับปัจจัยหลายอย่างแต่ปัจจัยที่สำคัญได้แก่ เชื้อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับโรคปริทันต์อักเสบและการตอบสนองของภูมิคุ้มกันของร่างกาย [2,3] คราบจุลินทรีย์ (dental plaque) ที่สะสมอยู่บนตัวฟันบริเวณขอบเหงือกประกอบด้วยเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคหลายชนิด เชื้อจุลินทรีย์ที่สำคัญและเป็นที่ยอมรับว่าเป็นสัมพันธ์กับพยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์อักเสบนั้นจัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียชนิดไม่อาศัยออกซิเจนและถูกจัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียชนิดแกรมลบ (Gram negative anaerobic species) ได้แก่ เชื้อพอร์ไฟโรโมนาส จิงจิวัลลิส (*Porphyromonas gingivalis*) แอคกริเกทแบคเตอร์ แอคทีโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) ฟรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย (*Prevotella intermedia*) แทนเนอเรลลา ฟร็อสเทนซิส (*Tannerella forsythensis*) และ ทริพอนีมา เดนติโคลา (*Treponema denticola*) [4] การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าในโรคปริทันต์อักเสบชนิดรุนแรง (aggressive periodontitis) จะพบปริมาณของเชื้อพอร์ไฟโรโมนาส จิงจิวัลลิส แอคกริเกทแบคเตอร์ แอคทีโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ และ ฟรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย มากกว่ารอยโรคปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรัง (chronic periodontitis) ที่ไม่มีการลุกลามของโรค [5] ทั้งนี้อาการและความรุนแรงของโรคปริทันต์อักเสบอาจมีความสัมพันธ์กับเชื้อแบคทีเรียที่จำเพาะเหล่านี้ [6]

คุณสมบัติที่สำคัญและอาจเกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวคือการปล่อยเอนไซม์ย่อยโปรตีน (proteolytic enzymes) ออกมาโดยตรง การสร้างสารพิษ เช่น ลิโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide : LPS) และฟิมเบรีย (fimbriae) สารพิษจะลุกลามเข้าสู่ร่องเหงือกและอวัยวะปริทันต์ และการกระตุ้นการตอบสนองของภูมิคุ้มกันของร่างกายบริเวณดังกล่าว เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อก่อโรคปริทันต์ เช่น โมโนไซต์ (monocyte) และแมคโครฟาจ (macrophage) จะหลั่งสารอักเสบ (inflammatory mediators) และไซโตไคน์ (cytokines) ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการละลายของกระดูก เช่นอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า (Interleukin 1 beta [IL-1 β]) ทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์-อัลฟา (Tumor necrosis factor alpha [TNF- α]) และโปรสตาแกลนดิน (Prostaglandin) [1] สารอักเสบเหล่านี้มีคุณสมบัติทางชีวภาพที่ส่งผลกระทบต่อเซลล์เป้าหมายเช่น gingival fibroblast ซึ่งเซลล์เป้าหมายเหล่านี้จะถูกกระตุ้นให้ผลิตและหลั่งสารอักเสบและไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการละลายของกระดูกได้เช่นกัน รวมทั้งเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนส (matrix metalloproteinase [MMPs]) เมื่อมีการผลิตและหลั่งสารเหล่านี้ออกมาในปริมาณมากจะทำให้เกิดการทำลายของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของอวัยวะปริทันต์ และเกิดการละลายของกระดูกเบ้าฟัน [2, 7, 8]

ในปัจจุบันพบว่า การกำจัดส่วนของแบคทีเรียและไบโอฟิล์ม (biofilm) ได้เหงือก เป็นวิธีการหลักในการรักษาโรคปริทันต์อักเสบ [9] จากหลายรายงานศึกษาที่ผ่านมาชี้ให้เห็นว่าการกำจัดแผ่นคราบจุลินทรีย์ด้วยวิธีต่างๆสามารถช่วยลดการอักเสบ ป้องกันการทำลายตัวของเนื้อเยื่อปริทันต์ และลดการพัฒนาความรุนแรงของรอยโรคได้ [10-15] ภายหลังการรักษาที่เหมาะสมเนื้อเยื่อปริทันต์ที่เคยเสียหายจะเกิดการซ่อมแซม (repair) หรือการซ่อมสร้าง (regeneration) ขึ้นในที่สุด แนวความคิดที่กล่าวว่าการซ่อมสร้างเพื่อให้เกิดการกลับคืนมาของอวัยวะปริทันต์ทั้งในลักษณะของรูปร่าง ปริมาณ และความสามารถในการทำหน้าที่นั้นเป็นเป้าหมายหลักของการรักษาโรคปริทันต์อักเสบ [16,17] การหายของแผลต้องอาศัยขบวนการหลายอย่างเช่นการเคลื่อนตัว (migration) การยึดเกาะ (adhesion) รวมถึง

การเพิ่มจำนวนและการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเซลล์ (proliferation and differentiation) ของเซลล์หลายชนิด โดยขบวนการที่เกิดขึ้นนี้อาจถูกกระตุ้นหรือเหนี่ยวนำจากการที่มีสารสื่อแบบโพลีเปปไทด์ (polypeptide mediator) มาจับกับตัวรับบนผิวเซลล์ หรือ เมื่อมี โกรทแฟคเตอร์ (growth factor) ในบริเวณที่เกี่ยวข้อง อย่างไรก็ตามพบว่าโกรทแฟคเตอร์ต่างชนิดกันก็จะส่งผลให้เซลล์แสดงออกต่างกัน เช่น ทรานสฟอร์มมิงโกรทแฟคเตอร์ แอลฟา (transforming growth factor alpha [TGF- α]) และ อีพิเดอร์มอลโกรทแฟคเตอร์ (epidermal growth factor [EGF]) เกี่ยวข้องกับการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างใหม่ของอีพิเธลิเยียม (re-epithelialization) [18] ส่วน วาสคิวลาร์เอนโดทีเลียลเซลล์โกรทแฟคเตอร์ (vascular endothelial cell growth factor [VEGF]) ทรานสฟอร์มมิงโกรทแฟคเตอร์ เบตา (transforming growth factor beta [TGF- β]) แองจิโอเจนิน (angiogenin) แองจิโอโทรปิน (angiotropin) แองจิโอโพอิติน (angiopoietin) และเฮปาทาโตไซต์โกรทแฟคเตอร์ (hepatocyte growth factor) เกี่ยวข้องอย่างมากกับการสร้างเส้นเลือดใหม่ในบริเวณที่เนื้อเยื่อเดิมถูกทำลาย ซึ่งตรงข้ามกับทรอมโบสโปนดิน (thrombospondin) และแองจิโอสแตติน (angiostatin) ที่ยังยับยั้งการสร้างเส้นเลือด [19] ส่วนทรานสฟอร์มมิงโกรทแฟคเตอร์เบตา ร่วมกับคอนเนทิฟทิฟโกรทแฟคเตอร์ (connective tissue growth factor) จะเกี่ยวข้องกับการสร้างเส้นใยคอลลาเจน (fibroblast collagen) นอกจากนี้การเคลื่อนตัวและการยึดเกาะของเซลล์ จะอาศัยอินทิกริน (integrin) จับกับส่วนอื่นใดในเอกซ์ตราเซลล์ูลาร์เมทริกซ์ (extracellular matrix) เช่นการเคลื่อนตัวของเซลล์อีพิเธลิเยียมและอาศัยโปรตีน อินทิกรินแอลฟา6เบตา4 ($\alpha 6 \beta 4$ integrin) จับกับลามินิน (laminin) หรือ อินทิกรินแอลฟา5เบตา1 ($\alpha 5 \beta 1$ integrin) ที่เป็นบริเวณยึดเกาะของไฟโบรเนกติน (fibronectin) ทำให้เกิดการยึดติดชนิดเฮมิเดสโมโซม (hemidesmosome)

การเกิดการซ่อมสร้างของเนื้อเยื่อปริทันต์นั้นนอกจากจะมีการหายของแผลตามหลักพื้นฐานแล้ว ยังต้องตรวจหรือบ่งชี้ให้ได้ว่ามีการกลับคืนมาทั้งขนาดและปริมาณของเนื้อเยื่อปริทันต์ทั้งหมด เช่น ความสูงของกระดูกเบ้าฟัน ปริมาณและลักษณะเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเหงือก การมีชั้นเคลือบฟันแบบ acellular extrinsic fiber กลับคืนมาในบริเวณที่เคยหายไป การสร้างเส้นใยชาร์เป (sharpey's fibers) ที่ยึดติดในรากฟัน และการมีการยึดแน่นของชั้นอีพิเธลิเยียม (epithelial seal) ในส่วนขอบบนของรากฟัน [20,21] ตามปกติร่างกายของมนุษย์จะมีความสามารถในการซ่อมสร้างเนื้อเยื่อที่จำกัดและมีเฉพาะเนื้อเยื่อบางอย่างเท่านั้นที่จะมีความสามารถนี้ได้ ซึ่งเหตุผลหลักเนื่องมาจากไม่พบเซลล์ต้นกำเนิดและเซลล์ตั้งต้นที่เหมาะสมและเพียงพอในช่วงเวลาของการซ่อมสร้าง [20] อย่างไรก็ตามในผู้ป่วยที่มีระดับความรุนแรงของโรคปริทันต์อักเสบใกล้เคียงกันและได้รับการรักษาแบบเดียวกันแต่การตอบสนองในการซ่อมแซมเนื้อเยื่อเหงือกและการกลับคืนสู่ภาวะปกติของอวัยวะปริทันต์ภายหลังการรักษาโรคปริทันต์อักเสบอาจให้ผลที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ยังไม่มีคำอธิบายที่ชัดเจนเกี่ยวกับกลไกหรือปัจจัยที่ควบคุมการซ่อมแซมเนื้อเยื่อเหงือกและอวัยวะปริทันต์ ดังนั้นการศึกษาถึงกลไกหรือปัจจัยที่ควบคุมการซ่อมแซมเนื้อเยื่อเหงือกและอวัยวะปริทันต์จึงมีความสำคัญต่อการรักษาและการพยากรณ์โรคในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ

ทรีฟอยล์แฟกเตอร์ (Trefoil factors or TFFs) จัดอยู่ในกลุ่ม secretory molecules ถูกสร้างขึ้นโดย mucous epithelial cells ในมนุษย์ตำแหน่งของ TFF gene อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 21 (21q22.3) [22] โครงสร้างของทรีฟอยล์แฟกเตอร์ ประกอบด้วยเปปไทด์สายสั้นๆและมีพันธะไดซัลไฟด์เชื่อมยึดเปปไทด์ทำให้เกิดลักษณะที่เรียกว่า intramolecular loops (trefoil domains) [23] ทรีฟอยล์แฟกเตอร์ แบ่งออกได้ 3 ชนิด [24] คือ TFF1, TFF2 และ TFF3 สำหรับ TFF1 (pS2) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 60 ตัวและมี 1 trefoil domain มักจะพบ TFF1 ในรูปแบบที่เป็น dimeric form TFF2 (spasmolytic polypeptide) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 106 ตัวและมี 2 trefoil domains เปปไทด์ของ TFF2 มี 1 ตำแหน่งที่มี N-linked glycosylation สำหรับ TFF3 (intestinal trefoil factor) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 59 ตัวและมี 1 trefoil domain TFF3 อาจถูกสร้างออกมาในแบบ monomeric หรือ dimer form ในทางเดินอาหารมักพบว่า mucous cells มีการสร้าง TFF ชนิดต่างๆ และถูกหลั่งออกมาใน mucosal fluid ร่วมกับ mucins [24] ในหนูทดลองพบว่าโปรตีนที่มีชื่อว่า blottin ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม TFF-interacting protein และพบได้ทั้งบริเวณ gastric surface สามารถทำงานร่วมกับ TFF2 [24] สำหรับในมนุษย์ TFF-interacting proteins ที่มีชื่อว่า TFIZ1 จะทำงานร่วมกับ TFF1

[25] และ GKN2 จะทำงานร่วมกับ TFF2 [24] ในขณะนี้ยังไม่มีรายงานที่ระบุเกี่ยวกับตัวจับที่จำเพาะ (specific receptor) สำหรับ TFF ชนิดต่างๆ การศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าปัจจัยที่ควบคุมการแสดงออกของ TFF ชนิดต่างๆ ได้แก่ ไซโตไคน์ ทั้งชนิด pro-inflammatory cytokines เช่น IL-1 β , IL-6 และ TNF- α [26] และ anti-inflammatory cytokines เช่น TGF- β [27,28,29]

บทบาทหน้าที่ทางชีวภาพของ TFF ชนิดต่างๆจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการ mucosal regeneration และ tissue repairing process [30] โดยที่ TFF กระตุ้นให้เกิด migration of epithelial cells มายังบริเวณที่เกิดบาดแผล นอกจากนี้ TFF สามารถยับยั้งกระบวนการตายของเซลล์เยื่อบุผิว (epithelial cell apoptosis) [31] บทบาทหน้าที่ทางชีวภาพของ TFF ชนิดต่างๆยังเกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและ inflammatory process [32,33,34] การศึกษาในหนูทดลองที่มีการปรับเปลี่ยนทางพันธุกรรมเพื่อยับยั้งการแสดงออกของ TFF gene แสดงให้เห็นว่าหนูทดลองดังกล่าวมีการตอบสนองต่อการอักเสบบริเวณลำไส้เล็กที่ผิดปกติไปจากหนูทดลองที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุม [34] การศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าระดับการแสดงออกของ TFF1 และ TFF3 ใน serum ของผู้ป่วยที่เป็นโรค chronic inflammatory bowel disease เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม [35] นอกจากนี้ การศึกษาทางอิมมูโนฮิสโตเคมีแสดงให้เห็นว่าในผู้ป่วยกระเพาะอาหารอักเสบที่ติดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโรลี (*Helicobacter pylori*) มีการแสดงออกของ TFF ชนิดต่างๆที่บริเวณเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยกระเพาะอาหารอักเสบแต่ไม่ติดเชื้อดังกล่าว [36]

มีรายงานระบุว่าต่อมน้ำลายและเซลล์บุผิวช่องปาก (oral epithelial cells) ของมนุษย์สามารถสร้าง TFF ชนิดต่างๆ [37,38] อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของ TFF ชนิดต่างๆในเนื้อเยื่อเหงือกและในน้ำลายของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบมาก่อนอีกทั้งยังไม่มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อจุลินทรีย์ที่สัมพันธ์กับโรคปริทันต์อักเสบกับการแสดงออกของ TFF ชนิดต่างๆ ดังนั้นการศึกษเกี่ยวกับการแสดงออกของ TFF ชนิดต่างๆในเนื้อเยื่อเหงือกและในน้ำลายของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ การศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ TFF ชนิดต่างๆในเนื้อเยื่อเหงือกและในน้ำลายกับระดับสภาวะปริทันต์ที่เกี่ยวข้องกับโรคปริทันต์อักเสบ ตลอดจนการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อจุลินทรีย์ที่สัมพันธ์กับโรคปริทันต์อักเสบกับการแสดงออกของ TFF ชนิดต่างๆจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจ และผลการศึกษาที่ได้จะนำมาซึ่งองค์ความรู้ใหม่และเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญที่จะนำไปสู่การวิจัยต่อยอดเกี่ยวกับบทบาทหน้าที่ทางชีวภาพของ TFF ชนิดต่างๆที่สัมพันธ์กับกลไกการควบคุมการซ่อมแซมเนื้อเยื่อเหงือกและอวัยวะปริทันต์เพื่อหาแนวทางการรักษาและแนวทางการพยากรณ์โรคในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบต่อไป

วัสดุและวิธีการทดลอง

1 การคัดเลือกกลุ่มตัวอย่าง

คณะผู้วิจัยจะทำการเลือกกลุ่มตัวอย่างในคนไทยอายุตั้งแต่ 20 ปีขึ้นไป ที่มารับการรักษาที่คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และอาสาสมัครที่เข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ได้รับการรักษาที่มีการถอนฟันหรือได้รับการรักษาทางศัลยกรรมปริทันต์ อาสาสมัครที่เข้าร่วมในโครงการวิจัยไม่มีปัญหาโรคทางระบบ ไม่อยู่ในระหว่างตั้งครรภ์หรือระยะให้นมบุตร หรือรับประทานยาคุมกำเนิด ไม่ได้รับประทานยาปฏิชีวนะในช่วง 3 เดือนที่ผ่านมา ไม่สูบบุหรี่ อาสาสมัครที่เข้าร่วมในโครงการวิจัยจะได้รับการตรวจสภาวะปริทันต์ตามแบบฟอร์มของคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ซึ่งรวมถึงระดับการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์ (clinical attachment level; CAL) ความลึกของร่องลึกปริทันต์ (probing depth; PD) อาการเลือดออกโดยเครื่องมือตรวจปริทันต์ (bleeding on probing; BOP) และระดับการโยกของฟัน หลังจากที่ได้รับทราบข้อมูลและรับฟังคำอธิบายถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย ขั้นตอนและวิธีการวิจัยอย่างละเอียดจากคณะผู้วิจัย อาสาสมัครที่ยินดีเข้าร่วมในงานวิจัยจะทำการลงลายมือชื่อยินยอมให้ทำการศึกษาไว้เป็นหลักฐานก่อนทำการเก็บตัวอย่าง กลุ่มอาสาสมัครที่เข้าร่วมในโครงการวิจัยประกอบด้วย 2 กลุ่มคือ

- กลุ่มอาสาสมัครที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรัง (chronic periodontitis) จำนวน 25 คน ที่มีความรุนแรงของโรคปริทันต์อักเสบในระดับปานกลางถึงรุนแรงมากโดยใช้หลักเกณฑ์ตามระบบการจำแนกโรคปริทันต์อักเสบของสมาคมปริทันตวิทยาแห่งประเทศไทย ปี คศ. 1999 [22] และมีฟันอย่างน้อย 1 ซี่ที่ต้องได้รับการถอนฟันเนื่องจากโรคปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรัง เนื้อเยื่อเหงือกบริเวณฟันซี่ดังกล่าวขนาดประมาณ 5 มม. x 5 มม. x 2 มม. จะถูกตัดออกมาเพื่อใช้เป็นชิ้นเนื้อตัวอย่างสำหรับการศึกษาการแสดงออกของ TFF ชนิดต่าง ๆ โดยเทคนิค Immunohistochemistry

- กลุ่มอาสาสมัครที่เป็นกลุ่มควบคุม จำนวน 25 คน ที่มีอวัยวะปริทันต์ที่ปกติ ไม่มีการสูญเสียการยึดเกาะของเนื้อเยื่อปริทันต์ และมีร่องลึกปริทันต์น้อยกว่า 4 มิลลิเมตร (no loss of attachment and probing depth < 4 mm.) และมีฟันอย่างน้อย 1 ซี่ที่มีอวัยวะปริทันต์ที่ปกติแต่ต้องได้รับการถอนฟันเพื่อการรักษาทางทันตกรรมจัดฟันหรือได้รับการรักษาทางศัลยกรรมปริทันต์โดยการผ่าตัดเหงือกเพื่อเพิ่มความยาวของตัวฟัน (surgical crown lengthening procedure) เนื้อเยื่อเหงือกบริเวณฟันซี่ดังกล่าวขนาดประมาณ 5 มม. x 5 มม. x 2 มม. จะถูกตัดออกมาเพื่อใช้เป็นชิ้นเนื้อตัวอย่างสำหรับการศึกษาการแสดงออกของ TFF ชนิดต่าง ๆ โดยเทคนิค Immunohistochemistry

2 การเก็บตัวอย่างน้ำลาย

การเก็บตัวอย่างน้ำลายนี้จะทำโดยคณะผู้วิจัยในช่วงเวลา 9.00-11.00 นาฬิกา ก่อนการเก็บตัวอย่างน้ำลาย ผู้วิจัยจะให้อาสาสมัครแต่ละคนบ้วนปากและนั่งพักประมาณ 10 นาที จากนั้นจึงให้อาสาสมัครบ้วนน้ำลายชนิดที่ไม่ได้รับการกระตุ้น (unstimulated whole saliva) ลงในหลอดพลาสติกปลอดเชื้อเป็นเวลา 10-15 นาที ผู้เข้าร่วมการวิจัยแต่ละคนจะถูกเก็บน้ำลายให้ได้คนละ 3-5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นตัวอย่างน้ำลายจะถูกนำมาเตรียมและจัดเก็บในห้องปฏิบัติการ โดยน้ำลายจะถูกนำไปเขย่าโดยใช้เครื่องเขย่าผสมสารให้เข้ากัน (vortex) นาน 2 นาที ก่อนทำการปั่นเหวี่ยงที่ 5000 rpm เป็นเวลา 10 นาที จึงแบ่งเก็บ supernatant จากตัวอย่างน้ำลายลงในหลอดเอพเพนดอร์ฟ หลอดละ 1 มิลลิลิตร แล้วนำตัวอย่างน้ำลายที่ได้ไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปทดสอบ

3 การวัดระดับ TFF ชนิดต่าง ๆ ในน้ำลายศึกษาด้วยวิธี ELISA

ตัวอย่างน้ำลายจะถูกนำมาวัดปริมาณ TFF ชนิดต่าง ๆ โดยโดยวิธีการ sandwich ELISA technique ซึ่งมีขั้นตอนการทำงานสรุปโดยย่อดังนี้

- 1 เจือจางตัวอย่างน้ำลายใน assay buffer, pH 8.0, containing 0.1 mol/L phosphate, 0.1% BSA, 0.1% Tween20 ในอัตราส่วนที่พอเหมาะสำหรับการตรวจหา TFF แต่ละชนิด (1:100 สำหรับ TFF1, 1:5 สำหรับ TFF2, 1:1000 สำหรับ TFF3)
- 2 เตรียม purified TFF แต่ละชนิด ใน assay buffer ให้มีลำดับความเข้มข้นที่เรียงตามลำดับจากความเข้มข้นมากไปสู่ความเข้มข้นน้อย (serial dilution) เพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับคำนวณความเข้มข้นของ TFF แต่ละชนิดจากตัวอย่างน้ำลาย ค่าความเข้มข้นของ TFF1 ใน assay buffer อยู่ระหว่าง 0.005-0.171 nmol/L ค่าความเข้มข้นของ TFF2 อยู่ระหว่าง 0.006-0.200 nmol/L และค่าความเข้มข้นของ TFF3 อยู่ระหว่าง 0.003-0.183 nmol/L
- 3 นำ capture antibodies (rabbit polyclonal antibodies ได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr. Lars Thim, Novo Nordisk, Department of Protein Chemistry, Novo Alle, DK-2880 Bagsværd, Denmark) ที่จำเพาะต่อ TFF แต่ละชนิด มาทำให้เจือจางใน coating buffer, pH 9.6, (15 mmol/L sodium carbonate, 35 mmol/L sodium bicarbonate) โดยเตรียมความเข้มข้น anti-human TFF1 rabbit polyclonal antibodies 0.24 µg/100 µL ความเข้มข้น anti-human TFF2 rabbit polyclonal antibodies 0.50 µg/100 µL ความเข้มข้น anti-human TFF3 rabbit polyclonal antibodies 0.20 µg/100 µL (100 µL /well) จากนั้นเก็บเพลทไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3 ชั่วโมง แล้วล้างเพลทด้วย washing buffer
- 4 นำตัวอย่างน้ำลายที่เจือจางแล้ว ปริมาณ 100 ไมโครลิตร/หลุม มาใส่ลงในไมโครเพลท 96 หลุม กำหนดให้ใช้สามหลุมต่อหนึ่งตัวอย่าง (triplicate) ในการนี้ นำ purified TFF แต่ละชนิด ใน assay buffer ที่มีลำดับความเข้มข้นที่เรียงตามลำดับจากความเข้มข้นมากไปสู่ความเข้มข้นน้อย ปริมาณ 100 ไมโครลิตร/หลุม มาใส่ลงในไมโครเพลท 96 หลุม กำหนดให้ใช้สามหลุมต่อหนึ่งตัวอย่าง (triplicate) จากนั้นเก็บเพลทไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 12 ชั่วโมง แล้วจึงล้างเพลทด้วย washing buffer
- 5 นำ detecting antibodies (rabbit polyclonal antibodies conjugated with biotin ได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr. Lars Thim) ที่จำเพาะต่อ TFF แต่ละชนิด มาทำให้เจือจางใน 0.1% bovine-albumin in phosphate buffer โดย dilution factor ที่ใช้สำหรับ biotinylated rabbit anti-human TFF1 antibodies 1:500, 1:500 สำหรับ TFF2 และ 1:2,000 สำหรับ TFF3 (100 µL /well) จากนั้นเก็บเพลทไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วล้างเพลทด้วย washing buffer
- 6 นำ 100 ไมโครลิตรของ horseradish peroxidase-avidin (Dakopatt), diluted 1:2000 in 10 nmol/L sodium phosphate, pH 7.4, 400 mmol/L NaCl, and 0.2 g/L lysozyme (Sigma) มาใส่ลงในเพลท จากนั้นเก็บเพลทไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาทีเพื่อการทำปฏิกิริยาและการเกิดสีจะทำได้โดยเติม 100 ไมโครลิตรของ TMB Microwell Substrate System (Kirkegaard and Perry Laboratories) ใส่ลงในเพลท จากนั้นเก็บเพลทไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 100 ไมโครลิตรของ stop solution (1 mol/L phosphoric acid) ลงในแต่ละหลุม
- 7 นำตัวอย่างน้ำลายและ purified TFF แต่ละชนิดใน sample diluent ที่มีลำดับความเข้มข้นที่เรียงตามลำดับไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density) ด้วยเครื่อง ELISA plate reader ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร
- 8 นำค่าการดูดกลืนแสงกับค่าความเข้มข้นของ purified TFF แต่ละชนิดไปสร้างกราฟมาตรฐาน ทำการแปลงข้อมูลแล้วเลือกกราฟเส้นตรงที่มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจใกล้ 1 ที่สุด เพื่อแสดงว่าสมการที่ได้มีความเหมาะสมที่จะนำไปคำนวณหาความเข้มข้นของ TFF แต่ละชนิดในน้ำลาย

การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

1. ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นของ TFF ชนิดต่าง ๆ ในน้ำลายถูกนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มอาสาสมัครที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังและกลุ่มอาสาสมัครที่เป็นกลุ่มควบคุม ด้วยค่าทางสถิติโดยใช้ Mann-Whitney test
2. ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ TFF ชนิดต่าง ๆ ในน้ำลายจากกลุ่มอาสาสมัครที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังและระดับความรุนแรงของโรคจะถูกวิเคราะห์โดยค่าสถิติชนิด Spearman's rank correlation coefficient

4 การเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อและการเตรียมชิ้นเนื้อเพื่อขั้นตอนทางอิมมูโนฮิสโตเคมี

เนื้อเยื่อเหงือกบริเวณฟันซี่ที่ถูกลบขนาดประมาณ 5 มม. x 5 มม. x 2 มม. จะถูกตัดออกมาและจะถูกนำไปแช่ในน้ำยาฟอมาลิน ก่อนจะนำไปเก็บรักษาเพื่อคงสภาพชิ้นเนื้อในแทงพาราฟิน ตัวอย่างชิ้นเนื้อจากอาสาสมัคร จะถูกนำไปตัดออกเป็นแผ่นบาง ๆ ขนาดความหนาประมาณ 5 ไมโครเมตร ด้วยเครื่องตัดชนิด Microtome โดยในการตัดนี้จะได้แผ่นชิ้นเนื้อจำนวน 5 แผ่น ชิ้นเนื้อจากชิ้นเนื้อของอาสาสมัครแต่ละราย แผ่นชิ้นเนื้อแต่ละแผ่นจะถูกนำไปติดบนแผ่นแก้ว แผ่นชิ้นเนื้อ 1 แผ่น จะถูกย้อมด้วย hematoxylin และ eosin (H&E) เพื่อใช้สำหรับอ้างอิง (reference) ส่วนที่เหลืออีก 4 แผ่น ชิ้นเนื้อจะถูกย้อมด้วยแอนติบอดีชนิดปฐมภูมิ (Primary antibody) ซึ่งจะทำการปฏิกิริยาเฉพาะกับ TFF ชนิดต่าง ๆ สำหรับชิ้นเนื้อแผ่นสุดท้ายจะถูกใช้เป็นตัวควบคุมลบ (Negative control)

5 การศึกษาการแสดงออกของ TFF ชนิดต่าง ๆ ในเนื้อเยื่อเหงือกด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี

การศึกษาวัยครั้งนี้จะใช้วิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีที่เรียกว่า Avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) ซึ่งเป็นวิธีการที่มี specificity และ sensitivity สูง โดยลำดับขั้นตอนและวิธีการได้ดัดแปลงมาจากรายงานของ Chaiyarit et al. [39,40] ชิ้นเนื้อทั้งหมดที่ผ่านขั้นตอนอิมมูโนฮิสโตเคมี จะถูกประเมินโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบ 2 ตา ที่มีกำลังขยาย 100 เท่า การประเมินการแสดงออกของ TFF ชนิดต่าง ๆ ในเนื้อเยื่อเหงือกจะใช้วิธี Semiquantitative method ที่ได้ดัดแปลงมาจากรายงานของ Chaiyarit et al. [39,40] โดยผู้ตรวจสอบได้บันทึกการติดสีที่จำเพาะ (immunostaining scores) ต่อ TFF ชนิดต่าง ๆ ดังนี้

- | | |
|---|---|
| 0 | : ไม่พบจำนวน positive cells |
| 1 | : ค่าเฉลี่ยของร้อยละจำนวน positive cells มีค่าน้อยกว่า 25% |
| 2 | : ค่าเฉลี่ยของร้อยละจำนวน positive cells มีค่าระหว่าง 25% ถึง 50% |
| 3 | : ค่าเฉลี่ยของร้อยละจำนวน positive cells มีค่ามากกว่า 50% ถึง 75% |
| 4 | : ค่าเฉลี่ยของร้อยละจำนวน positive cells มีค่ามากกว่า 75% |

การวิเคราะห์ทางสถิติ

1. ค่า immunostaining score จากตัวอย่างเนื้อเยื่อเหงือกจะถูกนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มอาสาสมัครที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรัง และกลุ่มอาสาสมัครที่เป็นกลุ่มควบคุม ด้วยค่าทางสถิติโดยใช้ Man-Whitney test
2. ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ TFF ชนิดต่าง ๆ ในเนื้อเยื่อเหงือกจากกลุ่มอาสาสมัครที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังและระดับความรุนแรงของโรคจะถูกวิเคราะห์โดยค่าสถิติชนิด Spearman's rank correlation coefficient

6 การศึกษาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ในน้ำลายด้วยวิธี real-time PCR

6.1 การเก็บตัวอย่าง

กลุ่มอาสาสมัครที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังแบบทั่วไป ทำการเก็บตัวอย่างเชื้อจากฟันที่ได้รับการถอนฟันเนื่องจากโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรัง 1 ตำแหน่ง และ ในกลุ่มควบคุม ทำการเก็บตัวอย่างเชื้อจากฟันที่ได้รับการถอนฟันจากเหตุผลเพื่อการรักษาทางทันตกรรมจัดฟันโดยการเก็บเชื้อจากร่องลึกปริทันต์ในแต่ละตำแหน่งทำได้โดย

- กันบริเวณที่จะเก็บเชื้อให้แห้งด้วยสำลีปลอดเชื้อ
- ใช้สำลีปลอดเชื้อเช็ดเพื่อกำจัดคราบจุลินทรีย์เหนือเหงือกออกจากฟันและเป่าลมเบาๆให้แห้ง
- ใช้แท่งกระดาษซับ (paper point) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อใส่เข้าไปในร่องลึกปริทันต์ที่ลึกที่สุดของร่องลึกปริทันต์ของฟันซี่ที่ศึกษาเพียงตำแหน่งเดียวจำนวน 1 แท่งจนถึงจุดลึกสุดทิ้งไว้นานเป็นเวลา 15 ถึง 20 วินาที จากนั้นนำแท่งกระดาษซับดังกล่าว บรรจุในเอพเพนดอร์ฟ (eppendorf) ปราศจากเชื้อ เพื่อนำไปตรวจวัดปริมาณเชื้อพอร์ไฟโรโมนเนสจึงจิवालิส เชื้อแอคกริเกทิบาคเตอร์ แอคติโนมัยซีเทมคอมมีแทนส์ และเชื้อเทนเนอเรลลา โฟร์ไซเทนซิสโดยวิธีเรียลไทม์ โพลีเมอเรสเชนรีแอคชั่น (real-time polymerized chain reaction [real-time PCR]) ซึ่งจะได้กล่าวต่อไป
- เก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ-80 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำตัวอย่างมาเข้าสู่ขบวนการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อตามข้อ 3 ต่อไป

6.2. การหาปริมาณเชื้อโดยวิธี real-time PCR

นำตัวอย่างที่เก็บไว้ในน้ำกลั่นมาปั่นด้วยเครื่องวอร์เท็กซ์ (vortex) เป็นเวลา 30 วินาทีเพื่อแยกเชื้อออกจากกระดาษซับ ทำการตรวจหาการมีเชื้อพอร์ไฟโรโมนเนส จึงจิवालิส เชื้อแอคกริเกทิบาคเตอร์ แอคติโนมัยซีเทมคอมมีแทนส์ เชื้อเทนเนอเรลลา โฟร์ไซเทนซิส และเชื้อทริฟอนีมา เดนดิโคลา จากตัวอย่างเชื้อที่ทำการเก็บจากกลุ่มตัวอย่างทั้งหมดโดยมีขั้นตอนคือเตรียมสารที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต หลังจากนั้นทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างโดยใช้ Instagene DNA purified matrix (Bio-Rad Lab, Hercules, CA) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ extracted DNA จะนำมาเป็น template สำหรับกระบวนการ เรียลไทม์ โพลีเมอเรสเชนรีแอคชั่น โดยใช้ SYBR Green เป็นตัวตรวจสอบตามวิธีของ Maeda et al., 2003 [41] ซึ่ง oligonucleotide primers ที่ใช้ในกระบวนการ Real-time PCR แสดงในตาราง

Targets	Primers (5'-3')
<i>P. gingivalis</i> 16S rDNA [41]	F:5'-CTTGACTTCAATGGCGGCAG -3' R:5'-AGGGAAGACGGTTTTCACCA-3'
<i>T. forsythensis</i> 16S rDNA [42]	F: 5'-GCGTATGTAACCTGCCCGCA-3' R:5'-TGCTTCAGTGTCAGTTATACCT-3'
<i>A. actinomycetemcomitans</i> 16S rDNA [41]	F:5'-CTTACCTACTCTTGACATCCGAA -3' R:5'-ATGCAGCACCTGTCTCAAAGC-3'

ผลการทดลอง

1. ข้อมูลพื้นฐานและสภาวะปริทันต์ของกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบและกลุ่มควบคุม

สำหรับการศึกษานี้มีอาสาสมัครรวมทั้งหมด 50 ราย ประกอบด้วยผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบจำนวน 25 รายและอาสาสมัครกลุ่มควบคุมจำนวน 25 ราย ในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบจำนวน 25 ราย เป็นเพศหญิง 13 ราย และเพศชาย 12 ราย มีอายุเฉลี่ย 52.20 ± 10.75 ปี ช่วงอายุตั้งแต่ 35 ถึง 73 ปี ผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบจำนวน 17 รายได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น localized periodontitis อีก 8 รายได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น genralized periodontitis ค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ SD) สำหรับสภาวะปริทันต์มีดังนี้

1. ร่องลึกปริทันต์ (pocket depth) ทั้งปาก	3.35 ± 0.80 มิลลิเมตร
2. ร่องลึกปริทันต์ เฉพาะพื้นที่ถูกถอน	6.78 ± 1.81 มิลลิเมตร
3. การยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์ (clinical attachment loss) ทั้งปาก	3.64 ± 0.92 มิลลิเมตร
4. การยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์ เฉพาะพื้นที่ถูกถอน	8.53 ± 2.72 มิลลิเมตร
5. อาการเลือดออกโดยเครื่องมือปริทันต์ (bleeding on probing; BOP)	64.61 ± 12.86 %

สำหรับอาสาสมัครกลุ่มควบคุมจำนวน 25 ราย เป็นเพศหญิง 19 ราย และ เพศชาย 6 ราย มีอายุเฉลี่ย 28.72 ± 10.98 ปี ช่วงอายุตั้งแต่ 20 ถึง 63 ปี ค่าเฉลี่ยสำหรับสภาวะปริทันต์มีดังนี้

1. ร่องลึกปริทันต์ ทั้งปาก	2.51 ± 0.16 มิลลิเมตร
2. ร่องลึกปริทันต์ เฉพาะพื้นที่ถูกถอน	2.72 ± 0.21 มิลลิเมตร
3. การยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์ ทั้งปาก	2.51 ± 0.13 มิลลิเมตร
4. การยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์ เฉพาะพื้นที่ถูกถอน	2.56 ± 0.45 มิลลิเมตร
5. อาการเลือดออกโดยเครื่องมือปริทันต์	6.41 ± 1.43 %

2. การวัดระดับ TFF1, TFF2 และ TFF3 ในน้ำลายด้วยวิธี ELISA

ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าระดับ TFF1 และ TFF3 ในน้ำลายจากกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบมีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.032$ และ $p = 0.037$ ตามลำดับ) (ตารางที่ 1) แต่ไม่พบความแตกต่างของระดับ TFF2 ในน้ำลายจากกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบและกลุ่มควบคุม

3. การประเมินผลด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี

ในเนื้อเยื่อเหงือกของกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบและกลุ่มควบคุมพบการย้อมติดสีที่จำเพาะสำหรับ TFF1, TFF2 และ TFF3 ในบริเวณชั้นฐานและเนื้อฐานของเซลล์บุผิวช่องปาก (รูปที่ 1, 2 และ 3) การประเมินผลพบว่าระดับคะแนนการย้อมติดสีที่จำเพาะต่อ TFF1 และ TFF2 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบและกลุ่มควบคุม แต่ระดับคะแนนการย้อมติดสีที่จำเพาะต่อ TFF3 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบและกลุ่มควบคุม ($p = 0.041$) โดยที่คะแนนการย้อมติดสีต่อ TFF3 ในกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเป็นไปในทิศทางที่ต่ำกว่าคะแนนในกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 2)

4. การวัดปริมาณเชื้อก่อโรคปริทันต์ในน้ำเหลืองเหงือกด้วยวิธี real time PCR

การศึกษานี้พบว่าปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับโรคปริทันต์อักเสบได้แก่ *P. gingivalis* และ *T. forsythensis* ในน้ำเหลืองเหงือกของกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบมีค่ามากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) แต่ไม่พบความแตกต่างของปริมาณ *A. actinomycetemcomitans* ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบและกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 3)

5. ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ TFF1, TFF2 และ TFF3 ที่ตรวจวัดจากน้ำลายและจากเนื้อเยื่อเหงือก

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ TFF1, TFF2 และ TFF3 ในน้ำลายด้วยค่าสถิติ Spearman's rank correlation coefficient พบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ TFF1 และ TFF2 ไปในทิศทางเดียวกันอย่างมี

นัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ทั้งในกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบและกลุ่มควบคุม แต่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง TFF1 และ TFF3 ในทั้งสองกลุ่ม การศึกษาครั้งนี้พบความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ TFF2 และ TFF3 ไปในทิศทางเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เฉพาะในกลุ่มกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 4)

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างค่าคะแนนการย้อมติดสีที่จำเพาะต่อ TFF1, TFF2 และ TFF3 ในเนื้อเยื่อเหงือกด้วยค่าสถิติ Spearman's rank correlation coefficient พบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่าง TFF1/ TFF2 และ TFF2/TFF3 ไปในทิศทางเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เฉพาะในกลุ่มควบคุม แต่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง TFF1, TFF2 และ TFF3 ในกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ (ตารางที่ 4)

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ TFF1, TFF2 และ TFF3 ในน้ำลายกับค่าคะแนนการย้อมติดสีที่จำเพาะต่อ TFF1, TFF2 และ TFF3 ในเนื้อเยื่อเหงือกด้วยค่าสถิติ Spearman's rank correlation coefficient พบความสัมพันธ์ระหว่าง TFF2 ในน้ำลายและ TFF2 ในเนื้อเยื่อเหงือกไปในทิศทางตรงกันข้ามกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เฉพาะในกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ แต่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง TFF1, TFF2 และ TFF3 ในน้ำลายและเนื้อเยื่อเหงือกจากกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 4)

6. ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อก่อโรคปริทันต์ในน้ำเหลืองเหงือกและค่าสภาวะปริทันต์

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อก่อโรคปริทันต์ในน้ำเหลืองเหงือกและค่าสภาวะปริทันต์ด้วยค่าสถิติ Spearman's rank correlation coefficient พบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อ *P. gingivalis* และ *T. forsythensis* กับค่าสภาวะปริทันต์ได้แก่ อาการเลือดออกโดยเครื่องมือปริทันต์ ร่องลึกปริทันต์ และการยืดเกาะของอวัยวะปริทันต์ไปในทิศทางเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อ *A. actinomycetemcomitans* กับค่าสภาวะปริทันต์ (ตารางที่ 5)

7. ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อก่อโรคปริทันต์ในน้ำเหลืองเหงือกกับปริมาณ TFF1, TFF2 และ TFF3 ที่ตรวจวัดจากน้ำลาย

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อก่อโรคปริทันต์ในน้ำเหลืองเหงือกกับปริมาณ TFF1, TFF2 และ TFF3 ที่ตรวจวัดจากน้ำลายด้วยค่าสถิติ Spearman's rank correlation coefficient พบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อ *P. gingivalis* และ *T. forsythensis* กับระดับ TFF3 ในน้ำลายไปในทิศทางตรงกันข้ามกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อ *A. actinomycetemcomitans* กับปริมาณ TFF1, TFF2 และ TFF3 ที่ตรวจวัดจากน้ำลาย (ตารางที่ 6)

8. ความสัมพันธ์ระหว่างค่าสภาวะปริทันต์กับปริมาณ TFF1, TFF2 และ TFF3 ที่ตรวจวัดจากน้ำลาย

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างค่าสภาวะปริทันต์กับปริมาณ TFF1, TFF2 และ TFF3 ที่ตรวจวัดจากน้ำลายด้วยค่าสถิติ Spearman's rank correlation coefficient พบความสัมพันธ์ระหว่างค่าสภาวะปริทันต์ได้แก่ อาการเลือดออกโดยเครื่องมือปริทันต์ ร่องลึกปริทันต์ และการยืดเกาะของอวัยวะปริทันต์กับปริมาณ TFF3 ที่ตรวจวัดจากน้ำลายไปในทิศทางตรงกันข้ามอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) พบความสัมพันธ์ระหว่างค่าสภาวะปริทันต์ได้แก่ อาการเลือดออกโดยเครื่องมือปริทันต์ กับปริมาณ TFF1 และ TFF2 ที่ตรวจวัดจากน้ำลายไปในทิศทางตรงกันข้ามอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 1 ปริมาณ TFF1, TFF2 และ TFF3 ที่ตรวจวัดในน้ำลายจากอาสาสมัครปกติและผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ ด้วยวิธี ELISA

<u>Salivary TFF peptide concentrations (nmol/ gram salivary protein)</u>			
	<u>median (interquartile range)</u>	<u>minimum</u>	<u>maximum</u>
<u>TFF1</u> [*]			
Healthy subjects (n=25)	2.85 (2.03)	0.64	8.39
Chronic periodontitis (n=25)	1.62 (1.47)	0.39	4.65
<u>TFF2</u>			
Healthy subjects (n=25)	0.09 (0.14)	0.01	1.16
Chronic periodontitis (n=25)	0.06 (0.09)	0.01	0.32
<u>TFF3</u> ^{**}			
Healthy subjects (n=25)	16.72 (11.69)	8.70	70.73
Chronic periodontitis (n=25)	8.47 (4.95)	3.5	15.45

* เครื่องหมายดอกจันหนึ่งบ่งชี้ว่าระดับ TFF1 ในน้ำลายผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p = 0.032)

** เครื่องหมายดอกจันสองบ่งชี้ว่าระดับ TFF3 ในน้ำลายผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p = 0.037)

ตารางที่ 2 ระดับคะแนนการย้อมติดสีต่อ TFF1, TFF2 และ TFF3 ที่ตรวจวัดในเนื้อเยื่อเหงือกจากอาสาสมัครปกติ (control) และผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ (periodontitis) ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี

Immunostaining score ^a	TFF1		TFF2		TFF3 [*]	
	Control	Periodontitis	Control	Periodontitis	Control	Periodontitis
	(n = 25)	(n = 25)	(n = 25)	(n = 25)	(n = 25)	(n = 25)
0	8	5	11	13	8	15
1	6	6	1	0	7	5
2	0	3	3	2	0	1
3	1	2	0	3	3	1
4	10	9	10	7	7	3

^aImmunostaining score ถูกจัดระดับคะแนนดังนี้

0 = ไม่พบเซลล์ที่ย้อมติดสี

1 = น้อยกว่า 25% ของเซลล์ที่ย้อมติดสี

2 = ตั้งแต่ 25% ถึง 50% ของเซลล์ที่ย้อมติดสี

3 = ตั้งแต่ 50% ถึง 75% ของเซลล์ที่ย้อมติดสี

4 = มากกว่า 75% ของเซลล์ที่ย้อมติดสี

^{*} เครื่องหมายดอกจันบ่งชี้ว่าการแสดงออกของ TFF3 ระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p = 0.041)

ตารางที่ 3 ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับโรคปริทันต์อักเสบ (*P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* และ *T. forsythensis*) ที่ตรวจวัดในน้ำเหลืองเหงือกจากอาสาสมัครปกติและผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบด้วยวิธี real time PCR

	<u>Amount of periodontopathic bacteria (cells)</u>			
	<u>median</u>	<u>interquartile range</u>	<u>minimum</u>	<u>maximum</u>
<i>P. gingivalis</i> *				
Healthy subjects (n=25)	0	3	0	1035
Periodontitis (n=25)	4,280	60,323	0	417,999
<i>A. actinomycetemcomitans</i>				
Healthy subjects (n=25)	0	0	0	57
Periodontitis (n=25)	0	3	0	1,326
<i>T. forsythensis</i> **				
Healthy subjects (n=25)	0	0	0	4,306
Periodontitis (n=25)	3,273	11,629	0	28,880

* เครื่องหมายดอกจันหนึ่งบ่งชี้ว่าปริมาณ *P. gingivalis* ในน้ำเหลืองเหงือกจากผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$)

** เครื่องหมายดอกจันหนึ่งบ่งชี้ว่าปริมาณ *T. forsythensis* ในน้ำเหลืองเหงือกจากผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$)

ตารางที่ 4 ความสัมพันธ์ของปริมาณ TFF1, TFF2 และ TFF3 (nmol/g protein) ในน้ำลาย ความสัมพันธ์ระหว่างค่า immunostaining scores ของ TFF1, TFF2 และ TFF3 ในเนื้อเยื่อเหงือก และความสัมพันธ์ระหว่าง TFF1, TFF2 และ TFF3 ในเนื้อเยื่อเหงือกและในน้ำลาย จากอาสาสมัครปกติ (control) และผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ (periodontitis)

	<u>Correlation coefficient values</u>	
	Control (n = 25)	Periodontitis (n = 25)
<u>Salivary TFF concentrations^a</u>		
TFF1 and TFF2	0.409 [*]	0.669 [*]
TFF1 and TFF3	0.347	0.052
TFF2 and TFF3	0.816 [*]	0.008
<u>TFF immunostaining scores^b</u>		
TFF1 and TFF2	0.638 [*]	0.227
TFF1 and TFF3	0.390	0.036
TFF2 and TFF3	0.484 [*]	0.086
<u>Salivary TFF concentrations and TFF immunostaining scores^b</u>		
TFF1 and TFF1	0.013	0.150
TFF2 and TFF2	-0.047	-0.510 [*]
TFF3 and TFF3	-0.072	0.118

* เครื่องหมายดอกจันแสดงถึงความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p-value มีค่าน้อยกว่า 0.05

ตารางที่ 5 ความสัมพันธ์ของปริมาณปริมาณเชื้อก่อโรคปริทันต์ในน้ำเหลืองเหงือกและสภาวะปริทันต์จาก
อาสาสมัครปกติและผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ

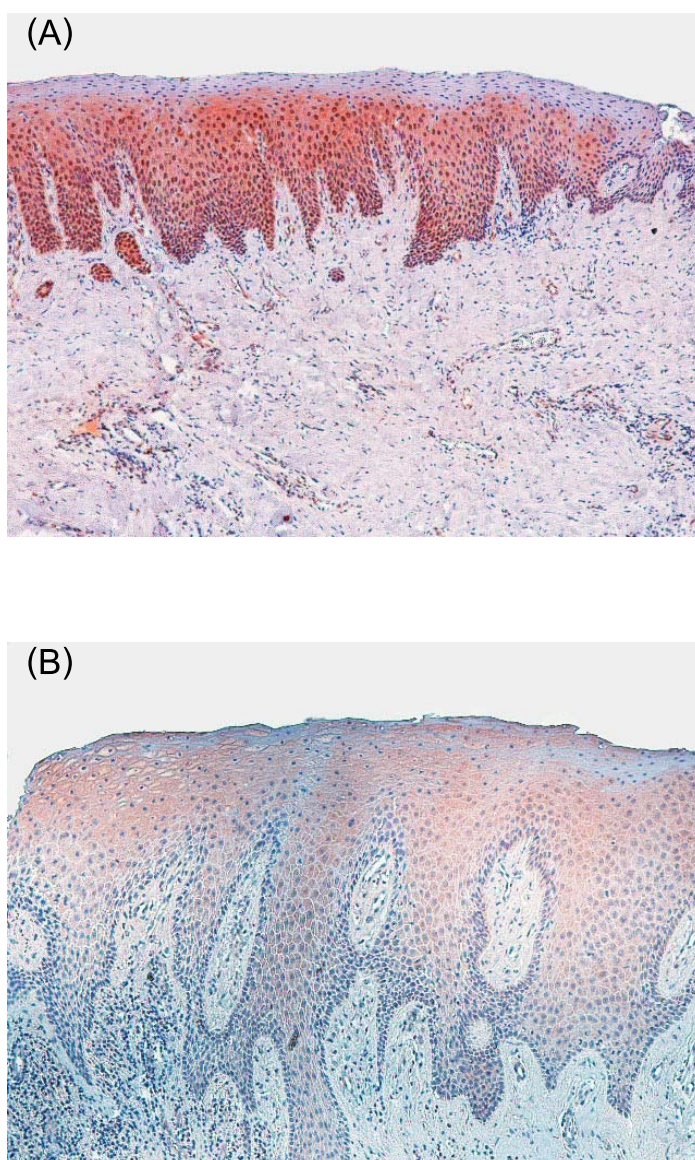
	<u>Number of periodontal bacteria</u>		
	<i>Pg</i>	<i>Aa</i>	<i>Tf</i>
<u>Periodontal status (all remaining teeth)</u>			
Bleeding on probing (BOP)			
Spearman correlation coefficient	0.680	0.094	0.557
<i>P</i> -value	< 0.001	0.518	< 0.001
Number of cases	50	50	50
Pocket depth (PD)			
Spearman correlation coefficient	0.585	0.106	0.456
<i>P</i> -value	< 0.001	0.465	0.001
Number of cases	50	50	50
Clinical attachment level (CAL)			
Spearman correlation coefficient	0.663	0.109	0.526
<i>P</i> -value	< 0.001	0.451	< 0.001
Number of cases	50	50	50

ตารางที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าปริมาณเชื้อก่อโรคปริทันต์ในน้ำเหลืองเหงือกกับปริมาณ TFF1, TFF2 และ TFF3 (nmol/g protein) ในน้ำลายและค่า immunostaining scores ของ TFF1, TFF2 และ TFF3 ในเนื้อเยื่อเหงือกจากผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบและอาสาสมัครปกติ

	<u>Number of periodontal bacteria</u>		
	Pg	Aa	Tf
<u>Salivary TFF concentrations</u>			
TFF1 (nmol/gram protein)			
Spearman correlation coefficient	-0.218	-0.247	-0.237
<i>P</i> -value	0.129	0.084	0.097
Number of cases	50	50	50
TFF2 (nmol/gram protein)			
Spearman correlation coefficient	-0.100	-0.241	-0.098
<i>P</i> -value	0.487	0.092	0.499
Number of cases	50	50	50
TFF3 (nmol/gram protein)			
Spearman correlation coefficient	-0.383	-0.078	-0.462
<i>P</i> -value	0.006	0.590	0.001
Number of cases	50	50	50

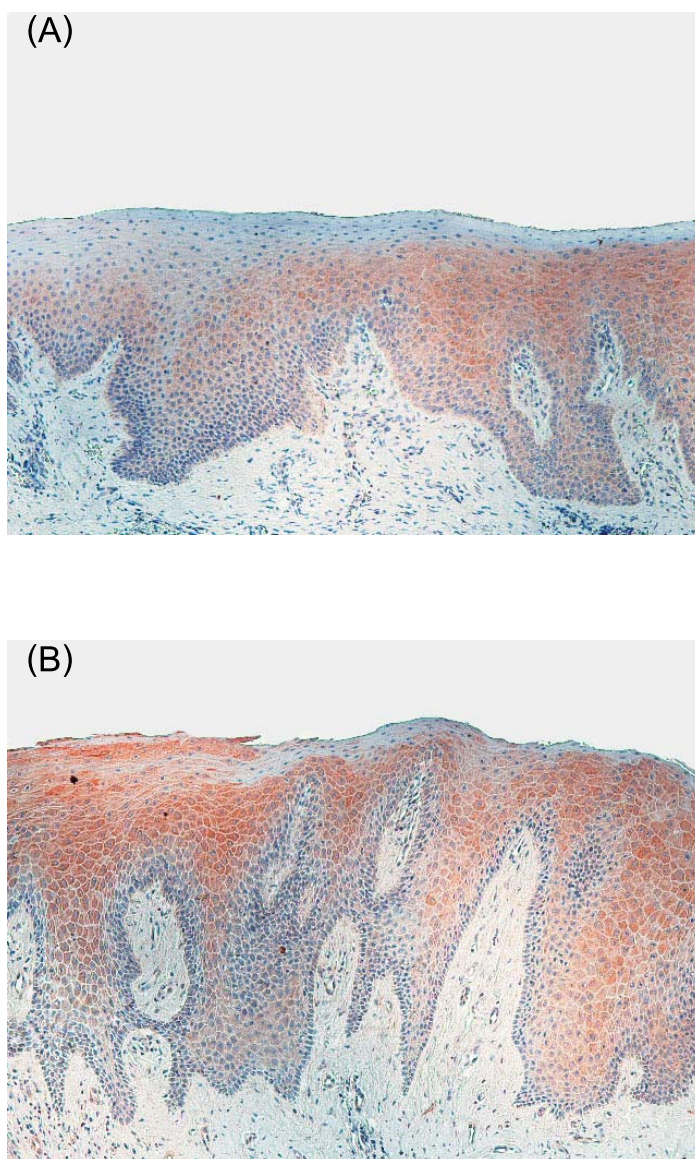
ตารางที่ 7 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าสภาวะปริทันต์กับปริมาณ TFF1, TFF2 และ TFF3 ที่ตรวจวัดจากน้ำลายจาก
อาสาสมัครปกติและผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ

	<u>Periodontal status</u>		
	BOP (%)	PD (mm)	CAL (mm)
<u>Salivary TFF concentrations</u>			
TFF1 (nmol/gram protein)			
Spearman correlation coefficient	-0.365	-0.181	-0.274
<i>P</i> -value	0.009	0.208	0.055
Nmber of cases	50	50	50
TFF2 (nmol/gram protein)			
Spearman correlation coefficient	-0.282	-0.182	-0.242
<i>P</i> -value	0.047	0.206	0.090
Nmber of cases	50	50	50
TFF3 (nmol/gram protein)			
Spearman correlation coefficient	-0.531	-0.391	-0.490
<i>P</i> -value	< 0.001	0.005	< 0.001
Nmber of cases	50	50	50



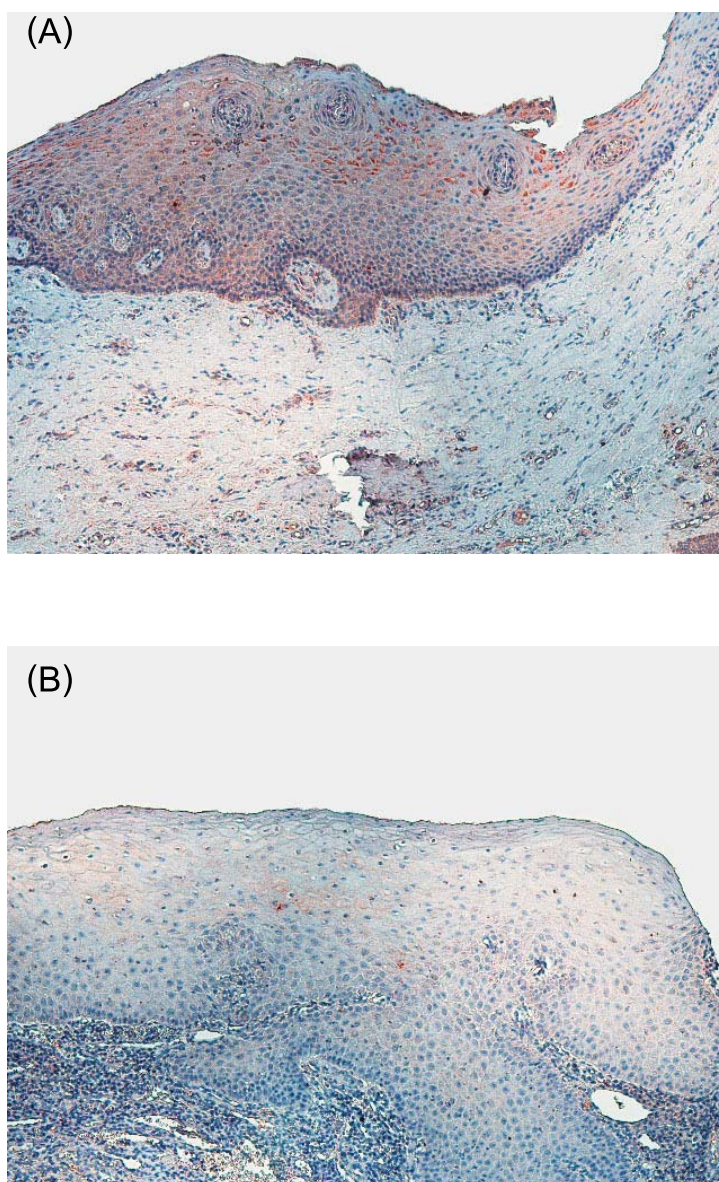
รูปภาพที่ 1

การแสดงออกของ TFF1 จากตัวอย่างเนื้อเยื่อเหงือกของอาสาสมัครปกติ (A) และผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ (B) การย้อมติดสีน้ำตาลแดงแสดงความจำเพาะต่อ TFF1 ซึ่งเซลล์ที่ย้อมติดสีจำเพาะพบได้ในชั้นฐานและเนื้อฐานของชั้นเซลล์บุผิวช่องปากในเนื้อเยื่อเหงือกของอาสาสมัครปกติและผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ (x100)



รูปภาพที่ 2

การแสดงออกของ TFF2 จากตัวอย่างเนื้อเยื่อเหงือกของอาสาสมัครปกติ (A) และผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ (B) การย้อมติดสีน้ำตาลแดงแสดงความจำเพาะต่อ TFF2 ซึ่งเซลล์ที่ย้อมติดสีจำเพาะพบได้ในชั้นฐานและเหนือฐานของชั้นเซลล์บุผิวช่องปากในเนื้อเยื่อเหงือกของอาสาสมัครปกติและผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ (x100)



รูปภาพที่ 3

การแสดงออกของ TFF3 จากตัวอย่างเนื้อเยื่อเหงือกของอาสาสมัครปกติ (A) และผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ (B) การย้อมติดสีน้ำตาลแดงแสดงความจำเพาะต่อ TFF3 ซึ่งเซลล์ที่ย้อมติดสีจำเพาะพบได้ในชั้นฐานและเหนือฐานของชั้นเซลล์บุผิวช่องปากในเนื้อเยื่อเหงือกของอาสาสมัครปกติและผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ (x100)

บทวิจารณ์

การศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่า TFF peptides ตรวจพบได้ใน mucous producing cells ของเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ อีกทั้งยังพบ TFF peptides ได้ในสารคัดหลั่งของร่างกาย เช่น สารคัดหลั่งในกระเพาะอาหาร ตับอ่อน ตลอดจนตรวจพบได้ในน้ำนม และ ในซีรัม ผลการทดลองด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีและ ELISA แสดงให้เห็นว่ามีการแสดงออกของ TFF1, TFF2 และ TFF3 ในเนื้อเยื่อเหงือกและในน้ำลาย การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าในน้ำลายของมนุษย์จะมีปริมาณของ TFF3 มากที่สุด รองลงมาคือ TFF1 สำหรับ TFF2 ในน้ำลายมีปริมาณน้อยมาก การศึกษาที่ได้ครั้งนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาในอดีต [37] ที่ระบุว่า ปริมาณ mRNA ของ TFF3 พบมากที่สุดในต่อมน้ำลาย รองลงมาคือ mRNA ของ TFF1 และพบ mRNA ของ TFF2 ในต่อมน้ำลายน้อยมาก จากผลที่ได้ดังกล่าวอาจบอกได้ว่า ต่อมน้ำลายจะผลิต TFF3 และ TFF1 เป็นส่วนใหญ่ ปริมาณ TFF2 ในน้ำลายบางส่วนอาจมาจากกระแสเลือดที่ผ่านออกมาทางน้ำเหลืองเหงือก สำหรับ TFF3 ในน้ำลายอาจจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการ wound healing process ในช่องปาก อย่างไรก็ตามการศึกษาต่อไปในอนาคตเกี่ยวกับบทบาทของ TFF3 ต่อการหายของบาดแผลในช่องปากจึงมีความสำคัญและน่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง

การแสดงออกของ TFF3 ในชั้นเนื้อเยื่อเหงือกของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุม โดยการแสดงออกนั้นเป็นไปในทิศทางลดลงในกลุ่มของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ แต่การแสดงออกของ TFF1 และ TFF2 ของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม มีการศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าในผู้ป่วยกระเพาะอาหารอักเสบที่ติดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโรลี (*Helicobacter pylori*) มีการแสดงออกของ TFF ชนิดต่างๆที่บริเวณเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยกระเพาะอาหารอักเสบแต่ไม่ติดเชื้อดังกล่าว [36] จากข้อมูลดังกล่าวที่ได้และข้อมูลวิจัยก่อนๆ อาจนำไปสู่การตั้งสมมุติฐานที่ว่า พยาธิสภาพจากการอักเสบเรื้อรังในบริเวณเนื้อเยื่อเหงือก ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อการแสดงออกของ TFF3 นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้อาจนำไปสู่การตั้งสมมุติฐานอื่นๆที่ว่ากลไกการควบคุมการแสดงออกของ TFF3 อาจแตกต่างไปจาก TFF1 และ TFF2 อย่างไรก็ตามสมมุติฐานนี้จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปเพื่อพิสูจน์ความถูกต้อง

จากผลการศึกษาทำให้ทราบว่ารูปแบบการแสดงออกของ TFF peptides ในเนื้อเยื่อเหงือกแตกต่างจากการแสดงออกของ TFF peptides ในน้ำลาย กล่าวคือการแสดงออกของ TFF3 ในเนื้อเยื่อเหงือกของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเป็นไปในทิศทางลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่ในน้ำลายระดับของ TFF1 และ TFF3 ลดลงในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ข้อมูลดังกล่าวอาจนำไปสู่การตั้งสมมุติฐานที่ว่า กลไกการแสดงของ TFF peptides ในเนื้อเยื่อเหงือกอาจได้รับผลกระทบโดยตรงจากพยาธิสภาพของโรคปริทันต์อักเสบ แต่การแสดงออกของ TFF peptides ในน้ำลาย เป็นผลที่เกิดจากการสร้างและหลั่งโมเลกุลชนิดนี้จากเซลล์ของต่อมน้ำลาย ดังนั้นการเกิดพยาธิสภาพของโรคปริทันต์อักเสบอาจมีผลกระทบต่อการสร้าง TFF peptides ในน้ำลายและเนื้อเยื่อเหงือกด้วยกลไกที่แตกต่างกัน การวิจัยต่อไปเกี่ยวกับกลไกที่จำเพาะต่อการควบคุมการแสดงออกของ TFF peptides ในต่อมน้ำลายและเนื้อเยื่อเหงือกจึงมีความสำคัญต่อการศึกษถึงผลกระทบของโรคปริทันต์อักเสบต่อการสร้าง TFF peptides จากต่อมน้ำลายและเนื้อเยื่อเหงือก

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าปริมาณเชื้อ *P. gingivalis* และ *T. forsythensis* เพิ่มขึ้นในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม สำหรับเชื้อ *A. actinomycetemcomitans* มักจะพบปริมาณเพิ่มขึ้นในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดรุนแรง (aggressive periodontitis) แต่ในผู้ป่วยในการศึกษานี้ส่วนใหญ่เป็นโรคปริทันต์อักเสบที่ไม่รุนแรง ดังนั้นจึงไม่พบความแตกต่างของปริมาณเชื้อ *A. actinomycetemcomitans* ระหว่างผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เมื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อก่อโรคปริทันต์ทั้งสามชนิดกับการแสดงออกของ TFF peptides ในน้ำลายและเนื้อเยื่อเหงือก พบความสัมพันธ์ระหว่าง TFF3 ใน

น้ำลายกับปริมาณเชื้อ *P. gingivalis* และ *T. forsythensis* ไปในทิศทางตรงกันข้ามอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และพบความสัมพันธ์ระหว่าง TFF3 ในน้ำลายกับค่าสภาวะปริทันต์ไปในทิศทางตรงกันข้ามอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากผลการศึกษาที่ได้อาจนำไปสู่การการทําวิจัยต่อไปในอนาคตเพื่อหาข้อมูลเกี่ยวกับผลการยับยั้งการสร้าง TFF3 ในน้ำลายจากเชื้อ *P. gingivalis* และ *T. forsythensis* เช่น การศึกษา proteolytic enzymes เช่น gingipain ที่ผลิตขึ้นโดยเชื้อ *P. gingivalis* และเอนไซม์ karilysin ที่ผลิตขึ้นโดยเชื้อ *T. forsythensis* ว่ามีผลต่อการทำลายโครงสร้างทางโมเลกุลของ TFF peptides หรือไม่ นอกจากนี้การวิเคราะห์เกี่ยวกับคุณลักษณะของตัวอย่างน้ำลายที่เก็บมาตรวจสอบนั้นเป็นน้ำลายชนิด whole saliva ซึ่งเป็น mixed fluids ที่มีองค์ประกอบหลักของมาจากต่อมน้ำลายซึ่งเกี่ยวข้องกับ secretory immune response และองค์ประกอบเป็นส่วนน้อยที่ได้มาจากน้ำเหลืองเหลืองซึ่งเกี่ยวข้องกับ systemic immune response แต่เป็นที่ทราบกันดีว่าบริเวณอวัยวะปริทันต์จะมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิด systemic immune response ต่อพยาธิสภาพของโรคปริทันต์อักเสบ ดังนั้นการวิจัยต่อไปในอนาคตเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ TFF1, TFF2 และ TFF3 ในน้ำเหลืองเหลืองกับค่าสภาวะปริทันต์ เช่น ร่องลึกปริทันต์และการยืดเกาะของอวัยวะปริทันต์และความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ TFF1, TFF2 และ TFF3 ในน้ำเหลืองเหลืองกับกับปริมาณเชื้อก่อโรคปริทันต์อักเสบจึงเป็นประเด็นที่น่าสนใจ

ผลการวิเคราะห์ครั้งนี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างค่าคะแนนการย้อมติดสีที่จำเพาะต่อ TFF ชนิดต่างๆ ในเนื้อเยื่อเหงือกกับค่าสภาวะปริทันต์และปริมาณเชื้อก่อโรคปริทันต์อักเสบ ทั้งนี้อาจตั้งสมมุติฐานได้ว่าการลดระดับการแสดงออกของ TFF3 ในเนื้อเยื่อเหงือกเป็นผลที่เกิดขึ้นจากภาวะการอักเสบเรื้อรังและกลไกที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง TFF3 ในเนื้อเยื่อเหงือกอาจแตกต่างจากกลไกที่สร้าง TFF3 จากต่อมน้ำลาย จากข้อมูลเบื้องต้นมีประเด็นที่น่าสนใจสำหรับการศึกษานในเชิงลึกเกี่ยวกับปัจจัยที่ควบคุมการสร้าง TFF3 เนื้อเยื่อเหงือกและปริมาณ TFF3 ที่ตรวจวัดได้ในน้ำลายและน้ำเหลืองเหลืองของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเพื่อที่จะศึกษาถึงความสัมพันธ์กับค่าสภาวะปริทันต์และข้อมูลที่ได้อาจนำไปใช้ประโยชน์สำหรับการประเมินผลการรักษาผู้ป่วย

ผลที่ได้รับจากโครงการวิจัย

โครงการวิจัยนี้ได้ดำเนินการสำเร็จตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้และผลที่ได้รับจากโครงการวิจัยสามารถแบ่งออกเป็นประเภทต่างๆดังนี้

1. ข้อมูลใหม่ที่ได้จากการวิจัย

กล่าวโดยสรุปการวิจัยชิ้นนี้นำมาซึ่งข้อมูลใหม่เกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ TFF peptides ในเนื้อเยื่อเหงือกและน้ำลายของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอาสาสมัครที่มีสุขภาพช่องปากปกติ ข้อมูลที่ได้นี้นับว่าเป็นประโยชน์ที่จะนำไปศึกษาในเชิงลึกเกี่ยวกับกลไกที่ควบคุมการสร้าง TFF peptides ในเนื้อเยื่อเหงือกและน้ำลายภายใต้พยาธิสภาพของโรคปริทันต์อักเสบและอาจนำไปประยุกต์ใช้กับการศึกษาวิจัยทางคลินิกในด้านที่เกี่ยวข้องกับการติดตามผลการรักษาผู้ป่วย

2. การเผยแพร่ผลงานวิจัยในที่ประชุมทางวิชาการระดับนานาชาติ (ภาคผนวก ก)

Chaiyarit P. 2009. Expression of salivary trefoil factors in patients with chronic periodontitis.

