

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์-แอลฟาในไลเคนพลาเนียสในช่องปากที่รักษาด้วย
ยาฟลูโอซิโนโลน อะเซทโทไนด์ ความเข้มข้น 0.1 %

Expression of tumor necrosis factor- α in oral lichen planus treated with
fluocinolone acetonide 0.1 %

โดย

กอบกาญจน์ ทองประสม
กิตติพงษ์ ดนุไทย

ศูนย์วิทยพัชร์พยากร
มีนาคม 2549
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้มีรายนามดังต่อไปนี้

- ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร. พลธรรม ไชยฤทธิ์ ภาควิชาวินิจฉัยโรคช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ได้มอบชิ้นเนื้อในคนปกติ สำหรับงานวิจัยนี้
- ทันตแพทย์หญิง มัชฌิมารพ ไชยมุสิก กลุ่มงานทันตกรรม โรงพยาบาลจังหวัดสระบุรี ได้ช่วยเหลือเกี่ยวกับการส่งผู้ป่วยเข้าร่วมในโครงการวิจัย
- อาจารย์ทันตแพทย์หญิง วิไลรัตน์ สฤษฏีชัยกุล นิสิตปริญญาโทหลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิตสาขาเวชศาสตร์ช่องปาก ที่ช่วยงานวิจัยในห้องปฏิบัติการอิมมูโนฮิสโตเคมี
- ข้าราชการและเจ้าหน้าที่ภาควิชาเวชศาสตร์ช่องปาก และภาควิชาทันตพยาธิวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ช่วยเหลือในการทำวิจัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์- แอลฟาในไลเคนพลาแนสในช่องปากที่รักษาด้วยยาฟลูโอซิโนโลน
อะเซทโทไนด์ ความเข้มข้น 0.1 %

กอบกาญจน์ ทองประสม
กิตติพงษ์ หนูไทย

มีนาคม 2549

บทคัดย่อ

ไลเคนพลาแนสในช่องปากเป็น โรคอักเสบเรื้อรังชนิดหนึ่งที่พบได้บ่อยและมีความเกี่ยวข้องกับความผิดปกติของภูมิคุ้มกันชนิดที่ เซลล์เป็นสื่อ เคยมีรายงานว่าทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์-แอลฟามีความเกี่ยวข้องกับการเกิดรอยโรคนี้ จุดประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อที่จะตรวจสอบผลของยาฟลูโอซิโนโลน อะเซทโทไนด์ชนิดนี้ซึ่งความเข้มข้น 0.1% ต่อการแสดงออกของ ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์-แอลฟาใน รอยโรคไลเคนพลาแนสในช่องปาก ผู้ป่วยไลเคนพลาแนสในช่องปากชนิดผื่นและแผลดลอกจำนวน 18 ราย ได้รับการตัดชิ้นเนื้อก่อนและหลังการรักษาด้วยยาฟลูโอซิโนโลน อะเซทโทไนด์ชนิดนี้ซึ่งความเข้มข้น 0.1% เป็นเวลา 1 เดือน ร่วมกับการศึกษาเนื้อเยื่อปกติจำนวน 20 ราย ด้วยวิธีการเดียวกันโดยส่งตรวจด้วยวิธีการทางพยาธิวิทยาและอิมมูโนฮิสโตเคมีที่ข้อมด้วยแอนติบอดีต่อทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์-แอลฟา โดยใช้ชิ้นเนื้อมะเร็งในช่องปากเป็นตัวควบคุมผลบวก ในขณะที่เนื้อเยื่อไลเคนพลาแนสในช่องปากที่ไม่ได้ข้อมแอนติบอดีปฐมภูมิใช้เป็นตัวควบคุมผลลบ จากผลการศึกษาพบว่าผู้ป่วย 16 ใน 18 ราย (88.89 เปอร์เซ็นต์) แสดงปฏิกิริยาที่ให้ผลบวกต่อทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์-แอลฟา ซึ่งส่วนใหญ่พบใน โมโนนิวเคลียร์เซลล์ มี 10 ราย (55.56 เปอร์เซ็นต์) ที่พบการแสดงออกของ ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์- แอลฟาในเคอราติโนซัยต์ จำนวน โมโนนิวเคลียร์เซลล์ที่ให้ผลบวกต่อทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์-แอลฟา ก่อนการรักษาด้วยยาฟลูโอซิโนโลน อะเซทโทไนด์ชนิดนี้ซึ่งความเข้มข้น 0.1 % สูงกว่าภายหลังการรักษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.000$) และในเนื้อเยื่อปกติ ($p=0.000$) ยิ่งไปกว่านั้นจำนวน โมโนนิวเคลียร์เซลล์ภายหลังการรักษาด้วยยาฟลูโอซิโนโลน อะเซทโทไนด์ชนิดนี้ซึ่งความเข้มข้น 0.1 % ต่ำกว่าก่อนรักษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.000$) ดังนั้นการศึกษานี้แสดงว่าทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์-แอลฟา อาจมีความเกี่ยวข้องกับพยาธิสภาพของระบบภูมิคุ้มกันของการเกิดโรคไลเคนพลาแนสในช่องปากในผู้ป่วยไทยและยาฟลูโอซิโนโลน อะเซทโทไนด์ชนิดนี้ซึ่งความเข้มข้น 0.1 % สามารถทำให้มีการแสดงออกของทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์-แอลฟาลดลง

Expression of tumor necrosis factor- α in oral lichen planus treated with fluocinolone acetonide 0.1 %

KOBKAN THONGPRASOM

KITTIPONG DHANUTHAI

March, 2006

Abstract

Oral lichen planus (OLP) is a common chronic inflammatory disease involving T-cells mediated immunity. Tumor necrotic factor (TNF) - α has been reported to be involved in the disease process. The purpose of this study was to investigate the effect of fluocinolone acetonide in orabase (FAO) 0.1% on the expression of TNF- α in patients with OLP. Eighteen Thai patients with atrophic or erosive OLP were recruited. Biopsy specimens were taken before and 1 month after treatment with FAO 0.1 % and sent for histopathologic examination where they were immunohistochemically stained with antibody to TNF- α . Twenty normal mucosa specimens were identically processed. Oral squamous cell carcinoma tissue was used as a positive control for TNF- α expression, whereas OLP section without primary antibody was served as a negative control. Sixteen out of 18 cases (88.89%) of OLP exhibited positive staining for TNF- α . Most of the TNF- α was observed in the mononuclear cells. Ten cases (55.56%) of OLP demonstrated TNF- α expression in keratinocytes. The number of mononuclear cells positive for TNF- α before the treatment with FAO 0.1 % in orabase was statistically higher than that after the treatment ($p = 0.000$) and in the normal mucosa ($p = 0.000$). Moreover, the number of mononuclear cells after treatment with FAO 0.1 % in orabase was statistically significant lower than before the treatment ($p = 0.000$). In conclusion, our study exhibited that TNF- α may be associated with the immunopathogenesis of OLP in Thai patients and FAO 0.1% had an effect on the reduction of TNF- α expression.

สารบัญ

หน้า

1	บทนำ	1
2	การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
3	วิธีการวิจัย	9
4	ผลการวิจัย	14
5	การอภิปรายผล	29
6	ข้อสรุป	32
7	ข้อเสนอแนะ	32
8	เอกสารอ้างอิง	33



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการตารางประกอบ

ตาราง	หน้า
1 ชนิด จำนวน เพศ อายุ ตำแหน่งของรอยโรค และระยะเวลาของการเกิดโรคของผู้ป่วย ไลเคนพลาเนียสในช่องปากและเนื้อเยื่อปกติ	10
2 แสดงจำนวนของโมโนนิวเคลียร์เซลล์ที่มีการแสดงออกทางอิมมูโนฮิสโตเคมีต่อ TNF- α และปริมาณ โมโนนิวเคลียร์เซลล์บริเวณลามินา โพรเพรีย ก่อนและหลัง การรักษาด้วยยาฟลูโอซิโนโลน อะเซทโทไนด์ชนิดขี้ผึ้ง ความเข้มข้น 0.1% ที่ กำลังขยายขนาด 200 เท่า	15
3 แสดงจำนวนของ เคอราติโนไซต์ที่มีการแสดงออกทางอิมมูโนฮิสโตเคมีต่อ TNF- α ก่อน และหลังการรักษาด้วยยาฟลูโอซิโนโลน อะเซทโทไนด์ชนิดขี้ผึ้ง ความเข้มข้น 0.1% ที่กำลังขยายขนาด 200 เท่า	16
4 แสดงจำนวนของแสดงจำนวนของโมโนนิวเคลียร์เซลล์/เคอราติโนไซต์ที่มีการแสดง ออกทางอิมมูโนฮิสโตเคมีต่อ TNF- α และปริมาณ โมโนนิวเคลียร์เซลล์/ เคอราติโนไซต์ ในเนื้อเยื่อปกติ ที่กำลังขยายขนาด 200 เท่า	17

รายการภาพประกอบ

ภาพ	หน้า
1. แสดงการส่งสัญญาณของ TNF ผ่าน TNF-receptor-mediated signaling และเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ apoptosis (รูปด้านซ้าย) หรือเกิดการกระตุ้น NF- κ B แล้วเกิดการตอบสนองต่อการอักเสบ (รูปด้านขวา)	5
2. แสดงความสัมพันธ์ของระบบภูมิคุ้มกันกับการเกิดพยาธิสภาพของโรคไลเคนพลาเนียในช่องปาก	7
3. แสดงการเปรียบเทียบจำนวนของโมโนนิวเคลียร์เซลล์ที่มีการแสดงออกทางอิมมูโนฮิสโตเคมีต่อ TNF- α ก่อนและหลังการรักษาด้วยยาฟลูโอซิโนโลน อะเซทโทไนด์ชนิดขี้ผึ้งความเข้มข้น 0.1%	18
4. แสดงการเปรียบเทียบปริมาณโมโนนิวเคลียร์เซลล์บริเวณลามินา โปรเพรีย ก่อนและหลังการรักษาด้วยยาฟลูโอซิโนโลน อะเซทโทไนด์ชนิดขี้ผึ้ง ความเข้มข้น 0.1%	19
5. แสดงการปรากฏของ TNF- α ในกลุ่มควบคุมผลบวก บริเวณเบซัลเคอราติโนไซต์ (ลูกศร) ใกล้กับรอยโรคมะเร็งในช่องปากชนิดสแควมัสเซลล์คาร์ซิโนมา (200x)	21
6. แสดงกลุ่มควบคุมผลลบของชิ้นเนื้อไลเคนพลาเนียในช่องปากที่ไม่ใส่แอนติบอดีชนิดปฐมภูมิ (200x)	22
7. แสดงกลุ่มของเนื้อเยื่อปกติ (200x)	23
8. a) ลักษณะในช่องปากของผู้ป่วยไลเคนพลาเนียสรายที่ 3 ก่อนการรักษา	24
b) การหายจากรอยโรคไลเคนพลาเนียอย่างสมบูรณ์ในผู้ป่วยรายที่ 3 ภายหลังการรักษาด้วยฟลูโอซิโนโลน อะเซทโทไนด์ชนิดขี้ผึ้ง ความเข้มข้น 0.1% เป็นระยะเวลา 1 เดือน	

ภาพ	หน้า
9. a) แสดงการปรากฏของทิวเมอร์เนค โครซิสแฟกเตอร์-แอลฟา โดยเซลล์อักเสบที่มีนิวเคลียสเดี่ยว (ลูกศร) ในผู้ป่วยไลเคนพลาเนียสในช่องปาก รายที่ 3 ก่อนการรักษา (200x)	25
b) ภายหลังกการรักษาด้วยฟลูโอซิโนโลน อะเซทโทไนด์ชนิดขี้ผึ้ง ความเข้มข้น 0.1% เป็นระยะเวลา 1 เดือน รอยโรคหายสมบูรณ์ ไม่พบการติดสีของทิวเมอร์เนค โครซิสแฟกเตอร์-แอลฟา (200x)	
10. a) ลักษณะในช่องปากของผู้ป่วยไลเคนพลาเนียส รายที่ 9 ก่อนการรักษา	26
b) ลักษณะในช่องปากของผู้ป่วย รายที่ 9 ที่มีการหายของรอยโรคเพียงบางส่วน ภายหลังกการรักษาด้วยฟลูโอซิโนโลน อะเซทโทไนด์ชนิดขี้ผึ้ง ความเข้มข้น 0.1% เป็นระยะเวลา 1 เดือน	
11. a) แสดงการปรากฏของทิวเมอร์เนค โครซิสแฟกเตอร์-แอลฟา โดยเซลล์อักเสบที่มีนิวเคลียสเดี่ยว (ลูกศร) ในผู้ป่วยไลเคนพลาเนียสในช่องปาก รายที่ 9 ก่อนการรักษา (200x)	27
b) แสดงการปรากฏของทิวเมอร์เนค โครซิสแฟกเตอร์-แอลฟา ภายหลังกการรักษาด้วยฟลูโอซิโนโลน อะเซทโทไนด์ชนิดขี้ผึ้ง ความเข้มข้น 0.1% เป็นระยะเวลา 1 เดือน (200x)	
12. แสดงการปรากฏของทิวเมอร์เนค โครซิสแฟกเตอร์-แอลฟา โดยเคอราติโนไซต์ (ลูกศร) ในผู้ป่วยไลเคนพลาเนียสในช่องปาก รายที่ 2, 3, 8 ก่อนการรักษา (200x)	28

รายการสัญลักษณ์

ไลเคนพลาเนียส (Lichen planus) - LP

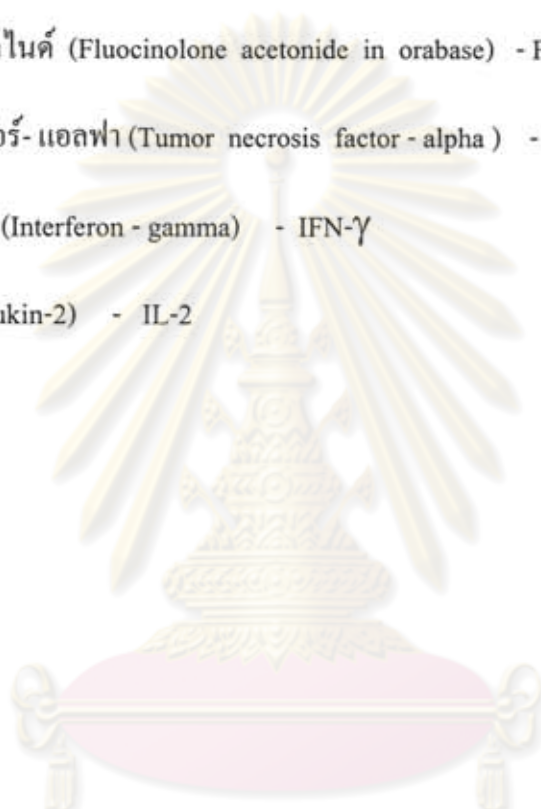
ไลเคนพลาเนียสในช่องปาก (Oral lichen planus) - OLP

ฟลูออซิโนโลน อะเซทโทไนด์ (Fluocinolone acetonide in orabase) - FAO

ทูเมอร์เนคโครซีสแฟกเตอร์-แอลฟา (Tumor necrosis factor - alpha) - TNF- α

อินเตอร์เฟอรอน-แกมมา (Interferon - gamma) - IFN- γ

อินเตอร์ลิวคิน-2 (Interleukin-2) - IL-2



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

ไลเคนพลาแนส (lichen planus) เป็นโรคเรื้อรังชนิดหนึ่งของเยื่อเมือกในช่องปากและผิวหนัง (chronic mucocutaneous disease) อาจพบรอยโรคของไลเคนพลาแนสที่ผิวหนังเพียงอย่างเดียว หรือพบรอยโรคเฉพาะในช่องปาก หรืออาจพบรอยโรคทั้งในช่องปากและผิวหนังได้ ลักษณะรอยโรคในช่องปากมีหลายรูปแบบซึ่งทำให้ผู้ป่วยมีอาการแตกต่างกัน ลักษณะเฉพาะของรอยโรคไลเคนพลาแนสจะเป็นลายเส้นสีขาว ประกอบด้วยตุ่มคัน (papules) เล็กๆ เบียดกันจนแน่นกลายเป็นเส้นสีขาวหนาตัวขึ้นจากเยื่อเมือกปกติ เช็ดดูไม่ออกและอาจปรากฏการอักเสบแดงร่วมด้วยหรือไม่ก็ได้ ผู้ป่วยมักมาพบทันตแพทย์ด้วยอาการระคายเคือง หรือปวดแสบปวดร้อนในช่องปาก รับประทานอาหารรสจัดไม่ได้ บางรายมีอาการเจ็บปวดรุนแรงมีเลือดออก ผู้ป่วยไม่สามารถรับประทานอาหารกลืนหรือพูดได้ตามปกติ ทำให้สุขภาพอ่อนแอลง จากการตรวจและรักษาผู้ป่วยที่มีรอยโรคในช่องปากที่คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พบว่าไลเคนพลาแนสเป็นรอยโรคของเยื่อเมือกที่พบได้บ่อยที่สุดในช่องปาก และรอยโรคที่เกิดขึ้นในช่องปากเป็นระยะเวลานานๆ โดยเฉพาะชนิดแผลถลอก (erosive type) ชนิดฝ่อลีบ (atrophic type) ที่ไม่ได้รับการรักษาหรือไม่ตอบสนองต่อการรักษาจะมีโอกาสเปลี่ยนเป็นมะเร็งในช่องปากได้⁽¹⁻³⁾

แม้ว่าสาเหตุของการเกิดโรคไลเคนพลาแนสยังไม่ทราบแน่ชัด ในปัจจุบันเชื่อว่า ที-ลิมโฟซัยต์ (T-lymphocytes) มีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับการเกิดรอยโรคชนิดนี้ โดยที่มีความผิดปกติเกี่ยวกับกลไกของระบบภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์เป็นสื่อ (cell-mediated immunity) เชื่อว่ามีสารบางชนิดที่ผ่านเข้าไปในเนื้อเยื่อของช่องปากที่เป็นแอนติเจน (antigen) เช่น จุลชีพ อาหาร โลหะหนัก หรือ แอนติเจนของผู้ป่วยเอง (autoantigen) ซึ่งแอนติเจนเหล่านี้จะกระตุ้นให้มีการปลดปล่อยสารซัยโตไคน์จากเซลล์สังเคราะห์เคอราติน (keratinocyte) ส่วนใหญ่พบที-ลิมโฟซัยต์แทรกอยู่ภายในชั้นเยื่อใต้ผิวหนังในรอยโรคไลเคนพลาแนสเป็นชนิด CD8⁺ lymphocytes ร่วมกับการทำลายเซลล์สังเคราะห์เคอราติน (apoptotic keratinocytes) ในบริเวณใกล้เคียง⁽⁴⁻⁶⁾

จากการศึกษาบริเวณรอยโรคจะพบเซลล์นำเสนอแอนติเจน (antigen presenting cells) เป็นจำนวนมากทั้งในชั้นเยื่อผิวและชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวส่งผ่านแอนติเจนให้กับที-ลิมโฟไซต์⁽⁷⁾ เมื่อมีแอนติเจนมากระตุ้นเซลล์เหล่านี้ จะมีการหลั่งคีโมไคน์ (chemokines) ออกมาทำให้เกิดการดึงดูดเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันมาในบริเวณนั้น⁽⁸⁾ เซลล์นำเสนอแอนติเจนจะส่งผ่านแอนติเจนทาง MHC Class II โมเลกุลให้ที-ลิมโฟไซต์ชนิด CD4⁺ T cells (Helper T cell) ส่วนเบซัลเซลล์เคอราติโนไซต์ (basal cell keratinocytes) จะส่งผ่านแอนติเจนทาง MHC Class I โมเลกุล ให้ที-ลิมโฟไซต์ชนิด CD8⁺ T cells หลังจากนั้น CD4⁺ T cells ชนิด T-helper1 เซลล์ (T_H1) จะหลั่งสารไซโตไคน์ชนิด Interleukin-2 (IL-2) และ Interferon-gamma (IFN- γ) ซึ่งจะไปกระตุ้น CD8⁺ T cells ให้หลั่งไซโตไคน์ชนิด Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) ทำให้มีการทำลายเซลล์สังเคราะห์เคอราติน (apoptotic keratinocytes) และเกิดการทำลายเซลล์ในชั้นเบซัลเซลล์ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของรอยโรคไลเคนพลาเนียสขึ้น⁽⁹⁻¹³⁾

รอยโรคที่เกิดการอักเสบจากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์เป็นสื่อ (T cell - mediated inflammatory lesions) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างและหลั่งไซโตไคน์ของเซลล์ชนิด T- helper1 (T_H1) และ T-helper2 (T_H2) โดยที่ T_H1 เซลล์จะผลิตไซโตไคน์ชนิด IFN- γ และ IL-2 ซึ่งจะทำให้เกิดการอักเสบ (proinflammatory cytokines) ในขณะที่ T_H2 เซลล์จะผลิตไซโตไคน์ชนิด IL-4, -5 และ -10 ซึ่งทำหน้าที่ด้านการอักเสบ (anti-inflammatory cytokines)⁽¹⁴⁾ เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงสมดุลของระดับไซโตไคน์ที่ผลิตจาก T_H1 เซลล์และ T_H2 เซลล์จะมีผลกระทบต่อระดับของ TNF- α มีหลายการศึกษาที่อธิบายบทบาทของ TNF- α ในการควบคุมปฏิกิริยาของระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่ง TNF- α เป็นไซโตไคน์แรกที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา T cell-mediated immunopathological reactions และมีบทบาทสำคัญในการควบคุมไซโตไคน์ชนิดอื่น⁽¹⁵⁾ รวมทั้งยังกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ apoptosis และส่งเสริมให้เกิด cytotoxic effect ที่เซลล์บริเวณนั้นด้วย

โรคไลเคนพลาเนียสในช่องปากเป็นโรคเรื้อรังและการบำบัดรักษาให้หายขาดทำได้ยากมาก ในปัจจุบันได้มีการนำยาหลายชนิดมาใช้รักษารอยโรคไลเคนพลาเนียส แต่ยังไม่มียาชนิดใดที่รักษารอยโรคให้หายขาดได้ ส่วนใหญ่เมื่อหยุดยารักษาแล้วรอยโรคมักกำเริบขึ้นมาใหม่ การรักษาจึงมุ่งเน้นบำบัดอาการ

มากกว่าจะเป็นการรักษา มีผู้รายงานการรักษาโรคไลเคนพลาเนียในช่องปากหลายวิธี ยาหลายชนิดได้นำมาใช้รักษารอยโรค สเตียรอยด์เป็นยาที่นิยมใช้กันมากที่สุดชนิดรับประทาน ชนิดฉีด และชนิดทาเฉพาะที่ เพราะมีคุณสมบัติลดการอักเสบและลดอาการเจ็บปวดได้ การให้สเตียรอยด์ชนิดรับประทานมักใช้ในรายที่มีอาการรุนแรงมากเท่านั้น เพราะมีผลข้างเคียงมาก ส่วนการฉีดสเตียรอยด์เข้าไปตรงบริเวณรอยโรคเพื่อรักษาในรายที่เจ็บปวดรุนแรงมักทำให้ผู้ป่วยมีอาการเจ็บปวดมากขึ้นแม้จะได้ผลดีในบางราย ยาสเตียรอยด์ชนิดทาเฉพาะที่ เช่น ยาฟลูโอซิโนโลน อะเซทโทไนด์ชนิดซีฟี่ ความเข้มข้น 0.1% (Fluocinolone acetonide 0.1% in orabase - FAO) นี้เคยนำมาศึกษาวิจัยและใช้รักษารอยโรคไลเคนพลาเนียได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะในรายที่ผู้ป่วยมีอาการเจ็บปวดรุนแรงและเคยรักษาด้วยยาชนิดอื่นไม่ได้ผล ผู้ป่วยมีอาการเจ็บปวดลดลงอย่างรวดเร็วและปลอดภัย ยิ่งไปกว่านั้นจากการติดตามผลการรักษาผู้ป่วยในระยะเวลาานกว่า 15 ปี พบว่าผลการรักษาเป็นที่น่าพอใจ ไม่พบผลข้างเคียงที่เป็นอันตรายร้ายแรง⁽¹⁵⁾ สามารถนำมาใช้รักษารอยโรคไลเคนพลาเนียในช่องปากอย่างมีประสิทธิภาพเมื่อเปรียบเทียบกับสเตียรอยด์ชนิดทาเฉพาะที่ชนิดอื่น⁽¹⁶⁾

ในปัจจุบันการศึกษาถึงสาเหตุและกลไกของภูมิคุ้มกันที่ทำให้เกิดรอยโรคไลเคนพลาเนีย รวมทั้งกลไกการทำงานของยาที่มีผลต่อการลดการอักเสบของรอยโรคยังไม่ทราบแน่ชัด แต่จากรายงานที่ผ่านมาสนับสนุนว่า ไซโตไคน์ที่พบบริเวณรอยโรคจะมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่ทำให้เกิดพยาธิสภาพขึ้น ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของระดับ TNF- α ซึ่งเป็นไซโตไคน์ที่ทำให้เกิดพยาธิสภาพในรอยโรคไลเคนพลาเนีย ก่อนและหลังการรักษาด้วยฟลูโอซิโนโลนอะเซทโทไนด์ ความเข้มข้น 0.1% จึงเป็นการศึกษาที่น่าสนใจ ซึ่งยังไม่มีผู้ใดทำการศึกษาในผู้ป่วยคนไทยมาก่อน ข้อมูลที่ได้ อาจจะมีประโยชน์ในการศึกษาเกี่ยวกับกลไกของการเกิดโรคและแนวทางในการรักษาผู้ป่วยไลเคนพลาเนีย ซึ่งอาจจะนำไปสู่การค้นพบยา immunomodulator ที่เหมาะสมในการรักษารอยโรคนี้ในอนาคต

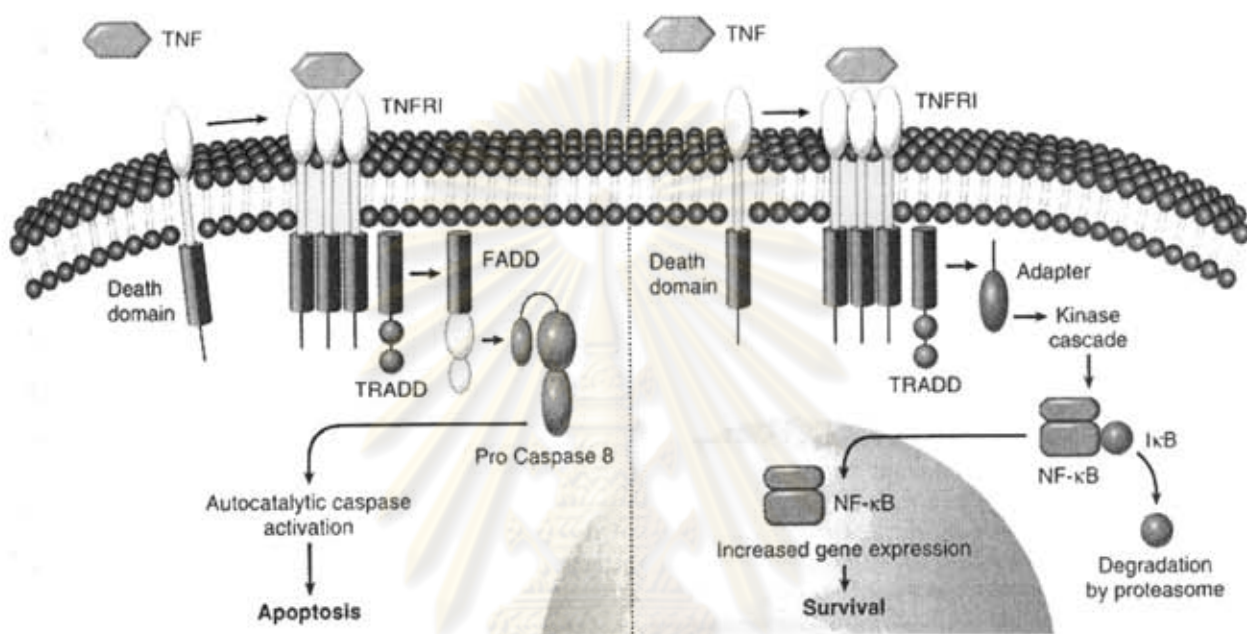
การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Tumor necrosis factor (TNF- α) เป็นซัยโตไคน์ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 17 kDa สร้างจากเซลล์หลายชนิดที่ตอบสนองต่อการอักเสบ, การติดเชื้อ, การบาดเจ็บ และสภาพแวดล้อมอื่นๆที่เกิดขึ้น^(17,18) TNF- α ยังมีบทบาทที่สำคัญในขบวนการอักเสบและตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกัน เช่น มีคุณสมบัติต้านไวรัส ควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ การหายของบาดแผล นอกจากนี้ TNF- α ยังกระตุ้นการเจริญเติบโตของหลอดเลือด (angiogenesis) การละลายตัวของกระดูกและการเพิ่มจำนวนของไฟโบรบลาสต์ (fibroblasts) แต่จะยับยั้งการเจริญและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์สังเคราะห์เคราติน (keratinocytes)⁽¹⁹⁻²¹⁾ ที่สำคัญ TNF- α มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพของโรคมะเร็งเนื้อเยื่อของตัวเองและโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบหลายชนิด ได้แก่ systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, psoriasis และ Crohn's disease⁽²²⁻²⁴⁾ ยิ่งไปกว่านั้น TNF- α ยังเป็นซัยโตไคน์หลักที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยาการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์เป็นสื่อ (T cell-mediated immunity)⁽²⁵⁾ ซึ่งมีความสำคัญในการควบคุมซัยโตไคน์ในรอยโรคไลเคนพลาเนียในช่องปาก⁽¹³⁾

เซลล์หลักที่เป็นแหล่งกำเนิดของ TNF- α คือ activated mononuclear phagocytes ในขณะที่เซลล์หลายชนิดที่ถูกกระตุ้นจะสามารถหลั่ง TNF- α ออกมา ได้แก่ ที และ บี- ลิมโฟไซต์, natural killer cells, เซลล์บุผิวหลอดเลือด (endothelial cells), ไฟโบรบลาสต์, เซลล์แลงเกอร์ฮานส์ (Langerhans cells) และ เซลล์สังเคราะห์เคราติน (keratinocytes) ส่วนตัวกระตุ้นการสร้าง TNF- α ที่สำคัญได้แก่ endotoxin, ไวรัสบางชนิด, immune complexes, neuropeptide, substance P และ interleukin-1 (IL-1)^(13,26)

TNF- α มีบทบาทสำคัญในกระบวนการตอบสนองภูมิคุ้มกัน การอักเสบและ apoptosis ซึ่ง TNF- α จะทำงานโดยการจับกับ receptor ที่จำเพาะ 2 ชนิด คือ type I TNF receptor (TNF-RI) หรือ p55 receptor ที่มีโมเลกุลขนาด 55 กิโลดาลตันและ type II TNF receptor (TNF-RII) หรือ p75 receptor ที่มีโมเลกุลขนาด 75 กิโลดาลตัน^(17, 26) TNF- α จะส่งสัญญาณให้เกิดกระบวนการ apoptosis ได้โดยซัยโตไคน์จะไปเหนี่ยวนำ

receptor และ adaptor protein TRADD (TNFR-adaptor protein with a dead domain) ให้มาจับกับ FADD (Fas-associated protein with a dead domain) เพื่อจะไปกระตุ้น pro-caspase 8 ทำให้เกิด autocatalytic activation ทำให้เกิดการทำลายเซลล์ขึ้น⁽²⁷⁾ (ภาพที่1)



ภาพที่1 แสดงการส่งสัญญาณของ TNF ผ่าน TNF-receptor-mediated signaling และเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ apoptosis (รูปด้านซ้าย) หรือเกิดการกระตุ้น NF-κB แล้วเกิดการตอบสนองต่อการอักเสบ (รูปด้านขวา) (Cotran และคณะ, 1999)

Fig. 1 Apoptosis vs. survival induced by TNF. A model of TNF-receptor-mediated signaling and the induction of apoptosis (left), or NF-κB activation and cell survival signals (right).

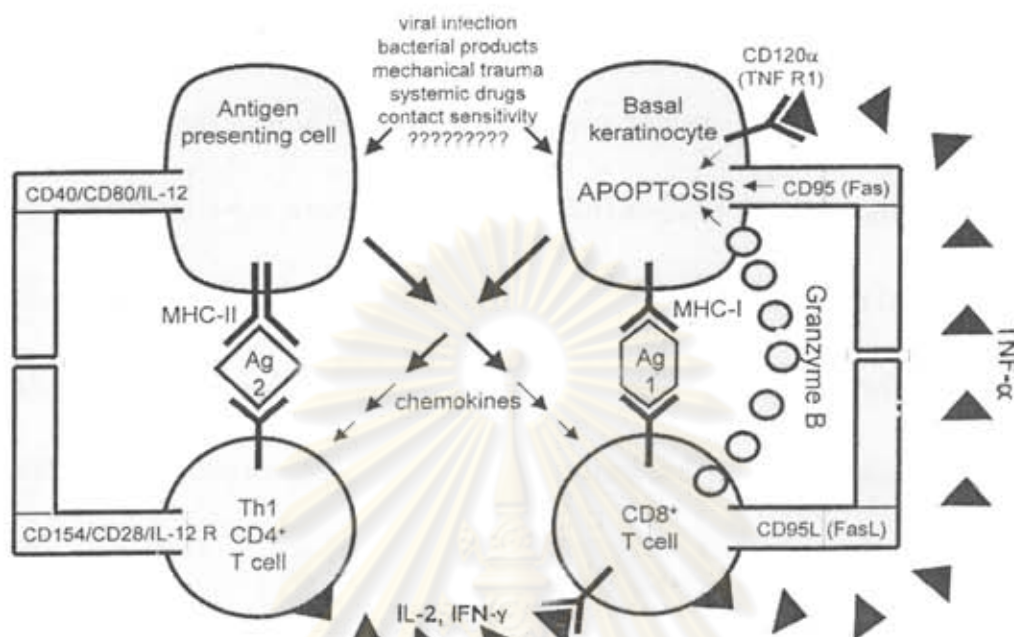
(Cotran et al, 1999)

บทบาทของ TNF- α ในรอยโรคไลเคนพลาเนียในช่องปาก

ไลเคนพลาเนียในช่องปากเป็นโรคที่เกิดจากการอักเสบจากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันชนิด เซลล์เป็นสื่อและมีการสะสมของที-ลิมโฟไซต์ภายในรอยโรค โดยออกมาจากเส้นเลือดขนาดเล็กในบริเวณ นั้นแล้วเคลื่อนที่ไปยังเยื่อผิวของช่องปาก TNF- α มีหน้าที่สำคัญในการทำให้ที-ลิมโฟไซต์มาอยู่บริเวณ รอยโรคโดยทำงานผ่านทาง การเหนี่ยวนำให้มีการเพิ่มการแสดงออกของ CD54 (ICAM-1) adhesion molecule ของเซลล์บุผิวหลอดเลือด (endothelial cells) และเซลล์สังเคราะห์เคอราติน^(28,29) นอกจากนั้นยัง พบว่าการปรากฏของแลงเกอร์ฮานส์เซลล์ที่อยู่ในระยะถูกกระตุ้นเป็นจำนวนมากในชั้นเยื่อผิวในบริเวณ รอยโรค^(30,31) ดังนั้นหลักฐานเหล่านี้จึงสนับสนุนบทบาทของ TNF- α ต่อโมเลกุลบนผิวของเซลล์ สังเคราะห์เคอราติน แลงเกอร์ฮานส์เซลล์และเซลล์บุผิวหลอดเลือด ความสัมพันธ์ของ TNF- α กับกลไก การเกิดพยาธิสภาพของรอยโรคไลเคนพลาเนีย จากรายงานล่าสุดได้แสดงไว้ดังภาพที่ 2⁽³²⁾

จากการศึกษาชิ้นเนื้อ frozen sections ของผู้ป่วยที่มีไลเคนพลาเนียในช่องปากจำนวน 8 ราย พบ การแสดงออกของเซลล์ที่ให้ผลบวกอิมมูโนฮิสโตเคมีของ TNF- α ในทุกเซลล์ที่อยู่ภายในชั้นเยื่อผิวและ พบการติดสีเข้มของเซลล์ที่ให้ผลบวกของ TNF- α ในเซลล์อักเสบที่มีการแทรกซึมในส่วนบนของชั้น ลามินา โปรเพรียของผู้ป่วยทั้ง 8 ราย ในขณะที่เนื้อเยื่อปกติจากผู้ป่วยทั้งหมด 10 ราย ตรวจพบ TNF- α ใน ผู้ป่วยเพียง 3 ราย โดยพบการแสดงออกของเซลล์ที่ให้ผลบวกของ TNF- α เพียงบางเซลล์ที่อยู่ภายในชั้นเยื่อ ผิว⁽³³⁾

Immunopathogenesis of OLP



ภาพที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ของระบบภูมิคุ้มกันกับการเกิดพยาธิสภาพของโรค
ไลเคนพลาเนียสในช่องปาก (Lodi et al, 2005)

Fig. 2 Immunopathogenesis of oral lichen planus (Lodi et al, 2005)

ต่อมาในปี 2000 มีผู้ศึกษาในจีนเนื้อที่ fixed ใน 10% formalin สำหรับ paraffin ในผู้ป่วยที่มีรอยโรคไลเคนพลาเนียสในช่องปาก 22 ราย พบการแสดงออกของเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อ TNF- α ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีในเซลล์ที่อยู่ภายในชั้นเยื่อผิวจากชั้นเบซัลเซลล์ถึงชั้นพาราเคอราติน (parakeratin layer) โดยพบการติดสีเข้มของเซลล์ที่ให้ผลบวกของ TNF- α บริเวณชั้นโพลัสซิมของเคอราติโนซัยต์ในผู้ป่วย 9 ราย ในขณะที่อีก 8 รายพบการติดสีอ่อนถึงปานกลางของเซลล์ที่ให้ผลบวกของเคอราติโนซัยต์ ส่วนรูปแบบการติดสีของเซลล์ที่ให้ผลบวกของ TNF- α มีลักษณะติดสีอ่อนในส่วนล่างของชั้นเยื่อผิว ในขณะที่ส่วนบนของชั้นพริกเกิล (prickle cell layer) ของชั้นเยื่อผิวติดสีเข้มที่สุด ในส่วนชั้นที่มีการแทรกซึมของเซลล์

อีกเสบในรอยโรคไลเคนพลาเนียสพบจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวกของ TNF- α <15% ถึง 40% ในผู้ป่วย 11 ราย ส่วนผู้ป่วยอีก 6 ราย พบจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวกของ TNF- α มากกว่า 40% ในขณะที่เนื้ออกไฟร โบรมา ตรวจไม่พบการแสดงออกของเซลล์ที่ให้ผลบวกอิมมูโนฮิสโตเคมีของ TNF- α ⁽³⁴⁾

นอกจากนั้นในปี 2003 ได้มีศึกษาการแสดงออกของ TNF- α ในชั้นเนื้อ paraffin ในรอยโรคไลเคนพลาเนียสในผู้ป่วย 6 ราย จากการตรวจทางอิมมูโนฮิสโตเคมีด้วย Standard method โดยใช้แอนติบอดีชนิดโมโนโคลนัล แอนติบอดี พบการแสดงออกของเซลล์ที่ให้ผลบวกอิมมูโนฮิสโตเคมีของ TNF- α ในเซลล์โมโนนิวเคลียร์ (mononuclear cells) ที่มีแทรกซึมบริเวณได้ชั้นเยื่อผิวและบริเวณใกล้เคียงกับเบซัลเซลล์ นอกจากนี้พบการติดสีของเบซัลเคอราติโนไซต์ มีลักษณะคล้ายเส้นต่อเนื่อง (continuous band) ในรอยโรคไลเคนพลาเนียส ⁽³⁵⁾

เนื่องจากรอยโรคไลเคนพลาเนียสที่ปรากฏในช่องปากเป็นระยะเวลานาน โดยเฉพาะชนิดถลอกลึก และชนิดผื่นสามารถเปลี่ยนเป็นมะเร็งในช่องปากได้ ^(1,2) มีการศึกษาความสัมพันธ์ของ TNF- α กับมะเร็งในช่องปาก โดยได้ศึกษาขึ้นเนื่องจากผู้ป่วยมะเร็งในช่องปากชนิดสแควมัสเซลล์คาร์ซิโนมา (squamous cell carcinoma) พบการแสดงออกของเซลล์ที่ให้ผลบวกอิมมูโนฮิสโตเคมีของ TNF- α ในเซลล์มะเร็งในช่องปากชนิดสแควมัสเซลล์คาร์ซิโนมา โดยพบการติดสีของเซลล์ที่ให้ผลบวกของ TNF- α บริเวณซัยโตพลาสซึมรอบๆนิวเคลียส (perinuclear cytoplasm) และในบางเซลล์มีการติดสีเข้มกระจายในซัยโตพลาสซึม จากผู้ป่วย 3 รายใน 9 ราย จากกลุ่ม high-grade malignancy ⁽³⁶⁾

การตรวจทางอิมมูโนฮิสโตเคมีด้วยวิธี ABC (Avidin-biotin-peroxidase-complex) โดยใช้แอนติบอดีชนิดโพลีโคลนัล แอนติบอดี พบการแสดงออกของเซลล์ที่ให้ผลบวกอิมมูโนฮิสโตเคมีของ TNF- α ในชั้นเนื้อเหงือกจากผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบในผู้ใหญ่ 9 ราย พบการแสดงออกของเซลล์ที่ให้ผลบวกอิมมูโนฮิสโตเคมีของ TNF- α ในเซลล์เยื่อผิวของร่องเหงือกในชั้นเบซัลเซลล์ ส่วนในชั้นลามินาโพรเพรียพบการแสดงออกของเซลล์ที่ให้ผลบวกของ TNF- α ในเซลล์โมโนไซต์ แมโครฟาจ ไซโตบลาสต์ และเซลล์นิวโทรฟิล ⁽³⁷⁾

จากงานวิจัยที่ผ่านมาเชื่อว่า TNF- α มีความสัมพันธ์กับการเกิดพยาธิสภาพของการเกิดโรคไลเคน
 พลาเนียสในช่องปากแต่ยังไม่เคยมีการศึกษาในผู้ป่วยคนไทยมาก่อน ดังนั้นงานวิจัยนี้จะเป็นการศึกษาแรกที่จะ
 จะแสดงความสัมพันธ์ของกลไกการเกิดโรคในผู้ป่วยไลเคนพลาเนียสในช่องปากคนไทย ซึ่งจะเป็นข้อมูล
 พื้นฐานสำหรับงานวิจัยต่อไปในอนาคต

วิธีการวิจัย

ผู้ป่วยที่มารับการรักษาที่คลินิกเวชศาสตร์ช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์
 มหาวิทยาลัยและกลุ่มงานทันตกรรม โรงพยาบาลสระบุรี ที่ได้รับการวินิจฉัยโรคจากการตรวจทางคลินิก
 และลักษณะทางพยาธิของรอยโรคเป็นโรคไลเคนพลาเนียสในช่องปากจำนวน 18 ราย (ชาย 4 ราย และหญิง
 14 ราย) โดยที่มีอายุระหว่าง 17-67 ปี (เฉลี่ย $39.11 \pm SD 12.3$ ปี) ระยะเวลาของการเกิดโรคระหว่าง 2-84
 เดือน (เฉลี่ย $18.86 \pm SD 22.5$ เดือน) รอยโรคเป็นชนิดดลอกลึก (erosive) จำนวน 12 ราย ชนิดฝ่อลีบ
 (atrophic) จำนวน 6 ราย ผู้ป่วยไม่เคยได้รับการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์ทั้งชนิดรับประทาน หรือชนิดทา
 เฉพาะที่ หรือยาอื่นๆ ในการรักษารอยโรคไลเคนพลาเนียสในช่องปาก หรือหยุดการรักษารอยโรคไลเคน
 พลาเนียสในช่องปากอย่างน้อย 1 เดือน นอกจากนั้นผู้ป่วยไม่มีโรคประจำตัวที่ร้ายแรงและไม่ได้อยู่
 ระหว่างรับประทานยารักษาโรคเป็นประจำ หรือมีวัสดุทางทันตกรรมใดๆ ในช่องปากที่สัมผัสกับรอยโรค
 และสงสัยว่าเป็นรอยโรคคล้ายรอยโรค ไลเคนพลาเนียส ผู้ป่วยได้อ่านและลงชื่อในเอกสารยินยอมเข้าร่วมการ
 ศึกษาวิจัย ซึ่งโครงการวิจัยนี้ได้ผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมในมนุษย์ คณะ
 แพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จากนั้นได้ทำการตรวจในช่องปากผู้ป่วย บันทึกประวัติ ข้อมูลและ
 รายละเอียดของผู้ป่วยในฟอร์มบันทึกข้อมูล

ชิ้นเนื้อของกลุ่มควบคุมจากเนื้อเยื่อปกติได้รับจาก ผศ.ทพ.ดร. พลธรรม ไชยฤทธิ์ ภาควิชา
 วินิจฉัยโรคช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จำนวน 25 ราย (ชาย 17 ราย และ

หญิง 8 ราย) อายุระหว่าง 16-38 ปี อายุเฉลี่ย $27.72 \pm SD 5.05$ ปี (ตารางที่ 1) ซึ่งชั้นเนื้อทั้งหมดนี้
ได้มาระหว่างการผ่าฟันคุดและการทำศัลย์ปริทันต์ ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยและผ่าน
คณะกรรมการจริยธรรมในการวิจัยของมหาวิทยาลัยขอนแก่นแล้ว

ตารางที่ 1 ชนิด จำนวน เพศ อายุ ตำแหน่งของรอยโรค และระยะเวลาของการเกิดโรคของ
ผู้ป่วยไลเคน พลาเนียสในช่องปากและเนื้อเยื่อปกติ

Table 1 Type, number, sex, age, site of lesion and duration in patients with oral lichen
planus and normal mucosa

Groups	Type*	No.	Sex	Age (years)	Site**	Duration (months)
			F:M	Mean \pm SD (range)		Mean \pm SD (range)
OLP	E-LP: A-LP	12:6	14:4	39.11 \pm 12.3 (17-67)	B=16 P=2 G=6 L=1 T=4 M=3	18.86 \pm 22.5 (1-84)
Normal mucosa	-	25	17:8	21.72 \pm 5.05 (16-38)	R=23 L=1 T=1	-

* E-LP = Erosive lichen planus A-LP = Atrophic lichen planus

**B = buccal mucosa

T = tongue

M = mucobuccal fold

F = floor of the mouth

G = gingival

R = retromolar area

P = palate

L = labial mucosa

Some patients had the lesions in more than one anatomical site.

การเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อ

ทำการเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อจากผู้ป่วยไลเคนพลาเนียสในช่องปาก โดยฉีดยาชาเฉพาะที่บริเวณรอยโรค และทำการตัดชิ้นเนื้อด้วยวิธี Punch biopsy ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เมื่อตัดชิ้นเนื้อออกมาแล้วได้นำไปแช่ไว้ในภาชนะที่บรรจุฟอร์มาลินความเข้มข้น 10% ทำการห้ามเลือดด้วยผ้าก๊อชสะอาด ปราศจากเชื้อตรงบริเวณที่ตัดชิ้นเนื้อและส่งชิ้นเนื้อไปยังภาควิชาทันตพยาธิวิทยาทันที หลังจากนั้นจ่ายยา ฟลูโอซิโนโลน อะเซทโทไนด์ชนิดขี้ผึ้งความเข้มข้น 0.1% ให้ผู้ป่วยทาบริเวณรอยโรค วันละ 3 ครั้ง เป็นเวลา 1 เดือน แล้วนัดผู้ป่วยกลับมาตัดชิ้นเนื้อตำแหน่งเดิมอีกครั้งหลังจากครั้งแรกเป็นระยะเวลา 1 เดือน

เกณฑ์การหายของรอยโรค

วินิจฉัยจากการตรวจทางคลินิกใช้เกณฑ์ของ Thongprasom และคณะ (2003) และอาการของผู้ป่วย ดังนี้

การหายอย่างสมบูรณ์ (Complete remission- CR): รอยโรคจะหายไปหมดหรือปรากฏลายเส้นสีขาวจาง และผู้ป่วยไม่มีอาการ

การหายเพียงบางส่วน (Partial remission- PR): รอยโรคเหลือสีขาวจางและมีรอยแดงเล็กน้อย ผู้ป่วยมีอาการลดลง

รอยโรคไม่ตอบสนองต่อการรักษา (No response- NR): รอยโรคไม่ดีขึ้นหรือเลวลงกว่าเดิม ผู้ป่วยยังคงมีอาการ

การตรวจด้วยวิธีการทางอิมมูโนฮิสโตเคมี

นำตัวอย่างชิ้นเนื้อที่แช่ใน 10% ฟอร์มาลินแล้วใส่ลงในบล็อกพาราฟิน แล้วนำมาตัดชิ้นเนื้อด้วยเครื่องตัด microtome ในห้องปฏิบัติการตรวจสอบชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา โดยตัดที่ความหนา 5 ไมครอน แล้วนำมาติดบนสไลด์แก้วที่สะอาดและได้รับการเคลือบสารยึดติดเนื้อเยื่อ (adhesive) ซึ่งได้เตรียมไว้

ล่วงหน้า ซ้อมตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ได้ตัดและวางบนแผ่นสไลด์แก้ว แล้วตรวจด้วยวิธีทางอิมมูโนฮิสโตเคมี โดยจัดสไลด์แก้วออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มทดลองซึ่งเป็นชิ้นเนื้อไลเคนพลาเนียสในช่องปาก กลุ่มควบคุมผลบวกโดยใช้ชิ้นเนื้อใกล้กับรอยโรคมะเร็งในช่องปากชนิดสแควมัสเซลล์คาร์ซิโนมา (Squamous cell carcinoma) และกลุ่มควบคุมผลลบโดยใช้ชิ้นเนื้อไลเคนพลาเนียสในช่องปากที่ไม่ใช่ primary antibody กำจัดพาราฟินแล้วทำการแช่ตำแหน่งการจดจำของแอนติบอดีบนสายโปรตีน (antigen retrieval) ด้วยการใช้หม้อต้ม waterbath ให้ความร้อนกับสไลด์แก้วใน 0.01 M Sodium citrate buffer (pH 6.0) โดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 50 นาที หลังจากนั้นนำสไลด์มาแช่ลงใน 2% methanol peroxide เป็นเวลา 10 นาที เพื่อกำจัด endogenous peroxidase จากนั้นใส่ Goat anti-human TNF- α antibody (Polyclonal, 1:50, Santa Cruz Biotechnology, USA) ด้วย 1.5% normal blocking serum in PBS เก็บไว้ใน moist chamber ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน (overnight incubation) สำหรับกลุ่มควบคุมผลลบทำการทดลองในลักษณะเดียวกัน โดย primary antibody จะถูกแทนที่ด้วย PBS แล้วนำสไลด์แก้วมาล้างใน Phosphate buffered saline (PBS) จากนั้นใส่ Biotinylated secondary antibody เก็บใน moist chamber ที่อุณหภูมิห้อง 60 นาทีหลังจากล้างด้วย PBS แล้วใส่ Avidin-Biotinylated HRP enzyme เก็บใน moist chamber ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วล้างด้วย PBS จากนั้นใส่ Peroxidase substrate 10 นาที นำสไลด์มาย้อมทับ (counter stain) ด้วยสีฮีมาทอกไซลิน และปิดด้วย cover slip

หลังจากนั้นทำการประเมินปริมาณของการติดสี (stained cells) โดยอ่านผลและบันทึกข้อมูลด้วยการถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงขาวโดยมีเกณฑ์ดังนี้

การเลือกตำแหน่งชิ้นเนื้อที่นับเซลล์

การเลือกตำแหน่งชิ้นเนื้อที่จะนับเซลล์บริเวณรอยต่อของเยื่อบุผิวกับเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของชิ้นเนื้อผู้ป่วยละ 4 ตำแหน่ง คือบริเวณซ้ายสุด 1 ตำแหน่ง กลาง 2 ตำแหน่ง และขวาสุด 1 ตำแหน่ง และทำการถ่ายภาพโดยใช้ objective เลนส์ ที่กำลังขยาย 40 เท่า และถ่ายภาพโดยผ่านเลนส์อีกตัวที่มีกำลังขยาย 5 เท่า ทำให้กำลังขยายทั้งหมด 200 เท่า (original magnification)

การนับจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อ TNF- α ในเนื้อเยื่อ

การแสดงออกของเซลล์ที่ให้ผลบวกทางอิมมูโนฮิสโตเคมีต่อ TNF- α คือเซลล์ที่ติดสีเข้มบริเวณนิวเคลียส (nucleus) และ/ หรือ ไซโตพลาสซึม (cytoplasm) และ/หรือผนังเซลล์เมมเบรน (cell membrane) โดยนับอย่างต่ำ 400 เซลล์/คน โดยทำการศึกษาซ้ำ 3 ครั้ง

การนับเซลล์ที่ให้ผลบวก

เซลล์ที่มีการติดสีน้ำตาลเข้มที่บริเวณนิวเคลียส และ/หรือไซโตพลาสซึม และ/หรือผนังเซลล์เมมเบรนของเซลล์ที่อยู่ในบริเวณรอยโรค ได้แก่ เคอราติโนไซต์และโมโนนิวเคลียร์เซลล์ โดยนับทั้งแมโครฟาจและลิมโฟไซต์ที่บริเวณรอยโรคไลเคนพลาเนียส รวมกันเป็น โมโนนิวเคลียร์เซลล์ตามการศึกษาของ Sklavounou และคณะ (2000)⁽³⁴⁾

การวิเคราะห์ข้อมูล

จากนั้นทำการนับเซลล์ที่ติดสีน้ำตาลและ โมโนนิวเคลียร์เซลล์ทั้งหมดที่ไม่ติดสี ทั้งก่อนและหลังการรักษา แล้วนำมาเปรียบเทียบกันโดยใช้สถิติเชิงพรรณนาและใช้สถิติ Matched-pairs t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.05$

การเปรียบเทียบเซลล์ที่ติดสีก่อนและหลังการรักษากับกลุ่มควบคุมใช้สถิติ Independent-sample t test ที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.05$

ผลของการวิจัย

พบว่ามีการแสดงออกทางอิมมูโนฮิสโตเคมีต่อ TNF- α ในผู้ป่วยไลเคนพลาเนียสในช่องปากก่อน ทำการรักษา 16 ใน 18 ราย (88.89%) ส่วนใหญ่เป็นการแสดงออกทางอิมมูโนฮิสโตเคมีในโมโนนิวเคลียร์เซลล์ ภายหลังการรักษาด้วยยาฟลูโอซิโนโลน อะเซทโทไนด์ ชนิดขี้ผึ้ง 0.1% เป็นเวลา 1 เดือน พบว่าผู้ป่วยมีการหายเพียงบางส่วน (partial remission) 17 ราย และมีการหายอย่างสมบูรณ์ (complete remission) 1 ราย การแสดงออกทางอิมมูโนฮิสโตเคมีต่อ TNF- α ในโมโนนิวเคลียร์เซลล์ก่อนรักษาด้วยยาฟลูโอซิโนโลน อะเซทโทไนด์ ชนิดขี้ผึ้ง 0.1% เป็นเวลา 1 เดือน (ค่าเฉลี่ย 7.06 ± 5.01 เซลล์) สูงกว่าภายหลังการรักษา (ค่าเฉลี่ย 1.44 ± 1.76 เซลล์) เช่นเดียวกับปริมาณโมโนนิวเคลียร์เซลล์บริเวณลามินา โพรเพรีย ก่อนการรักษาด้วยยาฟลูโอซิโนโลน อะเซทโทไนด์ ชนิดขี้ผึ้ง 0.1% เป็นเวลา 1 เดือน (ค่าเฉลี่ย 188.06 ± 50.98 เซลล์) มากกว่าภายหลังการรักษา (ค่าเฉลี่ย 93.56 ± 42.96 เซลล์) ดังตารางที่ 2 การแสดงออกทางอิมมูโนฮิสโตเคมีต่อ TNF- α ต่อเคอราติโนซัยต์พบ 10 ราย (55.56%) โดยพบการแสดงออกทางอิมมูโนฮิสโตเคมีก่อนรักษาด้วยยาฟลูโอซิโนโลน อะเซทโทไนด์ ชนิดขี้ผึ้ง 0.1% เป็นเวลา 1 เดือน จำนวน 8 ราย มีค่าเฉลี่ยค่าเฉลี่ย 1.11 ± 1.75 เซลล์ สูงกว่าภายหลังการรักษาซึ่งพบการแสดงออกทางอิมมูโนฮิสโตเคมีลดลงเหลือเพียง 3 ราย แต่เพิ่มขึ้นมาใหม่อีกจำนวน 2 ราย (ค่าเฉลี่ย 0.72 ± 1.87 เซลล์) ดังตารางที่ 3 เมื่อเปรียบเทียบจำนวนของโมโนนิวเคลียร์เซลล์ที่มีการแสดงออกทางอิมมูโนฮิสโตเคมีต่อ TNF- α ก่อนและหลังการรักษาด้วยยาฟลูโอซิโนโลน อะเซทโทไนด์ชนิดขี้ผึ้ง ความเข้มข้น 0.1% พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.000$) (ภาพที่ 3) เมื่อเปรียบเทียบจำนวนโมโนนิวเคลียร์เซลล์บริเวณลามินา โพรเพรีย ก่อนและหลังการรักษาด้วยยาฟลูโอซิโนโลน อะเซทโทไนด์ชนิดขี้ผึ้ง ความเข้มข้น 0.1% พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.000$) (ภาพที่ 4)

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนของโมโนนิวเคลียร์เซลล์ที่มีการแสดงออกทางอิมมูโนฮิสโตเคมีต่อ TNF- α และปริมาณโมโนนิวเคลียร์เซลล์บริเวณลามินา โปรเพรีย ก่อนและหลังการรักษาด้วยยาฟลูโอซิโนโลน อะเซทโทไนด์ชนิดขี้ผึ้ง ความเข้มข้น 0.1% ที่กำลังขยายขนาด 200 เท่า

Table 2 Number of TNF- α positive mononuclear cells and mononuclear cells count in lamina propria before and after treatment with FAO 0.1% (200x)

No	Before treatment			After treatment		
	Type	No. of positive mononuclear cells (range)	Mononuclear cells count	† Clinical Evaluation	No. of positive mononuclear cells (range)	Mononuclear cells count
1	E-LP	7 (4-10)	246	PR	3 (1-6)	108
2	E-LP	7 (5-9)	244	PR	3 (0-8)	95
3	A-LP	7 (4-9)	207	CR	0	32
4	A-LP	5 (3-9)	211	PR	2 (0-5)	123
5	E-LP	2 (1-2)	209	PR	0	104
6	E-LP	7 (3-9)	213	PR	4 (0-6)	71
7	E-LP	12 (9-14)	136	PR	0	39
8	A-LP	8 (6-12)	200	PR	3 (0-5)	117
9	E-LP	14 (5-24)	128	PR	2 (1-3)	102
10	E-LP	0	280	PR	0	188
11	E-LP	16 (12-21)	222	PR	6 (2-9)	72
12	E-LP	7 (6-7)	117	PR	1 (1-3)	29
13	A-LP	4 (1-9)	194	PR	0	104
14	A-LP	8 (7-10)	92	PR	1 (0-3)	46
15	E-LP	4 (2-6)	226	PR	0	93
16	A-LP	17 (5-23)	142	PR	0	131
17	E-LP	0	167	PR	0	160
18	E-LP	2 (0-4)	151	PR	1 (0-3)	70
Total	E-LP=12	mean±SD	mean±SD	CR=1	mean±SD	mean±SD
18	A-LP=6	7.06±5.01	188.06±50.98	PR=17	1.44±1.76	93.56±42.96

† PR = Partial remission

CR = Complete remission

ตารางที่ 3 แสดงจำนวนของ เคอราตินocytes มีการแสดงออกทางอิมมูโนฮิสโตเคมีต่อ TNF- α ก่อนและหลังการรักษาด้วยยาฟลูโอซิโนโลน อะเซทโทไนด์ชนิดขี้ผึ้ง ความเข้มข้น 0.1% ที่กำลังขยายขนาด 200 เท่า

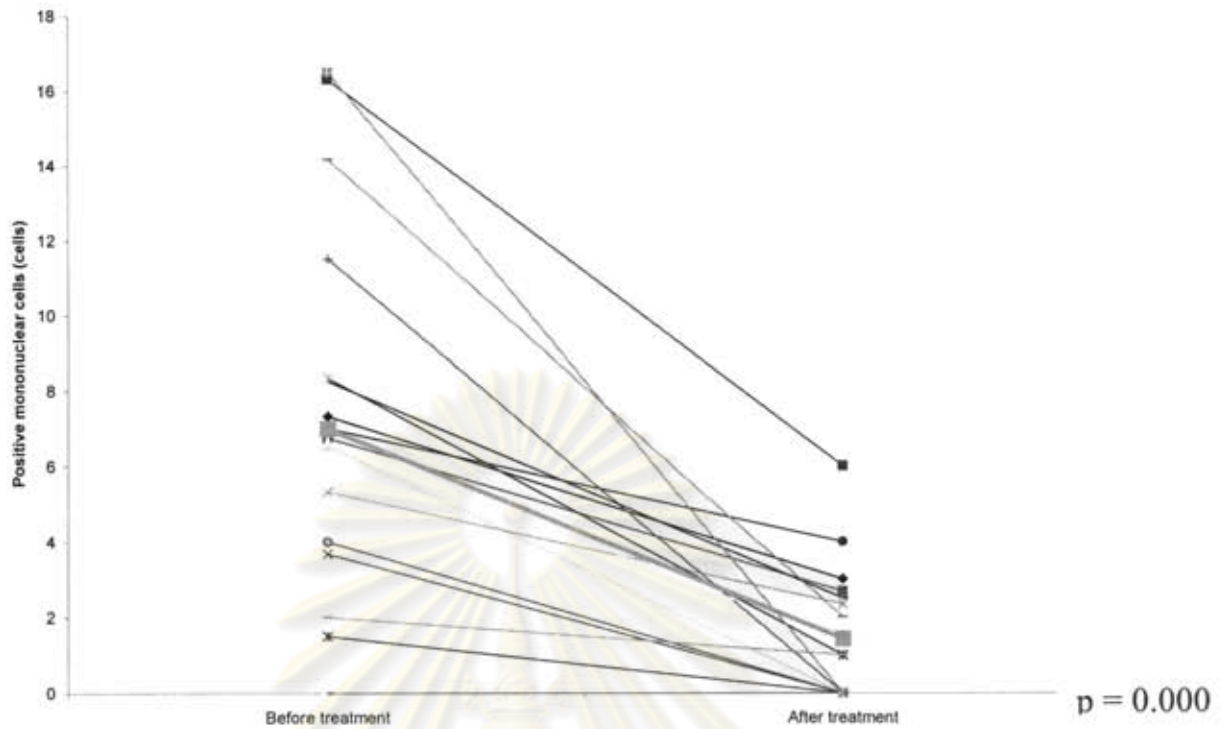
Table 3 Number of TNF- α positive keratinocytes before and after treatment with FAO 0.1 % (200x)

No	Before treatment			After treatment		
	Type	Positive keratinocytes (cells)	(Range) cells	Clinical Evaluation	Positive keratinocytes (cells)	(Range) cells
1	E-LP	0	0	PR	0	0
2	E-LP	1	(0-3)	PR	0	0
3	A-LP	3	(2-5)	CR	0	(0-1)
4	A-LP	0	0	PR	0	0
5	E-LP	0	0	PR	0	0
6	E-LP	0	0	PR	0	0
7	E-LP	1	(0-2)	PR	0	0
8	A-LP	0	0	PR	2	(1-3)
9	E-LP	1	(0-2)	PR	0	0
10	E-LP	0	0	PR	0	0
11	E-LP	0	0	PR	0	0
12	E-LP	6	(0-14)	PR	4	(0-12)
13	A-LP	0	0	PR	7	(0-16)
14	A-LP	0	0	PR	0	0
15	E-LP	3	(0-10)	PR	0	0
16	A-LP	4	(2-6)	PR	0	0
17	E-LP	0	0	PR	0	0
18	E-LP	1	(0-4)	PR	0	0
Total	ELP=12			CR=1		
18	A-LP=6	Mean \pm SD=1.11 \pm 1.75	(0-14)	PR=17	Mean \pm SD=0.72 \pm 1.87	(0-7)

ตารางที่ 4 แสดงจำนวนของแสดงจำนวนของโมโนนิวเคลียร์เซลล์/เคอราติโนไซต์ที่มีการแสดงออกทางอิมมูโนฮิสโตเคมีต่อ TNF- α และปริมาณ โมโนนิวเคลียร์เซลล์/ เคอราติโนไซต์ในเนื้อเยื่อปกติ ที่กำลังขยายขนาด 200 เท่า

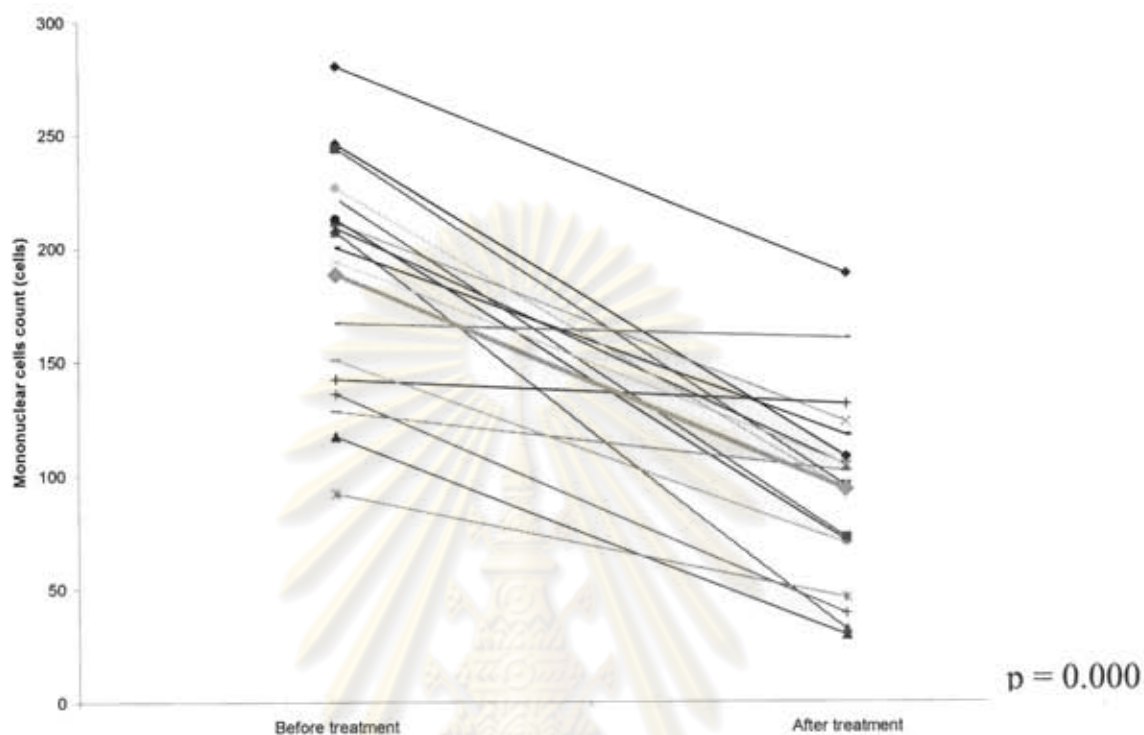
Table 4 Number of TNF- α positive mononuclear cells / keratinocytes and number of mononuclear cells / keratinocytes in normal mucosa (200x)

No	Normal mucosa			
	No of positive mononuclear cell	Mononuclear cell count	No of positive keratinocyte	Keratinocyte count
1	1	35	0	71
2	0	33	0	56
3	0	44	0	73
4	0	26	0	65
5	0	34	0	42
6	2	23	0	71
7	0	25	0	86
8	0	34	0	93
9	0	17	0	93
10	0	25	0	89
11	0	21	0	61
12	0	30	0	75
13	0	27	0	79
14	0	33	0	72
15	0	27	0	104
16	0	17	0	83
17	0	28	0	103
18	0	18	0	87
19	0	13	0	71
20	0	28	0	81
21	0	20	0	83
22	0	15	0	90
23	0	16	0	62
24	0	28	0	68
25	0	22	0	72
Total				
25	Mean \pm SD=1.50 \pm 0.71	Mean \pm SD=25.56 \pm 7.53	Mean \pm SD=0	Mean \pm SD=77.20 \pm 14.51



ภาพที่ 3 แสดงการเปรียบเทียบจำนวนของโมโนนิวเคลียร์เซลล์ที่มีการแสดงออกทางภูมิโมโนฮิสโตเคมี ต่อ TNF- α ก่อนและหลังการรักษาด้วยยาฟลูโอซิโนโลน อะเซทโทไนด์ชนิดขี้ผึ้ง ความเข้มข้น 0.1%

Fig. 3 Comparison of positive mononuclear cells in lamina propria between before and after treatment with FAO 0.1% in orabase



ภาพที่ 4 แสดงการเปรียบเทียบจำนวน โมโนนิวเคลียร์เซลล์บริเวณลามินา โพรเพรีย ก่อนและหลังการ รักษาด้วยยาฟลูโอซิโนโลน อะเซทโทไนด์ชนิดขี้ผึ้ง ความเข้มข้น 0.1%

Fig. 4 Comparison of the number of mononuclear cells in lamina propria between before and after treatment with FAO 0.1% in orabase

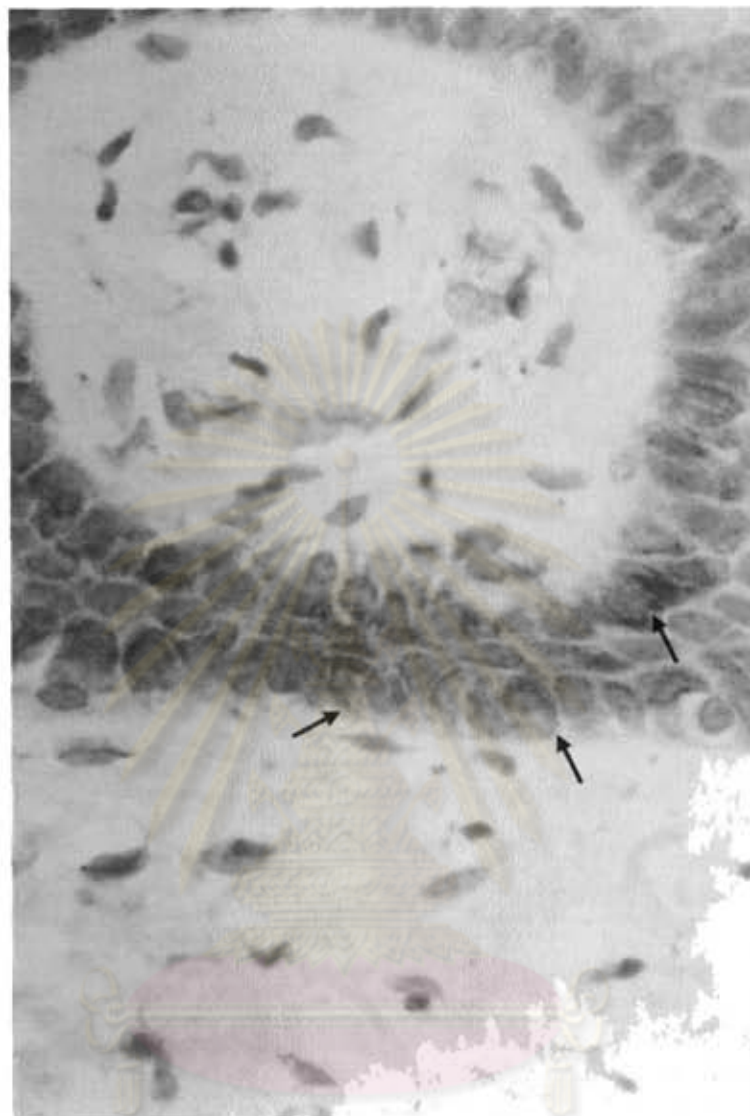
เมื่อเปรียบเทียบผู้ป่วยที่มีการแสดงออกทางอิมมูโนฮิสโตเคมี ในรอยโรคไลเคนพลาเนียในช่องปากก่อนการรักษา กับกลุ่มควบคุมเนื้อเยื่อปกติ พบการแสดงออกทางอิมมูโนฮิสโตเคมีต่อ TNF- α ในกลุ่มควบคุมเนื้อเยื่อปกติ 2 ใน 25 ราย โดยพบว่าการติดสีที่โมโนนิวเคลียร์เซลล์ปริมาณน้อยเพียง 1-2 เซลล์เท่านั้นและไม่พบการติดสีที่บริเวณเคอราติโนซัยต์ทุกราย (ตารางที่ 4) จากการวิเคราะห์ทางสถิติ การแสดงออกทางอิมมูโนฮิสโตเคมีต่อ TNF- α ในโมโนนิวเคลียร์เซลล์ของรอยโรคไลเคนพลาเนียในช่องปากก่อนการรักษาสูงกว่ากลุ่มเนื้อเยื่อปกติแตกต่างที่ระดับนัยสำคัญ ($p = 0.000$)

การแสดงออกทางอิมมูโนฮิสโตเคมีต่อ TNF- α ในกลุ่มควบคุมผลบวกปรากฏที่บริเวณเบซัลเคอราติโนซัยต์ (ภาพที่ 5) ในเนื้อเยื่อรอยโรคมะเร็งในช่องปากชนิดสแควมัสเซลล์คาร์ซิโนมา (squamous cell carcinoma) กลุ่มควบคุมผลลบของชิ้นเนื้อไลเคนพลาเนียในช่องปากที่ไม่ได้ primary antibody และกลุ่มควบคุมของเนื้อเยื่อปกติ (normal mucosa) ไม่แสดงการติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีต่อ TNF- α (ภาพที่ 6, 7)

ลักษณะในช่องปากของผู้ป่วยไลเคนพลาเนียรายที่ 3 ก่อนการรักษา และรอยโรคไลเคนพลาเนียที่หายอย่างสมบูรณ์ ภายหลังจากการรักษาด้วยฟลูออซิโนโลน อะเซทโทไนด์ชนิดขี้ผึ้ง ความเข้มข้น 0.1% เป็นระยะเวลา 1 เดือน แสดงไว้ในภาพที่ 8 a, b การปรากฏของทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์-แอลฟา โดยเซลล์อักเสบที่มีนิวเคลียสเดี่ยว ในผู้ป่วยไลเคนพลาเนียในช่องปากก่อนการรักษาและภายหลังจากการรักษาด้วยฟลูออซิโนโลน อะเซทโทไนด์ชนิดขี้ผึ้ง ความเข้มข้น 0.1% เป็นระยะเวลา 1 เดือน รอยโรคหายสมบูรณ์ ไม่พบการติดสีของทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ – แอลฟา (ภาพที่ 9 a, b)

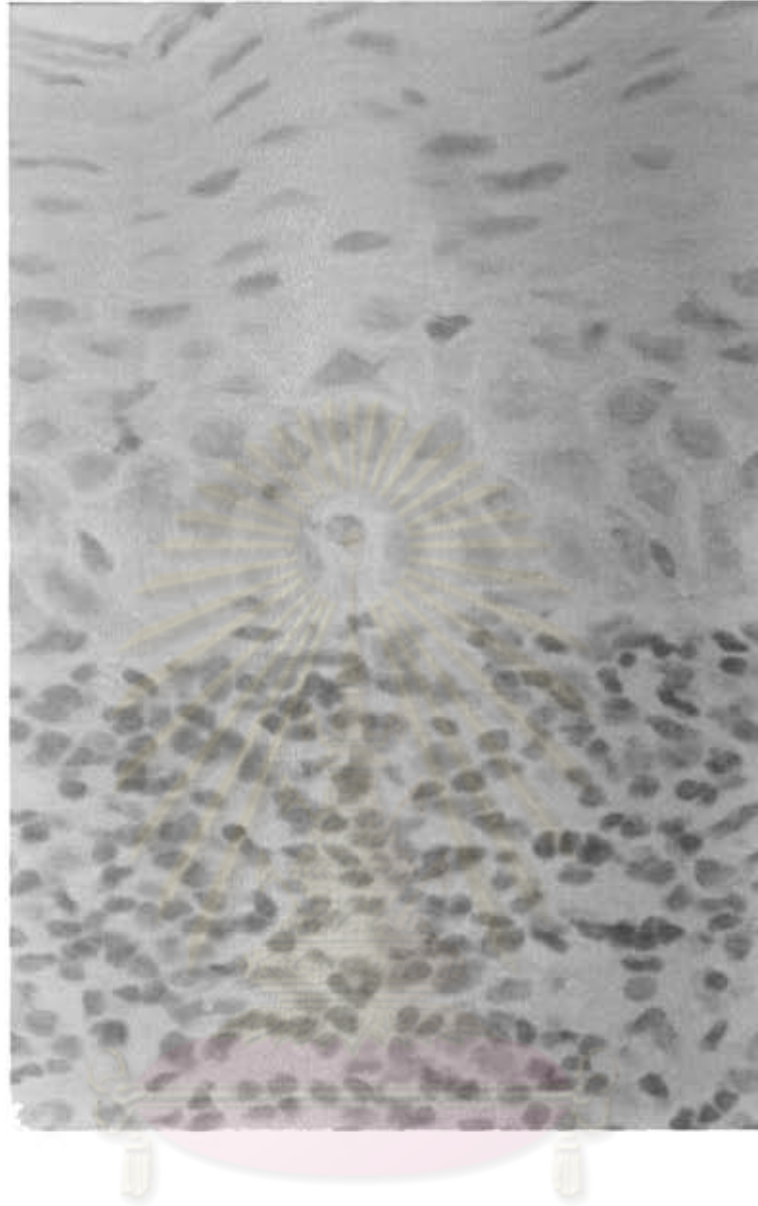
ลักษณะในช่องปากและการปรากฏของทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์-แอลฟา โดยเซลล์อักเสบที่มีนิวเคลียสเดี่ยวของผู้ป่วยไลเคนพลาเนียรายที่ 9 ที่มีการหายของรอยโรคเพียงบางส่วน ก่อนการรักษาและภายหลังจากการรักษาด้วยฟลูออซิโนโลน อะเซทโทไนด์ชนิดขี้ผึ้ง ความเข้มข้น 0.1% เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ (ภาพที่ 10 a, b และ 11 a, b)

นอกจากนี้พบการแสดงออกทางอิมมูโนฮิสโตเคมีต่อ TNF- α ที่บริเวณเคอราติโนซัยต์เพียง 2-3 เซลล์ ในผู้ป่วย 3 ราย แสดงไว้ในภาพที่ 12



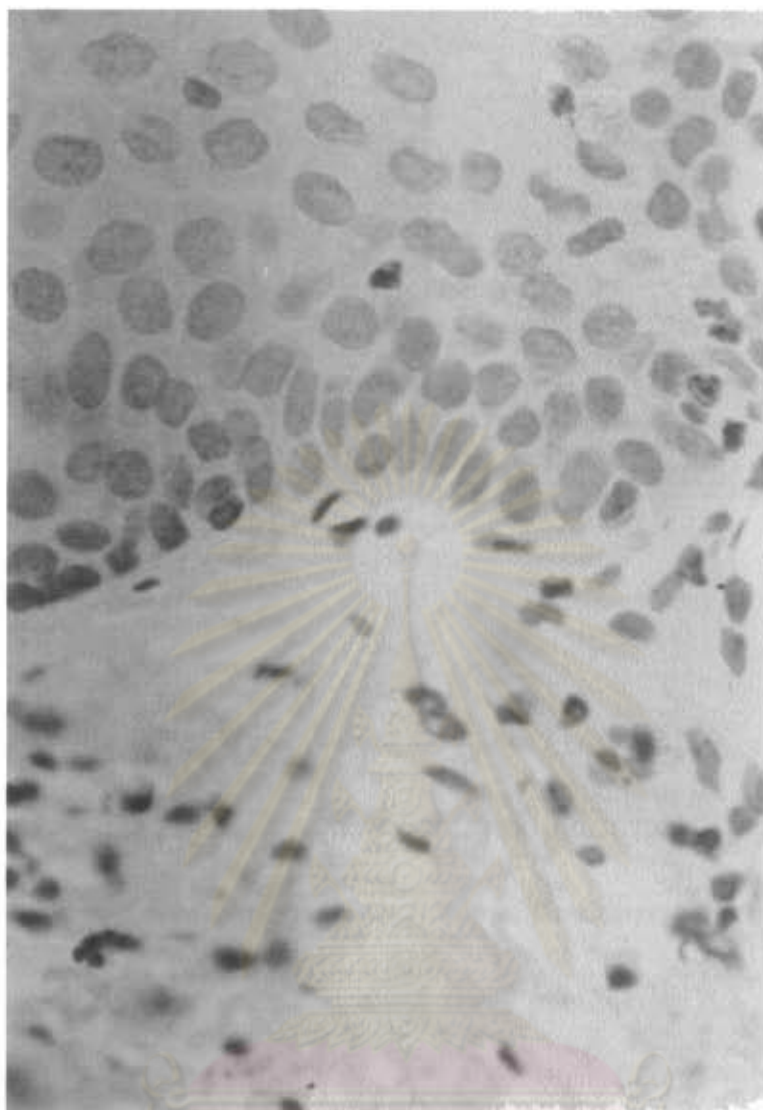
ภาพที่ 5 แสดงการปรากฏของ TNF- α ในกลุ่มควบคุมผลบวก บริเวณเบซัลเคอราติโนไซต์ (ลูกศร) ใกล้กับรอยโรคมะเร็งในช่องปากชนิดสแควมัสเซลล์คาร์ซิโนมา (squamous cell carcinoma) (200x)

Fig. 5 TNF- α was expressed by basal keratinocytes (arrows) adjacent to squamous cell carcinoma in positive control tissue (200x)



ภาพที่ 6 แสดงกลุ่มควบคุมผลลบของชิ้นเนื้อไลเคนพลาเนียในช่องปากที่ไม่ใส่ primary antibody (200x)

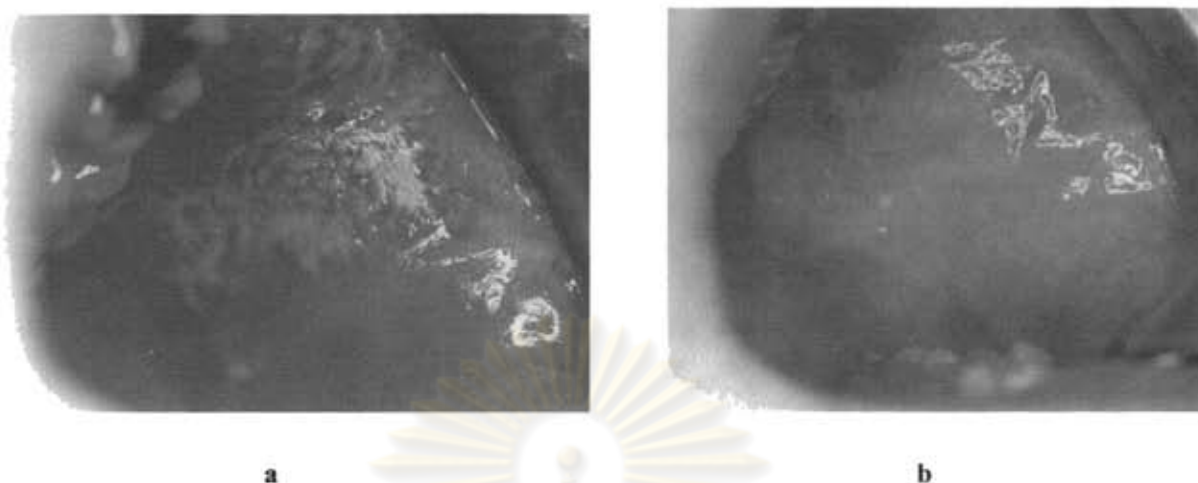
Fig. 6 Negative control tissue in oral lichen planus without primary antibody (200x)



ภาพที่ 7 แสดงกลุ่มของเนื้อเยื่อปกติ (normal mucosa) (200x)

Fig. 7 Normal mucosal tissue (200x)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



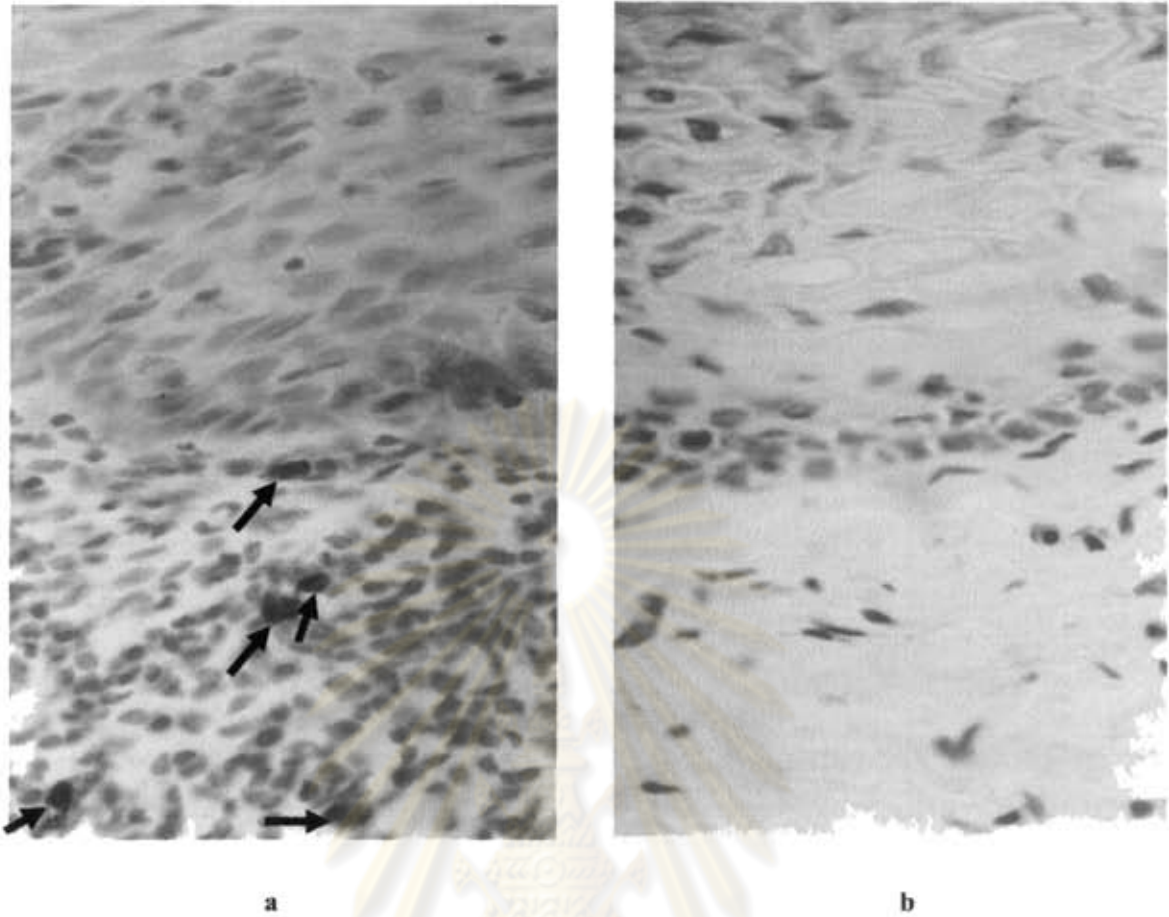
ภาพที่ 8 a) ลักษณะในช่องปากของผู้ป่วยไลเคนพลาเนียสรายที่ 3 ก่อนการรักษา

b) การหายจากรอยโรคไลเคนพลาเนียสอย่างสมบูรณ์ในผู้ป่วยรายที่ 3 ภายหลังจากการรักษาด้วยฟลูโอซิโนโลน อะเซทโทไนด์ชนิดซีฟี่ ความเข้มข้น 0.1% เป็นระยะเวลา 1 เดือน

Fig. 8 a) Oral manifestations of OLP in case 3 before treatment

b) Complete remission in case 3 after treatment with FAO 0.1% in orabase for 1 month

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

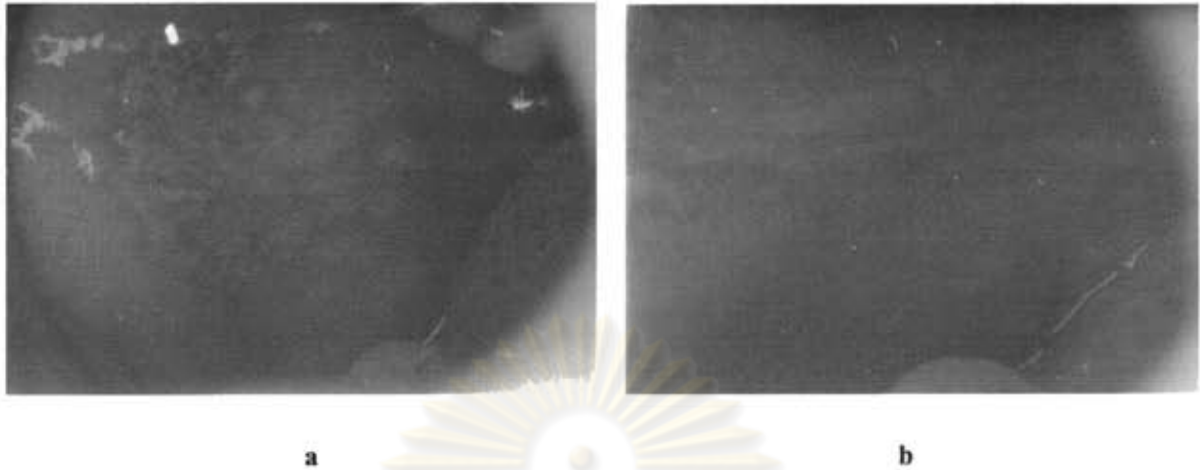


ภาพที่ 9 a) แสดงการปรากฏของทูเมอร์เนค โครซิสแพกเตอร์-แอลฟา โดยเซลล์อักเสบที่มีนิวเคลียสเดี่ยว (ลูกศร) ในผู้ป่วยไลเคนพลาเนียในช่องปากรายที่ 3 ก่อนการรักษา (200x)

b) ภายหลังกการรักษาด้วยฟลูออซิโนโลน อะเซทโทไนด์ชนิดขี้ผึ้ง ความเข้มข้น 0.1% เป็นระยะเวลา 1 เดือน รอยโรคหายสมบูรณ์ ไม่พบการติดสีของทูเมอร์เนค โครซิสแพกเตอร์-แอลฟา (200x)

Fig. 9 a) The expression of TNF- α by inflammatory mononuclear cells (arrows) in oral lichen planus in case 3 before treatment (200x)

b) No expression of TNF- α in case 3 with complete remission after treatment with FAO 0.1% in orabase for 1 month (200x)



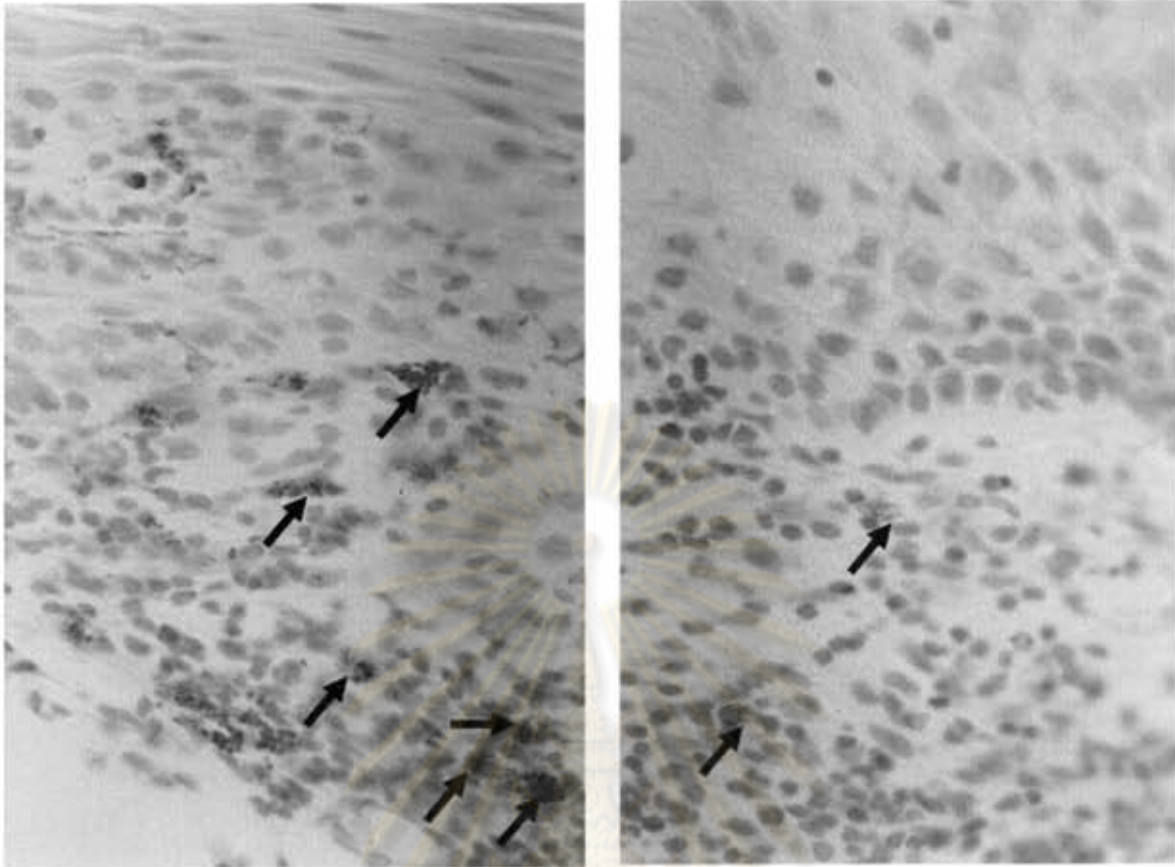
ภาพที่ 10a) ลักษณะในช่องปากของผู้ป่วยไลเคนพลาเนียสรายที่ 9 ก่อนการรักษา

b) ลักษณะในช่องปากของผู้ป่วยรายที่ 9 ที่มีการหายของรอยโรคเพียงบางส่วน ภายหลังการรักษาด้วยฟลูโอซิโนโลน อะเซทโทไนด์ชนิดขี้ผึ้ง ความเข้มข้น 0.1% เป็นระยะเวลา 1 เดือน

Fig. 10 a) Oral manifestations of OLP in case 9 before treatment

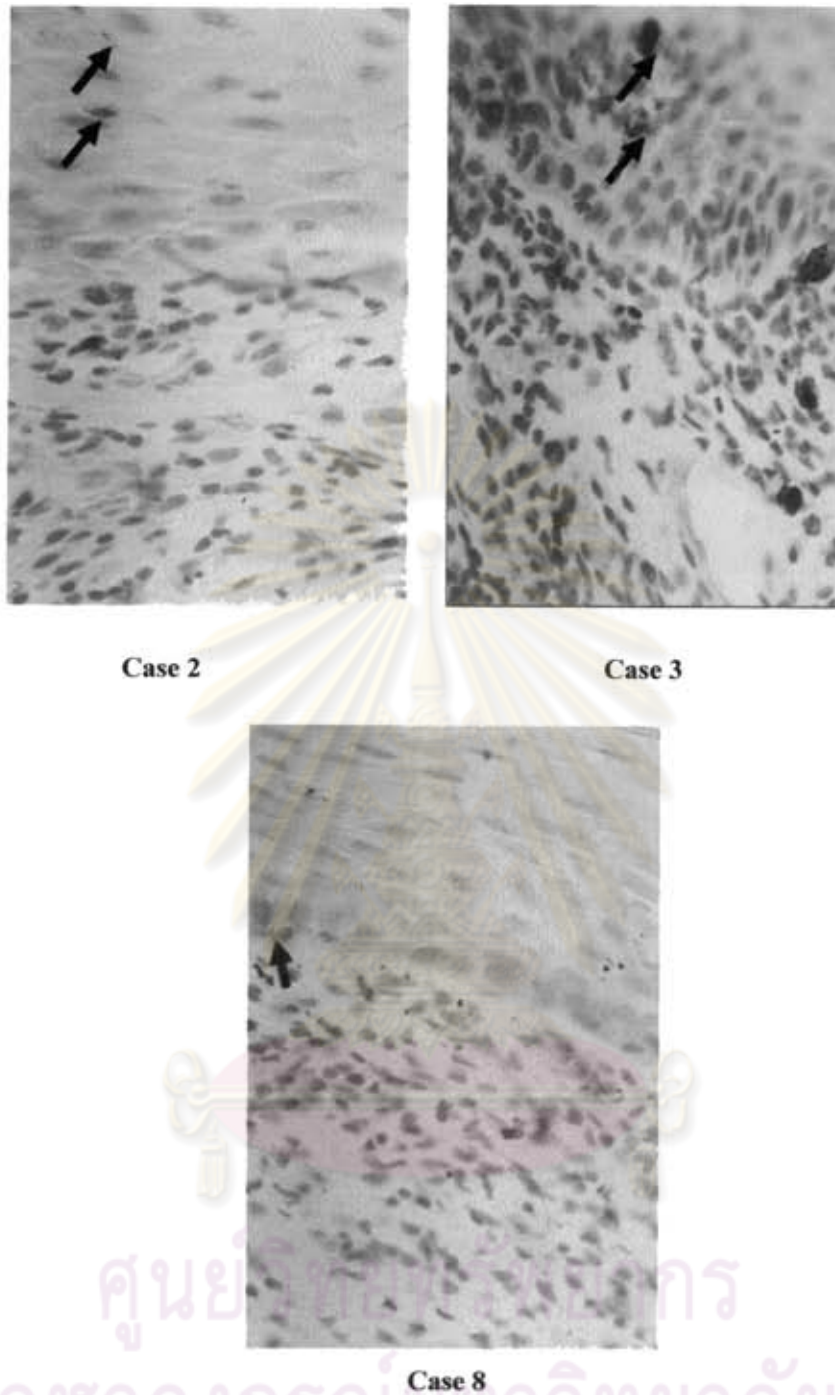
b) Partial remission of OLP in case 9 after treatment with FAO 0.1% in orabase for 1 month

ศูนย์วิทยุทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



a

- ภาพที่ 11 a) แสดงการปรากฏของทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์-แอลฟา โดยเซลล์อักเสบที่มีนิวเคลียสเดี่ยว (ลูกศร) ในผู้ป่วยไลเคนพลาเนียในช่องปาก รายที่ 9 ก่อนการรักษา (200x)
- b) แสดงการปรากฏของทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์-แอลฟา ภายหลังการรักษาด้วยฟลูโอซิโนโลน อะเซทโทไนด์ชนิดขี้ผึ้ง ความเข้มข้น 0.1% เป็นระยะเวลา 1 เดือน (200x)
- Fig. 11 a) The expression of TNF- α by inflammatory mononuclear cells (arrows) in oral lichen planus in case 9 before treatment (200x)
- b) The expression of TNF- α in case 9 after treatment with FAO 0.1% in orabase for 1 month (200x)



ภาพที่ 12 แสดงการปรากฏของทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์-แอลฟา โดยเคอราติโนไซต์ (ลูกศร) ในผู้ป่วยไลเคนพลาเนียในช่องปาก รายที่ 2, 3, 8 ก่อนการรักษา (200x)

Fig. 12 The expression of TNF- α by keratinocytes (arrows) in oral lichen planus (case 2, 3, 8) before treatment (200x)

การอภิปรายผล

TNF- α เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับโรคภูมิคุ้มกันต้านทานเนื้อเยื่อตัวเองและโรคที่มีการอักเสบหลายชนิด โดยจะควบคุมขบวนการของการเกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงการเจริญของชั้นเยื่อเมือกของช่องปากและเชื่อว่าการเพิ่มระดับ TNF- α จะทำให้มีการเพิ่มและมีการรวมตัวของเซลล์อักเสบมากขึ้นในรอยโรคและสามารถเหนี่ยวนำเซลล์โคโคไนด์ชนิดอื่นได้⁽³⁸⁾ ปัจจัยที่กระตุ้นการปลดปล่อย TNF- α ในรอยโรคไลเคนพลาเนียในช่องปากยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แม้ว่าการแตกสลายตัวของกรานูล (degranulation) ในมาสเซลล์ (mast cells) จากยาบางชนิดอาจมีความเกี่ยวข้อง⁽³⁰⁾

สมมุติฐานของกลไกการเกิดโรคไลเคนพลาเนียในช่องปากยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด Carozzo และคณะ⁽³⁹⁾ มีความเห็นว่าการเกิดโรคไลเคนพลาเนียในช่องปากมีความเกี่ยวข้องกับการควบคุมที่ผิดปกติของยีน (genetic dysregulation) ของระบบภูมิคุ้มกันมากกว่าการตอบสนองทางกายภาพ (physiologic response) ต่อแอนติเจน นอกจากนั้นการเพิ่มความถี่ของ -308 A TNF- α allele มักจะทำให้เกิดรอยโรคที่บริเวณผิวหนังด้วย แต่จากการวิจัยครั้งนี้ผู้ป่วยทุกรายมีรอยโรคไลเคนพลาเนียปรากฏในช่องปากเท่านั้นและไม่พบรอยโรคที่ผิวหนัง

Sugerman และคณะ (2002)⁽⁴⁰⁾ ได้รายงานว่ากลไกการเกิดพยาธิสภาพของรอยโรคไลเคนพลาเนียในช่องปากมีความเกี่ยวข้องกับทั้งแอนติเจนที่จำเพาะและไม่จำเพาะ แอนติเจนที่จำเพาะจะเกิดขึ้นกับการนำเสนอแอนติเจน โดยเบซัลเคอราติโนไซต์และแอนติเจนจำเพาะต่อเคอราติโนไซต์ที่ถูกทำลายโดย CD8⁺ cytotoxic T - cells ส่วนกลไกที่ทำให้เกิดพยาธิสภาพแบบไม่จำเพาะจะเกิดขึ้นจากการแตกตัวของเซลล์มาสและการกระตุ้นของ matrix metalloproteinases ในรอยโรคไลเคนพลาเนียในช่องปาก⁽⁴²⁾ ในการวิจัยครั้งนี้พบการแสดงออกของ TNF- α ในเบซัลเซลล์จำนวนน้อยมาก จึงสนับสนุนแนวความคิดที่ว่าแอนติเจนที่เกี่ยวข้องกับโรคไลเคนพลาเนียในช่องปากในคนไทยเป็นชนิดไม่จำเพาะ

จากการวิจัยนี้พบว่าผู้ป่วยไลเคนพลาเนียในช่องปากในคนไทย 16 ใน 18 ราย (88.89%) มีการแสดงออกของ TNF- α ที่บริเวณรอยโรคก่อนรักษาโดยพบการแสดงออกทางอิมมูโนฮิสโตเคมีส่วนใหญ่จะ

พบในโมโนนิวเคลียร์เซลล์ ซึ่งรวมทั้งแมคโครฟาจและลิมโฟไซต์ นักวิจัยหลายท่านเชื่อว่าการเพิ่มขึ้นของ TNF- α จะทำให้มีการรวมตัวของเซลล์อักเสบมากขึ้นในรอยโรค^(13,32) ซึ่งจากงานวิจัยนี้ก็แสดงให้เห็นชัดว่าในระยะแรกของโรคไลเคนพลาเนียในช่องปากก่อนการรักษา พบว่ามีเซลล์อักเสบเป็นจำนวนมากที่บริเวณรอยโรค ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่ผ่านมา ภายหลังการรักษาโรคด้วยฟลูโอซิโนโลนอะเซทโทไนด์ชนิดขี้ผึ้ง 0.1% ปรากฏเซลล์อักเสบที่เคยปรากฏในรอยโรคจำนวนมาก มีปริมาณลดลงอย่างเห็นได้ชัดเจนเมื่อได้รับการรักษาแล้ว ($p=0.000$) ยิ่งไปกว่านั้นจากการศึกษานี้พบผู้ป่วยมีการแสดงออกของ TNF- α ลดลงทุกรายเมื่อภายหลังการรักษาเป็นเวลา 1 เดือน โดยเฉพาะผู้ป่วยรายที่ 3 ซึ่งมีการหายของรอยโรคอย่างสมบูรณ์ ไม่ปรากฏการแสดงออกของ TNF- α ในชิ้นเนื้อภายหลังการรักษา แสดงว่าการแสดงออกของซัยโตไคน์นี้มีบทบาทสำคัญต่อกลไกการเกิดพยาธิสภาพในผู้ป่วย ไลเคนพลาเนียในช่องปากคนไทย ดังนั้นพยาธิสภาพของการเกิดรอยโรคนี้มีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของ TNF- α และยาฟลูโอซิโนโลน อะเซทโทไนด์ชนิดขี้ผึ้ง 0.1% สามารถยับยั้งซัยโตไคน์ชนิดนี้ได้

นอกจากนี้มีรายงานล่าสุดพบว่า CD8+ cytotoxic T-cells จะสร้าง TNF- α ก่อนที่จะกระตุ้นที่เบซัลเคอราติโนไซต์ทำให้เกิด apoptosis⁽³²⁾ อาจเป็นไปได้ว่าโมโนนิวเคลียร์เซลล์ที่อยู่ในภาวะถูกกระตุ้นนี้จะเป็นแหล่งหลักในการสร้าง TNF- α แล้วกระตุ้นให้เคอราติโนไซต์ในบริเวณใกล้เคียงเกิด apoptosis ขึ้นก่อนแล้วค่อยกระตุ้นให้เคอราติโนไซต์ในบริเวณอื่นสร้าง TNF- α ขึ้น ดังนั้นจากการตรวจทางอิมมูโนฮิสโตเคมีในกลุ่มผู้ป่วยไลเคนพลาเนียในช่องปากในคนไทยกลุ่มนี้ ที่พบการแสดงออกที่บริเวณเบซัลเซลล์ จำนวน 10 ราย (55.56%) อาจจะเป็นเพราะมีการสร้างซัยโตไคน์ชนิดนี้ออกมาน้อยมาก แม้ว่ามีงานวิจัยที่ผ่านมาที่ศึกษาในชิ้นเนื้อเหงือกโดยใช้แอนติบอดีชนิดโพลีโคลนัลคล้ายกับงานวิจัยนี้ พบการแสดงออกของเซลล์ที่ให้ผลบวกด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีต่อ TNF- α ในเซลล์เยื่อผิวของร่องเหงือกในชั้นเบซัลเซลล์⁽³⁷⁾

สิ่งที่น่าสนใจในงานวิจัยนี้คือในการศึกษานี้ไม่พบการแสดงออกของ TNF- α ในชิ้นเนื้อผู้ป่วย 2 ราย ซึ่งได้ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง ก็ไม่สามารถตรวจพบได้ อาจเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงระดับของ

TNF- α ที่เคยมีรายงานว่าเมื่อมีการกระตุ้นเซลล์จะมีการสร้าง TNF- α ปริมาณสูงสุดในระยะแรก เมื่อเวลาผ่านไประยะหนึ่งจะมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณการสร้างทำให้มีระดับของ TNF- α ลดลง⁽⁴¹⁾ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าขึ้นเนื้อในผู้ป่วยรายดังกล่าวถูกนำมาศึกษาในระยะที่มีการสร้าง TNF- α ลดลงหรือมีระดับของ TNF- α ปริมาณน้อย จึงไม่สามารถตรวจพบได้ในเนื้อเยื่อ อย่างไรก็ตามในรอยโรคที่มีการอักเสบเรื้อรัง เช่น Arthritis ซึ่งมีการวิจัยในสัตว์ทดลองในระยะที่มีการอักเสบเรื้อรัง (chronic stage) จากวิธีการตรวจด้วยวิธีทางอิมมูโนฮิสโตเคมี ไม่สามารถตรวจพบการแสดงออกของ TNF- α ในเซลล์อักเสบ (inflammatory cells) ได้เช่นกัน⁽⁴²⁾ การศึกษาในผู้ป่วยจำนวนมากขึ้นอาจจะสามารถชี้ชัดได้มากกว่าในปัจจุบัน

รายงานล่าสุดพบว่าซัยโตไคน์หลายชนิดรวมทั้ง TNF- α สามารถตรวจพบได้ในของเหลวในช่องปาก (oral fluid) และในซีรัมในผู้ป่วยโรคเอนพลาเนียในช่องปาก ผลการศึกษาชี้แสดงว่า TNF- α มีความเกี่ยวข้องกับกลไกการเกิดโรคนี้^(43,44) อย่างไรก็ตามแม้ว่าการพัฒนาการรักษาด้วย แอนติ TNF- α ในการรักษาโรคที่มีการอักเสบเช่น โรครูมาตอยด์และโรคกล้ามเนื้ออักเสบจะได้ผล⁽⁴⁵⁾ แต่อาจจะต้องระมัดระวังผลลบที่ย้อนกลับ (negative feedback) ที่อาจเกิดขึ้นได้ โดยที่ TNF- α จะกระตุ้นโมเลกุลของการต้านอักเสบและยับยั้งเอ็นไซม์ที่ย่อยโปรตีนบางชนิด⁽⁴⁶⁾ เนื่องจาก TNF- α มีหน้าที่หลายอย่าง ดังนั้นการรักษาโดยใช้แอนติ TNF- α สามารถทำให้เกิดผลเสียต่อผู้ป่วยได้ มีรายงานว่าพบแอนตินิวเคลียร์แอนติบอดี (antinuclear antibody) และ double-strand DNA (dsDNA) แอนติบอดีในรอยโรคคล้ายรูปีส อิริธิม่าโตซัสของระบบ (systemic lupus erythematosus like disease)^(47,48) เกิดขึ้นซึ่งเป็นผลเสียจากการรักษาด้วยวิธีนี้

เนื่องจากการวิจัยนี้เป็นการศึกษาเริ่มแรกซึ่งยังไม่มีผู้ใดศึกษามาก่อน จึงยังไม่สามารถสรุปได้ชัดเจนเกี่ยวกับกลไกการเกิดพยาธิสภาพของรอยโรคเอนพลาเนียในผู้ป่วยไทย แต่ผลการศึกษาที่ผ่านมาทั้ง 18 ราย สามารถอธิบายถึงความเป็นไปได้ถึงความสัมพันธ์ของ TNF- α กับรอยโรคนี้ในคนไทย โดยที่ผลของยาทำให้โมโนนิวเคลียร์เซลล์ลดลงจึงเป็นผลทำให้ TNF- α ซึ่งสร้างโดยโมโนนิวเคลียร์เซลล์ลดลงด้วย ยิ่ง

ไปกว่านั้นงานวิจัยนี้ นับเป็นงานวิจัยแรก que แสดงว่าสเต็มเซลล์ชนิดทาเฉพาะที่ สามารถยับยั้งการแสดงออกของ TNF- α ในไลเคนพลาเนียในช่องปากซึ่งยังไม่มีผู้ใดรายงานมาก่อน และจะเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อการวิจัยต่อไปในอนาคต

ข้อสรุป

ผู้ป่วยไลเคนพลาเนียในช่องปากคนไทย 16 ใน 18 รายมีการแสดงออกของ TNF- α ที่บริเวณรอยโรค แสดงว่า กลไกการเกิดพยาธิสภาพของการเกิดโรคในคนไทยไม่แตกต่างกับรายงานของการศึกษาที่ผ่านมา ยิ่งไปกว่านั้นยาฟลูโอซิโนโลน อะเซทโทไนด์ 0.1% ชนิดทาเฉพาะที่ใช้ได้ผลดี และสามารถยับยั้งการแสดงออกของซัยโตไคน TNF- α เกือบทุกราย ดังนั้นการใช้ยาพวก immunomodulator ชนิดอื่นที่ยับยั้งการแสดงออกของ TNF- α อาจจะนำมาใช้รักษาได้ในผู้ป่วยคนไทยได้ต่อไป

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากแอนติบอดีมีราคาแพง ผู้ป่วยที่เข้าเกณฑ์ลักษณะทางคลินิกที่ยินยอมและสมัครใจเข้าร่วมในโครงการวิจัยมีไม่มากนัก การเก็บข้อมูลจึงต้องใช้ระยะเวลานาน อย่างไรก็ตามจากการวิจัยที่ผ่านมาพบเสมอว่าจะมีผู้ป่วยบางรายไม่กลับมาเข้าร่วมโครงการวิจัยภายหลังการรักษา ทำให้มีปัญหาในการเก็บข้อมูลไม่ เป็นไปตามที่กำหนด จึงต้องเตรียมงบประมาณไว้สำหรับผู้ป่วยที่ไม่กลับเข้าร่วมโครงการวิจัย นอกจากนี้ ปัญหาในการตรวจทางอิมมูโนฮิสโตเคมีในงานวิจัยนี้ที่ผ่านมาได้ใช้โพลีโคลนัลแอนติบอดีซึ่งสามารถหาได้ในขณะนั้น อาจจะมีปัญหาในการตีพิมพ์ผลงานอย่างไรก็ตามได้ส่งผลงานวิจัยนี้ไปลงพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ คือ Journal of Oral pathology and Medicine แล้ว ดังนั้นงานวิจัยต่อไปจะทำการศึกษาผู้ป่วยทั้งหมดซ้ำอีกครั้งโดยใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดี ซึ่งกำลังอยู่ระหว่างการติดต่อกับบริษัทที่จำหน่าย primary antibody ชนิดโมโนโคลนัล อาจพบผลการวิจัยใหม่ที่น่าสนใจหรือมีความแตกต่างจากเดิม โอกาสที่จะลงตีพิมพ์ในวารสารอาจมีได้สูงและมีความน่าเชื่อถือมากขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. กอบกาญจน์ ทองประสม. รอยโรคในช่องปากที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกัน. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2543 หน้า 5-56.
2. Eisen D. The clinical features, malignant potential and systemic associations of oral lichen planus : a study of 723 patients. *J Am Acad Dermatol* 2002; 46: 207-14.
3. Chainani-Wu N, Silverman S Jr, Lozada-Nur F, Mayer P, Watson JJ. Oral lichen planus: patient profile, disease progression and treatment responses. *J Am Dent Assoc* 2001; 132: 901-9.
4. Walsh LJ, Savage NW, Ishii T, Seymour GJ. Immunopathogenesis of oral lichen planus. *J Oral Pathol Med.* 1990; 19: 389-96.
5. Khan A, Farah CS, Savage NW, Walsh LJ, Harbrow DJ, Surgerman PB. Th1 cytokines in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 2003; 32: 77-83.
6. Sugerman PB, Savage NW, Zhou X, Walsh LJ, Bigby M. Oral lichen planus. *Clin Dermatol* 2000; 18: 533-9.
7. Farthing PM, Matear P, Cruchley AT. The activation of Langerhans cells in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 1990; 19: 81-5.
8. Yamamoto T, Osaki T, Yoneda K, Ueta E. Cytokine production by keratinocytes and mononuclear infiltrates in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 1994; 23: 309-25.
9. Constant SL, Bottomly K. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell response: the alternative approaches. *Ann Rev Immunol* 1997; 15: 297-322.
10. Morhenn VB, Wood GS. Gamma interferon-induced expression of class II major histocompatibility complex antigens by human keratinocytes. Effects of conditions of culture. *Ann New York Acad Sci* 1988; 548: 321-30.

11. Firth NA, Rich AM, Radden BG. Assessment of the value of immunofluorescence microscopy in the diagnosis of oral mucosal lichen planus. *J Oral Pathol Med* 1990; 19: 295-7.
12. Albanesi C, Cavani A, Girolomoni G. Interferon-gamma-stimulated human express the genes necessary for the production of peptide-loaded MHC class II molecules. *J Invest Dermatol* 1998; 110: 138-42.
13. Sugarman PB, Savage NW, Seymour GJ, Walsh LJ. Is there a role for Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in oral lichen planus? *Oral Pathol Med* 1996; 25: 219-24.
14. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989; 7: 145-73.
15. Thongprasom K, Luengvisut P, Wongwatanakij A, Boonjatturus C. Clinical evaluation in treatment of oral lichen planus with topical fluocinolone acetonide: a 2-year follow-up. *J Oral Pathol Med* 2003; 32: 315-22.
16. Thongprasom K, Luangjarmekorn L, Sererat T, Taweessap W. Relative efficacy of fluocinolone acetonide compared with triamcinolone acetonide in treatment of oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 1992; 21: 456-8.
17. Zhang M, Tracey KJ. Tumor necrosis factor. In: Thomson AW, ed. *The cytokine handbook* 3 rd ed. California: Academic Press, 1998: 517-48.
18. Baud Véronique, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends in cell Biology* 2001; 11: 372-77.
19. Pilai S, Bikle DD, Eessalu TE et al. Binding and biological effects of tumour necrosis alpha on cultured human neonatal foreskin keratinocytes. *J Clin Invest* 1989; 83: 816-21.

20. Semenzato G. Tumour necrosis factor: a cytokine with multiple biological activities. *Br J Cancer* 1990; 61:354-61.
21. Fiers W. Tumour necrosis factor: characterisation at the molecular, cellular and in vivo level. *Fed Eur Biochem Soc Lett* 1991; 285:199-212.
22. Al-Janadi M, Al-Balla S, Al-Dalaan A, Raziuddin S. Cytokine profile in systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and other rheumatic diseases. *J Clin Immunol* 1993; 13: 58-67.
23. Ettehad P, Greaves MW, Walluch D, Aderka D, Camp RDR. Elevated tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) biological activity in psoriatic skin lesions. *Clin Exp Immunol* 1994; 96: 146-51.
24. Brennan FM, Feldmann M. Cytokines in autoimmunity. *Current Opinion in Immunology* 1996; 8: 872-7.
25. Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol* 1992; 10: 411-52.
26. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology. 5th ed. Philadelphia : W.B.Saunders Company, 2003: 247-97.
27. Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins pathologic basis of disease. 6th ed. Philadelphia: W.B.Saunders Company, 1999: 23-5.
28. Walsh LJ, Trinchieri G, Waldorf HA, Whitaker D, Murphy GF. Human dermal mast cells contain and release tumor necrosis factor- α which induces endothelial leukocyte adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 4220-4.
29. Verdickt GM, Savage NW, Dodd NM, Walsh LJ. Expression of the CD54 (ICAM-1) and CD1 1a (LFA-1) adhesion molecules in oral mucosal inflammation. *J Oral Pathol Med* 1992; 21: 65-9.
30. Walsh LJ, Ishii T, Gemmell E, Savage NW, Seymour GJ. Immunohistological analysis of epithelial cell populations in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 1990; 19: 177-81.

31. Ishii T, Walsh LJ, Seymour GJ, Powell RN. Modulation of Langerhans cell surface antigen expression by recombinant cytokines. *J Oral Pathol Med* 1990; 19:355-9.
32. Lodi G, Scully C, Carrozzo M, Griffiths M, Sugerman PB, Thongprasom K. Current controversies in oral lichen planus; report of an international consensus meeting - Part 1. Viral infections and aetiopathogenesis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005; 100: 40-51.
33. Younes F, Quartey EL, Kiguwa S, Partridge M. Expression of TNF and the 55-kDa TNF receptor in epidermis, oral mucosa, lichen planus and squamous cell carcinoma. *Oral Dis* 1996; 2: 25-31.
34. Sklavounou A, Chrysomaili E, Scorilas A, Karameris A. TNF- α expression and apoptosis-regulating proteins in oral lichen planus: a comparative immunohistochemical evaluation. *J Oral Pathol Med* 2000; 29:370-5.
35. Khan A, Farah CS, Savage NW, Walsh LJ, Harbrow DJ, Sugerman PB. Th1 cytokines in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 2003 32:77-83.
36. Nakano Y, Kobayashi W, Sugai S, Kimura H, Yagihashi S. Expression of tumor necrosis factor- α and Interleukin-6 in oral squamous cell carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 1999; 90: 858-66.
37. Tervahartiala T, Koski H, Xu J-W *et al.* Tumor necrosis factor- α and its receptors, p55 and p75, in Gingiva of adult periodontitis. *J Dent Res* 2001; 80: 1535-9.
38. Ulich THR, Castillo J, Keys M *et al.* Kinetics and mechanisms of recombinant human interleukin 1 and tumor necrosis factor- α induced changes in circulating numbers of neutrophils and lymphocytes. *J Immunol* 1987; 139:3406-15.
39. Carrozzo M, Uboldi de Capei M, Dametto E *et al.* Tumor necrosis factor- α and Interferon- γ polymorphisms contribute to susceptibility to oral lichen planus. *J Invest Dermatol* 2004; 122: 87-94.

40. Sugerman PB, Savage NW, Walsh LJ *et al.* The pathogenesis of oral lichen planus. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13: 350-65.
41. Imaizumi T, Itaya H, Fujita K *et al.* Expression of tumor necrosis factor- α in cultured human endothelial cells stimulated with lipopolysaccharide or interleukin-1 α . *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 410-5.
42. Sakedai M, Tominaga K, Habu M *et al.* Involvement of tumor necrosis factor- α and interleukin-8 in antigen-induced arthritis of the rabbit temporomandibular joint. *J Oral Pathol Med* 2004; 33: 102-10.
43. Rhodus NL, Cheng B, Myers S, Bowles W, Ho V, Ondrey F. A comparison of the pro-inflammatory, NF-kB-dependent cytokines: TNF-alpha, IL-1- alpha, IL-6, and IL-8 in different oral fluids from oral lichen planus patients. *Clin Immunol* 2005; 114: 278-83.
44. Erdem MT, Gulec AI, Kiziltunc A, Yildirim A, Atasoy M. Increased serum levels of tumor necrosis factor alpha in lichen planus. *Dermatology* 2003; 207: 367-70.
45. Baugh JA, Bucala R. Mechanisms for modulating TNF alpha in immune and inflammatory disease. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2001; 4: 635-50.
46. Banno T, Gazel A, Blumenberg M. Effects of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in epidermal keratinocytes revealed using global transcriptional profiling. *J Biol Chem* 2004; 279: 32633-42.
47. Antoni C, Braun J. Side effects of anti-TNF therapy: current knowledge. *Clin Exp Rheumatol* 2002; 20: S152-7.
48. Mor A, Bingham C 3rd, Barisoni L, Lydon E, Belmont HM. Proliferative lupus nephritis and leukocytoclastic vasculitis during treatment with etanercept. *J Rheumatol* 2005; 32: 740-3.