ผลของคลอเฮกซิดีนต่อการแสดงออกของยีนและการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-2 ในเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ของมนุษย์

สิริลักษณ์ ตีรณธนากุล*

บทคัดย่อ

เอ็มเอ็มพี-2 เป็นเอนไซม์ตัวหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในการทำลายเนื้อเยื่อในโรคปริทันต์ การกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-2 เป็นขั้นตอนหนึ่งที่สำคัญในการควบคุมการทำงานของเอนไซม์นี้ คลอเอกซิดีนเป็นสารสำคัญที่ใช้ในการควบคุมการเกิดคราบจุลินทรีย์และลดการอักเสบของเนื้อเยื่อในช่องปาก ด้วยคุณสมบัติในการทำลายเชื้ออย่างกว้างขวางทั้งแบคทีเรียและเชื้อรา คุณสมบัติในการคงอยู่ในช่องปากเป็นเวลานานหลังใช้ และยังพบอีกว่ามีความสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มเอ็มเอ็มพี

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาผลของคลอเฮกซิดีนต่อการแสดงออกของยีน และการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ: เซลล์เอ็นยึดปริทันต์ของมนุษย์ถูกเลี้ยงในสภาวะที่มีและไม่มีคลอเฮกซิดีนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม ร้อยละ 1 โดยมีหรือไม่มีคอน เอ เลี้ยงต่อไปอีก 24 ชั่วโมง ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธีเอ็มทีที ศึกษาระดับการแสดงออกของยีนเอ็มเอ็มพี-2 เอ็มเอ็มพี-14 และทิมพ์-2 ด้วยวิธีเรียลไทม์อาร์ทีพีซีอาร์ และศึกษาการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-2 ด้วยวิธีไซโมกราฟี

ผลการทดลอง: คลอเฮกซิดีนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.12 และ 0.012 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยพบว่ามีค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตของเซลล์เป็นร้อยละ 46.31%$\pm$6.8 และ 48.39%$\pm$4.49 ตามลำดับ แต่คลอเฮกซิดีนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.0012 จะไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ และให้ผลในการยับยั้งการกระตุ้นการทำงานของเอ็มเอ็มพี-2 ในเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ของมนุษย์เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วย คอน เอ นอกจากนี้ยังพบว่าคลอเฮกซิดีนไม่มีผลต่อปริมาณโปรเอ็มเอ็มพี-2 ที่สร้างออกมานอกเซลล์ และไม่มีผลต่อระดับการ

สรุปผล: น้ำยาบ้วนปากคลอเฮกซิดีนในความเข้มข้นต่ำ (ร้อยละ 0.0012) ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ของมนุษย์ และสามารถยับยั้งการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-2 ได้

คำสำคัญ: เอ็มเอ็มพี-2 คลอเฮกซิดีน เซลล์เอ็นยึดปริทันต์ของมนุษย์

**อาจารย์ ภาควิชาโอษฐวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สุขุมวิท 23 แขวงคลองเตยเหนือ เขตวัฒนา กรุงเทพมหานคร 10110*

Effect of Chlorhexidine on MMP-2 Expression and Activation in Human Periodontal Ligament Cells

Siriluck Tiranathanagul*

Abstract

Matrix metalloproteinase-2 or MMP-2 is one of key enzymes in periodontal destruction in periodontal diseases. MMP-2 activation process is crucial for controlling the optimal function of this enzyme. Chlorhexidine is the most commonly prescribed antiseptic mouthrinse in the dental field. The advantages of the chlorhexidine include antibacterial and antifungal activities, substantivity and anticollagenolytic activity. However, effect of chlorhexidine on expression and activation of MMP-2 by human periodontal ligament cells (HPDL) is not clear.

Objective: To investigate the effect of chlorhexidine on MMP-2 expression and activation in HPDL cells.

Materials and Methods: HPDL cells were cultured in DMEM with/without various concentration of chlorhexidine for 1 minute then continue growing in DMEM with 1% serum for 24 hours. Cytotoxicity was evaluated using MTT assay. Zymography was used to verify the MMP-2 activation. The expression of MMP-2, MMP-14, TIMP-2 and GAPDH was determined using RT-realtime PCR.

Results: 0.12% and 0.012% chlorhexidine decreased cell viability to 46.31%$\pm$6.8 and 48.39%$\pm$4.49 respectively. Chlorhexidine at 0.0012% was not toxic to HPDL cells and reduced MMP-2 activation when induced by Con A. Chlorhexidine did not have any effect on MMP-2, MMP-14 and TIMP-2 expression.

Conclusion: Chlorhexidine mouthrinse in low concentration (0.0012%) had no cytotoxic effect in HPDL cells. Besides, it was able to inhibit MMP-2 activation in these cells.

Key words: MMP-2, Chlorhexidine, Human periodontal ligament cells

**Lecturer, Department of Stomatology, Faculty of Dentistry, Srinakharinwirot University, Sukhumvit 23, Wattana, Bangkok, Thailand 10110*

บทนำ

โรคปริทันต์ (periodontal disease) เป็นโรคติดเชื้อที่มีการอักเสบเรื้อรัง ทำให้มีการทำลายของอวัยวะปริทันต์ ซึ่งนำไปสู่การสูญเสียฟันไปในที่สุด กลไกการเกิดโรคเกิดจากการตอบสนองของเซลล์ในเนื้อเยื่อปริทันต์ต่อปัจจัยก่อโรคของเชื้อแบคทีเรีย โดยเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรค ได้แก่ พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส *(Porphyromonas gingivalis)* แทนเนอเรลลา ฟอร์ซัยเธีย *(Tannerella forsythia)* และ แอกกรีเกติแบคเตอร์ แอคทิโนมัยซีเต็มโคมิแทนส์ *(Aggregatibacter actinomycetemcomitans)* [1] กลไกสำคัญหนึ่งได้แก่ การสร้างและหลั่งเอนไซม์ในกลุ่ม เมทริกซ์เมทัลโลโปติเนส (matrix metalloproteinases) หรือ เอ็มเอ็มพี (MMPs) โดยเซลล์ในเนื้อเยื่อปริทันต์ ทำให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อบริเวณนั้น

เอ็มเอ็มพี เป็นกลุ่มของเอ็นไซม์ที่มีความสามารถในการย่อยทำลายเมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix) ได้ทุกชนิด รวมทั้งคอลลาเจนชนิดต่าง ๆ เอ็มเอ็มพีถูกสร้างได้จากเซลล์หลายชนิด ได้แก่ เซลล์สร้างเส้นใย (fibroblasts) นิวโทรฟิล (neutrophil) แมคโครฟาจ (macrophage) เคราติโนไซท์ (keratinocyte) และเซลล์บุหลอดเลือด (endothelial cells) เป็นต้น เอ็มเอ็มพีมีบทบาทสำคัญในกระบวนการของร่างกายที่ต้องมีการย่อยสลายเมทริกซ์นอกเซลล์ทั้งในสภาวะปกติ เช่น การพัฒนาของตัวอ่อน การเกิดหลอดเลือดใหม่ การหาของแผล และในสภาวะที่มีพยาธิสภาพ เช่น มะเร็ง ข้ออักเสบรูมาตอยด์ รวมทั้งโรคปริทันต์อักเสบ การควบคุมการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มนี้จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการคงอยู่ของเนื้อเยื่ออย่างสมดุล (tissue homeostasis) การควบคุมทำได้ในหลายระดับตั้งแต่ระดับการแสดงออกของยีน ระดับการกระตุ้นการทำงาน และการยับยั้งการทำงานด้วยตัวยับยั้ง (inhibitors) เอ็มเอ็มพี ที่พบว่ามีบทบาทในการทำลายเนื้อเยื่อปริทันต์ได้แก่ เอ็มเอ็มพี-1, 2, 7, 8, 9, 13 และ 14 [2-8] เอ็มเอ็มพี-2 เป็นเอ็นไซม์ในกลุ่มเอ็มเอ็มพี ที่สามารถย่อยทำลายเมทริกซ์นอกเซลล์หลายชนิด รวมทั้ง คอลลาเจน ชนิดที่ 1 และ 4 และเป็นเอนไซม์ที่ต้องการกระบวนการกระตุ้นการทำงานที่ซับซ้อนต่างจากเอ็มเอ็มพีชนิดอื่น ๆ โดยการกระตุ้นการทำงานจะเกิดขึ้นบนผิวเซลล์ และต้องอาศัยโมเลกุลของ เอ็มเอ็มพี-14 และทิมพ์-2 (TIMP-2) ร่วมด้วย [9] มีรายงานพบการเพิ่มขึ้นของเอ็มเอ็มพี-2 โดยเฉพาะในรูปที่พร้อมทำงานในรอยโรคปริทันต์ของมนุษย์ [7,14] และในหนูทดลองที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคปริทันต์ [15]

คลอเฮกซิดีน (chlorhexidine) เป็นสารฆ่าเชื้อที่มีขอบเขตในการทำลายเชื้อกว้าง สามารถทำลายเชื้อได้ทั้งแบคทีเรียกรัมบวก กรัมลบ เชื้อรา และไวรัสบางชนิด [10] โดยกลไกการออกฤทธิ์นั้นคลอเฮกซิดีนจะไปทำลายผนังเซลล์ของเชื้อ [11-12] คลอเฮกซิดีนถูกนำมาใช้ในทางทันตกรรมเป็นน้ำยาบ้วนปากฆ่าเชื้อ ควบคุมการเกิดคราบจุลินทรีย์ และลดการอักเสบของเนื้อเยื่อในช่องปาก [13] โดยทั่วไปใช้ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.12 นอกจากนี้คลอเฮกซิดีนยังมีความสามารถในการเกาะติดกับพื้นผิวฟัน และเนื้อเยื่อในช่องปาก ทำให้สามารถคงอยู่ในช่องปากเป็นระยะเวลานาน [17-20] มีการศึกษาพบว่า สามารถพบคลอเฮกซิดีนอยู่ในน้ำลายภายหลังจากที่อมสารละลายคลอเฮกซิดีนเป็นเวลา 1 นาที นานถึง 8 ชั่วโมง [29,30]โดยการศึกษาหนึ่ง [30] ใช้คลอเฮกซิดีน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (เทียบเท่ากับร้อยละ 0.1) หลังจากให้ผู้ถูกทดลองอมสารละลายคลอเฮกซิดีน และทำการตรวจสอบปริมาณคลอเฮกซิดีนในน้ำลายในเวลาต่าง ๆ พบว่า 8 ชั่วโมงซึ่งเป็นเวลานานที่สุดที่ทำการศึกษา สามารถตรวจพบคลอเฮกซิดีนในน้ำลาย 1.97±0.38 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (เทียบเท่ากับร้อยละ 0.000197)

คลอเฮกซิดีน นอกจากมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแล้ว ยังพบว่าสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มเอ็มเอ็มพีได้ มีการศึกษาในหลอดทดลอง [16] โดยใช้เอนไซม์เอ็มเอ็มพี-2, -8 และ 9 ที่ถูกสร้างมาจากเซลล์ของมนุษย์ ซึ่งอยู่ในรูปไม่พร้อมทำงาน (inactive form) มากระตุ้นการทำงานด้วยการบ่มกับสารละลาย p-aminophenylmercuric acetate (APMA) แล้วนำไปบ่มในสารละลายที่มีคลอเฮกซิดีน ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และเติมสารตั้งต้นของเอนไซม์แต่ละชนิดเพื่อทดสอบผลของคลอเฮซิดีนต่อการทำงานของ

เอนไซม์ทั้งสาม พบว่าคลอเฮกซิดีนสามารถยับยั้งการทำงานของเอ็มเอ็มพี-2, -8 และ 9 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.004, 0.01 และ 0.03 ตามลำดับ ด้วยความสามารถในการแย่งจับโมเลกุลที่มีประจุบวก (cation-chelating mechanism) การทำงานของเอ็นไซม์เอ็มเอ็มพีต้องอาศัยไอออนที่มีประจุบวก (cation) ได้แก่ ไอออนสังกะสี (Zn^{2+}) และ ไอออนแคลเซียม (Ca^{2+}) ทำให้เมื่อถูกดึงไอออนเหล่านี้ออกไปการทำงานจึงถูกยับยั้ง

ยังไม่มีการศึกษาผลของคลอเฮกซิดีนต่อเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ของมนุษย์ในด้านของการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-2 จึงเป็นที่น่าสนใจว่าในระดับความเข้มข้นที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์นั้นคลอเฮกซิดีนจะมีฤทธิ์ใดต่อเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-2

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสามารถของคลอเฮกซิดีนในระดับความเข้มข้นที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ของมนุษย์ ในด้านการแสดงออกของยีนและการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

การเลี้ยงเซลล์เอ็นยึดปริทันต์

เซลล์เอ็นยึดปริทันต์ ได้มาจากคลังเซลล์ซึ่งเป็นเซลล์ที่เก็บในไนโตรเจนเหลว ที่ภาควิชาโอษฐวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เป็นเซลล์ที่ทำการเตรียมและเพาะเลี้ยงตามวิธีของสิริลักษณ์ ตีรณธนากุลและคณะ [28] โดยมีวิธีการโดยย่อดังนี้ ฟันที่ได้รับการถอนจากผู้ป่วยคลินิกทันตกรรมคณะทันตแพทยศาสตร์ โดยได้รับความยินยอมจากผู้ป่วย ฟันจะต้องอยู่ในสภาพที่ดี ปราศจากการติดเชื้อโดยไม่มีรอยผุ หรือเป็นโรคปริทันต์ และทำการถอนเพื่อวัตถุประสงค์ในการจัดฟันหรือการผ่าฟันคุด นำฟันที่ได้มาล้างให้สะอาดด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer solution: PBS) ใช้ใบมีดปลอดเชื้อ (blade no.15) ขูดเนื้อเยื่อปริทันต์บนผิวรากฟัน บริเวณกลางของรากฟัน (โดยห่างจากส่วนคอฟัน และปลายรากฟันอย่างน้อย 2 มิลลิเมตร) ตัดเนื้อเยื่อที่ได้เป็นชิ้นขนาดประมาณ 1x1 มิลลิเมตร และวางลงบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็ม (DMEM; Dulbecco's modified eagle medium) ที่เติมซีรัมร้อยละ 10 แอลกลูตามีน (L-glutamine) ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ เพนนิซีลิน (Penicillin) 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สเตรปโตมัยซิน (Streptomycin) 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แอมโฟเทอริซิน บี (Amphotericin B) 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในตู้เลี้ยงเซลล์ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์สัปดาห์ละ 2 ครั้ง ประมาณ 7-14 วัน จะมีเซลล์คืบคลานออกมาจากชิ้นเนื้อ เลี้ยงต่อจนเซลล์เพิ่มจำนวนโตเต็มจานเลี้ยงเซลล์จึงทำการถ่ายเซลล์ลงจานเลี้ยงใหม่ เป็นเซลล์รุ่นที่ 1 เลี้ยงต่อไปด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดเดิม เมื่อเซลล์เจริญเต็มจานเลี้ยงเซลล์ ทำการถ่ายเซลล์ลงจานเลี้ยงเซลล์ใหม่ ในอัตราส่วนหนึ่งต่อสาม เซลล์ที่ใช้ในการทดลองเป็นเซลล์รุ่นที่ 3 ถึง 8

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธีเอ็มทีที (MTT assay)

เซลล์เอ็นยึดปริทันต์ถูกนำลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุม (Nunc, Denmark) ที่ความหนาแน่นหลุมละ 15,000 เซลล์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นอาหารเลี้ยงเซลล์ถูกเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็มที่มีปริมาณซีรัมลดลงเป็น ร้อยละ 1 และในสภาวะที่มีและไม่มีคลอเฮกซิดีนด้วยความเข้มข้นต่าง ๆ (C-20, บริษัท โอสถ อินเตอร์ แลบบอราทอรีส์ จำกัด) ได้แก่ ความเข้มข้นร้อยละ 0.12 และลดลงช่วงละ 10 เท่า จนถึงความเข้มข้น 0.000012 เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็มที่มีซีรัม ร้อยละ 1 เลี้ยงเซลล์ต่อไปเป็นเวลา 24 ชั่วโมง อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดไม่มีซีรัม และมีสารเอ็มทีที (MTT) ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เลี้ยงต่อเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นทำการละลายผลึกฟอร์มาซาน (formazan) ด้วยไดเมธิลซัลโฟไซด์ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงของสารละลายในไมโครเพลท (Biochrom Asys UVM340)

การกระตุ้นเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ด้วยคลอเฮกซิดีน และคอนคานาวาลิน เอ

เซลล์เอ็นยึดปริทันต์ถูกนำลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 6 หลุม (Nunc, Denmark) ที่ความหนาแน่นหลุมละ 250,000 เซลล์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นอาหารเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ถูกเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นชนิดดีเอ็มอีเอ็มที่เติมซีรัม ร้อยละ 1 และให้อยู่ในสภาวะที่มีและไม่มีคลอเฮกซิดีนความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์อีกครั้ง ด้วย ดีเอ็มอีเอ็ม ที่เติมซีรัม ร้อยละ 1 มีหรือไม่มี คอนคานาวาลิน เอ (Concanavalin A) (ด้วยความอนุเคราะห์จาก ศ.ทพ.ดร.ประสิทธิ์ ภวสันต์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เลี้ยงเซลล์ต่อไปเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อไปวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-2 ด้วยวิธีไซโมกราฟี ส่วนเซลล์ทำการสกัดอาร์เอ็นเอเพื่อวิเคราะห์ต่อไป

การวิเคราะห์เอนไซม์ เอ็มเอ็มพี-2 ด้วยวิธีไซโมกราฟี (Zymography)

อาหารเลี้ยงเซลล์จากการทดลองจะถูกนำมาวิเคราะห์หาเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-2 ด้วยวิธีไซโมกราฟี (Zymography) ซึ่งมีวิธีการโดยย่อคือ อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกผสมกับแซมเปิลบัฟเฟอร์ (sample buffer) แล้วนำไปแยกด้วยไฟฟ้า (gel electrophoresis) ในเจลที่มีความเข้มข้นของอคริลามายด์ร้อยละ 10 และเจลาติน (gelatin) ความเข้มข้น ร้อยละ 0.1

เมื่อทำการแยกโปรตีนด้วยไฟฟ้าแล้ว เจลจะถูกล้างด้วยสารละลาย TritonX-100 ความเข้มข้น ร้อยละ 2.5 จำนวน 3 รอบ รอบละ 15 นาที ก่อนนำไปบ่มในสารละลาย developing buffer (0.15M NaCl, 10mM $CaCl_2$, 50mM Tris-HCl pH 7.5, Brij35 ร้อยละ 0.1) เป็นเวลา 1 คืน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นย้อมเจลด้วยสารละลาย Brilliant Blue R250 (Sigma) ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ในสารละลายเมทิลแอลกอฮอล์ ร้อยละ 40 และกรดอะซีติด ร้อยละ 10 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างสีส่วนเกินออกด้วยสารละลายเมทิลแอลกอฮอล์ ร้อยละ 5 และกรดอะซีติก ร้อยละ 7.5 บริเวณที่มีเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-2 จะปรากฏเป็นแถบใสบนแผ่นเจลสีน้ำเงิน

สารสกัดอาร์เอ็นเอ และศึกษาระดับการแสดงออกของยีน

สกัดอาร์เอ็นเอ จากเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ด้วย TRI Reagent (Sigma, USA) ตามวิธีที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ และนำไปสังเคราะห์ cDNA (reverse transcription) ด้วย IMPROM-II Reverse Transcription system (Promega, USA) ตามวิธีที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ จากนั้นนำ cDNA ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยวิธี เรียลไทม์พีซีอาร์ ด้วย LightCycler 480 SYBR Green I Master บนเครื่อง LightCycler 480 II (Roche, USA) ตามวิธีที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ

ยีนที่ทำการศึกษาได้แก่ เอ็มเอ็มพี-2 (MMP-2), เอ็มเอ็มพี-14 (MMP-14) และ ทิมพ์-2 (TIMP-2) และ GAPDH

MMP-2	forward	5’ CAAGAAGTATGGCTTCTGCC 3’
	reverse	5’ GCACCCTTGAAGAAGTAGCT 3’
MMP-14	forward	5’ CATCGCTGCCATGCAGAAGT 3’
	reverse	5’ GTCATATCGGGCAGCAC 3’
TIMP-2	forward	5’ GGAAGTGACTCTGGAAACGACATT 3’
	reverse	5’ CTCGATGTCGAGAAACTCCTGCTTG 3’
GAPDH	forward	5’ TGAAGGTCGAGTCAACGGAT 3’
	reverse	5’ TCACACCCATGACGAACATGG 3’

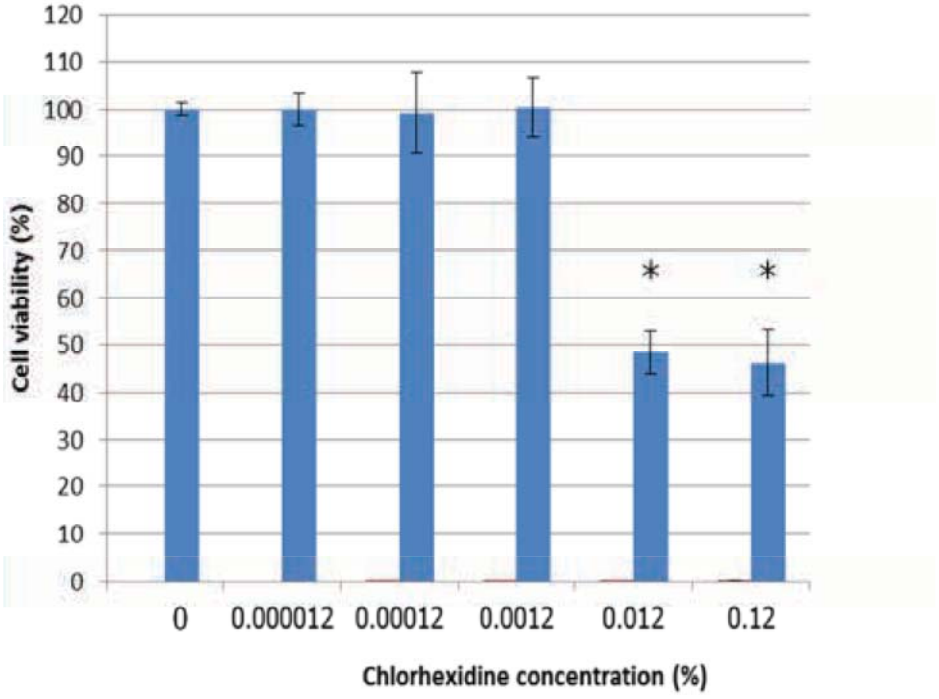
การวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการทดลองแสดงในรูปของ ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยใช้วิธีทดสอบการแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$) โดยโปรแกรมสถิติเอสพีเอสเอส 16.0 (SPSS 16.0)

ผลการทดลอง

การทดสอบความเป็นพิษของคลอเฮกซิดีนต่อเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ของมนุษย์ (รูปที่ 1)

คลอเฮกซิดีนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.12 และ 0.012 มีค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตของเซลล์เป็น ร้อยละ 46.31±6.8 และ 48.39±4.49 ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (ร้อยละ 100) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แสดงถึงความเป็นพิษต่อเซลล์ ในขณะที่กลุ่มคลอเฮกซิดีนที่ความเข้มข้นต่ำลงมา ร้อยละ 0.0012, 0.00012 และ 0.000012 มีค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตของเซลล์เป็นร้อยละ 100.36±6.28, 99.21±8.41 และ 99.93±3.41 ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ($p>0.05$)



รูปที่ 1 กราฟแสดงผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของคลอเฮกซิดีนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธีเอ็มทีที (MTT assay) เซลล์เอ็นยึดปริทันต์ถูกเลี้ยงในสภาวะที่มีและไม่มีคลอเฮกซิดีน ด้วยความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม ร้อยละ 1 เลี้ยงเซลล์ต่อไปเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ข้อมูลแสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุม p<0.05)

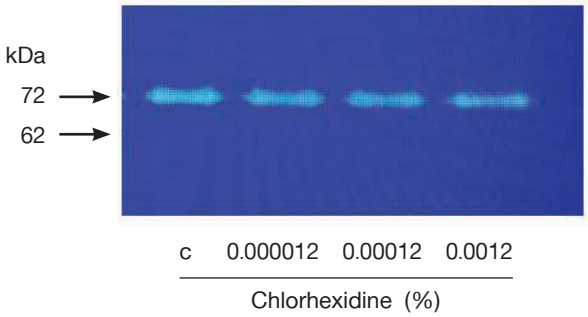
Fig 1. Cell viability of HPDL cells in various concentration of chlorhexidine measured by the MTT assays HPDL cells were treated with various concentration of chlorhexidine for 1 minute then continue growing in DMEM with 1% serum for 24 hours. Treatments significantly different from the untreated control at p<0.05 are presented as *.

ผลของคลอเฮกซิดีนต่อปริมาณเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-2 (รูปที่ 2)

ภาพไซโมกราฟีแสดงแถบใสของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี ซึ่งบ่งบอกถึงปริมาณเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-2 ในรูปอินแอคทีฟ (inactive) หรือโปรเอ็มเอ็มพี-2 (proMMP-2) ที่มีขนาด 72 กิโลดัลตัน บนเจลอคริลามายด์ ร้อยละ 10 ที่มีเจลาตินอยู่ ร้อยละ 0.1 ไม่พบความแตกต่างของปริมาณเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-2 ระหว่างกลุ่มควบคุม (C) และกลุ่มคลอเฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 0.0012, 0.00012 และ 0.000012

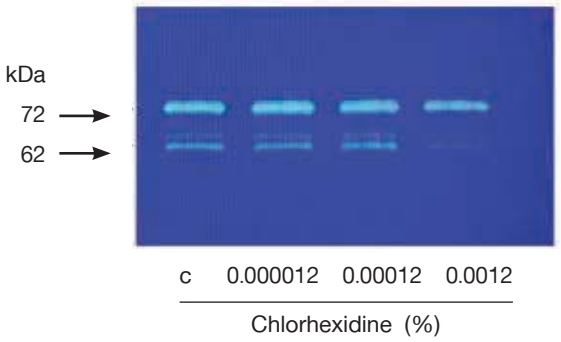
ผลของคลอเฮกซิดีนต่อการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-2 (รูปที่ 3)

แถบใสบนภาพเจลไซโมกราฟีแสดงปริมาณเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-2 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย คอนเอ (Con A) ในรูปอินแอคทีฟ และรูปแอคทีฟ (แถบใสที่มีขนาด 72 และ 62 กิโลดัลตัน ตามลำดับ) พบว่ากลุ่มคลอเฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 0.0012 มีแถบใสของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-2 ในรูปแอคทีฟ ลดลงอย่างชัดเจน



รูปที่ 2 ผลของคลอเฮกซิดีนต่อปริมาณเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-2 (MMP-2) เซลล์เอ็นยึดปริทันต์ถูกเลี้ยงในสภาวะที่มีและไม่มีคลอเฮกซิดีน ด้วยความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม ร้อยละ 1 เลี้ยงเซลล์ต่อไปเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยวิธีไซโมกราฟี

Fig 2. Effect of chlorhexidine on MMP-2 level of HPDL cells. HPDL cells were treated with various concentration of chlorhexidine for 1 minute then continue growing in DMEM with 1% serum for 24 hours. The medium were harvested for gelatin zymography.

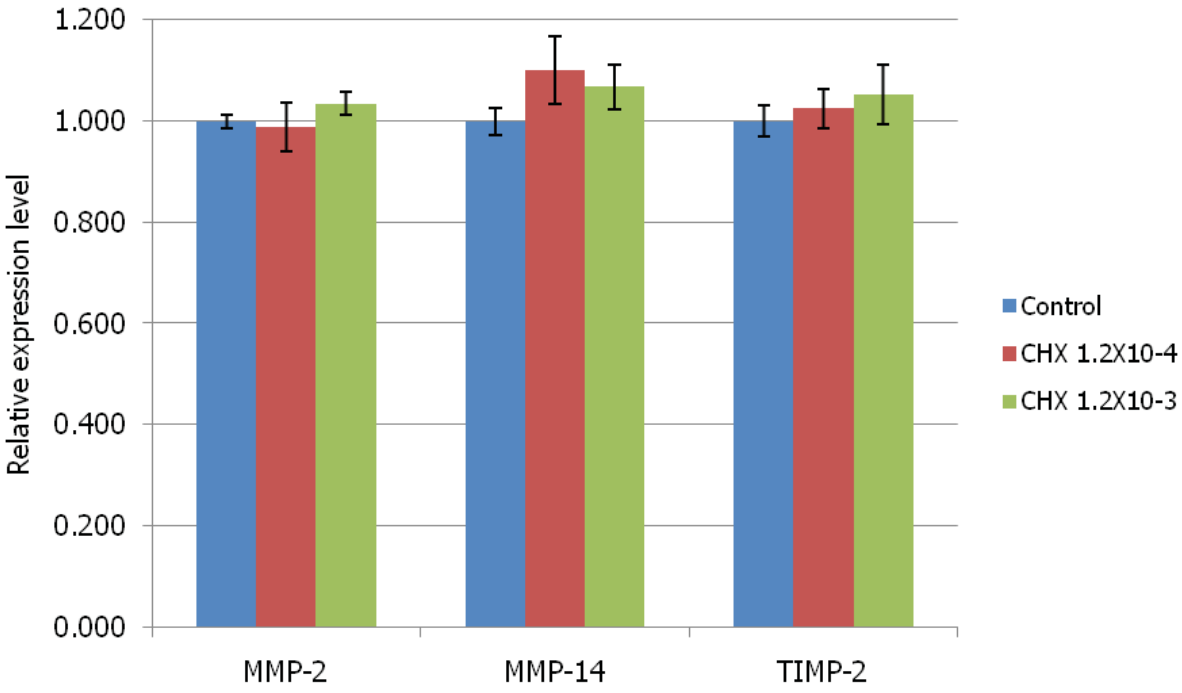


รูปที่ 3 ผลของคลอเฮกซิดีนต่อการยับยั้งการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-2 (MMP-2) เซลล์เอ็นยึดปริทันต์ถูกเลี้ยงในสภาวะที่มีและไม่มีคลอเฮกซิดีน ด้วยความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม ร้อยละ 1 ที่มี คอน เอ ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เลี้ยงเซลล์ต่อไปเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยวิธีไซโมกราฟี

Fig 3. Effect of chlorhexidine on MMP-2 activation of HPDL cells. HPDL cells were treated with various concentration of chlorhexidine for 1 minute then continue growing in DMEM with 1% serum and 10 μg/ml of Con A for 24 hours. The medium were harvested for gelatin zymography.

ผลของคลอเฮกซิดีนต่อการแสดงออกของยีนเอ็มเอ็มพี-2, เอ็มเอ็มพี-14 และทิมพ์-2 (รูปที่ 4)

ผลเรียลไทม์ อาร์ที-พีซีอาร์ แสดงระดับการแสดงออกของยีนเอ็มเอ็มพี-2, เอ็มเอ็มพี-14 และทิมพ์-2 ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ระหว่างเซลล์ในกลุ่มควบคุม และเซลล์ในกลุ่มที่สัมผัสคลอเฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 0.00012 และ 0.0012



รูปที่ 4 ผลของคลอเฮกซิดีนต่อการแสดงออกของเอ็มเอ็มพี-2, เอ็มเอ็มพี-14 และทิมพ์-2 (MMP-2, MMP-14, TIMP-2) เซลล์เอ็นยึดปริทันต์ถูกเลี้ยงในสภาวะที่มีและไม่มีคลอเฮกซิดีน (CHX) ด้วยความเข้มข้น (ร้อยละ) ต่าง ๆ เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม ร้อยละ 1 เลี้ยงเซลล์ต่อไปเป็นเวลา 24 ชั่วโมงสกัดอาร์เอ็นเอมาวิเคราะห์ด้วยวิธีอาร์ทีเรียลไทม์พีซีอาร์ (กลุ่มควบคุมไม่ได้สัมผัสคลอเฮกซิดีน)

Fig 4. Effect of chlorhexidine on MMP-2, MMP-14 and TIMP-2 expression of HPDL cells. HPDL cells were treated with various concentration of chlorhexidine for 1 minute then continue growing in DMEM with 1% serum for 24 hours. The mRNA were extracted for real-time RT-PCR.

บทวิจารณ์

เอ็นยึดปริทันต์เป็นเนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่ยึดฟันกับกระดูกขากรรไกร เซลล์เอ็นยึดปริทันต์เป็นเซลล์สร้างเส้นใย ที่เป็นส่วนประกอบในเนื้อเยื่อปริทันต์ มีหน้าที่รักษาสมดุลการทำงานของเอ็นยึดปริทันต์ มีความสามารถในการเปลี่ยนไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งของอวัยวะปริทันต์ ได้แก่ เซลล์สร้างเคลือบรากฟัน (cementoblast) และเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast) [31] การศึกษานี้ใช้เซลล์เอ็นยึดปริทันต์ เนื่องจากเป็นเซลล์ที่มีบทบาทโดยตรงทั้งในสภาวะที่เกิดการทำลาย และเกิดการซ่อมแซมเนื้อเยื่อในโรคปริทันต์ เมื่อเกิดการทำลายของอวัยวะปริทันต์ ทำให้เกิดร่องลึกปริทันต์ซึ่งปกคลุมด้วยเซลล์บุผิวเพียงไม่กี่ชั้น และฉีกขาดได้ง่าย ทั้งจากการให้การรักษาโรคปริทันต์โดยทันตแพทย์ หรือการบาดเจ็บจากการแปรงฟัน หรือการบดเคี้ยว จึงเป็นช่องทางหนึ่งที่เซลล์เอ็นยึดปริทันต์จะสัมผัสกับสารภายนอก รวมทั้งน้ำยาบ้วนปากหรือน้ำยาที่ทันตแพทย์ใช้ฉีดล้างในร่องเหงือกได้

การศึกษานี้ใช้คลอเฮกซิดีนที่อยู่ในรูปของน้ำยาบ้วนปากความเข้มข้นร้อยละ 0.12 ที่ถูกใช้อยู่อย่างแพร่หลายในทางทันตกรรม โดยเป็นน้ำยาบ้วนปากที่ทันตแพทย์จ่ายให้คนไข้โรคปริทันต์นำกลับไปใช้ที่บ้าน และเป็นคลอเฮกซิดีนที่ทันตแพทย์ใช้ในการฉีดล้างร่องลึกปริทันต์ระหว่างให้การรักษาโรคปริทันต์ คลอเฮกซิดีนในระดับความเข้มข้นที่สูงที่ใช้ในทางทันตกรรมนั้น มุ่งหวังผลในการฆ่าเชื้อ และลดการเกิดคราบจุลินทรีย์ [13] แต่ในความเข้มข้นนั้นพบว่าเป็นพิษต่อเซลล์หลายชนิด [21-24] ความเป็นพิษต่อเซลล์ของคลอเฮกซิดีนนั้นขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่สัมผัสและส่วนประกอบของสารที่ใช้ในการทำละลาย [25] เช่นเดียวกับการศึกษานี้ พบว่าคลอเฮกซิดีนมีความเป็นพิษต่อเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.12 และ 0.012

คลอเฮกซิดีนยังมีคุณสมบัติที่ดี สามารถมีฤทธิ์คงอยู่ในช่องปากได้เป็นเวลานานหลังจากใช้อมบ้วนปาก เนื่องจากคุณสมบัติของสารที่เป็นโมเลกุลที่มีประจุบวก สามารถเกาะติดกับ มิวซิน (mucin) ซึ่งเป็นโปรตีนในน้ำลายที่ฉาบอยู่บนเนื้อเยื่อช่องปากและฟัน [18] และยังถูกดูดซับบนผิวฟัน เป็นผลลดการก่อตัวของแบคทีเรียในช่องปาก ในการศึกษานี้ให้เซลล์สัมผัสคลอเฮกซิดีนเป็นเวลา 1 นาที เทียบได้กับการใช้คลอเฮกซิดีนเป็นน้ำยาบ้วนปากในชีวิตประจำวัน รวมถึงการใช้เป็นน้ำยาฉีดล้างในร่องลึกปริทันต์ในระหว่างการรักษาโรคปริทันต์ มีการศึกษาพบว่าคลอเฮกซิดีนที่ใช้อมบ้วนปาก สามารถคงอยู่ในช่องปากได้นานถึง 8 ชั่วโมง [30] โดยความเข้มข้นจะลดลงตามเวลา พบว่า 1 ชั่วโมงภายหลังการอมบ้วนปากด้วยสารละลายคลอเฮกซิดีนความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (เทียบเท่ากับร้อยละ 0.1) สามารถตรวจพบคลอเฮกซิดีนในน้ำลายที่ความเข้มข้น 12.42±1.01ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (เทียบเท่ากับร้อยละ 0.001242) ซึ่งใกล้เคียงกับความเข้มข้นของคลอเฮกซิดีนที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้

เอ็มเอ็มพี-2 เป็นเอนไซม์ที่ถูกสร้างได้จากเซลล์หลายชนิด เช่น เซลล์สร้างเส้นใย เซลล์บุหลอดเลือด แมคโครฟาจ เป็นต้น เอ็มเอ็มพี-2 จะถูกสร้างและหลั่งออกมานอกเซลล์ในรูปที่ยังไม่พร้อมทำงาน หรือเรียกว่า โปรเอ็มเอ็มพี-2 ในส่วนของการกระตุ้นการทำงาน เอ็มเอ็มพี-2 เป็นเอนไซม์ที่ต้องการกระบวนการกระตุ้นการทำงานที่ซับซ้อนต่างจากเอ็มเอ็มพีอื่น ๆ โดยต้องอาศัยโมเลกุลของ เอ็มเอ็มพี-14 หรือเอ็มพี-1เอ็มเอ็มพี และทิมพ์-2 ร่วมด้วย [9] โดยเอ็มเอ็มพี-14 ซึ่งเป็นเอนไซม์บนผิวเซลล์จะจับโมเลกุลทิมพ์-2 ไว้และทำหน้าที่ร่วมกันในการจับโมเลกุลของโปรเอ็มเอ็มพี-2 จากนั้นเอ็มเอ็มพี-14 ที่อยู่ข้างเคียงจะทำหน้าที่ตัดส่วน โปรโดเมน ของโปรเอ็มเอ็มพี-2 ได้เป็นแอคทีฟเอ็มเอ็มพี-2 [9] การกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-2 จึงขึ้นอยู่กับการมีอยู่อย่างเพียงพอ และในสัดส่วนที่เหมาะสม ของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-14 และทิมพ์-2 การยับยั้งการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-2 จึงทำได้โดยการยับยั้งการทำงานของเอ็มเอ็มพี-14 หรือลดจำนวนของเอ็มเอ็มพี-14 และ/หรือเพิ่มจำนวนทิมพ์-2

ในการศึกษานี้ได้ใช้ คอนคานาวาลิน เอ หรือ คอน เอ (Concanavalin A or Con A) ในการจำลองสภาวะที่มีการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ เอ็มเอ็มพี-2 โดยเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่มีคอน เอ ภายหลังจากเซลล์สัมผัสคลอเฮกซิดีนเป็นเวลา 1 นาที เพื่อเลี่ยงผลทางเคมีที่อาจจะเกิดขึ้นของคลอเฮกซิดีนและคอน เอ มีรายงานว่า คอน เอให้ผล

ในการเพิ่มปริมาณเอ็มเอ็มพี-14 ในเซลล์หลายชนิด [25,26] การที่คอน เอ สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดแอคทีฟเอ็มเอ็มพี-2 เพิ่มมากขึ้นจึงเกิดได้จากการเพิ่มจำนวนของ เอ็มเอ็มพี-14 [26,27] ในการศึกษานี้พบว่าคลอเฮกซิดีนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.0012 ซึ่งเป็นระดับที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์สามารถยับยั้งการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-2 ในเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ของมนุษย์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย คอน เอ ได้

ในการศึกษานี้ก็พบว่าคลอเฮกซิดีน ไม่มีผลต่อปริมาณของเอ็มเอ็มพี-2 ที่ถูกสร้างออกมานอกเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ ซึ่งสอดคล้องกับผลการแสดงออกของยีนที่พบว่าการแสดงออกของยีนเอ็มเอ็มพี-2 ไม่เปลี่ยนแปลง นอกจากนี้การแสดงออกของยีนเอ็มเอ็มพี-14 และทิมพ์-2 ก็ไม่พบการเปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกัน ดังนั้นการที่คลอเฮกซิดีนสามารถยับยั้งการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-2 จึงน่าจะเกิดจากกลไกที่คลอเฮกซิดีนสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มเอ็มเอ็มพี ด้วยคุณสมบัติคีเลชั่น ซึ่งในกระบวนการกระตุ้นเอ็มเอ็มพี-2 นั้นต้องอาศัยการทำงานของ เอนไซม์เอ็มเอ็มพี-14 การที่เอนไซม์เอ็มเอ็มพี-14 ไม่สามารถทำงานได้ จึงไม่เกิดการกระตุ้นการทำงานของเอ็มเอ็มพี-2 ความสามารถของคลอเฮกซิดีนในการยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์เอ็มเอ็มพีแต่ละชนิดนั้นไม่เท่ากัน [16] อาจเนื่องจากโครงสร้างสามมิติของเอ็มเอ็มพี แต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน ปริมาณคลอเฮกซิดีนที่ใช้ในการยับยั้งจึงไม่เท่ากัน ตามรายงานการศึกษาในหลอดทดลองที่พบว่าคลอเฮกซิดีนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.004, 0.01 และ 0.03 สามารถยับยั้งการทำงานของเอ็มเอ็มพี-2, -8 และ 9 ตามลำดับ ด้วยขบวนการคีเลชั่น

ผลของคลอเฮกซิดีนที่สามารถยับยั้งการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-2 ในการศึกษานี้ส่วนหนึ่งน่าจะเกิดจากโมเลกุลของคลอเฮกซิดีนที่เกาะอยู่ในหลุมของจานเลี้ยงเซลล์ ที่ยังคงมีฤทธิ์อยู่หลังจากนำคลอเฮกซิดีนที่สัมผัสเซลล์เป็นเวลา 1 นาทีออกไปแล้ว ซึ่งปริมาณคลอเฮกซิดีนที่คงอยู่อาจแตกต่างจากสภาวะจริงในช่องปาก จึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาต่อไปว่า สภาวะในช่องปากจริงนั้นคลอเฮกซิดีนจะมีความสามารถในการยับยั้งการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-2 ได้ดีเพียงใด

บทสรุป

น้ำยาบ้วนปากคลอเฮกซิดีนเป็นน้ำยาบ้วนปากมาตรฐาน (Gold standard) สำหรับการยั้บยั้งการเกิดคราบจุลินทรีย์และลดการอักเสบของเหงือกในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ ในความเข้มข้นที่สูงคลอเฮกซิดีนให้ผลดีในการฆ่าเชื้อราและแบคทีเรีย แต่พบว่าเป็นพิษต่อเซลล์ หลังอมบ้วนปากพบว่าคลอเฮกซิดีนสามารถมีฤทธิ์คงอยู่ในช่องปากได้เป็นเวลานาน ด้วยความเข้มข้นที่ค่อย ๆ ลดลง ในความเข้มข้นที่ต่ำเช่นในการศึกษานี้ คลอเฮกซิดีนจะไม่เป็นพิษต่อเซลล์ และยังมีผลในการยับยั้งการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เอ็มเอ็มพี-2 อีกด้วย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ ได้รับเงินทุนสนับสนุนการวิจัยจากเงินรายได้ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปี 2557 สัญญาเลขที่ 471/2557

เอกสารอ้างอิง

1. Consensus report. Periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors. Ann Periodontol 1996; 1(1): 926-932.

2. Ingman T, Sorsa T, Lindy O, Koski H, Konttinen YT. Multiple forms of gelatinases/type IV collagenases in saliva and gingival crevicular fluid of periodontitis patients. J Clin Periodontol 1994; 21(1): 26-31.

3. Aiba T, Akeno N, Kawane T, Okamoto H, Horiuchi N. Matrix metalloproteinases-1 and -8 and TIMP-1 mRNA levels in normal and diseased human gingivae. Eur J Oral Sci 1996; 104(5-6): 562-569.

4. Kubota T, Nomura T, Takahashi T, Hara K. Expression of mRNA for matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in periodontitis affected human gingival tissue. Arch Oral Biol 1996; 41(3): 253-262.

5. Tervahartiala T, Pirila E, Ceponis A, Maisi P, Salo T, Tuter G, et al. The in vivo expression of the collagenolytic matrix metalloproteinases (MMP-2, -8, -13 and 14) and matrilysin (MMP-7) in adult and localized juvenile periodontitis. J Dent Res 2000; 79(12): 1969-1977.

6. Dahan M, Nawrocki B, Elkaim R, Soell M, Bolcato-Bellemin AL, Birembaut P, et al. Expression of matrix metalloproteinases in health and diseased human gingival. J Clin Periodontol 2001; 28(2): 128-136.

7. Ejeil AL, Igondjo-Tchen S, Ghomrasseni S, Pellat B, Godeau G, Gogly B. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in healthy and diseased human gingiva. J Periodontol 2003; 74(2): 188-195.

8. Smith PC, Munoz VC, Collados L, Oyarzun AD. In situ detection of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in gingival epithelium in human periodontal disease. J Periodontal Res 2004; 39(2): 87-92.

9. Strongin AY, Collier I, Bannidov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. J Biol Chem 1995; 270(10): 5331-5338.

10. Lim KS, Kam PC. Chlorhexidine: Pharmacology and clinical applications. Anaesth Intensive Care 2008; 36(4): 502–512.

11. Kuyyakanond T, Quesnel LB. The mechanism of action of chlorhexidine. FEMS Microbiol Lett 1992; 100(1–3): 211–215.

12. Barrett-Bee K, Newboult L, Edwards S. The membrane destabilizing action of the antibacterial agent chlorhexidine. FEMS Microbiology Letters 1994; 119(1–2): 249–253.

13. Löe H, Schiott CR. The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. J Periodontal Res 1970; 5(2): 79-83.

14. Korostoff JM, Wang JF, Sarment DP, Stewart JC, Feldman RS, Billings PC. Analysis of in situ protease activity in chronic adult periodontitis patients: expression of activated MMP-2 and a 40kDa serine protease. J Periodontol 2000; 71(3): 353-360.

15. Achong R, Nishimura I, Ramachandran H, Howell TH, Fiorellini JP , Karimbux NY. Membrane type (MT) 1 – matrix metalloproteinase (MMP) and MMP-2 expression in ligature-induced periodontitis in the rat. J Periodontol 2003; 74(4): 494-500.

16. Gendron R, Grenier D, Sorsa T, Mayrand D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. Clin Diagn Lab Immunol 1999; 6(3): 437-439.

17. Bonesvoll P. Oral pharmacology of chlorhexidine. J Clin Periodontol 1977; 4(5): 49-65.

18. Rölla G, Löe H, Schiott CR. The affinity of chlorhexidine for hydroxyapatite and salivary mucins. J Periodontal Res 1970; 5(2): 90-95.

19. Chen Y, Wong RW, Seneviratne CJ, Hagg U, McGrath C, Samaranayake LP. Comparison of the antimicrobial activity of Listerine and Corsodyl on orthodontic brackets in vitro. Am J Orthod Dentofacial Orthop 2011; 140(4): 537-542.

20. Greenstein G, Berman C, Jaffin R. Chlorhexidine. An adjunct to periodontal therapy. J Periodontol 1986; 57(6): 370-377.

21. Sanchez IR, Nusbaum KE, Swaim SF, Hale AS, Henderson RA, McGuire JA. Chlorhexidine diacetate and povidone- iodine cytotoxicity to canine embryonic fibroblasts and Staphylococcus aureus. Vet surg 1988; 17(4); 182-185.

22. Tatnall FM, Leigh IM, Gibson JR. Comparative study of antiseptic toxicity on basal keratinocytes, transformed human keratinocytes and fibroblasts. Skin Pharmacol 1990; 3(3): 157-163.

23. Pucher JJ, Daniel JC. The effect of chlorhexidine digluconate on human fibroblasts in vitro. J Periodontol 1992; 63(6): 526-532.

24. Mirhadi H, Azar MR, Abbaszadegan A, Geramizadeh B, Torabi S, Rahsaz M . Cytotoxicity of chlorhexidine –hydrogen peroxide combination in different concentrations on cultured human periodontal ligament fibroblasts. Dent Res J(Isfahan) 2014; 11(6): 645-648.

25. Babich H, Wuzburger BJ, Rubin YL, Sinensky MC, Blau L. An in vitro study on the cytotoxicity of chlorhexidine digluconate to human gingival cells. Cell Biol Toxicol 1995; 11(2): 79-88.

26. Yu M, Sato H, Seiki M, Thompson EW. Complex regulation of membrane-type matrix metalloproteinase expression and matrix metalloproteinase-2 activation by concanavalin A in MDA-MB-231 human breast cancer cells. Cancer Res 1995; 55(15): 3272-3277.

27. Theret N, Lehti K, Musso O, Clement B. MMP-2 activation by collagen I and concanavalin A in cultured human hepatic stellate cells. Hepatology 1999; 30(2): 462-468.

28. Tiranathanagul S, Pattamapun, Yongchaitrakul T, Pavasant P. Upregulation of MT-MMP in PDL cells by bacterial supernatant. J Dent Assoc Thai 2001; 51(6): 399-409.

29. Musteata FM, Pawliszyn J. Assay of stability, free and total concentration of chlorhexidine in saliva by solid phase microextraction. J Pharm Biomed Anal 2005 Apr 29; 37(5): 1015-1024.

30. Tsuchiya H1, Miyazaki T, Ohmoto S. High-performance liquid chromatographic analysis of chlorhexidine in saliva after mouthrinsing. Caries Res 1999; 33(2): 156-163.

31. Pavasant P, Yongchaitrakul T. Biology of periodontal ligament cells. Bangkok: MisterKopy (Thailand) Co., Ltd; 2008. p. 83-88.

ติดต่อบทความ:
อ.ทพญ.ดร. สิริลักษณ์ ตีรณธนากุล
ภาควิชาโอษฐวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
สุขุมวิท 23 แขวงคลองเตยเหนือ
เขตวัฒนา กทม 10110
โทรศัพท์ 02-649-5000 ต่อ 15130
จดหมายอิเล็กทรอนิกส์ siriluk@swu.ac.th

Corresponding author:
Dr. Siriluck Tiranathanagul
Department of Stomatology, Faculty of Dentistry, Srinakharinwirot University,
Sukhumvit 23, Wattana, Bangkok, Thailand 10110
Tel: 02-649-5000 ext. 15130
E-mail: siriluk@swu.ac.th