ผลของสารสกัดจากรกแพะต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกของมนุษย์ในห้องปฏิบัติการ

Effects of Goat Placenta Extracts on the Proliferation of Human Gingival Fibroblasts *in vitro*

เทพวาภรณ์ ธรรมแงะ (Thepvaporn Tamangae)* วราภรณ์ สุวรรณรงค์ (Waraporn Suwannarong)**
ดร.วัชรี คุณกิตติ (Dr.Watcharee Khunkitti)*** ดร.สุวิมล ทวีชัยศุภพงษ์ (Dr.Suwimol Taweechaisupapong)****

บทคัดย่อ

เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกของมนุษย์เป็นเซลล์สำคัญในกระบวนการหายของแผลของเนื้อเยื่อปริทันต์ที่ได้รับบาดเจ็บ ซึ่งเนื้อเยื่อยึดต่อที่สมบูรณ์จะช่วยป้องกันการบุกรุกของจุลินทรีย์ก่อโรคสู่อวัยวะปริทันต์ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากรกแพะ 2 ชนิด (kku5, kku6) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกของมนุษย์ ณ เวลาต่างๆ โดยทำการศึกษาในห้องปฏิบัติการ ความมีชีวิตของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกของมนุษย์จะถูกประเมินด้วยการใช้เพรสโตบลู และแสดงผลเป็นร้อยละ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารสกัด kku5 ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกของมนุษย์ ในทุกช่วงเวลาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยให้ผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้ดีที่สุด ณ เวลา 7 วัน ข้อมูลที่ได้นี้จะสามารถนำไปพัฒนาสารสกัดจากรกแพะเป็นผลิตภัณฑ์ในการช่วยการหายของแผลในช่องปากต่อไป

ABSTRACT

Human gingival fibroblasts (HGFs) are a major component of connective tissues that important in protecting the periodontium from pathogenic microorganisms and plays a key role in wound healing of the periodontium. The purpose of this in vitro study is to determine the effects of various concentrations of goat placenta extracts (kku5, kku6) on the proliferation of human gingival fibroblasts in varying periods of time. The viability of HGFs was measured fluorometrically by PrestoBlue assay and expressed as a percentage relative to the cells untreated with the extracts. The results showed that kku5 at concentration 1 mg/ml were the most potent extract in stimulating proliferation of HGFs during a 7 day period ($P<0.05$). These findings suggest a potential development of goat placenta extract kku5 as a new therapeutic agent which may use to promote wound healing in the oral cavity.

คำสำคัญ: รกแพะ การเพิ่มจำนวนของเซลล์ เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกของมนุษย์

Keywords: Goat placenta, Cell proliferation, Human gingival fibroblast

** นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาปริทันตวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
*** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาปริทันตวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ และกลุ่มวิจัยไบโอฟิล์ม มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
**** รองศาสตราจารย์ สาขาวิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ และกลุ่มวิจัยไบโอฟิล์ม มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
***** ศาสตราจารย์ กลุ่มวิจัยไบโอฟิล์ม คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*

บทนำ

โรคปริทันต์อักเสบ (periodontitis) เป็นโรคติดเชื้อที่มีการทำลายเนื้อเยื่อปริทันต์ ซึ่งปัจจุบันพบว่ามีแนวโน้มสูงขึ้นตามอายุที่เพิ่มขึ้น หากไม่ได้รับการรักษาจะส่งผลให้มีการทำลายอวัยวะปริทันต์ ได้แก่ เหงือก (gingiva), เอ็นยึดปริทันต์ (periodontal ligament), กระดูกเบ้าฟัน (alveolar bone) และเคลือบรากฟัน (cementum) มากขึ้น ลักษณะทางคลินิกที่พบได้แก่ เหงือกจะมีสีแดงคล้ำ บวม มีเลือดไหลจากเหงือกที่บวม มีการสูญเสียการยึดเกาะปริทันต์กระดูกถูกทำลาย และเหงือกร่น มองเห็นตัวฟันยาวขึ้น มีหนอง และเลือดไหลบริเวณเหงือกที่อักเสบ ฟันจะโยกร่วมกับมีอาการเจ็บขณะเคี้ยวอาหาร และนำไปสู่การสูญเสียฟันได้

เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกของมนุษย์ (human gingival fibroblast) เป็นเซลล์หลักในเนื้อเยื่อยึดต่อ (connective tissue) ของอวัยวะปริทันต์ ทำหน้าที่สร้างเส้นใยซึ่งเป็นโครงสร้างของเนื้อเยื่อ เพื่อเสริมสร้างความแข็งแรงให้กับเนื้อเยื่อปริทันต์ ซึ่งเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกของมนุษย์มีบทบาทสำคัญในการคืนสภาพของการยึดเกาะของเนื้อเยื่อยึดต่อ (connective tissue attachment) ของอวัยวะปริทันต์ทำให้สามารถกลับมาใช้งานได้ นอกจากนี้เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกของมนุษย์ยังเป็นเซลล์สำคัญเซลล์หนึ่งในกระบวนการหายของแผล (wound healing) ของเนื้อเยื่อปริทันต์ที่ได้รับบาดเจ็บ เพื่อป้องกันการบุกรุกของจุลินทรีย์ก่อโรคสู่อวัยวะปริทันต์ได้อีกด้วย

สารสกัดจากรกได้ถูกนำมาใช้ในเรื่องของการหายของแผล และเป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอางเนื่องจากสารสกัดจากรกอุดมไปด้วยสารที่มีประโยชน์ ได้แก่ เอนไซม์ (enzymes) กรดนิวคลิอิก (nucleic acids) วิตามิน (vitamins) กรดอะมิโน (amino acids) สเตียรอยด์ (steroids) กรดไขมัน (fatty acids) และแร่ธาตุ(minerals) ซึ่งสารต่างๆ เหล่านี้สามารถช่วยในเรื่องของการต้านสารอนุมูลอิสระ (antioxidant) ต้านการอักเสบ (anti-inflammation) ได้ (Park et al., 2010) จึงได้มีการนำสารสกัดจากรกมาประยุกต์ใช้เพื่อประโยชน์ในทางการแพทย์มากขึ้น เช่น โรคตับเรื้อรัง (chronic liver diseases) กลุ่มอาการวัยหมดประจำเดือน (menopause syndrome) และโรคเม็ดสีที่ผิวหนัง (skin pigment diseases) (Kong et al., 2008)

มีการศึกษาสารสกัดจากรกแพะต่อเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast) พบว่าสารสกัดจากรกแพะมีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูกของมนุษย์ และลดสัดส่วนการแสดงออกของจีนรีเซปเตอร์แอคติเวเตอร์ ของนิวเคลียร์แฟคเตอร์ แคปปา บี ไลแกนหรือแรงค์แอล (receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand ; RANKL) และออสทีโอโปรติเจรินหรือโอพีจี (osteoprotegerin ; OPG) เมื่อถูกกระตุ้นด้วยส่วนสกัดเซลล์แตกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสได้ (เอกรัตน์ และคณะ, 2560) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาซึ่งพบว่า เปปไทด์จากรกแพะมีประสิทธิภาพในการต้านสารอนุมูลอิสระ และสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase)ได้ (Ruksounjik et al., 2016) อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานการศึกษาผลของสารสกัดจากรกแพะในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกของมนุษย์ การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากรกแพะต่อการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกของมนุษย์ ซึ่งผลของการศึกษานี้จะสามารถนำมาเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนา หรือประยุกต์ใช้สารดังกล่าวในทางด้านทันตกรรมต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากรกแพะต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกของมนุษย์ที่ความเข้มข้น และระยะเวลาต่างๆ

วิธีการวิจัย

การเตรียมเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกของมนุษย์

เก็บชิ้นเนื้อเยื่อเหงือกตัวอย่างจากอาสาสมัครจำนวน 5 คน ที่มีสุขภาพแข็งแรง ซึ่งมารับการรักษาที่คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และมีแผนการรักษาที่จะต้องได้รับการทำศัลยกรรมปริทันต์เพื่อเพิ่มความยาวตัวฟัน (crown lengthening procedure) เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกจะถูกแยกจากชิ้นเนื้อเยื่อเหงือกและเพาะเลี้ยง (subculture) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็ม 1 มิลลิลิตร (มล.) ซึ่งประกอบด้วยกลูโคส 4.5 กรัม/ลิตร และโซเดียมไบคาร์บอเนต 3.7 กรัม/ลิตร ที่เติมซีรัมจากตัวอ่อนของวัวร้อยละ10 เพนนิซิลิน 100 ยูนิต/มล. สเตรพโตมัยซิน 100 ไมโครกรัม/มล. และแอมโฟเทอริซินบี 5ไมโครกรัม/มล. จากนั้นนำจานเพาะเลี้ยงเซลล์ไปบ่มในตู้อบคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเลือกใช้เฉพาะเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกที่เลี้ยงในครั้งที่ 4-6 (passage 4th-6th) เพื่อป้องกันความแตกต่างที่อาจจะเกิดขึ้นจากการแยกเลี้ยงแต่ละครั้ง

การเตรียมสารสกัดจากรกแพะ

นำรกแพะที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ มาทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหิดแห้งด้วยความเย็น จะได้สารสกัด kku5 และ kku6 จากนั้นนำสารสกัด kku5 และ kku6 มาละลายด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็ม เพื่อให้ได้สารละลายที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม(มก.)/มล. จากนั้นเขย่าให้ละลายจนหมด แล้วทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร เก็บใส่เอพเพนดอร์ฟ หลอดละ 150 ไมโครลิตร นำสารละลายที่ได้เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เมื่อจะทำการทดสอบ ให้นำสารละลายของสารสกัด kku5 และ kku6 ที่ความเข้มข้น 20 มก./มล. นำมาทำการเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่เติมซีรัมจากตัวอ่อนของวัวร้อยละ 0.1 ให้มีความเข้มข้นลดลงทีละ 2 เท่า (two-fold serial dilutions) ในเอพเพนดอร์ฟ

การทดสอบหาช่วงความเข้มข้นของสารสกัดจากรกแพะที่กระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก

ทดสอบหาความเข้มข้นของสารสกัด kku5 และ kku6 ที่กระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก โดยตรวจสอบความมีชีวิตของเซลล์ด้วยเพรสโตบลู โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกจากอาสาสมัครจำนวน 5 คน ที่เลี้ยงในครั้งที่ 4-6 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีซีรัมจากตัวอ่อนของลูกวัว ร้อยละ 0.1 เพาะเลี้ยงในถาดเพาะเลี้ยง 96 หลุม ให้มีความหนาแน่นของเซลล์ 10^4 เซลล์ต่อหลุม และเพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นในกลุ่มทดลองจะได้รับการเติมสารสกัดที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.0019-2 มก./มล. ใส่ในถาดเพาะเลี้ยงปริมาณหลุมละ 100 ไมโครลิตร โดยมีเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกที่ไม่ได้เติมสารละลายของสารสกัดจากรกแพะ และอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกเป็นกลุ่มควบคุม จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบตามเวลา ดูดสารละลายออกจากถาดเพาะเลี้ยง แล้วล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ 3 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลายเพรสโตบลู ที่ทำการเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีซีรัมจากตัวอ่อนของลูกวัวร้อยละ 0.1 ให้มีความเข้มข้นลดลง 10 เท่า หลุมละ 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปอ่านค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์โดยใช้เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ไมโครเพลทรีดเดอร์ ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น (excitation wavelength) 560 นาโนเมตร และความยาวคลื่นคายพลังงาน (emission wavelength) 590 นาโนเมตร ซึ่งสารสกัดทั้งสองชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ จะถูกทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง และคำนวณหาค่าเฉลี่ยร้อยละการอยู่รอดของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก

การทดสอบการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก เมื่อมีสารสกัดจากรกแพะ ณ เวลาต่างๆ

นำช่วงความเข้มข้นจากการทดสอบหาความเข้มข้นของสารสกัด kku5 และ kku6 ที่กระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกได้ดีที่สุด 3 ความเข้มข้น มาทดสอบการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ที่เวลา 1, 3, และ 7 วัน

โดยกลุ่มทดลองจะได้รับการเติมสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ในถาดเพาะเลี้ยงปริมาณหลุมละ 100 ไมโครลิตร โดยมีเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกที่ไม่ได้เติมสารละลายของสารสกัด และอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกเป็นกลุ่มควบคุม จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1, 3, และ 7 วัน เมื่อครบกำหนดเวลา เติมสารละลายเพรสโตบลูที่ทำการเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีซีรีมจากตัวอ่อนของลูกวัวร้อยละ 0.1 ให้มีความเข้มข้นลดลง 10 เท่า หลุมละ 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปอ่านค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ ซึ่งสารสกัดทั้งสองชนิดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จะถูกทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง และคำนวณหาค่าเฉลี่ยร้อยละการอยู่รอดของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ใช้โปรแกรม GraphPad Prism 5 ในการวิเคราะห์ผลเปรียบเทียบร้อยละของความมีชีวิตของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกเมื่อทดสอบด้วยสารสกัดจากรกแพะที่ความเข้มข้นต่างๆ และณ เวลาต่างๆ โดยใช้สถิติการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One way ANOVA) และทดสอบความแตกต่างระหว่างคู่โดยวิธี Duncan's test กำหนดค่าระดับนัยสำคัญ (α) เท่ากับ 0.05

ผลการวิจัย

ช่วงความเข้มข้นของสารสกัดจากรกแพะที่กระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกของมนุษย์

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัด kku5 และ kku6 ในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก พบว่า kku6 ที่ความเข้มข้น 0.0078 มก./มล. มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกได้ดีที่สุด ซึ่งมีค่ามัธยฐานร้อยละของความมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 109.1 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม รองลงมา คือ kku6 ที่ความเข้มข้น 0.031 มก./มล.โดยมีค่ามัธยฐานร้อยละของความมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 107.7

ส่วนสารสกัด kku5 ความเข้มข้น 0.25 มก./มล. กระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกได้มากที่สุด โดยมีค่ามัธยฐานร้อยละความมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 95.31 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม รองลงมา คือ kku5 ที่ความเข้มข้น 0.0625 มก./มล.โดยมีค่ามัธยฐานร้อยละความมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 94.21 (ภาพที่ 1) และเมื่อเปรียบเทียบผลการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกที่ความเข้มข้นที่ดีที่สุดของสารสกัด kku5 และ kku6 พบว่าแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

จากผลการศึกษาดังกล่าวข้างต้น สารสกัด kku6 ความเข้มข้นระหว่าง 0.0019 - 0.031 มก./มล. และสารสกัด kku5 ความเข้มข้นระหว่าง 0.0625 - 1 มก./มล. จึงถูกเลือกเพื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพ ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก ณ เวลาต่างๆ ต่อไป

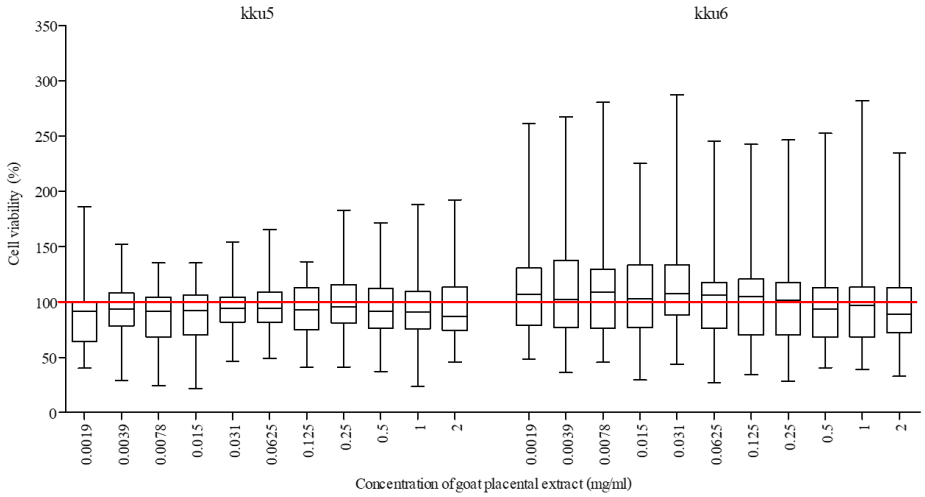
การเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกของมนุษย์ เมื่อมีสารสกัดจากรกแพะ ณ เวลาต่างๆ

เมื่อนำเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมาทดสอบกับสารสกัด kku6 ที่ความเข้มข้น 0.0019, 0.078 และ 0.31 มก./มล. ณ เวลา 1, 3 และ 7 วัน พบว่าที่ระยะเวลา 1 และ 3 วัน ความเข้มข้นของสารสกัด kku6 ที่กระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้ดีที่สุด คือ 0.0019 มก./มล. ซึ่งมีค่ามัธยฐานร้อยละความมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 108.5 และ 114.4 ตามลำดับ (ภาพที่ 2 ก และ ข) และที่เวลา 7 วัน พบว่าความเข้มข้นของสารสกัด kku6 ที่กระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้ดีที่สุดคือความเข้มข้น 0.31 มก./มล. ซึ่งมีค่ามัธยฐานร้อยละความมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 117 (ภาพที่ 2 ค)

เมื่อนำเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมาทดสอบกับสารสกัด kku5 ที่ความเข้มข้น 0.063, 0.25 และ 1 มก./มล. เป็นระยะเวลา 1, 3 และ 7 วัน พบว่าที่ความเข้มข้น 1 มก./มล.ของสารสกัด kku5 มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้มากกว่าทุกความเข้มข้น และทุกช่วงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยมีค่ามัธยฐาน

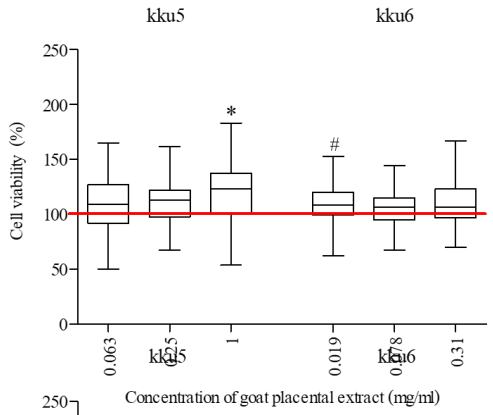
ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 123.3, 124.7 และ 141.2 ตามลำดับ (ภาพที่ 2 ก, ข และ ค) และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ของสารสกัด kku5 ที่ความเข้มข้น 1 มก./มล. ในทุกช่วงเวลา พบว่า ณ เวลา 7 วันจะกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้มากที่สุด โดยมากกว่า ณ เวลา 1 และ 3 วัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.05$) (ภาพที่ 3)

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ของสารสกัด kku5 และ kku6 ณ เวลาต่าง ๆ พบว่า kku5 ที่ความเข้มข้น 1 มก./มล. จะกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้มากกว่า kku6 ในทุกช่วงเวลาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.05$) (ภาพที่ 2 ก, ข และ ค)

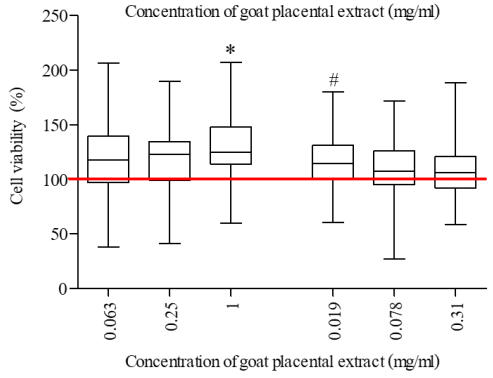


ภาพที่ 1 ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกของมนุษย์จากอาสาสมัครรวมทั้ง 5 คน เมื่อสัมผัสกับสารสกัด kku5 และ kku6 ที่ความเข้มข้น 0.0019-2 มก./มล. เป็นเวลา 1 วัน

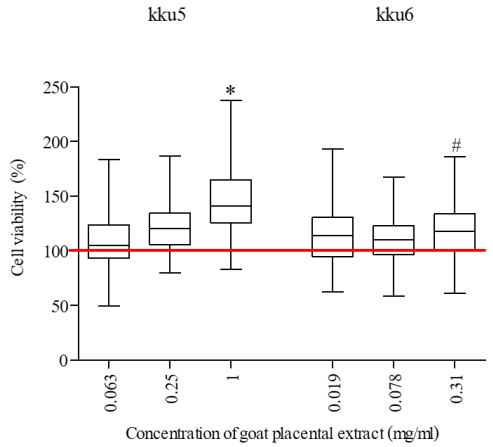
(ก)



(ข)



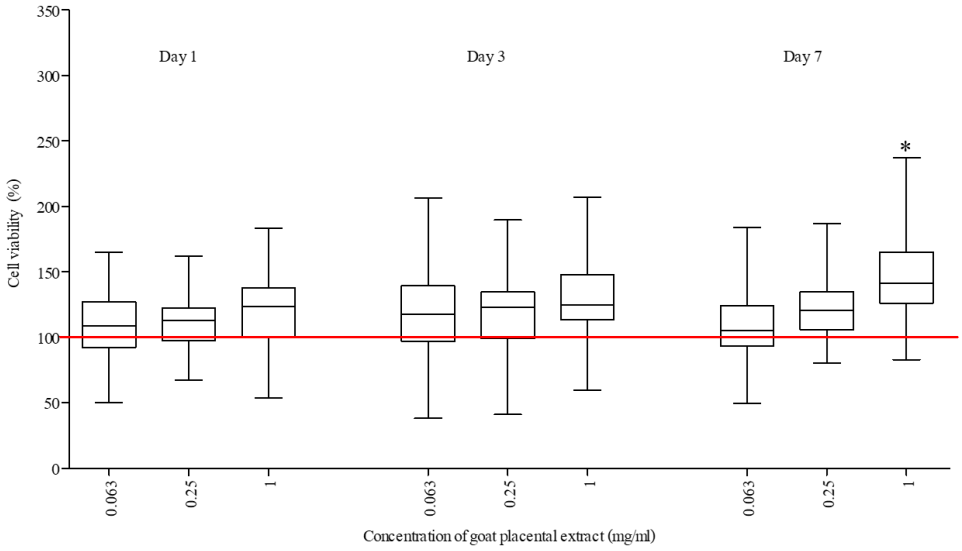
(ค)



ภาพที่ 2 ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกของมนุษย์จากอาสาสมัครรวมทั้ง 5 คน เมื่อสัมผัสกับสารสกัด kku5 และ kku6 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ณ เวลา 1 (ก), 3 (ข) และ 7 วัน (ค)

* $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ที่สัมผัสกับสารสกัด kku5 ความเข้มข้น 0.063 และ 0.25 มก./มล.

# $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ที่สัมผัสกับสารสกัด kku5 ความเข้มข้น 1 มก./มล.



ภาพที่ 3 เปรียบเทียบร้อยละความมีชีวิตของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกของมนุษย์จากอาสาสมัครรวมทั้ง 5 คน เมื่อสัมผัสกับสารสกัด kku5 ณ เวลา 1, 3, และ 7 วัน

* P< 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ที่สัมผัสกับสารสกัด kku5 ความเข้มข้น 1 มก./มล. ณ เวลา 1 และ 3 วัน

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จากการทดสอบหาช่วงความเข้มข้นของสารสกัดจากรกแพะ kku5 และ kku6 ที่มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกได้ดีที่สุด โดยทดสอบ 10 ความเข้มข้นของสารสกัดทั้งสอง พบว่าสารสกัด kku 6 ที่ความเข้มข้น 0.0078 มก./มล. มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกได้ดีที่สุด แต่เมื่อนำช่วงความเข้มข้นที่ดีที่สุดของสารสกัดทั้งสองมาทดสอบต่อ ณ เวลา 1, 3 และ 7 วัน พบว่า ณ เวลา 1 วัน สารสกัด kku5 ที่ความเข้มข้น 1 มก./มล. มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกได้ดีที่สุด ซึ่งเป็นไปได้ว่า เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกที่ใช้ทดสอบมาจาก passage ที่ต่างกัน นอกจากนี้เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกปฐมภูมิของมนุษย์ที่ใช้ศึกษายังมาจากอาสาสมัครจำนวน 5 คน ที่มีความแตกต่างของอายุ และเพศ ซึ่งจากรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่าอายุ และเพศมีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใย (Bartold et al., 1986; Kanda, Watanabe, 2005) อีกทั้งยังพบว่า เซลล์ปฐมภูมิจะมีการเปลี่ยนแปลงเมตาบอลิซึม และหน้าที่จำเพาะของเนื้อเยื่อเมื่อเวลาผ่านไป (Lemons et al., 2010; Coller et al., 2006)

สารสกัด kku5 ที่ความเข้มข้น 1 มก./มล. ยังมีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกได้มากกว่าที่ความเข้มข้น 0.063 และ 0.25 มก./มล. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P< 0.05) ณ เวลา 3 และ 7 วัน โดยเมื่อพิจารณาที่ความเข้มข้น 1 มก./มล. (ภาพที่ 3) จะพบว่าประสิทธิภาพในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น เมื่อสารสัมผัสกับเซลล์นานขึ้น ซึ่ง ณ เวลา 7 วัน สารสกัด kku5 ที่ความเข้มข้น 1 มก./มล. มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกได้มากกว่า ณ เวลา 1 และ 3 วัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P< 0.05) จากการศึกษาของ Creeper, Ivanovski (2012) และ Lima et al. (2015) ที่ได้ศึกษาเกี่ยวกับการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก ณ เวลาต่างๆ ได้อธิบายไว้ว่าการที่เซลล์มีการเพิ่มจำนวนน้อยใน 1

วันแรกนั้น มาจากเซลล์ยังไม่ได้มีการปรับตัวกับสภาวะแวดล้อมใหม่ ทำให้ไม่เห็นผลจากสารสกัดได้อย่างเต็มที่ แต่เมื่อเวลาผ่านไป เซลล์มีการปรับตัว จะสามารถเห็นผลของสารสกัดได้อย่างเต็มที่ ในการศึกษานี้พบว่าที่ 7 วัน มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์มากที่สุด ซึ่งคล้ายกับผลการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้น

ผลจากการศึกษานี้พบว่า สารสกัดจากรกแพะมีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก ซึ่งอาจเป็นผลจากการที่รกประกอบไปด้วยสารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ เช่น เปบไทด์ชีวภาพ กรดนิวคลีอิก กรออะมิโน วิตามิน ฮอร์โมน เอนไซม์ โกรทแฟคเตอร์ และแร่ธาตุต่างๆ (Biswas et al., 2001; Pan et al., 2017) มีการศึกษาสารสกัดจากรกแพะพบว่ามีสารโกท พาเซนตา อิมมูโนเรกูลาทอรี แฟคเตอร์ ซึ่งมีผลกระตุ้นการเพิ่มการแบ่งตัวของเซลล์ โดยเพิ่มจำนวนลิมโฟไซด์ เนทเชอรัล คิลเลอร์ เซลล์ และมาโครฟาจ และยังทำให้เพิ่มประสิทธิภาพในการกลืนกินของมาโครฟาจในหนูที่ถูกกดภูมิคุ้มกัน (Hua et al., 2009) นอกจากนี้จากการศึกษาของชนินเนตร และคณะ (2559) พบว่าสารสกัดจากรกแพะ kku5 มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวน และการเปลี่ยนแปลงของเซลล์สร้างกระดูกของมนุษย์ได้ด้วย เนื่องจากโรคปริทันต์อักเสบ เป็นโรคที่มีการสูญเสียอวัยวะปริทันต์ ได้แก่ เหงือก เอ็นยึดปริทันต์ และกระดูกเบ้าฟัน ดังนั้นสารสกัดจากรกแพะ จึงน่าจะเป็นตัวเลือกในการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ในการกระตุ้นการหายของแผลของอวัยวะปริทันต์ทั้งส่วนที่เป็นกระดูกเบ้าฟัน และเนื้อเยื่อยึดต่อได้

สรุปผลการศึกษาพบว่า สารสกัดจากรกแพะ kku5 ที่ความเข้มข้น 1 มก./มล. มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกได้ดีที่สุด อย่างไรก็ตาม ควรมีการศึกษาผล และกลไกของสารสกัดจากรกแพะต่อกระบวนการพัฒนาของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์เพิ่มเติม รวมทั้งศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบ เพื่อให้ได้ข้อมูลในการพัฒนาสารสกัดจากรกแพะเพื่อเป็นประโยชน์ต่อการรักษาโรคปริทันต์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากบัณฑิตวิทยาลัย และกลุ่มวิจัยไบโอฟิล์ม คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

ชนินเนตร ตรัยภาวัต. ผลของการสกัดจากรกแพะและรกหมูต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์และเซลล์ไลน์ 1.19 ในห้องปฏิบัติการ [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาปริทันตวิทยา]. ขอนแก่น: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2559.

เอกรัตน์ กลิ่นกุหลาบ. ผลของสารสกัดจากรกแพะต่อการเพิ่มจำนวนและการแสดงออกของจีนแรงค์แอล และโอพีจีของเซลล์สร้างกระดูกของมนุษย์ในห้องปฏิบัติการ [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาปริทันตวิทยา]. ขอนแก่น: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2560.

Bartold PM, Boyd RR, Page RC. Proteoglycans synthesized by gingival fibroblasts derived from human donors of different ages. Journal of cellular physiology 1986; 126(1): 37-46.

Biswas T, Auddy B, Bhattacharya N, Bhattacharya S, Mukherjee B. Wound healing activity of human placental extracts in rats. Acta Pharmacologica Sinica 2001; 22(12): 1113-6.

Coller HA, Sang L, Roberts JM. A new description of cellular quiescence. Plos biology 2006; 4(3): 329-49.

Creeper F, Ivanovski S. Effect of autologous and allogenic platelet-rich plasma on human gingival fibroblast function. Oral diseases 2012; 18(5): 494-500.

Hua Z, Fang LQ, Hong W, Yan H, Wang YH, Cui YD. Effects of goat placental immunoregulatory factor on non-specific immunity of mice. Israel Journal of Veterinary Medicine 2009; 64(3): 66-71.

Kanda N, Watanabe S. Regulatory roles of sex hormones in cutaneous biology and immunology. Journal of dermatological science 2005; 38(1): 1-7.

Kong MH, Lee EJ, Lee SY, Cho SJ, Hong YS, Park SB. Effect of human placental extract on menopausal symptoms, fatigue, and risk factors for cardiovascular disease in middle-aged Korean women. Menopause 2008; 15(2): 296-303.

Lemons JM, Feng XJ, Bennett BD, Legesse-Miller A, Johnson EL, Raitman I. Quiescent fibroblasts exhibit high metabolic activity. Plos biology 2010; 8(10): 1-16.

Lima RS, Peruzzo DC, Napimoga MH, Saba-Chujfi E, Santos-Pereira SA, Martinez EF. Evaluation of the biological behavior of Mucograft® in human gingival fibroblasts: an in vitro study. Brazilian dental journal 2015; 26(6): 602-6.

Pan SY, Chan MK, Wong MB, Klokol D, Chernykh V. Placental therapy: An insight to their biological and therapeutic properties. Journal of Medicine and Therapeutics 2017; 4(11): 1-6.

Park S, Phark S, Lee M, Lim J, Sul D. Anti-oxidative and anti-inflammatory activities of placental extracts in benzo [a] pyrene-exposed rats. Placenta 2010; 31(10): 873-9.

Ruksounjik O, Klaynongsruang S, Hahnvajanawong C, Khunkitti W. Bioactivities of Goat Placenta hydrolysates. Isan Journal of Pharmaceutical Sciences 2016; 12(3): 61-71.