



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 10

The 10th STOU National Research Conference

การแสดงผลงานของ IL-8 ในเซลล์เอ็นยิดปริทันต์ ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดผนังเซลล์ของเชื้อ
เอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิส ชนิดสลายเม็ดเลือดแดง และไม่สลายเม็ดเลือดแดง ที่แยกจากคลองรากฟัน

IL-8 Expression in Periodontal Ligament Cells Stimulated with Cell Wall Extract
of *Enterococcus faecalis* Hemolytic and Non-hemolytic Types Isolated from Root Canals

อสมารณณ์ นิลพรหมณ์ (Asamaporn Nilpram) ¹ รวี เถียรไพศาล (Rawee Teanpaisan) ²

เกวลิณ ธรรมสิทธิ์บุรณ์ (Kewalin Thammasitboon) ³

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้ คือ (1) เพื่อศึกษาความสามารถของสารสกัดผนังเซลล์ของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิส ในการกระตุ้นให้มีการแสดงออกของ IL-8 ในเซลล์เอ็นยิดปริทันต์ เปรียบเทียบกับกรดไลโปไคติก (2) เพื่อศึกษาการ แสดงออกของ IL-8 ในเซลล์เอ็นยิดปริทันต์ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดผนังเซลล์ของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิส สายพันธุ์ที่ แยกจากคลองรากฟัน เปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน และ (3) เพื่อศึกษาการแสดงผลของ IL-8 ในเซลล์เอ็นยิดปริทันต์ที่ ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดผนังเซลล์ของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิส กลุ่มที่สลายเม็ดเลือดแดง และกลุ่มที่ไม่สลายเม็ดเลือดแดง โดยศึกษาการแสดงผลของ mRNA ของ IL-8 ด้วยวิธีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริงด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลี-เมอ เรส และเปรียบเทียบปริมาณการแสดงผลของ mRNA ของ IL-8 ด้วยสถิติแมน วิทนี ยู ที่ระดับนัยสำคัญ $p = 0.05$ ผลการวิจัยพบว่า (1) สารสกัดผนังเซลล์ของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิส มีความสามารถในการกระตุ้นให้เซลล์เอ็นยิดปริ- ทันต์มีการแสดงออกของ IL-8 ได้เช่นเดียวกับกรดไลโปไคติก (2) สารสกัดผนังเซลล์ของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิส ที่แยกจากคลองรากฟันทุกสายพันธุ์ ทำให้เซลล์เอ็นยิดปริทันต์มีการแสดงออกของ IL-8 สูงกว่าสายพันธุ์มาตรฐาน อย่างมี นัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.002$) และ (3) สารสกัดผนังเซลล์ของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิส กลุ่มที่สลายเม็ดเลือดแดง ทำให้ เซลล์เอ็นยิดปริทันต์มีการแสดงออกของ IL-8 สูงกว่ากลุ่มที่ไม่สลายเม็ดเลือดแดง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$)

คำสำคัญ เอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิส สลายเม็ดเลือดแดง ไม่สลายเม็ดเลือดแดง สารสกัดผนังเซลล์ IL-8

¹ นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพช่องปาก ภาควิชาทันตกรรมอนุรักษ์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์: nijident@gmail.com

² ศาสตราจารย์ ดร ภาควิชาโษษฐวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์: rawee.t@psu.ac.th

³ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร ภาควิชาทันตกรรมอนุรักษ์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์: kewalin.t@psu.ac.th



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 10

The 10th STOU National Research Conference

Abstract

The objectives of this research was to (1) investigate the ability of cell wall extract of (CWE) of *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) on the stimulation of IL-8 expression in periodontal ligament cells (PDL cells) compared with lipoteichoic acid (LTA), (2) evaluate IL-8 expression in PDL cells stimulated with CWE of *E. faecalis* isolated from root canals compared with reference strain, and (3) evaluate IL-8 expression in PDL cells stimulated with CWE of *E. faecalis* hemolytic group and non-hemolytic group. mRNA expression of IL-8 was investigated by real-time quantitative polymerase chain reaction, and data was compared by Mann-Whitney U test at a significant level of $p = 0.05$. The results showed that (1) CWE of *E. faecalis* had the ability to stimulate IL-8 expression in PDL cells same as LTA did, 2) IL-8 expression in PDL cells stimulated with CWE of all strains of *E. faecalis* isolated from root canals was significantly higher compared with the reference strain ($p = 0.002$), and (3) IL-8 expression in PDL cells stimulated with CWE of *E. faecalis* hemolytic group was significantly higher compared with non-hemolytic group ($p < 0.001$).

Keywords: *E. faecalis*, Hemolytic, Non-hemolytic, Cell wall extract, IL-8



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 10

The 10th STOU National Research Conference

บทนำ

เอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิส เป็นแบคทีเรียแกรมบวกชนิดหนึ่ง ซึ่งพบได้บ่อยที่สุดในคลองรากฟันที่ล้มเหลวจากการรักษา โดยมีความชุกร้อยละ 24 ถึง 77 ดังรายงานในการศึกษาของ Stuart และคณะ (2006) ลักษณะสำคัญของโครงสร้างผนังเซลล์ คือ มีกรดไลโปเตอิค (lipoteichoic acid) แทรกตัวอยู่ในชั้นของเพปติโดไกลแคน (peptidoglycan) ที่ค่อนข้างหนา การศึกษาของ Ginsburg I (2002) และการศึกษาของ Kang และคณะ (2016) รายงานสอดคล้องกันว่ากรดไลโปเตอิคที่พบในผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก เป็นปัจจัยสำคัญประการหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ เนื่องจากมีความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ดี โดยการจับกับตัวรับที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เจ้าบ้าน ได้แก่ ฟอสโฟลิปิด (phospholipid) CD14 และ Toll-like receptors (TLRs) และเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ นำไปสู่การสร้างสารก่อการอักเสบ (pro-inflammatory cytokines) ชนิดต่างๆ ซึ่ง IL-8 เป็นสารก่อการอักเสบชนิดหนึ่ง ที่พบในกระบวนการอักเสบและทำลายเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟัน โดยมีคุณสมบัติในการดึงดูดเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลให้เคลื่อนเข้ามาในบริเวณที่เกิดการอักเสบ อย่างไรก็ตาม องค์ประกอบอื่นๆ ในผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกอาจทำหน้าที่ร่วมกับกรดไลโปเตอิค ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกระบวนการอักเสบและทำลายเนื้อเยื่อ การศึกษาของ Kengatharan และคณะ (1998) และการศึกษาของ Middelveld และ Alving (2000) รายงานว่า เพปติโดไกลแคนที่พบเป็นส่วนใหญ่ในผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก จะทำหน้าที่ร่วมกับกรดไลโปเตอิคในการเหนี่ยวนำระบบภูมิคุ้มกัน นอกจากนี้ การศึกษาของ Ray และคณะ (2003) รายงานว่า ไลโปโปรตีน (lipoprotein) ที่พบได้ทั่วไปในผนังเซลล์ของแบคทีเรีย มีความจำเพาะกับตัวรับบนเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เจ้าบ้านชนิด TLR2 เป็นอย่างมาก และยังทำให้ตัวรับ TLR2 สามารถทำหน้าที่ร่วมกับตัวรับ TLR1 และ TLR6 จึงเหนี่ยวนำให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันได้ดี แต่กระบวนการสกัดโมเลกุลดังกล่าวจากผนังเซลล์แบคทีเรียให้มีความบริสุทธิ์ (pure purification) ทำได้ค่อนข้างยาก เนื่องจากประกอบด้วยขั้นตอนที่มีความซับซ้อนและละเอียดอ่อน จึงเป็นที่มาของการศึกษาโดยใช้สารสกัดผนังเซลล์ (cell wall extract) ของแบคทีเรีย ที่ทำการสกัดด้วยวิธีการปั่นแยกส่วนเป็นลำดับขั้น (Differential centrifugation) สำหรับทำการทดลองในโครงการวิจัยนี้ โดยในเบื้องต้นจะทำการศึกษาความสามารถในการกระตุ้นเซลล์เอ็นยิตปริทันต์ให้มีการแสดงออกของ IL-8 โดยเปรียบเทียบกับกรดไลโปเตอิค ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมบวก (positive control) โดยมีรายงานในการศึกษาของอุมพร พรหมแก้ว (2562) ที่พบว่า การกระตุ้นเซลล์เอ็นยิตปริทันต์ด้วยสารสกัดผนังเซลล์ของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิส ATCC 19433 สายพันธุ์มาตรฐาน ความเข้มข้น 10 µg/ml ทำให้เซลล์เอ็นยิตปริทันต์มีการแสดงออกของ IL-8 สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ เช่นเดียวกับการกระตุ้นด้วยกรดไลโปเตอิค เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การศึกษาของ Marton และ Kiss (2000) อธิบายว่า การอักเสบของเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟัน (apical periodontitis) จะเริ่มต้นด้วยการอักเสบภายในเอ็นยิตปริทันต์ที่อยู่บนผิวรากฟัน ซึ่งส่วนใหญ่ประกอบด้วยเซลล์เอ็นยิตปริทันต์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast-like cells) จึงมีการสันนิษฐานว่าเซลล์ดังกล่าวอาจมีส่วนสำคัญในการกำจัดเชื้อที่รุกรานเข้ามาในบริเวณปลายรากฟัน การศึกษาของ Tang และคณะ (2011) รายงานว่าเซลล์เอ็นยิตปริทันต์ของมนุษย์มีการแสดงออกของตัวรับที่มีความจำเพาะกับองค์ประกอบผนังเซลล์ของแบคทีเรีย เช่น TLR2 TLR4 ฯลฯ ซึ่งมีความสำคัญในการเหนี่ยวนำให้เกิดการตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบปฐมภูมิ (innate immune response) และยังพบว่าเซลล์ดังกล่าวสามารถสร้างสารก่อการอักเสบ ได้แก่ IL-1 β IL-6 และ IL-8 เมื่อถูกกระตุ้นด้วยโมเลกุลที่จำเพาะกับตัวรับดังกล่าวข้างต้น (TLRs-agonists) การศึกษาของ Zhang และคณะ (2015) สนับสนุนการศึกษาข้างต้น โดยพบว่าเซลล์เอ็นยิต



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 10

The 10th STOU National Research Conference

ปริพันธ์ของมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นด้วยกรดไลโปโตนิก ความเข้มข้น 10 µg/ml และด้วยเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิส ATCC 29212 สายพันธุ์มาตรฐาน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะมีการสร้าง IL-8 สูงกว่ากลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การศึกษาเหล่านี้ แสดงให้เห็นว่าเซลล์เอ็นอีทีปริพันธ์ของมนุษย์สามารถถูกกระตุ้นด้วยองค์ประกอบในผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก ทำให้มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน ซึ่งนำไปสู่การอักเสบและทำลายเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟัน

เชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิส บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารละลายเม็ดเลือดแดง (hemolysin) ซึ่งอาจมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค และความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ การศึกษาของ Huycke และคณะ (1991) รายงานว่าพบเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิส ชนิดสลายเม็ดเลือดแดง ร้อยละ 44.7 ในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยจำนวน 190 ราย ที่มีภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด โดยที่เชื้อเหล่านี้มักต้านทานต่อยาเจนตาไมซิน (gentamycin) และทำให้ผู้ป่วยมีความเสี่ยงในการเสียชีวิตภายในสามสัปดาห์เพิ่มขึ้นประมาณห้าเท่า เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่ติดเชื้อในกระแสเลือดโดยเชื้อชนิดไม่สลายเม็ดเลือดแดง ซึ่งมักไวต่อยาเจนตาไมซิน สอดคล้องกับการศึกษาของ Ike และคณะ (1984) ที่ทำให้เกิดการติดเชื้อผ่านทางช่องท้อง (intra-peritoneal infection) ด้วยเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิส ซึ่งพบว่าค่าของปริมาณสารที่ให้โดยตรงกับสัตว์ทดลองแล้วทำให้สัตว์ทดลองตายไปร้อยละ 50 ของจำนวนสัตว์ทดลองทั้งหมด (lethal dose fifty หรือ LD₅₀) ของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิส ชนิดไม่สลายเม็ดเลือดแดง จะสูงกว่าค่าดังกล่าวของชนิดสลายเม็ดเลือดแดงถึงสิบเท่า นอกจากนี้ การศึกษาของ ภัทธมน ประไพสิทธิ์ (2562) ที่รายงานความชุกของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิส ในตัวอย่างที่เก็บจากคลองรากฟันของฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาและมีรอยโรคปลายราก จำนวน 36 ซี่ พบว่าเป็นเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิส ชนิดสลายเม็ดเลือดแดง ร้อยละ 26.5 ซึ่งพบได้มากในฟันที่มีอาการแสดงทางคลินิกร่วมด้วย เช่น มีรูเปิดหนอง (sinus opening) เคาะเจ็บ ฯลฯ นอกจากนี้ยังพบว่าขนาดโดยเฉลี่ยของรอยโรครอบปลายรากฟัน มีค่าประมาณ 6.2 มิลลิเมตร และ 3.9 มิลลิเมตร ในฟันที่พบเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิส ชนิดสลายเม็ดเลือดแดง และชนิดไม่สลายเม็ดเลือดแดง ตามลำดับ

การศึกษานี้มีการใช้เชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิส ที่แยกได้จากคลองรากฟันที่ล้มเหลวจากการรักษา อันประกอบด้วยเชื้อชนิดสลายเม็ดเลือดแดง และชนิดไม่สลายเม็ดเลือดแดง ทำการกระตุ้นเซลล์เอ็นอีทีปริพันธ์โดยใช้สารสกัดผนังเซลล์ของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิส เพื่อประเมินการแสดงออกของ IL-8 และเปรียบเทียบผลกับการกระตุ้นด้วยเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิส สายพันธุ์มาตรฐานที่เป็นกลุ่มควบคุมบวก ซึ่งไม่เคยมีรายงานในการศึกษาที่ผ่านมา โดยที่การใช้เชื้อจากคลองรากฟันดังกล่าวอาจให้ผลการทดลองที่มีความใกล้เคียงกับสภาวะทางคลินิกมากขึ้น ซึ่งจะช่วยให้เกิดความเข้าใจเกี่ยวกับบทบาทของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิส แต่ละชนิดในการเกิดรอยโรครอบปลายรากฟัน และอาจนำไปสู่การพัฒนากระบวนการรักษาคคลองรากฟันให้ดียิ่งขึ้น โดยเฉพาะกรณีที่มีความล้มเหลวของการรักษาอันเนื่องมาจากเชื้อดังกล่าว

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาความสามารถของสารสกัดผนังเซลล์ของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิส ในการกระตุ้นให้มีการแสดงออกของ IL-8 ในเซลล์เอ็นอีทีปริพันธ์ เปรียบเทียบกับกรดไลโปโตนิก
2. เพื่อศึกษาการแสดงออกของ IL-8 ในเซลล์เอ็นอีทีปริพันธ์ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดผนังเซลล์ของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิส สายพันธุ์ที่แยกจากคลองรากฟัน เปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน
3. เพื่อศึกษาการแสดงออกของ IL-8 ในเซลล์เอ็นอีทีปริพันธ์ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดผนังเซลล์ของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิส กลุ่มที่สลายเม็ดเลือดแดง และกลุ่มที่ไม่สลายเม็ดเลือดแดง



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 10

The 10th STOU National Research Conference

ระเบียบวิธีวิจัย

1. การเพาะเชื้อ และเตรียมสารสกัดผนังเซลล์ของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟิคาเลียส

การศึกษานี้ใช้เชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟิคาเลียส ATCC 19433 สายพันธุ์มาตรฐาน จำนวน 1 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ที่แยกจากคลองรากฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาและมีรอยโรครอบปลายรากฟัน จำนวน 6 สายพันธุ์ อันประกอบด้วยเชื้อกลุ่มที่สลายเม็ดเลือดแดง จำนวน 3 สายพันธุ์ (H-1 H-2 และ H-3) และกลุ่มที่ไม่สลายเม็ดเลือดแดง จำนวน 3 สายพันธุ์ (NH-1 NH-2 และ NH-3) ซึ่งได้รับการศึกษาของภัทรมน ประไพสิทธิ์ (2562)

นำเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟิคาเลียส ดังกล่าวข้างต้น ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวชนิดเบร็น ฮาร์ด อินฟิวชัน (Brain heart infusion broth) 20 ml ซึ่งบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนได้ปริมาณเชื้อเท่ากับ 10^8 CFU/ml มาทำการสกัดสารสกัดผนังเซลล์ของเชื้อด้วยวิธีการปั่นแยกส่วนเป็นลำดับขั้น (Differential centrifugation) รายละเอียดดังในการศึกษาของ Krisanaprakornkit และคณะ (2000) จากนั้นวัดความเข้มข้นของโปรตีนในสารสกัดผนังเซลล์ด้วยชุดวัดปริมาณโปรตีน เพียช บีซีเอ (Pierce® BCA Protein Assay kit) และปรับความเข้มข้นให้ได้ตามต้องการ

2. การเตรียมเซลล์เอ็นไยด์ปริทันต์

เป็นเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเอ็นไยด์ปริทันต์บริเวณส่วนกลางของผิวรากฟัน จากซีฟันทอนของอาสาสมัครผู้ป่วยที่มีสุขภาพแข็งแรง และไม่มีโรคประจำตัว ซึ่งมารับบริการถอนฟันตามปกติ ณ คลินิกศัลยกรรมช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมในมนุษย์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ รหัสโครงการ EC6210-040) ซึ่งต่อไปนี้จะเรียกว่า “เซลล์เอ็นไยด์ปริทันต์” โดยมีเกณฑ์การคัดเลือกซีฟัน คือ มีส่วนตัวฟันสมบูรณ์ ไม่มีรอยผุและวัสดุบูรณะบนตัวฟัน มีการสร้างรากฟันเสร็จสมบูรณ์ และไม่มีพยาธิสภาพใดๆของอวัยวะปริทันต์ สำหรับเกณฑ์การคัดเลือกซีฟันออก คือ ซีฟันที่ไม่ได้ถูกเก็บอย่างเหมาะสม หรือเป็นซีฟันที่ไม่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเอ็นไยด์ปริทันต์ได้ภายในเวลา 24 ชั่วโมง

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเอ็นไยด์ปริทันต์ เริ่มจากนำซีฟันทอนที่ถูกเก็บอยู่ภายในหลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อ ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดแอลฟาเอ็มอีเอ็ม ที่มีฟีนอลเรด (MEM α with phenol red) และซีรัมวัวร้อยละ 10 มาล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน (Phosphate buffer saline) หลายๆครั้ง แล้วใช้มีดผ่าตัดดูดแยกเนื้อเยื่อเอ็นไยด์ปริทันต์จากบริเวณตอนกลางของผิวรากฟันมาทำการเพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 35 mm (PYREX®, Fisher Scientific, Thermo Fisher Scientific, Canada) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดูลเบคโก โมดิฟาย อีเกิล มีเดีย (Dulbecco's modified eagle medium) ที่ประกอบด้วยซีรัมวัวร้อยละ 10 เพนิซิลลิน 100 units/ml แอมโฟเทอรีซิน บี 0.25 μ g/ml โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 95 และมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 จนเซลล์เริ่มเจริญออกมาจากชิ้นเนื้อ หลังจากเซลล์เพิ่มจำนวนได้ประมาณร้อยละ 80 ของภาชนะเลี้ยงเซลล์ ให้ทำการขยายจำนวนเซลล์โดยการย้ายลงบนจานเลี้ยงเซลล์ใหม่ (subculture) ซึ่งนับเป็นเซลล์รุ่นที่ 1 สำหรับเซลล์ที่ใช้ในการศึกษานี้จะเป็นเซลล์ในรุ่นที่ 3 ถึง 5

3. การศึกษาความสามารถของสารสกัดผนังเซลล์ของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟิคาเลียส ในการกระตุ้นให้เซลล์เอ็นไยด์ปริทันต์มีการแสดงออกของ mRNA ของ IL-8 เปรียบเทียบกับกรดไลโปไคติก เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 0 6 48 และ 72 ชั่วโมง

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เอ็นไยด์ปริทันต์ลงในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 6 หลุม (Corning Costar® TC-Treated Multiple Well Plates, Sigma-Aldrich®, Merck, Germany) แต่ละหลุมมีปริมาณเซลล์หลุมละ 5×10^4 เซลล์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศา



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 10

The 10th STOU National Research Conference

เซลล์เชื้อ ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 95 และมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 3 วัน โดยเมื่อมีความหนาแน่นของปริมาณเซลล์ร้อยละ 70 ถึง 80 ของภาชนะเลี้ยงเซลล์ จึงนำมาทดสอบกับสารสกัดผนังเซลล์ของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส พีคาลีส ATCC 19433 สายพันธุ์มาตรฐาน เปรียบเทียบกับกรดไลโปโตนิก (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA) ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมบวก (positive control) โดยใช้ความเข้มข้น 10 µg/ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หลังจากบ่มครบตามกำหนดของแต่ละช่วงเวลาแล้ว ให้ดูดส่วนน้ำใส (conditioned media) ของแต่ละหลุมออก และนำเซลล์เอ็นยิดปริทันต์ที่เหลืออยู่ในแต่ละหลุมมาสกัด RNA ด้วยชุดสกัดอินนูเพรพ (innuPREP® DNA/RNA Mini Kit, Analytik Jena AG, Germany) จากนั้นนำ RNA ปริมาณ 2 ถึง 3 µg มาทำการสังเคราะห์ cDNA ด้วยชุดสกัดรีเวิร์สเอด (RevertAid® First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo Scientific, Lithuania) นำ cDNA ที่ได้มาตรวจวัดระดับ mRNA ของ IL-8 ด้วยวิธีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริงด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (real-time quantitative polymerase chain reaction หรือ real time PCR) และติดตามผลจากการติดสี SYBR-Green ซึ่งใช้ cDNA ปริมาณ 5 µl ต่อปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ณ ตำแหน่งของยีนที่สนใจ และใช้ไพรเมอร์จำเพาะสำหรับยีนดังกล่าว (ตารางที่ 1) ทำการทดลองสองครั้ง โดยใช้เซลล์เอ็นยิดปริทันต์จากซีฟีนของผู้ป่วยรายเดียวกัน และทำการทดสอบในขั้นตอน real-time PCR ตัวอย่างละสองซ้ำ คำนวณปริมาณการแสดงออกของ mRNA ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปของเครื่องเรียลไทม์ พีซีอาร์ ดีเทกชัน ซิสเต็ม (CFX96 Touch Real-Time PCR System, BIO-RAD®, USA) โดยอ้างอิงตามการศึกษาของ Gao และคณะ (2015) ดังนี้

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{target gene}} - Ct_{\text{housekeeping gene}})_{\text{treatment}} - (Ct_{\text{target gene}} - Ct_{\text{housekeeping gene}})_{\text{control}}$$

$$\text{Fold of induction} = 2^{\Delta\Delta Ct}$$

เปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของ IL-8 ในเซลล์เอ็นยิดปริทันต์ด้วยสถิติแมน วิทนี ยู ที่ระดับนัยสำคัญ $p = 0.05$ เนื่องจากการทดลองนี้มีจำนวนตัวอย่างค่อนข้างน้อย และข้อมูลไม่ได้มีลักษณะการแจกแจงแบบปกติ

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์จำเพาะที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของ mRNA ของ IL-8 และ GAPDH อ้างอิงตามการศึกษาของ Krisanaprakornkit และคณะ (2000)

Name	Sequence	Amplicon size (bp)
IL-8	F 5'- TTT CTG ATG GAG AGA GCT CTG TCT GG -3'	598
	R 5'- AGT GGA ACA AGA CTT GTG GAT CCT GG -3'	
GAPDH	F 5'- ACC ACA GTC CAT GCC ATC ACT GC -3'	452
	R 5'- TCC ACC ACC CTG TTG CTG TAG C -3'	

4. การศึกษาการแสดงออกของ mRNA ของ IL-8 ในเซลล์เอ็นยิดปริทันต์ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดผนังเซลล์ของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส พีคาลีส ความเข้มข้น 100 µg/ml เปรียบเทียบกับความเข้มข้น 10 µg/ml เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง

เนื่องจากการศึกษาของ อุมพร พรหมแก้ว (2562) พบว่าการกระตุ้นเซลล์เอ็นยิดปริทันต์ด้วยสารสกัดผนังเซลล์ของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส พีคาลีส ATCC 19433 สายพันธุ์มาตรฐาน ความเข้มข้น 10 µg/ml ทำให้มีปริมาณการแสดงออกของ



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 10

The 10th STOU National Research Conference

IL-8 ไม่แตกต่างจากความเข้มข้น 100 µg/ml เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดังนั้น การทดลองนี้จะเป็นการเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของ IL-8 ในเซลล์เอ็นไธโดปริทันต์ ระหว่างการกระตุ้นด้วยสารสกัดผนังเซลล์เชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลีส ATCC 19433 สายพันธุ์มาตรฐาน ความเข้มข้น 10 µg/ml และ 100 µg/ml โดยทำการบ่มเป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เอ็นไธโดปริทันต์และประเมินการแสดงออกของ mRNA ของ IL-8 เช่นเดียวกับการทดลองข้างต้น เปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของ IL-8 ในเซลล์เอ็นไธโดปริทันต์ด้วยสถิติแมน วิทนี ยู ที่ระดับนัยสำคัญ $p = 0.05$ เนื่องจากการทดลองนี้มีจำนวนตัวอย่างไม่มากนัก และข้อมูลไม่ได้มีลักษณะการแจกแจงแบบปกติ ผลการทดลองพบว่า สารสกัดผนังเซลล์ของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลีส ดังกล่าว ความเข้มข้น 100 µg/ml บ่มกับเซลล์เอ็นไธโดปริทันต์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำให้เซลล์เอ็นไธโดปริทันต์มีปริมาณการแสดงออกของ IL-8 สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.029$) จึงนำความเข้มข้นและเวลาบ่มดังกล่าวไปใช้ในการทดลองต่อไป (การทดลองนี้จัดเป็นขั้นตอนหนึ่งของการศึกษา แต่ไม่ใช่วัตถุประสงค์การวิจัย จึงขอกล่าวโดยสรุปไว้ในระเบียบวิธีวิจัยเพื่ออธิบายเหตุผลของการใช้สารสกัดผนังเซลล์ของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลีส ความเข้มข้น 100 µg/ml และเวลาบ่ม 48 ชั่วโมง ในการทดลองต่อไป)

5. การศึกษาการแสดงออกของ mRNA ของ IL-8 ในเซลล์เอ็นไธโดปริทันต์ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดผนังเซลล์ของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลีส สายพันธุ์ที่แยกจากคลองรากฟัน เปรียบเทียบกับสารสกัดผนังเซลล์ของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลีส ATCC 19433 สายพันธุ์มาตรฐาน

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เอ็นไธโดปริทันต์เพื่อนำมาทดสอบกับสารสกัดผนังเซลล์ของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลีส ที่แยกจากคลองรากฟัน จำนวน 6 สายพันธุ์ ประกอบด้วยเชื้อกลุ่มที่สลายเม็ดเลือดแดง และกลุ่มที่ไม่สลายเม็ดเลือดแดง กลุ่มละ 3 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับการกระตุ้นด้วยสารสกัดผนังเซลล์ของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลีส ATCC 19433 สายพันธุ์มาตรฐาน ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมบวก (positive control) โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดผนังเซลล์ 100 µg/ml บ่มกับเซลล์เอ็นไธโดปริทันต์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากบ่มครบตามกำหนดเวลาแล้ว จึงสกัด RNA และสังเคราะห์ cDNA เพื่อประเมินการแสดงออกของ mRNA ของ IL-8 ด้วยวิธีการดังกล่าวข้างต้น ทำการทดลองสามครั้ง โดยใช้เซลล์เอ็นไธโดปริทันต์จากซี่ฟันของผู้ป่วยรายเดียวกัน และทำการทดสอบในขั้นตอน real-time PCR ตัวอย่างละสองซ้ำ เปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของ IL-8 ในเซลล์เอ็นไธโดปริทันต์ ระหว่างการกระตุ้นด้วยสารสกัดผนังเซลล์ของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลีส สายพันธุ์ที่แยกจากคลองรากฟัน และสายพันธุ์มาตรฐาน และระหว่างการกระตุ้นด้วยสารสกัดผนังเซลล์ของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลีส กลุ่มที่สลายเม็ดเลือดแดง และกลุ่มที่ไม่สลายเม็ดเลือดแดง ด้วยสถิติแมน วิทนี ยู ที่ระดับนัยสำคัญ $p = 0.05$ เนื่องจากการทดลองนี้มีจำนวนตัวอย่างค่อนข้างน้อย และข้อมูลไม่ได้มีลักษณะการแจกแจงแบบปกติ

ผลการวิจัย

1. ความสามารถของสารสกัดผนังเซลล์ของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลีส ในการกระตุ้นให้เซลล์เอ็นไธโดปริทันต์มีการแสดงออกของ mRNA ของ IL-8 เปรียบเทียบกับการกระตุ้นด้วยกรดไลโปโตนิก เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 0 6 48 และ 72 ชั่วโมง

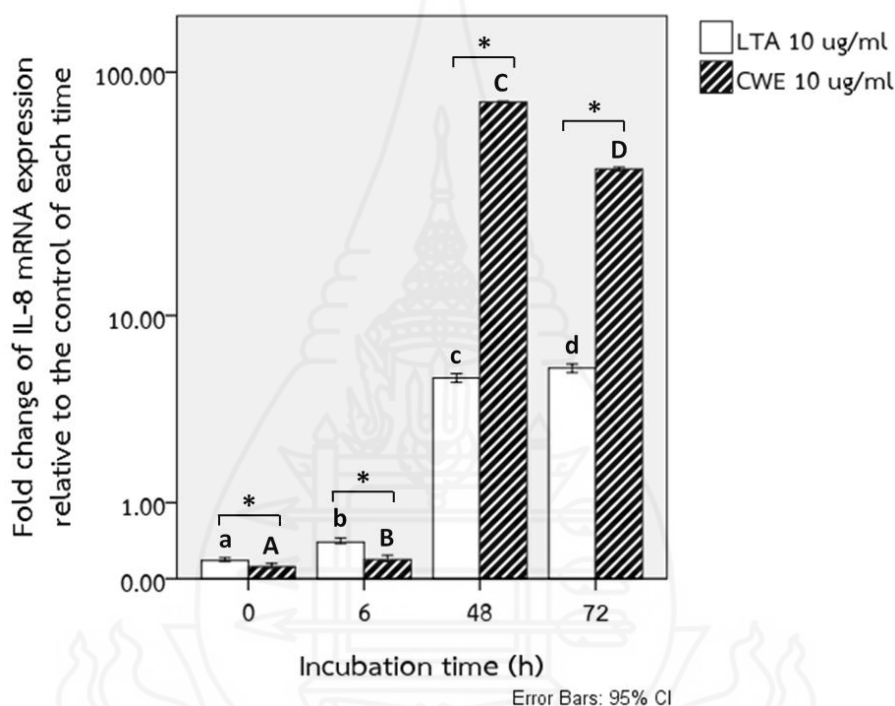
การกระตุ้นเซลล์เอ็นไธโดปริทันต์ด้วยสารสกัดผนังเซลล์ของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลีส ATCC 19433 สายพันธุ์มาตรฐาน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำให้มีปริมาณการแสดงออกของ mRNA ของ IL-8 สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลาอื่นๆ ($p = 0.029$) ซึ่งมีปริมาณการแสดงออกโดยเฉลี่ยประมาณ 76 เท่า เทียบกับกลุ่มควบคุม



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 10

The 10th STOU National Research Conference

ในขณะที่การกระตุ้นด้วยกรดไลโปไคติก ทำให้มีปริมาณการแสดงของ mRNA ของ IL-8 เพิ่มขึ้นตามเวลาที่เพิ่มขึ้น (time dependent) โดยมีปริมาณการแสดงออกสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อกระตุ้นเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ($p = 0.029$) ซึ่งมีปริมาณการแสดงออกโดยเฉลี่ยประมาณ 6 เท่า เทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ การกระตุ้นเซลล์เอ็นอีทีปริทันต์เป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง ทำให้มีปริมาณการแสดงออกของ mRNA ของ IL-8 เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับที่เวลา 0 และ 6 ชั่วโมง โดยที่สารสกัดผนังเซลล์ของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส พิคาลิส ATCC 19433 สายพันธุ์มาตรฐาน ทำให้มีปริมาณการแสดงออกของ mRNA ของ IL-8 สูงกว่าการกระตุ้นด้วยกรดไลโปไคติก อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.029$) (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 ความสามารถของสารสกัดผนังเซลล์ (CWE) ของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส พิคาลิส ATCC 19433 สายพันธุ์มาตรฐาน ในการกระตุ้นเซลล์เอ็นอีทีปริทันต์ให้มีการแสดงออกของ mRNA ของ IL-8 เปรียบเทียบกับการกระตุ้นด้วยกรดไลโปไคติก (LTA) (ตัวอักษรภาษาอังกฤษเล็กที่แตกต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างช่วงเวลาภายในกลุ่ม LTA ตัวอักษรภาษาอังกฤษใหญ่ที่แตกต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างช่วงเวลาภายในกลุ่ม CWE และสัญลักษณ์ * แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการกระตุ้นด้วย CWE และ LTA ในแต่ละช่วงเวลา)

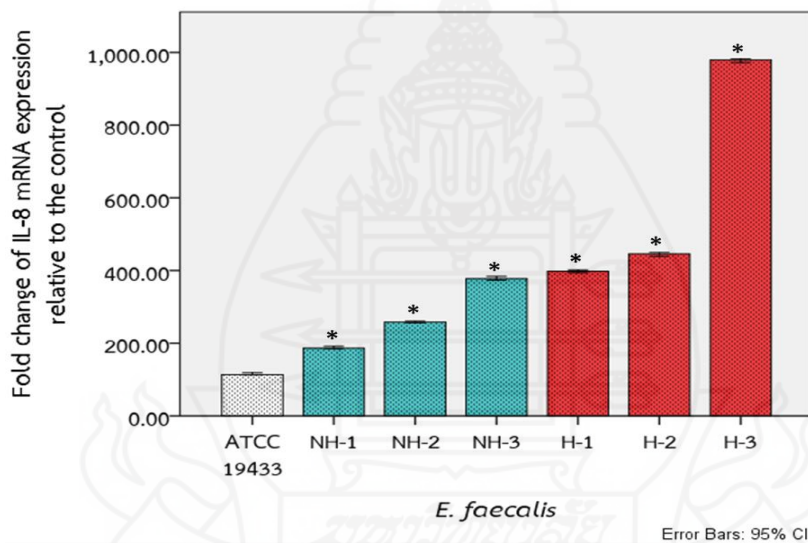
2. การแสดงออกของ mRNA ของ IL-8 ในเซลล์เอ็นอีทีปริทันต์ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดผนังเซลล์ของเชื้อเอนเทอโร-คอคคัส พิคาลิส สายพันธุ์ที่แยกจากคลองรากฟัน เปรียบเทียบกับการกระตุ้นด้วยสารสกัดผนังเซลล์ของเชื้อเอนเทอโร-คอคคัส พิคาลิส ATCC 19433 สายพันธุ์มาตรฐาน



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 10

The 10th STOU National Research Conference

การกระตุ้นเซลล์เอ็นไธดปรินต์ด้วยสารสกัดผนังเซลล์ของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟิคาเลีย สายพันธุ์ที่แยกจากคลองรากฟัน ทั้งกลุ่มที่สลายเม็ดเลือดแดง และกลุ่มที่ไม่สลายเม็ดเลือดแดง ทำให้มีปริมาณการแสดงออกของ mRNA ของ IL-8 สูงกว่าการกระตุ้นด้วยสารสกัดผนังเซลล์ของสายพันธุ์มาตรฐานดังกล่าวอย่างชัดเจน ปริมาณการแสดงออกของ mRNA ของ IL-8 มีค่าประมาณ 398 445 และ 978 สำหรับสายพันธุ์ H-1 H-2 และ H-3 ตามลำดับ และมีค่าประมาณ 187 258 และ 379 สำหรับสายพันธุ์ NH-1 NH-2 และ NH-3 ตามลำดับ ในขณะที่สายพันธุ์ ATCC 19433 ทำให้มีปริมาณการแสดงออกของ mRNA ของ IL-8 โดยเฉลี่ยประมาณ 115 เท่า เทียบกับกลุ่มควบคุม จากการวิเคราะห์พบว่าสารสกัดผนังเซลล์ของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟิคาเลีย ที่แยกจากคลองรากฟันทั้งหกสายพันธุ์ ทำให้มีปริมาณการแสดงออกของ mRNA ของ IL-8 สูงกว่าการกระตุ้นด้วยสารสกัดผนังเซลล์ของสายพันธุ์มาตรฐาน (ATCC 19433) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.002$) นอกจากนี้ยังพบว่า การกระตุ้นเซลล์เอ็นไธดปรินต์ด้วยสารสกัดผนังเซลล์ของกลุ่มที่สลายเม็ดเลือดแดง ทำให้มีปริมาณการแสดงออกของ mRNA ของ IL-8 สูงกว่าการกระตุ้นด้วยสารสกัดผนังเซลล์ของกลุ่มที่ไม่สลายเม็ดเลือดแดง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) (ภาพที่ 2 และ 3)

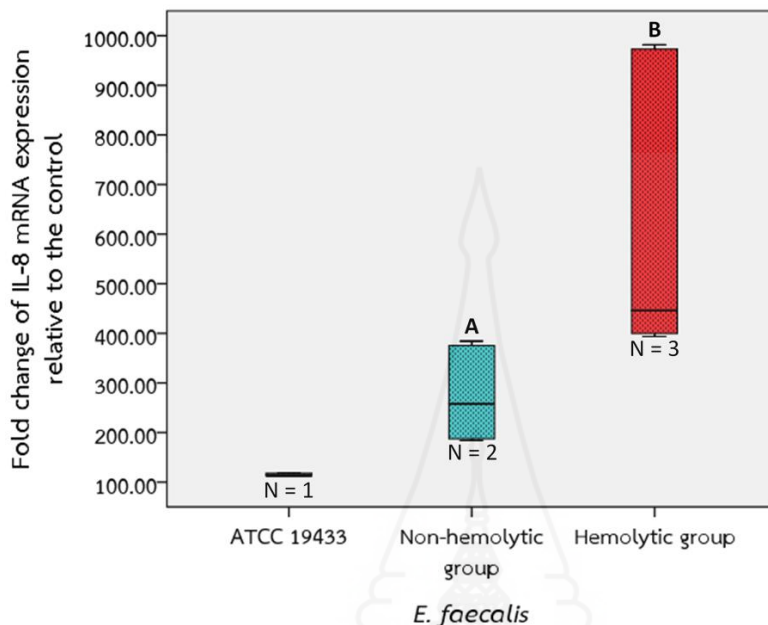


ภาพที่ 2 การแสดงออกของ mRNA ของ IL-8 ในเซลล์เอ็นไธดปรินต์ ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดผนังเซลล์ของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟิคาเลีย สายพันธุ์ที่แยกจากคลองรากฟัน (NH- และ H-) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน (ATCC 19433) (สัญลักษณ์ * แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟิคาเลีย ที่แยกจากคลองรากฟันแต่ละสายพันธุ์ กับสายพันธุ์มาตรฐาน)



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 10

The 10th STOU National Research Conference



ภาพที่ 3 การแสดงออกของ mRNA ของ IL-8 ในเซลล์เอ็นยิดปริทันต์ ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดผนังเซลล์ของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิส เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ไม่สลายเม็ดเลือดแดง (non-hemolytic group) และกลุ่มที่สลายเม็ดเลือดแดง (hemolytic group) (ตัวอักษรภาษาอังกฤษใหญ่ที่แตกต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ไม่สลายเม็ดเลือดแดง และกลุ่มที่สลายเม็ดเลือดแดง)

อภิปรายผลการวิจัย

1. ความสามารถของสารสกัดผนังเซลล์ของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิส ในการกระตุ้นให้เซลล์เอ็นยิดปริทันต์มีการแสดงออกของ mRNA ของ IL-8 เปรียบเทียบกับการกระตุ้นด้วยกรดไลโปไคติก เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 0 6 48 และ 72 ชั่วโมง

ผลการศึกษานี้พบว่าสารสกัดผนังเซลล์ของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิส มีความสามารถในการกระตุ้นให้เซลล์เอ็นยิดปริทันต์มีการแสดงออกของ IL-8 ได้เช่นเดียวกับกรดไลโปไคติกที่เป็นกลุ่มควบคุมบวก โดยที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมง จะพบว่าเซลล์เอ็นยิดปริทันต์ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดผนังเซลล์มีปริมาณการแสดงออกของ IL-8 สูงกว่าการกระตุ้นด้วยกรดไลโปไคติกอย่างชัดเจนและมีนัยสำคัญทางสถิติ เป็นการยืนยันถึงคุณสมบัติขององค์ประกอบภายในผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกที่สามารถกระตุ้นให้มีการตอบสนองของเซลล์เอ็นยิดปริทันต์ อันมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบและทำลายเนื้อเยื่อ ในขณะการศึกษาของ อุมพร พรหมแก้ว (2562) พบว่าสารสกัดผนังเซลล์ดังกล่าว ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ ทำให้เซลล์เอ็นยิดปริทันต์มีปริมาณการแสดงออกของ IL-8 สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างชัดเจน แต่ไม่แตกต่างจากการกระตุ้นด้วยกรดไลโปไคติก เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นอกจากนี้ ผลการศึกษาของ Zhang และคณะ (2015) พบว่าเซลล์เอ็นยิดปริทันต์ที่ถูกกระตุ้นด้วยกรดไลโปไคติก ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ จะมีปริมาณการสร้าง IL-8 สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่แตกต่างจากการกระตุ้นด้วยเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิส ที่ถูกทำให้ตายด้วยความร้อน 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 10

The 10th STOU National Research Conference

เมื่อทำการบ่มไปจนถึงเวลา 24 ชั่วโมง โดยประเมินการสร้าง IL-8 ด้วยปฏิกิริยาเอนไซม์อิมมูโนแอสเสย์ (Enzyme-linked immunosorbent assays หรือ ELISA) ผลการศึกษาที่แตกต่างกัน อาจเป็นผลจากช่วงเวลาประเมินผลที่แตกต่างกัน วิธีการประเมินปริมาณ IL-8 ที่แตกต่างกัน หรืออาจเป็นผลจากความร้อนที่ทำให้เกิดการเสื่อมสภาพขององค์ประกอบภายในผนังเซลล์ของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟิคาลิส จึงทำให้เสียคุณสมบัติในการกระตุ้นเซลล์เอ็นอีทีปรีทันต์ การที่สารสกัดผนังเซลล์ทำให้มีปริมาณการแสดงออกของ IL-8 ในเซลล์เอ็นอีทีปรีทันต์ สูงกว่าการกระตุ้นด้วยกรดไลโปโพลีไซคลิก เป็นการสนับสนุนการศึกษาของ Kengatharan และคณะ (1998) การศึกษาของ Middelveld และ Alving (2000) และการศึกษาของ Ray และคณะ (2013) ที่กล่าวว่าองค์ประกอบอื่นๆในผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกอาจทำหน้าที่ร่วมกับกรดไลโปโพลีไซคลิก ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกระตุ้นการอักเสบและทำลายเนื้อเยื่อ

2. การแสดงออกของ mRNA ของ IL-8 ในเซลล์เอ็นอีทีปรีทันต์ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดผนังเซลล์ของเชื้อเอนเทอโร-คอคคัส ฟิคาลิส สายพันธุ์ที่แยกจากคลองรากฟัน เปรียบเทียบกับการกระตุ้นด้วยสารสกัดผนังเซลล์ของเชื้อเอนเทอโร-คอคคัส ฟิคาลิส ATCC 19433 สายพันธุ์มาตรฐาน

ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดผนังเซลล์ของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟิคาลิส ที่แยกจากคลองรากฟันทั้งหกสายพันธุ์ ทำให้มีปริมาณการแสดงออกของ IL-8 สูงกว่าสารสกัดผนังเซลล์ของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟิคาลิส ATCC 19433 สายพันธุ์มาตรฐานที่เป็นกลุ่มควบคุมบวก อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้น เชื้อสายพันธุ์ที่แยกจากคลองรากฟันจึงอาจมีความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดกระบวนการอักเสบและทำลายเนื้อเยื่อได้มากกว่าเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน และการตอบสนองของเซลล์เอ็นอีทีปรีทันต์ต่อสารสกัดผนังเซลล์ของเชื้อที่แยกจากคลองรากฟันอาจมีความใกล้เคียงกับสภาวะทางคลินิกมากกว่าด้วยโดยสันนิษฐานว่า เชื้อที่แยกจากคลองรากฟันที่เคยได้รับการรักษา อาจเกิดการพัฒนาสายพันธุ์ให้มีความสามารถในการดำรงชีวิตอยู่ในสภาวะที่ขาดแคลนอาหาร ซึ่งแตกต่างจากเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานที่ถูกเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ จึงอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดความแตกต่างของการตอบสนองของเซลล์เอ็นอีทีปรีทันต์ดังเช่นในผลการศึกษานี้ อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาใดในปัจจุบันที่เปรียบเทียบผลการกระตุ้นเซลล์เอ็นอีทีปรีทันต์ ระหว่างเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟิคาลิส สายพันธุ์ที่แยกจากคลองรากฟัน และสายพันธุ์มาตรฐาน

การศึกษามูลการตอบสนองของเซลล์เอ็นอีทีปรีทันต์ เปรียบเทียบระหว่างการกระตุ้นด้วยสารสกัดผนังเซลล์ของ เชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟิคาลิส กลุ่มที่สลายเม็ดเลือดแดง (hemolytic group) และกลุ่มที่ไม่สลายเม็ดเลือดแดง (non-hemolytic group) พบว่าสารสกัดผนังเซลล์ของกลุ่มที่สลายเม็ดเลือดแดง ทำให้มีปริมาณการแสดงออกของ IL-8 สูงกว่าสารสกัดผนังเซลล์ของกลุ่มที่ไม่สลายเม็ดเลือดแดง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้น เชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟิคาลิส กลุ่มที่สลายเม็ดเลือดแดง จึงอาจมีความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดกระบวนการอักเสบและทำลายเนื้อเยื่อได้มากกว่ากลุ่มที่ไม่สลายเม็ดเลือดแดง ซึ่งสนับสนุนผลการศึกษาของ Ike และคณะ (1984) ที่รายงานว่าเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟิคาลิส ที่สามารถสร้างสารสลายเม็ดเลือดแดง (hemolysin) จะมีความสามารถในการก่อโรครุนแรงกว่าเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟิคาลิส ที่ไม่สามารถสร้างสารดังกล่าวได้อย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากพบว่าค่าของปริมาณสารที่ให้อยู่ตรงกับสัตว์ทดลองแล้วทำให้สัตว์ทดลองตายไปร้อยละ 50 ของจำนวนสัตว์ทดลองทั้งหมด (LD50) ของหนูที่มีการติดเชื้อผ่านทางช่องท้อง (intraperitoneal infection) ด้วยเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟิคาลิส ชนิดไม่สลายเม็ดเลือดแดง จะสูงกว่าค่าดังกล่าวของชนิดสลายเม็ดเลือดแดงถึงสิบเท่า นอกจากนี้ การศึกษาของ Huycke และคณะ (1991) พบว่าร้อยละ 91.2 ของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟิคาลิส ที่มีความสามารถในการต้านทานต่อยาเจนตาไมซิน (gentamycin) จะสามารถสร้างสารสลายเม็ดเลือดแดงได้ และพบว่าผู้ป่วยที่มีภาวะติดเชื้อใน



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 10

The 10th STOU National Research Conference

กระแสเลือด (bacteremia) ด้วยเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิส ที่สามารถสร้างสารสลายเม็ดเลือดแดงและต้านทานต่อยาเจนตาไมซิน จะมีความเสี่ยงในการเสียชีวิตภายในสามสัปดาห์เพิ่มขึ้นถึงห้าเท่า เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่ติดเชื้อในกระแสเลือดด้วยเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิส ที่ไม่สามารถสร้างสารสลายเม็ดเลือดแดงซึ่งมักไวต่อยาเจนตาไมซิน เช่นเดียวกับการศึกษาของ Ike และคณะ (1987) ที่พบว่าเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิส ชนิดสลายเม็ดเลือดแดง ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยที่มีภาวะติดเชื้อผ่านทางหลอดเลือด (parenteral infection) จะสามารถต้านทานยาปฏิชีวนะได้ถึงร้อยละ 90 เมื่อเปรียบเทียบกับชนิดไม่สลายเม็ดเลือดแดงที่ต้านทานยาปฏิชีวนะได้เพียงร้อยละ 19 การศึกษาเหล่านี้แสดงให้เห็นว่า สารสลายเม็ดเลือดแดงที่แบคทีเรียสร้างขึ้นอาจมีความเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรค และการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาใดที่อธิบายกลไกของสารสลายเม็ดเลือดแดงที่สร้างจากแบคทีเรียเกี่ยวกับกระบวนการก่อโรคต่างๆในมนุษย์ และยังไม่มีการศึกษาที่เปรียบเทียบผลการกระตุ้นเซลล์เอ็นอีทีปริทันต์ ระหว่างเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิส กลุ่มที่สลายเม็ดเลือดแดง และกลุ่มที่ไม่สลายเม็ดเลือดแดง

เมื่อพิจารณาข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยแต่ละรายที่แยกเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิส ได้จากคลองรากฟัน ซึ่งได้รับการศึกษาของ ภัทรมน ประไพสิทธิ์ (2562) พบว่าเชื้อกลุ่มที่สลายเม็ดเลือดแดง จะแยกได้จากคลองรากฟันของฟันที่มีอาการแสดงทางคลินิกอย่างชัดเจน คือ เคาะเจ็บ มีรูเปิดหนอง (sinus opening) และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรอยโรครอบปลายรากฟันโดยเฉลี่ย 6.2 มิลลิเมตร ยกเว้นสายพันธุ์ H-3 ที่ได้จากฟันที่รอยโรครอบปลายรากขนาด 2 มิลลิเมตร ในขณะที่เชื้อกลุ่มที่ไม่สลายเม็ดเลือดแดง จะแยกได้จากคลองรากฟันของฟันที่ไม่มีอาการแสดงทางคลินิก และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรอยโรครอบปลายรากฟันโดยเฉลี่ยประมาณ 3.9 มิลลิเมตร ยกเว้นสายพันธุ์ NH-3 ที่ได้จากฟันที่มีรูเปิดหนอง หากพิจารณาร่วมกับผลการตอบสนองของเซลล์เอ็นอีทีปริทันต์ที่พบว่าสารสกัดผนังเซลล์ของเชื้อทุกสายพันธุ์ในกลุ่มที่สลายเม็ดเลือดแดง ทำให้เซลล์เอ็นอีทีปริทันต์มีปริมาณการแสดงออกของ IL-8 สูงกว่าการกระตุ้นด้วยสารสกัดผนังเซลล์ของเชื้อทุกสายพันธุ์ในกลุ่มที่ไม่สลายเม็ดเลือดแดง ก็มีความสอดคล้องกับการที่มักพบเชื้อกลุ่มที่สลายเม็ดเลือดแดงในคลองรากฟันของฟันที่มีอาการแสดงทางคลินิกอย่างชัดเจน สำหรับสายพันธุ์ NH-3 ที่แยกได้จากคลองรากฟันของฟันที่มีรูเปิดหนอง ก็พบว่ามีปริมาณการแสดงออกของ IL-8 ใกล้เคียงกับเชื้อกลุ่มที่สลายเม็ดเลือดแดงด้วยเช่นกัน (สายพันธุ์ H-1 และ H-2) จากข้อมูลดังกล่าวนี้ ทำให้สันนิษฐานว่าความสามารถของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิส ในการกระตุ้นให้เซลล์เอ็นอีทีปริทันต์มีการแสดงออกของ IL-8 อาจมีความเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของอาการแสดงทางคลินิก หรือขนาดของรอยโรครอบปลายรากฟัน ซึ่งการศึกษาของ Bendre และคณะ (2003) รายงานว่า IL-8 มีผลเหนี่ยวนำกระบวนการสร้างเซลล์ที่ทำหน้าที่ทำลายกระดูกหรือเซลล์ออสติโอคลาสต์ (osteoclastogenesis) และสามารถเหนี่ยวนำการทำหน้าที่ของเซลล์ดังกล่าวด้วย อย่างไรก็ตาม ปัจจัยอื่นๆอาจมีผลต่ออาการแสดงทางคลินิก และขนาดของรอยโรครอบปลายรากฟัน เช่น โมเลกุลชนิดอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบและทำลายเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟัน เชื้อชนิดอื่นๆ ซึ่งอาจอยู่ภายในคลองรากฟันที่แยกเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิส มาทำการศึกษา ความสามารถในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยแต่ละราย ฯลฯ เนื่องจากผลการศึกษาพบว่าสายพันธุ์ H-3 ทำให้มีปริมาณการแสดงออกของ IL-8 สูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อสายพันธุ์อื่นๆที่แยกจากคลองรากฟัน แต่กลับไม่ได้มาจากคลองรากฟันของฟันที่มีอาการทางคลินิกที่ชัดเจน

การศึกษานี้ ทำการทดสอบโดยใช้เชื้อจากคลองรากฟันจำนวนหกสายพันธุ์ เนื่องจากข้อจำกัดในเรื่องระยะเวลาการปฏิบัติงาน ประกอบกับวิธีการทางชีวโมเลกุลและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ค่อนข้างละเอียดอ่อนและเกิดข้อผิดพลาดได้ง่าย ทำให้เกิดข้อจำกัดในการนำข้อสรุปของผลการทดลองไปใช้ เพราะเป็นผลการเปรียบเทียบของเชื้อกลุ่มที่สลายเม็ดเลือดแดง



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 10

The 10th STOU National Research Conference

และกลุ่มที่สลายเม็ดเลือดแดง กลุ่มละสามสายพันธุ์เท่านั้น อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษานี้ยังสามารถแสดงให้เห็นความแตกต่างของการแสดงออกของ IL-8 ในเซลล์เอ็นโดพริทนต์ ระหว่างการกระตุ้นด้วยเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟิคาลิส กลุ่มที่สลายเม็ดเลือดแดง และกลุ่มที่ไม่สลายเม็ดเลือดแดง ซึ่งจะเป็ข้อมูลเบื้องต้นให้สำหรับการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

ดังนั้น จึงสรุปผลการศึกษาได้ว่า (1) สารสกัดผนังเซลล์ของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟิคาลิส มีความสามารถในการกระตุ้นให้เซลล์เอ็นโดพริทนต์ตอบสนองด้วยแสดงออกของ IL-8 ได้เช่นเดียวกับกรดไลโปโตะโคอิก (2) สารสกัดผนังเซลล์ของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟิคาลิส สายพันธุ์ที่แยกจากคลองรากฟัน สามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองดังกล่าวได้มากกว่าสายพันธุ์มาตรฐาน และ (3) สารสกัดผนังเซลล์ของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟิคาลิส กลุ่มที่สลายเม็ดเลือดแดง สามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองดังกล่าวได้มากกว่ากลุ่มที่ไม่สลายเม็ดเลือดแดง

ข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาที่พบว่าเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟิคาลิส ชนิดสลายเม็ดเลือดแดง ที่แยกจากคลองรากฟัน มีความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของเซลล์เอ็นโดพริทนต์ด้วยการแสดงออกของ IL-8 ได้มากกว่าชนิดที่ไม่สลายเม็ดเลือดแดง ซึ่ง IL-8 เป็นสารก่อการอักเสบชนิดหนึ่งที่เกี่ยวข้องในกระบวนการอักเสบและทำลายเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟัน ประกอบกับการศึกษาที่ผ่านมาที่รายงานว่าสารสลายเม็ดเลือดแดงที่เชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟิคาลิส สร้างขึ้นอาจเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรค และการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ ดังนั้น การนำเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟิคาลิส ชนิดที่สลายเม็ดเลือดแดง ซึ่งได้จากคลองรากฟันที่ล้มเหลวจากการรักษา มาทำการศึกษาร่วมกับยาที่ใช้ในระหว่างการรักษาคคลองรากฟัน น้ำยาล้างคลองรากฟัน หรือวิธีการต่างๆ ที่ใช้สำหรับกำจัดเชื้อในคลองรากฟัน เพื่อประเมินการดื้อยาหรือความสามารถในการมีชีวิตรอดจากกระบวนการกำจัดเชื้อ หรือเพื่อคิดค้นสารที่ยับยั้งการกระตุ้นเซลล์เจ้าบ้านผ่านทางตัวรับที่มีความจำเพาะกับองค์ประกอบในผนังเซลล์ของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟิคาลิส อาจให้ผลการทดลองที่เป็นประโยชน์สำหรับการพัฒนากระบวนการรักษาคคลองรากฟันในกรณีที่มีความล้มเหลวจากการรักษาที่มีความเกี่ยวข้องกับเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟิคาลิส ซึ่งเป็นเชื้อที่พบได้บ่อยที่สุดในกรณีดังกล่าว และยังคงเป็นปัญหาสำคัญของการรักษาคคลองรากฟันในปัจจุบัน

เอกสารอ้างอิง

- ภัทรมน ประไพสิทธิ์. (2562). ความชุกของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟิคาลิส ในฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาคคลองรากฟัน ที่มีรอยโรคปลายรากฟัน ด้วยวิธี *real-time quantitative PCR (qPCR)* และการเพาะเลี้ยงเชื้อ (วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต). มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.
- อุมาพร พรหมแก้ว. (2562). ความสามารถในการยึดเกาะเซลล์ การเข้าสู่เซลล์ ของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟิคาลิส ต่อเซลล์เนื้อเยื่อใน เซลล์เอ็นโดพริทนต์ และเซลล์เยื่อผิวช่องปาก และการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยสารสกัดจากผนังเซลล์ของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟิคาลิส สายพันธุ์มาตรฐาน (ATCC 19433) ต่อเซลล์เอ็นโดพริทนต์ (วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต). มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.
- Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *Journal of endodontics*. 2006;32(2):93-8.



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 10

The 10th STOU National Research Conference

- Ginsburg I. Role of lipoteichoic acid in infection and inflammation. *The Lancet Infectious diseases*. 2002;2(3):171-9.
- Kang SS, Sim JR, Yun CH, Han SH. Lipoteichoic acids as a major virulence factor causing inflammatory responses via Toll-like receptor 2. *Archives of pharmacal research*. 2016;39(11):1519-29.
- Marton IJ, Kiss C. Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis. *Oral microbiology and immunology*. 2000;15(3):139-50.
- Tang L, Zhou XD, Wang Q, Zhang L, Wang Y, Li XY, et al. Expression of TRAF6 and pro-inflammatory cytokines through activation of TLR2, TLR4, NOD1, and NOD2 in human periodontal ligament fibroblasts. *Archives of oral biology*. 2011;56(10):1064-72.
- Zhang L, Wang T, Lu Y, Zheng Q, Gao Y, Zhou X, et al. Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor Plays a Role in the Inflammatory Responses of Human Periodontal Ligament Fibroblasts to *Enterococcus faecalis*. *Journal of endodontics*. 2015;41(12):1997-2001.
- Kengatharan KM, De Kimpe S, Robson C, Foster SJ, Thiemermann C. Mechanism of gram-positive shock: identification of peptidoglycan and lipoteichoic acid moieties essential in the induction of nitric oxide synthase, shock, and multiple organ failure. *The Journal of experimental medicine*. 1998;188(2):305-15.
- Middelveld RJ, Alving K. Synergistic septicemic action of the gram-positive bacterial cell wall components peptidoglycan and lipoteichoic acid in the pig in vivo. *Shock (Augusta, Ga)*. 2000;13(4):297-306.
- Ray A, Cot M, Puzo G, Gilleron M, Nigou J. Bacterial cell wall macroamphiphiles: pathogen-/microbe-associated molecular patterns detected by mammalian innate immune system. 2003;95(1):33-42.
- Huycke MM, Spiegel CA, Gilmore MS. Bacteremia caused by hemolytic, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1991;35(8):1626-34.
- Ike Y, Hashimoto H, Clewell DB. Hemolysin of *Streptococcus faecalis* subspecies *zymogenes* contributes to virulence in mice. *Infection and immunity*. 1984;45(2):528-30.
- Gao R, Kryciak D, Petersen K, Utpatel C, Knapp A, Schmeisser C, et al. Genome-wide RNA sequencing analysis of quorum sensing-controlled regulons in the plant-associated *Burkholderia glumae* PG1 strain. *Applied and environmental microbiology*. 2015;81(23):7993-8007.
- Krisanaprakornkit S, Kimball JR, Weinberg A, Darveau RP, Bainbridge BW, Dale BA. 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. *Infection and immunity*. 2000;68(5):2907-15.
- Ike Y, Hashimoto H, Clewell DB. High incidence of hemolysin production by *Enterococcus* (*Streptococcus*) *faecalis* strains associated with human parenteral infections. *Journal of clinical microbiology*. 1987;25(8):1524-8.



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 10

The 10th STOU National Research Conference

Bendre MS, Montague DC, Peery T, Akel NS, Gaddy D, Suva LJ. Interleukin-8 stimulation of osteoclastogenesis and bone resorption is a mechanism for the increased osteolysis of metastatic bone disease. Bone. 2003;33(1):28-37.

