

ผลของการสูบบุหรี่ที่มีต่อการแสดงออกของเบต้าดีเฟนซิน-2
ในโรคปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรัง



นางสาว ฐุสรพร เดิมทอง

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาปริทันตศาสตร์ ภาควิชาปริทันตวิทยา

คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

THE EFFECT OF SMOKING ON BETA DEFENSIN-2 EXPRESSION IN
CHRONIC PERIODONTITIS



Miss Thasanporn Toemthong

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Periodontics

Department of Periodontology

Faculty of Dentistry

Chulalongkorn University

Academic Year 2007

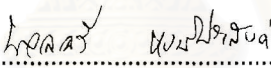
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ผลของการสูบบุหรี่ที่มีต่อการแสดงออกของ
เบต้าดีเฟนซิน-2 ในโรคปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรัง
โดย นางสาวฐรรพร เตมทอง
สาขาวิชา ปริทันตศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ ทันตแพทย์ ขจร กังสดาลพิภพ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.พรพรรณ พิบูลย์รัตนกิจ


คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต



..... คณะบดีคณะทันตแพทยศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง จิตtima ภูศิริ)

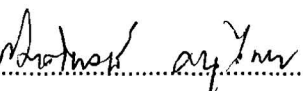
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง นวลฉวี หงษ์ประสงค์)


..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(อาจารย์ ทันตแพทย์ ขจร กังสดาลพิภพ)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(อาจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.พรพรรณ พิบูลย์รัตนกิจ)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.รังสินี มหานนท์)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ กิตติพงษ์ ดนุไทย)

ฐสรพร เต็มทอง ผลของการสูบบุหรี่ที่มีต่อการแสดงออกของเบต้าดีเฟนซิน-2 ใน
โรคปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรัง (THE EFFECT OF SMOKING ON BETA DEFENSIN-2
EXPRESSION IN CHRONIC PERIODONTITIS) อ.ที่ปรึกษา: อ.ทพ. ขจร กิ่งสตาลพิภพ,
อ.ที่ปรึกษาร่วม: อ.ทพญ. ดร. พรพรรณ พิบูลย์รัตนกิจ, 106 หน้า.

เบต้าดีเฟนซิน-2 (Human beta defensin 2; HBD-2) เป็นสารต้านจุลชีพที่สังเคราะห์จาก
เซลล์เยื่อเมือกมีบทบาทสำคัญในกลไกการป้องกันของร่างกายต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์ และ
ทำหน้าที่เชื่อมโยงระหว่างระบบภูมิคุ้มกันสืบทอดกับภูมิคุ้มกันได้มาหลังเกิด การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์
เพื่อศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์เบต้าดีเฟนซิน-2 ในเหงือกปกติและเหงือกที่เป็นโรคปริทันต์
อักเสบเรื้อรัง รวมทั้งผลของการสูบบุหรี่ต่อการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 โดยศึกษาจากชิ้น
เนื้อเหงือกของผู้ไม่เป็นโรคปริทันต์จำนวน 20 คน และผู้เป็นโรคปริทันต์จำนวน 20 คน ในแต่ละ
กลุ่มประกอบด้วยผู้สูบบุหรี่จำนวน 10 คนและผู้ไม่สูบบุหรี่จำนวน 10 คน เตรียมชิ้นเนื้อเหงือก โดย
การแช่แข็ง ตรวจวัดการแสดงออกของเปปไทด์เบต้าดีเฟนซิน-2 ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี โดยวัดผล
เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของเปปไทด์เบต้าดีเฟนซิน-2 ระหว่างกลุ่ม
ตัวอย่างแต่ละกลุ่ม จากชิ้นเนื้อเหงือกจำนวน 40 ตัวอย่าง พบว่าชิ้นเนื้อตัวอย่างทั้งหมดมีการแสดง
ออกของเปปไทด์เบต้าดีเฟนซิน-2 ในเยื่อเมือกพบการแสดงออกของเปปไทด์เบต้าดีเฟนซิน-2
ตั้งแต่ชั้นเบซัลไปจนถึงชั้นคอร์เนียม พบว่ากลุ่มตัวอย่างที่ไม่สูบบุหรี่และไม่เป็นโรคปริทันต์มี
ค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของเปปไทด์เบต้าดีเฟนซิน-2 มากกว่ากลุ่มตัวอย่างที่ไม่
สูบบุหรี่และเป็นโรคปริทันต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในขณะที่กลุ่มตัวอย่างที่สูบบุหรี่
และไม่เป็นโรคปริทันต์มีแนวโน้มการแสดงออกของเปปไทด์เบต้าดีเฟนซิน-2 ลดลง จากการวิเคราะห์
ทางสถิติพบว่าการแสดงออกของเปปไทด์เบต้าดีเฟนซิน-2 มีความสัมพันธ์กับการเป็นโรคปริทันต์
($P < 0.05$) แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับการสูบบุหรี่ ระดับการแสดงออกของเปปไทด์เบต้าดีเฟนซิน-2
ที่สูงในกลุ่มตัวอย่างที่ไม่เป็นโรคปริทันต์แสดงให้เห็นถึงบทบาทเชิงป้องกันในการตอบสนองของ
ร่างกายต่อแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์ ทั้งนี้ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงผลด้านลบของการสูบบุหรี่ต่อ
การแสดงออกของเปปไทด์เบต้าดีเฟนซิน-2 ในกลุ่มตัวอย่างขนาดใหญ่ขึ้นต่อไป

ภาควิชา.....ปริทันต์วิทยา.....
สาขาวิชา.....ปริทันต์ศาสตร์.....
ปีการศึกษา.....2550.....

ลายมือชื่อนิสิต..... ฐสรพร เต็มทอง.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... ขจร กิ่งสตาลพิภพ.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... พรพรรณ พิบูลย์รัตนกิจ.....

4876106332 : MAJOR PERIODONTICS

KEY WORD: HUMAN BETA DEFENSIN-2 / GINGIVAL EPITHELIUM/ PERIODONTAL DISEASE/ SMOKING

THASANPORN TOEMTHONG: THE EFFECT OF SMOKING ON BETA DEFENSIN-2 EXPRESSION IN CHRONIC PERIODONTITIS.

THESIS ADVISOR: KAJORN KUNGSADALPIPOB

THESIS COADVISOR: PORNPAN PIBOONRATANAKIT, Ph.D., 106 pp.

Human beta defensin-2 (HBD-2) is epithelial-derived antimicrobial peptide which plays an important role in host defense mechanism against periodontopathic bacteria and functions as the linkage between innate and adaptive immunity. This study investigated the HBD-2 peptide expression in healthy and periodontitis subjects including the effect of smoking on its expression. Gingival biopsies were obtained from 20 healthy subjects and 20 patients with unresolved periodontitis. Each group contained of 10 smoking and 10 nonsmoking subjects. All of the gingival tissues were prepared in frozen sections. The expression of HBD-2 was detected by immunohistochemistry and measured by the percentage of positive cells. All 40 samples demonstrated positive staining of HBD-2 which confined from the basal to the corneal layers of gingival epithelium. Significantly higher level of HBD-2 expression was found in the nonsmoking healthy tissues as compared to the nonsmoking disease tissues ($P < 0.05$). There was also a suggestion of lower expression of HBD-2 in smoking healthy tissues. HBD-2 expression was correlated with periodontal disease ($P < 0.05$) but not with smoking. Higher level of HBD-2 expression in healthy tissues suggests a protective role of HBD-2 in the host immune response to infection by periodontal pathogens. Further investigation in larger sample size is needed to better understand the negative effect of smoking on HBD-2 expression.


Department.....Periodontology.....

Field of study....Periodontics.....

Academic year...2007.....

Student's signature.....

Advisor's signature.....

Co-advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะไม่มีความสำเร็จไปได้เลยหากปราศจากความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก อาจารย์ ทนตแพทย์ ขจร กังสตาลพิภพ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ อาจารย์ ทนตแพทย์หญิง ดร. พรพรรณ พิบูลย์รัตนกิจ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้เมตตาได้รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา ให้คำแนะนำ กำลังใจ ผลักดัน ตลอดจนช่วยเหลือในการแก้ไขในการจัดทำวิทยานิพนธ์ ให้สำเร็จ ลุล่วงไปได้ ผู้เขียนรู้สึกสำนึกในบุญคุณและขอกราบขอบพระคุณมา ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ทนตแพทย์หญิง ดร.รังสิณี มหานนท์ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ และทรัพยากรต่างๆในการทำวิจัย รวมทั้งคำชี้แนะอันเป็นประโยชน์ในการศึกษา และการเป็นแบบอย่างที่ดีในการทำงาน

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ไพพรรณ พิทยานนท์ ที่กรุณาสละเวลาสอนและช่วยแนะนำการใช้สถิติในการทำวิจัยและการวิเคราะห์ข้อมูลอย่างไม่เห็นแก่ความเหน็ดเหนื่อย

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ทุกท่านที่ช่วยสละเวลาชี้แนะและแก้ไข วิทยานิพนธ์เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุด

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทนตแพทย์ ดร.ไพบูลย์ เตชะเลิศไพศาล ที่ได้เขียนและอนุญาตให้ใช้โปรแกรมช่วยการจัดทำรายการอ้างอิง

ขอขอบคุณ คุณนพดล สะอาดเอี่ยม คุณพิมพ์ประกาย ฤกษ์เย็น เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการอิมมูโนวิทยา ที่ช่วยแนะนำเทคนิคในการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมี และ คุณชัยวัฒน์ จิระฤทธิ์ธำรง ในการเป็นผู้วิจัยร่วม

ขอขอบคุณ คุณบุญส่ง บุตรพันธ์ คุณลาวัลย์ บุญประคอง และ เจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยชีววิทยา ช่องปากทุกท่านที่อำนวยความสะดวกในการตัดชิ้นเนื้อและจัดหาวัสดุอุปกรณ์ในการทำวิจัย

กราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ทนตแพทย์หญิง กอบกาญจน์ ทองประสม และขอบคุณ คุณสุภโชค จิระเวชวงศ์สกุล ในการเอื้อเฟื้อและช่วยเหลือในการใช้กล้องถ่ายภาพดิจิทัล

ขอขอบคุณกลุ่มตัวอย่างทุกท่านที่อนุญาตให้นำชิ้นเนื้อเหงือกมาทำการศึกษา

ขอบคุณเพื่อนนิสิตหลังปริญญาภาควิชาปริทันตวิทยา คณาจารย์และเจ้าหน้าที่ภาควิชา ศัลยศาสตร์ทุกท่าน ที่กรุณาช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง

ขอบคุณสถาบันราชานุกูล หน่วยงานต้นสังกัดที่อนุมัติให้ลาศึกษา

กราบขอบพระคุณบิดาของผู้ทำการวิจัยที่คอยดูแลและคอยเป็นกำลังใจในการทำงาน

ขอให้คุณประโยชน์อันจะพึงมีจากงานวิจัยนี้ จงตกแก่ผู้มีพระคุณทุกท่านที่ได้กล่าวและไม่ได้กล่าวนามด้วยเทอญ

สารบัญ

หน้า

| | |
|--|----|
| บทคัดย่อภาษาไทย..... | ง |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... | จ |
| กิตติกรรมประกาศ..... | ฉ |
| สารบัญ | ช |
| สารบัญตาราง..... | ฌ |
| สารบัญภาพ..... | ญ |
| บทที่ 1 บทนำ..... | 1 |
| ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... | 1 |
| วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... | 3 |
| รูปแบบการวิจัย..... | 3 |
| กรอบแนวคิดการวิจัย..... | 3 |
| ขอบเขตของการวิจัย..... | 4 |
| ข้อตกลงเบื้องต้น..... | 4 |
| ข้อจำกัดของการวิจัย..... | 4 |
| ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... | 5 |
| บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... | 6 |
| ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย..... | 6 |
| ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับสารดีเฟนซิน..... | 8 |
| ความสำคัญของสารดีเฟนซินต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย..... | 10 |
| สารเบต้าดีเฟนซิน-2..... | 11 |
| ขบวนการสร้างและจับสารเบต้าดีเฟนซิน-2..... | 12 |
| หน้าที่ของสารเบต้าดีเฟนซิน-2..... | 13 |
| ปัจจัยที่มีผลต่อการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2..... | 14 |
| การแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2ในช่องปากและการเกิดโรคปริทันต์..... | 17 |
| บุรี..... | 19 |
| การสูบบุหรี่กับปัจจัยเสี่ยงในการเกิดและความรุนแรงของโรคปริทันต์..... | 20 |

| | |
|---|-----|
| ผลของการสูบบุหรี่ต่อพยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์อักเสบ..... | 21 |
| บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย..... | 26 |
| ประชากรที่ศึกษา..... | 26 |
| วัตถุประสงค์และสารเคมี..... | 27 |
| วิธีการศึกษา..... | 29 |
| การวิเคราะห์ข้อมูล..... | 47 |
| บทที่ 4 ผลการศึกษา..... | 49 |
| ลักษณะทั่วไปของกลุ่มตัวอย่าง..... | 49 |
| ข้อมูลการสูบบุหรี่ของกลุ่มตัวอย่างที่สูบบุหรี่..... | 51 |
| สภาวะปริทันต์ของกลุ่มตัวอย่าง..... | 52 |
| ลักษณะการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2..... | 53 |
| ระดับการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ในกลุ่มตัวอย่างที่ทำการศึกษา..... | 54 |
| การแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ในเหงือกปกติและเหงือกที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ..... | 56 |
| ผลของการสูบบุหรี่ต่อการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ในเหงือกปกติ..... | 58 |
| ผลของการสูบบุหรี่ที่มีต่อการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ในเหงือกปกติและเหงือกที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรัง..... | 59 |
| บทที่ 5 อภิปรายผลและสรุปผลการศึกษา..... | 62 |
| อภิปรายผลการศึกษา..... | 62 |
| สรุปผลการศึกษา..... | 69 |
| ข้อเสนอแนะ..... | 69 |
| รายการอ้างอิง..... | 70 |
| ภาคผนวก..... | 80 |
| ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... | 106 |

สารบัญตาราง

| ตารางที่ | หน้า |
|----------|---|
| 1 | แสดงการทดลองหาความเข้มข้นของแอนติบอดีปฏุมภูมิและสภาพการย้อมที่เหมาะสมของการย้อมเยื่อปิวเหงือก.....39 |
| 2 | แสดงลักษณะกลุ่มตัวอย่างจำแนกตามเพศ อายุ การมีโรคประจำตัวและยาที่ใช้ประจำ...50 |
| 3 | แสดงอายุ การสูบบุหรี่ ระยะเวลาการสูบและปริมาณการสูบบุหรี่ของกลุ่มตัวอย่างที่สูบบุหรี่ทั้งที่ไม่เป็น โรคปริทันต์และที่เป็น โรคปริทันต์.....51 |
| 4 | แสดงลักษณะสภาวะปริทันต์ของกลุ่มตัวอย่างที่ทำการเก็บชิ้นเนื้อเหงือกจำแนกตามกลุ่มที่ทำการศึกษา.....52 |
| 5 | แสดงค่าร้อยละ และ ค่าเฉลี่ยร้อยละ ของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2..... 54 |
| 6 | แสดงค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ของกลุ่มตัวอย่างที่ไม่เป็น โรคปริทันต์เทียบกับกลุ่มตัวอย่างที่เป็น โรคปริทันต์ในผู้ที่ไม่สูบบุหรี่.....57 |
| 7 | แสดงค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ของกลุ่มตัวอย่างที่สูบบุหรี่เทียบกับกลุ่มตัวอย่างที่ไม่สูบบุหรี่ในผู้ที่ไม่เป็น โรคปริทันต์.....58 |
| 8 | แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ในกลุ่มตัวอย่างทั้ง 4 กลุ่ม.....60 |
| 9 | แสดงผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 กับการสูบบุหรี่และการเป็นโรคปริทันต์.....61 |

สารบัญภาพ

| ภาพที่ | หน้า |
|--------|--|
| 1 | แสดงการจำแนกสารดีเฟนซินในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมตามจำนวนกรดอะมิโนและลักษณะโครงสร้าง.....8 |
| 2 | แสดงตัวอย่างภาพทางคลินิกและภาพถ่ายรังสีของฟันที่เป็นโรคปริทันต์ที่ใช้ในการศึกษา.....30 |
| 3 | แสดงการตัดแบบอินเวอร์สเพื่อทำการเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อเหงือก.....31 |
| 4 | แสดงการเก็บรักษาชิ้นเนื้อบนผ้ากอซชุบสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลินในเพตริดิช ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปแช่แข็ง.....32 |
| 5 | แสดงรอยตัดชิ้นเนื้อเหงือกในช่องปาก.....32 |
| 6 | แสดงการจุ่มชิ้นเนื้อที่จะทำการแช่แข็งลงในสารประกอบไอซีทีในถาดหลุมพลาสติก.....33 |
| 7 | แสดงการแช่ถาดหลุมพลาสติกที่มีชิ้นเหงือกในสารประกอบไอซีทีลงในไนโตรเจนเหลว.....34 |
| 8 | แสดงการห่อถาดหลุมพลาสติกด้วยกระดาษอลูมิเนียม ใส่กล่องกระดาษ ก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส.....34 |
| 9 | แสดงเครื่องตัดชิ้นเนื้อ cryostat.....35 |
| 10 | แสดงการยึดติดชิ้นเนื้อบนแท่นตัดที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส.....36 |
| 11 | แสดงการวางชิ้นเนื้อที่ตัดแล้วบนแผ่นสไลด์36 |
| 12 | แสดงน้ำยาควบคุมผลลบและแอนติบอดีปฐมภูมิ.....37 |
| 13 | แสดงแอนติบอดีทุติยภูมิและสารที่จะทำให้เกิดปฏิกิริยาอิมมูโนเปอร์รอกซิเดส.....38 |
| 14 | แสดงน้ำยาและสารเคมีที่ทำให้เกิดสี (HRP substrate).....38 |
| 15 | แสดงการติดสีของเซลล์เยื่อบุผิวหลอดลมที่ย้อมด้วยแอนติบอดีปฐมภูมิเปรียบเทียบกับย้อมด้วยสารละลายควบคุมผลลบที่กำลังขยาย 400 เท่า.....41 |
| 16 | แสดงเซลล์สร้างเส้นใยที่ได้รับการที่ย้อมด้วยแอนติบอดีปฐมภูมิที่กำลังขยาย 400 เท่าเปรียบเทียบกับย้อมด้วยสารละลายควบคุมผลลบที่กำลังขยาย 200 เท่า.....42 |
| 17 | แสดงการติดสีของเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกที่ได้รับการย้อมด้วยสารละลายควบคุมผลลบที่กำลังขยาย 400 เท่า.....44 |
| 18 | แสดงการติดสีของเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกที่ได้รับการย้อมด้วยแอนติบอดีปฐมภูมิที่กำลังขยาย 400 เท่า.....45 |
| 19 | แสดงการสุ่มเลือกตำแหน่งเพื่อตรวจนับการติดสีของเซลล์เยื่อบุผิว.....46 |

| ภาพที่ | หน้า |
|--------|--|
| 20 | แสดงการนับเซลล์ด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop 7.....46 |
| 21 | ภาพแสดงเซลล์เยื่อหุ้มผิวหึ่งอกที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ในกลุ่มตัวอย่างทั้ง 4 กลุ่ม ที่กำลังขยาย 400 เท่า.....53 |
| 22 | แผนภูมิแท่งแสดงค่าเฉลี่ยร้อยละและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของเซลล์ ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 จำแนกตามกลุ่มที่ทำการศึกษา.....55 |
| 23 | แสดงการเปรียบเทียบภาพที่ได้จากการย้อมทางอิมมูโนฮิสโตเคมีของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ระหว่างกลุ่มไม่เป็นโรคปริทันต์เทียบกับกลุ่มตัวอย่างที่เป็นโรคปริทันต์ในผู้ที่ไม่สูบบุหรี่ ที่กำลังขยาย 400 เท่า.....57 |
| 24 | แสดงการเปรียบเทียบภาพที่ได้จากการย้อมทางอิมมูโนฮิสโตเคมีของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ระหว่างกลุ่มไม่สูบบุหรี่เทียบกับกลุ่มตัวอย่างที่สูบบุหรี่ในผู้ที่ไม่เป็นโรคปริทันต์ ที่กำลังขยาย 400 เท่า.....59 |
| 25 | แสดงการกระจายข้อมูลร้อยละและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยละเซลล์ที่มีการแสดงออกของ สารเบต้าดีเฟนซิน-2.....60 |

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคปริทันต์อักเสบเป็นผลจากการตอบสนองของร่างกายต่อการติดเชื้อในลักษณะเรื้อรัง ส่งผลให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อรองรับฟัน โดยมีปัจจัยสำคัญคือ เชื้อโรค และการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน ร่วมกับปัจจัยอื่น เช่น ปัจจัยด้านพันธุกรรม และสิ่งแวดล้อม เช่น การสูบบุหรี่ ซึ่งช่วยส่งเสริมในการดำเนินของโรค (Darveau, Tanner และ Page, 1997)

เซลล์เยื่อบุผิวมีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกัน เพราะนอกจากจะเป็นส่วนที่ห่อหุ้มร่างกายจากเชื้อโรคและสิ่งอันตรายจากภายนอกแล้วยังสามารถสร้างสารเปปไทด์ต้านจุลชีพ (antimicrobial peptide) ต่างๆ เพื่อทำลายเชื้อไม่ให้เกาะและตั้งถิ่นฐานบนผิวร่างกาย (Lehrer, 2004; Schroder, 1999)

สารเบต้าดีเฟนซิน-2 (β -defensin-2) เป็นสารโปรตีนขนาดเล็กที่มีฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อโรค สร้างมาจากเซลล์เยื่อบุผิวในช่องปาก ระบบทางเดินอาหาร ทางเดินหายใจ ระบบทางเดินปัสสาวะ และผิวหนัง ทำหน้าที่ฆ่าเชื้อโรค และเป็นไซโตไคน์ในการเชื่อมโยงระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายในส่วนภูมิคุ้มกันสืบทอด (innate immunity) และ ภูมิคุ้มกันได้มาหลังเกิด (adaptive immunity) โดยสามารถเหนี่ยวนำแดนไดเรคตเซลล์ที่ยังพัฒนาไม่สมบูรณ์ (immature dendritic cells) และ ทีเซลล์จดจำสิ่งแปลกปลอม (memory T cells) ให้มายังบริเวณที่ติดเชื้อ นำไปสู่การตอบสนองของร่างกายของภูมิคุ้มกันได้มาหลังเกิดต่อไป (Marshall, 2004; Yang และคณะ, 2002)

จากการศึกษาวิจัยที่ผ่านมา สามารถตรวจพบการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ทั้งในเนื้อเยื่อเหงือกปกติ และเนื้อเยื่อเหงือกที่มีการอักเสบ แต่ยังไม่มีย่อสรุปว่าการแสดงออกของสารดังกล่าวจะเพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อกลุ่มใด เนื่องจากการคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างที่แตกต่างกัน ตลอดจนการตรวจสารนี้ทำโดยวิธีแตกต่างกัน เช่น ทำการตรวจ ในระดับอาร์เอ็นเอเข้ารหัส (mRNA) ด้วยวิธีรีเวิร์สทรานสคริปเตสโพลีเมอร์เรสเซนรีแอกชัน (reverse transcriptase polymerase chain reaction) หรือทำการตรวจสารนี้ในระดับเปปไทด์ด้วยวิธีการทางอิมมูโนฮิสโตเคมี (immunohistochemistry) รวมทั้งการแปลผลข้อมูลมีรายงานตัวแปรชี้วัดแตกต่างกัน เช่น ความถี่ของกลุ่มตัวอย่างที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 (Dale และ Krisanaprakornkit, 2001; Dunsche และคณะ, 2001,2002; Bissell และคณะ, 2004) หรือในรูปสัดส่วนของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออก (Lu และ

คณะ 2004) หรือ ปริมาณการแสดงออก (Dommisch และคณะ, 2005 Hosokawa และคณะ, 2006) เป็นต้น

มูลนิธิธรรมรงค์เพื่อการไม่สูบบุหรี่รายงานว่าคนไทยต้องเสียเงินค่ารักษาพยาบาลโรคมะเร็ง โรคหัวใจ และโรคถุงลมโป่งพองปีละ 60,000 ล้านบาท และมีการเสียชีวิตจากโรคที่เกิดจากการสูบบุหรี่ปีละ 52,000 คน หรือเฉลี่ยวันละ 140 คน หรือชั่วโมงละ 6 คน (สำนักงานสถิติแห่งชาติ, 2550) การสูบบุหรี่นอกจากเป็นอันตรายต่อร่างกายโดยเป็นสาเหตุของโรกระบบทางเดินหายใจ ระบบหัวใจและหลอดเลือด และโรคมะเร็งของอวัยวะต่างๆ แล้ว ยังมีผลต่อการเกิดโรคปริทันต์อีกด้วย พบว่าผู้ที่สูบบุหรี่มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคปริทันต์อีกเสบมากกว่าผู้ไม่สูบบุหรี่ 2.3-2.7 เท่า รวมทั้งมีความรุนแรงของโรคปริทันต์มากกว่า โดยพบว่าผู้ที่สูบบุหรี่มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคปริทันต์อีกเสบรุนแรงมากกว่าผู้ไม่สูบบุหรี่ 4.7 เท่า (सानุดม สุทธิพิศาลและคณะ, 2549) การสูบบุหรี่ทำให้เกิดการทำลายของกระดูกรองรับฟันและการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์ซึ่งอาจเกิดจากกลไกดังต่อไปนี้

1. การสูบบุหรี่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของชนิดและปริมาณเชื้อโรคในร่องเหงือก โดยจะพบเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคปริทันต์เพิ่มขึ้น (Haffajee และ Socransky, 2001; Umeda และคณะ, 1998; Zambon และคณะ, 1996)
2. การสูบบุหรี่ลดประสิทธิภาพการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ทำให้ติดเชื้อโรคได้ง่ายขึ้น (Apatzidou, Riggio และ Kinane, 2005; Guntzsch และคณะ, 2006; Pabst และคณะ, 1995)
3. การสูบบุหรี่เร่งการตอบสนองของขบวนการอักเสบโดยกระตุ้นให้มีการสร้างไซโตไคน์ก่อการอักเสบเพิ่มขึ้นเป็นผลให้เกิดการอักเสบและมีการทำลายอวัยวะปริทันต์ (Giannopoulou, Cappuyens และ Mombelli, 2003)
4. การสูบบุหรี่ส่งผลด้านลบต่อเนื้อเยื่อปริทันต์ โดยลดปริมาณเลือดที่มาเลี้ยงเหงือก (Bergstrom และ Preber, 1986) ลดการงอกใหม่ของหลอดเลือด (Kuhlmann และคณะ, 2005) ทำให้ประสิทธิภาพการซ่อมแซมอวัยวะปริทันต์ด้อยลง

จากรายงานการศึกษาข้างต้นเกี่ยวกับการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ในเนื้อเยื่อเหงือกและผลของการสูบบุหรี่ต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน นำไปสู่คำถามวิจัยและสมมติฐานเกี่ยวกับความแตกต่างของการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ในเนื้อเยื่อเหงือกปกติและเป็นโรคปริทันต์อักเสบ รวมทั้งการสูบบุหรี่อาจมีผลต่อการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 อันมีผลต่อพยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์อักเสบ โดยศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์เบต้าดีเฟนซิน-2 ทั้งใน

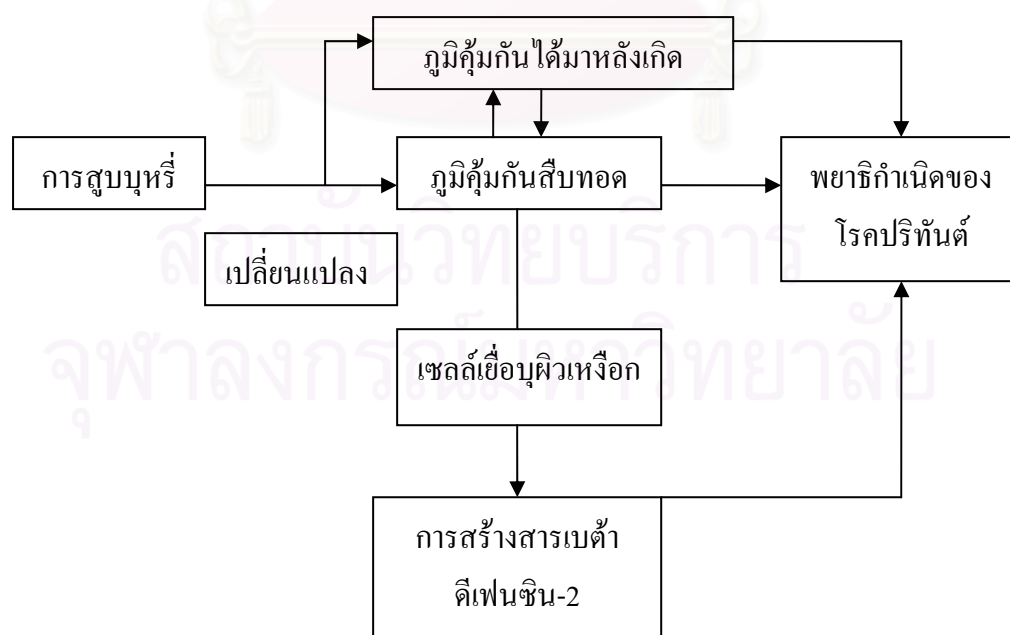
เนื้อเยื่อเหงือกปกติ และเนื้อเยื่อเหงือกที่เป็นโรคปริทันต์ ในผู้ที่สูบบุหรี่และไม่สูบบุหรี่ โดยใช้วิธีการตรวจหาโปรตีนด้วยวิธีการทางอิมมูโนฮิสโตเคมี ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาในประเด็นดังกล่าว วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์เบต้าดีเฟนซิน-2 ในเหงือกปกติและเหงือกที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรัง
2. ศึกษาผลของการสูบบุหรี่ที่มีต่อการแสดงออกของเปปไทด์เบต้าดีเฟนซิน-2 ในเหงือกปกติ และเหงือกที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรัง

รูปแบบการวิจัย

การวิจัยนอกร่างกาย (ex-vivo study) ในห้องปฏิบัติการ โดยใช้ชิ้นเนื้อเยื่อเหงือกปกติจากฟันกรามซี่สุดท้ายที่มีความจำเป็นต้องทำการถอนออก หรือจากฟันที่ถอนโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อการจัดฟันหรือจากฟันปกติที่รับการผ่าตัดเพื่อเพิ่มความยาวของตัวฟัน และชิ้นเหงือกจากฟันที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบซึ่งได้จากฟันที่จำเป็นจะต้องถอนออกเนื่องจากสาเหตุโรคปริทันต์และมีการพยากรณ์โรคเป็นแบบสิ้นหวัง (hopeless) โดยได้รับความยินยอมจากผู้ป่วยเป็นลายลักษณ์อักษรและการศึกษานี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมงานวิจัยของคณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยก่อนดำเนินการวิจัยเรียบร้อยแล้ว

กรอบแนวคิดการวิจัย



ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ในเหงือกปกติ และเหงือกที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรัง รวมทั้งศึกษาผลของการสูบบุหรี่ที่มีต่อการแสดงออกของเปปไทด์สารเบต้าดีเฟนซิน-2 ในเหงือกปกติ และเหงือกที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรัง ในเนื้อเยื่อเหงือกของผู้ที่มารับการรักษาโรคปริทันต์อักเสบและผู้ที่ไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบที่มารับการทำศัลยกรรมปริทันต์ที่คลินิกบัณฑิตปริทันต์ และผู้ที่มารับการถอนฟันที่คลินิกศัลยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกคนที่มารับบริการในช่วงเดือน มกราคม 2549 - มิถุนายน 2550 ที่มีอายุตั้งแต่ 20 ปี ขึ้นไป และตรงกับเกณฑ์การคัดเลือกเข้าร่วมงานวิจัย

ข้อตกลงเบื้องต้น

1. ซึ้นเหงือกปกติ หมายถึง ซึ้นเหงือกที่ได้จากฟันซี่ที่ไม่เป็นโรคปริทันต์กล่าวคือไม่มีการสูญเสียการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์ (clinical attachment loss) และมีร่องลึกปริทันต์ (probing depth) น้อยกว่าหรือเท่ากับ 3 มิลลิเมตร ไม่มีเลือดออกหลังจากใช้เครื่องมือวัดความลึกร่องปริทันต์สอดเข้าไปในร่องเหงือก และไม่มีลักษณะอักเสบแดง อาจจะได้จากการตัดซึ้นเหงือกก่อนทำการถอนฟันกรามซี่สุดท้ายหรือฟันที่ถอนเพื่อวัตถุประสงค์ในการจัดฟัน หรือจากการผ่าตัดเพื่อเพิ่มความยาวตัวฟันในฟันปกติ

2. ซึ้นเหงือกจากฟันที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ หมายถึง ซึ้นเหงือกที่ได้จากฟันซี่ที่มีการสูญเสียการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์มากกว่าหรือเท่ากับ 5 มิลลิเมตร (Flemmig, 1999) หรือมีร่องลึกปริทันต์ มากกว่าหรือเท่ากับ 6 มิลลิเมตร หรือจากภาพรังสีพบว่ามีการทำลายของกระดูกอบรากฟันไปมากกว่าร้อยละ 50 มีเลือดออกหลังจากใช้เครื่องมือวัดความลึกร่องปริทันต์สอดเข้าไปในร่องเหงือก ได้จากการตัดซึ้นเหงือกก่อนทำการถอนฟันที่จำเป็นจะต้องถอนเนื่องจากสาเหตุโรคปริทันต์อักเสบและมีการพยากรณ์โรคเป็นแบบสิ้นหวัง กล่าวคือมีระดับการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์เหลืออยู่น้อยมากจนไม่สามารถใช้งานในการบดเคี้ยวได้ตามปกติ หรือก่อให้เกิดความเจ็บปวดในช่องปากและสมควรถอนออก (McGuire, 1991)

3. ผู้ที่ไม่สูบบุหรี่ หมายถึง ผู้ที่ไม่สูบบุหรี่ขณะดำเนินการวิจัยและไม่มีประวัติการสูบบุหรี่

4. ผู้ที่สูบบุหรี่ หมายถึง ผู้ที่สูบบุหรี่ในขณะที่ดำเนินการวิจัยและมีปริมาณการสูบบุหรี่ไม่น้อยกว่า 10 มวนต่อวันทุกวัน

ข้อจำกัดของการวิจัย

ขนาดกลุ่มตัวอย่างมีขนาดเล็กเนื่องด้วยข้อจำกัดด้านงบประมาณ และลักษณะกลุ่มตัวอย่างที่หายาก เช่น เหงือกปกติจากผู้สูบบุหรี่ไม่น้อยกว่า 10 มวนต่อวัน เป็นกลุ่มตัวอย่างที่หายาก

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบบทบาทของเซลล์เชื้อนิวเคลียสและสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ในพยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์มากยิ่งขึ้น
2. ทราบผลของการสูบบุหรี่ที่มีต่อการแสดงออกของ สารเบต้าดีเฟนซิน-2 อันจะนำไปสู่ความเข้าใจเกี่ยวกับบทบาทของการสูบบุหรี่ในพยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์
3. สามารถนำองค์ความรู้ที่ได้ไปใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนการรณรงค์ลดการสูบบุหรี่และวางแผนในการรักษาโรคปริทันต์ต่อไป



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย

ร่างกายมนุษย์มีระบบภูมิคุ้มกัน 2 ระบบได้แก่ ระบบภูมิคุ้มกันสืบทอดหรือมีอยู่แล้วตามธรรมชาติ กับ ระบบภูมิคุ้มกันได้มาหลังเกิด

ภูมิคุ้มกันสืบทอดเป็นปราการด่านแรกสำหรับป้องกันการติดเชื้อ เป็นกลไกที่ร่างกายมีพร้อมอยู่แล้วก่อนที่จะเผชิญหน้ากับจุลินทรีย์ ซึ่งจะถูกระตุ้นทันทีหลังจากมีการรุกรานจากจุลินทรีย์เข้ามาในร่างกาย จากนั้นร่างกายตอบสนองด้วยการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันได้มาหลังเกิด ซึ่งเป็นการทำงานของที และ บี ลิมโฟไซต์ (T-, B-lymphocytes) เพื่อตอบสนองต่อจุลินทรีย์หรือแอนติเจน (antigen) ในลักษณะจำเพาะซึ่งต้องอาศัยเวลาประมาณ 3-5 วัน (Azuma, 2006) ภูมิคุ้มกันสืบทอดจะทำงานโดยจดจำโครงสร้างหรือโมเลกุลบางอย่างซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค (pathogen-associated molecular patterns) เช่น กรดนิวคลีอิกที่พบเฉพาะในจุลินทรีย์ ได้แก่ อาร์เอ็นเอสายคู่ (double stranded-RNA) ซึ่งเป็นกรดนิวคลีอิกที่พบเฉพาะในไวรัส บางกลุ่ม ดีเอ็นเอไม่มีกลุ่มเมทิล (unmethylated CpG DNA) ซึ่งเป็นกรดนิวคลีอิกที่พบเฉพาะในแบคทีเรีย โปรตีนที่มีเอ็น-ฟอร์มิลเมทไธโอนีน (N-formylmethionin) เป็นกรดอะมิโนตัวแรกซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของโปรตีนในแบคทีเรีย ไขมัน หรือคาร์โบไฮเดรตที่สร้างขึ้นเฉพาะในจุลินทรีย์ แต่ไม่พบในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ได้แก่ ไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharides) พบเฉพาะในแบคทีเรียแกรมลบ (gram-negative bacteria) กรดเทโคอิก (teichoic acids) พบเฉพาะในแบคทีเรียแกรมบวก (gram-positive bacteria) เป็นต้น ตัวรับสัญญาณ (receptors) ต่อโครงสร้างหรือโมเลกุลดังกล่าวเรียกว่า แพทเทิร์น เรคคognition รีเซพเตอร์ (pattern recognition receptors) ได้แก่ โทล-ไลค์ รีเซพเตอร์ (Toll-like receptors) นอดไลค์ รีเซพเตอร์ (NOD like receptors) และ สคาเวนเจอร์ รีเซพเตอร์ (scavenger receptors) เป็นต้น ตัวรับสัญญาณเหล่านี้อยู่บนเซลล์นิวโทรฟิล (neutrophil) แมคโครฟาจ (macrophage) เซลล์เยื่อบุผิว (epithelial cells) แมสท์เซลล์ (mast cells) อีโอซิโนฟิล (eosinophils) และ เนเชอรัลคิลเลอร์เซลล์ (natural killer cells) ทำหน้าที่จดจำและแยกเซลล์ของร่างกายออกจากเซลล์ของจุลินทรีย์ กระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันสืบทอดให้ตอบสนองเชื้อโรคและชี้นำการตอบสนองของของระบบภูมิคุ้มกันได้มาหลังเกิดอย่างจำเพาะต่อเชื้อโรคแต่ละชนิด (Mahanonda และ Pichyangkul, 2007)

