บทฟื้นฟูวิชาการ • Review Article

ศักยภาพของเอนไซม์ไมอีโลเพอร์ออกซิเดสเพื่อพัฒนาเป็นชุดตรวจกรองโรคปริทันต์

สุภาพร กลางประพันธ์[1], พลธรรม ไชยฤทธิ์[2,6], ดุษฎี หอมดี[3,6], เตือนจิต คำพิทักษ์[1], จุรีรัตน์ ดาดวง[4,7], ประณิธิ หงสประภาส[5], พัชรี บุญศิริ[1*]
[1]ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์, [2]ภาควิชาวินิจฉัยโรคช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์, [3]ภาควิชาปริทันตวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์,
[4]สาขาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์, [5]ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
[6]กลุ่มวิจัยโรคอักเสบเรื้อรังของช่องปากและโรคทางระบบที่เกี่ยวข้องกับสุขภาพช่องปาก
[7]ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์

Myeloperoxidases : A Potential Enzyme for Development of Diagnostic Kit for Screening of Periodontal Diseases

Supaporn Klangprapan[1], Ponlatham Chaiyarit[2,6], Doosadee Hormdee[3,6], Tueanjit Khampitak[1], Jureerut Daduang[4,7], Pranithi Hongsprabhas[5], Patcharee Boonsiri[1*]
[1]Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, [2]Department of Oral Diagnosis, Faculty of Dentistry, [3]Department of Periodontology, Faculty of Dentistry, [4]Department of Clinical Chemistry, Faculty of Associated Medical Sciences, [5]Department of Medicine, Faculty of Medicine, Khon Kaen University
[6]Research group of chronic inflammatory oral disease and systemic disease associated with oral health.
[7]Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University

โรคปริทันต์เป็นอาการอักเสบของเหงือกและเนื้อเยื่อปริทันต์ จากการสำรวจทางระบาดวิทยาสภาวะช่องปากระดับประเทศครั้งที่ 6 ในประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2549-2550 พบว่าโรคปริทันต์สามารถเกิดขึ้นได้ในทุกวัย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มผู้สูงอายุ สาเหตุหลักของโรคปริทันต์คือการติดเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งกระตุ้นให้ร่างการมีการตอบสนองและเกิดการอักเสบ การวินิจฉัยโรคปริทันต์ทำได้หลายวิธี เช่น การใช้เครื่องมือตรวจปริทันต์ การตรวจหาเชื้อก่อโรค การตรวจโดยอาศัยความจำเพาะระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจน การตรวจทางภูมิคุ้มกัน และการตรวจวัดเอนไซม์ในน้ำลายหรือน้ำเหลืองเหงือกซึ่งเป็นวิธีที่สะดวก ตัวอย่างของเอนไซม์ที่นิยมตรวจวัดคือ เอนไซม์ไมอีโลเพอร์ออกซิเดส (MPO) พบในแกรนูลซึ่งอยู่ภายในเม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิล ในระหว่างที่มีการอักเสบ MPO จะเคลื่อนที่ออกมาเพื่อเร่งปฏิกิริยาฮาโลจิเนชัน ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไฮโพคลอรัส ซึ่งมีฤทธิ์ทำลายแบคทีเรีย ปฏิกิริยาดังกล่าวหากใช้ซับสเตรตที่เหมาะสมกับ MPO จะได้สารที่มีสีมองเห็นด้วยตาและตรวจสอบได้โดย

Periodontal disease are an inflammatory diseases of periodontal tissue. The 6th epidemiological survey of this disease in Thailand during the year 2006-2007 reported that most of the elderly have periodontitis. The cause of periodontal disease is bacteria, which induces infections by plaque formation and cause inflammatory. Periodontal disease can be detected by many methods such as periodontal probing depth, bacterial culture, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and immunoassay of saliva and gingival crevicular fluid (CGF) specimens. The biological markers in CGF including myeloperoxidase (MPO) which is an enzyme found in azurophilic granule of neutrophil. When host response to injuries, neutrophil release MPO to catalyze halogenation reaction. Hypochlorous acid, the end product of this reaction, is toxic to bacteria. The color product obtained from MPO catalyzed selected substrate can be easily detect by eye or colorimetry. Thus MPO may be a potential enzyme for development of diagnostic kit for screening periodontal disease.

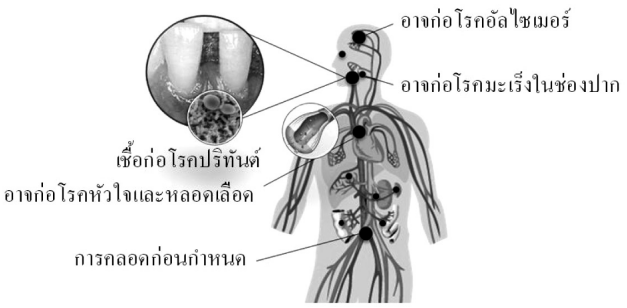
**Corresponding Author: Patcharee Boonsiri, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand Phone and Fax +66-43-348386 E-mail patcha_b@kku.ac.th*

การวัดสีที่เกิดขึ้น ดังนั้นปฏิกิริยาการเปลี่ยนซับสเตรตให้เกิดสีโดย MPO นี้ จึงมีศักยภาพที่จะพัฒนาเป็นชุดตรวจกรองโรคปริทันต์ได้

ศรีนครินทร์เวชสาร 2556; 28(3): 399-409 • Srinagarind Med J 2013: 28(3): 399-409

บทนำ

การมีสุขภาพแข็งแรงปราศจากโรคภัยเป็นความปรารถนาของมนุษย์ทุกคน เพราะปัญหาสุขภาพนับว่าเป็นภัยคุกคามทั้งทางด้านร่างกายและจิตใจ สุขภาพช่องปากจัดเป็นส่วนหนึ่งของสุขภาพกายและจิตใจ โรคที่อยู่ภายในช่องปากมีผลกระทบโดยตรงต่อผู้ป่วย เช่น ทำให้เกิดอุปสรรคต่อการเคี้ยวหรือการกลืนอาหารและการพูด ปัญหาช่องปากที่พบบ่อยคือโรคปริทันต์ โรคนี้มีการอักเสบของเหงือกและอวัยวะปริทันต์ สามารถพบได้ทั้งวัยเด็ก วัยรุ่น ผู้ใหญ่ และผู้สูงอายุ อย่างไรก็ตาม โรคปริทันต์ไม่ได้มีผลเฉพาะที่เหงือกหรืออวัยวะปริทันต์เท่านั้น แต่ยังเกี่ยวข้องกับโรคทางระบบ (systemic diseases) อื่น ๆ ด้วย เช่น โรคเบาหวานชนิดที่ 2[1] โรคหัวใจและหลอดเลือด[2] โรคมะเร็งในช่องปาก[3] โรคอัลไซเมอร์[4] รวมถึงการคลอดก่อนกำหนด[5] โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อก่อโรคปริทันต์ชนิด *Porphyromonas gingivalis* สามารถแพร่ผ่านทางกระแสเลือดและน้ำเหลือง ไปยังส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย เช่น ปอด หัวใจ ตับ เยื่อหุ้มสมอง ตา จมูก เป็นต้น และก่อให้เกิดอาการติดเชื้อของอวัยวะเหล่านั้น โดยแบคทีเรียดังกล่าวมีการสร้างสารพิษชนิด lipopolysaccharides (LPS) ซึ่งไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายให้เกิดการตอบสนอง[6] ถ้าหากร่างกายไม่สามารถรักษาสมดุลระหว่างระบบภูมิคุ้มกันกับเชื้อโรคที่รุกราน โรคทางระบบก็จะก่อตัวขึ้น (รูปที่ 1)

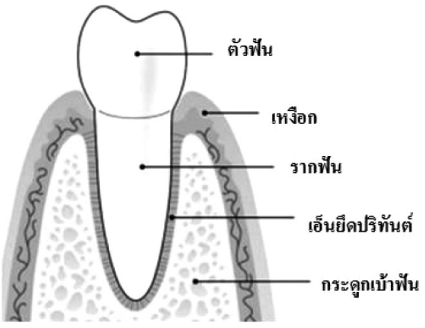


รูปที่ 1 โรคปริทันต์เกี่ยวข้องกับโรคทางระบบโดยเชื้อก่อโรคปริทันต์
(ดัดแปลงจาก http://biology.about.com/od/anatomy/ss/vein.htm สืบค้นวันที่ 27 เมษายน 2556)

นอกจากนี้โรคปริทันต์ยังส่งผลทางอ้อมต่อจิตใจและการเข้าสังคม เช่น การเกิดความกังวล ความรู้สึกไม่พอใจ ไม่มั่นใจในขณะพูด เนื่องจากการมีกลิ่นปาก รวมถึงความรู้สึกไม่สบายในช่องปากที่ต้องใช้ยาระงับความเจ็บปวด สุขภาพช่องปากและสุขภาพกายใจจึงมีความสัมพันธ์กัน เพราะถ้าช่องปากมีสุขภาพดี ก็จะไม่มีความเสี่ยงต่อโรคทางระบบ อีกทั้งมีความมั่นใจในการเข้าสังคมด้วย

โรคปริทันต์

โรคปริทันต์ (periodontal disease) เป็นโรคในช่องปากที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบของเหงือกและเนื้อเยื่อปริทันต์ (periodontal tissue) เนื้อเยื่อปริทันต์หมายถึงเนื้อเยื่อที่อยู่รอบ ๆ ฟัน ได้แก่ เหงือก (gingival) เอ็นยึดรากฟัน (periodontal ligament) เคลือบรากฟัน (cementum) และกระดูกเบ้าฟัน (alveolar bone)[7,8] (รูปที่ 2) โรคปริทันต์จำแนกเป็น 2 ประเภท ประเภทแรก คือ โรคเหงือกอักเสบ (gingivitis) (รูปที่ 3ก) เป็นระยะเริ่มต้นของการเกิดโรคปริทันต์อักเสบ สามารถพบได้ในกลุ่มคนทั่วไป ผู้เป็นโรคจะมีการอักเสบบริเวณเหงือก เหงือกบวมแดง เลือดออกง่าย แต่ยังไม่มีการทำลายอวัยวะปริทันต์ สามารถให้การดูแลรักษาเพื่อให้เหงือกคืนสู่ภาวะปกติได้โดยการแปรงฟันที่ถูกวิธีหรือการใช้ไหมขัดฟัน ประเภทที่สอง คือ โรคปริทันต์อักเสบ (periodontitis) (รูปที่ 3ข) เป็นระยะต่อเนื่องจากเหงือกอักเสบ มีความรุนแรงมากขึ้นเพราะภาวะเหงือกอักเสบที่ไม่ได้รับการดูแลรักษาจนทำให้เกิดการละลายตัวของกระดูกเบ้าฟัน และสุดท้ายต้องสูญเสียฟัน



รูปที่ 2 อวัยวะปริทันต์

ก.

ข.

รูปที่ 3 สภาพเหงือกและฟันของผู้ที่เป็น (ก) โรคเหงือกอักเสบ (ข) โรคปริทันต์อักเสบ

ในประเทศไทย จากการสำรวจทางระบาดวิทยาสภาวะช่องปากระดับประเทศครั้งล่าสุด (ครั้งที่ 6) พ.ศ. 2549-2550 โดยกองทันตสาธารณสุข กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข พบว่า เด็กและเยาวชนไทยอายุ 12 ปี และ 15 ปี มีภาวะเหงือกอักเสบร้อยละ 58.94 และ 60.90 ตามลำดับ ส่วนผู้ใหญ่ (อายุ 35-44 ปี) และผู้สูงอายุ (60-74 ปี) เป็นโรคปริทันต์อักเสบ ร้อยละ 37.60 และ 84.20 ตามลำดับ พบการกระจายของโรคนี้ในทุกภูมิภาค นอกจากนั้นยังพบว่าอุบัติการณ์ของโรคปริทันต์ในผู้สูงอายุเมื่อเทียบกับในอดีตมีอัตราเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีการตรวจพบว่า กลุ่มผู้สูงอายุที่เป็นโรคปริทันต์ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือร้อยละ 59.70 มีค่าร่องลึกปริทันต์ (pocket depth) มากกว่า 6 มิลลิเมตร กล่าวได้ว่าโรคปริทันต์เป็นโรคที่คนส่วนใหญ่ยังปล่อยปละละเลย และไม่ได้คำนึงถึงความสำคัญจึงทำให้เกิดปัญหาตามมา

โรคเหงือกอักเสบและโรคปริทันต์อักเสบ มีสาเหตุมาจากแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์ (periodontopathic bacteria) ที่สะสมอยู่ในช่องปาก หลังจากการรับประทานอาหารหรือการแปรงฟันที่ไม่ถูกวิธี ทำให้มีคราบหรือเศษอาหารจำพวกแป้งและน้ำตาลเกาะบริเวณผิวฟัน คราบอาหารเหล่านี้เป็นอาหารของแบคทีเรีย แบคทีเรียจึงสามารถเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนพร้อมกับสร้างคราบจุลินทรีย์บริเวณผิวฟันเหนือเหงือก (supragingival plaque) แล้วขยายบริเวณกว้างไปที่รากฟันใต้เหงือก (subgingival plaque) แบคทีเรียที่ก่อโรคปริทันต์มักจะเป็นแบคทีเรียแกรมลบชนิดที่ไม่ใช้ออกซิเจน (gram negative anaerobic bacteria) ตัวอย่างเช่น เชื้อ *P. gingivalis, Aggregatibacter actinomycetemcomitans, Treponema denticola, Bacteriodes forsythus, Prevotella intermedia, Camphylobacter concisus, Preptostreptococcus micros*[6,8] แบคทีเรียเหล่านี้มีคุณสมบัติในการก่อโรคโดยการปล่อยเอนไซม์ออกมาย่อยโปรตีนโดยตรง เช่น *P. gingivalis* สร้างเอนไซม์ dipeptidase ทำลายเส้นใยคอลลาเจน (collagen) ซึ่งเป็นส่วนประกอบในเอ็นยึดปริทันต์ และยังมีส่วนห่อหุ้มที่เป็นคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate capsule) สามารถต้านการถูกกลืนกินจากเซลล์เม็ดเลือดขาวแบบฟาโกไซโทซิส (phagocytosis) และแบคทีเรียมีการสร้างสารพิษ เช่น LPS และ leucotoxic substances[5] ทำให้มีการอักเสบและร่างกายมีการตอบสนองต่อการติดเชื้อ ซึ่งมีส่วนสำคัญต่อการเกิดโรคปริทันต์อักเสบ

นอกจากแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุหลักแล้วยังมีปัจจัยอื่น ๆ ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรคปริทันต์อักเสบ เช่น โรคทางระบบบางชนิด ได้แก่ โรคเบาหวานชนิดที่ 2 โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว เป็นต้น รวมทั้งพฤติกรรมการบริโภคอาหารก็มีส่วนเกี่ยวข้องกับโรคนี้ การรับประทานอาหารที่มีเส้นใย (fiber) น้อย การขาดสารอาหารจำพวกวิตามินซี บี และดี ปัจจัยเสริมอื่น ๆ เช่น การแปรงฟันไม่ถูกวิธี การดูแลทำความสะอาดที่ไม่ทั่วถึง การระคายเคืองจากสารเคมี การสูบบุหรี่ หินน้ำลายซึ่งเกิดจากการตกตะกอนของแร่ธาตุแคลเซียม ฟอสฟอรัสในน้ำลายรวมกับคราบจุลินทรีย์ มีลักษณะแข็ง คมบาดเหงือกที่อักเสบอยู่แล้วให้รุนแรงขึ้น ทำให้เด็กวัยเรียน วัยรุ่น ผู้ใหญ่ และผู้สูงอายุ มีความเสี่ยงต่อการเป็นโรคปริทันต์มากขึ้น

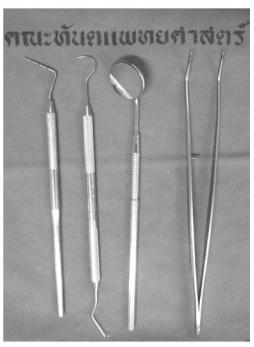
เนื่องจากโรคปริทันต์เป็นโรคที่ดำเนินไปอย่างช้า ๆ และมักไม่แสดงอาการเจ็บปวดใด ๆ คนส่วนมากจึงไม่ทราบว่าตนเองเป็นโรคปริทันต์ และมักมาพบทันตแพทย์เมื่อโรคลุกลามไปมากแล้ว ผู้ที่มีเหงือกอักเสบมากอาจพบว่า

มีเลือดออกขณะแปรงฟัน ผู้ที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบอาจสังเกตเห็นว่าเหงือกของตนเองมีการร่นเพิ่มขึ้น ช่องว่างระหว่างฟันมีขนาดใหญ่ขึ้น ฟันเริ่มแยกห่างจากกัน ฟันโยก เหงือกบวม เป็น ๆ หาย ๆ มีหนอง หรือมีกลิ่นปาก ซึ่งนอกจากจะทำให้เจ็บปวดทรมานแล้ว ยังทำให้สูญเสียความมั่นใจ

การดูแลรักษาสุขภาพช่องปากอย่างถูกวิธีจะช่วยลดปริมาณของเชื้อแบคทีเรียที่สะสมเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดโรคปริทันต์ จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ทุกคนต้องให้ความสำคัญ ทันตแพทย์แนะนำว่า ควรทำความสะอาดฟันอย่างสม่ำเสมอและต่อเนื่องโดยควรเลือกใช้แปรงที่มีขนแปรงอ่อนนุ่ม และแปรงฟันอย่างน้อยวันละ 2 ครั้ง ร่วมกับไหมขัดฟันวันละ 1 ครั้ง ถนอมฟันด้วยการหลีกเลี่ยงอาหารที่มีความเป็นกรดสูง ไม่ควรแปรงฟันหลังรับประทานอาหารทันที เพราะทำให้ฟันสึกได้ และไม่ควรแปรงฟันนานเกินไป เพราะจะทำให้เหงือกเกิดการอักเสบ ที่สำคัญควรตรวจสุขภาพปากและฟันอย่างน้อยปีละ 1 ครั้ง

การวินิจฉัยโรคปริทันต์

ปัจจุบันการวินิจฉัยโรคปริทันต์ส่วนใหญ่เป็นการบอกการดำเนินของโรคที่มีมาแล้วในอดีต เมื่อสงสัยว่าเป็นโรคปริทันต์ วิธีมาตรฐานที่ทันตแพทย์นิยมคือใช้เครื่องมือตรวจปริทันต์ (periodontal probe) (รูปที่ 4ก) และเก็บข้อมูลสภาวะปริทันต์ ได้แก่ การวัดระดับความลึกของร่องปริทันต์ (periodontal probing depth, PD) (รูปที่ 4ข) ซึ่งวัดขอบเหงือกเป็นตำแหน่งอ้างอิงจนถึงจุดลึกปริทันต์ ระดับการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์ (clinical attachment level, CAL) โดยจะวัดระยะทางจากขอบเหงือกถึงรอยต่อเคลือบฟันและเคลือบรากฟัน (cemento enamel junction, CEJ) และระยะทางจากขอบเหงือกถึงจุดลึกสุดของร่องลึกปริทันต์ และข้อมูลส่วนสุดท้ายที่ต้องเก็บคืออาการเลือดออก วัดโดยดูการมีเลือดออกภายหลังใช้เครื่องมือตรวจปริทันต์ (bleeding on probing, BOP)[9] นอกจากนี้ยังอาจประเมินความรุนแรงของโรคโดยการใช้ภาพถ่ายรังสีดูการสูญเสียกระดูกเบ้าฟัน



ก.

ข.

รูปที่ 4 (ก) เครื่องมือตรวจปริทันต์ (ข) ตัวอย่างการใช้เครื่องมือตรวจวัดความลึกของร่องปริทันต์

นอกจากวิธีมาตรฐานที่ตรวจโดยทันตแพทย์แล้ว ยังมีอีกหลายวิธีที่จะทำให้ทราบระยะของโรคได้เช่นเดียวกัน ซึ่งก็ขึ้นกับระดับการตรวจวัด เช่น ระดับโมเลกุล เซลล์ เนื้อเยื่อ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 วิธีต่าง ๆ ที่ใช้ในการวินิจฉัยโรคปริทันต์[10]

ระดับ	กระบวนการที่ตรวจวัด	เครื่องมือหรือเทคนิคที่ใช้วินิจฉัย
โมเลกุล	Activation of receptors for endotoxin, CD-14, toll-like receptors	Polymerase chain reaction (PCR) DNA-DNA hybridization LASER-capture microdissection
เซลล์	Inflammatory cell activation (neutrophils, osteoclast activation)	ELISA, immunohistochemistry Colorimetric technique Cell culture
เนื้อเยื่อ	Downgrowth of junctional epithelium, bone and connective tissue loss	Histomorphometry Immunohistochemistry
คลินิก	Attachment loss, bleeding, bone loss, pocket depth	Periodontal probe Radiographs

จากตารางที่ 1 แต่ละวิธีมีหลักการ ข้อดี ข้อเสีย ต่างกันดังต่อไปนี้

วิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เป็นการตรวจที่อาศัยหลักการของความจำเพาะระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี เกิดเป็นสารเชิงซ้อนที่เรียกว่าแอนติเจน-แอนติบอดี คอมเพล็กซ์ (antigen antibody complex) แอนติเจนเป็นส่วนประกอบที่มาจากเชื้อก่อโรคปริทันต์ เช่น *P. gingivalis* แอนติบอดีเป็นอิมมูโนโกลบูลินเอซึ่งมีความจำเพาะต่อเชื้อ *P. gingivalis* ในน้ำเหลืองเหงือกจากร่องเหงือกของผู้ป่วยโรคปริทันต์ ซึ่งระดับอิมมูโนโกลบูลินเอในน้ำเหลืองเหงือกของผู้ป่วยโรคปริทันต์จะสูงกว่าในกลุ่มควบคุม วิธีการนี้มีความจำเพาะและความไวสูง 10^2-10^4 เซลล์สำหรับเชื้อที่ต้องการหา รวดเร็ว ทราบผลภายใน 10-30 นาที แต่ข้อเสียคือ ใช้กับเชื้อโรคบางชนิดเท่านั้น และค่าใช้จ่ายสูง[11]

วิธีเพาะเชื้อ (cell culture technique) เป็นการตรวจหาเชื้อที่ก่อโรคในคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือก โดยเก็บตัวอย่างคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือกจากผู้ป่วยโรคปริทันต์ นำมาเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะต่อเชื้อดังกล่าว แล้วอบจนเกิดกลุ่มของเชื้อ (colony) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการนับเซลล์และทดสอบการดื้อยาปฏิชีวนะโดยอาศัยเอนไซม์เบต้า-แลคแทมเมส (beta-lactamase) ซึ่งสร้างจากแบคทีเรียรูปแท่ง แกรมลบ มีฤทธิ์ย่อยสลายยาปฏิชีวนะกลุ่มเบต้า-แลคแทม (beta-lactam) เช่น เพนิซิลลิน (penicillin), แอมพิซิลลิน (ampicillin) เชื้อ *P. gingivalis, Prevotella intermedia* ประมาณร้อยละ 70 จะดื้อยาปฏิชีวนะเหล่านี้ วิธีนี้มีความไว 10^4-10^6 เซลล์สำหรับเชื้อที่ต้องการหา และ 10^3 เซลล์สำหรับเชื้อที่ไม่จำเพาะ ข้อดีของวิธีนี้คือใช้ในการทดสอบภูมิไวรับยาต้านจุลชีพได้ แต่ข้อเสียคือเครื่องมือราคาแพง การส่งตรวจเชื้อต้องทำอย่างรวดเร็วเนื่องจากเชื้ออาจตายทำให้เพาะเชื้อไม่ได้ และต้องทำการตรวจภายใน 24-48 ชั่วโมงหลังจากเก็บเชื้อ แต่ใช้เวลานานกว่าจะทราบผล รวมทั้งไม่สามารถจำแนกเชื้อบางชนิดที่ไม่สามารถเพาะเชื้อได้ เช่น เชื้อสไปโรชีท (*Spirochetes*)[12]

วิธีเพิ่มจำนวนชิ้น DNA (polymerase chain reaction, PCR) Asai และคณะ (2002)ได้ศึกษาการตรวจโรคปริทันต์ด้วยเทคนิคการเพิ่มจำนวนชิ้น DNA ของเชื้อก่อโรคปริทันต์ที่อยู่ในคราบจุลินทรีย์ ได้แก่ *T. denticola*, *Treponema vincentii* และ *Treponema medium* โดยการเติมไพรเมอร์ (primer) ซึ่งเป็นส่วนของ DNA ที่มีความยาว 18-28 คู่เบส ไพรเมอร์นี้จะเข้าจับกับตำแหน่งเฉพาะบน DNA สายเดี่ยวจากคราบจุลินทรีย์ เมื่อมีการปรับอุณหภูมิตามกระบวนการ PCR เพื่อให้เกิดการจำลองสาย DNA เพิ่มขึ้น จึงทำให้สามารถตรวจได้แม้เชื้อจะมีปริมาณเพียงเล็กน้อย ความไวของวิธีการนี้เท่ากับ 10^3-10^8 เซลล์ของเชื้อที่ต้องการหา และทราบผลเร็วภายใน 2-4 ชั่วโมง แต่ค่าใช้จ่ายสูงมาก[13]

วิธีการตรวจด้วย DNA probe เป็นการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) โดยการใช้ตัวตรวจจับ (probe) ที่จำเพาะกับลำดับเบสของ 16S rRNA ซึ่งนิยมใช้ในการตรวจหาแบคทีเรียก่อโรค วิธีนี้มีความจำเพาะและความไวสูง 10^2-10^4 เซลล์สำหรับเชื้อที่ต้องการหา สามารถตรวจเชื้อได้หลายชนิด รวมทั้งเชื้อที่ไม่สามารถตรวจด้วยวิธีการเพาะเชื้อได้ ใช้เวลา 1-24 ชั่วโมงก็ทราบผล แม้ว่าวิธีการตรวจทาง DNA ได้รับความสนใจแต่ต้องการเครื่องมือเฉพาะทางและค่าใช้จ่ายสูง[14]

วิธีการตรวจวัดระดับโปรตีนหรือเอนไซม์ในน้ำลาย (saliva) **และน้ำเหลืองเหงือก** (gingival crevicular fluid, GCF) เมื่อมีการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อโรคปริทันต์ทั้งแบบจำเพาะและไม่จำเพาะต่อเชื้อก่อโรคปริทันต์ ทำให้เกิดการสร้างและหลั่งสารก่อการอักเสบและไซโตไคน์ (cytokine) ต่าง ๆ ออกมาบริเวณเหงือกที่อักเสบ[15] และสารบางชนิดสามารถพบได้ในน้ำลายด้วย ดังนั้นนักวิจัยจึงได้มุ่งเน้นศึกษาโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบในของเหลวชีวภาพ (biological fluid) ตัวอย่างของโปรตีนที่พบในน้ำลายและน้ำเหลืองเหงือกของผู้ป่วยโรคปริทันต์ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 โปรตีนที่พบได้ในน้ำลายและน้ำเหลืองเหงือกของผู้ป่วยโรคปริทันต์[16,23]

โปรตีนที่พบในน้ำลาย	โปรตีนที่พบในน้ำเหลืองเหงือก
1. Elastase	1. Matrix metalloproteinase 2,8, 9
2. Amylase	2. Neutral protease
3. Dipeptidylpeptidase	3. Dipeptidylpeptidase
4. Alanine aminotransferase	4. Alkaline phosphatase
5. Arginase	5. Aspartate aminotransferase
6. β-glucuronidase	6. Creatine kinase
7. Myeloperoxidase	7. Myeloperoxidase
8. Lysozyme	8. Lysozyme
9. Chitinase	9. Elastase
10. Matrixmetalloproteinase 1,8	10. β-glucuronidase
11. Cathepsin	11. Cathepsin G,D,B
12. Lactoperoxidase	12. Plasminogen
	13. Gingipain

โปรตีนและเอนไซม์ที่แสดงไว้ในตารางที่ 2 แต่ละชนิดมีหน้าที่ต่างกัน ที่มีผู้ศึกษากันมาก ได้แก่ เอนไซม์ matrix metalloproteinase (MMP), aspartate aminotransferase (AST), β-glucuronidase, lactoperoxidase (LPO), และ myeloperoxidase (MPO)

Matrix metalloproteinase (MMP) สร้างจากเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue cell) เป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่ม endopeptidase เช่น collagenase, gelatinase, membrane-bound proteinase ทำหน้าที่ย่อยโปรตีนที่เป็นส่วนสำคัญสำหรับ extracellular matrix บริเวณเร่งของเอนไซม์จะประกอบด้วยกรดอะมิโนกลูตามิก (glutamic acid) และฮิสทิดีน (histidine) และ Zn^{2+} ซึ่งเป็นตำแหน่งเข้าจับกับซับสเตรต (substrate) ตัวยับยั้งเอนไซม์นี้ที่สำคัญคือ tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) ซึ่งจะเข้าจับกับ MMP เพื่อรักษาสมดุลเมแทบอลิซึมของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) ถ้าขาด TIMPs อาจทำให้เกิดพยาธิสภาพได้ MMP มีหลายกลุ่ม เช่น กลุ่มที่ย่อยคอลลาเจนประกอบด้วย MMP-1, -8, MMP-13 กลุ่มที่ย่อยเจลาติน (gelatin) ประกอบด้วย MMP-2, MMP-9[17] ตัวอย่างปฏิกิริยาของ collagenase มีดังนี้

$$\text{Collagen} + H_2O \xrightarrow{\text{Collagenase}} \text{Collagen fragments}$$

การศึกษาโดยการตรวจหา MMP ในเนื้อเยื่อเหงือกในกลุ่มผู้ที่มีการอักเสบของอวัยวะปริทันต์โดยการย้อมเนื้อเยื่อ (immunohistochemistry) สามารถพบ MMP-1, 2, 3, 8 และ MMP-9 แต่ในกลุ่มผู้มีสภาพปริทันต์ปกติพบเฉพาะ MMP-2[18] และจากการตรวจระดับ MMP ในน้ำเหลืองเหงือกด้วยวิธี ELISA พบว่า MMP-2 ในกลุ่มผู้ป่วยปริทันต์อักเสบมีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุม และ MMP-9 ในน้ำเหลืองเหงือกไม่แตกต่างระหว่างกลุ่มผู้ป่วยปริทันต์อักเสบ กลุ่มผู้ป่วยเหงือกอักเสบ และกลุ่มควบคุม[19]

Aspartate aminotransferase (AST) พบมากในเซลล์ของหัวใจ ตับ กล้ามเนื้อลาย ไต เม็ดเลือดแดง นอกจากนี้ยังพบได้ในน้ำลายและน้ำเหลืองเหงือก เป็นเอนไซม์ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ที่เสียสภาพ (necrotic cell) จากการศึกษาพบว่าในน้ำลายคนที่เป็นโรคปริทันต์มีปริมาณ AST สูงกว่ากลุ่มควบคุม[20] การตรวจวัดเอนไซม์นี้ใช้วิธี enzymatic method โดย AST จะเร่งปฏิกิริยา transamination ซึ่งจะย้ายหมู่อะมิโน ($-NH_2$) จาก L-aspartate ไปให้กับ 2-oxoglutarate แล้วเกิดผลิตภัณฑ์คือ oxaloacetate และ L-glutamate จากนั้น oxaloacetate ที่เกิดขึ้นสามารถทำปฏิกิริยากับ nicotinamide adeninedinucleotide (NADH) ซึ่งเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ malate dehydrogenase (MDH) ได้ผลิตภัณฑ์คือ L-malate และNAD^+ สามารถวัดค่าดูดกลืนแสง ที่ลดลงของ NADH ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ซึ่งจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับ activity ของ AST ดังปฏิกิริยานี้

$$\text{L-Aspartate} + \text{2-Oxoglutarate} \xrightarrow{\text{AST}} \text{Oxaloacetate} + \text{L-glutamate}$$

$$\text{Oxaloacetate} + \text{NADH} \xrightarrow{\text{MDH}} \text{L-Malate} + \text{NAD}^+$$

β-glucuronidase ในน้ำเหลืองเหงือกเป็นส่วนประกอบสำคัญของไพรมารี่ แกรนูล (primary granule) ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล (neutrophil) เอนไซม์ชนิดนี้หลั่งออกมาในระหว่างการอักเสบของเนื้อเยื่อปริทันต์และมีความสัมพันธ์การเพิ่มของร่องลึกปริทันต์และค่าการลดลงของระดับการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์[21] นอกจากนี้เมื่อศึกษาในน้ำเหลืองเหงือกโดยวิธีวัดค่าดูดกลืนแสงพบว่า β-glucuronidase มีค่าสูงในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม[22]

Lactoperoxidase (LPO) เป็นเอนไซม์ที่ช่วยต้านแบคทีเรีย โดยทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ในระบบต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant enzyme) สามารถพบได้ในน้ำลาย น้ำตา ช่องจมูก น้ำคัดหลั่งจากลำไส้เล็ก (intestinal secretion) และน้ำนม[23] เอนไซม์ชนิดนี้เกี่ยวข้องในกระบวนการทำลายแบคทีเรียโดย LPO จะเร่งการเกิดปฏิกิริยาและใช้ H_2O_2 เป็นซับสเตรต ให้ผลิตภัณฑ์ซึ่งจะยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียโดยเฉพาะ hypothiocyanite ($OSCN^-$) ตัวอย่างปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นดังนี้

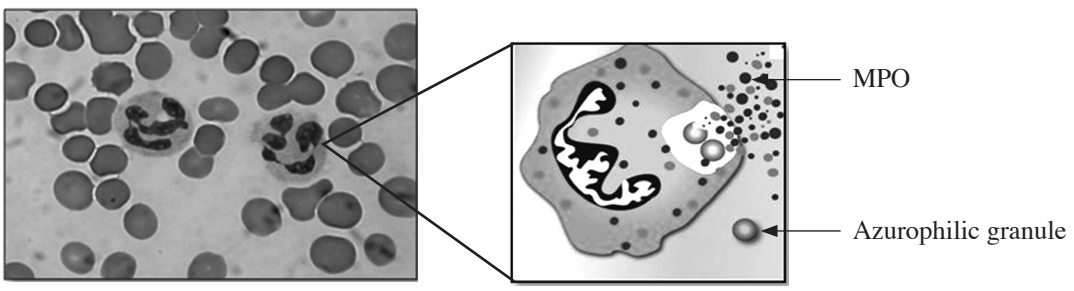
$$H_2O_2 + SCN^- \xrightarrow{\text{LPO}} H_2O + OSCN^-$$

$$H_2O_2 + Br^- \xrightarrow{\text{LPO}} H_2O + BrO^-$$

$$H_2O_2 + I^- \xrightarrow{\text{LPO}} H_2O + IO^-$$

นอกจากเอนไซม์ ที่ได้กล่าวไว้ข้างต้นยังมีนักวิจัยหลายคนได้ทำการศึกษาเอนไซม์ MPO ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการทำลายแบคทีเรีย

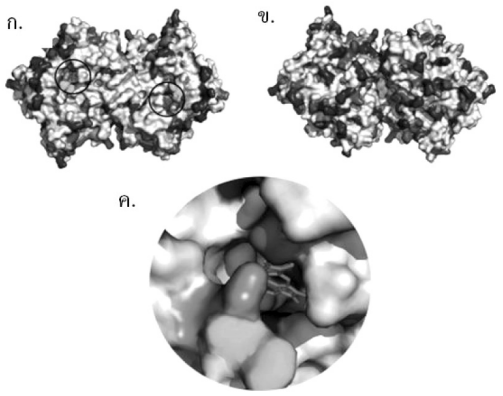
เอนไซม์ Myeloperoxidases (MPO) พบมากในเม็ดเลือดขาว (white blood cells หรือ leukocyte) ซึ่งเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล เป็นชนิดที่มีจำนวนมากที่สุดถึงร้อยละ 50-70 ของเม็ดเลือดขาวทั้งหมด มีหน้าที่ป้องกันร่างกายโดยทำลายสิ่งแปลกปลอมและเชื้อโรคที่เข้าสู่ร่างกายโดยกระบวนการฟาโกไซโทซิส ภายในนิวโทรฟิลประกอบด้วยแกรนูล (granule) หลายชนิด เช่น tertiary granule, specific granule, azurophilic granule จึงเรียกอีกอย่างได้ว่า polymorphonuclear (PMN)[24,25] ภายในแกรนูลประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิด พบเอนไซม์ MPO ในแกรนูลชนิด azurophilic โดยมีปริมาณทั้งหมดในนิวโทรฟิลร้อยละ 5 แต่ถ้าคิดเฉพาะในแกรนูลจะมีมากถึงร้อยละ 25[24] (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 MPO จาก azurophilic granule ภายในเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล (ที่มา: http://www.mt.mahidol.ac.th/e- learning /BasicTechniquesInHematology/lessons/ lesson %201/wbc/wbc.htm /สืบค้นวันที่ 20 ต.ค. 2555)

MPO เป็นเอนไซม์ในกลุ่มเพอร์ออกซิเดส (peroxidases : POD) (EC 1.11.1.7) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาที่มีการเติมหรือดึงไฮโดรเจนอะตอมหรือเฮไลด์ไอออน (halide ion) เช่น ปฏิกิริยาฮาโลจิเนชัน (halogenation) ในมนุษย์มีการสังเคราะห์เอนไซม์ MPO จากยีน *MPO* หลังการสังเคราะห์ MPO เสร็จสิ้นแล้ว จะมีกระบวนการตกแต่งสายพอลิเพปไทด์ (post-translational modification) เพื่อทำให้ MPO สามารถทำหน้าที่เฉพาะได้ กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของ MPO ส่วนมากมีประจุบวก เช่น อาร์จินีน ไลซีน ฮีสทิดีน[26] โครงสร้างของ MPO มีลักษณะเป็นฮีมโปรตีน 2 หน่วย (di-heme protein)

และเป็นเฮทเทอโรไดเมอร์ (heterodimer) สายพอลิเพปไทด์ของทั้ง 2 หน่วยเชื่อมต่อเข้าด้วยกันโดยพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) บริเวณตรงกลางของโมเลกุลประกอบด้วยฮีมซึ่งมีเหล็กและพอร์ไฟรินเป็นส่วนประกอบ[25] MPO มีน้ำหนักโมเลกุล 144 กิโลดาลตัน (รูปที่ 6) ในขณะที่เร่งปฏิกิริยาตำแหน่งนี้จะมีซับสเตรตที่จำเพาะเข้ามาที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ (active site) และพร้อมสำหรับทำหน้าที่เร่งการเกิดปฏิกิริยาได้



รูปที่ 6 โครงสร้างของเอนไซม์ MPO (ก) โครงสร้างด้านหน้าของ MPO สามารถมองเห็นฮีม (สีเขียว) (ข) โครงสร้างด้านหลังของ MPO จะมีกรดอะมิโนอาร์จินีน (สีน้ำเงินเข้ม) อยู่อย่างหนาแน่นทำให้เอนไซม์นี้มีประจุเป็นบวก (ค) บริเวณเร่งของเอนไซม์ MPO[26]

เอนไซม์ MPO นี้นอกจากตรวจพบในน้ำลายหรือน้ำเหลืองเหงือกของผู้ป่วยโรคปริทันต์แล้ว ยังสามารถพบได้ในผู้เป็นโรคที่เกี่ยวกับการอักเสบ เช่น โรคหลอดเลือดอักเสบ (vasculitis) โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) โรคปลอกประสาทเสื่อมแข็ง (multiplesclerosis) การบาดเจ็บที่เนื้อเยื่อปอดและไต(lung and renal tissue injury) โรคหัวใจและหลอดเลือด (cardiovascular disease) MPO มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการทำลายแบคทีเรียเพื่อป้องกันเซลล์เจ้าบ้านจากการรุกรานของเชื้อก่อโรค และยังมีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ในระบบต้านอนุมูลอิสระด้วย ระบบการต่อสู้กับแบคทีเรียโดยอาศัยปฏิกิริยาฮาโลจิเนชัน ที่มี H_2O_2 และธาตุเฮไลด์เป็นซับสเตรตเรียกว่า "MPO-H_2O_2-halide system" [27,28]

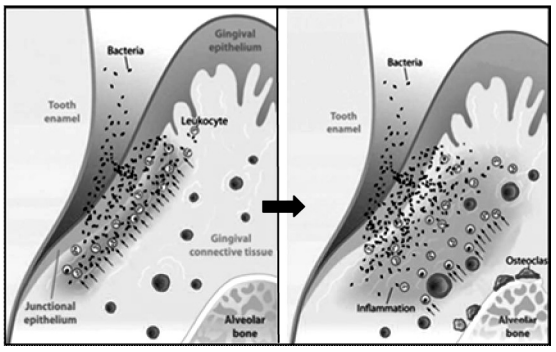
เมื่อมีแบคทีเรียเข้ามาในร่างกายหรือเกิดมีแผล MPO จะถูกปล่อย ออกจาก azurophilic granule ของนิวโทรฟิลเพื่อเร่งปฏิกิริยาฮาโลจิเนชัน โดยมีซับสเตรตหลักคือ H_2O_2 ซึ่งมีความเป็นพิษต่อเซลล์ และซับสเตรตรองที่เป็นเฮไลด์ไอออน (halide ion) เช่น คลอไรด์ไอออน (chloride ion : Cl^-) หลังจากเร่งปฏิกิริยาจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไฮโพคลอรัส (hypochorous acid : HOCl) บริเวณที่มี HOCl จะมีสภาวะเป็นกรด ส่งผลให้แบคทีเรียไม่สามารถมีชีวิตอยู่ได้[27] ปฏิกิริยาการเปลี่ยน H_2O_2 เป็น HOCl โดย MPO แสดงได้ดังสมการข้างล่าง

$$H_2O_2 + Cl^- \xrightarrow{MPO} HOCl + H_2O$$

ดังนั้นการหลั่ง MPO จึงมีส่วนสัมพันธ์กับโรคที่มีสาเหตุจากแบคทีเรีย เช่น โรคปริทันต์

เอนไซม์ MPO และการประยุกต์ใช้ในการตรวจกรองโรคปริทันต์

เมื่อมีแบคทีเรียต่าง ๆ อยู่ที่เหงือกและผิวฟัน เชื้อจุลชีพเหล่านี้จะปล่อยสารพิษ เช่น LPS ออกมากระตุ้นให้ร่างกายตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะต่อเชื้อก่อโรคปริทันต์ โดยกระตุ้นให้มีการเคลื่อนที่ของนิวโทรฟิลจากระบบเลือดมายังบริเวณเหงือกที่มีแบคทีเรีย ในระหว่างนั้นจะมีการสร้างและหลั่งสารก่อการอักเสบและไซโตไคน์ต่าง ๆ เช่น อินเตอร์ลิวคิน-1 (interleukin-1) ทูเมอร์เนโครซีสแฟกเตอร์ แอลฟา (tumornecrosisfactor alpha) และพรอสทาแกลนดิน (prostaglandins)[25] เป็นต้น นิวโทรฟิลที่ออกมาจะทำการฟาโกไซโทซิสแบคทีเรีย ในระหว่างนี้ azurophilic granule ที่อยู่ภายในนิวโทรฟิลจะปล่อยเอนไซม์ MPO ออกมาเพื่อกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาการสร้าง HOCl ซึ่งมีฤทธิ์เป็นกรด ผลคือทำให้แบคทีเรียไม่สามารถมีชีวิตรอดได้[27] แต่ถ้าหากมีการเสียสมดุลระหว่างเชื้อก่อโรคปริทันต์กับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกายจะเกิดการอักเสบบวม แดง และในที่สุดเกิดการละลายตัวของกระดูกเบ้าฟันจึงนำไปสู่การเป็นโรคปริทันต์ในที่สุด (รูปที่ 7)

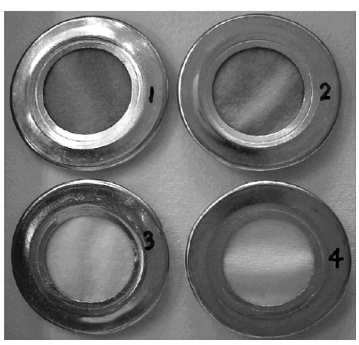


รูปที่ 7 การตอบสนองภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อแบคทีเรียบริเวณเหงือกเมื่อเกิดการอักเสบและการละลายตัวของกระดูกเบ้าฟัน[29]

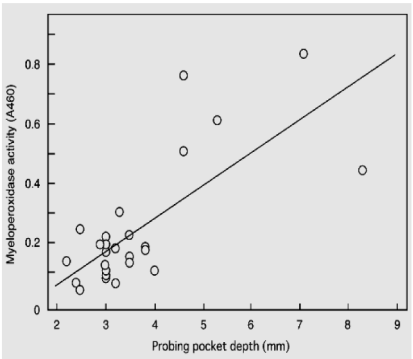
มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์ MPO และโรคปริทันต์ ที่พอสรุปได้ดังนี้ ในปี ค.ศ. 2000 Yamalik และคณะ ได้ใช้น้ำเหลืองเหงือกซึ่งมี MPO ทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 ซึ่งเป็นซับสเตรตหลัก และใช้ tetramethyl benzidine (TMB) เป็นซับสเตรตรอง จากนั้นวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบมีความเข้มข้นของ MPO ในน้ำเหลืองเหงือก (1.03 U/µl) ซึ่งมากกว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคเหงือกอักเสบ (0.79 U/µl) และมากกว่ากลุ่มผู้มีสภาพปริทันต์ปกติ (0.24 U/µl) ผลการศึกษานี้ทำให้ทราบปริมาณ MPO baseline ในคนปกติ เทียบกับกลุ่มผู้ป่วย[28]

ในปี ค.ศ. 2002 Meisel และคณะ รายงานว่าระดับ MPO ในกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์ที่มีการสูบบุหรี่มีค่าสูงมากกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ไม่สูบบุหรี่[30] ทั้งนี้เนื่องจากการสูบบุหรี่ทำให้มีการอักเสบของเหงือกและอวัยวะรอบ ๆ ฟันที่ถูกทำลายมากขึ้น ในปี ค.ศ. 2007 Borges และคณะได้ศึกษาตัวบ่งชี้ที่มีความสัมพันธ์กับกระบวนการอักเสบในผู้ป่วยโรคปริทันต์ โดยวัดระดับแรงตึงเครียดจากเนื้อเยื่อเหงือกที่มีการอักเสบในผู้ป่วยปริทันต์ ผลปรากฏว่าในกลุ่มผู้ป่วยปริทันต์ มีระดับ MPO สูงกว่ากลุ่มที่มีสภาพปริทันต์ปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)[31]

ปี ค.ศ. 2008 Sakamoto และคณะ ศึกษาวิธีการตรวจสอบการทำงานของ MPO โดยใช้น้ำลายจากกลุ่มผู้มีสภาพปริทันต์ปกติและกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์ ด้วยวิธีวัดการดูดกลืนแสง ใช้ H_2O_2 เป็นซับสเตรตหลัก และใช้ 3,3′-diaminobenzidine (DAB) และ guaiacol เป็นซับสเตรตรอง ทำการทดสอบปฏิกิริยาใน Sandwich test-disk ซึ่งมีลักษณะคล้ายจานกระดาษเล็ก ๆ (รูปที่ 8) เมื่อมีการเร่งปฏิกิริยาด้วย MPO จะมีการเปลี่ยนสีเกิดขึ้นบนกระดาษนั้น ทำการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรมิเตอร์ (spectrometer) พบว่าผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์จะมีระดับการทำงานของ MPO มากกว่าในกลุ่มผู้มีสภาพปริทันต์ปกติ และนอกจากนี้ผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์ที่มีร่องลึกปริทันต์มากจะมีการทำงานของ MPO มากด้วย[32] (รูปที่ 9)



รูปที่ 8 ผลการตรวจสอบการทำงานของ MPO บน Sandwich test-disk โดยความเข้มข้นของสีแปรผันตรงกับปริมาณ MPO และค่าการดูดกลืนแสงที่ 460 นาโนเมตร[32]
1 = เอนไซม์ MPO 40 นาโนกรัมสกัดมาจากเม็ดเลือดขาวในมนุษย์
2 = น้ำลายจากผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ (ร่องลึกปริทันต์ 4.6 นาโนเมตร)
3 = น้ำลายจากผู้มีสภาพปริทันต์ปกติ
4 = น้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร



รูปที่ 9 ความสัมพันธ์ระหว่างร่องลึกปริทันต์และการทำงานของ MPO[32]

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในสัตว์ทดลอง โดยในปี ค.ศ. 2009 Queiroz-Junior และคณะ ได้วิเคราะห์ระดับ MPO ในหนูเพศผู้ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบเรื้อรังจนกลายเป็นโรคปริทันต์ โดยคณะวิจัยได้ฉีดยาสลบแล้วใช้เชือกผูกมัดบริเวณคอฟันของหนูนาน 11 วัน เพื่อทำให้บริเวณเนื้อเยื่อเหงือกรอบ ๆ ฟันเกิดการอักเสบเรื้อรัง แล้วจึงเก็บตัวอย่างเลือดจากเนื้อเยื่อเหงือกที่อักเสบและบริเวณที่ไม่อักเสบตำแหน่งใกล้เคียงกันไปวิเคราะห์ปริมาณ MPO ด้วยวิธีการวัดการดูดกลืนแสง MPO ในเนื้อเยื่อเหงือกจะเร่งการสลายซับสเตรต H_2O_2 และทำให้เกิดการเปลี่ยนสีของ TMB วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร การเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงที่เกิดขึ้นจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของ MPO พบว่าในเหงือกหนูที่เป็นโรคปริทันต์มีปริมาณ MPO มากกว่าเหงือกของหนูที่สภาพปริทันต์ปกติ โดยในบริเวณที่อักเสบและไม่อักเสบในหนูที่เป็นโรคปริทันต์มีปริมาณ MPO เพิ่มขึ้น[33]

ซับสเตรตที่กล่าวมาข้างต้นได้แก่ DAB, TMB, guaiacol ล้วนแล้วแต่เป็นสารพิษหรือสารก่อมะเร็ง[34] จึงมีความพยายามที่จะทำการศึกษาหาซับสเตรตที่ไม่เป็นพิษหรือเป็นพิษน้อยมากมาใช้แทน นอกจากซับสเตรตที่กล่าวมาก็ยังมีการใช้ซับสเตรตอื่น ๆ อีก เช่น monochlorodimedone[35] แต่ยังไม่มีซับสเตรตใดหรือวิธีการใด ๆ ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นเครื่องมือที่สามารถใช้งานได้สะดวกในชุมชนและมีค่าใช้จ่ายไม่สูง การค้นคว้าเพื่อหาซับสเตรตที่ไม่เป็นพิษสำหรับใช้งานดังกล่าว จึงน่าจะมีประโยชน์และมีศักยภาพในการนำไปพัฒนาการตรวจกรองโรคปริทันต์

สรุป

MPO เป็นเอนไซม์ที่มีศักยภาพในการเป็นตัวบ่งชี้ของโรคปริทันต์ ดังนั้นจึงน่าสนใจอย่างยิ่งที่จะศึกษาถึงกลไกของเอนไซม์ MPO และพัฒนาใช้ให้เกิดประโยชน์ เช่น พัฒนาเป็นชุดตรวจสำเร็จรูปเพื่อใช้ตรวจกรองโรคเหงือกอักเสบและปริทันต์อักเสบที่ใช้สะดวก ราคาไม่แพง สามารถคัดกรองโรคปริทันต์ตั้งแต่ระยะแรกได้ด้วยตนเอง ทั้งนี้เพื่อให้การดูแลรักษาตั้งแต่ระยะเริ่มต้น เพื่อสุขภาพช่องปากที่ดีของตนและคนในครอบครัว ปากและฟันทำหน้าที่ได้อย่างเต็มที่ ช่วยลดภาวะทุพโภชนาการเนื่องจากปัญหาช่องปากและลดความรุนแรงของโรคอื่น ๆ ด้วย เพื่อนำไปสู่สุขภาวะและคุณภาพชีวิตที่ดี

References

1. Kiran M, Arpak N, Unsal E, Erdogan MF. The effect of improved periodontal health on metabolic control in type 2 diabetes mellitus. J Clin Periodontol 2005; 32:266-72.
2. Paquette DW, Brodala N, Nichols TC. Cardiovascular disease, inflammation, and periodontal infection. Periodontol 2007; 44:113-26.
3. Tezal M, Grossi SG, Genco RJ. Is periodontitis associated with oral neoplasms?. J Periodontol 2005; 76:406-10.
4. Kamer AR, Craig RG, Dasanayake AP, Brys M, Glodzik-Sobanska L, de Leon MJ. Inflammation and Alzheimer's disease: possible role of periodontal diseases. Alzheimers Dement 2008; 4:242-50.
5. Offenbacher S, Katz V, Fertik G, Collins J, Boyd D, Maynor G, McKaig R, Beck J. Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight. J Periodontol 1996; 67(10 Suppl):1103-13.
6. Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Duff GW. Microbiological parameters associated with IL-1 gene polymorphisms in periodontitis patients. J Clin Periodontol 2000; 27:810-8.
7. Lavine WS, Page RC, Padgett GA. Host response in chronic periodontal disease. V. The dental and periodontal status of mink and mice affected by Chediak-Higashi syndrome. J Periodontol 1976; 47:621-35.

8. Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. Lab Invest 1976; 34:235-49.
9. Listgarten MA. Periodontal probing: what does it mean?. J Clin Periodontol 1980; 7:165-76.
10. Zia A KS, Bey A, Gupta ND, Mukhtar-Un-Nisar S. Oral biomarkers in the diagnosis and progression of periodontal diseases. Biol Med 2011; 3:45-52.
11. Savitt ED, Strzempko MN, Vaccaro KK, Peros WJ, French CK. Comparison of cultural methods and DNA probe analyses for the detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides intermedius* in subgingival plaque samples. J Periodontol 1988; 59:431-8.
12. Snyder B, Ryerson CC, Corona H. Analytical performance of an immunologic-based periodontal bacterial test for simultaneous detection and differentiation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Prevotella intermedia*. J Periodontol 1996; 67:497-505.
13. Asai Y, Jinno T, Igarashi H, Ohyama Y, Ogawa T. Detection and quantification of oral treponemes in subgingival plaque by real-time PCR. J Clin Microbiol 2002; 40:3334-40.
14. French CK, Savitt ED, Simon SL. DNA probe detection of periodontal pathogens. Oral Microbiol Immunol 1986; 1:58-62.
15. Kjeldsen M, Holmstrup P, Bendtzen K. Marginal periodontitis and cytokines: a review of the literature. J Periodontol 1993; 64:1013-22.
16. Ozmeric N. Advances in periodontal disease markers. Clin Chim Acta 2004; 343:1-16.
17. Verma RP, Hansch C. Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs. Bioorg Med Chem 2007; 15:2223-68.
18. Ingman T, Sorsa T, Michaelis J, Konttinen YT. Matrix metalloproteinases-1, -3, and -8 in adult periodontitis in situ. An immunohistochemical study. Ann N Y Acad Sci 1994; 732:459-61.
19. Rai B, Kharb S, Jain R, Anand SC. Biomarkers of periodontitis in oral fluids. J Oral Sci 2008; 50:53-6.
20. Todorovic T, Dozic I, Vicente-Barrero M. Salivary enzymes and periodontal disease. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2006; 11:E115-9.
21. Ginwalla TMS GB, Kamat KA. Beta-Glucuronidase Activity in the saliva of Individuals with Normal and Diseased Periodontium (A Biochemical Study). J India Dent Assn 1969; 41:59-63.
22. Balaji SK . Beta-Glucuronidase Activity In Gingival Crevicular Fluid And Subgingival Microflora In Patients With And Without Adult Periodontitis. Asian J Exp Biol Sci 2012; 3:142-55.
23. Wever R, Kast WM, Kasinoedin JH, Boelens R. The peroxidation of thiocyanate catalysed by myeloperoxidase and lactoperoxidase. Biochim Biophys Acta 1982; 709:212-9.
24. Rausch PG, Moore TG. Granule enzymes of polymorphonuclear neutrophils: A phylogenetic comparison. Blood 1975; 46:913-9.
25. Klebanoff SJ, Rosen H. The role of myeloperoxidase in the microbicidal activity of polymorphonuclear leukocytes. Ciba Found Symp 1978: 263-84.
26. Arnhold J, Flemmig J. Human myeloperoxidase in innate and acquired immunity. Arch Biochem Biophys 2010; 500:92-106.
27. Rosen H, Crowley JR, Heinecke JW. Human neutrophils use the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system to chlorinate but not nitrate bacterial proteins during phagocytosis. J Biol Chem 2002; 277:30463-8.
28. Yamalik N, Caglayan F, Kilinc K, Kilinc A, Tumer C. The importance of data presentation regarding gingival crevicular fluid myeloperoxidase and elastase-like activity in periodontal disease and health status. J Periodontol 2000; 71:460-7.
29. Dana T. Graves TO, Gustavo P. Garlet. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. J Oral Microbiology 2011; 3:5304-DOI.
30. Meisel P KT, Cascorbi I, Schroeder W, Herrmann F, John U, Kocher T. Gender and smoking-related risk reduction of periodontal disease with variant myeloperoxidase alleles. Genes Immun 2002; 3:102-6.
31. Borges IJr, Moreira EA, Filho DW, de Oliveira TB, da Silva MB, Frode TS. Proinflammatory and oxidative stress markers in patients with periodontal disease. Mediators Inflamm 2007: 1-5. (doi:10.1155/2007/45794).
32. Sakamoto W, Fujii Y, Kanehira T, Asano K, Izumi H. A novel assay system for myeloperoxidase activity in whole saliva. Clin Biochem 2008; 41:584-90.
33. Queiroz-Junior CM, Pacheco CM, Fonseca AH, Klein A, Caliari MV, de Francischi JN. Myeloperoxidase content is a marker of systemic inflammation in a chronic condition: the example given by the periodontal disease in rats. Mediators Inflamm 2009: 1-7. (doi:10.1155/2009/760837).
34. Pliss GB, Volfson NI. Possible carcinogenic properties of a new chromogen, dicarboxydine (gamma,gamma'-3,3′-benzidine dioxydibutyric acid), tested in rats and mice. J Natl Cancer Inst 1979; 62:301-4.
35. Van der Velden U. Probing force and the relationship of the probe tip to the periodontal tissues. J Clin Periodontol 1979; 6:106-14.