Abstract of 2th Annual Protein and Peptide Conference. Seoul, South Korea (April 2-4, 2009)

3. บทความต้นฉบับเพื่อตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติที่มี impact factor

ตามเอกสารแนบ (ภาคผนวก ข)

4. การสร้างเครือข่ายความร่วมมือด้านการวิจัยในประเทศ

จากการศึกษาเกี่ยวกับ TFF peptides และความสัมพันธ์ของโมเลกุลชนิดนี้กับโรคในช่องปากทำให้เกิดเครือข่ายความร่วมมือทางงานวิจัยดังนี้

4.1 การศึกษา molecular forms (monomer and dimer) of TFF3 in human saliva, using mass spectrometer (Maldi-TOF/TOF) ได้รับความร่วมมือจาก ดร. สิทธิรักษ์ รอยตระกูล จาก ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC)

4.2 การศึกษา DNA methylation in promoter region of *TFF3* gene derived from oral cancer cells

ได้รับความร่วมมือจาก รศ.ดร. เต็มดวง ลิ้มไพบูลย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

4.3 การผลิต monoclonal antibodies against human TFF3 peptide ได้รับความร่วมมือจาก ศ.ดร. วัชร กสิณฤกษ์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

5. การสร้างเครือข่ายความร่วมมือด้านการวิจัยในต่างประเทศ

5.1 Ebba Nexø, M.D., Ph.D., Professor of Clinical Biochemistry

Department of Clinical Biochemistry

Aarhus University Hospital

Norrebrogade 44

Dk 8000 aarhus C, Denmark

5.2 Andy Giraud, Ph.D., Professor

Research Director

Infection, Immunity & Environment Theme

Group Head: Gastrointestinal Research in Inflammation and Pathology (GRIP) Lab

Murdoch Childrens Research Institute

The Royal Children's Hospital

Flemington Road Parkville Victoria 3052 Australia

เอกสารอ้างอิง

1. Schenkein, H., *The pathogenesis of periodontal diseases*. J Periodontol, 1999. 70(4): 457-70.
2. Genco, R.J., *Host responses in periodontal diseases: current concepts*. J Periodontol, 1992. 63(Suppl):338-55.
3. Van Dyke, T.E., M.A. Lester, and L. Shapira, *The role of the host response in periodontal disease progression: implications for future treatment strategies*. J Periodontol, 1993. 64(Suppl):792-806.
4. Socransky, S.S., et al., *Microbiological parameters associated with IL-1 gene polymorphisms in periodontitis patients*. J Clin Periodontol, 2000. 27: 810-8.
5. Theilade, E., *The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases*. J Clin Periodontol, 1986. 13: 905-11.
6. Slots, J., *Microbiology in periodontics*. Tandlaegebladet, 1986. 90: 794-8.
7. Baker, P.J., *The role of immune responses in bone loss during periodontal disease*. Microbes Infect, 2000. 2: 1181-92.
8. Graves, D.T., *The potential role of chemokines and inflammatory cytokines in periodontal disease progression*. Clin Infect Dis, 1999. 28: 482-90.
9. Wennstrom, J.L., et al., *Full-mouth ultrasonic debridement versus quadrant scaling and root planing as an initial approach in the treatment of chronic periodontitis*. J Clin Periodontol, 2005. 32: 851-9.
10. Cobb, C.M., *Non-surgical pocket therapy: mechanical*. Ann Periodontol, 1996. 1(1): p. 443-90.
11. Knowles, J.W., et al., *Results of periodontal treatment related to pocket depth and attachment level. Eight years*. J Periodontol, 1979. 50: 225-33.
12. Lindhe, J. and S. Nyman, *Long-term maintenance of patients treated for advanced periodontal disease*. J Clin Periodontol, 1984. 11: 504-14.
13. Muller, H.P. and A. Heinecke, *Clinical effects of scaling and root planing in adults infected with Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Clin Oral Investig, 2004. 8: 63-9.
14. Ramfjord, S.P., et al., *Oral hygiene and maintenance of periodontal support*. J Periodontol, 1982. 53: 26-30.
15. Van der Weijden, G.A. and M.F. Timmerman, *A systematic review on the clinical efficacy of subgingival debridement in the treatment of chronic periodontitis*. J Clin Periodontol, 2002. 29 (Suppl): 55-71; discussion 90-1.
16. Aukhil, I., *Biology of tooth-cell adhesion*. Dent Clin North Am, 1991. 35: 459-67.
17. Garrett, S., *Periodontal regeneration around natural teeth*. Ann Periodontol, 1996. 1: 621-66.
18. Martin, P., *Wound healing--aiming for perfect skin regeneration*. Science, 1997. 276: 75-81.
19. Conway, E.M., D. Collen, and P. Carmeliet, *Molecular mechanisms of blood vessel growth*. Cardiovasc Res, 2001. 49: 507-21.
20. Grzesik, W.J. and A.S. Narayanan, *Cementum and periodontal wound healing and regeneration*. Crit Rev Oral Biol Med, 2002. 13: 474-84.
21. Wikesjo, U.M. and K.A. Selvig, *Periodontal wound healing and regeneration*. Periodontol 2000, 1999. 19: 21-39.

22. Chinery, R., J. Williamson, R. Poulson, *The gene encoding human intestinal trefoil factor (TFF3) is located on chromosome 21q223 clustered with other members of the trefoil peptide family.* Genomics 1996. 32: 281-4.
23. Thim, L., F.E.B. May, *Structure of mammalian trefoil factors and functional insights.* Cell Mol Life Sci 2005. 62: 2956-73.
24. Otto, W.R., L. Thim, *Trefoil factors Trefoil factor family-interacting proteins.* Cell Mol Life Sci 2005. 62: 2939-46.
25. Westley, B.R., S.M. Griffin, F.E. May, *Interaction between TFF1, a gastric tumour suppressor trefoil protein, and TFIZ1, brichos domain-containing protein with homology to SP-C.* Biochemistry 2005. 44: 7967-75.
26. Tebbutt, N.C., A.S. Giraud, M. Inglese, B. Jenkins, P. Waring, F.J. Clay, et al., *Reciprocal regulation of gastrointestinal homeostasis by SHP2 and STAT-mediated trefoil gene activation in gp 130 mutant mice.* Nat Med 2002. 8: 1089-97.
27. Blanchard, C., S. Durual, M. Estienne, K. Bouzakiri, M.H. Heim, N. Blin, et al., *IL-4 and IL-13 up-regulate intestinal trefoil factor expression: requirement for STAT6 and de novo protein synthesis.* J Immunol 2004. 172: 3775-83.
28. Dossinger, V., T. Kayademir, N. Blin, P. Gott, *Downregulation of TFF expression in gastrointestinal cell lines by cytokines and nuclear factors.* Cell Physiol Biochem 2002. 12: 197-206.
29. Baus-Loncar, M., E.D. Al Azzeh, H. Romanska, el-N. Lalani, G.W. Stamp, N. Blin, et al., *Transcriptional control of TFF3 (intestinal trefoil factor) via promoter binding sites for the nuclear factor kappaB and C/EBPbeta.* Peptides 2004. 25: 849-54.
30. Taupin, D., D.K. Podolsky, *Trefoil factors initiatory of mucosal healing.* Mol Cell Biol 2003. 4: 721-34.
31. Taupin, D., K. Kinoshita, D.K. Podolsky, *Intestinal trefoil factor confers colonic epithelial resistance to apoptosis.* Proc Natl Acad Sci USA 2000. 97: 799-804.
32. Cook, G.A., M. Familiari, L. Thim, A.S. Giraud, *The trefoil peptides TFF2 and TFF3 are expressed in rat lymphoid tissues and participates in immune response.* FEBS Lett 1999. 456: 155-9.
33. Baus-Loncar, M., J. Schmid, el-N. Lalani, I. Rosewell, R.A. Goodlad, G.W. Stamp, et al., *Trefoil factor 2 deficiency in murine digestive tract influences the immune system.* Cell Physiol Biochem 2005. 16: 31-42.
34. Baus-Loncar, M., T. Kayademir, S. Takaishi, T. Wang, *Trefoil factor family 2 deficiency and immune response.* Cell Mol Life Sci 2005. 62: 2947-55.
35. Vestergaard, E.M., J. Brynskov, K. Ejksjaer, J.T. Clausen, L. Thim, E. Nexø, et al., *Immunoassays of human trefoil factors 1 and 2: measured on serum from patients with inflammatory bowel diseases.* Scan J Clin Lab Invest 2004. 64: 146-56.
36. Van De Bovenkamp, J.H., A.M. Korteland-Van Male, H.A. Buller, A.W. Einerhand, J. Dekker, *Infection with Helicobacter pylori affects all major secretory cell populations in the human antrum.* Dig Dis sci 2005. 50: 1078-86.
37. Jagla, W., A. Wiede, M. Hinz, K. Dietzmann, D. Gulicher, K.L. Gerlach, et al., *Secretion of TFF-peptides by human salivary glands.* Cell Tissue Res 1999. 298:161-6.

38. Kutta, H., J. May, M. Jaehne, A. Munscher, F.P. Paulsen, *Antimicrobial defence mechanisms of the human parotid duct*. J Ant 2006. 208: 609-19.
39. Chaiyarit, P., N. Ma, Y. Hiraku, S. Pinlaor, P. Yongvanit, D. Jintakanon, et al., *Nitrative and oxidative DNA damage in oral lichen planus in relation to human oral carcinogenesis*. Cancer Sci 2005. 96: 553-9.
40. Chaiyarit, P., K. Thongprasom, S. Satayut, K. Dhanuthai, P. Piboonratanakit, P. Phothipakdee, *Alteration of the expression of CD44 isoforms in oral epithelia and saliva from patients with oral lichen planus*. J Clin Immunol 2007 (Epub ahead of print: September 9th, 2007).
41. Maeda, H., C. Fujimoto, Y. Haruki, T. Maeda, S. Kokeguchi, M. Petelin, et al., *Quantitative real-time PCR using Taqman and SyBR Green for Actinobacillus actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia, tetQ gene and total bacteria*. FEMS Immunol Med Microbiol 2003. 39: 81-6.
42. Sakamoto, M., et al., *Rapid detection and quantification of five periodontopathic bacteria by real-time PCR*. Microbiol Immunol 2001. 45: 39-44.