กลไกในการต่อต้านการรุกรานของเชื้อโรคของระบบภูมิคุ้มกันสืบทอดเกิดขึ้นจากการที่ตัวรับสัญญาณบนเซลล์นิวโทรฟิล แม็คโครฟาจ เซลล์เยื่อบุผิว แมสท์เซลล์ อีโอซิโนฟิล และเนเชอรัลคิลเลอร์เซลล์ได้รับการกระตุ้นจากส่วนประกอบต่างๆ ของเชื้อโรคและเหนี่ยวนำให้เซลล์สร้างโมเลกุลที่มีประสิทธิภาพ (effector molecules) และสารสื่อกลาง (mediators) เพื่อกระตุ้นการทำงานของเซลล์อื่นๆ รวมทั้งกระตุ้นการทำงานของคอมพลีเมนต์ (complements) ในระบบภูมิคุ้มกัน โมเลกุลและสารสื่อกลางที่ถูกสร้างขึ้นได้แก่ ไซโตไคน์ คีโมไคน์ (chemokines) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide) สารเปปไทด์ขนาดเล็กที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ (small antimicrobial peptides) เช่น ดีเฟนซิน (defensins) และ คาธิลิดิน (cathelicidins) สารเปปไทด์ขนาดใหญ่ต้านจุลชีพ (large antimicrobial peptides) เช่น ไลโซไซม์ (lysozyme) อะซุโรซิดิน (azurocidin) คาเทปซิน (cathepsin) ฟอสโฟไลเปส เอ2 (phospholipase A2) และ แลคโตเฟอริน (lactoferrin) เป็นต้น (Hancock และ Diamond, 2000)

ระบบภูมิคุ้มกันได้มาหลังเกิดเป็นการตอบสนองของร่างกายต่อการติดเชื้อแบบเฉพาะเจาะจง โดยเซลล์จำเพาะในระบบภูมิคุ้มกันสืบทอด ซึ่งได้แก่ เซลล์แลงเกอร์ฮาน (Langerhan cells) และ เซลล์เดนไดรติกที่ยังพัฒนาไม่สมบูรณ์ ซึ่งอยู่ในเยื่อบุผิว ทำการกลืนกิน (phagocytose) จุลินทรีย์ และย่อยเป็นชิ้นเปปไทด์เล็กๆ มีขนาดเท่ากับกรดอะมิโน 8-9 ตัว ส่งออกมาที่พื้นผิวเซลล์ ในขณะที่เดียวกันเซลล์เดนไดรติกเซลล์ที่ยังพัฒนาไม่สมบูรณ์มีการพัฒนาเป็นเดนไดรติกเซลล์ที่สมบูรณ์ (mature dendritic cells) ระหว่างที่มุ่งหน้าไปยังต่อมน้ำเหลือง (lymph nodes) และนำเสนอแอนติเจนอีพิโทป (antigen epitope) ต่อทีเซลล์ (T cells) เป็นผลให้ทีเซลล์เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์เป็นสื่อ (cell mediated immunity) และสร้างไซโตไคน์ กระตุ้นการเพิ่มจำนวนของบีเซลล์ (B cell proliferation) และเปลี่ยนเป็นเซลล์พลาสมา (plasma cell) สร้างแอนติบอดี (antibody) ทำให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำ (humoral immunity) นอกจากนี้ ไซโตไคน์ที่ทีเซลล์ สร้างขึ้นยังมีผลกระตุ้นแม็คโครฟาจและนิวโทรฟิลรวมทั้ง เนเชอรัลคิลเลอร์เซลล์อีกด้วย (Oppenheim และคณะ, 2003)

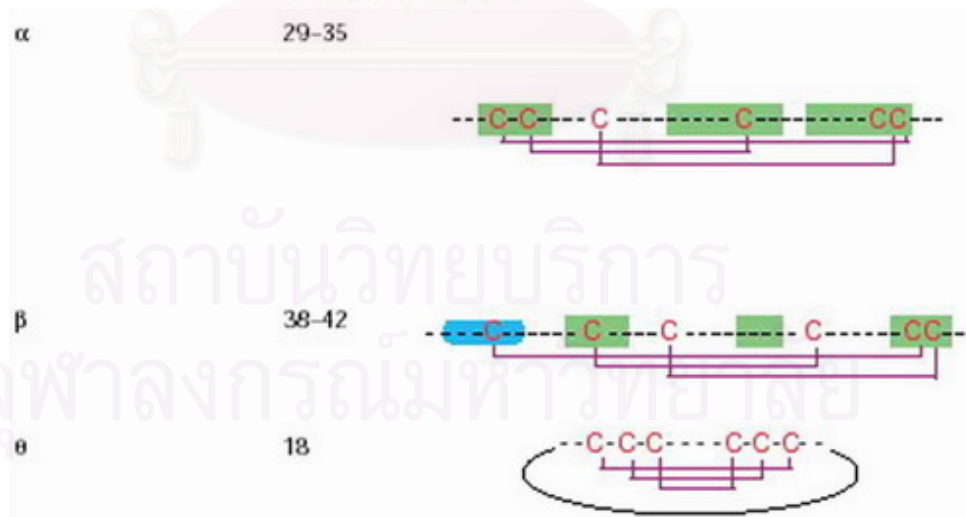
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับสารดีเฟนซิน

สารเปปไทด์ต้านจุลชีพ เป็นสารโปรตีนขนาดเล็กมีหน้าที่ต่อต้านเชื้อโรค พบได้ใน พืช แมลง และสัตว์มีกระดูกสันหลัง ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม พบมี 2 กลุ่มใหญ่ คือ คาธิลิจิดิน (cathelicidins) และ ดีเฟนซิน (defensins)

คาธิลิจิดิน เป็นสารโพลีเปปไทด์ ประกอบด้วยส่วนคาธิลีน (cathelin domain) และส่วนที่มีคุณสมบัติต้านจุลินทรีย์ (C-terminal antimicrobial) พบในนิวโทรฟิล โมโนไซต์ (monocyte) เนเชอรัล คิลเลอร์เซลล์ ที และ บี ลิมโฟไซต์ และเซลล์เยื่อผิวหนัง มีฤทธิ์กำจัดแบคทีเรียแกรมบวก

สารดีเฟนซินเป็นสารต้านจุลชีพที่สร้างมาจากเซลล์เยื่อผิวหนังและนิวโทรฟิล (Weinberg, Krisanaprakornkit และ Dale, 1998) เป็นเปปไทด์ที่มีประจุบวกเนื่องจากมีกรดอะมิโนซิสเตอีน (cysteine) เป็นส่วนประกอบหลัก มีขนาดโมเลกุล 2-6 กิโลดาลตัน (kDa) ภายในโมเลกุลมีโครงสร้างเป็นลักษณะเบต้าชีต (β -sheet structure) พบพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) 3 ตำแหน่งที่กรดอะมิโนซิสเตอีน 3 คู่ ซึ่งเป็นลักษณะที่สำคัญของโครงสร้างดีเฟนซิน ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แบ่งออกเป็น 3 ประเภทใหญ่ๆ ตามขนาดโมเลกุล การเรียงตัวของกรดอะมิโน และตำแหน่งที่มีการจับของพันธะไดซัลไฟด์ ออกเป็น อัลฟาดีเฟนซิน (α -defensins) เบต้าดีเฟนซิน (β -defensins) และทีทาดิเฟนซิน (theta; θ -defensin) (Lehrer, 2004; Yang และคณะ, 2002) ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 แสดงการจำแนกสารดีเฟนซินในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมตามจำนวนกรดอะมิโนและลักษณะโครงสร้าง (Yang และคณะ, 2002)

อัลฟาดีเฟนซิน

พบในมนุษย์ ลิง และหนูโรเดนท์ (rodent) ประกอบด้วย กรดอะมิโนจำนวน 29-35 ตัว แบ่งย่อยออกได้อีก 6 ชนิดคือ อัลฟาดีเฟนซิน-1 ถึง-4 ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบในเซลล์นิวโทรฟิลของมนุษย์ จึงมีชื่อเรียกว่า ฮิวแมนนิวโทรฟิลเปปไทด์ (human neutrophil peptides – HNP) พบว่า อัลฟาดีเฟนซินมีส่วนถึงร้อยละ 7 ของโปรตีนในนิวโทรฟิล (Weinberg และคณะ, 1998) โดยอัลฟาดีเฟนซินอยู่ในลักษณะเป็นพรีโปรเปปไทด์ (prepropeptide) เก็บไว้ในอะซูโรฟิลลิก แกรนูล (azurophilic granule) ของนิวโทรฟิล ทำหน้าที่ฆ่าจุลินทรีย์ผ่านขบวนการกลืนกิน (De Smet และ Contreras, 2005) อัลฟาดีเฟนซิน-1 ยังสามารถพบได้ใน บี ลิมโฟไซต์ เนเชอรัลคิลเลอร์เซลล์ โมโนไซต์ และแมคโครฟาจ (Niyonsaba และคณะ, 2005)

อัลฟาดีเฟนซิน-5 และ-6 พบในพานิชเซลล์ (Paneth's cells) ของลำไส้เล็ก และในเซลล์เยื่อเมือกของระบบทางเดินปัสสาวะและสืบพันธุ์ (urogenital tract) โดยที่พานิชเซลล์ จะเก็บดีเฟนซินที่เป็นเปปไทด์สมบูรณ์ (Gallo และคณะ, 2002)

เบต้าดีเฟนซิน

มีขนาดใหญ่กว่าอัลฟาดีเฟนซิน โดยมีกรดอะมิโนจำนวน 36-45 ตัว จนถึงปัจจุบัน พบเบต้าดีเฟนซิน 6 ชนิด ได้แก่

เบต้าดีเฟนซิน-1 (HBD-1) มีกรดอะมิโนจำนวน 36 ตัว พบที่ผิวหนัง เยื่อหูต่อเหงื่อ ต่อมน้ำมัน ปอด ต่อมไขมัน ต่อมน้ำลาย ตับ ตับอ่อน ต่อมลูกหมาก และเยื่อเมือก พบว่ามีการสร้างตลอดเวลา (Mathews และคณะ, 1999)

สารเบต้าดีเฟนซิน-2 (HBD-2) มีกรดอะมิโนจำนวน 41 ตัว พบได้ที่สะเก็ดผิวหนังของโรคเรื้อนกวาง (psoriatic skin) ผิวหนังที่มีการอักเสบ ทางเดินหายใจ และระบบทางเดินอาหารที่มีการสัมผัสกับแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังพบในเยื่อเมือกของปอด ระบบทางเดินปัสสาวะและสืบพันธุ์ ตับอ่อน เม็ดเลือดขาว เหงือก และไขกระดูก สามารถเหนี่ยวนำการสังเคราะห์ได้ด้วยเชื้อแบคทีเรียและไซโตไคน์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบ (Schroder, 1999)

เบต้าดีเฟนซิน-3 (HBD-3) มีกรดอะมิโนจำนวน 45 ตัว พบว่าสร้างที่เยื่อเมือก ทางเดินหายใจ ระบบทางเดินปัสสาวะและสืบพันธุ์ และเนื้อเยื่ออื่น เช่น ต่อมทอนซิล หลอดอาหาร หลอดลม รก หัวใจ กล้ามเนื้อลาย และต่อมธัยมัส (Harder และคณะ, 2001)

เบต้าดีเฟนซิน-4 (HBD-4) มีกรดอะมิโนจำนวน 37 ตัว พบในอัมชะ กระเพาะอาหาร นิวโทรฟิล ต่อมธัยรอยด์ ปอด มดลูก ตับและทางเดินหายใจ โดยจะพบมากเมื่อเกิดการติดเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบที่เยื่อเมือกทางเดินหายใจ แต่ไม่พบว่ามีการสร้างเพิ่มเมื่อถูกเหนี่ยวนำ

โดย อินเตอร์ลิวคิน-1 อัลฟา (interleukin-1 α) อินเตอร์ลิวคิน-6 (IL-6) อินเตอร์เฟอรอนแกมมา (interferon γ) หรือ ทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์- อัลฟา (tumor necrosis factor- α) (De Smet และ Contreras, 2005)

เบต้าดีเฟนซิน-5 และ - 6 (HBD-5,-6) พบเฉพาะที่ หลอดน้ำกาม (epididymis) แต่ยังมีข้อมูลการศึกษาไม่มาก

ทีทาดีเฟนซิน

มีการเรียงตัวของกรดอะมิโนต่างไปจากดีเฟนซิน 2 ชนิดแรก คือเรียงตัวเป็นวง (cyclic) และพบเฉพาะใน เซลล์ฟาโกไซต์ของสัตว์ไพรเมท (primate phagocyte) เท่านั้น (Lehrer, 2004)

ความสำคัญของสารดีเฟนซินต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย

1. ป้องกันการรุกรานของเชื้อโรคเข้าสู่ร่างกายโดย สารดีเฟนซินออกฤทธิ์ในการฆ่าหรือลดการทำงานของแบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัสชนิดมีเปลือกหุ้ม (enveloped virus) เช่น ไวรัสที่ก่อโรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง (HIV) ก่อโรครีม (Herpes virus) ก่อโรคแผลร้อนในปากอักเสบ (vesicular stomatitis virus) และพาราไอซต์กลุ่มพลาสโมเดียม (plasmodium) (Hancock และ Diamond, 2000; Sawaki และคณะ, 2002) โดยที่ความสามารถในการฆ่าหรือลดการทำงานของเชื้อโรคของสารดีเฟนซินจะลดลงในสภาวะที่เป็นเกลือ เช่น ในปอดของผู้ป่วยซิสติกไฟโบรซิส (cystic fibrosis) (Bals และคณะ, 1998; Goldman และคณะ, 1997)

กลไกการออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อโรคเกิดจากการที่ส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์และผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ ประกอบด้วยฟอสโฟลิปิด (phospholipids) จึงมีคุณสมบัติเป็นประจุลบ ดังนั้นเมื่อสารดีเฟนซินซึ่งมีคุณสมบัติเป็นประจุบวกแทรกตัวเข้าไปในส่วนประกอบชั้นนอกของแบคทีเรียที่เป็นประจุลบทำให้พื้นผิวที่หุ้มเซลล์แบคทีเรียแตกออก เกิดการเสียสมดุลออสโมติก และมีการรั่วซึมของส่วนประกอบในไซโตพลาสซึมออกมานอกเซลล์ ทำให้แบคทีเรียตายหรือหยุดการเจริญเติบโต (Marshall, 2004)

นอกจากคุณสมบัติในการทำลายจุลินทรีย์โดยตรงแล้ว สารดีเฟนซินยังทำหน้าที่เป็นสารดึงดูด (chemotactic agent) นิวโทรฟิลให้เข้ามากำจัดเชื้อโรคอีกทางหนึ่งด้วย (Niyonsaba, Ogawa และ Nagaoka, 2004)

2. เป็นสารเชื่อมโยงระหว่างระบบภูมิคุ้มกันสืบทอดกับระบบภูมิคุ้มกันได้มาหลังเกิด โดยอาจเกิดจากกลไกต่อไปนี้ (Yang และคณะ, 2002)

2.1 สารดีเฟนซินทำหน้าที่เป็นตัวดึงดูดให้เดนไดรติกที่ยังพัฒนาไม่สมบูรณ์ และ

ที่เซลล์ที่จดจำสิ่งแปลกปลอมมายังบริเวณที่มีการอักเสบ ติดเชื้อโดยการทำให้ปฏิกิริยาผ่านทางตัวรับ สัญญาณ CCR-1,-5,-6 และ G α i-protein coupled receptor ซึ่งอยู่บนผิวเซลล์เดนไดรติกที่ยังพัฒนาไม่สมบูรณ์และที่เซลล์ที่จดจำสิ่งแปลกปลอม

2.2 สารดีเฟนซินจับกับสารแอนติเจนบนเซลล์เมมเบรน (cell membrane) ของเชื้อโรคเกิดเป็น สารประกอบดีเฟนซิน-แอนติเจน (defensin-antigen complex) ช่วยให้เดนไดรติกที่ยังพัฒนาไม่สมบูรณ์สามารถจับกิน (uptake) เชื้อโรคได้ง่าย

2.3 สารดีเฟนซินช่วยให้เซลล์เดนไดรติกที่ยังพัฒนาไม่สมบูรณ์มีการพัฒนาเป็น เซลล์เดนไดรติกที่สมบูรณ์ โดยการกระตุ้นให้เซลล์เดนไดรติกที่ยังพัฒนาไม่สมบูรณ์สร้างอินเตอร์ลิวคิน-2 (IL-2) ซึ่งเป็นการกระตุ้นทางตรง และโดยการที่สารดีเฟนซินไปกระตุ้นโมโนไซต์ และแมคโครฟาจ ให้สร้างทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์ และอินเตอร์ลิวคิน-1 (IL-1) เพื่อกระตุ้นให้ เซลล์เดนไดรติกที่ยังพัฒนาไม่สมบูรณ์พัฒนาเป็นเดนไดรติกเซลล์ที่สมบูรณ์ซึ่งเป็นการกระตุ้นทางอ้อม

3. สารดีเฟนซินมีบทบาทในการเกิดภูมิแพ้ โดยสารดีเฟนซินกระตุ้นให้แมสต์เซลล์หลั่ง สารฮิสตามีน (histamine) และ พรอสตาแกลนดิน ดี2 (prostaglandin D2) (Befus และคณะ, 1999; Niyonsaba และคณะ, 2001)

สารอัลฟาดีเฟนซินมีความเป็นพิษต่อเชื้อโรคและเซลล์ของร่างกายในขณะที่สารเบต้าดีเฟนซินไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ร่างกาย (Nishimura และคณะ, 2004; Weinberg และคณะ, 1998)

สารเบต้าดีเฟนซิน-2

สารเบต้าดีเฟนซิน-2 พบครั้งแรกในสะเก็ดผิวหนังของโรครีئونกวาง (Harder และคณะ, 1997) สามารถพบได้ทั่วไปในเยื่อผิวของปอด ทางเดินอาหาร เหงือก ทางเดินปัสสาวะและ สืบพันธุ์ เม็ดเลือดขาว ไชกระดูก จัดเป็น โมเลกุลที่กระตุ้นได้ (active molecule) เนื่องจากสามารถ กระตุ้นให้มีการสังเคราะห์จากเซลล์เยื่อผิวด้วยเชื้อโรคและส่วนประกอบของเชื้อโรครวมทั้ง ไชโตไคน์ (Oppenheim และคณะ, 2003) สารเบต้าดีเฟนซิน-2 มีคุณสมบัติต้านทานเชื้อแคนดิดา (candida) และแบคทีเรียแกรมลบ แต่ไม่มีผลกับแบคทีเรียแกรมบวกกลุ่มสแตฟิโลค็อกคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*) สารเบต้าดีเฟนซิน-2 เป็นสารดีเฟนซินตัวแรกที่ร่างกายสร้างขึ้นในการ ตอบสนองต่อการสัมผัสกับจุลินทรีย์ ไชโตไคน์กลุ่มทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์-อัลฟา และ อินเตอร์ ลิวคิน -1 เบต้า (IL-1 β) (Schroder, 1999) ส่วนใหญ่สร้างมาจากเซลล์เยื่อผิว (epithelial cell) ไม่ พบว่าสร้างจากเซลล์สร้างเส้นใย (fibroblast) (Dunsche และคณะ, 2001) โดยยีนส์ที่ควบคุมการสร้าง อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 8 (8p23.1) ซึ่งมีจำนวน 2-12 แบบ (copies) (Hollox, Armour และ Barber,

2003) นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์โอดอนโทบลาสต์ (odontoblast) โมโนไซต์ และแมคโครฟาจที่ได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์หรืออินเทอร์เฟอรอนแกมมาสามารถสร้างสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ได้เช่นกัน (Dommissch และคณะ, 2007; Duits และคณะ, 2002)

ขบวนการสร้างและขับสารเบต้าดีเฟนซิน-2

การสร้างสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ประกอบด้วยการสร้างอาร์เอ็นเอเข้ารหัส หรือที่เรียกว่า ขบวนการทรานสคริปชัน (transcription) และการสร้างสารโปรตีน หรือเรียกว่าขบวนการ ทรานสเลชัน (translation) (Krisanaprakornkit และคณะ, 2000) โดยอาศัยตัวรับสัญญาณบนผิว เซลล์เยื่อหุ้ม ซึ่งได้แก่ โทลไลครีเซพเตอร์ 2 และ 4 (TLR2, TLR4) นอดรีเซพเตอร์ 1 และ 2 (NOD1, NOD2) (Sugawara และคณะ, 2006) หรือ อัลฟา-5 เบต้า-1 อินทิกริน ($\alpha 5 \beta 1$ integrin) (Ouhara และ คณะ, 2006) จับกับสิ่งกระตุ้น แล้วส่งสัญญาณภายในเซลล์ไปยังนิวเคลียส โดยสิ่งกระตุ้นต่างกันจะมีเส้นทางการส่งสัญญาณที่ต่างกันออกไป เช่น พิวโซแบคทีเรียม นิวคลีออตัม (*Fusobacterium nucleatum*) กระตุ้นเซลล์เยื่อหุ้มเหงือกสร้างสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ผ่านทาง MAP kinase (Krisanaprakornkit, Kimball และ Dale, 2002; Ouhara และคณะ, 2006) แอกทิโนแบซิลลัส แอกทิ โนมายซีเทม โคมิตาน (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*) และ พอร์ไฟโรโมนัส จินจิวัลิส (*Porphyromonas gingivalis*) กระตุ้นเซลล์เยื่อหุ้มเหงือกสร้างสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ผ่านทาง NFkB (Chung และ Dale, 2004) อินเตอร์ลิวคิน -1 เบต้า กระตุ้นเซลล์อะดีโนคาร์ซิโนมา (adenocarcinoma cell line) สร้างสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ผ่านทาง MAP kinase และ NFkB (Jang และคณะ, 2004) เป็นต้น หลังจากได้รับสัญญาณกระตุ้นนิวเคลียสจะสร้างอาร์เอ็นเอเข้ารหัส ส่งออกมาสร้างโปรตีนในลาเมลลาบอดี้* (lamella bodies) ของเซลล์ในชั้นสไปนัส (spinous) และกรานูโลซัม (granulosum) (Oren และคณะ, 2003) สารเบต้าดีเฟนซิน-2 ที่สร้างขึ้นจะถูกขับออกมาสู่ช่องว่างระหว่างเซลล์เมื่อ มีการเปลี่ยนรูปร่างของเซลล์เยื่อหุ้ม (differentiation) ในการเจริญจากชั้นเบซัลขึ้นมาสู่ชั้นพื้นผิวด้านบน (Liu และคณะ, 2002) นอกจากนี้ในเยื่อหุ้มแล้วยังสามารถตรวจสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ได้ใน น้ำลายและน้ำเหลืองเหงือก (gingival crevicular fluid) (Diamond และคณะ, 2001; Mathews และ คณะ, 1999)

* ลามเมลลาบอดี้ เป็นส่วนหนึ่งของ กอลจีโอพพาราตัส (golgi apparatus) ทำหน้าที่ขับไขมันและไลโซไซม์ออกนอกเซลล์

หน้าที่ของสารเบต้าดีเฟนซิน-2

สารเบต้าดีเฟนซิน-2 มีหน้าที่สำคัญในการด้านการรุกรานของเชื้อโรค เช่น แบคทีเรียก่อโรคฟันผุ (cariogenic bacteria) และแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์ (periodontopathic bacteria) (Ouhara และคณะ, 2005) โดยออกฤทธิ์กำจัดแบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจน (aerobe) ได้ดีกว่าแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobe) สารเบต้าดีเฟนซิน-2 มีประสิทธิภาพในการกำจัดสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ (*Streptococcus mutans*) แอคทีโนมัยซิส นีสลันดีอี (*Actinomyces naeslundii*) แอคทีโนมัยซิส อิสราเอลไล (*Actinomyces israelii*) และสเตรปโตคอคคัส แซงกิวส (*Streptococcus sanguis*) ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มแรกที่มาเกาะผิวฟัน (early colonizers) ได้ดีกว่า ฟิวโซแบคทีเรียม นิวคลีอาตัม รวมทั้ง แอคทีโนแบซิลลัส แอคทีโนมัยซิเทม โคมิแทน และ พอร์ไฟโรโมแนส จินจิวัลิส ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์ ฤทธิ์ในการกำจัดแบคทีเรียกลุ่มแรกที่มาเกาะผิวฟันเป็นการป้องกันการติดเชื้อของแบคทีเรียก่อโรคในช่องปากทางอ้อมเนื่องจากแบคทีเรียก่อโรคต้องอาศัยเกาะกับแบคทีเรียกลุ่มแรกที่มาเกาะผิวฟันในการเจริญเติบโต (Joly และคณะ, 2004)

สารเบต้าดีเฟนซิน-2 ทำหน้าที่ดึงดูดเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน เช่น นิวโทรฟิลที่ผ่านการกระตุ้นด้วยทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์-อัลฟา (Niyonsaba และคณะ, 2004) เซลล์เดนไดรติกเซลล์ชนิดซีดี 34 (CD 34+ progenitor-derived dendritic cell) ที่เซลล์จดจำสิ่งแปลกปลอม (CD4CD45RO memory T cell) และที่เซลล์ชนิดซีดี 8 (CD8 T cells) (Yang และคณะ, 1999) มายังบริเวณที่มีการติดเชื้อเพื่อกำจัดเชื้อโรค และช่วยพัฒนาเซลล์นำเสนอแอนติเจน (antigen presenting cells) ซึ่งได้แก่ เซลล์แลงเกอร์ฮาน และ เซลล์เดนไดรติกที่ยังพัฒนาไม่สมบูรณ์ให้เป็นเซลล์เดนไดรติกที่สมบูรณ์เพื่อกระตุ้นที่เซลล์ให้มีการตอบสนองของภูมิคุ้มกัน ได้มาหลังเกิดต่อไป (Yang และคณะ, 2002)

นอกจากนี้สารเบต้าดีเฟนซิน-2 ยังทำหน้าที่ส่งเสริมการงอกของเซลล์เยื่อบุผิวและเซลล์สร้างเส้นใย ช่วยในการหายของแผล (Niyonsaba และ Ogawa, 2005) มีรายงานว่าสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ด้านทานการเกิดเนื้องอกด้วยการส่งเสริมให้มีภูมิต้านทานต่อทูเมอร์แอนติเจน (tumor antigen) (Oppenheim และคณะ, 2003)

ปัจจัยที่มีผลต่อการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2

จากการเลี้ยงเซลล์เคอราติโนไซต์ (keratinocyte) ในห้องปฏิบัติการ พบว่ามี 3 ปัจจัยหลักที่ทำให้เซลล์เคอราติโนไซต์แสดงออกซึ่งอาร์เอ็นเอเข้ารหัสหรือเปปไทด์ของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ได้แก่ ชนิดของเชื้อแบคทีเรียรวมทั้งส่วนประกอบต่างๆของแบคทีเรีย ไซโตไคน์ก่อการอักเสบ (proinflammatory cytokines) และ ชนิดของเซลล์เยื่อบุผิวและการพัฒนาของเซลล์เคอราติโนไซต์ (differentiation of keratinocyte) (Liu และคณะ, 2002)

ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย รวมทั้งส่วนประกอบต่างๆ ของแบคทีเรีย

ชนิดของเชื้อแบคทีเรียสามารถกระตุ้นเซลล์เคอราติโนไซต์ให้สร้างสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ได้แตกต่างกันไป

Vankeerberghen และคณะ (2005) ศึกษาการแสดงออกของอินเตอร์ลิวคิน-8 สารเบต้าดีเฟนซิน-1,-2,-3 และ-4 ของเยื่อบุผิวเหงือกจากผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ 6 คน โดยนำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ แล้วกระตุ้นด้วยแอกทิโนแบซิลลัส แอกทิโนมัชชีเทม โคมิแทน จำนวน 5 สายพันธุ์ (strains) พอร์ไฟโรโมนเนส จินจิवालิส จำนวน 5 สายพันธุ์ ฟิวโซแบคทีเรียม นิวคลีออตัม จำนวน 1 สายพันธุ์ และเอสเชอริเชีย โคลไล (*Escherichia coli*) จำนวน 1 สายพันธุ์ เป็นเวลา 20 ชั่วโมง ตรวจวัดการแสดงออกของสารที่ศึกษาด้วยวิธี เรียลไทม์ พีซีอาร์ (real time PCR) พบว่าฟิวโซแบคทีเรียม นิวคลีออตัม และเอสเชอริเชีย โคลไล กระตุ้นการแสดงออกของอินเตอร์ลิวคิน-8 และสารเบต้าดีเฟนซิน-2 มากกว่าการกระตุ้นด้วย แอกทิโนแบซิลลัส แอกทิโนมัชชีเทม โคมิแทน ซีโรโทปป์ เอ 10 เท่า โดยที่แอกทิโนแบซิลลัส แอกทิโนมัชชีเทม โคมิแทน ซีโรโทปป์ บี และพอร์ไฟโรโมนเนส จินจิवालิส ทั้ง 5 สายพันธุ์ไม่สามารถกระตุ้นแสดงออกของอินเตอร์ลิวคิน-8 และสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ส่วนแอกทิโนแบซิลลัส แอกทิโนมัชชีเทม โคมิแทน ซีโรโทปป์ ซี สามารถกระตุ้นแสดงออกของอินเตอร์ลิวคิน-8 และสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ได้เท่ากับการกระตุ้นด้วยเชื้อฟิวโซแบคทีเรียม นิวคลีออตัม และเอสเชอริเชีย โคลไล

Ji และคณะ (2007) ศึกษาการแสดงออกของอินเตอร์ลิวคิน-8 สารเบต้าดีเฟนซิน-1 -2,-3 และคาร์ลิซิซิน ในเซลล์เยื่อบุผิวช่องปาก (human oral keratinocyte; HOK-16B) โดยการกระตุ้นด้วยแบคทีเรียไม่ก่อโรคในช่องปาก(commensal bacteria) 5 ชนิด และแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์ 3 ชนิด ได้แก่ ทรีโพนีมา เด็นติโคลา (*Treponema denticola*) แทนเนอเรลลา ฟอร์ซัยเธีย (*Tannerella forsythia*) และพอร์ไฟโรโมนเนส จินจิवालิส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจวัดปริมาณสารที่ศึกษาด้วยวิธีเรียลไทม์ พีซีอาร์ พบว่าแบคทีเรียชนิดไม่ก่อโรคในช่องปาก เช่น สเตรปโตค็อกคัส กอร์ดอนี (*Streptococcus gordonii*) 프리โวเทลลา อินเตอร์มีเดีย (*Prevotella intermedia*) และ

ฟิวโสบางที่เรียก นิวคลีโอไซด์ กระตุ้นการสร้างสารเบต้าดีเฟนซิน-2 และอินเตอร์ลิวคิน-8 ได้ดีกว่าแบบที่เรียกที่ก่อโรคปรีทันต์ทั้ง 3 ชนิด พบว่าเชื้อทริโพนีมา เต็นติโคลา และ พอร์ไฟโรโมแนส จินจิ วาลิส กดการสร้างอินเตอร์ลิวคิน-8 และ แบบที่เรียกที่มีชีวิตสามารถกระตุ้นหรือกดการทำงานของเซลล์เยื่อบุผิวช่องปากได้ดีกว่าแบบที่เรียกที่ตายแล้ว

ส่วนประกอบต่าง ๆ ของแบบที่เรียกมีผลต่อการกระตุ้นหรือกดการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 แตกต่างกันไป โดยพบว่าผนังเซลล์ของแบบที่เรียก ฟิวโสบางที่เรียก นิวคลีโอไซด์ สามารถกระตุ้นการสร้างสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ได้ดี แต่ไลโปโพลีแซคคาไรด์ของฟิวโสบางที่เรียก นิวคลีโอไซด์ กระตุ้นการสร้างสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ได้น้อยมาก (Krisanaprakornkit และคณะ, 2000) นอกจากนี้ส่วนประกอบอื่นๆ ของแบบที่เรียก เช่น ไลโปโพลีแซคคาไรด์ แฟล็กเจลลิน (flagellin) และโปรตีนในส่วนเยื่อหุ้มผิวส่วนนอก (outer membrane protein) ของเชื้อแอคติโนแบคทีเรีย และโปรตีนในส่วนของเยื่อหุ้มผิวส่วนนอก (outer membrane protein) ของเชื้อแอคติโนแบคทีเรีย สามารถกระตุ้นการสร้างสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ได้เช่นกัน (Ouhara และคณะ, 2006)

ไซโตไคน์ก่อการอักเสบ

Joly และคณะ (2005) ศึกษาการสร้างสารเบต้าดีเฟนซิน-2 จากเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการโดยกระตุ้นด้วย และ อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า อินเตอร์ลิวคิน-2 อินเตอร์ลิวคิน-6 อินเตอร์ลิวคิน-8 อินเตอร์ลิวคิน-12 ทุเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์-อัลฟา อินเทอร์เฟอรอนแกมมาและไลโปโพลีแซคคาไรด์ ของ เอสเชอริเชีย โคลิ วัตถุประสงค์ของอาร์เอ็นเอการห้สเบต้าดีเฟนซิน-2 ด้วยวิธีเรียลไทม์ พีซีอาร์ พบว่า ทุเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์-อัลฟาและ อินเตอร์ลิวคิน -1 เบต้า กระตุ้นการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ได้ดี อินเตอร์ลิวคิน-2 ,-6 และไลโปโพลีแซคคาไรด์ กระตุ้นได้เล็กน้อย ส่วนอินเทอร์เฟอรอนแกมมา อินเตอร์ลิวคิน-8 และ อินเตอร์ลิวคิน-12 ไม่กระตุ้นแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 การใช้อินเทอร์เฟอรอนแกมมาร่วมกับอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้าสามารถกระตุ้นแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ได้ และ การใช้อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า ร่วมกับทุเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์-อัลฟาสามารถกระตุ้นแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ได้ดีกว่าการใช้อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้าอย่างเดียวถึง 4 เท่า

Ong และคณะ (2002) ศึกษาการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2และคาซิซิซิน ในตัวอย่างผิวหนังในผู้ป่วยโรคผิวหนังอักเสบที่มีการฝ่อลีบ (atopic dermatitis) จำนวน 8 คน และโรคเรื้อนกวาง (psoriasis) จำนวน 11 คน เปรียบเทียบกับผู้ไม่เป็นโรคผิวหนังจำนวน 6 คน ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี และวัตถุประสงค์ของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 และคาซิซิซิน ในเซลล์ผิวหนังที่กระตุ้นด้วย ทุเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์- อัลฟา อินเตอร์ลิวคิน-4 และ-13 ด้วยวิธีเรียลไทม์ พีซีอาร์

พบว่าในผู้ป่วยโรคเรื้อนกวามีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 และคาธิลซิดินมากกว่าผู้ป่วยโรคผิวหนังอักเสบที่มีการฝ่อลีบ และพบว่าทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์-อัลฟา กระตุ้นการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 และคาธิลซิดิน ในขณะที่ อินเตอร์ลิวคิน-4 และ-13 กดการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 และคาธิลซิดิน

ชนิดของเซลล์และการเปลี่ยนรูปร่างของเซลล์เคอราติโนไซต์

Dunsche และคณะ (2001) ศึกษาการแสดงออกของอาร์เอ็นเอเข้ารหัสสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ด้วยวิธีรีเวิร์สทรานสคริปเตส โพลีเมอร์เรสเซนรีแอกชัน (reverse transcriptase polymerase chain reaction; RT PCR) ในเซลล์สร้างเส้นใยจากเหงือกและเซลล์เคอราติโนไซต์ (keratinocytes) จากเยื่อเมือก (mucosa) ที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการพบว่าเซลล์เคอราติโนไซต์สร้างสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ในขณะที่เซลล์สร้างเส้นใยไม่สร้างสารเบต้าดีเฟนซิน-2

เซลล์เคอราติโนไซต์ที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการมีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ในเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยแบคทีเรียหรือไซโตไคน์ (Krisanaprakornkit และคณะ, 2000) และในเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (Liu และคณะ, 2002) ซึ่งสอดคล้องกับการตรวจชิ้นเนื้อเหงือกที่จะพบอาร์เอ็นเอเข้ารหัสของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ในเยื่อผิวเหงือกเหนือชั้นเบซัล (suprabasal layer) ของเยื่อผิวด้านช่องปาก (oral gingival epithelium) และด้านร่องเหงือก (sulcular epithelium) ที่มีเซลล์เรียงตัวซ้อนกันหลายชั้น โดยมีการเจริญเติบโตและเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากชั้นล่างขึ้นสู่ชั้นบน แต่ไม่พบการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ที่เยื่อผิวเชื่อมต่อ (junctional epithelium) เนื่องจากเยื่อผิวเชื่อมต่อเป็นเซลล์เยื่อผิวเหงือกที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างแล้ว (Dale และคณะ, 2001)

Dale และ Krisanaprakornkit (2001) พบการแสดงออกของเปปไทด์สารเบต้าดีเฟนซิน-2 มากในชั้นกรานูลาร์ (granular layer) ไปจนถึงชั้นคอร์เนียม (corneal layer) ของเยื่อผิวเหงือกโดยจะพบมากที่สุดที่ขอบเหงือก (gingival crest) ซึ่งเป็นบริเวณที่สัมผัสกับคราบจุลินทรีย์ ในขณะการศึกษาของ Hosokawa และคณะ (2006) Lu และคณะ (2004) พบการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ทั้งในส่วนของอาร์เอ็นเอเข้ารหัสและเปปไทด์ในชั้นเบซัล (basal layer) ไปจนถึงชั้นคอร์เนียม

การแสดงผลของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ในช่องปากและการเกิดโรคปริทันต์

ในช่องปากสามารถพบการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ได้ในเหงือก ลิ้น ต่อมน้ำลาย (Dunsche และคณะ, 2002) เยื่อบุผิวแก้มที่ติดเชื้อแคนดิดา (Sawaki และคณะ, 2002) ในเซลล์ไคคอนโตบลาสท์ (Dommissch และคณะ, 2007) ในน้ำลาย (Mathews และคณะ, 1999) และในน้ำเหลืองเหงือก (Diamond และคณะ, 2001) โดยบริเวณรอยต่อระหว่างเหงือกและฟันจะมีสภาพแวดล้อมที่ซับซ้อน เนื่องจากฟันเป็นส่วนอวัยวะแข็งที่งอกขึ้นมาจากเหงือกที่เป็นเนื้อเยื่ออ่อน จึงเป็นจุดอ่อนแอให้เชื้อโรครุกรานและเป็นจุดเริ่มต้นของการเกิดโรคปริทันต์ (Dale และ Fredericks, 2005) และเป็นบริเวณมีรายงานการศึกษาการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 มาก

รายงานการศึกษาด้านจุลชีพเบต้าดีเฟนซิน-2 ในเหงือกมีดังต่อไปนี้

Mathews และคณะ (1999) ศึกษาการแสดงออกของอาร์เอ็นเอรหัสสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ในตัวอย่างที่ได้จากต่อมน้ำลายขนาดใหญ่ (major salivary glands) ลิ้น เหงือก และกระพุ้งแก้มของผู้ที่เสียชีวิตแล้ว (post mortem specimens) และเหงือกที่ได้จากการผ่าตัด พบการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 เฉพาะในเหงือกที่ได้จากการผ่าตัด และพบการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 มากขึ้นในตำแหน่งที่มีการอักเสบเมื่อเทียบกับตำแหน่งเหงือกปกติ

Krisanaprakornkit และคณะ (2000) ศึกษาการแสดงออกของอาร์เอ็นเอรหัสของเบต้าดีเฟนซิน-2 ในเหงือกปกติที่ได้จากการถอนฟันกรามซี่ที่สาม (third molar) ในกลุ่มตัวอย่าง 15 คน ด้วยวิธีรีเวิร์สทรานสคริปเตส โพลีเมอร์เรส เซน รีแอกชัน พบว่ามีกลุ่มตัวอย่างจำนวน 14 คนที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 คิดเป็นร้อยละ 93.33 แสดงให้เห็นว่าในเหงือกปกติมีความถี่ในการตรวจพบสารเบต้าดีเฟนซิน-2 สูง

Dunsche และคณะ (2002) ทำการตรวจเนื้อเยื่อเหงือกที่ปกติ และที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบในชิ้นเนื้อเหงือกตัวอย่าง 104 ชิ้น ด้วยวิธีรีเวิร์สทรานสคริปเตส โพลีเมอร์เรส เซน รีแอกชัน พบว่าในชิ้นเนื้อตัวอย่างที่ไม่มีการอักเสบ พบการแสดงออกของอาร์เอ็นเอรหัสของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 จำนวน 54 จาก 64 ชิ้น คิดเป็นร้อยละ 84.30 ในขณะที่ชิ้นเนื้อตัวอย่างที่มีการอักเสบพบการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 เพียง 22 จาก 40 ชิ้น คิดเป็นร้อยละ 55.60

Bissell และคณะ (2004) ศึกษาเพื่อวัดปริมาณของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 จากเนื้อเยื่อเหงือกที่ตัดออกมาจากกลุ่มตัวอย่างที่ไม่เป็นโรคปริทันต์ 20 คน และจากกลุ่มตัวอย่างที่เป็นโรคปริทันต์ 29 คน ด้วยวิธีเคมีควอนติเตชัน รีเวิร์สทรานสคริปชัน โพลีเมอร์เรส เซนรีแอกชัน (Semi quantitative reverse transcription PCR) พบว่ากลุ่มตัวอย่างที่ไม่เป็นโรคปริทันต์ 7 จาก 20 คน (ร้อยละ 35.0) มีการแสดงออกของอาร์เอ็นเอรหัสสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ในระดับสูง กลุ่มตัวอย่าง 7 จาก 20 คน (ร้อยละ 35.0) มีการแสดงออกในระดับต่ำ และกลุ่มตัวอย่าง 6 จาก 20 คน (ร้อยละ 30) ไม่มีการ

แสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ในขณะที่กลุ่มตัวอย่างที่เป็นโรคปริทันต์ กลุ่มตัวอย่าง 4 จาก 29 คน (ร้อยละ 13.8) มีการแสดงออกของอาร์เอ็นเอเข้ารหัสของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ในระดับสูง กลุ่มตัวอย่าง 9 จาก 29 คน (ร้อยละ 31.0) มีการแสดงออกในระดับต่ำ และมีถึง 16 จาก 29 คน (ร้อยละ 55.2) ที่ไม่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 การแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ไม่มีความสัมพันธ์กับอายุและเพศ แต่อาจมีความสัมพันธ์กับการสูบบุหรี่หรือยาที่ได้รับ

Lu และคณะ (2004) ใช้วิธีทางอิมมูโนฮิสโตเคมี ตรวจเปปไทด์เบต้าดีเฟนซิน-2 ในกลุ่มตัวอย่างที่ไม่เป็นโรคปริทันต์ 7 คน และกลุ่มตัวอย่างที่เป็นโรคปริทันต์ 22 คน โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์วิเคราะห์สัดส่วนการติดสีของเซลล์ที่มีการแสดงออกของเปปไทด์สารเบต้าดีเฟนซิน-2 (computer - assisted image analysis) พบว่ากลุ่มตัวอย่างที่ไม่เป็นโรคปริทันต์มีระดับเปปไทด์สารเบต้าดีเฟนซิน-2 สูงกว่ากลุ่มตัวอย่างที่เป็นโรคปริทันต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และในกลุ่มตัวอย่างที่เป็นโรคปริทันต์ เนื้อเยื่อเหงือกจากบริเวณที่ไม่มีการอักเสบจะมีปริมาณเปปไทด์สารเบต้าดีเฟนซิน-2 ต่ำกว่าเนื้อเยื่อเหงือกจากบริเวณที่มีการอักเสบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

Dommsich และคณะ (2005) ศึกษาเปรียบเทียบปริมาณอาร์เอ็นเอเข้ารหัสของเบต้าดีเฟนซิน-1,-2 และ-3 ในเหงือกปกติจำนวน 10 คน เหงือกอักเสบ (gingivitis) จำนวน 10 คนและเหงือกที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ จำนวน 10 คน ด้วยวิธีเรียลไทม์พีซีอาร์ ไม่พบความแตกต่างของปริมาณเบต้าดีเฟนซิน-2 ในระหว่างเหงือกปกติและเหงือกที่มีการอักเสบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกับผลของเบต้าดีเฟนซิน-1 และ-3 แต่สำหรับค่าเฉลี่ยของปริมาณการแสดงออกพบว่าในเหงือกอักเสบมีปริมาณเบต้าดีเฟนซิน-2 สูงที่สุด ส่วนเหงือกที่เป็นปริทันต์อักเสบ ปริมาณเบต้าดีเฟนซิน-2 มีระดับเดียวกับเบต้าดีเฟนซิน-3 ซึ่งสูงกว่าเบต้าดีเฟนซิน-1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.016$)

Hosokawa และคณะ (2006) ศึกษาการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ในเหงือกปกติ 10 คน และในเหงือกที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบจำนวน 13 คน ด้วยวิธี รีเวอร์สทรานสคริปชันโพลีเมอร์เรสเซนซ์แอกชัน อิมมูโนฮิสโตเคมี และเอนไซม์-ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเส (อีไลซา) (Enzyme - linked immunosorbent assay ; ELISA) ผลการตรวจด้วยวิธี รีเวอร์สทรานสคริปชันโพลีเมอร์เรสเซนซ์แอกชันพบว่าความถี่ในการตรวจพบการแสดงออกของเบต้าดีเฟนซิน-2 ในกลุ่มเหงือกปกติสูงกว่าเหงือกที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ ผลการตรวจด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีพบว่าการแสดงออกของเปปไทด์ของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ในกลุ่มตัวอย่างทุกคน และผลการตรวจด้วยวิธีอีไลซาพบว่าความเข้มข้นของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ในกลุ่มเหงือกที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบสูงกว่าเหงือกปกติเล็กน้อย และไม่มีความสัมพันธ์กับความลึกร่องปริทันต์

การศึกษาของ Joly และคณะ (2005) โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์เยื่อผิวและทำการกระตุ้นด้วยไซโตไคน์ชนิดต่างๆ พบว่าการแสดงออกของอาร์เอ็นเอเข้ารหัสและสารโปรตีนสารเบต้าดีเฟนซิน-2

สอดคล้องและเป็นไปในทิศทางเดียวกัน แต่การศึกษาของ Lu และคณะ (2005) โดยศึกษาการ แสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-1,2 และ-3 จากชิ้นเนื้อที่ตัดออกมาจากช่องปาก พบว่าระดับ การแสดงออกของอาร์เอ็นเอสำหรับสารเบต้าดีเฟนซิน-2 มีมากกว่าการแสดงออกของเปปไทด์สาร เบต้าดีเฟนซิน-2 กลไกและผลการศึกษาการแสดงผลของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ที่แตกต่างกันระหว่างการ ศึกษาที่ได้จากการกระตุ้นเซลล์ในห้องปฏิบัติการกับการศึกษาที่ได้จากการตรวจเนื้อเยื่อนอก ร่างกายยังต้องการการศึกษาวิจัยเพิ่ม

จากการศึกษาที่กล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 สามารถตรวจพบได้ทั้งจากเนื้อเยื่อเหงือกที่ปกติไม่มีการอักเสบ (healthy) และจากเนื้อเยื่อเหงือกที่มี การอักเสบหรือเป็นโรคปริทันต์ โดยผลการศึกษาแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มคือ การศึกษาที่แสดงให้เห็น ว่าเซลล์บริเวณที่มีการอักเสบมีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 สูงกว่าบริเวณเหงือกปกติ (Mathews และคณะ, 1999) การศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าบริเวณที่มีการอักเสบมีการแสดงออกของ สารเบต้าดีเฟนซิน-2 ต่ำกว่าบริเวณเหงือกปกติ (Bissell และคณะ, 2004; Dunsche และคณะ, 2002; Hosokawa และคณะ, 2006; Lu และคณะ, 2004) และการศึกษาที่ไม่พบความแตกต่างของการ แสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ระหว่างเนื้อเยื่อที่ปกติและมีการอักเสบ (Dommsich และคณะ, 2005) เนื่องจากรายงานการศึกษาที่ได้ทบทวนวรรณกรรมยังไม่มีข้อสรุปที่ชัดเจนในเรื่องการ แสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ในเหงือกปกติและเหงือกที่อักเสบ นอกจากนี้มีหลายปัจจัยที่มี ผลต่อการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ดังกล่าวมาแล้วข้างต้น จึงเป็นที่มาของการศึกษานี้ เพื่อศึกษารูปแบบการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ในเยื่อผิวเหงือกและนำไปสู่ความเข้าใจ เกี่ยวกับบทบาทของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ในพยาธิกำเนิดโรคปริทันต์อักเสบมากขึ้น

บุหรี่

เป็นที่ทราบกันว่าบุหรี่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ โดยผู้สูบบุหรี่จะเริ่มติดบุหรี่ในวัยรุ่นและมัก สูบต่อเนื่องจนตลอดชีวิต (Palmer และคณะ, 2005)

จากการสำรวจพฤติกรรมการสูบบุหรี่และการดื่มสุราของประชากรไทยอายุตั้งแต่ 15 ปีขึ้นไป ในปี 2547 โดยสำนักงานสถิติแห่งชาติ พบว่าอัตราการสูบบุหรี่ของชายไทยเท่ากับร้อยละ 43.7 ส่วนเพศหญิงพบมีการสูบบุหรี่ร้อยละ 2.6 โดยมีผู้สูบบุหรี่เป็นประจำรวม 9,627,600 คน และสูบนานๆ ครั้ง 1,726,500 คน ช่วงอายุที่สูบบุหรี่มากที่สุดได้แก่วัยทำงาน 25-59 ปี รองลงมาคือกลุ่มผู้สูงอายุที่มีอายุ ตั้งแต่ 60 ปีขึ้นไป เพศชายจะเริ่มสูบบุหรี่เมื่ออายุ 18.2 ปี และเพศหญิงจะเริ่มสูบบุหรี่เมื่ออายุ 21.7 ปี ทั้งนี้ พบว่าคนไทยเสียชีวิตโดยมีสาเหตุสืบเนื่องจากการสูบบุหรี่เฉลี่ยวันละ 140 ราย และรัฐบาลต้องเสีย งบประมาณปีละ 6,000-7,000 ล้านบาทต่อปีเพื่อเป็นค่ารักษาพยาบาลผู้ป่วยโรคมะเร็ง โรคหัวใจและ

โรคถุงลมโป่งพองอันเกิดจากการสูบบุหรี่ (สำนักงานสถิติแห่งชาติ, 2547) ควันบุหรี่ประกอบด้วยสารเคมีหลายชนิด พบว่าสารนิโคตินเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการเสพติดทั้งร่างกายและจิตใจ (Palmer และคณะ, 2005)

การสูบบุหรี่กับปัจจัยเสี่ยงในการเกิดและความรุนแรงของโรคปริทันต์

ปัจจัยเสี่ยงในการเกิดโรคปริทันต์มีหลายปัจจัย เช่น อายุ เพศ เชื้อชาติ ความเครียด การรักษาอนามัยช่องปาก ความใส่ใจในการรับการรักษาทางทันตกรรม ปัจจัยด้านพันธุกรรม การเป็นโรคเบาหวาน ปัจจัยสิ่งแวดล้อม เช่น การสูบบุหรี่ และ การมีเชื้อแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์ เป็นต้น จากรายงานการศึกษาปัจจัยเสี่ยงของโรคปริทันต์แสดงให้เห็นว่า การสูบบุหรี่เป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญของการเกิดโรคปริทันต์ (Calsina, Ramon และ Echeverria, 2002; Johnson และ Guthmiller, 2007; Torrungruang, Tamsailom และคณะ, 2005) จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าผู้ที่สูบบุหรี่มีความเสี่ยงเพิ่มขึ้น 2-4 เท่า ในการเกิดการสูญเสียการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์ (Grossi และคณะ, 1994; Haffajee และ Socransky, 2001) และ เพิ่มความเสี่ยงในการสูญเสียกระดูกเบ้าฟัน (alveolar bone) มากกว่าผู้ไม่สูบบุหรี่ 3-7 เท่า (Bergstrom, Eliasson และ Preber, 1991; Grossi และคณะ, 1995) โดยพบว่าผู้สูบบุหรี่มีค่าเฉลี่ยร่องลึกปริทันต์และมีจำนวนตำแหน่งที่มีความลึกร่องปริทันต์มากกว่าผู้ไม่สูบบุหรี่ (Torrungruang, Nisapakultorn และคณะ, 2005) รวมทั้งมีระดับเหงือกอักเสบมากกว่า มีทำลายกระดูกบริเวณง่ามรากมากกว่า และมีการสูญเสียฟันกรามมากกว่าผู้ไม่สูบบุหรี่ (Kerdvongbundit และ Wikesjo, 2000)

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการสูบบุหรี่กับสภาวะโรคปริทันต์ในพนักงานการไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทยในปี พ.ศ. 2545 โดยมีกลุ่มตัวอย่างที่ได้รับการตรวจสภาวะปริทันต์จำนวน 2005 คน อายุ 49-72 ปี พบว่าพฤติกรรมการสูบบุหรี่กับการเกิดโรคปริทันต์อักเสบมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ โดยผู้สูบบุหรี่มีอัตราเสี่ยงต่อการเกิดโรคปริทันต์อักเสบมากกว่าผู้ไม่สูบบุหรี่ 2.6 เท่า และเมื่อควบคุมอิทธิพลของตัวแปรโรคเบาหวาน อายุ และปริมาณคราบจุลินทรีย์พบว่า อัตราเสี่ยงต่อการเกิดโรคปริทันต์อักเสบของผู้สูบบุหรี่ยังคงมากกว่าผู้ไม่สูบบุหรี่ 2.34 เท่า และเมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการสูบบุหรี่กับความรุนแรงของโรคปริทันต์ โดยใช้การวิเคราะห์แบบถดถอยโลจิสติกภายใต้การควบคุมอิทธิพลของตัวแปรโรคเบาหวาน อายุ และปริมาณคราบจุลินทรีย์ให้คงที่พบว่า ผู้สูบบุหรี่มีอัตราเสี่ยงต่อการเป็นโรคปริทันต์อักเสบระดับกลาง 3.01 เท่า และระดับรุนแรง 4.72 เท่าของผู้ไม่สูบบุหรี่ (सानุตม์ สุทธิพิศาล และคณะ, 2549)

ความรุนแรงของโรคปริทันต์แปรผันตามปริมาณการสูบ (Goultschin และคณะ, 1990) โดยผู้ที่สูบบุหรี่วันละ 1 มวน 2-10 มวน และ 11-20 มวนต่อวัน มีโอกาสที่จะสูญเสียการยึดเกาะอวัยวะ

ปริทันต์ ร้อยละ 0.5 ร้อยละ 5 และร้อยละ 10 ตามลำดับ โดยผู้ที่สูบบุหรี่น้อยกว่าวันละ 10 มวนจะมีการสูญเสียการยึดเกาะอวัยวะปริทันต์ไม่ต่างจากผู้ไม่สูบบุหรี่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Martinez-Canut, Lorca และ Magan, 1995) Grossi และคณะ (1994) รายงานว่าผู้ที่สูบบุหรี่น้อยกว่า 15 ของปี (packyear) จะมีอัตราเสี่ยงการสูญเสียการยึดเกาะอวัยวะปริทันต์ขั้นรุนแรงเป็น 2.05 เท่าเทียบกับผู้ที่ไม่สูบบุหรี่ และจะเพิ่มเป็น 4.75 เท่า ในผู้ที่สูบบุหรี่มากกว่า 30 ของปี ในขณะที่ สานุดมและคณะ (2549) รายงานในคนไทยว่าผู้ที่สูบบุหรี่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 10 ของปี มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคปริทันต์ขั้นรุนแรงมากกว่าผู้ไม่สูบ 3.8 เท่า และจะเพิ่มเป็น 5.7 เท่า เมื่อมีปริมาณการสูบบุหรี่มากกว่า 10 ของปี

ผลของการสูบบุหรี่ต่อพยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์อักเสบ

1. การสูบบุหรี่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของชนิดและปริมาณเชื้อโรคในร่องเหงือก

การศึกษาเปรียบเทียบเชื้อจุลินทรีย์ได้เหงือกในผู้สูบบุหรี่กับผู้ไม่สูบบุหรี่มีผลการศึกษาที่แตกต่างกัน ไปขึ้นกับเครื่องมือที่ใช้เก็บตัวอย่าง ตำแหน่ง ด้านของฟัน จำนวนซี่ฟัน ความลึกของร่องปริทันต์จากฟันที่เก็บตัวอย่าง สภาพช่องปากของกลุ่มตัวอย่างและวิธีการตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธีการเพาะเชื้อ (culture) การทำพีซีอาร์ (PCR) หรือ วิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ (immunofluorescence) สามารถแบ่งผลการศึกษาแบ่งได้ออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่ไม่พบความแตกต่างของเชื้อจุลินทรีย์ได้เหงือกในผู้สูบบุหรี่และผู้ไม่สูบบุหรี่และกลุ่มที่พบว่ามีความแตกต่างของเชื้อจุลินทรีย์ได้เหงือกในผู้สูบบุหรี่และผู้ไม่สูบบุหรี่

1.1 การศึกษาที่ไม่พบความแตกต่างของเชื้อจุลินทรีย์ได้เหงือกในผู้สูบบุหรี่และผู้ไม่สูบบุหรี่ ได้แก่ การศึกษาของ

Preber, Bergstrom และ Linder (1992) ใช้การเพาะเชื้อจุลินทรีย์ได้เหงือกในผู้ป่วยโรคปริทันต์รุนแรงจำนวน 145 คน โดยเป็นผู้สูบบุหรี่ 83 คนและผู้ไม่สูบบุหรี่ 62 คน พบว่าร้อยละของผู้ติดเชื้อแอกทีโนแบซิลลัส แอกทีโนมัยซีเทม โคมิแทน พอร์ไฟโรโมแนส จินจิวัลิสซึ่งในขณะนั้นเรียกแบคทีเรียชนิดนี้ว่า จินจิวัลิส (*Bacteroidis gingivalis*) และพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดียซึ่งในขณะนั้นเรียก แบคทีเรียชนิดนี้ว่า อินเตอร์มีเดีย (*Bacteroidis intermedius*) ในกลุ่มตัวอย่างทั้งสองกลุ่มนี้ไม่แตกต่างกัน

Stoltenberg และคณะ (1993) ใช้การตรวจหาจุลินทรีย์ได้เหงือก (subgingival plaque) ด้วยวิธีเคมีควอนติตีฟิเคชันแบบที่เรียลไทม์คอนเซนเทรชันฟลูออเรสเซนซ์อิมมูโนแอสเส (semi-quantitative bacterial concentration fluorescence immunoassay) ในบริเวณฟันหลังของผู้สูบบุหรี่ 63 คนเทียบกับผู้ไม่สูบบุหรี่ 126 คน ไม่พบความแตกต่างของความชุก (prevalence) ในการติดเชื้อ พอร์ไฟโรโมแนส จินจิวัลิส แอกทีโนแบซิลลัส แอกทีโนมัยซีเทม โคมิแทน พรีโวเทลลา อินเตอร์

มีเดีย อีทีเนลลา โคโรเดน (*Eikenella corrodens*) และฟิวโสบกที่เรียม นิวคลีออตัม ระหว่างกลุ่มตัวอย่างทั้งสองกลุ่ม

Bostrom และคณะ (2001) ใช้กระดาษซับรูปกรวย (paper point) ที่ปราศจากเชื้อสอดเข้าไปในร่องลึกปริทันต์ของผู้สูบบุหรี่ 33 คน และผู้ไม่สูบบุหรี่ 31 คน แล้วนำมาตรวจหาเชื้อพอร์ไฟโรโมนเนส จินจิวัลิส ฟริโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย ฟริโวเทลลา ไนกริเซน (*Prevotella nigrescens*) แพนเนอเรลลา ฟอร์ซัยเซียซึ่งในขณะนั้นเรียก แบคทีรอยดิส ฟอร์ไซซัส (*Bacteroides forsythus*) แอกทีโนแบซิลลัส แอกทีโนมายซีเทม โคมิแทน ฟิวโสบกที่เรียม นิวคลีออตัม ทรีโพนีมา เด็นติโคลา เปปโตสเตรปโตคอคคัส ไมครอส (*Peptostreptococcus micros*) แคมไพโรแบคเตอร์เรคตัส (*Campylobacter rectus*) อีทีเนลลา โคโรเดน เซเลโมนเนส น็อกเซีย (*Selemonas noxia*) และสแตฟีโลคอคคัส อินเตอร์มีเดียส (*Staphylococcus intermedius*) ด้วยวิธีดีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอ ไฮบริไดเซชัน (DNA-DNA hybridization) ไม่พบว่ามีความแตกต่างในอัตราการติดเชื้อเหล่านี้ในผู้สูบบุหรี่และผู้ไม่สูบบุหรี่ และยังพบว่า การสูบบุหรี่ไม่มีความสัมพันธ์กับเชื้อที่ทำการตรวจ

1.2 การศึกษาที่พบว่ามีความแตกต่างของเชื้อจุลินทรีย์ได้เหงือกในผู้สูบบุหรี่และผู้ไม่สูบบุหรี่ ได้แก่ การศึกษาของ

Zambon และคณะ (1996) ทำการตรวจเชื้อจุลินทรีย์ได้เหงือกในกลุ่มตัวอย่างจำนวน 1,426 คน โดยเป็นผู้สูบบุหรี่หรือเคยสูบบุหรี่ จำนวน 798 คน ด้วยวิธีจุลทรรศน์ศาสตร์อิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ (immunofluorescence microscopy) พบว่าในกลุ่มผู้สูบบุหรี่มีสัดส่วนผู้ที่ตรวจพบแพนเนอเรลลา ฟอร์ซัยเซียสูงกว่าผู้ไม่สูบบุหรี่อย่างมีนัยสำคัญ

Umeda และคณะ (1998) ทำการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียแบซิลลัส แอกทีโนมายซีเทม โคมิแทน แพนเนอเรลลา ฟอร์ซัยเซีย พอร์ไฟโรโมนเนส จินจิวัลิส ฟริโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย ฟริโวเทลลา ไนกริเซน และทรีโพนีมา เด็นติโคลา ด้วยวิธีโพลีเมอร์เรส เซน รีแอกชัน ในกลุ่มตัวอย่างที่มีเชื้อชาติแตกต่างกันจำนวน 149 คน พบว่าอายุและเชื้อชาติมีความสัมพันธ์กับการตรวจพบเชื้อก่อโรคปริทันต์ และ ผู้สูบบุหรี่มีความเสี่ยงเพิ่มขึ้นที่จะตรวจพบเชื้อทรีโพนีมา เด็นติโคลา ในร่องลึกปริทันต์สูงกว่าผู้ไม่สูบบุหรี่ 4.61 เท่า

Haffajee และ Socransky (2001) ทำการตรวจกลุ่มตัวอย่างอายุ 20-86 ปี จำนวน 272 คน โดยอาศัยวิธีการตรวจเชื้อด้วยวิธี เช็คเกอร์บอร์ด ดีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอ ไฮบริไดเซชัน (checker board DNA-DNA hybridization) พบว่าผู้ที่สูบบุหรี่มีตำแหน่งที่มีการตั้งถิ่นฐานของเชื้อแบคทีเรียโนดาตัม (*Eubacterium nodatum*) ฟิวโสบกที่เรียม นิวคลีออตัม ฟริโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย เปปโตสเตรปโตคอคคัส ไมครอส ฟริโวเทลลา ไนกริเซน แพนเนอเรลลา ฟอร์ซัยเซีย พอร์ไฟโรโมนเนส

จินจิवालิส และทรีโพนิมา เต็นติโคลา สูงกว่าผู้ไม่สูบบุหรี่ และพบเชื้อเหล่านี้ในร่องลึกปริทันต์ที่มีความลึกน้อยกว่าหรือเท่ากับ 4 มิลลิเมตรซึ่งไม่พบลักษณะเช่นนี้ในผู้ไม่สูบบุหรี่

การศึกษาของ Zambon และคณะ (1996) Umeda และคณะ (1998) และ Haffajee และ Socransky (2001) ทำการศึกษาในกลุ่มตัวอย่างขนาดใหญ่ ผลการศึกษาที่ได้จึงสามารถนำมาปรับใช้กับประชากรทั่วไปได้ จึงเป็นไปได้ว่าผู้ที่สูบบุหรี่มีเชื้อก่อโรคปริทันต์ที่สำคัญ ได้แก่ พอร์ไฟโรโมแนส จินจิवालิส ทรีโพนิมา เต็นติโคลา และ แทนเนอเรลลา ฟอร์ซัยเซีย มากกว่าผู้ไม่สูบบุหรี่ ซึ่งอาจเกิดจากการสูบบุหรี่ปรับเปลี่ยนสภาพแวดล้อมในร่องลึกปริทันต์ให้เหมาะสมต่อการตั้งถิ่นฐานของเชื้อก่อโรคปริทันต์ หรือทำให้ง่ายต่อการเกิดโรคในตำแหน่งใหม่

2. การสูบบุหรี่ลดประสิทธิภาพการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย

การสูบบุหรี่มีผลต่อเซลล์ต่างๆ ในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายและเกิดความเปลี่ยนแปลงในการทำงานของภูมิคุ้มกันของร่างกายทั้งภูมิคุ้มกันสืบทอดและภูมิคุ้มกันได้มาหลังเกิด (Palmer และคณะ, 2005) โดยการสูบบุหรี่ทำให้การทำหน้าที่การจับกินเชื้อโรคและดึงดูดเซลล์ (chemotaxis) ในระบบภูมิคุ้มกันของนิวโทรฟิลบกพร่อง (Guntsch และคณะ, 2006)

สารนิโคตินในบุหรี่กระตุ้นให้นิวโทรฟิลสร้างอินเตอร์ลิวคิน-8 เพิ่มขึ้นในกระแสเลือดอย่างมาก ทำให้การเคลื่อนที่ของเม็ดเลือดขาวเป็นไปอย่างไร้ทิศทาง (non specific movement) และรวมกลุ่มอยู่ในกระแสเลือดจนทำให้เกิดภาวะนิวโทรฟิลเกิน (neutrophilia) ลิมโฟไซต์เกิน (lymphocytosis) และโมโนไซต์เกิน (monocytosis) แต่ในบริเวณที่มีการติดเชื้อกลับไม่มีเม็ดเลือดขาวที่จะไปทำลายเชื้อโรค (Iho และคณะ, 2003)

นิโคตินกระตุ้นให้นิวโทรฟิลจากกลุ่มตัวอย่างที่ไม่เป็นโรคปริทันต์สร้างโมเลกุลออกซิเจนอิสระ (O_2^-) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) มากเกิน ทำให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อ (Iho และคณะ, 2003) แต่ในทางตรงข้าม นิโคตินกลับลดการนำใช้ออกซิเจน (oxygen uptake) ทำให้ลดการสร้างซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในนิวโทรฟิลและโมโนไซต์ของผู้ป่วยโรคปริทันต์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์เป็นเหตุให้ประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อของนิวโทรฟิลและโมโนไซต์ลดลง (Pabst และคณะ, 1995)

ในผู้ป่วยโรคปริทันต์ ผู้ที่สูบบุหรี่จะมีจำนวนเม็ดเลือดขาว นิวโทรฟิล และลิมโฟไซต์ ในกระแสเลือดสูงกว่าผู้ไม่สูบบุหรี่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่จำนวนบี ลิมโฟไซต์ไม่แตกต่างกัน เนื่องจากมีการสร้างที ลิมโฟไซต์เพิ่มมากขึ้น แต่จำนวนที ลิมโฟไซต์ในเนื้อเยื่อปริทันต์ลดลง เนื่องจากที ลิมโฟไซต์ที่สร้างขึ้นไม่สามารถออกจากหลอดเลือดได้ เพราะหลอดเลือดเสื่อมสภาพและเซลล์ขาดความสามารถแทรกตัวออกจากหลอดเลือด (diapedesis) การมีที ลิมโฟไซต์ในกระแสเลือดสูงทำให้มีสารสื่ออักเสบเพิ่มมากขึ้นซึ่งส่งเสริมการทำลายเนื้อเยื่อปริทันต์ (Loos และคณะ,

2004) นอกจากนี้ ที ลิมโฟไซต์ที่เพิ่มมากขึ้นนั้นไม่สามารถสร้างไซโตไคน์ที่กระตุ้นให้บีเซลล์พัฒนาไปเป็นพลาสมาเซลล์ (Johnson และ Guthmiller, 2007) เป็นเหตุให้การสร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อเชื้อโรคลดลง (Apatzidou และคณะ, 2005)

3. การสูบบุหรี่ เร่งการตอบสนองของขบวนการอักเสบโดยกระตุ้นให้มีการสร้างไซโตไคน์ก่อการอักเสบเพิ่มขึ้น

Giannopoulou, Kamma และ Mombelli (2003) ศึกษาระดับไซโตไคน์ในน้ำเหลืองเหงือกในผู้ป่วยโรคปริทันต์รุนแรง (aggressive periodontitis) จำนวน 20 คน โรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังจำนวน 20 คน โรคเหงือกอักเสบจำนวน 20 คน และผู้ไม่เป็นโรคปริทันต์ 20 คน พบว่าในผู้ป่วยโรคปริทันต์จะมีระดับอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า อินเตอร์ลิวคิน-6 และอินเตอร์ลิวคิน-8 สูง ในขณะที่ระดับอินเตอร์ลิวคิน-4 ต่ำ เมื่อเทียบกับผู้ไม่เป็นโรคปริทันต์ และ ผู้สูบบุหรี่มีระดับอินเตอร์ลิวคิน-6 และ-8 สูงกว่าผู้ไม่สูบบุหรี่ 1.28 และ 9.21 เท่า ตามลำดับ ส่วนระดับอินเตอร์ลิวคิน-4 ในผู้สูบบุหรี่จะต่ำกว่าผู้ไม่สูบบุหรี่ 1.89 เท่า

Bostrom, Linder และ Bergstrom (1999) ศึกษาระดับอินเตอร์ลิวคิน-6 และทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์-อัลฟาในน้ำเหลืองเหงือกของผู้ที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังจำนวน 108 คน ในจำนวนนี้เป็นผู้ไม่สูบบุหรี่จำนวน 35 คน และเป็นผู้สูบบุหรี่ 73 คน พบว่าผู้สูบบุหรี่มีระดับทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์-อัลฟาสูงกว่าผู้ไม่สูบบุหรี่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

Giannopoulou, Cappuyns และ Mombelli (2003) ศึกษาผลของการสูบบุหรี่ต่อระดับไซโตไคน์ในน้ำเหลืองเหงือกของผู้ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เป็นโรคเหงือกอักเสบ ในผู้สูบบุหรี่ 10 คน และผู้ไม่สูบบุหรี่ 12 คน พบว่าในภาวะเหงือกปกติระดับอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า ของผู้สูบบุหรี่ใกล้เคียงกับผู้ไม่สูบบุหรี่ และมีระดับสูงขึ้น 2.5 เท่าเมื่อเป็นโรคเหงือกอักเสบ ระดับอินเตอร์ลิวคิน-4 จะแปรผกผันกับการสูบบุหรี่และการเป็นโรคเหงือกอักเสบ โดยในภาวะเหงือกปกติระดับอินเตอร์ลิวคิน-4 ของผู้ไม่สูบบุหรี่สูงกว่าผู้สูบบุหรี่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีระดับลดลงเมื่อเป็นโรคเหงือกอักเสบ ส่วนระดับอินเตอร์ลิวคิน-8 ของผู้สูบบุหรี่พบว่าสูงกว่าผู้ไม่สูบบุหรี่ทั้งในภาวะเหงือกปกติและภาวะเหงือกอักเสบ

การศึกษาดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นว่าผู้สูบบุหรี่มีระดับไซโตไคน์ก่อการอักเสบสูงกว่าผู้ไม่สูบบุหรี่ซึ่งเป็นสาเหตุให้มีการทำลายเนื้อเยื่อปริทันต์

4. การสูบบุหรี่ส่งผลด้านลบต่อเนื้อเยื่อปริทันต์

การสูบบุหรี่มีผลต่อระบบการไหลเวียนเลือดในอวัยวะปริทันต์ สารนิโคตินในบุหรี่มีฤทธิ์ในการบีบหลอดเลือด (vasoconstrictor) จึงทำให้เลือดมาเลี้ยงเหงือกของผู้สูบบุหรี่ลดลง (Bergstrom และ Preber, 1986; Clarke, Shephard และ Hirsch, 1981) นิโคตินมีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวน

(proliferation) และการเคลื่อนย้ายตำแหน่ง (migration) ของเซลล์บุผิวหลอดเลือด (endothelial cells) ซึ่งมีความจำเป็นในการสร้างหลอดเลือดใหม่ในการหายของแผล (Kuhlmann และคณะ, 2005) นิโคตินมีความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใยจากเอ็นยึดปริทันต์ (periodontal ligament) โดยยับยั้งการเพิ่มจำนวน และการสังเคราะห์คอลลาเจนของเซลล์สร้างเส้นใย (Chang และคณะ, 2002) นิโคตินยังมีผลทำให้นิวเคลียสของเซลล์เยื่อหุ้มฟันในช่องปากหดตัว เหนียวนำไปให้มีการบาดเจ็บ เกิดการแยกตัวของเซลล์ในชั้นสไปนัส (acantholysis) และมีการสร้างไซโตไคน์และสารสื่ออักเสบเพิ่มขึ้น (Johnson และ Organ, 1997)

นอกจากนี้ยังพบว่าผู้สูบบุหรี่มีระดับ อัลฟา-1-แอนติทริปซิน (α -1-antitrypsin) และ อัลฟา-2-แมกโครโกลบูลิน (α -2-macroglobulin) ซึ่งเป็นโปรตีนในพลาสมาที่มีหน้าที่ยับยั้งการทำงานของโปรตีเอส (protease inhibitor) ลดลง ส่งผลให้มีการทำงานของเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนเพิ่มขึ้นเป็นเหตุให้มีการทำลายเนื้อเยื่อปริทันต์ได้ง่าย (Persson และคณะ, 2001)

จากรายงานการศึกษาข้างต้นแสดงให้เห็นผลด้านลบของการสูบบุหรี่ที่มีผลต่อพยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์ ไม่ว่าจะเป็นผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์ ผลต่อการปรับเปลี่ยนภูมิคุ้มกันของร่างกายทั้งภูมิคุ้มกันสืบทอดและภูมิคุ้มกันได้มาหลังเกิด รวมทั้งมีผลเฉพาะที่ต่อเนื้อเยื่อปริทันต์ (Hilgers และ Kinane, 2004) Bissell และคณะ (2004) ได้อภิปรายไว้ว่าการสูบบุหรี่อาจมีผลกระทบต่อการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ซึ่งเป็นเปปไทด์ต้านจุลชีพในระบบภูมิคุ้มกันสืบทอด ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Wallace และคณะ (2006) ที่พบว่าเซลล์เยื่อหุ้มฟันทางเดินหายใจของผู้ป่วยโรคถุงลมโป่งพอง (chronic obstructive pulmonary disease) มีการสร้างสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ลดลงจึงทำให้ง่ายต่อการติดเชื้อระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง และลดประสิทธิภาพการทำงานของปอด

การศึกษานี้เป็นการศึกษาผลของการสูบบุหรี่ต่อการแสดงออกของเบต้าดีเฟนซิน-2 ซึ่งเป็นสารที่สร้างมาจากเซลล์เยื่อหุ้มฟัน มีหน้าที่ทำลายเชื้อโรคโดยตรงและเชื่อมโยงการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันสืบทอดและภูมิคุ้มกันได้มาหลังเกิด โดยใช้วิธีการทางอิมมูโนฮิสโตเคมีในการตรวจหาการแสดงออกของเปปไทด์สารเบต้าดีเฟนซิน-2 ในเนื้อเยื่อเหงือกปกติ และเหงือกที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังในผู้ที่สูบบุหรี่และไม่สูบบุหรี่ เป็นครั้งแรกซึ่งยังไม่เคยมีใครทำการศึกษารื่องนี้มาก่อน โดยมุ่งหวังให้เกิดความเข้าใจและสามารถอธิบายถึงพยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์อักเสบในผู้ป่วยที่สูบบุหรี่ได้มากยิ่งขึ้น

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ประชากรที่ศึกษา

กลุ่มทดลองได้แก่ กลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์และกลุ่มผู้สูบบุหรี่

กลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์ ได้แก่ ผู้ที่มีฟันซึ่งมีการสูญเสียการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์มากกว่าหรือเท่ากับ 5 มิลลิเมตร หรือมีร่องลึกปริทันต์ มากกว่าหรือเท่ากับ 6 มิลลิเมตร หรือจากภาพรังสีพบว่ามีการทำลายของกระดูกรอบรากฟันไปมากกว่าร้อยละ 50 มีเลือดออกหลังจากใช้เครื่องมือวัดความลึกร่องปริทันต์สอดเข้าไปในร่องเหงือก ในการเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อเหงือกในการศึกษานี้ ได้จากฟันที่จำเป็นต้องถอนเนื่องจากสาเหตุโรคปริทันต์อักเสบและมีการพยากรณ์โรคเป็นแบบสิ้นหวัง กล่าวคือมีระดับการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์เหลืออยู่น้อยมากจนไม่สามารถใช้งานในการบดเคี้ยวได้ตามปกติหรือก่อให้เกิดความเจ็บปวดในช่องปาก

กลุ่มผู้สูบบุหรี่ ได้แก่ ผู้ที่สูบบุหรี่ในขณะที่ดำเนินการวิจัยและมีปริมาณการสูบบุหรี่ไม่น้อยกว่า 10 มวนต่อวันทุกวัน

กลุ่มควบคุมได้แก่ กลุ่มผู้ที่ไม่เป็นโรคปริทันต์และกลุ่มผู้ไม่สูบบุหรี่

กลุ่มผู้ไม่เป็โรคปริทันต์ ได้แก่ ผู้ที่มีฟันซึ่งไม่มีการสูญเสียการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์ และมีร่องลึกปริทันต์ น้อยกว่าหรือเท่ากับ 3 มิลลิเมตร ไม่มีเลือดออกหลังจากใช้เครื่องมือวัดความลึกร่องปริทันต์สอดเข้าไปในร่องเหงือก และไม่มีลักษณะอักเสบแดง การเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อเหงือกได้จากการตัดชิ้นเหงือกก่อนทำการถอนฟันกรามซี่สุดท้ายหรือจากฟันที่ถอน โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อการจัดฟัน หรือจากฟันปกติที่รับการผ่าตัดเพื่อเพิ่มความยาวของตัวฟัน

กลุ่มผู้ไม่สูบบุหรี่ ได้แก่ ผู้ที่ไม่สูบบุหรี่ขณะดำเนินการวิจัยและไม่มีประวัติการสูบบุหรี่

กลุ่มตัวอย่างได้จากผู้ที่มารับการรักษาโรคปริทันต์อักเสบและผู้ที่ไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ ที่มารับการทำศัลยกรรมปริทันต์ที่คลินิกบัณฑิตปริทันต์และผู้ที่มารับการถอนฟันที่คลินิก ศัลยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทั้งหมดที่เข้าเกณฑ์ในการเข้าร่วมการวิจัยในช่วงเวลาที่ทำการวิจัย

การศึกษานี้ได้ผ่านความเห็นชอบของคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมงานวิจัยของคณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเมื่อ 15 สิงหาคม 2549 เป็นที่เรียบร้อยแล้ว

