

SPECTRAL IMAGING AND BIOCHEMICAL PROFILES OF DRUG-INDUCED GINGIVAL OVERGROWTH AND NORMAL GINGIVA: A PILOT STUDY

Punnapich SUPANICH^{1*}, Poramaporn KLANRIT¹, Doosadee HORMDEE¹, Patutong CHATCHAWAL², Molin WONGWATTANAKUL², Supaporn SINGHARA¹, Pawinee WISETSAK¹ and Patcharaporn TIPPAYAWAT²

1 Faculty of Dentistry, Khon Kaen University, Thailand; punnapich.s@kkumail.com (Corresponding Author)

2 Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University, Thailand

ARTICLE HISTORY

Received: 2 June 2023

Revised: 21 June 2023

Published: 3 July 2023

ABSTRACT

There is still no solid consensus on the pathogenesis of drug-induced gingival overgrowth (DIGO), of which the relapse of the lesion can be expected after the treatment. Knowledge of the biochemical component disparities between DIGO tissue and normal gingival tissue may clarify more comprehension of the DIGO pathogenesis and lead to more effective management. FTIR microspectroscopy is a technique that can specify the biochemical components of biological substances by analyzing their spectral profiles. The objectives of this study were to analyze and compare the spectral profiles, which reflect the biochemical components, between DIGO and normal gingiva, by using the FTIR microspectroscopy on DIGO and normal gingival tissue in the form of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue (FFPE), three samples from each tissue type. The result showed that in wavenumbers of 1800-900 cm⁻¹, there was no difference in absorbance intensity and peaks of average spectra between normal and DIGO gingival epithelium. The spectral difference analysis could not distinguish between normal and DIGO epithelium, although DIGO connective tissue showed higher absorbance intensity than normal connective tissue. In addition, the peaks of average spectra between DIGO connective tissue and normal connective tissue were located at the same wavenumbers. There was a difference in coils and β -sheet ratio in protein between normal and DIGO connective tissue. However, the spectral difference analysis could not distinguish between normal and DIGO connective tissue.

Keywords: Drug-induced gingival overgrowth, FTIR microspectroscopy, Spectral profile

CITATION INFORMATION: Supanich, P., Klanrit, P., Hormdee, D., Chatchawal, P., Wongwattanakul, M., Singhara, S., Wisetsak, P., & Tipayawat, P. (2023). Spectral Imaging and Biochemical Profiles of Drug-Induced Gingival Overgrowth and Normal Gingiva: A Pilot Study. *Procedia of Multidisciplinary Research*, 1(7), 96

ภาพถ่ายสเปกตรัมและรูปแบบขององค์ประกอบทางชีวเคมีของภาวะเหงือกโต สาเหตุจากยา และเหงือกปกติ: การศึกษานำร่อง

ปุณณพิชญ์ สุพานิช¹, ปริมาภรณ์ กลั่นฤทธิ์¹, ดุษฎี หอมดี¹, พรุทอง ชัชวาลย์², โมลินี ว่องวัฒนากุล², สุภาภรณ์ สิงห์รา¹,
ภาวิณี วิเศษศักดิ์¹ และ พิชราภรณ์ ทิพย์วัฒน์²

1 คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น; punnapich.s@kkumail.com (ผู้ประพันธ์บรรณกิจ)

2 คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทคัดย่อ

ปัจจุบันยังไม่มีข้อสรุปชัดเจนเกี่ยวกับพยาธิกำเนิดของเหงือกโตสาเหตุจากยา ซึ่งเป็นรอยโรคอาจเกิดซ้ำหลังการรักษา ดังนั้นองค์ความรู้เกี่ยวกับองค์ประกอบทางชีวเคมีระหว่างเหงือกโตสาเหตุจากยาและเหงือกปกติอาจนำไปสู่การจัดการรอยโรคที่มีประสิทธิภาพ เอพทีไออาร์ไมโครสเปกโตรสโคปี เป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์องค์ประกอบทางชีวเคมีของสารผ่านการวิเคราะห์สเปกตรัมการดูดกลืนรังสีอินฟราเรด การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์และเปรียบเทียบสเปกตรัมการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดของเหงือกโตสาเหตุจากยาและเหงือกปกติ โดยอาศัยเทคนิคดังกล่าวในการวิเคราะห์การดูดกลืนสเปกตรัมของเนื้อเยื่อเหงือกที่ถูกตรึงด้วยฟอร์มาลินและฝังในพาราฟินที่ได้รับการวินิจฉัยเป็นเหงือกโตสาเหตุจากยาและเหงือกปกติ จำนวนกลุ่มละสามตัวอย่าง ผลการศึกษาพบว่าในช่วงเลขคลื่น $1800-900\text{ cm}^{-1}$ เยื่อบุผิวของเหงือกโตสาเหตุจากยามีความเข้มของการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดและพีคของสเปกตรัมเฉลี่ยไม่แตกต่างจากเหงือกปกติ และเมื่อใช้การวิเคราะห์ความแตกต่างของสเปกตรัมพบว่าไม่สามารถแยกแยะความแตกต่างระหว่างเยื่อบุผิวของเหงือกโตสาเหตุจากยาและเหงือกปกติ ส่วนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือกโตสาเหตุจากยามีความเข้มของการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดสูงกว่าเหงือกปกติ โดยตำแหน่งการเกิดพีคของสเปกตรัมเฉลี่ยไม่แตกต่างจากเหงือกปกติ แต่พบความแตกต่างของสัดส่วนโครงสร้างคอลเลเจนและแผ่นบีตาของโปรตีนระหว่างเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในเหงือกโตสาเหตุจากยาและเหงือกปกติ อย่างไรก็ตาม เมื่อใช้การวิเคราะห์ความแตกต่างของสเปกตรัมพบว่าไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือกโตสาเหตุจากยาและเหงือกปกติ

คำสำคัญ: เหงือกโตสาเหตุจากยา, เอพทีไออาร์ ไมโครสเปกโตรสโคปี, รูปแบบสเปกตรัม

ข้อมูลการอ้างอิง: ปุณณพิชญ์ สุพานิช, ปริมาภรณ์ กลั่นฤทธิ์, ดุษฎี หอมดี, พรุทอง ชัชวาลย์, โมลินี ว่องวัฒนากุล, สุภาภรณ์ สิงห์รา, ภาวิณี วิเศษศักดิ์ และ พิชราภรณ์ ทิพย์วัฒน์. (2566). ภาพถ่ายสเปกตรัมและรูปแบบขององค์ประกอบทางชีวเคมีของภาวะเหงือกโตสาเหตุจากยา และเหงือกปกติ: การศึกษานำร่อง. *Procedia of Multidisciplinary Research*, 1(7), 96

บทนำ

ภาวะเหงือกโตสาเหตุจากยา (Drug-induced gingival overgrowth) ก่อให้เกิดปัญหาความสวยงาม การบดเคี้ยว และการทำความสะอาดฟัน ซึ่งอาจนำไปสู่การสูญเสียฟัน ยาสามกลุ่มหลักที่มีรายงานว่าทำให้ผู้ป่วยเกิดภาวะเหงือกโตภายหลังการใช้ ได้แก่ 1) ยากดภูมิคุ้มกัน เช่น ไซโคลสปอริน (Cyclosporin) 2) ยากลุ่มยับยั้งช่องแคลเซียม (Calcium channel blocker) เช่น นิเฟดิพีน (Nifedipine) แอมโลดิพีน (Amlodipine) และ 3) ยากันชัก เช่น เฟนิโทอิน (Phenytoin) ทั้งนี้ มีผู้ป่วยที่มีโรคประจำตัวที่จำเป็นต้องใช้ยากกลุ่มดังกล่าวเป็นระยะเวลานาน และมีภาวะเหงือกโตที่จำเป็นต้องได้รับการรักษา (Hallmon et al., 1999)

การศึกษาทางมิวชีววิทยา (Histology) และอิมมูโนฮิสโตเคมี (Immunohistochemistry) ที่ผ่านมาก่อให้เกิดทฤษฎีต่างๆ เกี่ยวกับพยาธิกำเนิดของเหงือกโตสาเหตุจากยา โดยมีหลายปัจจัยที่มีบทบาท เช่น บทบาทของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในเหงือกบางกลุ่มที่มีแนวโน้มทำให้เกิดภาวะเหงือกโตสาเหตุจากยา บทบาทของสารสื่ออักเสบ (Inflammatory cytokines) ซึ่งส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนและทำหน้าที่ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ เช่น การสร้างเอนไซม์คอลลาจีเนส (Collagenase) ที่มีหน้าที่ย่อยสลายคอลลาเจน และบทบาทของเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส (Matrix metalloproteinase, MMP) โดยการที่ยาไปยับยั้งช่องประจุบวก (cation channel; $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$) และลดการนำประจุบวกเข้าสู่เซลล์ ทำให้ลดการนำกรดโฟลิก (Folic acid) เข้าสู่เซลล์ไฟโบรบลาสต์ ซึ่งส่งผลรบกวนการสังเคราะห์เอนไซม์ MMP-1 และ 2 และ Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) จึงเกิดความล้มเหลวในการกระตุ้นเอนไซม์คอลลาจีเนส ทำให้ลดการสลายและเกิดการสะสมของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และเกิดลักษณะเหงือกบวมโตขึ้น (Brown et al., 2015) นอกจากนี้ยังมีปัจจัยเสี่ยงต่างๆ เช่น อายุ เพศ เชื้อชาติ พันธุกรรม ตัวยา และอนามัยช่องปาก อย่างไรก็ตามไม่ใช่ผู้ป่วยทุกรายจะเกิดภาวะเหงือกโตภายหลังจากใช้ยา และแม้ผู้ป่วยได้รับยาชนิดเดียวกันแต่สามารถมีความรุนแรงของเหงือกโตที่แตกต่างกัน (Seymour et al., 2000) ปัจจุบันจึงยังไม่มีข้อสรุปที่ชัดเจนเกี่ยวกับพยาธิกำเนิดของเหงือกโตสาเหตุจากยา สำหรับแนวทางการจัดการภาวะเหงือกโตสาเหตุจากยาเริ่มจากปรึกษาแพทย์ประจำตัวผู้ป่วยเพื่อเปลี่ยนกลุ่มยา ร่วมกับการขูดหินน้ำลาย เคลารากฟัน หรือบางกรณีอาจรวมกับการผ่าตัด อย่างไรก็ตามผู้ป่วยบางส่วนจำเป็นต้องใช้ยากกลุ่มเดิม ซึ่งในผู้ป่วยกลุ่มดังกล่าวพบว่าเหงือกมักกลับมาบวมโตแม้ได้รับการผ่าตัดทำให้ต้องรับการผ่าตัดหลายครั้ง การมีความรู้ความเข้าใจที่ชัดเจนขึ้นเกี่ยวกับพยาธิกำเนิดของภาวะเหงือกโตจากยาจึงอาจนำไปสู่วิธีการจัดการที่มีประสิทธิภาพและยั่งยืนมากขึ้น ซึ่งการทราบความแตกต่างระหว่างองค์ประกอบทางชีวเคมีของเหงือกโตจากยาและเหงือกปกติอาจนำไปสู่ความเข้าใจที่มากขึ้นในเรื่องดังกล่าว

อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี (Infrared spectroscopy) เป็นเทคนิคที่สามารถตรวจสอบองค์ประกอบทางชีวเคมีของสารประกอบจากการวิเคราะห์สเปกตรัมการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดของสารนั้น เนื่องจากพันธะเคมีและหมู่ฟังก์ชันแต่ละชนิดในโมเลกุลของสารประกอบจะเกิดการสั่นและปรากฏเป็นพีคบนสเปกตรัมเมื่อได้รับรังสีอินฟราเรดที่มีความถี่เฉพาะตัวที่แตกต่างกัน ปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิคเป็นฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์ม อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR) ซึ่งมีข้อดีกว่าเทคนิคแบบดั้งเดิมหลายประการเช่น ลดสัญญาณรบกวนลง และมีความละเอียดของการแสดงผลมากขึ้น (Ismail et al., 1997) เทคนิคนี้สามารถใช้ตรวจสอบตัวอย่างทางชีวภาพได้หลากหลาย ตั้งแต่ของเหลวชีวภาพ เซลล์ที่มีชีวิต และเนื้อเยื่อที่ถูกตรึงด้วยฟอร์มาลินและฝังในพาราฟิน (Formalin-fixed, paraffin-embedded tissue, FFPE) โดยหากต้องการเลือกบริเวณที่เฉพาะในการวิเคราะห์สามารถใช้กล้องจุลทรรศน์ร่วมด้วย เรียกว่าเทคนิคเอฟทีไออาร์ไมโครสเปกโตรสโกปี (FTIR microspectroscopy) (Baker et al., 2014) ที่ผ่านมาในทางทันตกรรมมีการศึกษาเพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดระหว่างเหงือกที่เป็นมะเร็งช่องปากชนิดสควamous cell carcinoma และเหงือกปกติ (Fukuyama et al., 1999) ระหว่างน้ำลายของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบและผู้ป่วยที่มีสภาวะปริทันต์ดี (Fujii et al., 2016) อย่างไรก็ตามยังไม่มีเคยมีผู้ศึกษาความแตกต่างของการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดระหว่างเหงือกโตสาเหตุจากยาและเหงือกปกติ ซึ่งอาจนำไปสู่ความเข้าใจหรือองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับพยาธิกำเนิดของรอยโรคนี้ และวิธีการจัดการที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น

วิธีการวิจัย

การเตรียมตัวอย่างจากชิ้นเนื้อในบล็อกพาราฟิน

การศึกษานี้เป็นการศึกษาในห้องปฏิบัติการที่ได้รับการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (เลขที่โครงการ HE 662103) โดยทำการศึกษาในเนื้อเยื่อเหลืองที่ถูกตรึงด้วยฟอร์มาลินและฝังในพาราฟินของผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยเป็นเนื้องอกโตสาเหตุจากยาเสพติด จำนวน 3 ราย และผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยเป็นเนื้อเยื่อเนื้องอกปกติ จำนวน 3 ราย (เพศหญิง 2 ราย เพศชาย 1 ราย) ที่มีอายุระหว่าง 35-85 ปี ชิ้นเนื้อดังกล่าวเป็นสิ่งหลงเหลือจากการส่งตรวจทางพยาธิวิทยา โดยบล็อกพาราฟินถูกเก็บไว้ที่ห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยาของปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยมีข้อมูลบริเวณที่ตัดชิ้นเนื้อส่งตรวจ และยาที่ใช้ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ข้อมูลบริเวณที่ตัดชิ้นเนื้อส่งตรวจ และยาที่ผู้ป่วยใช้ที่มีรายงานว่าสัมพันธ์กับการเกิดเนื้องอกโต

ชนิดของเนื้อเยื่อ	ลำดับ	บริเวณที่ตัดชิ้นเนื้อส่งตรวจ	ยาที่เกี่ยวข้อง
เนื้องอกปกติ	N1	เนื้องอกบริเวณพันกรามน้อยบนซ้ายซี่ที่ 1 และ 2 พันกรามบนซ้ายซี่ที่ 1	-
	N2	เนื้องอกบริเวณพันกรามล่างขวาซี่ที่ 3	-
	N3	เนื้องอกบริเวณพันกรามล่างซ้าย	-
เนื้องอกโตสาเหตุจากยา	D1	เนื้องอกบริเวณพันกรามบนขวาซี่ที่ 1 และ 2	เฟนิโทอิน เบนโซไดอะซีปีน (Benzodiazepine)
	D2	เนื้องอก (ไม่ระบุบริเวณ)	แอมโลดิพีน
	D3	เนื้องอกบริเวณฟันตบบนขวาซี่ที่ 2	แอมโลดิพีน

กระบวนการการตัดชิ้นเนื้อเริ่มจากเตรียมชิ้นเนื้อที่อยู่ในบล็อกพาราฟินไว้บนแท่นน้ำแข็งอย่างน้อย 10 นาที ตัดชิ้นเนื้อให้มีความหนา 5 ไมโครเมตรต่อเนื่องกันเป็นแถบเรียบด้วยเครื่องไมโครโทม (microtome) รุ่นอีอาร์เอ็ม 3100 (ERM 3100) นำริบบอนวางบนแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 30 เพื่อให้เกิดการแผ่ เทแถบเรียบบนลงในอ่างน้ำ (water bath) อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียสที่มีเจลาติน (gelatin) ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 อุณหภูมิของน้ำจะช่วยให้ริบบอนขยายตัวได้อย่างเต็มที่ ใช้ปากคีบแยกริบบอนออก เลือกลำแบนเรียบบนที่ดีที่สุดโดยใช้สไลด์ไปซ้อนด้านล่าง และแผ่นริบบอนจะเกาะติดกับสไลด์ได้แน่น สไลด์ที่ใช้มี 2 ชนิด ได้แก่ สไลด์แก้ว (glass slide) และสไลด์พิเศษ 0.2 % gelatin-coated MirrIR slide (Kevley technologies, Ohio, USA) เมื่อนำสไลด์ทั้ง 2 ชนิดซ้อนริบบอนเรียบเรียบร้อยแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นทิ้งให้เย็นตัวลงที่อุณหภูมิห้อง

การย้อมสีชิ้นเนื้อบนสไลด์แก้วด้วยสีอีมาทอกซิลินและอีโอซิน (Hematoxylin and Eosin, H&E) และเก็บภาพทางมิวชีววิทยา

นำสไลด์แก้วที่มีชิ้นเนื้อมาจุ่มในภาชนะหรือโถบรรจุ xylene 3 โถๆ ละ 3 นาทีเพื่อกำจัดพาราฟิน (deparaffinization) จากนั้นจุ่มในโถบรรจุ ethyl alcohol ร้อยละ 100 2 โถๆ ละ 2 นาที ร้อยละ 95 2 โถๆ ละ 2 นาที และ tap water 5 นาที เพื่อเป็นการเติมน้ำ (hydration) จากนั้นจุ่มใน Mayer's Hematoxylin 15 นาที tap water 5 นาที (primary staining) และจุ่มใน acid alcohol 1 ถึง 2 ครั้ง tap water 2 นาที ammonia water 15 วินาที เพื่อให้สีอีมาทอกซิลินเข้มข้น ตามด้วย tap water อีกครั้งเป็นเวลา 2 นาที (differentiation) จากนั้นจุ่มใน Eosin 10 ถึง 30 วินาที (counterstaining) และจุ่มใน ethyl alcohol ร้อยละ 95 2 โถๆ ละ 1 นาที ตามด้วย ethyl alcohol ร้อยละ 100 3 โถๆ ละ 1 นาที (dehydration)

จากนั้นจุ่มใน xylene 3 โถๆ ละ 2 นาที (clearing) แล้วจึงเก็บภาพทางมิวสวียาของเนื้อเยื่อในรูปแบบสไลด์ดิจิทัล (digital slides) ด้วยเครื่องสแกนสไลด์ระบบดิจิทัล (PANNORAMIC MIDI II, 3DHISTECH Ltd, Hungary)

การกำจัดพาราฟินออกจากสไลด์พิเศษ (Deparaffinization)

นำสไลด์พิเศษ 0.2 % gelatin-coated MirrIR slide ที่มีชิ้นเนื้อมาจุ่มในภาชนะหรือโถบรรจุ xylene 3 โถๆ ละ 3 นาที เพื่อกำจัดพาราฟิน จากนั้นจุ่มใน ethanol ร้อยละ 100 2 โถๆ ละ 3 นาที ร้อยละ 95 2 โถๆ ละ 2 นาที (hydration) จากนั้นล้างด้วย tap water 5 นาที deionized water 5 นาที แล้วทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง และนำไปเก็บไว้ในตู้ดูดความชื้นอย่างน้อย 1 วันก่อนนำไปศึกษา

การบันทึกภาพและข้อมูลสเปกตรัม

ใช้ภาพทางมิวสวียาของเนื้อเยื่อบนสไลด์แก้วในการอ้างอิงเพื่อเลือกบริเวณที่จะบันทึกภาพและข้อมูลสเปกตรัมของเนื้อเยื่อบนสไลด์พิเศษ 0.2 % gelatin-coated MirrIR slide บันทึกภาพและข้อมูลสเปกตรัมของเนื้อเยื่อบนสไลด์พิเศษในบริเวณที่เลือกด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Hyperion 3000, Bruker) ที่เชื่อมกับ FTIR spectrometer (Tensor II, Bruker) ใช้หัวเลนส์กำลังขยาย 15 เท่า ทั้งนี้กล้องจุลทรรศน์เชื่อมกับ liquid-nitrogen-cooled mercury cadmium telluride (MCT) 64 x 64 pixel focal plane array (FPA) mid-infrared detector ซึ่งเมื่อใช้ร่วมกับเลนส์วัตถุจะได้พิกเซล (pixel) ขนาด $5.5 \times 5.5 \mu\text{m}^2$ กำหนดค่าตัวแปรในการบันทึกภาพและวัดข้อมูลสเปกตรัม คือ 128 co-added scans, 4 pixel aggregation และ 8 cm^{-1} resolution reflection mode

การสร้าง chemical image

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลสเปกตรัมเบื้องต้นด้วย Atmospheric compensation และปรับขอบนุ่ม 13 จุดบนข้อมูลสเปกตรัม จากนั้นสร้าง chemical image จากระดับความเข้มของการดูดกลืนแสงจากพื้นที่ใต้กราฟ (integrated areas) ในช่วง $1720\text{--}1480 \text{ cm}^{-1}$ (ช่วงคลื่นของโปรตีนเอไมด์ I และ เอไมด์ II) และ $1300\text{--}1200 \text{ cm}^{-1}$ (ช่วงคลื่นของโปรตีนเอไมด์ III) ด้วยโปรแกรม OPUS version 7.0 (Bruker Optics GmbH & Co. KG, Ettlingen, Germany)

การเปรียบเทียบสเปกตรัมเฉลี่ย และการวิเคราะห์ความแตกต่างของสเปกตรัมระหว่างเหงือกปกติและเหงือกโตสาเหตุจากยา (Average spectra comparison and spectral analysis)

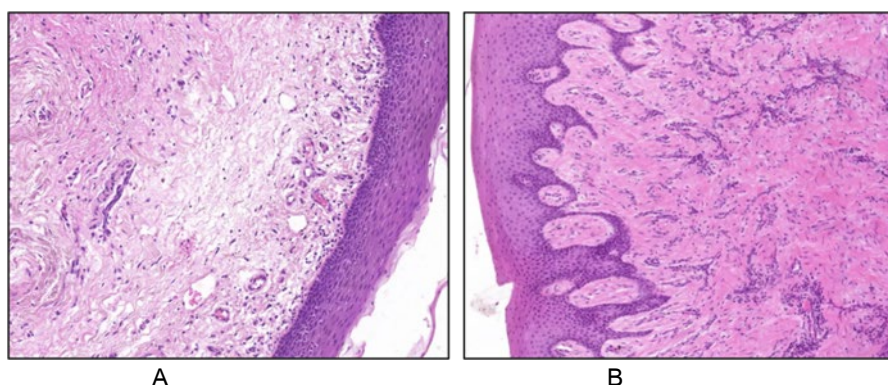
ใช้โปรแกรม Unscrambler X (version 10.5, Camo Software, Oslo, Norway) ในขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

- 1) การสร้างกราฟเปรียบเทียบสเปกตรัมเฉลี่ยของเยื่อบุผิวและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระหว่างเหงือกปกติและเหงือกโตสาเหตุจากยา จากข้อมูลสเปกตรัมเฉลี่ยแต่ละกลุ่มโดยปรับขอบนุ่ม 13 จุดด้วยอัลกอริทึม Savitzsky-Golay และ baseline correction ในช่วง fingerprint region ($1800\text{--}900 \text{ cm}^{-1}$)
 - 2) การแปลงข้อมูลการเปรียบเทียบสเปกตรัมเฉลี่ยเป็นอนุพันธ์อันดับสองด้วยอัลกอริทึม Savitzsky-Golay ปรับขอบนุ่ม 13 จุด, third-order polynomial ในช่วง fingerprint region ($1800\text{--}900 \text{ cm}^{-1}$)
 - 3) วิเคราะห์ความแตกต่างข้อมูลสเปกตรัมระหว่างเนื้อเยื่อเหงือกโตสาเหตุจากยาและเนื้อเยื่อเหงือกปกติในบริเวณเยื่อบุผิวและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันโดยวิธีการวิเคราะห์ Principal component regression (PCR)
- ใช้สถิติเชิงพรรณนาในการเปรียบเทียบสเปกตรัมเฉลี่ย วิเคราะห์ข้อมูลหลายตัวแปรเพื่ออธิบายความแตกต่างสเปกตรัมระหว่างเหงือกปกติและเหงือกโตสาเหตุจากยา

ผลการวิจัย

การเปรียบเทียบลักษณะทางมิกซ์วิทยา

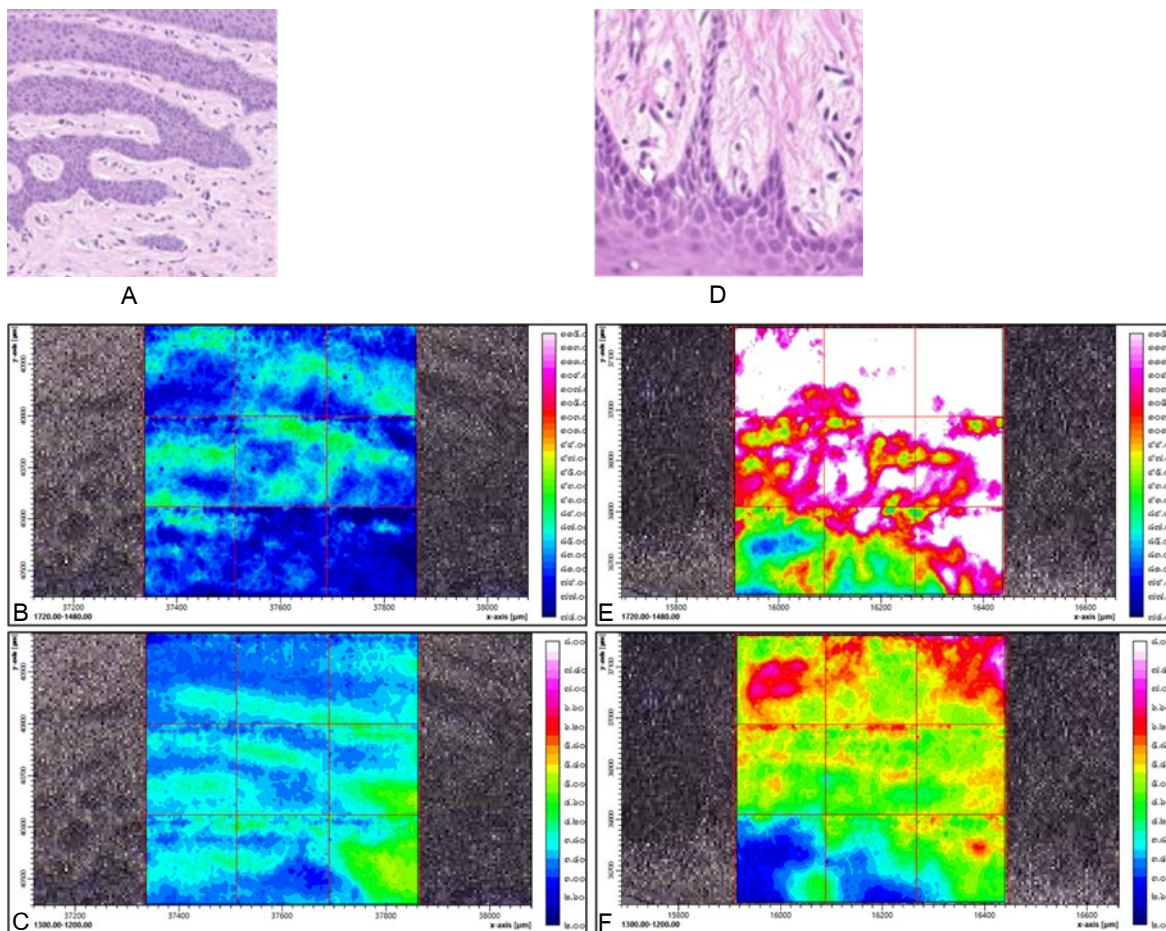
ภาพมิกซ์วิทยาของเหงือกปกติและเหงือกโตสาเหตุจากยาแสดงให้เห็นเซลล์เยื่อบุผิวลักษณะหลายเหลี่ยมเรียงตัวหลายชั้น โดยเยื่อบุผิวของเหงือกโตสาเหตุจากยาจะมีลักษณะหนากว่า และมีลักษณะคล้ายนิ้วมือนิ้วยาวเข้ามาในชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชัดเจนกว่าเหงือกปกติ ชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Connective tissue) ประกอบด้วยเนื้อเยื่อเส้นใย (Fibrous tissue) ลักษณะเป็นแถบสีชมพู เซลล์ไฟโบรบลาสต์ลักษณะคล้ายรูปกระสวย และเซลล์อักเสบลักษณะกลมและมีนิวเคลียสดำสีม่วงเข้ม โดยเหงือกโตสาเหตุจากยามีความหนาแน่นของเนื้อเยื่อเส้นใยและเซลล์อักเสบที่มากกว่าเหงือกปกติ (ภาพที่ 1 A และ B)



ภาพที่ 1 ลักษณะทางมิกซ์วิทยาบริเวณเยื่อบุผิวและเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน A) เหงือกปกติ B) เหงือกโตสาเหตุจากยา

การเปรียบเทียบ chemical image

ภาพ chemical image แสดงระดับความเข้ม (Intensity) การดูดกลืนรังสีอินฟราเรดในช่วงเลขคลื่น $1720-1480\text{ cm}^{-1}$ และ $1300-1200\text{ cm}^{-1}$ ที่แตกต่างกันในบริเวณต่างๆ ด้วยระดับของสี พบว่าระดับความเข้มของสเปกตรัมเยื่อบุผิวในภาพที่ 2 B และ E มีความใกล้เคียงกันโดยเป็นระดับสีเขียว แสดงว่าเยื่อบุผิวของทั้งเหงือกปกติและเหงือกโตสาเหตุจากยามีระดับความเข้มของการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดช่วงเลขคลื่น $1720-1480\text{ cm}^{-1}$ ใกล้เคียงกัน เช่นเดียวกับระดับความเข้มของการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดช่วงเลขคลื่น $1300-1200\text{ cm}^{-1}$ ของเยื่อบุผิวของทั้งสองกลุ่มตัวอย่าง ซึ่งแสดงเป็นระดับสีน้ำเงินในภาพที่ 2 C และ F ส่วนบริเวณเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน พบว่าระดับความเข้มสเปกตรัมเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในตัวอย่างเหงือกปกติในภาพที่ 2 B เป็นระดับสีน้ำเงิน ขณะที่ระดับความเข้มสีของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในตัวอย่างเหงือกโตสาเหตุจากยา ในภาพที่ 2 E เป็นระดับสีชมพูถึงขาว แสดงว่าเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือกปกติมีระดับความเข้มของการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดช่วงเลขคลื่น $1720-1480\text{ cm}^{-1}$ ต่ำกว่าเหงือกโตสาเหตุจากยา และเมื่อวิเคราะห์ระดับความเข้มของการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดช่วงเลขคลื่น $1300-1200\text{ cm}^{-1}$ พบระดับความเข้มสีในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของตัวอย่างเหงือกปกติในภาพที่ 2 C เป็นระดับสีเขียว ในขณะที่ระดับความเข้มสีของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในตัวอย่างเหงือกโตสาเหตุจากยาในภาพที่ 2 F เป็นระดับสีแดงถึงชมพู แสดงว่าเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือกปกติมีระดับความเข้มของการดูดกลืนรังสีในช่วงคลื่นนี้ต่ำกว่าเหงือกโตสาเหตุจากยาเช่นเดียวกัน



ภาพที่ 2 ลักษณะทางมิถุนวิทยา และ chemical image บริเวณเยื่อบุผิวและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของถุงอิก

A) ภาพมิถุนวิทยาของถุงอิกปกติ

B) chemical image ที่ช่วงเลขคลื่น $1720-1480\text{ cm}^{-1}$ ของถุงอิกปกติ

C) chemical image ที่ช่วงเลขคลื่น $1300-1200\text{ cm}^{-1}$ ของถุงอิกปกติ

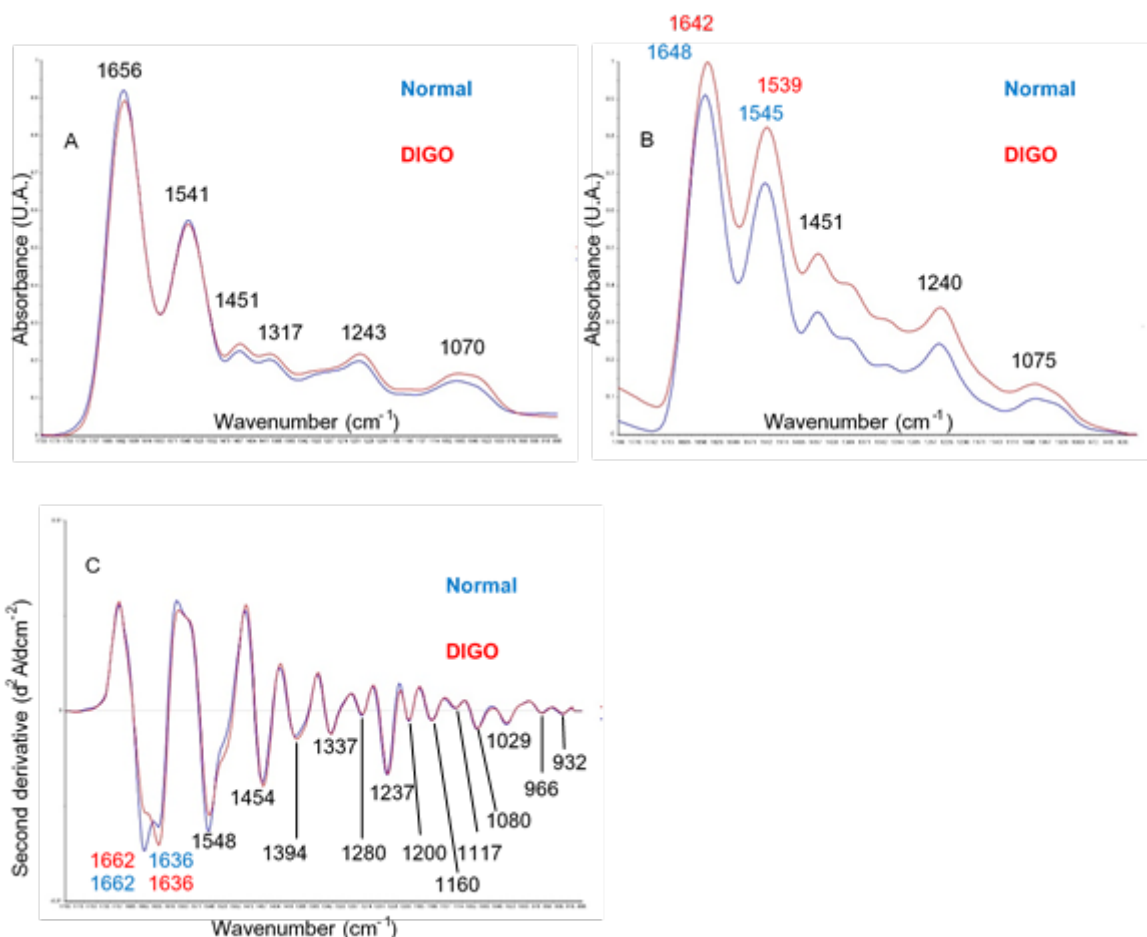
D) ภาพมิถุนวิทยาของถุงอิกโตสาเหตุจากยา

E) chemical image ที่ช่วงเลขคลื่น $1720-1480\text{ cm}^{-1}$ ของถุงอิกโตสาเหตุจากยา

F) chemical image ที่ช่วงเลขคลื่น $1300-1200\text{ cm}^{-1}$ ของถุงอิกโตสาเหตุจากยา

การเปรียบเทียบสเปกตรัมเฉลี่ย

เมื่อเปรียบเทียบสเปกตรัมเฉลี่ยของการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดเฉลี่ยในช่วง $1800-900\text{ cm}^{-1}$ ระหว่างถุงอิกปกติและถุงอิกโตสาเหตุจากยาที่ผ่านการปรับขอบนูนและ baseline correction พบว่าเยื่อบุผิวของถุงอิกปกติและถุงอิกโตสาเหตุจากยามีพีคการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดตรงกัน ได้แก่ 1656 cm^{-1} , 1541 cm^{-1} , 1451 cm^{-1} , 1317 cm^{-1} , 1243 cm^{-1} และ 1070 cm^{-1} โดยมีระดับความสูงของพีคใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 3 A) ส่วนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของถุงอิกปกติและถุงอิกโตสาเหตุจากยามีพีคการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดตรงกัน โดยถุงอิกโตสาเหตุจากยามีระดับความสูงของพีคทุกตำแหน่งสูงกว่าถุงอิกปกติ อย่างไรก็ตามพบว่าในช่วง $1700-1600\text{ cm}^{-1}$ และ $1600-1500\text{ cm}^{-1}$ มีแนวโน้มของตำแหน่งพีคที่แตกต่างกัน (ภาพที่ 3 B) ซึ่งเมื่อนำข้อมูลมาแปลงเป็นอนุพันธ์อันดับสองพบว่าเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของถุงอิกทั้งสองกลุ่มมีตำแหน่งการเกิดพีคตรงกัน แต่ถุงอิกปกติมีระดับของพีคที่ 1662 cm^{-1} สูงกว่า 1636 cm^{-1} ในขณะที่ถุงอิกโตสาเหตุจากยามีระดับของพีคที่ 1662 cm^{-1} ต่ำกว่า 1636 cm^{-1} (ภาพ 3 C)



ภาพที่ 3 กราฟเปรียบเทียบสเปกตรัมเฉลี่ยระหว่างเหือกปกติ (Normal) และเหือกโตสาเหตุจากยา (DIGO) (1800-900 cm^{-1}) (เส้นสีน้ำเงิน = เหือกปกติ) (เส้นสีแดง = เหือกโตสาเหตุจากยา)

A กราฟเปรียบเทียบสเปกตรัมเฉลี่ยระหว่างเยื่อผิวในเหือกปกติและเหือกโตสาเหตุจากยา

(ปรับขอบนุ่ม 13 จุด และ baseline correction)

B กราฟเปรียบเทียบสเปกตรัมเฉลี่ยระหว่างเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในเหือกปกติและเหือกโตสาเหตุจากยา

(ปรับขอบนุ่ม 13 จุด และ baseline correction)

C กราฟเปรียบเทียบสเปกตรัมเฉลี่ยระหว่างเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในเหือกปกติและเหือกโตสาเหตุจากยา

(อนุพันธ์อันดับ 2)

การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างเหือกปกติจากเหือกโตสาเหตุจากยาด้วยวิธี **Principal component regression (PCR)**

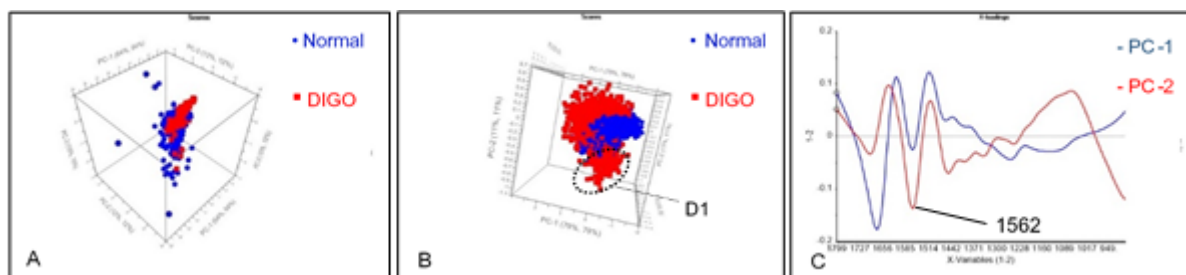
1) ชั้นเยื่อผิว

เมื่อวิเคราะห์ PCR ในช่วงเลขคลื่น 1800-900 cm^{-1} พบว่าไม่สามารถแยกความแตกต่างของสเปกตรัมจากเหือกปกติและเหือกโตสาเหตุจากยาออกจากกันได้ (ภาพที่ 4 A)

2) ชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน

เมื่อวิเคราะห์ PCR ในช่วงเลขคลื่น 1800-900 cm^{-1} พบว่าไม่สามารถแยกความแตกต่างของสเปกตรัมจากเหือกปกติและเหือกโตสาเหตุจากยาออกจากกันได้ (ภาพที่ 4 B) อย่างไรก็ตามสเปกตรัมในบริเวณ PC-1 negative PC-2

negative ของตัวอย่างเหงือกโตสาเหตุจากยา 1 ราย มีลักษณะไม่เกาะกลุ่มกับสเปกตรัมส่วนใหญ่ (ภาพที่ 4 B) ซึ่งจาก loading plot พบว่าพีคที่สัมพันธ์กับสเปกตรัมที่อยู่ในบริเวณดังกล่าวคือ 1562 cm^{-1} (ภาพที่ 4 C)



ภาพที่ 4 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างเหงือกปกติ (Normal) และเหงือกโตสาเหตุจากยา (DIGO) ด้วยวิธี Principal component regression (PCR) (สีน้ำเงิน = เหงือกปกติ) (สีแดง = เหงือกโตสาเหตุจากยา) ($1800\text{-}900\text{ cm}^{-1}$)
 A PCR ระหว่างเยื่อผิวในเหงือกปกติและเหงือกโตสาเหตุจากยา
 B PCR ระหว่างเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในเหงือกปกติและเหงือกโตสาเหตุจากยา
 C Loading plot ของการวิเคราะห์ PCR ระหว่างเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในเหงือกปกติ และเหงือกโตสาเหตุจากยา

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

โครงสร้างของเหงือกประกอบด้วยเยื่อผิวและเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ผลการศึกษาทางมิวชีววิทยาในการศึกษาที่สอดคล้องกับการศึกษาอื่นๆ โดยพบว่าเหงือกโตสาเหตุจากยามีลักษณะทางมิวชีววิทยาแตกต่างจากเหงือกปกติทั้งในชั้นเยื่อผิวและเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เซลล์ชั้นเยื่อผิวมีส่วนยื่นเยื่อผิว (rete ridge) ยื่นเข้ามาในชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเด่นชัดกว่าเหงือกปกติ ส่วนในชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันมีปริมาณเส้นใยและเซลล์อักเสบเพิ่มขึ้นเทียบกับเหงือกปกติ (Hallmon et al., 1999) ลักษณะทางมิวชีววิทยาดังกล่าวยังสอดคล้องกับผลการศึกษาในอดีตเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงทางอิมมูโนฮิสโตเคมีของเหงือกโตสาเหตุจากยาที่พบว่าชั้นเยื่อผิวของเหงือกโตสาเหตุจากยาจะมีการแสดงออกของ Ki-67 โปรตีน p53 และ Bcl-2 ซึ่งเกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวของเซลล์เคอราติโนไซต์ กระบวนการเกิดเนื้องอก และการยับยั้งการตายของเซลล์เคอราติโนไซต์ตามปกติ ตามลำดับ มากกว่าเหงือกปกติ นอกจากนี้ในชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือกโตสาเหตุจากยามีการเปลี่ยนแปลงระดับไซโตไคน์ต่างๆ เช่น Interleukin-6 MMP และ TIMP ไปในทิศทางที่ทำให้มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์ เพิ่มการสร้างและยับยั้งการทำลายเมทริกซ์นอกเซลล์ซึ่งรวมถึงเส้นใยต่างๆ เมื่อเปรียบเทียบกับเหงือกปกติ (Saito et al., 2005; Ganesh, 2016; Araújo Batista et al., 2017; Crăitu et al., 2019) พูเรียทรานสฟอร์มมิงพลาสมิดโรสโคปี (FTIR) เป็นเทคนิคที่สามารถตรวจสอบโครงสร้างเคมีในสารตัวอย่างจากการวิเคราะห์รูปแบบสเปกตรัมการดูดกลืนรังสีอินฟราเรด เนื่องจากพันธะในโมเลกุลหรือหมู่ฟังก์ชันต่างๆ จะเกิดการสั่นแบบยืดหรือหด และสมมาตรหรือไม่สมมาตร ปรากฏเป็นพีคบนสเปกตรัม ณ เลขคลื่นจำเพาะ (Ismail et al., 1997) การศึกษาสารตัวอย่างประเภทสารชีวภาพด้วยเทคนิค FTIR นิยมศึกษาในช่วงสเปกตรัม $1800\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ (fingerprint region) เนื่องจากพีคในช่วงดังกล่าวเกี่ยวข้องกับการสั่นของพันธะในสารชีวโมเลกุลที่สำคัญ (Baker et al., 2014) เช่น โปรตีน โดยพีคในช่วงเอไมด์ I ($1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$) เกี่ยวข้องกับการสั่นแบบยืดของพันธะ C=O พีคในช่วงเอไมด์ II ($1600\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$) เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนรูป (deformation) ของ NH_2 ในเอไมด์ปฐมภูมิ และจากการสั่นแบบงอของพันธะ N-H กับการสั่นแบบยืดของพันธะ C-N ในเอไมด์ทุติยภูมิ พีคในช่วงเอไมด์ III ($1300\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$) เกี่ยวข้องกับการสั่นแบบงอในระนาบของพันธะ N-H กับการสั่นแบบยืดของพันธะ C-N รวมถึงการเปลี่ยนรูปของ C-H และ N-H (Parker, 1971; Singh et al., 1993)

ผลการศึกษาเหงือกปกติและเหงือกโตสาเหตุจากยาดด้วยเทคนิค FTIR ในการศึกษาพบว่า สเปกตรัมเฉลี่ยการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดช่วงเลขคลื่น $1800\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ ที่ได้รับการปรับขอบนุ่ม 13 จุดและปรับ baseline ของชั้นเยื่อผิวทั้ง

เหงือกปกติและเหงือกโตสาเหตุจากยาปรากฏพีคการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดที่ตรงกัน ได้แก่ 1656 cm^{-1} (α helix ของโปรตีน) 1541 cm^{-1} (การสั่นแบบงอของพันธะ N-H และสั่นแบบยืดของพันธะ C-N) 1451 cm^{-1} (การงอแบบไม่สมมาตรของหมู่ฟังก์ชัน CH_3 ของโปรตีน) 1317 cm^{-1} (องค์ประกอบของแถบเอไมด์ III ของโปรตีน หรือคอลลาเจน) 1243 cm^{-1} (คอลลาเจนประเภทที่ 1) และ 1070 cm^{-1} (กรดนิวคลีอิก) (Movasaghi et al., 2008) แสดงว่าเมื่อเหงือกปกติเปลี่ยนเป็นเหงือกโตสาเหตุจากยาจะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งการเกิดพีคซึ่งแสดงถึงพันธะเคมีในองค์ประกอบไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงไป นอกจากนี้ระดับความสูงของแต่ละพีคซึ่งแสดงถึงระดับการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดระหว่างเยื่อบุผิวของเหงือกทั้งสองกลุ่มยังมีความใกล้เคียงกันแสดงถึงปริมาณขององค์ประกอบที่ไม่แตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับ chemical image ที่แสดงระดับความเข้มข้นการดูดกลืนรังสีอินฟราเรด ($1720\text{-}1480$ และ $1300\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$) ที่ใกล้เคียงกันระหว่างชั้นเยื่อบุผิวของเหงือกทั้งสองกลุ่ม จึงอาจกล่าวได้ว่าการเปลี่ยนแปลงจากเหงือกปกติเป็นเหงือกโตสาเหตุจากยาจะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงในชั้นเยื่อบุผิวทั้งในแง่ของพันธะเคมีและปริมาณขององค์ประกอบ เมื่อทำ Principal component regression (PCR) เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของสเปกตรัมในช่วง $1800\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ ของเยื่อบุผิวระหว่างเหงือกทั้งสองกลุ่ม ก็พบว่าไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเยื่อบุผิวของเหงือกปกติและเหงือกโตสาเหตุจากยาได้

ส่วนผลการเปรียบเทียบสเปกตรัมเฉลี่ยการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดช่วงเลขคลื่น $1800\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ ของชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันพบว่าความสูงพีคในเหงือกโตสาเหตุจากยามีความสูงกว่าเหงือกปกติ สอดคล้องกับ chemical image ที่แสดงระดับความเข้มข้นการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในเหงือกโตสาเหตุจากยาสูงกว่าในเหงือกปกติ แสดงว่าเมื่อเหงือกปกติเปลี่ยนเป็นเหงือกโตสาเหตุจากยาจะมีปริมาณขององค์ประกอบในชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเพิ่มขึ้น เมื่อพิจารณาตำแหน่งการปรากