

ANTI-INFLAMMATORY EFFECT OF HESPERIDIN ON LIPOPOLYSACCHARIDE OF PORPHYROMONAS GINGIVALIS STIMULATED HUMAN GINGIVAL FIBROBLAST: AN IN VITRO PILOT STUDY

Napasorn RIMPRANAM^{1*}, Saengsome PRAJANEH¹, Poramaporn KLANRIT¹, Pongrat PAKDEECHOTE² and Subin PUASIRI¹

1 Faculty of Dentistry, Khon Kaen University, Thailand; napasorn.ri@kkumail.com (N. R.)
(Corresponding Author)

2 Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand

ARTICLE HISTORY

Received: 21 April 2023

Revised: 10 May 2023

Published: 22 May 2023

ABSTRACT

Hesperidin (Hsd) is one of phytochemicals which is found mostly in citrus peels. It has a potentially of anti-inflammatory effects on other cell lines. In this study, we investigated the anti-inflammatory effect of hesperidin. Primary human gingival fibroblast-like cell (HGF-PT) and RAW 264.7 macrophage cells were stimulated with *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharides (LPS-Pg) and supplied with Hsd (5, 10 and 20 μ M). Nitric oxide production level (Griess assay) was evaluated in HGF-PT and RAW 264.7 cell at 24 hours. Then, the expression of interleukin-6 (IL-6) mRNA was evaluated in HGF-PT at 3 hours by using Reverse transcription quantitative real time Polymerase-chain reaction (RT-qPCR). Results showed that Hsd at all concentrations significantly caused a reduction of nitric oxide levels in RAW 264.7 cells, but not in HGF-PT cells. Moreover, the significant doses of Hsd (10 and 20 μ M) were found to reduce IL-6 mRNA expression. In conclusion, our finding supports that hesperidin has a potential of an anti-inflammatory effect in primary human gingival fibroblast-like cells.

Keywords: Hesperidin, Inflammation, Human Gingival Fibroblast-Like Cell, Raw 264.7

CITATION INFORMATION: Rimpranam, N., Prajaneh, S., Klanrit, P., Pakdeechote, P., & Puasiri, S. (2023). Anti-Inflammatory Effect of Hesperidin on Lipopolysaccharide of Porphyromonas Gingivalis Stimulated Human Gingival Fibroblast: An in Vitro Pilot Study. *Procedia of Multidisciplinary Research*, 1(5), 32.

ฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารเฮสเพอริตินต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ เหนือกมนุษย์เมื่อถูกกระตุ้นด้วยไลพอพอลิแซคคาไรด์ ของเชื้อ พอร์ไฟโรโมแนส จินจิวัลิส: การศึกษานำร่องในห้องปฏิบัติการ

นภสร रिมนประนาม^{1*}, แสงโสม ประจะเนย์¹, ปริมาภรณ์ กลั่นฤทธิ์¹, พวงรัตน์ ภัคดีโชติ² และ สุบิน พัวศิริ¹

1 คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น; napasorn.ri@kkumail.com (นภสร) (ผู้ประพันธ์บรรณกิจ)

2 คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทคัดย่อ

เฮสเพอริตินเป็นสารพฤษเคมีที่พบมากในเปลือกส้ม และมีฤทธิ์ลดการอักเสบในเซลล์ต่างๆ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ลดการอักเสบของเฮสเพอริติน โดยใช้เซลล์คล้ายไฟโบรบลาสต์เหนือกมนุษย์และเซลล์แมคโครฟาจหนู (RAW 264.7) มากระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วยไลพอพอลิแซคคาไรด์ของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวัลิส ร่วมกับการเติมเฮสเพอริตินความเข้มข้น 5, 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ ทำการวัดการอักเสบโดยการวัดระดับไนตริกออกไซด์ด้วยวิธีกรีสส์ ที่เวลา 24 ชั่วโมง และวัดระดับการแสดงออกของยีนอินเตอร์ลิวคิน-6 ในเซลล์คล้ายไฟโบรบลาสต์เหนือกมนุษย์ ด้วยวิธีเรียลไทม์โพลีเมอร์เรสเซนซ์แอกชัน ที่เวลา 3 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่าเฮสเพอริตินทุกความเข้มข้นสามารถลดระดับไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจหนูอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และเฮสเพอริตินความเข้มข้น 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ ทำให้การแสดงออกของยีนอินเตอร์ลิวคิน-6 ลดลง ในเซลล์คล้ายไฟโบรบลาสต์เหนือกมนุษย์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเฮสเพอริตินสามารถลดการอักเสบในเซลล์คล้ายไฟโบรบลาสต์เหนือกมนุษย์ได้

คำสำคัญ: เฮสเพอริติน, การอักเสบ, ไฟโบรบลาสต์เหนือกมนุษย์, เซลล์แมคโครฟาจหนู

ข้อมูลอ้างอิง: นภสร रिมนประนาม, แสงโสม ประจะเนย์, ปริมาภรณ์ กลั่นฤทธิ์, พวงรัตน์ ภัคดีโชติ และ สุบิน พัวศิริ. (2566). ฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารเฮสเพอริตินต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหนือกมนุษย์ เมื่อถูกกระตุ้นด้วยไลพอพอลิแซคคาไรด์ ของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวัลิส: การศึกษานำร่องในห้องปฏิบัติการ. *Procedia of Multidisciplinary Research*, 1(5), 32.

บทนำ

โรคปริทันต์อักเสบ เป็นโรคที่มีการอักเสบเรื้อรังที่บริเวณเหงือกหรือเนื้อเยื่อรอบตัวฟัน รวมถึงกระดูกขาฟันและเอ็นยึดปริทันต์ ซึ่งมีสาเหตุมาจากการสะสมของคราบจุลินทรีย์ เมื่อไม่ได้รับการรักษาอย่างเหมาะสม ร่างกายจะเกิดการตอบสนองต่อเชื้อก่อโรคปริทันต์ที่สะสมอยู่ในคราบจุลินทรีย์ เช่น เชื้อพอร์ไฟโรโมนัส จินจิวัลิส (*Porphyromonas gingivalis*) หรือสารพิษที่เชื่อมปล่อยออกมา เช่น ไลพอพอลิแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide; LPS) โดยการอักเสบนี้เป็นการตอบสนองของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักในเนื้อเยื่อเหงือก เมื่อร่างกายได้รับเชื้อก่อโรคปริทันต์ เซลล์ไฟโบรบลาสต์จะตอบสนองโดยการหลั่งสารน้ำโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น อินเตอร์ลิวคิน-1-เบตา (Interleukin-1; IL-1 β) อินเตอร์ลิวคิน-6 (Interleukin-6; IL-6) (Steffen et al., 2000) การหลั่งสารน้ำโปรตีนเหล่านี้มีวัตถุประสงค์เพื่อกำจัดเชื้อก่อโรคปริทันต์ เมื่อมีการหลั่งสารน้ำโปรตีนเหล่านี้เพิ่มมากขึ้น จะส่งผลให้เพิ่มการอักเสบและส่งผลทำให้เกิดการทำลายของอวัยวะปริทันต์ ทำให้เกิดร่องลึกปริทันต์ เหงือกกรัน ฟันโยก (Kinane et al., 2017) และส่งผลให้เกิดการสูญเสียฟันได้ในที่สุด

การรักษาโรคปริทันต์ เช่น การแปรงฟัน การขูดหินน้ำลายและการเกลารากฟัน มีจุดประสงค์เพื่อกำจัดปัจจัยก่อโรคและลดการอักเสบ นอกจากนี้ยังมีการรักษาอื่นๆ เช่น การใช้สารเคมี ยาต้านการอักเสบชนิดที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ หรือยาปฏิชีวนะแบบเฉพาะที่ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อและลดการอักเสบ แต่การใช้ยาเสริมก็ยังมีข้อจำกัดในการใช้งานและอาจเกิดผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ เช่น มีไข้ อาเจียน ระบายเคืองกระเพาะอาหาร หรืออาการแสบร้อนภายในปาก (Jepsen & Jepsen, 2016)

เปลือกส้มเป็นส่วนที่ไม่ได้นำมาบริโภคและมักจะถูกทิ้งเป็นของเสีย แต่พบว่าในเปลือกพบมีสารฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) ที่สำคัญมากมาย โดยพบว่าสารเฮสเพอริดินที่อยู่ในเปลือกส้ม มีฤทธิ์ในการต้านจุลชีพ ต้านมะเร็ง ปกป้องระบบประสาท ช่วยเพิ่มระดับไขมันดี มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ในการต้านการอักเสบในเซลล์ต่างๆ เช่น เซลล์กระดูกอ่อนมนุษย์ (human articular chondrocyte) และเซลล์เคราตินไซต (human keratinocyte) (Moon & Kim, 2012; Tsai et al., 2019) โดยยังไม่มีการศึกษาถึงฤทธิ์ต้านการอักเสบในเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือก ดังนั้นการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ลดการอักเสบของสารเฮสเพอริดินต่อเซลล์คล้ายไฟโบรบลาสต์เหงือก-ปฐมภูมิมนุษย์ เมื่อถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วยไลพอพอลิแซคคาไรด์ ของเชื้อพอร์ไฟโรโมนัส จินจิวัลิส เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนา คิดค้น และผลิตยาต้านการอักเสบจากสมุนไพร เพื่อใช้ร่วมในการรักษาโรคปริทันต์อักเสบ

วิธีการวิจัย

1) การเพาะเลี้ยงเซลล์และการทดสอบเพื่อศึกษาแนวใหม่การเจริญเติบโตของเซลล์

การศึกษานี้เป็นการศึกษาในห้องปฏิบัติการที่ได้รับการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (เลขที่โครงการ HE 652177) ที่ทำการศึกษาในเซลล์แมคโครฟาจหนู (RAW 264.7, ATCC TIB-71) และในเซลล์คล้ายไฟโบรบลาสต์เหงือกปฐมภูมิมนุษย์ที่ได้จากอาสาสมัคร จำนวน 10 ราย ผู้ป่วยอายุ 15-60 ปี ไม่มีโรคประจำตัว ไม่สูบบุหรี่ ไม่ได้ทานยาปฏิชีวนะภายใน 6 เดือนก่อนการรักษา เป็นผู้ที่ไม่ได้ตั้งครรภ์หรือให้นมบุตร ผู้ซึ่งเข้ารับการรักษาด้วยการทำศัลยกรรมปริทันต์ผ่าตัดเหงือกที่ไม่เป็นโรคปริทันต์ ที่คลินิกศัลยกรรมปริทันต์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยทำการเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อเหงือกที่ได้จากการผ่าตัด ทำการล้างชิ้นเนื้อเหงือกด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน (phosphate buffer saline; PBS; Gibco BRL, NY, USA) จำนวน 2 ครั้ง ทำการตัดชิ้นเนื้อเหงือกให้มีขนาด 2x2x2 มิลลิเมตรและวางลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 6 หลุม (Corning, NY, USA) เติมน้ำเลี้ยงเซลล์เซลล์ดีเอ็มเอ็ม (Dulbecco's Modified Eagle Medium; DMEM; Gibco BRL, NY, USA) ที่มีฟีตัลโบวายซีรัมร้อยละ 10 โดยปริมาตร (Fetal bovine serum; FBS; Gibco BRL, NY, USA) และกลูตามีน (L-glutamine; Gibco BRL, NY, USA) ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้ความชื้นร้อยละ 95 คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เมื่อครบ 48 ชั่วโมง ทำ

การตรวจสอบหาเซลล์ที่ออกมาจากชิ้นเนื้อเหืองอกด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ เปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ทุก 3 วัน บ่มในสภาวะเดิมจนเซลล์เจริญเติบโตแบบเซลล์เรียงตัวชั้นเดียวจนมีความหนาแน่นร้อยละ 80 ของพื้นที่ทั้งหมด จากนั้นทำการย้ายเซลล์ไปยังจานเพาะเลี้ยงใหม่เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ด้วยการกระตุ้นในเซซัน (Trypsinization) ด้วยการเติมทริปซินอีดีทีเอ (0.25% Trypsin-EDTA; Gibco BRL, NY, USA) และใช้เซลล์ครั้งที่ 3-8 (Passage 3-8th) ทำการทดลอง ในส่วนของเซลล์แมคโครฟาจหนู จะทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในพลาสติกพลาสติกเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 ตารางเซนติเมตร (SPL life sciences, Korea) ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟีตัลโบววยซีรัมร้อยละ 10 โดยปริมาตร บ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้ความชื้นร้อยละ 95 คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ทุก 3 วัน จนเซลล์เจริญเติบโตหนาแน่นร้อยละ 80 ของพื้นที่ทั้งหมด

ต่อมาทำการทดสอบการเจริญเติบโตของเซลล์คล้ายไฟโบรบลาสต์เหืองอกปฐมภูมิมนุษย์ โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ใน ภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม (Corning, NY, USA) ใส่เซลล์หลุมละ 1×10^4 เซลล์ ทำการบ่มเซลล์ในอาหารเลี้ยง เซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟีตัลโบววยซีรัมร้อยละ 10 โดยปริมาตร ร้อยละ 1 โดยปริมาตร และปราศจากซีรัม บ่มเซลล์เป็น ระยะเวลา 6, 10 และ 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนด ทำการเติมเพรสโตบลู ปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร จากนั้น นำไปบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้ความชื้นร้อยละ 95 และคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็น ระยะเวลา 45 นาที ทำการวัดการเจริญเติบโตของเซลล์ผ่านการอ่านค่าความเข้มข้นของแสงฟลูออเรสเซนซ์ ด้วยเครื่อง สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ไมโครเพลทรีดเดอร์ (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น 560 นาโนเมตร และความยาวคลื่นคายพลังงาน 590 นาโนเมตร กำหนดให้เซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟีตัลโบววยซีรัมร้อยละ 10 โดยปริมาตร มีอัตราการเจริญเติบโตร้อยละ 100

2) การเตรียมสารละลายเฮสเพอริดินและไลพอฟอลิแซคคาไรด์

เตรียมสารละลายเฮสเพอริดินให้ได้ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ และทำการเตรียมสารละลายไลพอฟอลิแซคคาไรด์ของเชื้อฟอร์ไฟโรโมแนส จินจิวัลิส (InvivoGen, San Diego, USA) ให้ได้ความเข้มข้น 5 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับใช้ทดสอบกับเซลล์แมคโครฟาจหนูและเซลล์คล้ายไฟโบรบลาสต์เหืองอกปฐมภูมิมนุษย์ ตามลำดับ

3) การทดสอบความเป็นพิษของเฮสเพอริดิน และการทดสอบฤทธิ์ลดการอักเสบโดยการวัดระดับไนตริกออกไซด์ ด้วยวิธีกรีสส์ (Griess Assay) ในเซลล์แมคโครฟาจหนูและเซลล์คล้ายไฟโบรบลาสต์เหืองอกปฐมภูมิมนุษย์

เตรียมเซลล์แมคโครฟาจหนูและเซลล์คล้ายไฟโบรบลาสต์เหืองอกปฐมภูมิมนุษย์ ในภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม ทำการใส่เซลล์หลุมละ 1×10^4 เซลล์ และ 3×10^4 เซลล์ตามลำดับ โดยแบ่งออกเป็น 8 กลุ่มการทดลอง ดังนี้ กลุ่มที่ 1 เซลล์แมคโครฟาจหนูที่ถูกกระตุ้นด้วยไลพอฟอลิแซคคาไรด์ ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเซลล์คล้ายไฟโบรบลาสต์เหืองอกปฐมภูมิมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลพอฟอลิแซคคาไรด์ ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

กลุ่มที่ 2-4 เซลล์แมคโครฟาจหนูที่ถูกกระตุ้นด้วยไลพอฟอลิแซคคาไรด์ ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ เซลล์คล้ายไฟโบรบลาสต์เหืองอกปฐมภูมิมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลพอฟอลิแซคคาไรด์ ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ร่วมกับการเติมเฮสเพอริดิน ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 ไมโครโมลาร์

กลุ่มที่ 5-6 เซลล์แมคโครฟาจหนูที่ถูกกระตุ้นด้วยไลพอฟอลิแซคคาไรด์ ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ เซลล์คล้ายไฟโบรบลาสต์เหืองอกปฐมภูมิมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลพอฟอลิแซคคาไรด์ ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ร่วมกับการเติมสารเบนซีตามีน ไฮโดรคลอไรด์ความเข้มข้น 12.5 และ 25 ไมโครโมลาร์

กลุ่มที่ 7 เซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟีตัลโบววยซีรัมร้อยละ 1 โดยปริมาตร

กลุ่มที่ 8 เซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงในตัวทำละลายดีเอ็มเอสอีร้อยละ 1 โดยปริมาตร

ทำการบ่มเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนด ทำการวัดความมีชีวิตของเซลล์ด้วยการเติมเพรสโตบลู และวัดความมีชีวิตของเซลล์ผ่านการอ่านค่าความเข้มข้นของแสงฟลูออเรสเซนซ์ ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ไมโครเพลทรีดเดอร์ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น 560 นาโนเมตร และความยาวคลื่นคายพลังงาน 590 นาโนเมตร โดยกำหนดให้เซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟีตัลโบวายซีรัมร้อยละ 1 โดยปริมาตร มีอัตราการมีชีวิตของเซลล์ร้อยละ 100 และกำหนดให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตต้องมากกว่าร้อยละ 80

จากนั้นทำการดูดของเหลวเหนือตะกอนที่ได้จากการทดลองก่อนหน้า ลงในภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม เติมนสารละลายกรีสซีเอเจนท์ (ประกอบด้วย 1% Sulfanilamide และ 1% N-(L-nahthyl)ethylenediamine (NED) ใน 5% phosphoric acid) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำการตรวจวัดปริมาณไนไตรท์ ที่ความยาวคลื่น 548 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ไมโครเพลทรีดเดอร์

4) การทดสอบฤทธิ์ลดการอักเสบของเฮสเพอริดิน ในเซลล์คล้ายไฟโบรบลาสต์เชิงอกปฐมภูมิมนุษย์ด้วยวิธี Reverse transcription quantitative real time Polymerase-chain reaction (RT-qPCR)

เตรียมเซลล์คล้ายไฟโบรบลาสต์เชิงอกปฐมภูมิมนุษย์ ในภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 6 หลุม ทำการใส่เซลล์หลุมละ 1×10^6 เซลล์ โดยแบ่งออกเป็น 7 กลุ่มการทดลอง ดังนี้

กลุ่มที่ 1 เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลพอฟอลิแซคคาไรด์ ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

กลุ่มที่ 2-4 เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลพอฟอลิแซคคาไรด์ ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ร่วมกับการเติมเฮสเพอริดิน ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 ไมโครโมลาร์

กลุ่มที่ 5-6 เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลพอฟอลิแซคคาไรด์ ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ร่วมกับการเติมสารเบนซิทามีน ไฮโดรคลอไรด์ ความเข้มข้น 12.5 และ 25 ไมโครโมลาร์

กลุ่มที่ 7: เซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟีตัลโบวายซีรัมร้อยละ 1 โดยปริมาตร

ทำการบ่มเซลล์เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนด ทำการสกัดอาร์เอ็นเอโดยชุดสกัดสำเร็จรูปในการสกัดอาร์เอ็นเอ (GeneJET RNA Purification kit; Thermo Fisher Scientific; USA) และนำอาร์เอ็นเอที่ได้ไปเป็นแม่แบบในการทำเวอส์ทรานสคริปชันเพื่อสร้างสายคอมพลีเมนต์อาร์ดีเอ็นเอและตรวจวัดด้วยวิธี RT-qPCR โดยใช้ระบบ Power SYBR Green (Applied Biosystem™; USA) และเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (7500 Fast, Applied Biosystem™; USA) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อแกปดีเอช (GAPDH; forward: TGAAGGTCGGAGTCAACGGAT, reverse: TCACACCCATGACGAACATGG) และอินเตอร์ลิวคิน-6 (IL-6; forward: TAGCCGCCCCACACAGACAG, reverse: GGCTGGCATTGTGGTTGGG)

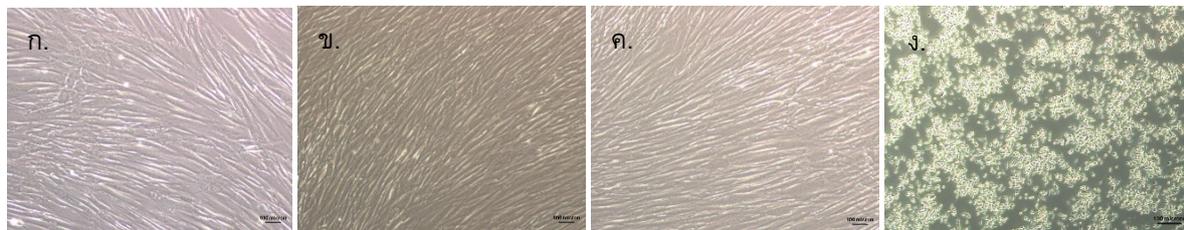
5) การวิเคราะห์ข้อมูล

ใช้สถิติทดสอบวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) ในกรณีที่มีข้อมูลมีการแจกแจงปกติ และมีความแปรปรวนของแต่ละกลุ่มเท่ากัน และทำการทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วยวิธี Bonferroni และในกรณีที่ข้อมูลมีการแจกแจงไม่ปกติหรือมีความแปรปรวนของแต่ละกลุ่มไม่เท่ากัน จะใช้สถิติทดสอบ Kruskal Wallis Test และทำการทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม ด้วยวิธี Dunn-Bonferroni ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P < 0.05$)

ผลการวิจัย

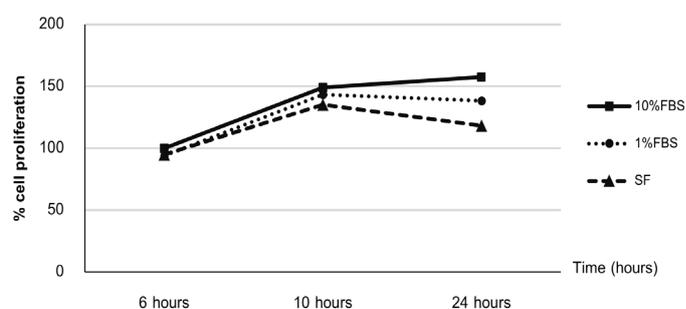
1) ผลการทดสอบแนวโน้มนำการเจริญเติบโตของเซลล์คล้ายไฟโบร بلاสต์เหงือกปฐมภูมิมนุษย์

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์คล้ายไฟโบร بلاสต์เหงือกปฐมภูมิมนุษย์ในอาสาสมัครทั้งหมด 10 ราย พบว่ามีเพียงจำนวน 3 รายที่มีเซลล์คล้ายไฟโบร بلاสต์คืบคลานออกมาจากชั้นเนื้อเหงือก โดยพบว่าเซลล์มีลักษณะเรียวยาวรูปทรงกระสวย มีส่วนยื่นออกมาจากตัวเซลล์ และมีนิวเคลียสรูปไข่อยู่ตรงกลางเซลล์ ส่วนเซลล์แมคโครฟาจหนูจะมีลักษณะทรงกลม มีขนาดเล็กกว่าเซลล์คล้ายไฟโบร بلاสต์เหงือกปฐมภูมิมนุษย์ และเกาะกันเป็นกลุ่ม ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 แสดงลักษณะของเซลล์คล้ายไฟโบร بلاสต์เหงือกปฐมภูมิมนุษย์จากอาสาสมัครจำนวน 3 ราย และเซลล์แมคโครฟาจหนู ที่การเจริญเติบโตหนาแน่นร้อยละ 80 ของพื้นที่ ก.) เซลล์จากอาสาสมัครรายที่ 1 passage 4th ข.) เซลล์จากอาสาสมัครรายที่ 2 passage 3rd ค.) เซลล์จากอาสาสมัครรายที่ 3 passage 4th ง.) เซลล์แมคโครฟาจหนู

ในส่วนของการแนวโน้มนำการเจริญเติบโตของเซลล์คล้ายไฟโบร بلاสต์เหงือกปฐมภูมิมนุษย์ ในอาสาสมัคร 1 ราย ผลการศึกษาพบว่าที่เวลา 10 และ 24 ชั่วโมง เซลล์มีอัตราการเจริญเติบโตเกินร้อยละ 80 และมีแนวโน้มนำการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาผ่านไป (6-24 ชั่วโมง) เมื่อพิจารณาที่ 24 ชั่วโมงพบว่าเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีฟีตัลโบวายซีรัมร้อยละ 10 โดยปริมาตร มีอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์เพิ่มขึ้นร้อยละ 57.5 และเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีฟีตัลโบวายซีรัมร้อยละ 1 โดยปริมาตร มีอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์เพิ่มขึ้นร้อยละ 38.46 ในขณะที่เซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม มีอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์เพิ่มขึ้นเพียงร้อยละ 18.27 และมีอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์น้อยที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่น ดังแสดงในภาพที่ 2 และตารางที่ 1



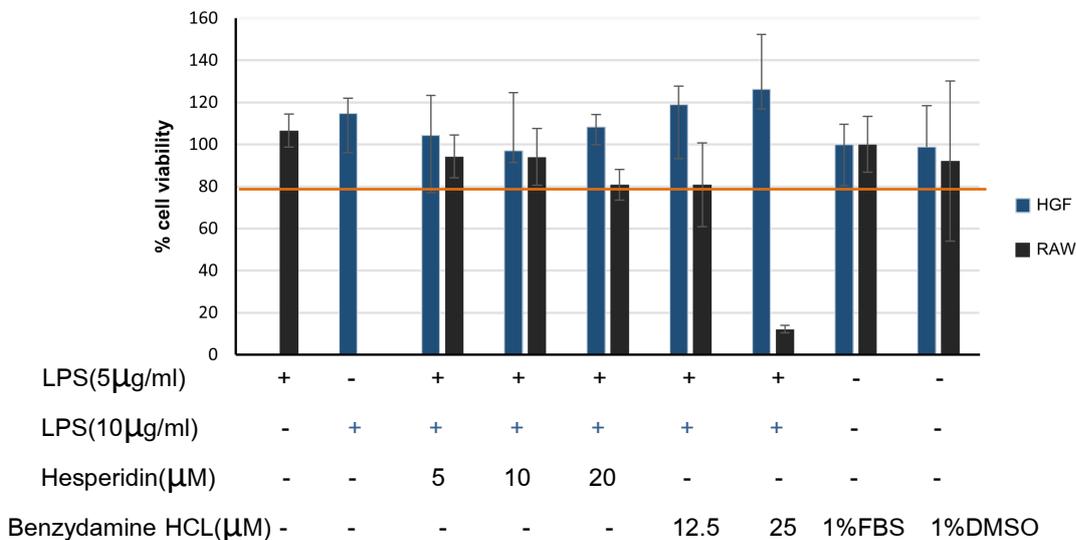
Cell culture media	6 hours	10 hours	24 hours
10% FBS	100.00	149.14	157.50
1% FBS	94.03	143.34	138.46
Serum free	95.05	135.07	118.27

ภาพที่ 2 และ ตารางที่ 1 แสดงร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์คล้ายไฟโบร بلاสต์เหงือกปฐมภูมิมนุษย์จำนวน 1 ราย ที่ระยะเวลา 6, 10 และ 24 ชั่วโมง

2) ผลการทดสอบความเป็นพิษของเฮสเพอริติน

เมื่อทำการกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วยไลพอโพลีแซคคาไรด์ความเข้มข้น 5 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในเซลล์แมคโครฟาจหนูและเซลล์คล้ายไฟโบร بلاสต์เหงือกปฐมภูมิมนุษย์ตามลำดับ ร่วมกับการเติมเฮสเพอริติน พบว่าเซลล์ในทุกกลุ่มมีอัตราการรอดชีวิตเกินร้อยละ 80 ทั้งในเซลล์คล้ายไฟโบร بلاสต์เหงือกปฐมภูมิมนุษย์และเซลล์แมคโคร

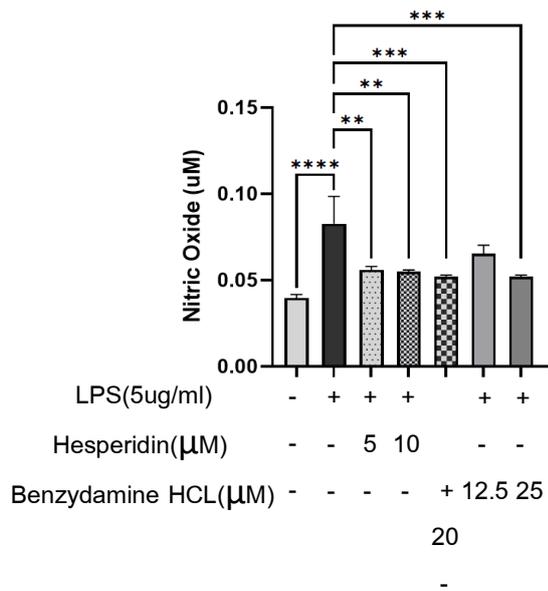
ฟาจหนู ยกเว้นกลุ่มทดลองที่ได้รับการเติมเบนซีตามีนไฮโดรคลอไรด์ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ ในเซลล์แมคโครฟาจหนู มีอัตราการรอดชีวิตน้อยกว่าร้อยละ 80 ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 แสดงผลความเป็นพิษของสารเฮสเพอริดินต่อเซลล์คล้ายไฟโบรบลาสต์เชิงอุปฐามภูมิมนุษย์จำนวน 1 ราย และเซลล์แมคโครฟาจหนู เมื่อทำการกระตุ้นด้วยไลพอพอลิแซคคาไรด์ร่วมกับการเติมเฮสเพอริดิน ที่เวลา 24 ชั่วโมง

3) ผลการทดสอบฤทธิ์ลดการอักเสบของเฮสเพอริดิน โดยการวัดระดับไนตริกออกไซด์ ด้วยวิธีกรีสส์

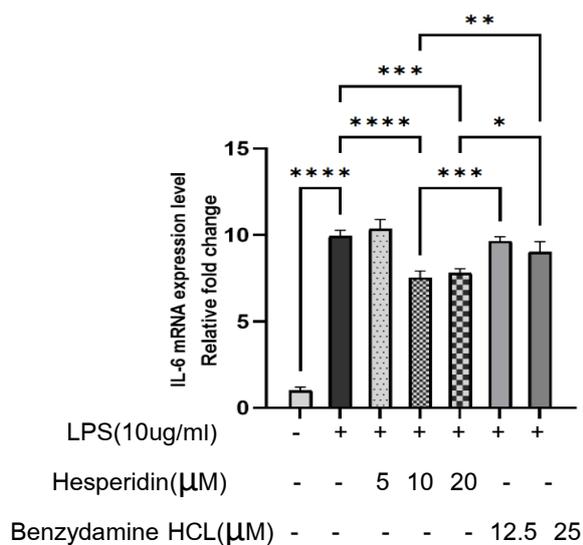
ผลการทดสอบฤทธิ์ลดการอักเสบของเฮสเพอริดินต่อเซลล์แมคโครฟาจหนู พบว่ากลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยไลพอพอลิแซคคาไรด์เพียงอย่างเดียวมีระดับไนตริกออกไซด์สูงที่สุด และเฮสเพอริดินทุกระดับความเข้มข้นมีแนวโน้มลดระดับไนตริกออกไซด์ได้มากกว่ากลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยไลพอพอลิแซคคาไรด์เพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบว่าเฮสเพอริดินสามารถลดระดับไนตริกออกไซด์ได้มากกว่ากลุ่มที่ได้รับการเติมเบนซีตามีนไฮโดรคลอไรด์อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในภาพที่ 4 ในขณะที่ผลการทดลองในเซลล์คล้ายไฟโบรบลาสต์เชิงอุปฐามภูมิมนุษย์ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของระดับไนตริกออกไซด์ที่เวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 4 แสดงระดับไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจหนู เมื่อทำการกระตุ้นด้วยไลโปพอลิแซคคาไรด์ร่วมกับการเติมเฮสเพอริดิน ที่เวลา 24 ชั่วโมง (****P < 0.0001, ***P = 0.0007, **P < 0.005, *P < 0.05)

4) ผลการทดสอบฤทธิ์ลดการอักเสบของเฮสเพอริดิน ด้วยวิธี RT-qPCR

ผลการทดสอบในเซลล์คล้ายไฟโบรบลาสต์เชิงอุปฐามภูมิมนุษย์ พบว่ากลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปพอลิแซคคาไรด์เพียงอย่างเดียวมีระดับการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอของยีน IL-6 สูงกว่าระดับปกติถึง 9.7 เท่า โดยมีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อพิจารณาฤทธิ์ลดการอักเสบของเฮสเพอริดิน พบว่าเฮสเพอริดินที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ มีระดับการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอของยีน IL-6 น้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปพอลิแซคคาไรด์เพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบว่าเฮสเพอริดิน ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ สามารถลดระดับการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอของยีน IL-6 ได้มากกว่ากลุ่มที่ได้รับการเติมเบนซิดามีนไฮโดรคลอไรด์ความเข้มข้น 12.5 และ 25 ไมโครโมลาร์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเฮสเพอริดิน ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ สามารถลดระดับการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอของยีน IL-6 ได้มากกว่ากลุ่มที่ได้รับการเติมเบนซิดามีนไฮโดรคลอไรด์ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P = 0.0109) ดังแสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 5 แสดงระดับการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอเข้ารหัสของยีน IL-6 ในเซลล์คล้ายไฟโบร بلاสต์เหนือกปฐมภูมิมนุษย์ เมื่อทำการกระตุ้นด้วยไลพอโพลีแซคคาไรด์ร่วมกับการเติมเฮสเพอริดิน ที่เวลา 3 ชั่วโมง (****P < 0.0001, ***P = 0.0001, **P = 0.0028, *P < 0.05)

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

เซลล์ไฟโบร بلاสต์มีความสำคัญในการคงสมดุลระหว่างการสร้างและการทำลายของอวัยวะปริทันต์ รวมถึงมีบทบาทหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ โดยผ่านตัวรับบนผิวเซลล์ ได้แก่ โทลล์ไลค์รีเซปเตอร์ 2 และ 4 (Toll-like Receptor; TLR2, TLR4) เมื่อร่างกายได้รับเชื้อก่อโรคปริทันต์ เช่น ไลพอโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อก่อโรคปริทันต์พอร์ไฟโรโมแนสจินจิวัลิส (LPS-Pg) จะทำให้เกิดการจับกันระหว่าง LPS-Pg กับ TLR2, TLR4 ทำให้เกิดการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการอักเสบผ่านปฏิกิริยาของเซลล์ เกิดการถอดรหัสพันธุกรรม และทำให้เกิดการสังเคราะห์สารน้ำโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น อินเตอร์ลิวคิน-6 อินเตอร์ลิวคิน-1-เบตา เป็นต้น โดยการหลั่งสารน้ำโปรตีนเหล่านี้จะกระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดขาวโพลีมอร์โฟนิวเคลียร์นิวโทรฟิล เกิดการตอบสนองทำให้เกิดการผลิตอนุมูลอิสระออกซิเจน และส่งเสริมให้เกิดการผลิตไนตริกออกไซด์เพิ่ม เมื่อมีการผลิตสารอักเสบเหล่านี้มากขึ้นก็จะยิ่งส่งเสริมให้เกิดการทำลายอวัยวะปริทันต์ (Groeger & Meyle, 2019; Jia et al., 2019) โดยในปัจจุบันมีหลายงานวิจัยที่ใช้สมุนไพรหรือสารสกัดจากธรรมชาติเพื่อศึกษาเกี่ยวกับการลดการอักเสบในโรคเหนือกอักเสบและโรคปริทันต์อักเสบ เพื่อพัฒนาเป็นทางเลือกเสริมในการรักษาโรคปริทันต์ เช่น ชาเขียว เปลือกมังคุด และขมิ้นชัน เป็นต้น (Nagarsi et al., 2015; Rassameemasmaung et al., 2008)

การศึกษานี้เลือกใช้เฮสเพอริดินซึ่งเป็นสารพฤษเคมีที่พบได้มากในเปลือกส้ม โดยนำมาทำการทดสอบผลการลดระดับไนตริกออกไซด์ด้วยวิธีกริสส์ และผลการลดระดับการแสดงออกของยีน IL-6 โดยเฮสเพอริดินเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยการเพิ่มการสร้าง Superoxide dismutase ในเซลล์กระดูกอ่อนมนุษย์ (Tsai et al., 2019) และฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยสามารถลดระดับการแสดงออกของยีน IL-6, IL-1 β ในเซลล์ไลน์โมโนไซต์มนุษย์ (Yeh et al., 2007) ปัจจุบันมีการใช้ยาชื่อ Daflon[®] 500 มิลลิกรัม ซึ่งเป็นยาที่ใช้รักษาโรคหลอดเลือดขอด โดยประกอบด้วย micronized diosmin ร้อยละ 90 และ micronized hesperidin ร้อยละ 10 โดยมีฤทธิ์เพิ่มการบีบตัวของหลอดเลือดดำและลดการซึมผ่านของสารหรือเซลล์บริเวณหลอดเลือดฝอยจึงมีบทบาทลดกระบวนการอักเสบได้ (Lyseng-Williamson & Perry, 2003)

การทดลองเริ่มจากการวัดแนวโน้มการมีชีวิตของเซลล์คล้ายไฟโบร بلاสต์เหนือกปฐมภูมิมนุษย์ซึ่งเป็นเซลล์ที่ได้จากการเก็บชิ้นเนื้อเหนือกจากอาสาสมัคร พบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง เซลล์ในทุกกลุ่มการทดลองมีร้อยละการเจริญเติบโต

มากกว่าร้อยละ 80 และเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกปฐมภูมิมนุษย์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่ปราศจากซีรัมมีอัตราการเจริญเติบโตน้อยที่สุด เมื่อทำการทดสอบความเป็นพิษของเฮสเพอริดินพบว่าเฮสเพอริดินทุกระดับความเข้มข้นไม่เป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจหนูและเซลล์คล้ายไฟโบรบลาสต์เหงือกปฐมภูมิมนุษย์ โดยเซลล์มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่าร้อยละ 80 ทุกกลุ่มการทดลอง

ไนตริกออกไซด์ เป็นโมเลกุลที่มีลักษณะเป็นก๊าซ ถูกผลิตด้วยเอนไซม์อินดิวิซิเบิลไนตริกออกไซด์ซินเทส (inducible nitric oxide synthase; iNOS) ซึ่งมีความสำคัญกับการอักเสบ เมื่อร่างกายได้รับเชื้อก่อโรคหรือสารอักเสบตัวอื่น ๆ จะทำให้เกิดการผลิตเอนไซม์ iNOS เพิ่มขึ้น โดยไนตริกออกไซด์สามารถทำลายเชื้อก่อโรค และทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระจนทำให้เกิดการทำลายอวัยวะปริทันต์ โดยจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าเฮสเพอริดินทุกระดับความเข้มข้น (5, 10 และ 20 ไมโครโมลาร์) สามารถลดระดับไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจหนูได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Sakata และคณะ (2003) พบว่าสารเฮสเพอริดินที่ระดับความเข้มข้น 10, 20 และ 30 ไมโครโมลาร์ สามารถลดระดับไนตริกออกไซด์ที่ผลิตจากเซลล์แมคโครฟาจหนูได้ โดยที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (Sakata et al., 2003) แต่จากการศึกษาในครั้งนี้ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของระดับไนตริกออกไซด์ที่ผลิตจากเซลล์คล้ายไฟโบรบลาสต์เหงือกปฐมภูมิมนุษย์ อาจเนื่องจากการผลิตไนตริกออกไซด์จะแตกต่างกันไปในแต่ละเซลล์ โดยพบว่าเซลล์แมคโครฟาจหนูและวัจะสามารถผลิตไนตริกออกไซด์ได้มากกว่าเซลล์แมคโครฟาจของมนุษย์ เป็นต้น (Aktan, 2004)

สารนำโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น IL-6 และ IL-1 β มีบทบาทในการควบคุมกระบวนการอักเสบในโรคปริทันต์ โดยพบว่า IL-6 มีความสำคัญเกี่ยวกับกระบวนการทำลายกระดูกเข้าฟัน โดยสามารถเหนี่ยวนำเซลล์สลายกระดูก (osteoclast) ได้โดยตรง จากการศึกษาของ Kent และคณะ (1998) เมื่อทำการกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ด้วยไลพอลิแซคคาไรด์ พบว่ามีการแสดงออกของยีน IL-6 เพิ่มขึ้นที่เวลา 4 ชั่วโมงหลังจากการกระตุ้น (Kent et al., 1998) การศึกษาของ Steffen และคณะ (2000) พบว่าหลังการกระตุ้นให้เกิดการอักเสบ ยีน IL-6 จะค่อยๆ เพิ่มขึ้นที่ 2.5 ชั่วโมงและลดลงที่เวลา 6 ชั่วโมง (Steffen et al., 2000) ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงเลือกทดสอบการอักเสบที่ช่วงเวลา 3 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงที่ยังคงมีการแสดงออกของยีน IL-6 อยู่หลังจากการกระตุ้นให้เกิดการอักเสบ จากการศึกษาพบว่ากลุ่มที่ได้รับการเติมไลพอลิแซคคาไรด์เพียงอย่างเดียวมีการแสดงออกของยีน IL-6 มากถึง 9.7 เท่าของกลุ่มควบคุมที่มีเพียงแต่อาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟีทิลโบวายซีรัมร้อยละ 1 โดยปริมาตร และพบว่าเฮสเพอริดินที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ สามารถลดการแสดงออกของยีน IL-6 ได้มากกว่ากลุ่มที่ได้รับการเติมไลพอลิแซคคาไรด์เพียงอย่างเดียว อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยจากการศึกษาของ Yeh และคณะ (2007) ทำการศึกษาผลการลดการอักเสบด้วยเฮสเพอริดินความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ในเซลล์ไลน์โมโนไซต์มนุษย์ พบว่าสามารถลดการแสดงออกของยีน IL-6, IL-1 β , TNF- α และ IL-8 ได้ (Yeh et al., 2007)

เนื่องจากการศึกษานี้เป็นการศึกษานำร่องและใช้เซลล์คล้ายไฟโบรบลาสต์เหงือกปฐมภูมิมนุษย์จากอาสาสมัครเพียง 1 ราย จึงควรศึกษาเพิ่มเติมในเซลล์คล้ายไฟโบรบลาสต์เหงือกปฐมภูมิมนุษย์จากอาสาสมัครรายอื่นๆ และควรทำการศึกษาที่เวลาต่างๆ เพิ่มเติมเพื่อดูแนวโน้มการอักเสบของเซลล์ รวมถึงอาจเลือกใช้ความเข้มข้นที่แตกต่างออกไปเพื่อศึกษาว่าความเข้มข้นใดเหมาะสมในการลดการอักเสบในเซลล์คล้ายไฟโบรบลาสต์เหงือกปฐมภูมิมนุษย์มากที่สุด รวมถึงศึกษาถึงกลไกวิถีในการยับยั้งการอักเสบของเฮสเพอริดินต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกมนุษย์ เพื่อให้เกิดความเข้าใจมากขึ้น

จากผลการศึกษานี้ แสดงให้เห็นถึงความสามารถของเฮสเพอริดินว่ามีแนวโน้มในการลดการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจหนูและเซลล์คล้ายไฟโบรบลาสต์เหงือกปฐมภูมิมนุษย์เมื่อถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย LPS-Pg ซึ่งถือเป็นทางเลือกหนึ่งในการเลือกใช้เฮสเพอริดินในการลดการอักเสบในเซลล์คล้ายไฟโบรบลาสต์เหงือกปฐมภูมิมนุษย์ แต่เนื่องจากการศึกษานี้เป็นการศึกษาในห้องปฏิบัติการซึ่งอาจจะยังไม่สามารถนำไปใช้กับมนุษย์ได้ ควรจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมทางคลินิกต่อไปเพื่อพัฒนาเฮสเพอริดินให้เป็นผลิตภัณฑ์ด้านการอักเสบที่จะสามารถให้เสริมในการรักษาโรคปริทันต์ เช่น การผลิตในรูปแบบเจลใสในร่องเหงือก หรือผลิตในรูปแบบน้ำยาบ้วนปาก เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

- Aktan, F. (2004). iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sciences*, Jun 25;75, 639-653. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.10.042>.
- Groeger, S., & Meyle, J. (2019). Oral Mucosal Epithelial Cells. *Frontiers in Immunology*, 10, 208. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00208>.
- Jepsen, K., & Jepsen, S. (2016). Antibiotics/antimicrobials: Systemic and local administration in the therapy of mild to moderately advanced periodontitis. *Periodontology 2000*, 71(1), 82-112. <https://doi.org/10.1111/prd.12121>.
- Jia, L., Han, N., Du, J., Guo, L., Luo, Z., & Liu, Y. (2019). Pathogenesis of Important Virulence Factors of *Porphyromonas gingivalis* via Toll-Like Receptors. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 262. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00262>.
- Kent, L. W., Rahemtulla, F., Hockett, R. D. J., Gilleland, R. C., & Michalek, S. M. (1998). Effect of lipopolysaccharide and inflammatory cytokines on interleukin-6 production by healthy human gingival fibroblasts. *Infection and Immunity*, 66(2), 608-614. <https://doi.org/10.1128/IAI.66.2.608-614.1998>.
- Kinane, D. F., Stathopoulou, P. G., & Papapanou, P. N. (2017). Periodontal diseases. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, 1-14. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.38>.
- Lyseng-Williamson, K. A., & Perry, C. M. (2003). Micronised Purified Flavonoid Fraction. *Drugs*, 63(1), 71-100. <https://doi.org/10.2165/00003495-200363010-00005>.
- Moon, P.-D., & Kim, H.-M. (2012). Antiinflammatory Effects of Traditional Korean Medicine, JinPi-tang and Its Active Ingredient, Hesperidin in HaCaT cells. *Phytotherapy Research : PTR*, 26, 657-662. <https://doi.org/10.1002/ptr.3627>.
- Nagasri, M., Madhulatha, M., Musalaiah, S., Pasupuleti, M. kumar, Kumar, P., & Krishna, C. (2015). Efficacy of curcumin as an adjunct to scaling and root planning in chronic periodontitis patients: A clinical and microbiological study. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 7, 554. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.163537>.
- Rassameemasuang, S., Sirikulsathean, A., Amornchat, C., Maungmingsook, P., Rojanapanthu, P., & Gritsanaphan, W. (2008). Topical application of *Garcinia mangostana* L. pericarp gel as an adjunct to periodontal treatment. *Complementary Therapies in Medicine*, 16(5), 262-267. <https://doi.org/10.1016/j.ctim.2007.12.004>.
- Sakata, K., Hirose, Y., Qiao, Z., Tanaka, T., & Mori, H. (2003). Inhibition of inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric oxide synthase by flavonoid hesperidin in mouse macrophage cell line. *Cancer Letters*, 199(2), 139-145. [https://doi.org/10.1016/s0304-3835\(03\)00386-0](https://doi.org/10.1016/s0304-3835(03)00386-0).
- Steffen, M. J., Holt, S. C., & Ebersole, J. L. (2000). *Porphyromonas gingivalis* induction of mediator and cytokine secretion by human gingival fibroblasts. *Oral Microbiology and Immunology*, 15(3), 172-180. <https://doi.org/10.1034/j.1399-302X.2000.150305.x>.
- Tsai, Y.-F., Chen, Y.-R., Chen, J.-P., Tang, Y., & Yang, K.-C. (2019). Effect of hesperidin on anti-inflammation and cellular antioxidant capacity in hydrogen peroxide-stimulated human articular chondrocytes. *Process Biochemistry*, 85, 175-184. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.07.014>.

Yeh, C.-C., Kao, S.-J., Lin, C.-C., Wang, S.-D., Liu, C.-J., & Kao, S.-T. (2007). The immunomodulation of endotoxin-induced acute lung injury by hesperidin in vivo and in vitro. *Life Sciences*, 80(20), 1821-1831. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.01.052>.

Data Availability Statement: The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Conflicts of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.



Copyright: © 2023 by the authors. This is a fully open-access article distributed under the terms of the Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0).