เกณฑ์ในการคัดเลือกผู้เข้าร่วมในการวิจัย

1. มีอายุตั้งแต่ 20 ปี ขึ้นไป ทั้งเพศชายและหญิง
2. ไม่เป็นโรคปริทันต์รุนแรง (aggressive periodontitis) โดยดูจากไม่มีการสูญเสียระดับการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์ มากกว่าหรือเท่ากับ 5 มิลลิเมตร เฉพาะตำแหน่งฟันกรามซี่ที่ 1 (first molars) หรือฟันคู่หน้า (incisors)
3. ไม่ได้รับการบำบัดทางปริทันต์ในช่วงเวลา 1 ปีก่อนเข้าร่วมงานวิจัย
4. ไม่มีโรคหรือภาวะทางระบบที่อาจส่งผลกระทบต่อสภาวะโรคปริทันต์ เช่น โรคเบาหวาน ภาวะตั้งครภ์ โรคกระดูกพรุน หรือรับประทานยาที่มีผลต่อเหงือก เช่น ฟีนิตอีน (phenytoin) แคลเซียมแชนแนลบล็อกเกอร์ (calcium channel blocker) ไซโคลสปอริน เอ (cyclosporin A) หรือ ยาคุมกำเนิดชนิดรับประทาน (oral contraceptive)
5. ไม่มีความเสี่ยงต่อการเกิดการติดเชื้อภายหลังการทำศัลยกรรมในช่องปากที่จำเป็นต้องได้รับยาปฏิชีวนะ เพื่อป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรียที่เยื่อหุ้มหัวใจ (bacterial endocarditis) หรือกำลังรับการฟอกไต
6. ไม่ได้รับยาปฏิชีวนะหรือยาลดอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (nonsteroidal anti-inflammatory drugs) ภายในระยะเวลา 3 เดือนก่อนเข้าร่วมงานวิจัย
7. ยินยอมเข้าร่วมการวิจัยโดยมีการเซ็นเอกสารยินยอมเข้าร่วมการวิจัย (consent form) หลังจากได้อ่านข้อมูลรายละเอียดเกี่ยวกับการทำวิจัยที่ใช้ประกอบการพิจารณาเข้าร่วมโครงการจนเป็นที่เข้าใจแล้ว

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

วัสดุอุปกรณ์

1. เพตริดิช (petridish)
2. กระจกน้ำแข็ง
3. กระจกโลหะใส่ในโตรเจนเหลว
4. Flask ใส่ในโตรเจนเหลว
5. ถาดหลุมพลาสติกสำหรับแช่แข็งชิ้นเนื้อ (disposable base mold; Electron Microscopy Sciences, Washington, USA)
6. ตู้เก็บความเย็นที่อุณหภูมิ-80 องศาเซลเซียส (Forma-86c ULT Freezed, Thermo Electron, USA)
7. คีมคีบ (cotton plier)
8. cryostat (CM3000, Leica Instrument GmbH, Germany)

9. รางอลูมิเนียมสำหรับวางสไลด์
10. ปากกาหมึกกันน้ำ (hydrophobic pen; DAKO, Denmark)
11. Coplin jar or staining dish with slide rack
12. Staining chamber
13. กล้องจุลทรรศน์แสงขาว (light microscope with contrast condenser; Olympus BX 50 System Microscope, Olympus optical Co.Ltd., Japan)
14. กล้องถ่ายภาพดิจิทัล Camedia C5060 wide zoom (Olympus Japan)
15. Poly-L-Lysine coated slide (Menzel GmbH & CO KG, Germany)
16. Glass cover slips 22 x 40 mm. (ESCO, USA)
17. Slide box 25 compact (Electron microscopy Sciences, USA)
18. Slide box 100 compact (เอเอสไซน์, ประเทศไทย)
19. อุปกรณ์เบ็ดเตล็ดได้แก่ กระดาษอลูมิเนียม ฟุ้งกันเบอร์ 1 2 3 และเทปพันสายไฟ

น้ำยาและสารเคมี

น้ำยาและสารเคมีทั่วไป

- Acetone reagent grade (BDHL Laboratories Supplies, England)
- Mayer's hematoxylin solution (Sigma-Aldrich, USA)
- Mounting media (Sigma-Aldrich, USA)

น้ำยาและสารเคมีที่ใช้ในการตรวจทางอิมมูโนฮิสโตเคมี

- Tissue Tek OCT compound (Electron microscopy Sciences, USA)
- แอนติบอดีปฐมภูมิ Goat anti HBD-2 purified polyclonal antibody catalog no.sc-10854 (Santa Cruz Biotechnology Inc, USA.)
- แอนติบอดีทุติยภูมิและชุดย้อมสี Goat ImmunoCruz Staining System: sc-2053 (Santa Cruz Biotechnology Inc, USA.)
- Disodium hydrogen phosphate anhydrous (Na_2HPO_4) (Ajax Finechem, Australia)
- Sodium dihydrogen phosphate monohydrate (NaH_2PO_4) (Ajax Finechem, Australia)
- 100% Xylene (Merck, Germany)
- Absolute Ethanol (Merck, Germany)
- Liquid nitrogen

วิธีการศึกษา

การเก็บข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่าง

การเก็บข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่างเกี่ยวกับ อายุ เพศ โรคประจำตัวและยาประจำได้จากเวชระเบียน และข้อมูลการสูบบุหรี่ได้จากการสัมภาษณ์ตามรายการข้อคำถามในแบบสอบถามการสูบบุหรี่ ซึ่งจะมีข้อคำถามในเรื่องอายุ เพศ โรคประจำตัว ยาประจำ ปริมาณการสูบ และจำนวนปีในการสูบบุหรี่ (รายละเอียดในภาคผนวก)

การเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อเหงือก

ทำการเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อเหงือกเพื่อตรวจหาการแสดงออกของเปปไทด์เบต้าดีเฟนซิน-2 โดยมี กลุ่มทดลองคือ ชิ้นเหงือกจากผู้สูบบุหรี่ และกลุ่มควบคุมคือ ชิ้นเหงือกจากผู้ไม่สูบบุหรี่ โดยจะเปรียบเทียบการแสดงออกของเปปไทด์เบต้าดีเฟนซิน-2 ทั้งในชิ้นเหงือกที่เป็นโรคมะเร็งอวัยวะอื่น อวัยวะอื่นและชิ้นเหงือกปกติ โดยแบ่งกลุ่มตัวอย่างเป็น 4 กลุ่มดังนี้

| | | |
|---|----|-----|
| ชิ้นเหงือกปกติจากผู้ไม่สูบบุหรี่ | 10 | ราย |
| ชิ้นเหงือกปกติจากผู้สูบบุหรี่ | 10 | ราย |
| ชิ้นเหงือกจากฟันที่เป็น โรคมะเร็งอวัยวะอื่นจากผู้ไม่สูบบุหรี่ | 10 | ราย |
| ชิ้นเหงือกจากฟันที่เป็น โรคมะเร็งอวัยวะอื่นจากผู้สูบบุหรี่ | 10 | ราย |

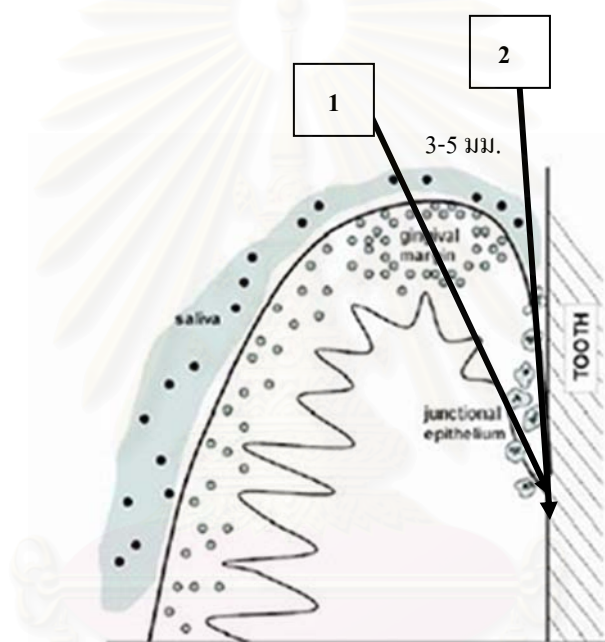
กลุ่มชิ้นเนื้อเหงือกปกติ ในการศึกษาส่วนใหญ่ได้จากการถอนฟันกรามซี่สุดท้าย และจากฟันที่ทำการผ่าตัดเพื่อเพิ่มความยาวของตัวฟัน ชิ้นเหงือกจากฟันที่เป็น โรคมะเร็งอวัยวะอื่นได้จากการถอนฟันที่เป็น โรคมะเร็งอวัยวะอื่นซี่สุดท้ายและมีการพยากรณ์โรคเป็นแบบสิ้นหวัง ดังตัวอย่างภาพทางคลินิกและภาพถ่ายรังสีของฟันซี่ #17 ซึ่งมีร่องลึกปริทันต์ 12 มิลลิเมตรและพบการทำลายของกระดูกรอบรากฟันมากกว่าร้อยละ 50 (ภาพที่ 2)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 2 แสดงตัวอย่างภาพทางคลินิกและภาพถ่ายรังสีของฟันที่เป็นโรคปริทันต์ที่ใช้ในการศึกษา

การเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อเหงือกทำโดย ฉีดยาชาเฉพาะที่ (Scandonest 2% special, Septodent, France) และทำการตัดแบบอินเวิร์ส (inverse bevel incision) บริเวณเหงือกด้านใกล้แก้ม (buccal) หรือด้านเพดาน (palatal) หรือด้านลิ้น (lingual) หรือด้านข้าง (proximal) ของฟันที่จะทำการเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อเหงือก ห่างจากขอบเหงือก 3-5 มิลลิเมตร โดยใช้ใบมีดเบอร์ 15 (blade no.15) กรีดลงไปให้ปลายใบมีดจรดก้นร่องเหงือก หรือ ก้นร่องลึกริทันต์ หลังจากนั้นทำการตัดในร่องเหงือก (sulcular incision) เพื่อให้สามารถแยกชิ้นเนื้อเหงือกออกจากตำแหน่งเดิมได้ ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 แสดงการตัดแบบอินเวิร์สเพื่อทำการเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อเหงือก

หลังจากตัดชิ้นเนื้อเหงือกออกมาจากช่องปากแล้ว ใช้คีม (cotton plier) คีบชิ้นเนื้อออกมาวางบนผ้ากอซชุบสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (phosphate buffer saline; PBS) ที่เตรียมไว้ใน เพตริดิช จากนั้นปิดชิ้นเนื้อด้วยผ้ากอซชุบสารละลาย PBS อีกชั้นหนึ่ง ดังแสดงในภาพที่ 4 ปิดฝาเพตริดิช พันด้วยเทปพาราฟฟิน (paraffin tape) เขียนชื่อ - นามสกุล เลขประจำตัวผู้ป่วย ซึ่ฟัน ตำแหน่งชิ้นเนื้อ และวันที่เก็บชิ้นเนื้อลงบนฝาเพตริดิช จากนั้นนำไปเข้าสู่เย็นหรือใส่กระติกน้ำแข็งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสก่อนนำชิ้นเนื้อไปแช่แข็ง ซึ่งควรทำให้เร็วที่สุด หรือภายใน 24 ชั่วโมงหลังจากตัดออกจากช่องปาก ตรวจสอบบริเวณที่ทำการตัดว่าสามารถห้ามเลือดให้หยุดเรียบร้อยก่อนทำหัตถการอื่นต่อ เช่น ถอนฟัน เป็นต้น ดังแสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 4 แสดงการเก็บรักษาชิ้นเนื้อบนผ้ากอซชุบสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลินใน เพตริดิช ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปแช่แข็ง



ภาพที่ 5 แสดงรอยตัดชิ้นเนื้อเหงือกในช่องปาก

การแช่แข็งชิ้นเนื้อตัวอย่าง (Freeze the tissue samples)

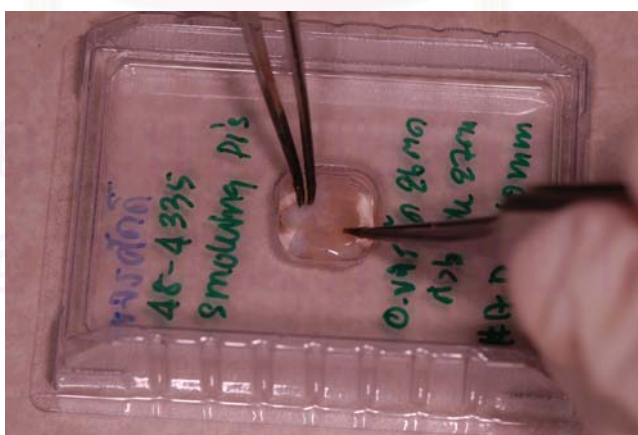
นำถาดหลุมพลาสติก (disposable base mold) ที่มีหลุมหน้าตัดสี่เหลี่ยมขนาด 7 x 7 x 5 มิลลิเมตร มาเขียนชื่อ- นามสกุล เลขประจำตัวผู้ป่วย ชีพพื้นและตำแหน่งชิ้นเนื้อ วันที่เก็บชิ้นเนื้อ จากนั้นตัดชิ้นเนื้อเหงือกที่มีขนาดพอเหมาะที่จะวางลงในหลุมของถาดพลาสติกได้

ในการวางชิ้นเนื้อในถาดหลุมพลาสติกต้องจัดตำแหน่งของชิ้นเนื้อให้อยู่กึ่งกลางหลุม โดยวางหน้าตัดของชิ้นเนื้อให้ส่วนที่เป็นด้านเยื่อบุผิวร่องเหงือก และด้านเยื่อบุผิวช่องปาก อยู่ในระนาบเดียวกัน เพื่อที่เมื่อตัดชิ้นเนื้อแล้วจะสามารถเห็นเซลล์เยื่อบุผิวเรียงตัวในแนวนอนไม่เป็นภาพตัดขวาง และเมื่อวางชิ้นเนื้อลงไปหลุมแล้ว ต้องไม่มีส่วนของเนื้อเยื่อสูงเกินปากหลุม

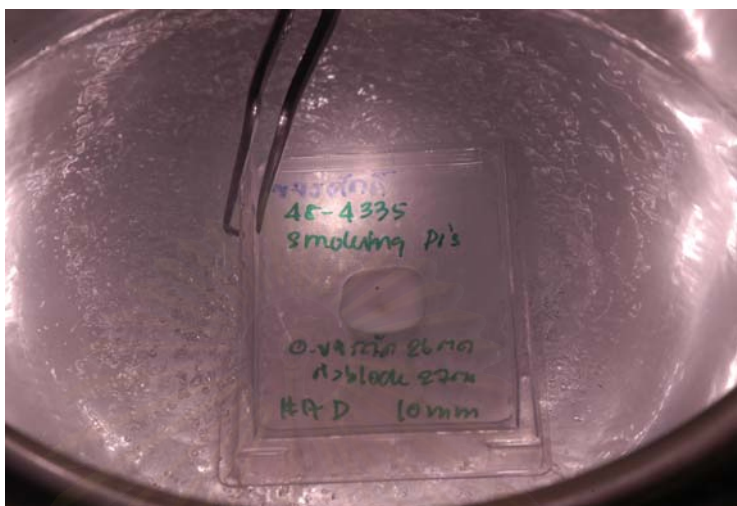
ใส่สารประกอบไอซีที (oxacalcitrone;OCT) ลงไปในหลุมพลาสติกจนเต็ม ระวังไม่ให้มีฟองอากาศ

ใช้เข็มจับชิ้นเหงือกที่ตัดแต่งเรียบร้อยแล้ว จับเม็ดเลือดที่ตกค้างด้วยผ้ากอซแห้ง จากนั้นนำชิ้นเหงือกจมลงในสารประกอบไอซีทีในลักษณะเดิมกับที่ได้ทดลองจัดตำแหน่งไว้ ให้ชิ้นเนื้อทั้งหมดจมอยู่ในสารประกอบไอซีทีและชิ้นเนื้อตั้งตรงบริเวณกึ่งกลางหลุม (ภาพที่ 6)

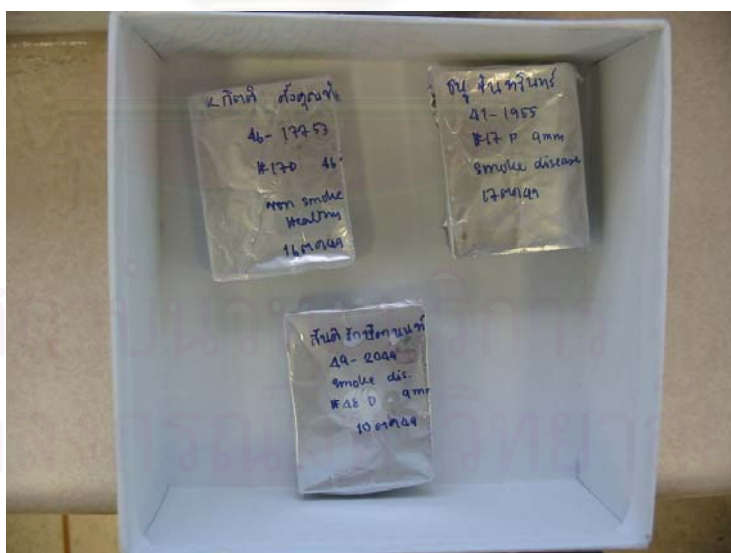
นำถาดหลุมพลาสติกที่มีชิ้นเนื้อในสารละลายไอซีทีแช่ลงในไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) รอจนสารประกอบไอซีทีแข็งตัวทั้งหมด (ภาพที่ 7) ห่อด้วยกระดาษอลูมิเนียม (aluminum foils) ที่เขียนชื่อ-นามสกุล เลขประจำตัวผู้ป่วย ชีพพื้นและตำแหน่งชิ้นเนื้อ วันที่เก็บชิ้นเนื้อ นำไปเก็บในกล่องกระดาษก่อนนำไปแช่แข็งในตู้เย็นที่อุณหภูมิ-80 องศาเซลเซียส ทันทีจนกว่าจะนำออกตัด (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 6 แสดงการจุ่มชิ้นเนื้อที่จะทำการแช่แข็งลงในสารประกอบไอซีทีในถาดหลุมพลาสติก



ภาพที่ 7 แสดงการแช่กรดหลุมพลาสติกที่มีชิ้นเหงือกในสารประกอบไอซีทีลงในไนโตรเจนเหลว



ภาพที่ 8 แสดงการห่อกรดหลุมพลาสติกด้วยกระดาษอลูมิเนียม ใส่กล่องกระดาษก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

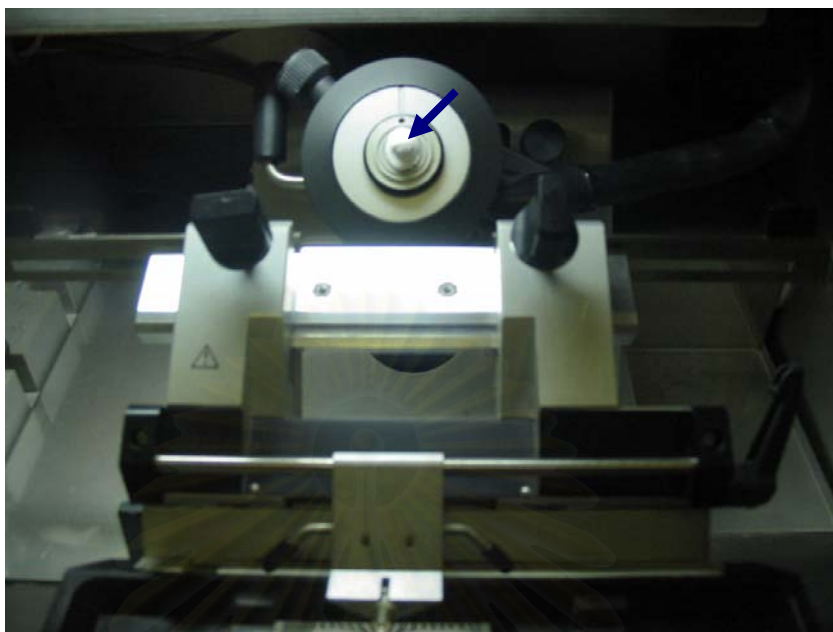
การตัดชิ้นเนื้อ (cryosection of the tissue)

ทำการตัดชิ้นเนื้อเหวี่ยงด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อ cryostat (ภาพที่ 9) โดยยัดชิ้นเนื้อบนแท่นตัด อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 10) ให้ชิ้นเนื้อที่ตัด (section) มีความหนา 4 ไมโครเมตร วางบน สไลด์ (Poly-L-lysine coated slide) ที่เขียนชื่อ สกุล และประเภทของกลุ่มศึกษา บริเวณส่วนฝ้าของ สไลด์ โดยในสไลด์แผ่นหนึ่งจะวางชิ้นเนื้อที่ตัดแล้ว 2 ชิ้น ห่างกันประมาณ 1 เซนติเมตร โดยกลุ่ม ตัวอย่าง 1 คนจะทำการตัดเนื้อเยื่อจำนวน 4 สไลด์ เพื่อใช้ย้อมด้วยแอนติบอดีปฐมภูมิ 1 สไลด์ ย้อม ด้วยสารละลายควบคุมผลลบ (negative control solution) 1 สไลด์ (ภาพที่ 11) และสำรองไว้อีก 2 สไลด์ในกรณีที่การย้อม 2 สไลด์แรกข้างต้นไม่ประสบความสำเร็จ เช่น มีชิ้นเนื้อหลุด เป็นต้น

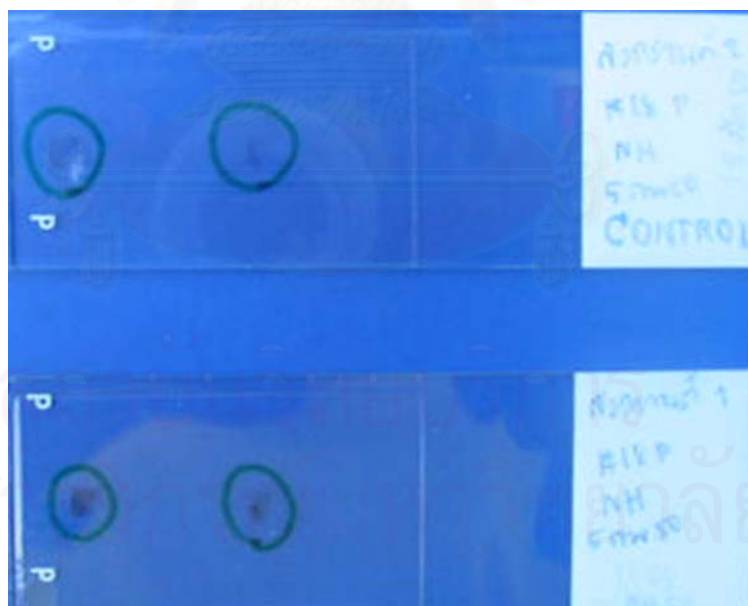
นำแผ่นสไลด์ที่ได้เรียงบนรางอลูมิเนียม และใช้พัดลมเป่า 1 ชั่วโมง จากนั้นเก็บลงในกล่อง ใส่สไลด์สำหรับแช่แข็ง พันด้วยเทปพันสายไฟ เก็บไว้ในตู้เย็นที่ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมา ย้อมทางอิมมูโนฮิสโตเคมี



ภาพที่ 9 แสดงเครื่องตัดชิ้นเนื้อ cryostat



ภาพที่ 10 แสดงการยัดติดชิ้นเนื้อบนแท่นตัดที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 11 แสดงการวางชิ้นเนื้อที่ตัดแล้วบนแผ่นสไลด์

การย้อมชิ้นเนื้อทางอิมมูโนฮิสโตเคมี

น้ำยาและสารเคมีที่ใช้

การศึกษานี้ใช้ purified goat polyclonal antibody เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิ โดยมี normal goat IgG เป็นสารละลายควบคุมผลลบ (ภาพที่ 12) และใช้ชุดย้อม Goat ImmunoCruz Staining System ซึ่งประกอบด้วย peroxidase block และ serum block (donkey serum) โดยมี biotinylated donkey anti-goat antibody เป็นแอนติบอดีทุติยภูมิและใช้ Horseradish Peroxidase (HRP)-Streptavidin เป็นสารที่จะทำให้เกิดปฏิกิริยาอิมมูโนเปอร์ออกซิเดส (immunoperoxidase) (ภาพที่ 13) ร่วมกับชุด HRP substrate ซึ่งประกอบด้วย substrate buffer, DAB chromogen และ peroxidase substrate (ภาพที่ 14) ทำให้เห็นสีน้ำตาลของเซลล์ที่มีการแสดงออกซึ่งสารเบต้า ดีเฟนซิน-2



ภาพที่ 12 แสดงน้ำยาควบคุมผลลบ (1) และแอนติบอดีปฐมภูมิ (2)



ภ

ภาพที่ 13 แสดงแอนติบอดีทุติยภูมิ(1) และสารที่จะทำให้เกิดปฏิกิริยาอิมมูโนเปอร์ออกซิเดส



ภาพที่ 14 แสดงน้ำยาและสารเคมีที่ทำให้เกิดสี (HRP substrate)

การหาความเข้มข้นและสภาพการย้อมที่เหมาะสม

ทำการย้อมตามคู่มือการย้อม โดยได้ทดลองทำการเจือจาง (titrate) แอนติบอดีปฐุมภูมิในอัตราส่วนที่แตกต่างกันรวมทั้งจัดสภาพการย้อมที่ต่างกันสองแบบ ดังตารางที่ 1 พบว่าอัตราส่วนการเจือจางแอนติบอดีปฐุมภูมิตั้งต้น (stock solution) ที่เหมาะสมคือ 1:25 และสภาพการย้อมที่เหมาะสม คือการบ่ม (incubate) แอนติบอดีปฐุมภูมิกับชิ้นเนื้อเหงือกที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน (overnight)

ตารางที่ 1 แสดงการทดลองหาความเข้มข้นของแอนติบอดีปฐุมภูมิและสภาพการย้อมที่เหมาะสมของการย้อมเยื่อบุผิวเหงือก

| ครั้งที่ (วันที่) | อัตราส่วนการเจือจาง แอนติบอดีปฐุมภูมิ | ความเข้มข้นของ แอนติบอดีปฐุมภูมิ ($\mu\text{g/ml}$) | สภาพการย้อม | ผลการย้อม |
|----------------------|--|---|---------------------------|--------------------------------------|
| 1 (23/6/49) | 1:100 | 2 $\mu\text{g/ml}$ | อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง | เซลล์เยื่อบุผิวไม่ ติดสีน้ำตาล |
| 2 (30/6/49) | 1:50 | 4 $\mu\text{g/ml}$ | อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง | เซลล์เยื่อบุผิวไม่ ติดสีน้ำตาล |
| 3 (7/7/49) | 1:25 | 8 $\mu\text{g/ml}$ | อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง | เซลล์เยื่อบุผิวติด สีน้ำตาลไม่ชัด |
| 4 (10/8/49) | 1:25 | 8 $\mu\text{g/ml}$ | 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน | เซลล์เยื่อบุผิวติด สีน้ำตาลชัดเจน |
| 5 (7/9/49) | 1:25 | 8 $\mu\text{g/ml}$ | 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน | เซลล์เยื่อบุผิวติด สีน้ำตาลชัดเจน |

การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีปฐมภูมิ แอนติบอดีทุติยภูมิและชุดย้อมที่ทำให้เกิดสี

ได้มีการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีปฐมภูมิ แอนติบอดีทุติยภูมิ และชุดย้อมที่ทำให้เกิดสีต่อสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ก่อนนำไปทำการย้อมชิ้นเนื้อของกลุ่มตัวอย่าง โดยการใช้เซลล์สร้างเส้นใยซึ่งทราบว่าจะไม่แสดงออกซึ่งสารเบต้าดีเฟนซิน-2 (Dunsche และคณะ, 2001) เป็นตัวควบคุมผลลบ (negative control) และเซลล์เยื่อบุผิวหลอดลมที่ได้รับการกระตุ้นด้วยอินเตอร์ลิวคิน-17 ซึ่งทราบว่าจะมีการแสดงออกซึ่งสารเบต้าดีเฟนซิน-2 (Kao และคณะ, 2004) เป็นตัวควบคุมผลบวก (positive control) โดยมีวิธีการดังนี้

1. ทำการเลี้ยงเซลล์บน glass cover slip โดย

1.1 เก็บ glass cover slip ด้วยเจลาติน (gelatin) โดย

1.1.1 จุ่ม glass cover slip ในสารละลายเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์

1.1.2 ผ่าน glass cover slip บนเปลวไฟ (flame) เพื่อฆ่าเชื้อ

1.1.3 วาง glass cover slip ในข้อ 1.1.2 ลงในหลุมเพาะเชื้อ (well culture plate)

1.1.4 เทสารละลายเจลาตินความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน ลงบน glass cover slip ที่อยู่ในหลุมเพาะเชื้อ

1.1.5 เทสารละลายเจลาตินส่วนเกินออกจากหลุมเพาะเชื้อ

1.1.6 วาง glass cover slip ทิ้งเป็นเวลา 2 ชั่วโมงในตู้เลี้ยงเชื้อ (culture hood) ก่อนนำไปเลี้ยงเซลล์

1.2 นำเซลล์ที่ต้องการเลี้ยงบน glass cover slip มานับจำนวนเซลล์ด้วยเครื่องนับเซลล์และคำนวณหาความเข้มข้นของเซลล์ในแหล่งเซลล์ตั้งต้น ในการศึกษาที่ใช้เซลล์สร้างเส้นใยที่ได้จากเหงือก (gingival fibroblast) ของผู้ไม่เป็นโรคปริทันต์ซึ่งเลี้ยงในห้องปฏิบัติการอิมมูโนความเข้มข้น 2,600,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็นแหล่งเซลล์ตั้งต้นสำหรับตัวควบคุมผลลบ และใช้เซลล์เยื่อบุผิวหลอดลม (bronchial epithelial cells) (Cambrex, USA) 100,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตรเป็นแหล่งเซลล์ตั้งต้นสำหรับตัวควบคุมผลบวก

1.3 กำหนดหาปริมาณของสารละลายที่มีเซลล์ตั้งต้นที่ต้องใช้เพื่อให้ได้เซลล์จำนวน 100,000 เซลล์ นำเซลล์ไปเลี้ยงบน glass cover slip โดยในการศึกษานี้ต้องใช้สารละลายเซลล์สร้างเส้นใยที่ได้จากเหงือกตั้งต้น 38 ไมโครลิตร และสารละลายเซลล์เยื่อบุผิวหลอดลมตั้งต้น 1 มิลลิลิตร

1.4 ไข่ (seed) เซลล์สร้างเส้นใยที่ได้จากเหงือก 100,000 เซลล์ ลงบน coverslip เคลือบเจลาตินในหลุมเพาะเชื้อ จำนวน 2 หลุม และไข่เซลล์เชื้อบิวาหลอดลม 100,000 เซลล์ ลงบน coverslip เคลือบเจลาตินในหลุมเพาะเชื้อ จำนวน 2 หลุม เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. การกระตุ้นเซลล์ด้วย อินเตอร์ลิวคิน-17

กระตุ้นเซลล์เชื้อบิวาหลอดลมที่เลี้ยงบน coverslip เคลือบเจลาติน ในหลุมเพาะเชื้อในข้อ 1 ด้วยไซโตไคน์อินเตอร์ลิวคิน-17 (R&D, USA) ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิเมตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

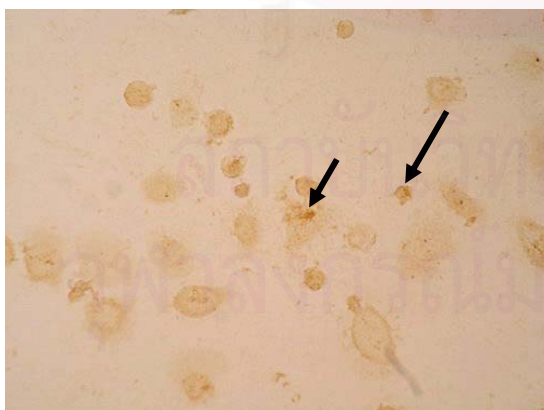
3. การย้อมด้วยแอนติบอดีปฐุมภูมิและชุดย้อมต่อสารเบต้าดีเฟนซิน-2

ทำการย้อมเซลล์สร้างเส้นใยที่ได้จากเหงือกและเซลล์เชื้อบิวาหลอดลมด้วยแอนติบอดีปฐุมภูมิและสารละลายควบคุมผลลบ โดยมีเซลล์ที่ได้รับการย้อมดังนี้

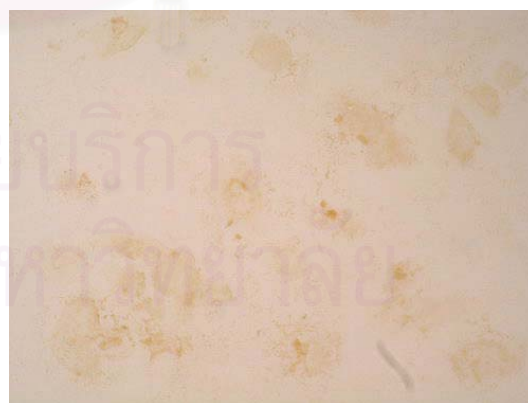
เซลล์เชื้อบิวาหลอดลมที่ได้รับการกระตุ้นด้วยอินเตอร์ลิวคิน-17 ย้อมด้วยแอนติบอดีปฐุมภูมิ จำนวน 1 หลุม และย้อมด้วยสารละลายควบคุมผลลบ 1 หลุม

เซลล์สร้างเส้นใยที่ได้จากเหงือกย้อมด้วยแอนติบอดีปฐุมภูมิ จำนวน 1 หลุม และย้อมด้วยสารละลายควบคุมผลลบ 1 หลุม

จากการย้อมพบว่าแอนติบอดีปฐุมภูมิและชุดย้อมนี้จะไม่ทำให้เกิดการติดสีในเซลล์สร้างเส้นใยแต่ทำให้เกิดการติดสีน้ำตาลบริเวณนิวเคลียสเฉพาะในเซลล์เชื้อบิวาหลอดลมที่ได้รับการกระตุ้นด้วยอินเตอร์ลิวคิน-17 เท่านั้น ดังแสดงในภาพที่ 15-16



ก



ข

ภาพที่ 15 แสดงการติดสีของเซลล์เชื้อบิวาหลอดลมที่ย้อมด้วยแอนติบอดีปฐุมภูมิ (ก) เปรียบเทียบกับย้อมด้วยสารละลายควบคุมผลลบ (ข) ที่กำลังขยาย 400 เท่า



ก

ข

ภาพที่ 16 แสดงเซลล์สร้างเส้นใยที่ได้รับการที่ย้อมด้วยแอนติบอดีปัฐมภูมิที่กำลังขยาย 400 เท่า (ก) เปรียบเทียบกับย้อมด้วยสารละลายควบคุมผลลบที่กำลังขยาย 200 เท่า (ข)

หมายเหตุ เซลล์สร้างเส้นใยที่ได้จากเหงือก เซลล์เยื่อผิวหลอดเลือด และไซโตไคน์อินเตอร์ลิวคิน-17 ได้รับความอนุเคราะห์จากรองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.รังสิณี มหานนท์ และการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีปัฐมภูมิ แอนติบอดีทุติยภูมิ และชุดย้อมที่ทำให้เกิดสี ได้รับความช่วยเหลือจาก คุณนพดล สะอาดเอี่ยม นักวิทยาศาสตร์ห้องปฏิบัติการอิมมูโนวิทยา

การย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมี

นำสไลด์ชิ้นเนื้อเหงือกของกลุ่มตัวอย่างมาทำการย้อม โดยกลุ่มตัวอย่างแต่ละคน จะได้รับการย้อมด้วยแอนติบอดีปัฐมภูมิ 1 สไลด์ และสารละลายควบคุมผลลบ 1 สไลด์

ทำการย้อมตามเอกสารคู่มือการใช้ผลิตภัณฑ์ ที่อุณหภูมิล้างโดยมีวิธีการย้อมดังนี้

1. นำสไลด์ออกจากกล่องใส่สไลด์สำหรับแช่แข็ง นำมาเป่าแห้งด้วยพัดลมที่อุณหภูมิห้อง
2. จุ่มสไลด์ชิ้นเนื้อลงในสารละลายอะซิโตนเย็น (100% cold acetone) นาน 10 นาที เพื่อให้แอนติเจนติดสีดีขึ้น และใช้พัดลมเป่าให้แห้งนาน 10 นาที
3. ใช้ปากกาหมึกกันน้ำ (hydrophobic marker) วรอบชิ้นเนื้อที่อยู่บนสไลด์ เพื่อจำกัดขอบเขตของสารละลายที่จะหยดลงบนชิ้นเนื้อ รอปประมาณ 5 นาที ให้หมึกแห้ง
4. ล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลินเป็นเวลา 2 นาที
5. ใส่สาร peroxidase block 1 หยดทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที เพื่อกำจัด endogenous peroxide จากนั้นล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลินเป็นเวลา 2 นาที

6. ใส่ serum block (normal donkey serum) 1 หยด ทิ้งไว้เป็นเวลา 20 นาที เพื่อลดการทำปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะนอกเหนือจากปฏิกิริยาระหว่างเบต้าดีเฟนซิน-2 กับแอนติบอดีปฐมภูมิ

7. ใส่แอนติบอดีปฐมภูมิ ซึ่งเป็น Goat anti HBD-2 purified polyclonal antibody ซึ่งในการศึกษานี้ใช้แอนติบอดีต่อเบต้าดีเฟนซิน-2 ความเข้มข้น 8 $\mu\text{g/ml}$ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน

สำหรับการทดลองควบคุมผลลบ ทำการทดลองในลักษณะเดียวกัน โดยใส่สารละลายควบคุมผลลบ (normal goat IgG) แทนการใส่แอนติบอดีปฐมภูมิ

8. ล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน 2 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที

9. ใส่ biotinylated secondary antibodies (donkey anti-goat IgG antibody) 1 หยด ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

10. ล้างด้วยสารละลาย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน 2 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที

11. ใส่ Horseradish peroxidase (HRP)-streptavidin complex 1 หยด ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

12. ล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน 2 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที

13. เตรียม HRP substrate ใน substrate mixing bottle โดยใส่ 1.6 ml deionized H_2O + 10x substrate buffer 5 หยด + 50x DAB chromogen 1 หยด + 50x peroxidase substrate ผสมใน mixing bottle

14. ใส่ HRP substrate 1 หยด ลงบนชิ้นเนื้อ รอจนกระทั่งเกิดสีน้ำตาลเป็นเวลา 10 นาที

15. ล้างด้วย deionized distilled water แล้วนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อดูว่าเห็นการติดสีน้ำตาลที่เซลล์เยื่อผิวหรือไม่ หากยังเห็นสีน้ำตาลไม่ชัดให้หยด HRP substrate ต่ออีก 5 นาที

16. ล้างด้วย deionized distilled water 3 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที

17. ทำการย้อมทับ (counter stain) ด้วยสีฮีมาทอกไซลิน (hematoxylin) 10 วินาที

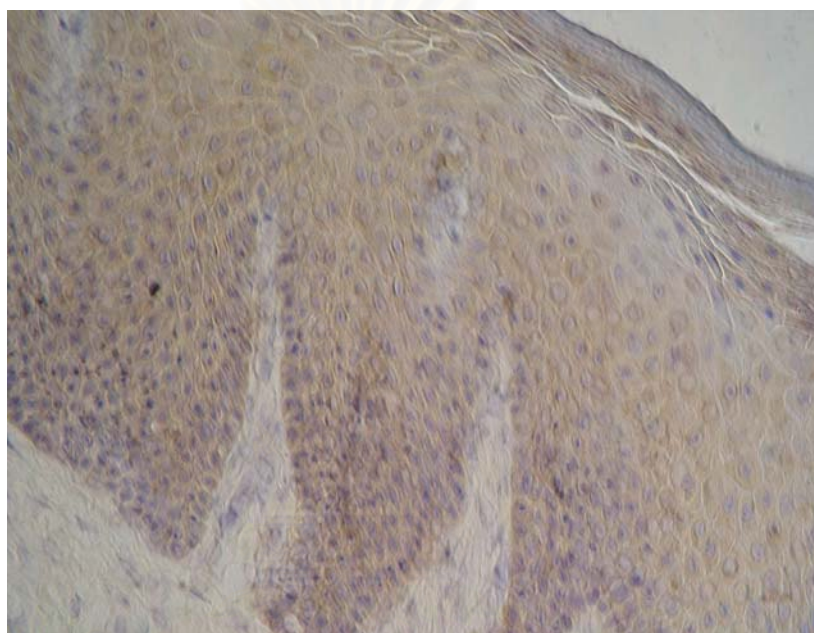
18. นำสไลด์ที่ผ่านการทำปฏิกิริยาแล้วไปทำการดึงน้ำออกจากตัวอย่างเนื้อเยื่อบนสไลด์ด้วยการแช่ลงใน alcohol และ xylene แล้วหยด mounting media และปิดด้วย cover slip

เก็บสไลด์ที่ย้อมเสร็จเรียบร้อยแล้วลงในกล่องเก็บสไลด์ (slide box) เพื่อทำการตรวจการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ต่อไป

หมายเหตุ ขั้นตอนที่ 5, 6, 7, 9, 11, 14 ทำในกล่องสำหรับย้อม (staining chamber) ที่มีความชื้น

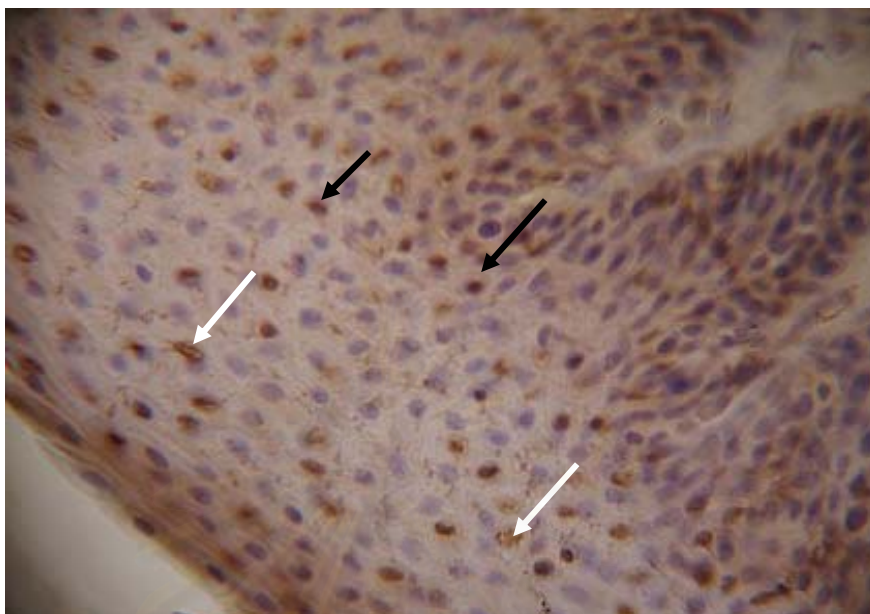
ผลการย้อม

เซลล์เยื่อปิวที่ได้รับการย้อมด้วยสารละลายควบคุมผลลบพบเซลล์ติดสีม่วง โดยที่ไม่พบเซลล์ที่ติดสีน้ำตาลซึ่งเป็นเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ในชั้นเยื่อปิวเหงือก ดังแสดงในภาพที่ 17



ภาพที่ 17 แสดงการติดสีของเซลล์เยื่อปิวเหงือกที่ได้รับการย้อมด้วยสารละลายควบคุมผลลบ ที่กำลังขยาย 400 เท่า

เซลล์เยื่อปิวที่ได้รับการย้อมด้วยแอนติบอดีปฐมภูมิและมีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 หรือเซลล์ที่ให้ผลบวก (positive cell) จะติดสีน้ำตาล โดยการติดสีน้ำตาลจะเห็นเป็นสองลักษณะคือ ติดสีน้ำตาลที่นิวเคลียส (nucleus) (ลูกศรสีดำ) หรือรอบๆ นิวเคลียส (perinucleus) (ลูกศรสีขาว) ส่วนเซลล์ที่ไม่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 หรือเซลล์ที่ให้ผลลบ (negative cell) จะติดสีม่วง ดังแสดงในภาพที่ 18



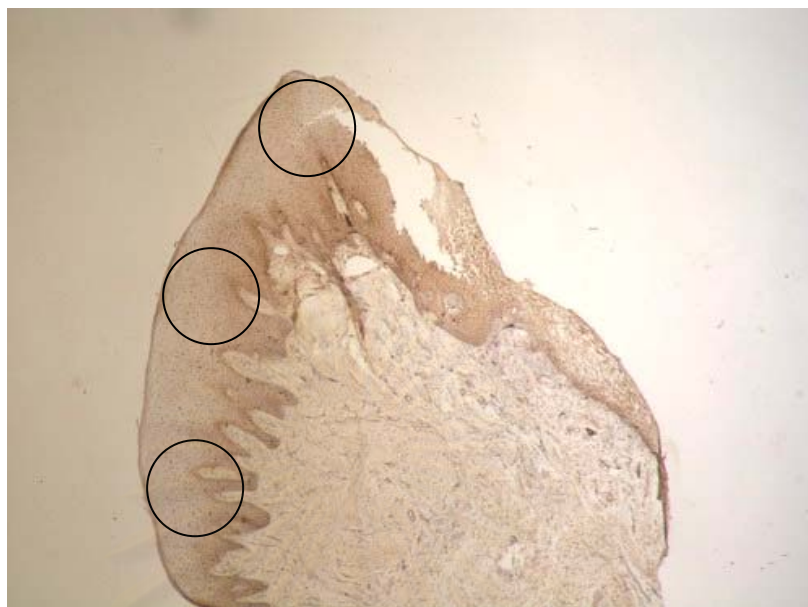
ภาพที่ 18 แสดงการติดสีของเซลล์เยื่อเหงือกที่ได้รับการย้อมด้วยแอนติบอดีปฐมภูมิ ที่กำลังขยาย 400 เท่า ลูกศรสีขาวแสดงการติดสีรอบๆนิวเคลียส ลูกศรสีดำแสดงการติดสีที่นิวเคลียส

การตรวจการแสดงออกของเบต้าดีเฟนซิน-2 ในชั้นเหงือกตัวอย่าง

ทำการประเมินการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ด้วยการถ่ายภาพดิจิทัลจากกล้องจุลทรรศน์แสงขาวที่กำลังขยาย 400 เท่า เพื่อดูการแสดงออกของเปปไทด์ของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ในชั้นเหงือกตัวอย่างโดยมีขั้นตอนดังนี้

การเลือกตำแหน่ง

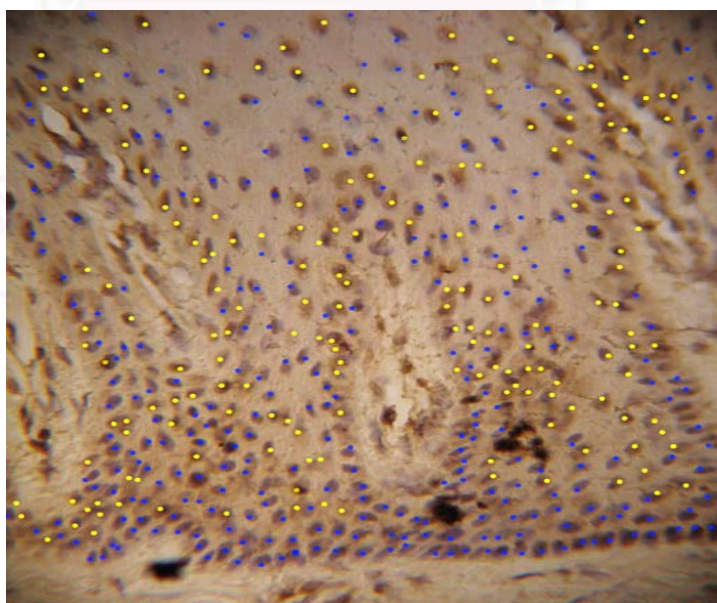
สุ่มเลือกตำแหน่งชิ้นเนื้อละ 3 ตำแหน่ง จากบริเวณเยื่อเหงือกเพื่อทำการถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า และนำภาพถ่ายไปตรวจนับเซลล์โดยบริเวณที่สุ่ม ได้แก่ บริเวณขอบเหงือก (gingival crest) 1 ตำแหน่ง และ อีก 2 ตำแหน่งจากขอบเหงือกด้านที่ติดกับช่องปาก (oral epithelium) โดยให้ตำแหน่งทั้งสามห่างกันเป็นระยะเท่าๆ กันดังแสดงในภาพที่ 19



ภาพที่ 19 แสดงการสุ่มเลือกตำแหน่งเพื่อตรวจนับการติดสีของเซลล์เยื่อหุ้ม

การนับเซลล์

นับจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ในเนื้อเยื่อเทียบกับจำนวนเซลล์ทั้งหมดที่กำลังขยาย 400 เท่า โดยใช้โปรแกรม Adobe Photoshop 7 (Garrison และคณะ, 2006) จุดสีที่ต่างกันลงบนเซลล์ที่ติดสีน้ำตาลและเซลล์ที่ติดสีม่วง ดังแสดงในภาพที่ 20



ภาพที่ 20 แสดงการนับเซลล์ด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop 7

ใช้ผู้นับ 2 คน ทำการนับเซลล์ 3 ตำแหน่งจากชิ้นเนื้อ 2 ชิ้น โดยทำการนับ 2 ครั้ง และหาค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อเบต้าดีเฟนซิน-2 ในกลุ่มตัวอย่างแต่ละคน โดยผู้นับ ทั้ง 2 คน ได้รับการปรับมาตรฐานกับผู้เชี่ยวชาญจนสามารถนับเซลล์ได้ถูกต้อง

การปรับมาตรฐานของผู้นับเซลล์

ผู้นับเซลล์ทั้งสองคนได้รับการฝึกการนับเซลล์จากผู้เชี่ยวชาญ และมีการปรับ มาตรฐานการนับ โดยให้ผู้นับเซลล์ทั้งสองคนและผู้เชี่ยวชาญนับเซลล์จากภาพถ่าย 3 ภาพ จำนวน 2 ครั้ง โดยกำหนดให้ค่าร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของเบต้าดีเฟนซิน-2 ที่ได้การนับของผู้นับ ทั้งสองมีค่าต่างกับผู้เชี่ยวชาญ และมีความต่างระหว่างผู้นับทั้งสองไม่เกินร้อยละ 10 การนับของผู้ นับทั้งสองคนมีความสอดคล้องไปในทิศทางเดียวกัน โดยกำหนดระดับความเชื่อมั่นของการ ทดสอบที่ 0.05 ($P < 0.05$) (รายละเอียดในภาคผนวก)

การคำนวณหาค่าเฉลี่ยเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อเบต้าดีเฟนซิน-2

1. จากภาพถ่ายเซลล์ 1 ภาพ คำนวณหาค่าร้อยละของเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อเบต้าดีเฟนซิน-2 จากสูตร

$$\text{ค่าร้อยละของเซลล์ที่ให้ผลบวก} = \frac{\text{จำนวนค่าเซลล์ที่ติดสีน้ำตาล} \times 100}{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด}}$$

2. ค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อเบต้าดีเฟนซิน-2 จากกลุ่มตัวอย่างแต่ละคนได้จากการหา ค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อเบต้าดีเฟนซิน-2 จากภาพถ่าย 3 ภาพ ในบริเวณที่สุ่มเลือกจาก ชิ้นเนื้อ 2 ชิ้น และทำการนับซ้ำ 2 ครั้ง จากผู้นับคนที่ 1 และคนที่ 2

การวิเคราะห์ข้อมูล

การทดสอบทางสถิติต่างๆ ใช้โปรแกรม SPSS 11.5 for windows

1. ข้อมูลพื้นฐานทั่วไปของผู้ป่วย ปริมาณการสูบบุหรี่ ความถี่ร้องปริทันต์ และจำนวน เซลล์ที่ให้ผลบวกต่อสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ใช้สถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistics)

2. นำข้อมูลร้อยละของเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อเบต้าดีเฟนซิน-2 จากกลุ่มตัวอย่างทั้ง 40 คนมา วิเคราะห์ค่าการกระจายของข้อมูลโดยใช้สถิติ One-sample Kolmogorov-Smirnov test และทดสอบ ค่าความแปรปรวนของข้อมูลโดยใช้สถิติการวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance; ANOVA)

3. การเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อสารเบต้า ดีเฟนซิน-2 ระหว่างกลุ่มชิ้นเนื้อเห็อกปกติกับกลุ่มชิ้นเนื้อเห็อกที่เป็น โรคมปริทันต์อักเสบเรื้อรัง และในกลุ่มผู้สูบกับไม่สูบบุหรี ใช้สถิติ Independent-Samples T – Test หรือ Mann-Witney U Test ตามลักษณะการกระจายของข้อมูล โดยกำหนดระดับความเชื่อมั่นของการทดสอบที่ 0.05 ($P < 0.05$)

4. การเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อ สารเบต้า ดีเฟนซิน-2 ในกลุ่มตัวอย่างทั้ง 4 กลุ่ม ใช้สถิติ ANOVA หรือ Kruskal Wallis ตามลักษณะความแปรปรวนของข้อมูล โดยกำหนดระดับความเชื่อมั่นของการทดสอบที่ 0.05 ($P < 0.05$)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการศึกษา

ลักษณะทั่วไปของกลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างที่เข้าร่วมในการศึกษารั้งนี้มีจำนวนทั้งหมด 64 คน เป็นชาย 45 คน หญิง 19 คน อายุ 20-68 ปี เฉลี่ย 43.38 ± 13.71 ปี เป็นผู้ที่ไม่เข้าเกณฑ์การคัดเลือกเข้าร่วมงานวิจัย 14 คน ได้แก่ ผู้ที่สูบบุหรี่ไม่ถึง 10 มวนต่อวันจำนวน 9 คน ผู้ที่สงสัยเป็นโรคมะเร็งที่บ่งชี้บ่งพร่องซึ่งต้องได้รับยาต้านเชื้อราในช่องปาก 1 คน และเป็นผู้ที่ได้รับยากลับเซลล์เซียมแซนแนลบล็อกเกอร์ 4 คน ส่วนที่เหลือ 10 คน มีปัญหาด้านเทคนิคในการข้อมชิ้นเนื้อ เช่น ชิ้นเนื้อที่มีขนาดเล็กไป ในขั้นตอนการข้อมมีการหลุดของชิ้นเนื้อตัวอย่างจากแผ่นสไลด์ หรือไม่สามารถมองเห็นเซลล์อย่างชัดเจนเนื่องจากมี mounting media หนาเกินไปในขั้นตอนการข้อมทับ ดังนั้นเมื่อพิจารณาตามเกณฑ์การคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างและคัดกลุ่มตัวอย่างที่มีความผิดพลาดทางเทคนิคออก จึงมีกลุ่มตัวอย่างที่นำมาศึกษาวิเคราะห์จำนวนทั้งสิ้น 40 คน เป็นชาย 27 คน หญิง 13 คน อายุ 20-68 ปี เฉลี่ย 44.77 ± 13.85 ปี เป็นผู้ไม่สูบบุหรี่ 20 คน ผู้สูบบุหรี่ 20 คน แบ่งกลุ่มการศึกษาออกเป็น 4 กลุ่ม จำนวนกลุ่มละ 10 คน คือ

กลุ่มไม่สูบบุหรี่และไม่เป็นโรคปริทันต์ (nonsmoking-healthy; NH)

กลุ่มไม่สูบบุหรี่และเป็นโรคปริทันต์ (nonsmoking-disease; ND)

กลุ่มสูบบุหรี่และไม่เป็นโรคปริทันต์ (smoking-healthy; SH)

กลุ่มสูบบุหรี่และเป็นโรคปริทันต์ (smoking-disease; SD)

กลุ่มไม่สูบบุหรี่และไม่เป็นโรคปริทันต์ ประกอบด้วยชาย 6 คน หญิง 4 คน มีช่วงอายุระหว่าง 21-65 ปี เฉลี่ย 33.90 ± 16.68 ปี ในจำนวนนี้มีโรคประจำตัว 2 คน ได้แก่ โรคซึมเศร้าต้องช้ยาต้านอาการซึมเศร้า 1 คน และโรค G-6 PD ไม่ต้องช้ยาประจำ 1 คน

กลุ่มไม่สูบบุหรี่และเป็นโรคปริทันต์ ประกอบด้วยชาย 3 คน หญิง 7 คน มีช่วงอายุระหว่าง 36-68 ปี เฉลี่ย 52.70 ± 10.76 ปี ในจำนวนนี้มีโรคประจำตัว 2 คน ได้แก่ โรคเบาหวาน ต้องช้ยา Metformin 1 คน และโรคความดันโลหิตสูงต้องช้ยา Hydrochlorothiazide ร่วมกับ Inderal 1 คน

กลุ่มสูบบุหรี่และไม่เป็นโรคปริทันต์ ประกอบด้วยชาย 9 คน หญิง 1 คน มีช่วงอายุระหว่าง 20-58 ปี เฉลี่ย 43.30 ± 13.08 ปี ในจำนวนนี้มีโรคประจำตัว 1 คน ได้แก่โรคความดันโลหิตสูงต้องใช้ยา Prenolol 1 คน

กลุ่มสูบบุหรี่และเป็นโรคปริทันต์ประกอบด้วยชาย 9 คน หญิง 1 คน มีช่วงอายุระหว่าง 40-61 ปี เฉลี่ย 49.20 ± 6.39 ปีในจำนวนนี้มีโรคประจำตัว 1 คน ได้แก่โรคความดันโลหิตสูงต้องใช้ยา Hydrochlorthiazide 1 คน และรับประทานวิตามินบีรวม 1 คน รายละเอียดสรุปได้ ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงลักษณะกลุ่มตัวอย่างจำแนกตามเพศ อายุ การมีโรคประจำตัวและยาที่ใช้ประจำ

| ลักษณะของกลุ่มตัวอย่าง | | Nonsmoking | Nonsmoking | Smoking | Smoking |
|---|-------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| | | Healthy | Disease | Healthy | Disease |
| เพศ | ชาย | 6 | 3 | 9 | 9 |
| | หญิง | 4 | 7 | 1 | 1 |
| อายุเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ปี) | | 33.90 ± 16.68 | 52.70 ± 10.76 | 43.30 ± 13.08 | 49.20 ± 6.39 |
| (ต่ำสุด – สูงสุด) | | (21-65) | (36-68) | (20-58) | (40-61) |
| โรคประจำตัว | ไม่มี | 8 | 8 | 9 | 9 |
| | มี | 2 | 2 | 1 | 1 |
| ยาประจำ | ไม่มี | 9 | 8 | 9 | 8 |
| | มี | 1 | 2 | 1 | 2 |

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อมูลการสูบบุหรี่ของกลุ่มตัวอย่างที่สูบบุหรี่

กลุ่มตัวอย่างที่สูบบุหรี่และไม่เป็นโรคปรีทันต์ มีช่วงอายุระหว่าง 20-58 ปี เฉลี่ย 43.30 ± 13.08 ปี ส่วนกลุ่มตัวอย่างที่สูบบุหรี่และเป็นโรคปรีทันต์มีอายุมากกว่าคือมีช่วงอายุระหว่าง 40 - 61 ปี เฉลี่ย 49.20 ± 6.39 ปี กลุ่มตัวอย่างที่ไม่เป็นโรคปรีทันต์มีปริมาณการสูบ 10-20 มวนต่อวัน เฉลี่ย 13.00 ± 4.83 มวนต่อวัน มีระยะเวลาการสูบ 2-30 ปี เฉลี่ย 17.20 ± 11.74 ปี และปริมาณการสูบตลอดชีวิต (packyear) 1-30 ซองปี เฉลี่ย 10.70 ± 9.97 ซองปี ในขณะที่กลุ่มตัวอย่างที่เป็นโรคปรีทันต์มีปริมาณการสูบ 10-20 มวนต่อวัน เฉลี่ย 14.00 ± 4.59 มวนต่อวัน มีระยะเวลาการสูบ 13-31 ปี เฉลี่ย 24.00 ± 6.60 ปี และมีปริมาณการสูบตลอดชีวิต 5.25-31.00 ซองปี เฉลี่ย 16.79 ± 9.83 ซองปี จากการทดสอบทางสถิติด้วย Independent-Samples T - Test ไม่พบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย อายุ จำนวนการสูบบุหรี่ต่อวัน ระยะเวลาการสูบ และปริมาณการสูบตลอดชีวิต ระหว่างกลุ่มสูบบุหรี่และไม่เป็นโรคปรีทันต์กับกลุ่มสูบบุหรี่และเป็นโรคปรีทันต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงอายุ การสูบต่อวัน ระยะเวลาการสูบและปริมาณการสูบบุหรี่ของกลุ่มตัวอย่างที่สูบบุหรี่ทั้งที่ไม่เป็นโรคปรีทันต์และที่เป็นโรคปรีทันต์

| อายุ ปริมาณ และพฤติกรรมการสูบบุหรี่ | Smoking Healthy | Smoking Disease | ค่าวิกฤต (P- value) |
|---|-----------------------------------|----------------------------------|------------------------|
| อายุเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (สูงสุด-ต่ำสุด) | (ปี) 43.30 ± 13.08 (20-58) | 49.20 ± 6.39 (40-61) | 0.21 |
| การสูบเฉลี่ยต่อวัน±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (สูงสุด- ต่ำสุด) | (มวน) 13.00 ± 4.83 (10-20) | 14.00 ± 4.59 (10-20) | 0.64 |
| ระยะเวลาการสูบเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (สูงสุด-ต่ำสุด) | (ปี) 17.20 ± 11.74 (2-30) | 24.00 ± 6.60 (13-31) | 0.13 |
| ปริมาณการสูบเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน(ซองปี) (สูงสุด-ต่ำสุด) | 10.70 ± 9.97 (1.00-30.00) | 16.79 ± 9.83 (5.25-31.00) | 0.18 |

สภาวะปริทันต์ของกลุ่มตัวอย่าง

ชั้นเนื้อเหงือกของกลุ่มตัวอย่างที่ไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบมีค่าความลึกร่องปริทันต์ในช่วง 2-3 มิลลิเมตร ส่วนชั้นเนื้อเหงือกของกลุ่มที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบมีค่าความลึกร่องปริทันต์ 5-13 มิลลิเมตร โดยผู้กลุ่มตัวอย่างที่มีร่องลึกปริทันต์ 5 มิลลิเมตร 1 คน มีการร่นตัวของเหงือก 3 มิลลิเมตร จากภาพรังสีพบมีการละลายตัวของกระดูกรอบรากฟันมากกว่าร้อยละ 50 (ตารางที่ 4)

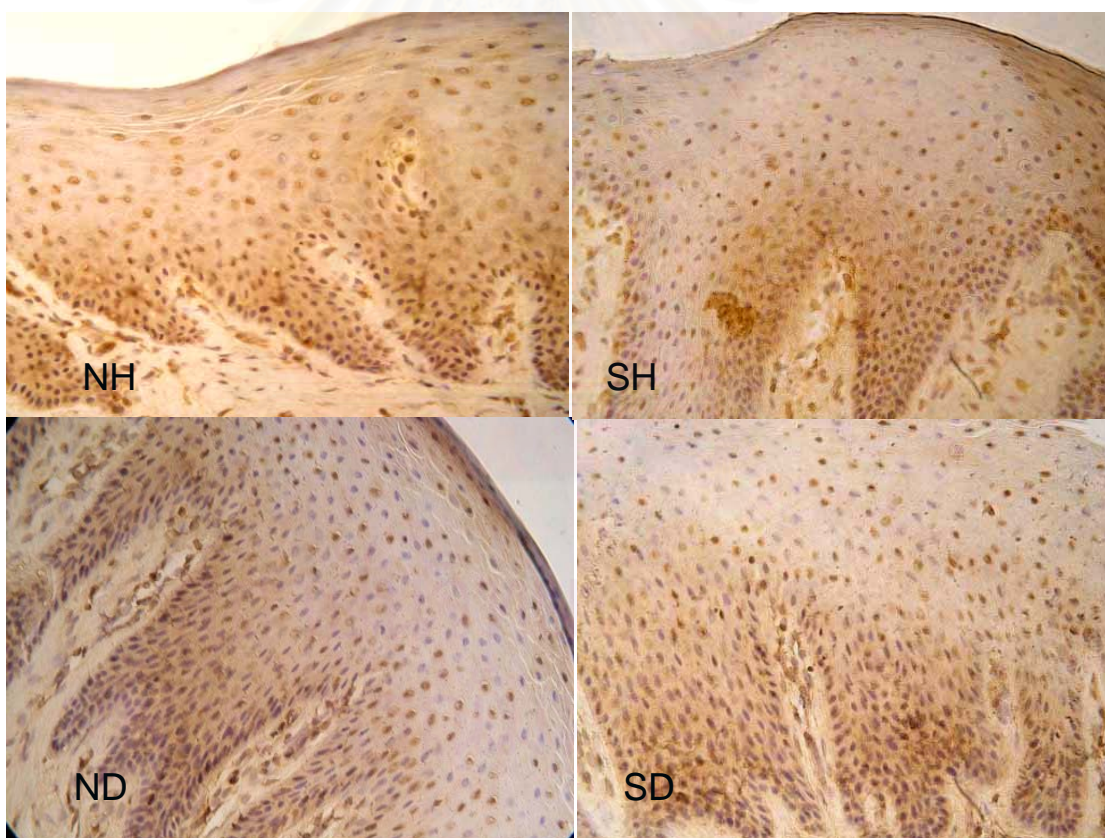
กลุ่มไม่สูบบุหรี่และเป็นโรคปริทันต์มีค่าความลึกร่องปริทันต์เฉลี่ย 8.30 ± 3.12 มิลลิเมตร ในขณะที่กลุ่มสูบบุหรี่และเป็นโรคปริทันต์มีค่าความลึกร่องปริทันต์เฉลี่ย 8.40 ± 1.95 มิลลิเมตร จากการวิเคราะห์โดยใช้สถิติ Independent-Samples T - Test ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยความลึกร่องปริทันต์ระหว่างกลุ่มไม่สูบบุหรี่และเป็นโรคปริทันต์กับกลุ่มสูบบุหรี่และเป็นโรคปริทันต์พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.93$) ดังรายละเอียดในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงลักษณะสภาวะปริทันต์ของกลุ่มตัวอย่างที่ทำการเก็บชั้นเนื้อเหงือก จำแนกตามกลุ่มที่ทำการศึกษา

| ความลึกร่องปริทันต์ | Nonsmoking | Nonsmoking | Smoking | Smoking |
|--|--------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
| | Healthy | Disease | Healthy | Disease |
| ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (มิลลิเมตร) (สูงสุด-ต่ำสุด) | 3.00 ± 0.00 (3-3) | 8.30 ± 3.12 (5-13) | 2.90 ± 0.31 (2-3) | 8.40 ± 1.95 (6-12) |
| ≤ 3 มิลลิเมตร (คน) | 10 | - | 10 | - |
| 3-5 มิลลิเมตร (คน) | - | 1 | - | - |
| ≥ 6 มิลลิเมตร (คน) | - | 9 | - | 10 |

ลักษณะการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2

จากบริเวณที่ทำการส่องตรวจของกลุ่มตัวอย่างทั้ง 4 กลุ่มด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงขาวที่กำลังขยาย 400 เท่า พบว่ากลุ่มตัวอย่างทุกคนมีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ในชั้นเยื่อผิวหนังก และไม่พบการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ในชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) โดยจะพบการติดสีน้ำตาลบริเวณนิวเคลียส (nucleus) และรอบๆนิวเคลียส (perinucleus) ของเซลล์ในชั้นเบซัลไปจนถึงชั้นคอร์เนียม จากการสังเกต พบเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 มากในเยื่อผิวหนังกชั้นสไปนัสเหนือชั้นเบซัล (suprabasal layers) แล้วค่อยๆกระจายขึ้นมาสู่ชั้นคอร์เนียม โดยกลุ่มตัวอย่างบางคน เซลล์ในชั้นเบซัลมีการติดสีที่นิวเคลียส และเซลล์ในชั้นสไปนัสถึงสไปนัสส่วนบน (upper spinous) ส่วนใหญ่มีการติดสีรอบนิวเคลียส ดังแสดงในภาพที่ 21



ภาพที่ 21 ภาพแสดงเซลล์เยื่อผิวหนังกที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ในกลุ่มตัวอย่างทั้ง 4 กลุ่มที่กำลังขยาย 400 เท่า

หมายเหตุ NH = nonsmoking-healthy; ND = nonsmoking-disease

SH = smoking-healthy; SD = smoking-disease

ระดับการแสดงผลของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ในกลุ่มตัวอย่างที่ทำการศึกษา

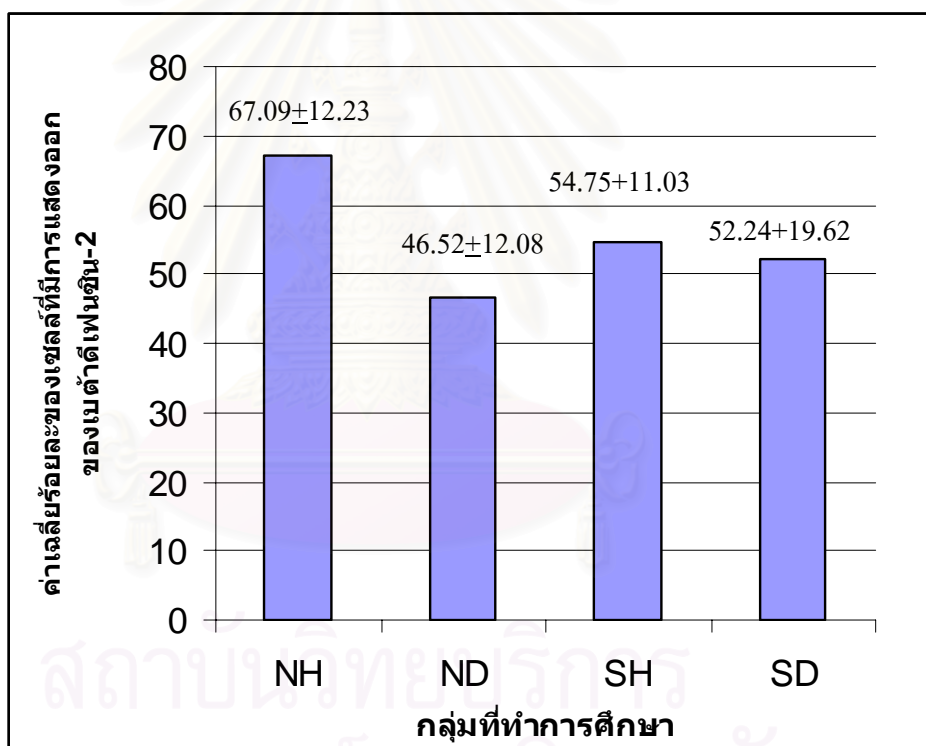
กลุ่มตัวอย่างทั้ง 4 กลุ่ม มีค่าร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงผลของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ดังแสดงในตารางที่ 5 จากการทดสอบการแจกแจงของค่าร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงผลของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ในกลุ่มตัวอย่างทั้ง 40 คนด้วยสถิติ One-sample Kolmogorov-Smirnov test พบว่าค่าร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงผลของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 มีการแจกแจงปกติ (normal distribution) (รายละเอียดในภาคผนวก)

ตารางที่ 5 แสดงค่าร้อยละ และ ค่าเฉลี่ยร้อยละ ของเซลล์ที่มีการแสดงผลของสารเบต้าดีเฟนซิน-2

| กลุ่มตัวอย่าง คนที่ | Nonsmoking healthy | Nonsmoking disease | smoking healthy | smoking disease |
|------------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|--------------------|
| 1 | 89.89 | 77.26 | 77.66 | 71.78 |
| 2 | 82.22 | 62.71 | 59.54 | 71.49 |
| 3 | 74.83 | 58.10 | 59.35 | 69.09 |
| 4 | 67.75 | 56.23 | 58.98 | 66.27 |
| 5 | 67.38 | 43.79 | 57.75 | 63.43 |
| 6 | 64.65 | 42.04 | 52.66 | 48.51 |
| 7 | 60.96 | 41.52 | 49.59 | 46.47 |
| 8 | 56.72 | 38.57 | 49.58 | 42.45 |
| 9 | 55.02 | 31.05 | 47.42 | 27.34 |
| 10 | 51.53 | 30.30 | 35.06 | 15.59 |
| ค่าเฉลี่ย | 67.09 | 46.52 | 54.75 | 52.24 |
| S.D. | 12.23 | 12.08 | 11.03 | 19.62 |

หมายเหตุ S.D. หมายถึง ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ค่าร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ของกลุ่มตัวอย่างที่เข้าร่วมการศึกษาทั้ง 40 คน มีค่าสูงสุด 89.89 ค่าต่ำสุด 15.59 เมื่อนำมาหาค่าเฉลี่ยพบว่าค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ของกลุ่มตัวอย่างทั้ง 40 คนมีค่าเฉลี่ยร้อยละ 54.76 และมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 15.47 เมื่อจำแนกตามสถานะโรคปริทันต์และการสูบบุหรี่พบว่ากลุ่มตัวอย่างที่ไม่สูบบุหรี่และไม่เป็นโรคปริทันต์มีค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 สูงสุด รองลงมาได้แก่กลุ่มตัวอย่างที่สูบบุหรี่และไม่เป็นโรคปริทันต์ และกลุ่มตัวอย่างที่สูบบุหรี่และเป็นโรคปริทันต์ตามลำดับ ส่วนกลุ่มตัวอย่างที่ไม่สูบบุหรี่และเป็นโรคปริทันต์มีค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ต่ำสุด ดังแสดงในแผนภูมิแท่ง ภาพที่ 22



ภาพที่ 22 แผนภูมิแท่งแสดงค่าเฉลี่ยร้อยละและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 จำแนกตามกลุ่มที่ทำการศึกษา

หมายเหตุ NH = nonsmoking-healthy; ND = nonsmoking-disease

SH = smoking-healthy; SD = smoking-disease

ในการศึกษานี้มีผู้ที่มีโรคประจำตัวจำนวน 6 คนและมียาประจำ 6 คน จากการใช้สถิติ Independent-Samples T-Test ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่ไม่มีโรคประจำตัวกับกลุ่มตัวอย่างที่มีโรคประจำตัวและกลุ่มตัวอย่างที่ไม่มียาประจำกับกลุ่มตัวอย่างที่มียาประจำพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.96$ และ 0.89 ตามลำดับ) (รายละเอียดในภาคผนวก) จึงสามารถนำค่าเฉลี่ยของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ของกลุ่มตัวอย่างทั้งหมดมาใช้วิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่เป็นและไม่เป็นโรคปริทันต์รวมทั้งศึกษาผลของการสูบบุหรี่ที่มีต่อการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ได้

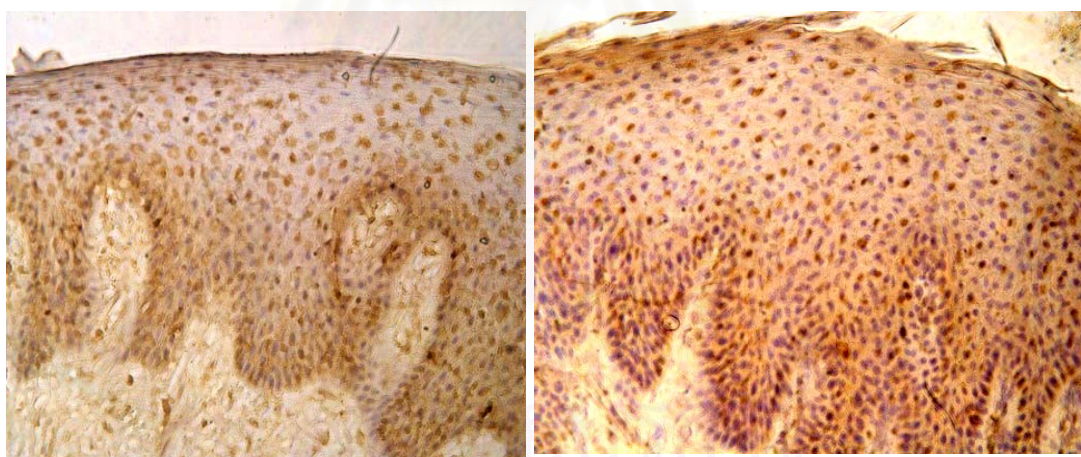
การแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ในเหงือกปกติ และเหงือกที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ

จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าการสูบบุหรี่และการเป็นโรคปริทันต์อาจมีผลต่อการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ดังนั้นจึงวิเคราะห์ด้วยสถิติ Independent-Samples T-Test เพื่อทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่ไม่เป็นโรคปริทันต์เทียบกับกลุ่มตัวอย่างที่เป็นโรคปริทันต์ในผู้ไม่สูบบุหรี่ เพื่อกำจัดตัวแปรของการสูบบุหรี่ พบว่ากลุ่มตัวอย่างที่ไม่สูบบุหรี่และเป็นโรคปริทันต์มีค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกสารเบต้าดีเฟนซิน-2 น้อยกว่ากลุ่มตัวอย่างที่ไม่สูบบุหรี่และไม่เป็นโรคปริทันต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) โดยมีค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกสารเบต้าดีเฟนซิน-2 น้อยกว่าคิดเป็นร้อยละ 20.57 ± 5.43 แสดงให้เห็นว่า การเป็นโรคปริทันต์อาจมีผลต่อการแสดงออกสารเบต้าดีเฟนซิน- 2 ดังแสดงในตารางที่ 6 ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะการติดเชื้อของเยื่อผิวเหงือกที่ได้จากการย้อมทางอิมมูโนฮิสโตเคมี ที่พบว่ากลุ่มตัวอย่างที่ไม่สูบบุหรี่และไม่เป็นโรคปริทันต์มีเซลล์คิติน้ำตาลที่มีการแสดงออกสารเบต้าดีเฟนซิน-2 หนาแน่นมากกว่ากลุ่มตัวอย่างที่ไม่สูบบุหรี่และเป็นโรคปริทันต์ซึ่งเซลล์ส่วนใหญ่คิติน้ำตาลมีรูปร่างอย่างชัดเจนดังแสดงในภาพที่ 23

ตารางที่ 6 แสดงค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ของกลุ่มตัวอย่างที่ไม่เป็นโรคปริทันต์เทียบกับกลุ่มตัวอย่างที่เป็นโรคปริทันต์ในผู้ที่ไม่สูบบุหรี่

| | ไม่เป็นโรคปริทันต์ (healthy) | เป็นโรคปริทันต์ (disease) | ค่าวิกฤต (P-value) |
|---|---------------------------------|------------------------------|-----------------------|
| ร้อยละของค่าเฉลี่ยเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 (ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน) | 67.09 \pm 12.23 | 46.52 \pm 12.08 | 0.00* |

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)



ก

ข

ภาพที่ 23 แสดงการเปรียบเทียบภาพที่ได้จากการย้อมทางอิมมูโนฮิสโตเคมีของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ระหว่างกลุ่มไม่เป็นโรคปริทันต์ (ก) เทียบกับกลุ่มตัวอย่างที่เป็นโรคปริทันต์ (ข) ในผู้ที่ไม่สูบบุหรี่ ที่กำลังขยาย 400 เท่า

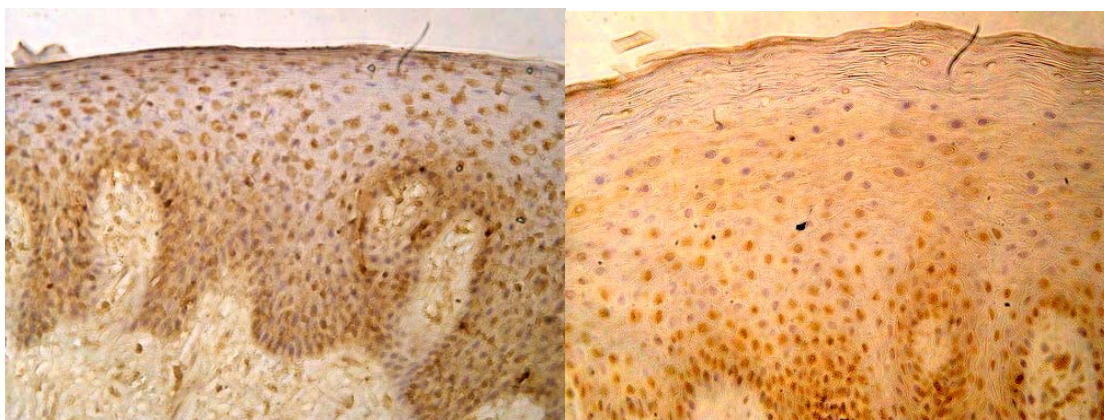
ผลของการสูบบุหรี่ต่อการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ในเหงือกปกติ

จากการวิเคราะห์ข้างต้นพบว่า การเป็นโรคปริทันต์อักเสบอาจมีผลต่อการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 เพื่อทดสอบผลของการสูบบุหรี่ต่อการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 จึงกำจัดตัวแปรกวนของการเป็นโรคปริทันต์อักเสบ โดยทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่สูบบุหรี่เทียบกับกลุ่มตัวอย่างที่ไม่สูบบุหรี่ในผู้ที่ไม่เป็นโรคปริทันต์ ด้วยสถิติ Independent-Samples T-Test พบว่ากลุ่มตัวอย่างที่สูบบุหรี่และไม่เป็นโรคปริทันต์มีค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 น้อยกว่ากลุ่มตัวอย่างที่ไม่สูบบุหรี่และไม่เป็นโรคปริทันต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยมีค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 น้อยกว่าคิดเป็นร้อยละ 12.33 ± 5.21 แสดงให้เห็นว่าการสูบบุหรี่อาจมีผลต่อการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ในผู้ที่ไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ ดังแสดงในตารางที่ 7 ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะการติดเชื้อของเยื่อหุ้มเหงือกที่ได้จากการย้อมทางอิมมูโนฮิสโตเคมี ที่พบว่ากลุ่มตัวอย่างที่ไม่สูบบุหรี่และไม่เป็นโรคปริทันต์มีเซลล์ติดเชื้อน้ำตาลที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 หนาแน่นมากกว่ากลุ่มตัวอย่างที่สูบบุหรี่และไม่เป็นโรคปริทันต์ดังแสดงในภาพที่ 24

ตารางที่ 7 แสดงค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ของกลุ่มตัวอย่างที่สูบบุหรี่เทียบกับกลุ่มตัวอย่างที่ไม่สูบบุหรี่ในผู้ที่ไม่เป็นโรคปริทันต์

| | สูบบุหรี่ (Smoking) | ไม่สูบบุหรี่ (Nonsmoking) | ค่าวิกฤต (P – value) |
|---|------------------------|------------------------------|-------------------------|
| ร้อยละของค่าเฉลี่ยเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 (ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน) | 54.75±11.03 | 67.09±12.23 | 0.02* |

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ก

ข

ภาพที่ 24 แสดงการเปรียบเทียบภาพที่ได้จากการย้อมทางอิมมูโนฮิสโตเคมีของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ระหว่างกลุ่มไม่สูบบุหรี่ (ก) เทียบกับกลุ่มตัวอย่างที่สูบบุหรี่ (ข) ในผู้ที่ไม่เป็นโรคปริทันต์ ที่กำลังขยาย 400 เท่า

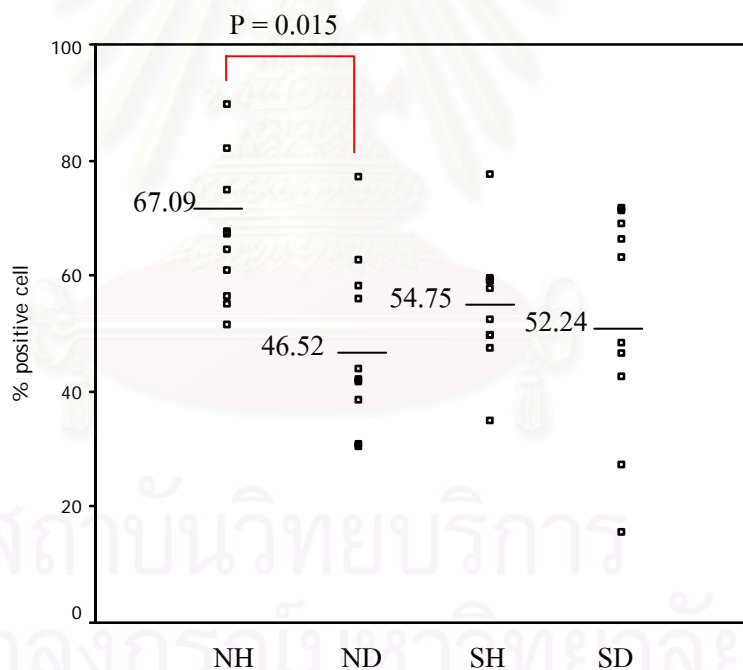
ผลของการสูบบุหรี่ต่อการแสดงออกของเปปไทด์ของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ในเหงือกปกติและเหงือกที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรัง

จากการวิเคราะห์ข้างต้นพบว่า การเป็นโรคปริทันต์และการสูบบุหรี่อาจมีผลต่อการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 จึงวิเคราะห์เพิ่มเติมโดยวิเคราะห์ปัจจัยทั้งสองที่อาจมีผลต่อการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ร่วมกัน โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนในการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่ทำการศึกษาทั้ง 4 กลุ่ม ผลการวิเคราะห์พบว่า ข้อมูลร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 มีการแจกแจงเป็นแบบปกติและความแปรปรวนของข้อมูลเท่ากันทุกกลุ่ม และพบว่ามีความแตกต่างของค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกสารเบต้าดีเฟนซิน-2 คู่ใดคู่หนึ่งในกลุ่มตัวอย่าง 4 กลุ่ม จึงวิเคราะห์เปรียบเทียบพหุคูณ (Multiple comparisons) ด้วยสถิติ Bonferroni พบว่ามีความแตกต่างของค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ระหว่างกลุ่มไม่สูบบุหรี่และไม่เป็นโรคปริทันต์กับกลุ่มไม่สูบบุหรี่และเป็นโรคปริทันต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่สูบบุหรี่และไม่สูบบุหรี่ และไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่สูบบุหรี่และไม่เป็นโรคปริทันต์กับกลุ่มที่สูบบุหรี่และเป็นโรคปริทันต์ แสดงให้เห็นว่าเมื่อวิเคราะห์ปัจจัยการเป็นโรคปริทันต์และการสูบบุหรี่ร่วมกัน ปัจจัยที่มีผลต่อการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 คือการเป็นโรคปริทันต์ ดังแสดงในตารางที่ 8 และภาพที่ 25

ตารางที่ 8 แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ในกลุ่มตัวอย่างทั้ง 4 กลุ่ม

| | Nonsmoking Healthy | Nonsmoking Disease | Smoking Healthy | Smoking Disease |
|--|-----------------------|-----------------------|--------------------|--------------------|
| ค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสาร HBD-2 ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน | 67.09 ± 12.23 | 46.52 ± 12.08 | 54.75 ± 11.03 | 52.24 ± 19.62 |
| | * P = .015 | | | |

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 25 แสดงการกระจายข้อมูลร้อยละและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยละเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2

หมายเหตุ NH = nonsmoking-healthy; ND = nonsmoking-disease
SH = smoking-healthy; SD = smoking-disease

วิเคราะห์เพิ่มเติมโดยควบคุมปัจจัยกวนและทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 กับการสูบบุหรี่ และการเป็นโรคปริทันต์ด้วยการวิเคราะห์ถดถอยโลจิสติก (Logistic regression) โดยกำหนดจุดตัดค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่มีค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 มากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 50 กับ กลุ่มที่มีค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 น้อยกว่าร้อยละ 50 พบว่าผู้ที่สูบบุหรี่มีความเสี่ยงที่จะมีเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 น้อยกว่าร้อยละ 50 มากกว่าผู้ไม่สูบบุหรี่เพิ่มขึ้นเป็น 2.11 เท่า อย่างไรก็ตามมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.29$) และผู้ที่ เป็นโรคปริทันต์มีความเสี่ยงที่จะมีเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 น้อยกว่าร้อยละ 50 มากกว่าผู้ไม่เป็นโรคปริทันต์ 5.13 เท่า อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.02$) ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 กับการสูบบุหรี่และการเป็นโรคปริทันต์

| ตัวแปรอิสระ | การแสดงออกของHBD-2 น้อยกว่าร้อยละ 50 | |
|--------------------|---|---|
| | อัตราเสี่ยง (ช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ 95) | อัตราเสี่ยงปรับ (ช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ 95) |
| การสูบบุหรี่ | 1.90 (0.52-7.00) | 2.11 (0.57-8.64) |
| การเป็นโรคปริทันต์ | 4.88* (1.19-19.94)* | 5.13* (1.22-21.60)* |

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการศึกษา

อภิปรายผลการศึกษา

กลุ่มตัวอย่างที่เข้าร่วมการวิจัย

เกณฑ์การเข้าร่วมการวิจัยในเรื่องการสูบบุหรี่ ที่กำหนดว่ากลุ่มตัวอย่างของกลุ่มผู้สูบบุหรี่ต้องสูบบุหรี่ไม่น้อยกว่า 10 มวนต่อวันทำให้หากกลุ่มตัวอย่างยากเนื่องจากการรณรงค์ลดการสูบบุหรี่ทำให้ประชาชนตระหนักถึงโทษของบุหรี่และลดการสูบลง ส่งผลให้การเก็บตัวอย่างต้องขยายเวลาออกไปจากกำหนดเดิม 6 เดือน ในการศึกษานี้มีกลุ่มตัวอย่างบางคนมีโรคประจำตัวหรือใช้ยาประจำ แต่จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าผู้ที่มีโรคประจำตัวและใช้ยาประจำดังกล่าวมีค่าเฉลี่ยของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ไม่ต่างจากผู้ไม่มีโรคประจำตัวและยาประจำ (รายละเอียดในภาคผนวก) จึงสามารถรวมผู้ที่มีโรคประจำตัวหรือใช้ยาประจำในการวิเคราะห์ข้อมูล

การเก็บข้อมูลการสูบบุหรี่

สถานภาพการสูบบุหรี่สามารถประเมินจากการตอบแบบสอบถามด้วยตนเอง (self reported questionnaire) วิธีการสัมภาษณ์ (interview) หรือการตรวจทางชีวเคมี (biochemical method) โดยการตรวจระดับสารนิโคติน หรือโคตินินในกระแสเลือด เป็นต้น การตรวจทางชีวเคมีเป็นวิธีที่มีความถูกต้อง เชื่อถือได้มากที่สุด (gold standard) แต่ไม่เป็นที่นิยม เนื่องจากวิธีการมีความยุ่งยาก สิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย วิธีการตอบแบบสอบถามด้วยตนเองเป็นวิธีที่สามารถยอมรับได้ในการแยกผู้สูบบุหรี่ออกจากผู้ไม่สูบบุหรี่ (Scott, Palmer และ Stapleton, 2001) โดยที่วิธีนี้มีค่าความไว (sensitivity) ร้อยละ 87 และมีความจำเพาะ (specificity) ร้อยละ 89 แต่มีข้อจำกัดในเรื่องความสามารถในการทำความเข้าใจข้อคำถามของผู้ตอบแบบสอบถามแต่ละคน (Patrick และคณะ, 1994) ดังนั้นการศึกษานี้จึงใช้การสัมภาษณ์โดยอิงตามรายการข้อคำถามในแบบสอบถามการสูบบุหรี่ เพื่อเปิดโอกาสให้ผู้เก็บข้อมูลชี้แจงข้อสงสัยแก่ผู้ถูกสัมภาษณ์ รวมทั้งสามารถสังเกตกลิ่นบุหรี่และคราบน้ำโคตินินบริเวณฟันและลักษณะสีของริมฝีปากและเนื้อเยื่อของกลุ่มตัวอย่างได้

เทคนิคที่ใช้ในการทำการศึกษา

การศึกษานี้ใช้วิธีการทางอิมมูโนฮิสโตเคมีในการตรวจการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ซึ่งมีข้อดีคือเป็นวิธีการที่ใช้แสดงตำแหน่งของโปรตีนในเนื้อเยื่อ โดยมีหลักการให้แอนติบอดีปฐมภูมิเข้าไปจับกับแอนติเจนในเนื้อเยื่อ หลังจากนั้นใช้แอนติบอดีทุติยภูมิที่เชื่อมต่อกับเอนไซม์เข้าไปจับกับแอนติบอดีปฐมภูมิ จากนั้นให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยาอิมมูโนเปอร์ออกซิเดส (immunoperoxidase) และใส่สารตั้งต้นที่ทำให้เกิดสีจนทำให้เกิดสีที่แอนติเจนที่ต้องการตรวจซึ่งสามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงขาว (สุทธิชัย ฤกษ์ประกรกิจ, 2546) วิธีอื่นในการศึกษาการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ทำได้โดยการศึกษาการแสดงออกของอาร์เอ็นเอ นำรหัสโดยวิธีการรีเวิร์สทรานสคริปเทส โพลีเมอร์เรส เช่น รีแอกชัน (Bissell และคณะ, 2004; Dale และคณะ, 2001; Dunsche และคณะ, 2002; Krisanaprakornkit และคณะ, 2000) วิธีนี้มีข้อดีคือ มีความไวในการตรวจสูง สามารถตรวจอาร์เอ็นเอในปริมาณน้อย ๆ เพียง 1-3 ไมโครกรัมได้ แต่มีข้อด้อยคือไม่สามารถวัดปริมาณการแสดงออกของอาร์เอ็นเอในรหัสได้ (สุทธิชัย ฤกษ์ประกรกิจ, 2546) ปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีการตรวจวัดปริมาณอาร์เอ็นเอในรหัสด้วยวิธี เรียลไทม์ พีซีอาร์ เช่น การในศึกษาของ Dommisch และคณะ (2005) อย่างไรก็ตามทั้ง 2 วิธีนี้ไม่สามารถตรวจวัดเปปไทด์หรือโปรตีน เนื่องจากมีปัจจัยอื่นเข้ามาแทรกในช่วงหลังการถอดรหัสอาร์เอ็นเอในรหัส (post-transcriptional modulation) หรือ ช่วงหลังการสังเคราะห์โปรตีน (post-translational modulation) ทำให้อาร์เอ็นเอในรหัสที่สร้างออกมานั้นไม่สามารถสังเคราะห์เป็นโปรตีนหรือโปรตีนที่สร้างออกมาไม่สามารถทำงานได้ (Bissell และคณะ, 2004; Hosokawa และคณะ, 2006)

ตำแหน่งที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2

สารเบต้าดีเฟนซิน-2 เป็นสารต้านจุลชีพที่สร้างจากเซลล์เยื่อบุผิวของร่างกาย พบได้ที่ เยื่อบุผิวระบบทางเดินหายใจ (Duits และคณะ, 2003) ทางเดินอาหารและลำไส้ (Vora และคณะ, 2004) และผิวหนัง (Sorensen และคณะ, 2005) นอกจากนี้ยังพบเนื้อเยื่อในช่องปาก เช่น เหงือก เยื่อบุกระพุ้งแก้ม ริมฝีปาก ต่อมน้ำลายซับแมนดิบูลาร์ (submandibular gland) และเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟัน (dental pulp) (Dunsche และคณะ, 2001) การแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ในเยื่อบุผิวแตกต่างกันไปในแต่ละอวัยวะ โดยผิวหนังมีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 อยู่ที่บริเวณเหนือชั้นเบซัล (Supp, Karpinski และ Boyce, 2004) เยื่อบุผิวกระเพาะอาหารและเยื่อบุผิวโพรงจมูกมีการแสดงออกที่บริเวณพื้นผิว (Ohara และคณะ, 2004; Pacova และคณะ, 2004) ในการศึกษาพบการติดสีของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ของเซลล์ในชั้นเบซัลไปจนถึงชั้นคอร์เนียมของเยื่อบุผิวเหงือก ตำแหน่งการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ที่ต่างกันนี้อาจเป็นเพราะรูปร่างและการเรียงตัวของเยื่อบุผิวเซลล์ที่ต่างกัน เช่น ที่ผิวหนัง และเหงือก เซลล์เยื่อบุผิวมีลักษณะ

เป็นสตราติไฟสแควมัส (stratified squamous) ในขณะที่โพรงจมูกเซลล์เยื่อเมือกมีลักษณะเป็นสโคโนสตราติไฟสคอลัมนา (pseudostratified columnar) นอกจากนี้ยังมีสภาพแวดล้อมที่ต่างกัน เช่น ในกระเพาะอาหารมีความเป็นกรดสูง บริเวณผิวหนังมีความเป็นเกลือสูง (Liu และคณะ, 2002) และเชื้อโรคที่อยู่ที่พื้นผิวของอวัยวะแต่ละส่วนมีความแตกต่างกัน ทำให้เซลล์เยื่อเมือกแต่ละบริเวณใช้ตัวรับสัญญาณบนผิวเซลล์ที่ต่างกันรวมทั้งเส้นทางการส่งสัญญาณไปกระตุ้นนิวเคลียสต่างกันเป็นผลให้มีการตอบสนองด้วยการสร้างสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ในลักษณะที่ต่างกันในแต่ละอวัยวะ (Dale และ Fredericks, 2005)

ลักษณะการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ของเยื่อเมือกยังมีความแตกต่างกันในแต่ละตำแหน่งของเยื่อเมือกโดยพบการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ที่เยื่อเมือกด้านช่องปากและด้านร่องเหงือกที่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ แต่ไม่พบการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ที่เยื่อเมือกเชื่อมต่อเนื่องจากเยื่อเมือกเชื่อมต่อเป็นเซลล์เยื่อเมือกที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (Dale และคณะ, 2001)

ในการศึกษานี้ชิ้นเนื้อเหงือกที่เก็บตัวอย่างได้ คือ ชิ้นเนื้อเหงือกด้านช่องปาก จากการเชื่อมด้วยแอนติบอดีปฐมภูมิต่อเปปไทด์เบต้าดีเฟนซิน-2 พบการติดสีน้ำตาลบริเวณนิวเคลียส และรอบๆ นิวเคลียสของเซลล์ในชั้นเบซัลไปจนถึงชั้นคอร์เนียมของชิ้นเนื้อ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Hosokawa และคณะ (2006) และการศึกษาของ Lu และคณะ (2004) แต่ต่างจากการศึกษาของ Dale และคณะ (2001) ซึ่งไม่พบการติดสีในเซลล์ชั้นเบซัล

กลุ่มตัวอย่างส่วนใหญ่การติดสีของเซลล์ในชั้นเบซัลจะมีการติดสีบริเวณนิวเคลียส ในกลุ่มตัวอย่างบางคนลักษณะการติดสีของเซลล์ในชั้นสไปนัสและชั้นสไปนัสส่วนบนจะอยู่บริเวณรอบนิวเคลียส แสดงให้เห็นถึงลักษณะการสร้างสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ที่สร้างจากนิวเคลียส และปล่อยจากนิวเคลียสออกสู่เซลล์ ช่องระหว่างเซลล์ และออกไปสู่พื้นผิวของเยื่อเมือกในที่สุด (Liu และคณะ, 2002; Oren และคณะ, 2003) และโดยที่การสร้างสารเบต้าดีเฟนซิน-2 เริ่มสร้างจากชั้นล่างของเยื่อเมือก แล้วจึงปล่อยออกจากเซลล์เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเซลล์ในการเจริญเติบโตขึ้นสู่ชั้นบน (Liu และคณะ, 2002) ในการศึกษาของ Dale และคณะ (2001) ไม่พบการติดสีของแอนติบอดีต่อเบต้าดีเฟนซิน-2 ในเซลล์ชั้นเบซัลซึ่ง Dale และคณะ อภิปรายว่าอาจเป็นเพราะแอนติบอดีที่ใช้ในการศึกษาของเขาไม่สามารถจับกับเอพิโทป (epitope) ของเปปไทด์ที่ยังพัฒนาไม่สมบูรณ์ (immature uncleaved peptide) ในเซลล์ชั้นเบซัลได้

การแสดงผลของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ในหึ่งอกปกติและหึ่งอกที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรัง

การศึกษานี้พบว่าการแสดงผลของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ในกลุ่มตัวอย่างที่ทำการศึกษาทุกคน โดยที่ในกลุ่มตัวอย่างที่ไม่สูบบุหรี่ ผู้ที่ไม่เป็นโรคปริทันต์มีค่าร้อยละของเซลล์ที่มีต่อการแสดงผลของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 มากกว่าผู้ที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) ดังแสดงในตารางที่ 6 ส่วนในกลุ่มตัวอย่างที่สูบบุหรี่ ผู้ที่ไม่เป็นโรคปริทันต์มีค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีต่อการแสดงผลของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 สูงกว่าผู้ที่เป็นโรคปริทันต์เช่นกัน ดังแสดงในแผนภูมิแท่งภาพที่ 22 ซึ่งผลการศึกษานี้สนับสนุนการศึกษาของ Lu และคณะ (2004) ที่ใช้วิธีทางอิมมูโนฮิสโตเคมี ตรวจกลุ่มตัวอย่างที่ไม่เป็นโรคปริทันต์ 7 คน และกลุ่มตัวอย่างที่เป็นโรคปริทันต์ 22 คน โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์วิเคราะห์สัดส่วนการติดสีของเซลล์ที่มีการแสดงผลของเปปไทด์สารเบต้าดีเฟนซิน-2 (computer - assisted image analysis) พบว่ากลุ่มตัวอย่างที่ไม่เป็นโรคปริทันต์มีสัดส่วนของเซลล์ที่มีการแสดงผลของเปปไทด์สารเบต้าดีเฟนซิน-2 สูงกว่ากลุ่มตัวอย่างที่เป็นโรคปริทันต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ผลการศึกษานี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Dunsche และคณะ (2002) ที่ทำการตรวจเนื้อเยื่อหึ่งอกที่ปกติและที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ ด้วยวิธีรีเวอร์สทรานสคริปเทส โพลีเมอร์เรสเซนรีแอคชั่น พบว่าในกลุ่มตัวอย่างหึ่งอกปกติ มีความถี่ของการแสดงผลของอาร์เอ็นเอเข้ารหัสของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ร้อยละ 84.30 สูงกว่ากลุ่มตัวอย่างที่มีการอักเสบซึ่งมีความถี่ของการแสดงผลของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ร้อยละ 55.60 และการศึกษาของ Bissell และคณะ (2004) ที่ศึกษาปริมาณของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 จากเนื้อเยื่อหึ่งอกที่ตัดออกมาจากกลุ่มตัวอย่างที่ไม่เป็นโรคปริทันต์ 20 คน และจากกลุ่มตัวอย่างที่เป็นโรคปริทันต์ 29 คน ด้วยวิธีเคมีควอนติเตตีฟ รีเวอร์สทรานสคริปเทส โพลีเมอร์เรสเซนรีแอคชั่น พบว่ากลุ่มตัวอย่างที่ไม่เป็นโรคปริทันต์ร้อยละ 35.0 มีการแสดงผลของอาร์เอ็นเอเข้ารหัสของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ในระดับสูง ร้อยละ 35.0 มีการแสดงผลของอาร์เอ็นเอเข้ารหัสของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ในระดับต่ำ และร้อยละ 30.0 ไม่มีการแสดงผลของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ในขณะที่กลุ่มตัวอย่างที่เป็นโรคปริทันต์พบว่าร้อยละ 13.8 มีการแสดงผลของอาร์เอ็นเอเข้ารหัสของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ในระดับสูง ร้อยละ 31.0 มีการแสดงผลของอาร์เอ็นเอเข้ารหัสของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ในระดับต่ำ และร้อยละ 55.2 ไม่มีการแสดงผลของสารเบต้าดีเฟนซิน-2

การศึกษานี้ต่างจากการศึกษาของ Mathews และคณะ (1999) ที่พบว่าหึ่งอกปกติมีการแสดงผลของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 น้อยกว่าหึ่งอกที่นำมาจากบริเวณที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบอาจเป็นเพราะ Mathew และคณะ ใช้วิธีการตรวจด้วยการทำ อาร์เอ็นเอส โพรเทคชั่นแอสเสส ซึ่งมีความ

ไวของการตรวจอาร์เอ็นเอเข้ารหัสต่ำกว่าวิธีวีรัสทรานสคริปเตสโพลีเมอร์เรสเซนซ์แอกชั่น (สุทธิชัย กฤษณะประกกรกิจ, 2546)

การแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ในเหงือกปกติ เป็นปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์เยื่อเมือกกับแบคทีเรียไม่ก่อโรคในช่องปาก เช่น ฟิวโซแบคทีเรียม นิวคลีอิตัม เพื่อเตรียมความพร้อมของเซลล์เยื่อเมือกในการต่อสู้กับแบคทีเรียก่อให้เกิดโรค เชื้อรา แคนดิดา หรือไวรัส (Dale และ Fredericks, 2005; Krisanaprakornkit และคณะ, 2000; Vankeerberghen และคณะ, 2005) เมื่อมีการรุกรานของเชื้อโรค ในระยะแรกร่างกายจะสร้างสารเบต้าดีเฟนซิน-2 เพิ่มขึ้น (Dommissch และคณะ, 2005) เพื่อดึงดูดให้ทีเซลล์ที่จดจำสิ่งแปลกปลอมและเดนไดรติกเซลล์ที่ยังพัฒนาไม่สมบูรณ์เข้ามาในบริเวณที่ติดเชื้อและเริ่มต้นขบวนการตอบสนองของภูมิคุ้มกันได้มาภายหลัง (Yang และคณะ, 2002) หลังจากนั้นเมื่อการอักเสบเพิ่มมากขึ้น คาเซปซิน (cathepsin) ที่เพิ่มขึ้นในภาวะที่มีการอักเสบจะย่อยสลายโปรตีนซิสเตอีนซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักในโครงสร้างของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ทำให้สารเบต้าดีเฟนซิน-2 ถูกทำลายและมีปริมาณลดลง (Bissell และคณะ, 2004) นอกจากนี้ยังพบว่าในภาวะที่เป็นโรคปริทันต์จะมีเชื้อแบคทีเรียสำคัญ ได้แก่ พอร์ไฟโรโมแนส จินจิวัลิส แทนเนอเรลลา ฟอร์ซัยเซีย และแอคทีโนแบซิลลัส แอคทีโนมัยซีเทมโคมิแทน ซึ่งมีฤทธิ์กดการสร้างสารเบต้าดีเฟนซิน-2 (Ji และคณะ, 2007; Vankeerberghen และคณะ, 2005) ดังนั้นค่าเฉลี่ยของเซลล์ซึ่งมีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 จึงลดลงในกลุ่มที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ

ค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ซึ่งมีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ที่ลดลงในกลุ่มตัวอย่างที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ อาจมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดหรือการดำเนินโรคปริทันต์เนื่องจากปริมาณของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ที่ลดลงแสดงถึงความสามารถในการต่อสู้การรุกรานของเชื้อที่ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่เพิ่มมากขึ้น (bacterial load) นอกจากนี้ในระยะสุดท้ายของฟันที่มีการสูญเสียการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์ไปมาก (terminal dentition) ไลโปโพลีแซคคาไรด์ของแบคทีเรียจะกระตุ้นให้โมโนไซต์สร้างไซโตไคน์ก่อนการอักเสบกลุ่มอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า พรอสตาแกลนดิน อี2 (prostaglandin E2) และไซโตไคน์กลุ่มที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันระบบเซลล์เป็นสื่อ (Th1 cytokine) เช่น อินเตอร์ลิวคิน-2 และ อินเทอร์เฟอรอนแกมมา มากกว่ากลุ่มที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันระบบเซลล์สารน้ำ (Th2 cytokine) เช่น อินเตอร์ลิวคิน-4 และ-6 ทำให้การสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรียลดลงและมีบทบาทสำคัญในพยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์อักเสบ ก่อให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อปริทันต์อย่างกว้างขวาง (Salvi และคณะ, 1998)

ผลของบุหรี่ต่อการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2

แม้ว่าจากการวิเคราะห์เปรียบเทียบพหุคูณ (multiple comparison) เกี่ยวกับปัจจัยโรคปริทันต์ และการสูบบุหรี่ ไม่พบความแตกต่างของการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ระหว่างกลุ่มสูบบุหรี่และไม่สูบบุหรี่ (ตารางที่ 8) แต่จากการวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ระหว่างกลุ่มไม่สูบบุหรี่และไม่เป็นโรคปริทันต์ กับกลุ่มสูบบุหรี่และไม่เป็นโรคปริทันต์ ด้วยสถิติ Independent –Sample T-Test พบว่ากลุ่ม ไม่สูบบุหรี่และไม่เป็นโรคปริทันต์ มีค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 สูงกว่ากลุ่มสูบบุหรี่และไม่เป็นโรคปริทันต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 7) แสดงให้เห็นถึงผลด้านลบของการสูบบุหรี่ที่อาจมีผลต่อการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 กล่าวคือ มีผลทำให้ค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ลดลงจากร้อยละ 67.09 ในกลุ่มตัวอย่างที่ไม่สูบบุหรี่และไม่เป็นโรคปริทันต์ เป็นร้อยละ 54.75 ในกลุ่มตัวอย่างที่สูบบุหรี่และไม่เป็นโรคปริทันต์ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับกลุ่มตัวอย่างที่สูบบุหรี่และเป็นโรคปริทันต์ที่มีค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ร้อยละ 52.24 จึงเป็นไปได้ว่าการสูบบุหรี่อาจมีผลลดความสามารถของเซลล์เยื่อบุผิวในการสร้างสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการต่อสู้กับแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์ และจากการที่สารเบต้าดีเฟนซิน-2 เป็นสารเชื่อมโยงระหว่างภูมิคุ้มกันสืบทอดกับภูมิคุ้มกันได้มาหลังเกิด ปริมาณสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ที่ลดลงอาจส่งผลกระทบต่อตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันได้มาหลังเกิดให้ลดลงด้วย

การสูบบุหรี่มีผลลดการสร้างสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ของเยื่อบุผิวเหงือกอาจเกิดจากการสูบบุหรี่ไปลดประสิทธิภาพการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันและลดประสิทธิภาพของกลไกในการป้องกันโรค (protective mechanism) ในร่องเหงือก และเนื้อเยื่อปริทันต์ (Ryder, 2007) ทำให้มีการตั้งถิ่นฐานของเชื้อก่อโรคปริทันต์ เช่น ตรีโพนิมา เคนติโคลา แทนเนอเรลลา ฟอร์ซัยเซีย และพอร์ไฟโร โมแนส จินจิวัลิส เพิ่มขึ้น (Haffajee และ Socransky, 2001; Umeda และคณะ, 1998; Zambon และคณะ, 1996) โดยที่พอร์ไฟโร โมแนส จินจิวัลิส สามารถยับยั้งการสร้างสารกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันที่สร้างจากเยื่อบุผิว เช่น สารเบต้าดีเฟนซิน-2 และอินเตอร์ลิวคิน-8 ส่งผลให้เกิดภาวะคีโมไคน์อ่อนเปลี้ย (chemokine paralyse) ลดการเคลื่อนที่ของเม็ดเลือดขาวเพื่อเข้ามากำจัดเชื้อโรค เป็นเหตุให้เชื้อโรคมีการเจริญเติบโตและมีการลุกลามของโรคต่อไป (Vankeerberghen และคณะ, 2005) การศึกษาของ Ji และคณะ (2007) พบว่า แทนเนอเรลลา ฟอร์ซัยเซีย และ ตรีโพนิมา เคนติโคลา สามารถยับยั้งการสร้างสารเบต้าดีเฟนซิน-2 และอินเตอร์ลิวคิน-8 จาก เซลล์เยื่อบุผิว ได้เช่นกัน ดังนั้นผู้ที่สูบบุหรี่จึงมีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 น้อยกว่าและมีการทำลายเนื้อเยื่อปริทันต์มากกว่าผู้ไม่สูบบุหรี่

ผลเปรียบเทียบการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่สูบบุหรี่และ
ไม่เป็นโรคปริทันต์กับกลุ่มตัวอย่างที่สูบบุหรี่และเป็นโรคปริทันต์ พบว่าทั้งสองกลุ่มมีระดับการ
แสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ไม่แตกต่างกัน โดยมีค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออก
ของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ร้อยละ 54.75 และร้อยละ 52.24 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากความสัมพันธ์
ในผู้ที่ไม่สูบบุหรี่ซึ่งค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ในกลุ่ม
ตัวอย่างที่ไม่สูบบุหรี่และไม่เป็นโรคปริทันต์มีค่าสูงกว่ากลุ่มตัวอย่างที่ไม่สูบบุหรี่และเป็นโรคปริ
ทันต์อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 8 นอกจากนี้พบว่ากลุ่มตัวอย่างที่สูบบุหรี่และ
เป็นโรคปริทันต์มีค่าเฉลี่ยของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 สูงกว่ากลุ่มตัวอย่าง
ที่ไม่สูบบุหรี่และเป็นโรคปริทันต์ (ภาพที่ 22) แสดงให้เห็นว่าการสูบบุหรี่ไปเปลี่ยนแปลงการทำ
หน้าที่ปกติของเยื่อผิวเซลล์ ซึ่งปัจจุบันยังไม่ทราบกลไกการสร้างสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ที่เปลี่ยนไป
ในผู้ที่สูบบุหรี่

การที่ค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ของกลุ่มตัวอย่าง
ที่สูบบุหรี่และเป็นโรคปริทันต์สูงกว่ากลุ่มตัวอย่างที่ไม่สูบบุหรี่และเป็นโรคปริทันต์อาจเป็นเพราะ
การสูบบุหรี่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงไซโตไคน์ในผู้ที่เป็นโรคปริทันต์ โดยมีผลทำให้ ระดับทูเมอร์
เนโครซิสแฟกเตอร์- อัลฟาในน้ำเหลืองเหงือกเพิ่มขึ้น (Bostrom และคณะ, 1999) เพิ่มระดับ
อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า และ อินเตอร์ลิวคิน-8 แต่ลดระดับอินเตอร์ลิวคิน-4 ในน้ำเหลืองเหงือก
(Giannopoulou, Cappuyns และ Mombelli, 2003) โดยที่ทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์- อัลฟา และ
อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า กระตุ้นเซลล์เยื่อผิวสร้างสารเบต้าดีเฟนซิน-2 (Joly และคณะ, 2005)
ในขณะที่อินเตอร์ลิวคิน-4 กดการสร้างสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ของเซลล์เยื่อผิว (Ong และคณะ,
2002) ดังนั้นกลุ่มตัวอย่างที่สูบบุหรี่และเป็นโรคปริทันต์ จึงมีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-
2 มากกว่ากลุ่มตัวอย่างที่ไม่สูบบุหรี่และเป็นโรคปริทันต์

อย่างไรก็ตามจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยการเป็นโรคปริทันต์อีกเสบ และการ
การสูบบุหรี่ต่อการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 พบว่าผู้ที่สูบบุหรี่มีความเสี่ยงที่มีการสร้าง
สารเบต้าดีเฟนซินลดลง 2.11 เท่าเมื่อเทียบกับผู้ที่ไม่สูบบุหรี่ แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.29$)
ในขณะที่ผู้ที่เป็นโรคปริทันต์มีความเสี่ยงที่มีการสร้างสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ลดลง 5.13 เท่าเมื่อเทียบ
กับผู้ที่ไม่เป็นโรคปริทันต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.02$) ดังแสดงในตารางที่ 9 ดังนั้นโรคปริทันต์
อีกเสบจึงมีความสำคัญและมีบทบาทต่อการสร้างสารเบต้าดีเฟนซิน-2 มากกว่าการสูบบุหรี่ ผลของ
การสูบบุหรี่อาจเป็นเพียงปัจจัยดัดแปลง (modifying factor) ที่อาจมีผลปรับเปลี่ยนการแสดงออกของ
สารเบต้าดีเฟนซิน-2 เนื่องจากการสูบบุหรี่มีผลกระตุ้นให้มีการสร้างไซโตไคน์ก่อการอักเสบรวมทั้ง
ปรับเปลี่ยนชนิดแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์ การศึกษาผลของการสูบบุหรี่ต่อการแสดงออกของสาร

เบต้าดีเฟนซิน-2 ในขนาดกลุ่มตัวอย่างที่ใหญ่ขึ้นอาจช่วยให้เห็นความแตกต่างของค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ในกลุ่มผู้สูบบุหรี่ได้ชัดเจนขึ้น

การศึกษานี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 กับเพศและอายุ (รายละเอียดในภาคผนวก) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Bissell และคณะ (2004) รวมทั้งไม่พบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 กับความถี่ร่องปริทันต์ (รายละเอียดในภาคผนวก) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Hosokawa และคณะ (2006)

สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษานี้สรุปได้ว่าสารเบต้าดีเฟนซิน-2 มีบทบาทในพยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์โดยสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ที่ลดลงในผู้ที่เป็โรคปริทันต์ทำให้ความสามารถในการต่อสู้กับการรุกรานของเชื้อแบคทีเรียลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเชื้อที่เพิ่มขึ้นอย่างมากในพื้นที่เป็นโรคปริทันต์ระยะสุดท้าย ยิ่งไปกว่านั้นอาจส่งผลการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้มาหลังเกิด ในการป้องกันการเกิดและการดำเนินไปของโรคปริทันต์

แม้การวิเคราะห์หัตถดอยโลจิสติกในการศึกษานี้ให้เห็นว่าการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ไม่มีความสัมพันธ์กับการสูบบุหรี่ แต่พบว่าในกลุ่มตัวอย่างที่ไม่เป็นโรคปริทันต์การสูบบุหรี่ส่งผลให้ค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ลดลง

ข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้มีข้อจำกัดเรื่องการหาตัวอย่างที่ตรงกับเกณฑ์การคัดเลือกผู้เข้าร่วมการวิจัยและงบประมาณในการจัดซื้อแอนติบอดีปฐภูมิ ทำให้ข้อมูลที่วิเคราะห์มาจากกลุ่มตัวอย่างขนาดเล็ก การศึกษาต่อไปจึงควรศึกษาในกลุ่มตัวอย่างที่มีขนาดใหญ่ขึ้น และอาจทำการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ทั้งในระดับอาร์เอ็นเอ นำรหัสด้วยวิธี เรียลไทม์ พีซีอาร์ และระดับเปปไทด์ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีที่มีการใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์วิเคราะห์สัดส่วนการติดสีของเซลล์ที่มีการแสดงออกของเปปไทด์สารเบต้าดีเฟนซิน-2 กับ ชนิดของเชื้อแบคทีเรียทั้งที่ก่อและไม่ก่อโรคปริทันต์ รวมทั้งไซโตไคน์ก่อการอักเสบ หรือทำการเปรียบเทียบปริมาณสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ในตำแหน่งหรืออกปกติเทียบกับตำแหน่งที่มีการอักเสบในกลุ่มตัวอย่างคนเดียวกัน เพื่อให้มีความเข้าใจในบทบาทของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ในพยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์มากยิ่งขึ้น

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- ศานุดม สุทธิพิศาล., ปิยพร อัยสว่าง., สุพจน์ ตามสายลม., เกศรินทร์ โรจนสมสิทธิ์., ขจร กังสดาด พิภพ., และคณะ. 2549. ความสัมพันธ์ระหว่างการสูบบุหรี่กับสถานะโรคปริทันต์ในพนักงานผู้สูงอายุของการไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย. วิทยาสารทันตแพทยศาสตร์ 56 (3): 187-197.
- สำนักงานสถิติแห่งชาติ. 2547. สรุปผลการสำรวจพฤติกรรมการสูบบุหรี่และการดื่มสุราของประชากรพ.ศ.2547.แหล่งที่มา :http://www.service.nso.go.th/nso/data/02/02_files/cigar_drink_47.pdf. [30 มีนาคม 2550].
- สุทธิชัย กฤษณะประกกรกิจ. 2546. เทคนิคทางอิมูโนวิทยาสำหรับงานวิจัยทางทันตแพทยศาสตร์. วิทยาสารทันตแพทยศาสตร์ 53(2): 131-140.

