Thesis Title Study of Salivary Proteolytic Enzyme Inhibitor from Thai Herbs in Patients with Oral Inflammatory Diseases

Author Mrs. Phenphichar Wanachantararak

M.S. Biochemistry

Examining Committee:

Assoc. Prof. Dr. Viboon	Rattanapanone	Chairman
Assoc. Prof. Dr. Usanee	Viniketkumnuen	Member
Asst. Prof. Mallika	Sookasam	Member
Dr. Somdet	Srichairatanakool	Member

Abstract

Oral inflammatory disease such as gingivitis and periodontitis is resulted mainly from mixed microorganism infection in dental plaque. These microorganisms produce many types of degraded enzymes in order to invade into underlying periodontium. The host defense mechanisms respond to this invasion by both immune and cellular response and release more enzymes which is sometime exaggerated this inflammation and causing more damage to gingiva and other periodontium. The proposes of this study were collected saliva samples from 40 healthy periodontium, 37 gingivitis and 40 periodontitis groups, and to determine the concentration of total proteinase, cysteine proteinase, elastase, total proteinase inhibitor, cystatin, and elastase inhibitor by using ELISA-biotinylated gelatin, spectrophotometric, HPLC and SDS-PAGE methods, respectively. In addition, thirty-two Thai herb extracts were investigated for proteinase inhibition by using gelatin on unprocessed-X-ray film, specific substrate technique then selected the best of Thai herbs for testing inhibitory activity saliva enzymes of periodontitis group.

The result of this study showed that the clinical measurement of the periodontitis group had higher median values of age, Löe-Silness Gingivitis and Plaque Index than other groups. The mean protein concentration in saliva of periodontitis group (2.0 mg/ml) was significantly higher than in the normal (1.6 mg/ml) and gingivitis groups (1.6 mg/ml). The enzymes in saliva samples presented in μg/mg

protein and showed that the median value of total proteinase specific activity in periodontitis group (346.3) was significantly higher than in gingivitis (60.0) and normal groups (156.0). The median values of cysteine proteinase in the gingivitis group (3.5) and periodontitis group (2.9) were significantly higher than the normal group (2.0). The median value of elastase specific activity in periodontitis group was higher (3.6) than the normal (0.6) and gingivitis group (0.4). And the enzyme inhibitors in saliva samples presented in μg/mg dry saliva and showed that the median values of total proteinase inhibitor in periodontitis (4.9) and gingivitis group (5.4) were significantly lower than in the normal group (29.6). The median values of total cystatin in the gingivitis (0.7) and periodontitis group (1.0) were significantly lower than in normal group (8.3). The median values of elastase inhibitor showed that there were not statistically significant difference in saliva of normal (4.1), gingivitis (5.1), and periodontitis groups (4.6).

The results for proteinase inhibitor of thirty-two Thai herb extracts by unprocessed x-ray film method were shown in the following (mg/g dry weight of tissue or seed); for trypsin that betel nut and soybean were the best (9.6); for elastase that emblic myrabolan was the best (200.0); for papain that betel nut and tea were the best (20.0). The periodontitis saliva was tested with three Thai herb extracts i.e.; betel nut, black tea and clove. The results showed that the elastase inhibitor of periodontitis saliva (μg/mg dry saliva) with adding betel nut (13.4), black tea (16.9) or clove (18.9) was significantly higher than the periodontitis saliva (7.5). Then it can be proved that Thai herb extracts had inhibitory effect to proteinase enzymes in saliva.

For the conclusion, the determination in saliva for the activity of total proteinase, cysteine proteinase, and elastase showed their increase in both gingivitis and periodontitis patients and total proteinase inhibitor, cystatin, and elastase inhibitor were decrease. They prove to be useful in the diagnosis and monitoring of gingivitis and periodontitis disease.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การศึกษาสารยับยั้งจากสมุนไพรไทยต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีนในน้ำลายของผู้ป่วยโรคช่องปากอักเสบ

ชื่อผู้เขียน เพ็ญพิชชา วนจันทรรักษ์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา ชีวเคมี

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. วิบูลย์	รัตนาปนนท์	ประธานกรรมการ
รศ. ดร. อุษณีย์	วินิจเขตคำนวณ	กรรมการ
ผศ. ทพญ. มัลลิกา	สุขเกษม	กรรมการ
อ. ดร. สมเดช	ศรีชัยรัตนกูล	กรรมการ

บทคัดย่อ

โรคช่องปากอักเสบ เช่น โรคเหงือกอักเสบและโรคปริทันต์อักเสบ มีสาเหตุหลักมาจากการติดเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดที่อาศัยอยู่ในแผ่นคราบจุลินทรีย์ เชื้อชนิดต่างๆ เหล่านี้จะผลิตเอนไซม์และสารพิษ เมื่อร่างกายเกิดปฏิกิริยาภูมิคุ้มกันต่อเชื้อจุลินทรีย์ ส่งผลให้มีการหลั่งเอนไซม์หลายชนิดออกมาจำนวนมาก ทำให้เกิดการลุกลามเข้าไปทำลายเหงือกและอวัยวะปริทันต์ การทดลองครั้งนี้ทำการเก็บน้ำลายจากกลุ่มคนปกติ 40 คน คนที่มีโรคเหงือกอักเสบ 37 คน และคนที่มีโรคปริทันต์อักเสบ 40 คน เพื่อวัดปริมาณเอนไซม์และสารยับยั้งต่อเอนไซม์ total proteinase, cysteine proteinase, elastase ด้วยวิธี ELISA-biotinylated gelatin, spectrophotometry, HPLC และ SDS-PAGE ตามลำดับ นอกจากนี้ทำการตรวจหาสารยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าวจากสารสกัดด้วยน้ำของสมุนไพรไทยจำนวน 32 ชนิดด้วยวิธีการทดสอบสารยับยั้งต่อเอนไซม์ย่อยเจลลาตินบนแผ่นฟิล์มและเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้น แล้วเลือกสมุนไพรไทยที่มีปริมาณสารยับยั้งต่อเอนไซม์สูงสุด เพื่อนำมาทดสอบเปรียบเทียบปริมาณสารยับยั้งต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีนในน้ำลายของคนที่มีโรคปริทันต์อักเสบ

จากผลการทดลองแสดงข้อมูลเป็นค่ามัธยฐาน (Median) ดังนี้ การตรวจสุขภาพช่องปากด้วยวิธี Löe-Silness Gingivitis and Plaque Index พบว่ากลุ่มคนที่มีโรคปริทันต์อักเสบมี อายุคราบจุลินทรีย์ และการอักเสบของเหงือกมากกว่ากลุ่มอื่น การวัดปริมาณโปรตีนในน้ำลายพบว่ากลุ่มคนที่มีโรคปริทันต์อักเสบ (2.0 mg/ml) มีปริมาณสูงกว่ากลุ่มคนปกติ (1.6 mg/ml) และคนที่มีโรคเหงือกอักเสบ (1.6 mg/ml) อย่างมีนัยสำคัญ การวัดปริมาณเอนไซม์ในน้ำลายแสดงค่าเป็น μg/mg

protein พบว่า total proteinase specific activity ของกลุ่มคนที่มีโรคปริทันต์อักเสบ (346.3) สูงกว่าคนที่มีโรคเหงือกอักเสบ (60.0) และกลุ่มคนปกติ (156.0) อย่างมีนัยสำคัญ cysteine proteinase specific activity ของกลุ่มคนที่มีโรคปริทันต์อักเสบ (2.9) และคนที่มีโรคเหงือกอักเสบ (3.5) สูงกว่ากลุ่มคนปกติ (2.0) อย่างมีนัยสำคัญ และ elastase specific activity ของกลุ่มคนที่มีโรคปริทันต์อักเสบ (3.6) สูงกว่ากลุ่มคนปกติ (0.6) และคนที่มีโรคเหงือกอักเสบ (0.4) อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนปริมาณสารยับยั้งต่อเอนไซม์ในน้ำลายแสดงค่าเป็น μg/mg dry saliva พบว่า total proteinase inhibitor ของกลุ่มคนที่มีโรคปริทันต์อักเสบ (4.9) และคนที่มีโรคเหงือกอักเสบ (5.4) ต่ำกว่ากลุ่มคนปกติ (29.6) อย่างมีนัยสำคัญ total cystatin ของกลุ่มคนที่มีโรคปริทันต์อักเสบ (1.0) และคนที่มีโรคเหงือกอักเสบ (0.7) ต่ำกว่ากลุ่มคนปกติ (8.3) อย่างมีนัยสำคัญ และ elastase inhibitor ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทั้งกลุ่มคนปกติ (4.1) คนที่มีโรคเหงือกอักเสบ (5.1) และคนที่มีโรคปริทันต์อักเสบ (4.6)

การทดสอบสารสกัดจากสมุนไพรไทยต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีน 32 ชนิดด้วยวิธี Unprocessed x-ray film แสดงหน่วยเป็น mg/g dry weight of tissue or seed พบว่ามีสารยับยั้งการทำงานต่อเอนไซม์ trypsin ในผลหมากและเมล็ดถั่วเหลืองมากที่สุด (9.6) ต่อเอนไซม์ elastase ในมะขามป้อมมากที่สุด (200.0) และต่อเอนไซม์ papain ในผลหมากและใบชามากที่สุด (20.0) ส่วนผลทดสอบสารยับยั้งจากสมุนไพรต่อเอนไซม์ในน้ำลายของกลุ่มคนที่มีโรคปริทันต์อักเสบพบว่าปริมาณสารยับยั้งต่อเอนไซม์ elastase (μg/mg dry saliva) เมื่อเติมสารสกัดจากผลหมาก (13.4) ใบชาดำ (16.9) หรือดอกกานพลู (18.9) สูงกว่าในน้ำลายของกลุ่มคนที่มีโรคปริทันต์อักเสบ (7.5) อย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าสารยับยั้งจากสารสกัดสมุนไพรไทยมีผลต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีนในน้ำลาย

ผลโดยสรุป การตรวจน้ำลายเพื่อหาปริมาณเอนไซม์ total proteinase, cysteine proteinase และ elastase พบว่าค่าเพิ่มขึ้นในกลุ่มคนที่มีโรคเหงือกอักเสบและคนที่มีโรคปริทันต์อักเสบ และปริมาณสารยับยั้ง total proteinase inhibitor, total cystatin และ elastase inhibitor มีค่าต่ำลง ซึ่งผลการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์เพื่อวินิจฉัยและรักษาโรคเหงือกอักเสบและโรคปริทันต์อักเสบ