ภาษาอังกฤษ

- Apatzidou, D. A., Riggio, M. P. and Kinane, D. F. 2005. Impact of smoking on the clinical, microbiological and immunological parameters of adult patients with periodontitis. J Clin Periodontol 32(9): 973-983.
- Azuma, M. 2006. Fundamental mechanisms of host immune responses to infection. J Periodontal Res 41: 361-373.
- Bals, R., Wang, X., Freeman, T., Bafna, V., et al. 1998. Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. J Clin Invest 102(5): 874-880.
- Befus, A. D., Mowat, C., Gilchrist, M., Hu, J., Solomon, S. and Bateman, A. 1999. Neutrophil defensins induce histamine secretion from mast cells: mechanisms of action. J Immunol 163(2): 947-953.
- Bergstrom, J. and Preber, H. 1986. The influence of cigarette smoking on the development of experimental gingivitis. J Periodontal Res 21(6): 668-676.
- Bergstrom, J., Eliasson, S. and Preber, H. 1991. Cigarette smoking and periodontal bone loss. J Periodontol 62(4): 242-246.

- Bissell, J., Heidari, M., Sacco, R. E., Palmquist, D., Guthmiller, J. M. , et al. 2004. Expression of beta-defensins in gingival health and in periodontal disease. J Oral Pathol Med 33(5): 278-285.
- Bostrom, L., Linder, L. E. and Bergstrom, J. 1999. Smoking and cervicular fluid levels of IL-6 and TNF-alpha in periodontal disease. J Clin Periodontol 26(6): 352-357.
- Bostrom, L., Bergstrom, J., Dahlen, G. and Linder, L. E. 2001. Smoking and subgingival microflora in periodontal disease. J Clin Periodontol 28(3): 212-219.
- Calsina, G., Ramon, J. M. and Echeverria, J. J. 2002. Effects of smoking on periodontal tissues. J Clin Periodontol 29(8): 771-776.
- Chang, Y. C., Huang, F. M., Tai, K. W., Yang, L. C. and Chou, M. Y. 2002. Mechanisms of cytotoxicity of nicotine in human periodontal ligament fibroblast cultures in vitro. J Periodontal Res 37(4): 279-285.
- Chung, W. O. and Dale, B. A. 2004. Innate immune response of oral and foreskin keratinocytes: utilization of different signaling pathways by various bacterial species. Infect Immun 72(1): 352-358.
- Clarke, N. G., Shephard, B. C. and Hirsch, R. S. 1981. The effects of intra-arterial epinephrine and nicotine on gingival circulation. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 52(6): 577-582.
- Dale, B. A., Kimball, J. R., Krisanaprakornkit, S., Roberts, F., Robinovitch, M., et al. 2001. Localized antimicrobial peptide expression in human gingiva. J Periodontal Res 36(5): 285-294.
- Dale, B. A. and Krisanaprakornkit, S. 2001. Defensin antimicrobial peptides in the oral cavity. J Oral Pathol Med 30(6): 321-327.
- Dale, B. A. and Fredericks, L. P. 2005. Antimicrobial peptides in the oral environment: expression and function in health and disease. Curr Issues Mol Biol 7(2): 119-133.
- Darveau, R. P., Tanner, A. and Page, R. C. 1997. The microbial challenge in periodontitis. Periodontol 2000 14:12-32.
- De Smet, K. and Contreras, R. 2005. Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. Biotechnol Lett 27(18): 1337-1347.

- Diamond, D. L., Kimball, J. R., Krisanaprakornkit, S., Ganz, T. and Dale, B. A. 2001. Detection of beta-defensins secreted by human oral epithelial cells. J Immunol Methods 256(1-2): 65-76.
- Dommisch, H., Acil, Y., Dunsche, A., Winter, J. and Jepsen, S. 2005. Differential gene expression of human beta-defensins (hBD-1, -2, -3) in inflammatory gingival diseases. Oral Microbiol Immunol 20(3): 186-190.
- Dommisch, H., Winter, J., Willebrand, C., Eberhard, J. and Jepsen, S. 2007. Immune regulatory functions of human beta-defensin-2 in odontoblast-like cells. Int Endod J 40(4): 300-307.
- Duits, L. A., Ravensbergen, B., Rademaker, M., Hiemstra, P. S. and Nibbering, P. H. 2002. Expression of beta-defensin 1 and 2 mRNA by human monocytes, macrophages and dendritic cells. Immunology 106(4): 517-525.
- Duits, L. A., et al. 2003. Rhinovirus increases human beta-defensin-2 and -3 mRNA expression in cultured bronchial epithelial cells. FEMS Immunol Med Microbiol 38(1): 59-64.
- Dunsche, A., Acil, Y., Siebert, R., Harder, J., Schroder, J. M. and Jepsen, S. 2001. Expression profile of human defensins and antimicrobial proteins in oral tissues. J Oral Pathol Med 30(3): 154-158.
- Dunsche, A., Acil, Y., Dommisch, H., Siebert, R., Schroder, J. M. and Jepsen, S. 2002. The novel human beta-defensin-3 is widely expressed in oral tissues. Eur J Oral Sci 110(2): 121-124.
- Flemmig, T. F. 1999. Periodontitis. Ann Periodontol 4(1): 32-8.
- Gallo, R. L., Murakami, M., Ohtake, T. and Zaiou, M. 2002. Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides. J Allergy Clin Immunol 110(6): 823-831.
- Garrison, W. D., Battle, M. A., Yang, C., Kaestner, K. H., Sladek, F. M. and Duncan, S. A. 2006. Hepatocyte nuclear factor 4 alpha is essential for embryonic development of the mouse colon. Gastroenterology 130(4): 1207-1220.
- Giannopoulou, C., Cappuyns, I. and Mombelli, A. 2003. Effect of smoking on gingival crevicular fluid cytokine profile during experimental gingivitis. J Clin Periodontol 30(11): 996-1002.
- Giannopoulou, C., Kamma, J. J. and Mombelli, A. 2003. Effect of inflammation, smoking and stress on gingival crevicular fluid cytokine level. J Clin Periodontol 30(2): 145-153.

- Goldman, M. J., Anderson, G. M., Stolzenberg, E. D., Kari, U. P., Zasloff, M. and Wilson, J. M. 1997. Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. Cell 88(4): 553-560.
- Goultshin, J., Cohen, H. D., Donchin, M., Brayer, L. and Soskolne, W. A. 1990. Association of smoking with periodontal treatment needs. J Periodontol 61(6): 364-367.
- Grossi, S. G., Zambon, J. J., Ho, A. W., Koch, H. G., Dunford, R. G., et al. 1994. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. J Periodontol 65(3): 260-267.
- Grossi, S. G., Genco, R. j., Machetei, E. E., Ho, A.W., Koch, H.G., et al. 1995. Assessment of risk for periodontal disease. II. Risk indicators for alveolar bone loss. J Periodontol 66(1): 23-29.
- Guntsch, A., Erler, M., Preshaw, P. M., Sigusch, B. W., Klinger, G. and Glockmann, E. 2006. Effect of smoking on crevicular polymorphonuclear neutrophil function in periodontally healthy subjects. J Periodontal Res 41(3): 184-188.
- Haffajee, A. D. and Socransky, S. S. 2001. Relationship of cigarette smoking to the subgingival microbiota. J Clin Periodontol 28(5): 377-388.
- Hancock, R. E. and Diamond, G. 2000. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. Trends Microbiol 8(9): 402-410.
- Harder, J., et al. 1997. Mapping of the gene encoding human beta-defensin-2 (DEFB2) to chromosome region 8p22-p23.1. Genomics 46(3): 472-475.
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E. and Schroder, J. M. 2001. Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. J Biol Chem 276(8): 5707-5713.
- Hilgers, K. K. and Kinane, D. F. 2004. Smoking, periodontal disease and the role of the dental profession. Int J Dent Hyg 2(2): 56-63.
- Hollox, E. J., Armour, J. A. and Barber, J. C. 2003. Extensive normal copy number variation of a beta-defensin antimicrobial-gene cluster. Am J Hum Genet 73(3): 591-600.
- Hosokawa, I., Hosokawa, Y., Komatsuzawa, H., Gonclaves, R. B., Karimbux, N., et al. 2006. Innate immune peptide LL-37 displays distinct expression pattern from beta-defensins in inflamed gingival tissue. Clin Exp Immunol 146(2): 218-225.

- Iho, S., Tanaka, Y., Takauji, R., Kobayashi, C., Muramatsu, I., et al. 2003. Nicotine induces human neutrophils to produce IL-8 through the generation of peroxynitrite and subsequent activation of NF-kappaB. J Leukoc Biol 74(5): 942-951.
- Jang, B. C., Lim, K. J., Paik, J. H., Kwon, S. W., et al. 2004. Up-regulation of human beta-defensin 2 by interleukin-1beta in A549 cells: involvement of PI3K, PKC, p38 MAPK, JNK, and NF-kappaB. Biochem Biophys Res Commun 320(3): 1026-1033.
- Ji, S., Kim, Y., Min, B. M., Han, S. and Choi, Y. 2007. Innate immune responses of gingival epithelial cells to nonperiodontopathic and periodontopathic bacteria. Journal Periodontal Res [online]. Available from <http://www.Pubmed.com> [2007, May 1] (doi:10.1111/j.1600-0765.2007.00974.x.).
- Johnson, G. K. and Organ, C. C. 1997. Prostaglandin E2 and interleukin-1 concentrations in nicotine-exposed oral keratinocyte cultures. J Periodontal Res 32(5): 447-454.
- Johnson, G. K. and Guthmiller, J. M. 2007. The impact of cigarette smoking on periodontal disease and treatment. Periodontol 2000 44:178-194.
- Joly, S., Maze, C., McCray, P. B., Jr. and Guthmiller, J. M. 2004. Human beta-defensins 2 and 3 demonstrate strain-selective activity against oral microorganisms. J Clin Microbiol 42(3): 1024-1029.
- Joly, S., Organ, C. C., Johnson, G. K., McCray, P. B., Jr. and Guthmiller, J. M. 2005. Correlation between beta-defensin expression and induction profiles in gingival keratinocytes. Mol Immunol 42(9): 1073-1084.
- Kao, C. Y., Chen, Y., Thai, P., Wachi, S., Huang, F., et al. 2004. IL-17 markedly up-regulates beta-defensin-2 expression in human airway epithelium via JAK and NF-kappaB signaling pathways. J Immunol 173(5): 3482-3491.
- Kerdvongbundit, V. and Wikesjo, U. M. 2000. Effect of smoking on periodontal health in molar teeth. J Periodontol 71(3): 433-437.
- Krisanaprakornkit, S., Kimball, J. R., Weinberg, A., Darveau, R. P., Bainbridge, B. W. and Dale, B. A. 2000. Inducible expression of human beta-defensin 2 by *Fusobacterium nucleatum* in oral epithelial cells: multiple signaling pathways and role of commensal bacteria in innate immunity and the epithelial barrier. Infect Immun 68(5): 2907-2915.

- Krisanaprakornkit, S., Kimball, J. R. and Dale, B. A. 2002. Regulation of human beta-defensin-2 in gingival epithelial cells: the involvement of mitogen-activated protein kinase pathways, but not the NF-kappaB transcription factor family. J Immunol 168(1): 316-324.
- Kuhlmann, C. R., Scharbrodt, W., Schaefer, C. A., Most, A. K., Backenkohler, U., et al. 2005. Discordant effects of nicotine on endothelial cell proliferation, migration, and the inward rectifier potassium current. J Mol Cell Cardiol 38(2): 315-322.
- Lehrer, R. I. 2004. Primate defensins. Nat Rev Microbiol 2(9): 727-738.
- Liu, A. Y., Destoumieux, D., Wong, A. V., Park, C. H., Valore, E. V., et al. 2002. Human beta-defensin-2 production in keratinocytes is regulated by interleukin-1, bacteria, and the state of differentiation. J Invest Dermatol 118(2): 275-281.
- Loos, B. G., Roos, M. T., Schellekens, P. T., van der Velden, U. and Miedema, F. 2004. Lymphocyte numbers and function in relation to periodontitis and smoking. J Periodontol 75(4): 557-564.
- Lu, Q., Jin, L., Darveau, R. P. and Samaranayake, L. P. 2004. Expression of human beta-defensins-1 and -2 peptides in unresolved chronic periodontitis. J Periodontal Res 39(4): 221-227.
- Lu, Q., Samaranayake, L. P., Darveau, R. P. and Jin, L. 2005. Expression of human beta-defensin-3 in gingival epithelia. J Periodontal Res 40(6): 474-481.
- Mahanonda, R. and Pichyangkul, S. 2007. Toll-like receptors and their role in periodontal health and disease. Periodontol 2000 43:41-55.
- Marshall, R. I. 2004. Gingival defensins: linking the innate and adaptive immune responses to dental plaque. Periodontol 2000 35:14-20.
- Martinez-Canut, P., Lorca, A. and Magan, R. 1995. Smoking and periodontal disease severity. J Clin Periodontol 22(10): 743-749.
- Mathews, M., Jia, H. P., Guthmiller, J. M., Losh, G., et al. 1999. Production of beta-defensin antimicrobial peptides by the oral mucosa and salivary glands. Infect Immun 67(6): 2740-2745.
- McGuire, M. K. 1991. Prognosis versus actual outcome: a long-term survey of 100 treated periodontal patients under maintenance care. J Periodontol 62(1): 51-58.

- Nishimura, M., Abiko, Y., Kurashige, Y., Takeshima, M., Yamazaki, M., et al. 2004. Effect of defensin peptides on eukaryotic cells: primary epithelial cells, fibroblasts and squamous cell carcinoma cell lines. J Dermatol Sci 36(2): 87-95.
- Niyonsaba, F., Someya, A., Hirata, M., Ogawa, H. and Nagaoka, I. 2001. Evaluation of the effects of peptide antibiotics human beta-defensins-1/2 and LL-37 on histamine release and prostaglandin D(2) production from mast cells. Eur J Immunol 31(4): 1066-1075.
- Niyonsaba, F., Ogawa, H. and Nagaoka, I. 2004. Human beta-defensin-2 functions as a chemotactic agent for tumour necrosis factor-alpha-treated human neutrophils. Immunology 111(3): 273-281.
- Niyonsaba, F. and Ogawa, H. 2005. Protective roles of the skin against infection: implication of naturally occurring human antimicrobial agents beta-defensins, cathelicidin LL-37 and lysozyme. J Dermatol Sci 40(3): 157-168.
- Niyonsaba, F., Ushio, H., Nagaoka, I., Okumura, K. and Ogawa, H. 2005. The human beta-defensins (-1, -2, -3, -4) and cathelicidin LL-37 induce IL-18 secretion through p38 and ERK MAPK activation in primary human keratinocytes. J Immunol 175(3): 1776-1784.
- Ohara, T., Morishita, T., Suzuki, H., Masaoka, T., Nagata, H. and Hibi, T. 2004. Pathophysiological role of human beta-defensins 2 in gastric mucosa. Int J Mol Med 14(6): 1023-1027.
- Ong, P. Y., Takaaki, O., Brandt, C., Strickland, I, Boguniewicz, M., et al. 2002. Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. N Engl J Med 347(15): 1151-1160.
- Oppenheim, J. J., Biragyn, A., Kwak, L. W. and Yang, D. 2003. Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. Ann Rheum Dis 62 Suppl 2:17-21.
- Oren, A., Ganz, T., Liu, L. and Meerloo, T. 2003. In human epidermis, beta-defensin 2 is packaged in lamellar bodies. Exp Mol Pathol 74(2): 180-182.
- Ouhara, K., Komatsuzawz, H., Yamada, S., Shiba, H., Fujiwara, T., et al. 2005. Susceptibilities of periodontopathogenic and cariogenic bacteria to antibacterial peptides, beta-defensins and LL37, produced by human epithelial cells. J Antimicrob Chemother 55(6): 888-896.
- Ouhara, K., Komatsuzawa, H., Shiba, H., Uchida, Y., Kawai, T., et al. 2006. Actinobacillus actinomycetemcomitans outer membrane protein 100 triggers innate immunity and

- production of beta-defensin and the 18-kilodalton cationic antimicrobial protein through the fibronectin-integrin pathway in human gingival epithelial cells. Infect Immun 74(9): 5211-5220.
- Pabst, M. J., Pabst, K. M., Collier, J. A., Coleman, T. C., Lemons-Prince, M.L., et al. 1995. Inhibition of neutrophil and monocyte defensive functions by nicotine. J Periodontol 66(12): 1047-1055.
- Pacova, H., Kucera, T., Astl, J. and Martinek, J. 2004. Detection of beta-defensins and NOS in healthy and pathological nasal mucosa. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 148(2): 239-240.
- Palmer, R. M., Wilson, R. F., Hasan, A. S. and Scott, D. A. 2005. Mechanisms of action of environmental factors--tobacco smoking. J Clin Periodontol 32 Suppl 6:180-195.
- Patrick, D. L., Cheadle, A., Thompson, D. C., Diehr, P., Koepsell, T. and Kinne, S. 1994. The validity of self-reported smoking: a review and meta-analysis. Am J Public Health 84(7): 1086-1093.
- Persson, L., Bergstrom, J., Ito, H. and Gustafsson, A. 2001. Tobacco smoking and neutrophil activity in patients with periodontal disease. J Periodontol 72(1): 90-95.
- Preber, H., Bergstrom, J. and Linder, L. E. 1992. Occurrence of periopathogens in smoker and non-smoker patients. J Clin Periodontol 19(9): 667-671.
- Ryder, M. I. 2007. The influence of smoking on host responses in periodontal infections. Periodontol 2000 43:267-277.
- Salvi, G. E., Brown, C. E., Fujihashi, K., Kiyono, H., Smith, F. W., et al. 1998. Inflammatory mediators of the terminal dentition in adult and early onset periodontitis. J Periodontal Res 33(4): 212-225.
- Sawaki, K., Mizukawa, N., Yamaai, T., Fukunaga, J. and Sugahara, T. 2002. Immunohistochemical study on expression of alpha-defensin and beta-defensin-2 in human buccal epithelia with candidiasis. Oral Dis 8(1): 37-41.
- Schroder, J. M. 1999. Epithelial antimicrobial peptides: innate local host response elements. Cell Mol Life Sci 56(1-2): 32-46.
- Scott, D. A., Palmer, R. M. and Stapleton, J. A. 2001. Validation of smoking status in clinical research into inflammatory periodontal disease. J Clin Periodontol 28(8): 715-722.

- Sorensen, O. E., Thapa, D. R., Rosenthal, A., Liu, L., Roberts, A. A. and Ganz, T. 2005. Differential regulation of beta-defensin expression in human skin by microbial stimuli. J Immunol 174(8): 4870-4879.
- Stoltenberg, J. L., Osborn, J. B., Pihlstrom, B. L., Herzberg, M. C., Aeppli, D. M., et al. 1993. Association between cigarette smoking, bacterial pathogens, and periodontal status. J Periodontol 64(12): 1225-1230.
- Sugawara, Y., Uehara, A., Fujimoto, Y., Kusumoto, K., Fukase, K., et al. 2006. Toll-like receptors, NOD1, and NOD2 in oral epithelial cells. J Dent Res 85(6): 524-529.
- Supp, D. M., Karpinski, A. C. and Boyce, S. T. 2004. Expression of human beta-defensins HBD-1, HBD-2, and HBD-3 in cultured keratinocytes and skin substitutes. Burns 30(7): 643-648.
- Torrunguang, K., Nisapakultorn, K., Sutdhibhisal, S., Tamsailom, S., Rojanasomsith, K., et al. 2005. The effect of cigarette smoking on the severity of periodontal disease among older Thai adults. J Periodontol 76(4): 566-572.
- Torrunguang, K., Tamsailom, S., Rojanasomsith, K., Sutdhibhisal, S., Nisapakultorn, K., et al. 2005. Risk indicators of periodontal disease in older Thai adults. J Periodontol 76(4): 558-565.
- Umeda, M., Chen, C., Bakker, I., Contreras, A., Morrison, J. L. and Slots, J. 1998. Risk indicators for harboring periodontal pathogens. J Periodontol 69(10): 1111-1118.
- Vankeerberghen, A., Nuytten, H., Dierickx, K., Quirynen, M., Cassiman, J. J. and Cuppens, H. 2005. Differential induction of human beta-defensin expression by periodontal commensals and pathogens in periodontal pocket epithelial cells. J Periodontol 76(8): 1293-1303.
- Vora, P., Youdin, A., Thomas, L. S., Fukata, M., Tesfay, S. Y., et al. 2004. Beta-defensin-2 expression is regulated by TLR signaling in intestinal epithelial cells. J Immunol 173(9): 5398-5405.
- Wallace, A. M., He, J. Q., Burkett, K. M., Ruan, J., Connett, J. E., et al. 2006. Contribution of alpha- and beta-defensins to lung function decline and infection in smokers: an association study. Respir Res 7:76-83.

- Weinberg, A., Krisanaprakornkit, S. and Dale, B. A. 1998. Epithelial antimicrobial peptides: review and significance for oral applications. Crit Rev Oral Biol Med 9(4): 399-414.
- Yang, D., et al. 1999. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. Science 286(5439): 525-528.
- Yang, D., Biragyn, A., Kwak, L. W. and Oppenheim, J. J. 2002. Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. Trends Immunol 23(6): 291-296.
- Zambon, J. J., Grossi, S. G., Machtei, E. E., Ho, A. W., Dunford, R. and Genco, R. J. 1996. Cigarette smoking increases the risk for subgingival infection with periodontal pathogens. J Periodontol 67(10 Suppl): 1050-1054.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

เอกสารแนะนำและใบยินยอมด้วยความสมัครใจสำหรับอาสาสมัคร

โครงการวิทยานิพนธ์เรื่อง “ผลของการสูบบุหรี่ที่มีต่อการแสดงออกของ เบต้าดีเฟนซิน- 2 ในโรคปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรัง” โดย ทันตแพทย์หญิง สุพรรณพร เต็มทอง ในความดูแลของ อาจารย์ทันตแพทย์ชจร กังสดาลพิภพ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทรศัพท์ 0-2218-8850

โครงการวิทยานิพนธ์นี้เป็นการศึกษาว่าโรคปริทันต์เกิดขึ้นได้อย่างไร โดยการนำชิ้นเนื้อที่จะถูกทิ้งไปในการถอนฟัน การผ่าฟันกรามที่สุดท้าย หรือการผ่าตัดเหงือกเพื่อเพิ่มความยาวฟัน มาใช้ในการศึกษาวิจัยบทบาทของสาร เบต้าดีเฟนซิน- 2 ในขบวนการเกิดโรคปริทันต์จากชิ้นเนื้อที่ไม่ต้องการนี้เพื่อนำไปสู่ความเข้าใจถึงการเกิดโรคปริทันต์ อันจะนำไปสู่การป้องกันและรักษาโรคปริทันต์ให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ทั้งนี้ การถอนฟันและการผ่าตัดดังกล่าวเป็นส่วนหนึ่งของการรักษาโรคให้แก่ผู้ป่วยอยู่แล้ว จึงไม่เป็นอันตรายแก่ผู้ป่วยแต่อย่างใด

การเปิดเผยข้อมูลการวิจัย จะเป็นในรูปการสรุปผลการวิจัย เสนอต่อผู้มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสนับสนุนและกำกับดูแลการวิจัย

วันให้ความยินยอม วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ก่อนที่จะลงนามในใบยินยอมเป็นอาสาสมัครในโครงการวิจัยนี้ ข้าพเจ้าได้รับการอธิบายจากผู้วิจัย ถึงวัตถุประสงค์การวิจัย วิธีการวิจัย รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด และมีความเข้าใจดีแล้ว

ผู้วิจัยรับรองว่าจะตอบคำถามต่าง ๆ ที่ข้าพเจ้าสงสัยด้วยความเต็มใจ ไม่ปิดบัง ซ่อนเร้น จนข้าพเจ้าเข้าใจ

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลเฉพาะเกี่ยวกับตัวข้าพเจ้าเป็นความลับและเปิดเผยได้เฉพาะในรูปที่เป็นสรุปผลการวิจัย หรือการเปิดเผยข้อมูลต่อผู้มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสนับสนุนและกำกับดูแลการวิจัย

ข้าพเจ้าได้อ่านข้อความข้างต้น และมีความเข้าใจดีทุกประการ จึงได้ลงนามในใบยินยอมนี้ด้วยความเต็มใจ

ลงนาม.....ผู้ยินยอม อายุ.....ปี

ลงนาม.....พยาน

ลงนาม.....พยาน

แบบสอบถามการสูบบุหรี่

คำชี้แจง แบบสอบถามการสูบบุหรี่มีวัตถุประสงค์เพื่อทำการสำรวจข้อมูลเบื้องต้น เกี่ยวกับลักษณะการสูบบุหรี่ พฤติกรรมการสูบและปริมาณการสูบบุหรี่ของผู้เข้าร่วมวิจัยเรื่องผลของการสูบบุหรี่ที่มีต่อการแสดงออกของเบต้าดีเฟนซิน- 2 ในโรคปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรัง

แบบสอบถามแบ่งออกเป็น 4 ส่วน

ส่วนที่ 1 เป็นการถามข้อมูลทั่วไป

ส่วนที่ 2 เป็นต้นไปจะเป็นการถามเกี่ยวกับลักษณะการสูบบุหรี่

ส่วนที่ 3 เป็นแบบสอบถามเฉพาะผู้ที่กำลังสูบบุหรี่อยู่ในปัจจุบัน

ส่วนที่ 4 เป็นแบบสอบถามเฉพาะผู้ที่ไม่ได้สูบบุหรี่อยู่ในปัจจุบันแต่เคยสูบบุหรี่ในอดีต

ขอความกรุณาในการกรอกรายละเอียดและเลือกข้อคำตอบตามความเป็นจริงให้ครบถ้วน

ส่วนที่ 1 ข้อมูลทั่วไป

1. ชื่อ.....สกุล.....H.N.....
2. เพศ 1. ชาย 2. หญิง
3. ปัจจุบันอายุ.....ปี
4. ท่านมีโรคประจำตัวหรือไม่
 1. ไม่มี
 2. มี เป็นโรค.....
5. ท่านมียาประจำหรือไม่
 1. ไม่มี
 2. มี ชื่อยา.....

ส่วนที่ 2 ข้อมูลเกี่ยวกับการสูบบุหรี่

1. ปัจจุบันท่านสูบบุหรี่หรือไม่
 1. สูบ (กรุณาตอบแบบสอบถามต่อในส่วนที่ 3)
 2. ไม่สูบ (กรุณาตอบแบบสอบถามต่อในส่วนที่ 4)

ส่วนที่3 สำหรับผู้ที่ตอบว่ากำลังสูบบุหรี่อยู่ในปัจจุบัน

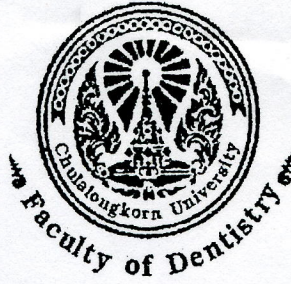
1. ถ้าท่านสูบบุหรี่ ปัจจุบันนี้ท่านสูบบุหรี่เฉลี่ยวันละกี่มวน.....มวน
 2. ตอนที่ท่านเริ่มสูบบุหรี่หรืออย่างสม่ำเสมอท่านอายุเท่าไร.....ปี
- จบการทำแบบสอบถาม ขอบพระคุณที่สละเวลาตอบแบบสอบถาม

ส่วนที่4 สำหรับผู้ที่ตอบว่าไม่ได้สูบบุหรี่อยู่ในปัจจุบัน

1. ท่านเคยสูบบุหรี่หรือไม่
 - 1.เคยสูบ (กรุณาทำแบบสอบถามต่อ)
 2. ไม่เคยสูบ(หยุดการตอบแบบสอบถาม)
2. ตอนที่ท่านเริ่มสูบบุหรี่หรืออย่างสม่ำเสมอท่านอายุเท่าไร.....ปี
3. ขณะที่ท่านสูบบุหรี่ ท่านสูบบุหรี่เฉลี่ยวันละกี่มวน.....มวน
4. ตอนที่ท่านเลิกสูบบุหรี่ท่านอายุเท่าไร.....ปี

จบการทำแบบสอบถาม ขอบพระคุณที่สละเวลาตอบแบบสอบถาม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



No. 18/2006

Study Protocol and Consent Form Approval

The Ethics Committee of the Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand has approved the following study to be carried out according to the protocol and informed consent dated and/or amended as follows in compliance with the ICH/GCP.

| | |
|------------------------|--|
| Study Title | :Expression of β -Defensin Peptides in Chronic Periodontitis |
| Study Code | :- |
| Center | :Chulalongkorn University |
| Principle Investigator | :Dr. Kajorn Kungsadalpipob |
| Protocol Date | :June 23, 2006 |
| Document Reviewed | :August 1, 2006 |

Surasith Kiatpongsan

(Associate Professor Surasith Kiatpongsan)
Chairman of Ethics Committee

Suchit Poolthong

(Assistant Professor Dr. Suchit Poolthong)
Deputy Dean for Research

| | |
|------------------|------------------|
| Date of Approval | :August 15, 2006 |
| Approval Expires | :August 15, 2008 |

*A list of the Ethics Committee members (names and positions) present at the Ethics Committee meeting on the date of approval of this study has been attached (upon requested). This Study Protocol Approval Form will be forwarded to the Principal Investigator.

ข้อมูลและรายละเอียดเกี่ยวกับการทำวิจัยที่ใช้ประกอบ

การพิจารณาเข้าร่วมโครงการ (Inform Consent)

โครงการวิจัยเรื่อง “การแสดงออกเปปไทด์เบต้าดีเฟนซินในโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรัง” มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการแสดงออกของเบต้าดีเฟนซิน ซึ่งเป็นสารที่ร่างกายสร้างขึ้นมาเพื่อต่อสู้กับเชื้อโรค โดยตรวจวัดปริมาณของสารนี้ในเหงือกของอาสาสมัคร ที่ได้รับหัตถการต่าง ๆ ดังนี้

1. เหงือกบริเวณฟันกรามซี่สุดท้ายที่ต้องทำการผ่าตัดฟันคุดออก
2. เหงือกบริเวณฟันที่ได้รับการทำศัลยกรรมปริทันต์
3. เหงือกบริเวณฟันที่ต้องได้รับการถอนจากเหตุโรคปริทันต์
4. เหงือกบริเวณฟันกรามน้อยที่วางแผนถอนตามแผนการการรักษาด้วยการจัดฟัน

ซึ่งการวิจัยนี้จะทำการเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อเหงือกรอบตัวฟันที่จะต้องได้รับการผ่าตัด โดยชิ้นเหงือกต้องถูกตัดออกไปตามขั้นตอนการรักษาปกติ โดยที่อาสาสมัครไม่ได้รับความเสียหายแต่ประการใด ในกรณีที่เป็นชิ้นเหงือกจากฟันที่ต้องถอนการตัดชิ้นเหงือกออกเล็กน้อยแทบจะไม่มีผลต่อการหายของแผล แต่ทั้งนี้หากเกิดการแทรกซ้อน เช่น เลือดออก แผลหายช้า หรือมีการติดเชื้อ เป็นต้น ทางคณะผู้วิจัยจะทำการดูแลรักษาอาสาสมัครจนแผลหายเป็นปกติ

เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครเพื่อเข้าร่วมวิจัย ประกอบด้วย

1. อายุมากกว่าหรือเท่ากับ 20 ปี ทั้งเพศชายและหญิง
2. ไม่มีการสูญเสียระดับการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์ ในฟันกรามซี่ที่หนึ่ง หรือฟันคู่หน้า
3. ไม่ได้รับการบำบัดทางปริทันต์ในช่วงเวลา 1 ปีก่อนเข้าร่วมงานวิจัย
4. สุขภาพแข็งแรงไม่มีภาวะทางระบบเช่น โรคเบาหวาน อยู่ในขณะตั้งครรภ์ เป็นโรคเมเรียมิดเลือดขาว หรือรับประทานยาที่มีผลต่อเหงือก
5. ไม่มีความเสี่ยงต่อการเกิดการติดเชื้อภายหลังการทำศัลยกรรมในช่องปาก

ตามขั้นตอนการผ่าตัด การถอนฟัน

การวิจัยนี้อาสาสมัครไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายใด ๆ ทั้งสิ้นในการเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อเหงือก ไม่ได้รับค่าตอบแทนและไม่ได้ประโยชน์โดยตรงจากการเข้าร่วมการวิจัย แต่ผลของการวิจัยในครั้งนี้มีส่วนช่วยให้เกิดความเข้าใจถึงผลของการสูญบุหรือต่อพยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์ซึ่งจะนำไปสู่การป้องกันและรักษาโรคแก่ประชาชนส่วนรวมต่อไป

การเข้าร่วมเป็นอาสาสมัครในโครงการวิจัยขอให้ไปโดยความสมัครใจ อาสาสมัครอาจปฏิเสธที่จะเข้าร่วม หรือถอนตัวออกจากการวิจัยได้ทุกขณะ โดยไม่ต้องได้รับโทษ หรือสูญเสียประโยชน์ที่พึงได้รับ

ผู้กำกับดูแลการวิจัย ผู้ตรวจสอบ คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรม และคณะกรรมการที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมยา สามารถเข้าไปตรวจสอบบันทึกข้อมูลทางการแพทย์ของอาสาสมัคร

เพื่อเป็นการยืนยันถึงขั้นตอนในการวิจัยทางคลินิกและข้อมูลอื่น ๆ โดยไม่ล่วงละเมิดเอกสิทธิ์ในการปิดบังข้อมูลของอาสาสมัครตามกรอบที่กฎหมายและกฎระเบียบได้อนุญาตไว้ นอกจากนี้ โดยการเซ็นให้ความยินยอม อาสาสมัครหรือผู้แทนตามกฎหมายจะมีสิทธิตรวจสอบและมีสิทธิที่จะได้รับข้อมูลด้วยเช่นกัน

ข้อมูลนี้อาจนำไปสู่การเปิดเผยตัวของอาสาสมัคร จะได้รับการปกปิด และยกเว้นว่าได้รับคำยินยอมไว้โดยกฎระเบียบและกฎหมายที่เกี่ยวข้องเท่านั้นจึงจะเปิดเผยข้อมูลแก่สาธารณชนได้

ในกรณีที่ผลการวิจัยได้รับการตีพิมพ์ ชื่อและที่อยู่ของอาสาสมัครจะต้องได้รับการปกปิดอยู่เสมอ

อาสาสมัครหรือผู้แทนตามกฎหมายจะได้รับแจ้งโดยทันท่วงทีในกรณีที่มีข้อมูลใหม่ซึ่งอาจใช้ประกอบการตัดสินใจของอาสาสมัครว่าจะยังคงเข้าร่วมในโครงการวิจัยต่อไปได้หรือไม่

จำนวนของอาสาสมัครที่จะใช้ในการวิจัยครั้งนี้มีประมาณ 40 คน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

ข้อมูลแสดงรายละเอียดของกลุ่มตัวอย่างและค่าร้อยละของเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อเบต้าดีเฟนซิน-2

ตารางที่ ผ-1 แสดงค่าร้อยละ ค่าเฉลี่ยร้อยละ และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) ของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 (HBD-2) ในกลุ่มตัวอย่างที่ไม่สูบบุหรี่และไม่เป็นโรคปริทันต์

| กลุ่มตัวอย่างคนที่ | ค่าร้อยละของเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อHBD-2 | อายุ (ปี) | เพศ | ร่องลึกปริทันต์ (มม.) | จำนวนสุม (มวน/วัน) | ระยะเวลาสูบบุหรี่ (ปี) | โรคประจำตัว | ยาประจำ |
|--------------------|--------------------------------------|-----------|-----|-----------------------|--------------------|------------------------|-------------|-----------------|
| 1 | 89.89 | 60 | ช | 3 | 0 | 0 | ไม่มี | ไม่มี |
| 2 | 82.22 | 22 | ญ | 3 | 0 | 0 | G-6-PD | ไม่มี |
| 3 | 74.83 | 26 | ช | 3 | 0 | 0 | ไม่มี | ไม่มี |
| 4 | 67.75 | 23 | ญ | 3 | 0 | 0 | ไม่มี | ไม่มี |
| 5 | 67.38 | 30 | ญ | 3 | 0 | 0 | ไม่มี | ไม่มี |
| 6 | 64.65 | 45 | ช | 3 | 0 | 0 | ซีมีเคร้า | ยาด้านซีมีเคร้า |
| 7 | 60.96 | 65 | ญ | 3 | 0 | 0 | ไม่มี | ไม่มี |
| 8 | 56.72 | 26 | ช | 3 | 0 | 0 | ไม่มี | ไม่มี |
| 9 | 55.02 | 21 | ช | 3 | 0 | 0 | ไม่มี | ไม่มี |
| 10 | 51.53 | 21 | ช | 3 | 0 | 0 | ไม่มี | ไม่มี |
| ค่าเฉลี่ย | 67.09 | 33.90 | - | 3.00 | 0.00 | 0.00 | - | - |
| S.D. | 12.23 | 16.68 | - | 0.00 | 0.00 | 0.00 | - | - |

ตารางที่ ๘-2 แสดงค่าร้อยละ ค่าเฉลี่ยร้อยละ และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) ของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 (HBD-2) ในกลุ่มตัวอย่างที่ไม่สูบบุหรี่และเป็นโรคปริทันต์

| กลุ่มตัวอย่างคนที่ | ค่าร้อยละของเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อHBD-2 | อายุ (ปี) | เพศ | ร่องลึกปริทันต์ (มม.) | จำนวน зуб (มวน/วัน) | ระยะ เวลาสูบ (ปี) | โรคประจำตัว | ยาประจำ |
|--------------------|--------------------------------------|-----------|-----|-----------------------|---------------------|-------------------|-----------------|-----------------|
| 1 | 77.26 | 57 | ช | 8 | 0 | 0 | ไม่มี | ไม่มี |
| 2 | 62.71 | 60 | ช | 7 | 0 | 0 | ไม่มี | ไม่มี |
| 3 | 58.10 | 47 | ญ | 5 | 0 | 0 | ไม่มี | ไม่มี |
| 4 | 56.23 | 63 | ช | 12 | 0 | 0 | ไม่มี | ไม่มี |
| 5 | 43.79 | 46 | ญ | 6 | 0 | 0 | ไม่มี | ไม่มี |
| 6 | 42.04 | 50 | ช | 6 | 0 | 0 | ความดันโลหิตสูง | HCTZ Inderal |
| 7 | 41.52 | 44 | ญ | 6 | 0 | 0 | ไม่มี | ไม่มี |
| 8 | 38.57 | 68 | ญ | 12 | 0 | 0 | เบาหวาน | MET |
| 9 | 31.05 | 66 | ญ | 13 | 0 | 0 | ไม่มี | ไม่มี |
| 10 | 30.30 | 36 | ญ | 7 | 0 | 0 | ไม่มี | ไม่มี |
| เฉลี่ย | 46.52 | 52.70 | - | 8.30 | 0.00 | 0.00 | - | - |
| S.D. | 12.08 | 10.76 | - | 3.12 | 0.00 | 0.00 | - | - |

หมายเหตุ HCTZ หมายถึง ยาขับปัสสาวะ(diuretics) Hydrochlorthiazide
 Inderal[®] ชื่อสามัญคือ Propranolol เป็นยาลดความดันโลหิตในกลุ่ม Nonselective Beta-Adrenergic Blockers
 MET หมายถึง ยาลดระดับน้ำตาลในเลือด Metformin

ตารางที่ ๘-3 แสดงค่าร้อยละ ค่าเฉลี่ยร้อยละ และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) ของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 (HBD-2) ในกลุ่มตัวอย่างที่สูบบุหรี่และไม่เป็นโรคปริทันต์

| กลุ่มตัวอย่างคนที่ | ค่าร้อยละของเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อHBD-2 | อายุ (ปี) | เพศ | ร่องลึกปริทันต์ (มม.) | จำนวนสูบ (มวน/วัน) | ระยะเวลาสูบ (ปี) | โรคประจำตัว | ยาประจำ |
|--------------------|--------------------------------------|-----------|-----|-----------------------|--------------------|------------------|-------------|----------|
| 1 | 77.66 | 20 | ช | 3 | 10 | 3 | ไม่มี | ไม่มี |
| 2 | 59.54 | 50 | ช | 3 | 10 | 20 | ไม่มี | ไม่มี |
| 3 | 59.35 | 57 | ช | 3 | 20 | 25 | ความดันสูง | Prenolol |
| 4 | 58.98 | 37 | ญ | 3 | 10 | 10 | ไม่มี | ไม่มี |
| 5 | 57.75 | 54 | ช | 3 | 10 | 30 | ไม่มี | ไม่มี |
| 6 | 52.66 | 45 | ญ | 3 | 10 | 2 | ไม่มี | ไม่มี |
| 7 | 49.59 | 47 | ช | 3 | 10 | 27 | ไม่มี | ไม่มี |
| 8 | 49.58 | 24 | ช | 3 | 20 | 2 | ไม่มี | ไม่มี |
| 9 | 47.42 | 41 | ช | 3 | 10 | 23 | ไม่มี | ไม่มี |
| 10 | 35.06 | 58 | ช | 3 | 20 | 30 | ไม่มี | ไม่มี |
| ค่าเฉลี่ย | 54.75 | 43.30 | - | 3.00 | 13.00 | 17.20 | - | - |
| S.D. | 11.03 | 13.08 | - | 0.00 | 4.83 | 11.74 | - | - |

หมายเหตุ Prenolol[®] ชื่อสามัญคือ Atenolol เป็นยาลดความดันโลหิตในกลุ่ม cardioselective Beta-Adrenergic Blockers

ตารางที่ ๘-4 แสดงค่าร้อยละ ค่าเฉลี่ยร้อยละ และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) ของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 (HBD-2) ในกลุ่มตัวอย่างที่สูบบุหรี่และเป็นโรคปริทันต์

| กลุ่มตัวอย่างคนที่ | ค่าร้อยละของเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อHBD-2 | อายุ (ปี) | เพศ | ร่องลึกปริทันต์ (มม.) | จำนวนสูบ (มวน/วัน) | ระยะเวลาสูบ(ปี) | โรคประจำตัว | ยาประจำ |
|--------------------|--------------------------------------|-----------|-----|-----------------------|--------------------|-----------------|-------------|-----------|
| 1 | 71.78 | 45 | ช | 8 | 10 | 22 | ไม่มี | ไม่มี |
| 2 | 71.49 | 40 | ช | 10 | 15 | 22 | ไม่มี | ไม่มี |
| 3 | 69.09 | 50 | ช | 6 | 20 | 31 | ไม่มี | วิตามินบี |
| 4 | 66.27 | 61 | ญ | 6 | 10 | 15 | ไม่มี | ไม่มี |
| 5 | 63.43 | 41 | ช | 9 | 10 | 27 | ไม่มี | ไม่มี |
| 6 | 48.51 | 48 | ช | 7 | 10 | 20 | ไม่มี | ไม่มี |
| 7 | 46.47 | 54 | ช | 7 | 20 | 30 | ไม่มี | ไม่มี |
| 8 | 42.45 | 53 | ช | 12 | 15 | 13 | ความดันสูง | HCTZ |
| 9 | 27.34 | 53 | ช | 10 | 20 | 30 | ไม่มี | ไม่มี |
| 10 | 15.59 | 47 | ช | 9 | 10 | 30 | ไม่มี | ไม่มี |
| ค่าเฉลี่ย | 52.24 | 49.20 | - | 8.40 | 14.00 | 24.00 | - | - |
| S.D. | 19.62 | 6.39 | - | 1.95 | 4.59 | 6.60 | - | - |

หมายเหตุ HCTZ หมายถึง ยาขับปัสสาวะ (diuretics) Hydrochlorthiazide

สถาบันนวัตยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค
ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

1. แสดงจำนวนกลุ่มตัวอย่างทั้งหมดที่เข้าร่วมการวิจัยจำแนกตามเพศ การมีโรคประจำตัว การใช้ยาประจำ การสูบบุหรี่ และการเป็นโรคปริทันต์

| | | group of experiment | | | | Group Total |
|---|--------------------|---------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------|
| | | nonsmok -healthy | nonsmok disease | smoke- healthy | smoke- disease | |
| sex | male | 6 | 3 | 9 | 9 | 27 |
| | female | 4 | 7 | 1 | 1 | 13 |
| Group Total | | 10 | 10 | 10 | 10 | 40 |
| ผู้ป่วยมีโรค ประจำตัวหรือไม่ | ไม่มีโรคประจำตัว | 8 | 8 | 9 | 9 | 34 |
| | มีโรคประจำตัว | 2 | 2 | 1 | 1 | 6 |
| Group Total | | 10 | 10 | 10 | 10 | 40 |
| ผู้ป่วยมียาประจำ หรือไม่ | ไม่มียาประจำ | 9 | 8 | 9 | 8 | 34 |
| | มียาประจำ | 1 | 2 | 1 | 2 | 6 |
| Group Total | | 10 | 10 | 10 | 10 | 40 |
| สูบบุหรี่หรือไม่ | ไม่สูบ | 10 | 10 | | | 20 |
| | สูบ | | | 10 | 10 | 20 |
| Group Total | | 10 | 10 | 10 | 10 | 40 |
| มีการอักเสบ(เป็น โรคปริทันต์)หรือไม่ | ไม่เป็นโรคปริทันต์ | 10 | | 10 | | 20 |
| | เป็นโรคปริทันต์ | | 10 | | 10 | 20 |
| Group Total | | 10 | 10 | 10 | 10 | 40 |

2. แสดงค่าอายุ ความลึกร่องปริทันต์ ปริมาณและ พฤติกรรมการสูบบุหรี่ของกลุ่มตัวอย่าง ทั้งหมดที่เข้าร่วมในการวิจัย

Descriptive Statistics

| | N | Minimum | Maximum | Mean | Std. Deviation |
|----------------------|----|---------|---------|--------|----------------|
| age in year | 40 | 20 | 68 | 44.77 | 13.852 |
| pocket depth | 40 | 2 | 13 | 5.65 | 3.262 |
| จำนวนวันที่สูบต่อวัน | 40 | 0 | 20 | 6.75 | 7.557 |
| จำนวนปีที่สูบบุหรี่ | 40 | 0 | 31 | 10.30 | 12.515 |
| pack year | 40 | .00 | 31.00 | 6.8738 | 9.92438 |
| Valid N (listwise) | 40 | | | | |

3. แสดงค่าอายุ ความลึกร่องปริทันต์ ปริมาณและ ระยะเวลาการสูบบุหรี่ของกลุ่มตัวอย่างรายกลุ่ม

Descriptive Statistics

| group of experiment | | N | Minimum | Maximum | Mean | Std. Deviation |
|---------------------|----------------------|----|---------|---------|---------|----------------|
| nonsmoke-healthy | age in year | 10 | 21 | 65 | 33.90 | 16.683 |
| | pocket depth | 10 | 3 | 3 | 3.00 | .000 |
| | จำนวนมวนที่สูบต่อวัน | 10 | 0 | 0 | .00 | .000 |
| | จำนวนปีที่สูบบุหรี่ | 10 | 0 | 0 | .00 | .000 |
| | pack year | 10 | .00 | .00 | .0000 | .00000 |
| | Valid N (listwise) | 10 | | | | |
| nonsmoke-disease | age in year | 10 | 36 | 68 | 52.70 | 10.761 |
| | pocket depth | 10 | 5 | 13 | 8.30 | 3.129 |
| | จำนวนมวนที่สูบต่อวัน | 10 | 0 | 0 | .00 | .000 |
| | จำนวนปีที่สูบบุหรี่ | 10 | 0 | 0 | .00 | .000 |
| | pack year | 10 | .00 | .00 | .0000 | .00000 |
| | Valid N (listwise) | 10 | | | | |
| smoke-healthy | age in year | 10 | 20 | 58 | 43.30 | 13.081 |
| | pocket depth | 10 | 2 | 3 | 2.90 | .316 |
| | จำนวนมวนที่สูบต่อวัน | 10 | 10 | 20 | 13.00 | 4.830 |
| | จำนวนปีที่สูบบุหรี่ | 10 | 2 | 30 | 17.20 | 11.745 |
| | pack year | 10 | 1.00 | 30.00 | 10.7000 | 9.97274 |
| | Valid N (listwise) | 10 | | | | |
| smoke-disease | age in year | 10 | 40 | 61 | 49.20 | 6.391 |
| | pocket depth | 10 | 6 | 12 | 8.40 | 1.955 |
| | จำนวนมวนที่สูบต่อวัน | 10 | 10 | 20 | 14.00 | 4.595 |
| | จำนวนปีที่สูบบุหรี่ | 10 | 13 | 31 | 24.00 | 6.600 |
| | pack year | 10 | 5.25 | 31.00 | 16.7950 | 9.83450 |
| | Valid N (listwise) | 10 | | | | |

4. แสดงสภาวะปริทันต์ของกลุ่มตัวอย่างรายกลุ่ม

| | | group of experiment | | | | Group Total |
|--------------------------|---------------------------|---------------------|------------------|---------------|---------------|-------------|
| | | nonsmoke-healthy | nonsmoke-disease | smoke-healthy | smoke-disease | |
| แบ่งกลุ่มร่องลึกปริทันต์ | น้อยกว่าหรือเท่ากับ 3 มม. | 10 | | 10 | | 20 |
| | 4-5 มม. | | 1 | | | 1 |
| | ตั้งแต่ 6 มม. | | 9 | | 10 | 19 |
| Group Total | | 10 | 10 | 10 | 10 | 40 |

5. การเปรียบเทียบอายุ ปริมาณการสูบบุหรี่ของกลุ่มตัวอย่างที่สูบบุหรี่ที่เป็นและไม่เป็นโรคปริทันต์

Group Statistics

| | group of experiment | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error Mean |
|----------------------|---------------------|----|---------|----------------|-----------------|
| age in year | smoke-healthy | 10 | 43.30 | 13.081 | 4.137 |
| | smoke-disease | 10 | 49.20 | 6.391 | 2.021 |
| จำนวนมวนที่สูบต่อวัน | smoke-healthy | 10 | 13.00 | 4.830 | 1.528 |
| | smoke-disease | 10 | 14.00 | 4.595 | 1.453 |
| จำนวนปีที่สูบบุหรี่ | smoke-healthy | 10 | 17.20 | 11.745 | 3.714 |
| | smoke-disease | 10 | 24.00 | 6.600 | 2.087 |
| pack year | smoke-healthy | 10 | 10.7000 | 9.97274 | 3.15366 |
| | smoke-disease | 10 | 16.7950 | 9.83450 | 3.10994 |

Independent Samples Test

| | | Levene's Test for Equality of Variances | | t-test for Equality of Means | | | | | | |
|----------------------|-----------------------------|---|------|------------------------------|--------|-----------------|-----------------|-----------------------|---|---------|
| | | F | Sig. | t | df | Sig. (2-tailed) | Mean Difference | Std. Error Difference | 95% Confidence Interval of the Difference | |
| | | | | | | | | | Lower | Upper |
| age in year | Equal variances assumed | 4.057 | .059 | -1.281 | 18 | .216 | -5.90 | 4.604 | -15.573 | 3.773 |
| | Equal variances not assumed | | | -1.281 | 13.065 | .222 | -5.90 | 4.604 | -15.841 | 4.041 |
| จำนวนมวนที่สูบต่อวัน | Equal variances assumed | .057 | .815 | -.474 | 18 | .641 | -1.00 | 2.108 | -5.429 | 3.429 |
| | Equal variances not assumed | | | -.474 | 17.955 | .641 | -1.00 | 2.108 | -5.430 | 3.430 |
| จำนวนปีที่สูบบุหรี่ | Equal variances assumed | 8.266 | .010 | -1.596 | 18 | .128 | -6.80 | 4.260 | -15.751 | 2.151 |
| | Equal variances not assumed | | | -1.596 | 14.168 | .133 | -6.80 | 4.260 | -15.928 | 2.328 |
| pack year | Equal variances assumed | .076 | .786 | -1.376 | 18 | .186 | -6.0950 | 4.42914 | -15.40028 | 3.21028 |
| | Equal variances not assumed | | | -1.376 | 17.996 | .186 | -6.0950 | 4.42914 | -15.40041 | 3.21041 |

6. ข้อมูลร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ในการปรับมาตรฐานการนับของผู้นับ 2 คนกับผู้เชี่ยวชาญ

| สไลด์ที่ | Y | N | expert | diffY | diffN | diffNY | วันที่ |
|----------|-------|-------|--------|-------|-------|--------|----------|
| nd51 | 26.02 | 21.58 | 28.08 | 2.06 | 6.50 | 4.44 | 12/10/06 |
| sh57 | 52.57 | 52.71 | 47.40 | -5.17 | -5.31 | -.14 | 12/10/06 |
| sh60 | 69.82 | 65.88 | 68.40 | -1.42 | 2.52 | 3.94 | 12/10/06 |
| nh08 | 77.94 | 68.01 | 75.09 | -2.85 | 7.08 | 9.93 | 16/10/06 |
| nd10 | 41.10 | 40.03 | 33.21 | -7.89 | -6.82 | 1.07 | 16/10/06 |
| sd65 | 87.88 | 88.75 | 86.71 | -1.17 | -2.04 | -.87 | 16/10/06 |
| sh26 | 69.56 | 71.43 | 77.23 | 7.67 | 5.80 | -1.87 | 16/10/06 |

Y หมายถึง ค่าร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ที่ได้จากผู้นับคนที่ 1

N หมายถึง ค่าร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ที่ได้จากผู้นับคนที่ 2

expert หมายถึง ค่าร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ที่ได้จากผู้เชี่ยวชาญ

diff Y หมายถึง ผลต่างของค่าร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ระหว่างผู้เชี่ยวชาญกับผู้นับคนที่ 1

diff N หมายถึง ผลต่างของค่าร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ระหว่างผู้เชี่ยวชาญกับผู้นับคนที่ 2

diff NY หมายถึง ผลต่างของค่าร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ระหว่างผู้นับคนที่ 1 กับผู้นับคนที่ 2

7. ข้อมูลแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ผู้นับคนที่ 1 และ 2 ในการปรับมาตรฐานการนับเซลล์

Correlations

| | | %positive cell counted by Yong | %positive cell counted by Nong |
|--------------------------------|---------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| %positive cell counted by Yong | Pearson Correlation | 1 | .983(**) |
| | Sig. (2-tailed) | . | .000 |
| | N | 7 | 7 |
| %positive cell counted by Nong | Pearson Correlation | .983(**) | 1 |
| | Sig. (2-tailed) | .000 | . |
| | N | 7 | 7 |

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

ผู้นับทั้ง 2 คน มีการนับไปในทิศทางเดียวกันและมีความสอดคล้องกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ(P=0.01)

8. แสดงค่าข้อมูลร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ของกลุ่มตัวอย่าง

| คนที่ | กลุ่ม | Y1 | Y2 | mean Y | N1 | N2 | mean N | mean all |
|-------|-------|-------|-------|-----------|-------|-------|-----------|-------------|
| 3 | 1 | 87.75 | 86.91 | 87.33 | 91.96 | 92.93 | 92.44 | 89.89 |
| 4 | 1 | 65.13 | 65.36 | 65.24 | 67.65 | 72.88 | 70.26 | 67.75 |
| 5 | 1 | 67.13 | 58.57 | 62.85 | 71.76 | 72.06 | 71.91 | 67.38 |
| 7 | 1 | 58.48 | 58.12 | 58.30 | 60.83 | 66.40 | 63.62 | 60.96 |
| 8 | 1 | 67.68 | 72.72 | 70.20 | 79.39 | 79.54 | 79.46 | 74.83 |
| 9 | 1 | 62.11 | 62.22 | 62.16 | 65.54 | 68.73 | 67.14 | 64.65 |
| 13 | 1 | 50.75 | 51.24 | 50.99 | 56.90 | 61.18 | 59.04 | 55.02 |
| 14 | 1 | 80.54 | 80.47 | 80.50 | 83.24 | 84.62 | 83.93 | 82.22 |
| 15 | 1 | 47.80 | 47.95 | 47.88 | 55.28 | 55.09 | 55.18 | 51.53 |
| 65 | 1 | 55.35 | 55.22 | 55.28 | 57.50 | 58.81 | 58.15 | 56.72 |
| 16 | 2 | 38.01 | 39.16 | 38.58 | 46.05 | 42.87 | 44.46 | 41.52 |
| 19 | 2 | 62.78 | 62.15 | 62.46 | 59.12 | 59.52 | 59.32 | 60.89 |
| 20 | 2 | 55.68 | 59.10 | 57.39 | 58.25 | 59.36 | 58.80 | 58.10 |
| 25 | 2 | 46.45 | 45.04 | 45.75 | 41.70 | 41.96 | 41.83 | 43.79 |
| 26 | 2 | 61.15 | 62.57 | 61.86 | 61.69 | 65.41 | 63.55 | 62.71 |
| 55 | 2 | 42.85 | 42.49 | 42.67 | 40.17 | 42.67 | 41.42 | 42.04 |
| 62 | 2 | 33.69 | 34.06 | 33.87 | 26.67 | 29.80 | 28.23 | 31.05 |
| 63 | 2 | 38.23 | 38.58 | 38.40 | 38.16 | 39.32 | 38.74 | 38.57 |
| 64 | 2 | 31.99 | 33.45 | 32.72 | 27.74 | 28.03 | 27.89 | 30.30 |
| 66 | 2 | 54.26 | 54.04 | 54.15 | 58.51 | 58.11 | 58.31 | 56.23 |

- หมายเหตุ** 1. Y1, Y2, Y mean หมายถึง ค่าร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ครั้งที่1 ครั้งที่2 และค่าเฉลี่ยจากการนับ 2 ครั้งของผู้นับคนที่1
2. N1, N2, N mean หมายถึง ค่าร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ครั้งที่1 ครั้งที่2 และค่าเฉลี่ยจากการนับ 2 ครั้งของผู้นับคนที่2
3. Mean all หมายถึง ค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 จากการนับทั้ง 2 ครั้งของผู้นับ 2 คน

8. แสดงค่าข้อมูลร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ของกลุ่มตัวอย่าง(ต่อ)

| คนที่ | กลุ่ม | Y1 | Y2 | mean Y | N1 | N2 | mean N | mean all |
|-------|-------|-------|-------|-----------|-------|-------|-----------|-------------|
| 27 | 3 | 45.70 | 45.52 | 45.61 | 52.63 | 54.48 | 53.56 | 49.58 |
| 28 | 3 | 73.56 | 74.30 | 73.93 | 78.53 | 84.27 | 81.40 | 77.66 |
| 30 | 3 | 55.36 | 54.96 | 55.16 | 56.51 | 70.55 | 63.53 | 59.35 |
| 34 | 3 | 55.31 | 55.75 | 55.53 | 63.33 | 61.53 | 62.43 | 58.98 |
| 35 | 3 | 55.13 | 55.35 | 55.24 | 63.55 | 64.12 | 63.83 | 59.54 |
| 36 | 3 | 48.99 | 49.24 | 49.12 | 56.49 | 55.90 | 56.19 | 52.66 |
| 37 | 3 | 41.42 | 43.03 | 42.22 | 56.57 | 57.35 | 56.96 | 49.59 |
| 57 | 3 | 51.32 | 48.41 | 49.86 | 44.65 | 45.30 | 44.98 | 47.42 |
| 58 | 3 | 34.49 | 34.35 | 34.42 | 35.59 | 35.80 | 35.70 | 35.06 |
| 59 | 3 | 61.22 | 60.54 | 60.88 | 53.04 | 56.20 | 54.62 | 57.75 |
| 39 | 4 | 45.50 | 46.37 | 45.93 | 50.10 | 52.08 | 51.09 | 48.51 |
| 40 | 4 | 63.70 | 67.15 | 65.42 | 66.40 | 79.12 | 72.76 | 69.09 |
| 41 | 4 | 27.30 | 26.46 | 26.88 | 25.37 | 30.22 | 27.80 | 27.34 |
| 43 | 4 | 57.88 | 59.15 | 58.52 | 65.04 | 71.66 | 68.35 | 63.43 |
| 45 | 4 | 42.07 | 42.76 | 42.42 | 45.85 | 55.22 | 50.53 | 46.47 |
| 46 | 4 | 67.39 | 67.30 | 67.34 | 75.48 | 75.80 | 75.64 | 71.49 |
| 47 | 4 | 63.49 | 63.47 | 63.48 | 66.81 | 71.30 | 69.06 | 66.27 |
| 48 | 4 | 68.15 | 68.34 | 68.24 | 72.97 | 77.67 | 75.32 | 71.78 |
| 56 | 4 | 43.45 | 43.26 | 43.35 | 42.08 | 41.02 | 41.55 | 42.45 |
| 61 | 4 | 17.09 | 18.61 | 17.85 | 13.21 | 13.46 | 13.34 | 15.59 |

- หมายเหตุ 1. Y1, Y2, Y mean หมายถึง ค่าร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ครั้งที่1 ครั้งที่2 และค่าเฉลี่ยจากการนับ 2 ครั้งของผู้นับคนที่1
2. N1, N2, N mean หมายถึง ค่าร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ครั้งที่1 ครั้งที่2 และค่าเฉลี่ยจากการนับ 2 ครั้งของผู้นับคนที่2
3. Mean all หมายถึง ค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 จากการนับทั้ง 2 ครั้งของผู้นับ 2 คน

9. ข้อมูลแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2
 ผู้สูบบุหรี่ 1 และ 2 ในการนับเซลล์ของกลุ่มตัวอย่าง 40 คน

Correlations

| | | ค่าเฉลี่ย positive cell จากการ นับของยัง | ค่าเฉลี่ย positive cell จากการ นับของน้อง |
|---|---------------------|---|--|
| ค่าเฉลี่ย positive cell จากการนับของยัง | Pearson Correlation | 1 | .960(**) |
| | Sig. (2-tailed) | . | .000 |
| | N | 40 | 40 |
| ค่าเฉลี่ย positive cell จากการนับของน้อง | Pearson Correlation | .960(**) | 1 |
| | Sig. (2-tailed) | .000 | . |
| | N | 40 | 40 |

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

ผู้สูบบุหรี่ 2 คน มีการนับไปในทิศทางเดียวกันและมีความสอดคล้องกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
 (P=0.01)

10. แสดงค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 จำแนกรายกลุ่ม

Descriptive Statistics

| group of experiment | | N | Minimum | Maximum | Mean | Std. Deviation |
|---------------------|---|----|---------|---------|---------|-------------------|
| nonsmoke-healthy | ค่าเฉลี่ย positive cell จากการนับของผู้สูบบุหรี่ 2 คน | 10 | 51.53 | 89.89 | 67.0950 | 12.23860 |
| | Valid N (listwise) | 10 | | | | |
| nonsmoke-disease | ค่าเฉลี่ย positive cell จากการนับของผู้สูบบุหรี่ 2 คน | 10 | 30.30 | 62.71 | 46.5200 | 12.08823 |
| | Valid N (listwise) | 10 | | | | |
| smoke-healthy | ค่าเฉลี่ย positive cell จากการนับของผู้สูบบุหรี่ 2 คน | 10 | 35.06 | 77.66 | 54.7590 | 11.03032 |
| | Valid N (listwise) | 10 | | | | |
| smoke-disease | ค่าเฉลี่ย positive cell จากการนับของผู้สูบบุหรี่ 2 คน | 10 | 15.59 | 71.78 | 52.2420 | 19.62039 |
| | Valid N (listwise) | 10 | | | | |

| | | group of experiment | | | | Group Total |
|---------------------------|------------|----------------------|----------------------|-------------------|---------------|-------------|
| | | nonsmoke -healthy | nonsmoke -disease | smoke- healthy | smoke-disease | |
| แบ่งกลุ่ม % positive cell | 0-25% | | | | 1 | 1 |
| | 25.01-50 | | 6 | 4 | 4 | 14 |
| | 50.01-75 | 8 | 4 | 5 | 5 | 22 |
| | 75.01-100% | 2 | | 1 | | 3 |
| Group Total | | 10 | 10 | 10 | 10 | 40 |

11. การทดสอบการกระจายข้อมูลของค่าร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ของกลุ่มตัวอย่าง 40 คน

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

| | | ค่าเฉลี่ย positive cell จากการนับ ของผู้นับ 2 คน |
|-----------------------------|----------------|--|
| N | | 40 |
| Normal Parameters(a,b) | Mean | 55.1540 |
| | Std. Deviation | 15.59135 |
| Most Extreme Differences | Absolute | .078 |
| | Positive | .043 |
| | Negative | -.078 |
| Kolmogorov-Smirnov Z | | .490 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | | .970 |

a Test distribution is Normal. b Calculated from data.

12. การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ระหว่างผู้มีโรคประจำตัวและไม่มีโรคประจำตัว

Group Statistics

| | ผู้ป่วยมีโรคประจำตัวหรือไม่ | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error Mean |
|---|-----------------------------|----|---------|----------------|-----------------|
| ค่าเฉลี่ย positive cell จาก การนับของผู้นับ 2 คน | ไม่มีโรคประจำตัว | 34 | 55.2024 | 15.60079 | 2.67551 |
| | มีโรคประจำตัว | 6 | 54.8800 | 17.01938 | 6.94813 |

Independent Samples Test

| | | Levene's Test for Equality of Variances | |
|---|--------------------------------|--|------|
| | | F | Sig. |
| ค่าเฉลี่ย positive cell จาก การนับของผู้นับ 2 คน | Equal variances assumed | .209 | .650 |
| | Equal variances not assumed | | |

| t-test for Equality of Means | | | | | | |
|------------------------------|-------|-----------------|--------------------|--------------------------|--|----------|
| t | df | Sig. (2-tailed) | Mean Difference | Std. Error Difference | 95% Confidence Interval of the Difference | |
| | | | | | Lower | Upper |
| .046 | 38 | .963 | .3224 | 6.99402 | -13.83631 | 14.48101 |
| .043 | 6.571 | .967 | .3224 | 7.44546 | -17.51918 | 18.16389 |

13. การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ระหว่างผู้มียาประจำและไม่มียาประจำ

Group Statistics

| | ผู้ป่วยมียาประจำหรือไม่ | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error Mean |
|---|-------------------------|----|---------|----------------|-----------------|
| ค่าเฉลี่ย positive cell จากการนับของผู้นับ 2 คน | ไม่มียาประจำ | 34 | 55.5885 | 16.10920 | 2.76270 |
| | มียาประจำ | 6 | 52.6917 | 13.22128 | 5.39757 |

Independent Samples Test

| | | Levene's Test for Equality of Variances | |
|---|-----------------------------|---|------|
| | | F | Sig. |
| ค่าเฉลี่ย positive cell จากการนับของผู้นับ 2 คน | Equal variances assumed | .019 | .891 |
| | Equal variances not assumed | | |

| t-test for Equality of Means | | | | | | |
|------------------------------|-------|-----------------|-----------------|-----------------------|---|----------|
| t | df | Sig. (2-tailed) | Mean Difference | Std. Error Difference | 95% Confidence Interval of the Difference | |
| | | | | | Lower | Upper |
| .415 | 38 | .680 | 2.8969 | 6.97841 | -11.23020 | 17.02392 |
| .478 | 7.881 | .646 | 2.8969 | 6.06352 | -11.12246 | 16.91618 |

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

14. การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 ระหว่างผู้ไม่สูบบุหรี่และไม่เป็นโรคปรีทันต์กับผู้ไม่สูบบุหรี่และเป็นโรคปรีทันต์

Group Statistics

| | มีการอักเสบ(เป็นโรคปรีทันต์)หรือไม่ | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error Mean |
|---|-------------------------------------|----|---------|----------------|-----------------|
| ค่าเฉลี่ย positive cell จากการนับของผู้นับ 2 คน | ไม่เป็นโรคปรีทันต์ | 10 | 67.0950 | 12.23860 | 3.87018 |
| | เป็นโรคปรีทันต์ | 10 | 46.5200 | 12.08823 | 3.82264 |

Independent Samples Test

| | | Levene's Test for Equality of Variances | |
|---|-----------------------------|---|------|
| | | F | Sig. |
| ค่าเฉลี่ย positive cell จากการนับของผู้นับ 2 คน | Equal variances assumed | .138 | .714 |
| | Equal variances not assumed | | |

| t-test for Equality of Means | | | | | | |
|------------------------------|--------|-----------------|-----------------|-----------------------|---|----------|
| t | df | Sig. (2-tailed) | Mean Difference | Std. Error Difference | 95% Confidence Interval of the Difference | |
| | | | | | Lower | Upper |
| 3.782 | 18 | .001 | 20.5750 | 5.43975 | 9.14651 | 32.00349 |
| 3.782 | 17.997 | .001 | 20.5750 | 5.43975 | 9.14639 | 32.00361 |

15.การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2ระหว่างผู้ไม่สูบบุหรี่และไม่เป็นโรคปริทันต์กับผู้สูบบุหรี่และไม่เป็นโรคปริทันต์

Group Statistics

| | สูบบุหรี่หรือไม่ | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error Mean |
|--|------------------|----|---------|----------------|-----------------|
| ค่าเฉลี่ยpositive cell จากการนับของผู้นับ 2 คน | ไม่สูบ | 10 | 67.0950 | 12.23860 | 3.87018 |
| | สูบ | 10 | 54.7590 | 11.03032 | 3.48809 |

Independent Samples Test

| | | Levene's Test for Equality of Variances | |
|---|-----------------------------|---|------|
| | | F | Sig. |
| ค่าเฉลี่ยpositive cell จาก การนับของผู้นับ 2 คน | Equal variances assumed | .191 | .667 |
| | Equal variances not assumed | | |

| t-test for Equality of Means | | | | | | |
|------------------------------|--------|-----------------|-----------------|-----------------------|---|----------|
| t | df | Sig. (2-tailed) | Mean Difference | Std. Error Difference | 95% Confidence Interval of the Difference | |
| | | | | | Lower | Upper |
| 2.368 | 18 | .029 | 12.3360 | 5.21010 | 1.38999 | 23.28201 |
| 2.368 | 17.809 | .029 | 12.3360 | 5.21010 | 1.38157 | 23.29043 |

16.การทดสอบค่าความแปรปรวนและการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2ระหว่างกลุ่มตัวอย่างทั้ง 4 กลุ่ม

Oneway

Test of Homogeneity of Variances

ค่าเฉลี่ยpositive cell จากการนับของผู้นับ 2 คน

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| 2.327 | 3 | 36 | .091 |

ANOVA

ค่าเฉลี่ยpositive cell จากการนับของผู้นับ 2 คน

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|-------|------|
| Between Groups | 2257.692 | 3 | 752.564 | 3.751 | .019 |
| Within Groups | 7222.826 | 36 | 200.634 | | |
| Total | 9480.518 | 39 | | | |

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: ค่าเฉลี่ยpositive cell จากการนับของผู้นับ 2 คน

Bonferroni

| (I) group of experiment | (J) group of experiment | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval | |
|-------------------------|-------------------------|-----------------------|------------|-------|-------------------------|-------------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound |
| nonsmoke-healthy | nonsmoke-disease | 20.5750* | 6.33457 | .015 | 2.8891 | 38.2609 |
| | smoke-healthy | 12.3360 | 6.33457 | .356 | -5.3499 | 30.0219 |
| | smoke-disease | 14.8530 | 6.33457 | .148 | -2.8329 | 32.5389 |
| nonsmoke-disease | nonsmoke-healthy | -20.5750* | 6.33457 | .015 | -38.2609 | -2.8891 |
| | smoke-healthy | -8.2390 | 6.33457 | 1.000 | -25.9249 | 9.4469 |
| | smoke-disease | -5.7220 | 6.33457 | 1.000 | -23.4079 | 11.9639 |
| smoke-healthy | nonsmoke-healthy | -12.3360 | 6.33457 | .356 | -30.0219 | 5.3499 |
| | nonsmoke-disease | 8.2390 | 6.33457 | 1.000 | -9.4469 | 25.9249 |
| | smoke-disease | 2.5170 | 6.33457 | 1.000 | -15.1689 | 20.2029 |
| smoke-disease | nonsmoke-healthy | -14.8530 | 6.33457 | .148 | -32.5389 | 2.8329 |
| | nonsmoke-disease | 5.7220 | 6.33457 | 1.000 | -11.9639 | 23.4079 |
| | smoke-healthy | -2.5170 | 6.33457 | 1.000 | -20.2029 | 15.1689 |

*. The mean difference is significant at the .05 level.

17.การหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 กับ การสูบบุหรี่ด้วยการประมาณความเสี่ยง

สูบบุหรี่หรือไม่ * แบ่งกลุ่มpositive cell:cutpoint=50.00% Crosstabulation

Count

| | | แบ่งกลุ่มpositive cell:cutpoint=50.00% | | Total |
|----------------------|--------------|---|----------|-------|
| | | 50.01-100% | 0-50.00% | |
| สูบบุหรี่ หรือไม่ | ไม่สูบบุหรี่ | 14 | 6 | 20 |
| | สูบบุหรี่ | 11 | 9 | 20 |
| Total | | 25 | 15 | 40 |

Risk Estimate

| | Value | 95% Confidence Interval | |
|--|-------|----------------------------|-------|
| | | Lower | Upper |
| Odds Ratio for สูบบุหรี่ หรือไม่ (ไม่สูบบุหรี่ / สูบบุหรี่) | 1.909 | .520 | 7.007 |
| For cohort แบ่งกลุ่มpositive cell:cutpoint=50.00% = 50.01-100% | 1.273 | .780 | 2.076 |
| For cohort แบ่งกลุ่มpositive cell:cutpoint=50.00% = 0- 50.00% | .667 | .292 | 1.523 |
| N of Valid Cases | 40 | | |

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

18. การหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 กับการเป็นโรคปริทันต์ด้วยการประมาณความเสี่ยง

มีการอักเสบ(เป็นโรคปริทันต์)หรือไม่ * แบ่งกลุ่มpositive cell:cutpoint=50.00% Crosstabulation

Count

| | | แบ่งกลุ่มpositive cell:cutpoint=50.00% | | Total |
|-------------------------------------|--------------------|--|----------|-------|
| | | 50.01-100% | 0-50.00% | |
| มีการอักเสบ(เป็นโรคปริทันต์)หรือไม่ | ไม่เป็นโรคปริทันต์ | 16 | 4 | 20 |
| | เป็นโรคปริทันต์ | 9 | 11 | 20 |
| Total | | 25 | 15 | 40 |

Risk Estimate

| | Value | 95% Confidence Interval | |
|--|-------|-------------------------|--------|
| | | Lower | Upper |
| Odds Ratio for มีการอักเสบ (เป็นโรคปริทันต์)หรือไม่ (ไม่เป็นโรคปริทันต์ / เป็นโรคปริทันต์) | 4.889 | 1.199 | 19.942 |
| For cohort แบ่งกลุ่ม positive cell:cutpoint=50.00% = 50.01-100% | 1.778 | 1.045 | 3.026 |
| For cohort แบ่งกลุ่ม positive cell:cutpoint=50.00% = 0-50.00% | .364 | .139 | .952 |
| N of Valid Cases | 40 | | |

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

19.การหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 กับ การสูบบุหรี่และการเป็นโรคปริทันต์ด้วยการวิเคราะห์ถดถอยโลจิสติก

Variables in the Equation

| | | B | S.E. | Wald | df | Sig. | Exp(B) | 95.0% C.I. for EXP(B) | |
|-----------|----------|--------|------|-------|----|------|--------|-----------------------|--------|
| | | | | | | | | Lower | Upper |
| Step 1(a) | SMOKE | .749 | .718 | 1.086 | 1 | .297 | 2.114 | .517 | 8.642 |
| | INFLAM | 1.636 | .733 | 4.982 | 1 | .026 | 5.135 | 1.221 | 21.600 |
| | Constant | -1.803 | .716 | 6.338 | 1 | .012 | .165 | | |

a Variable(s) entered on step 1: SMOKE, INFLAM.

20.การหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 กับ เพศ ด้วยการวิเคราะห์ความสัมพันธ์อัตรา

Directional Measures

| | | Value |
|---------------------|---|-------|
| Nominal by Interval | Eta | 1.000 |
| | sex Dependent ค่าเฉลี่ย positive cell จากการนับของผู้นับ 2 คน Dependent | .054 |

21.การหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของสารเบต้าดีเฟนซิน-2 กับ อายุ ความลึกร่องปริทันต์ ด้วยการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เพียร์สัน

Correlations

| | | ค่าเฉลี่ย positive cell จากการนับของผู้นับ 2 คน | age in year | pocket depth |
|---|---------------------|---|-------------|--------------|
| ค่าเฉลี่ย positive cell จากการนับของผู้นับ 2 คน | Pearson Correlation | 1 | -.276 | -.311 |
| | Sig. (2-tailed) | . | .084 | .051 |
| | N | 40 | 40 | 40 |
| age in year | Pearson Correlation | -.276 | 1 | .351(*) |
| | Sig. (2-tailed) | .084 | . | .027 |
| | N | 40 | 40 | 40 |
| pocket depth | Pearson Correlation | -.311 | .351(*) | 1 |
| | Sig. (2-tailed) | .051 | .027 | . |
| | N | 40 | 40 | 40 |

* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว รุสรวรรพร เดิมทอง เกิดเมื่อวันที่ 12 ตุลาคม 2513 ที่กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีสาขาทันตแพทยศาสตรบัณฑิต จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในปีการศึกษา 2535

เข้ารับราชการที่โรงพยาบาลศิริราช สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดสุโขทัย ระหว่างปี พ.ศ. 2536-2537 จากนั้นย้ายมารับราชการที่โรงพยาบาลอัมพวา สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดสมุทรสงคราม ในปี พ.ศ.2538

ลาออกจากราชการเพื่อศึกษาต่อหลักสูตรประกาศนียบัตรวิทยาศาสตร์การแพทย์คลินิก สาขา ทันตกรรมทั่วไป ที่ มหาวิทยาลัยมหิดลในปี พ.ศ. 2539

และได้บรรจุกลับรับราชการที่สถาบันราชานุกูล กรมสุขภาพจิต กระทรวงสาธารณสุข ตั้งแต่ปี พ.ศ.2540 ถึงปัจจุบัน



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย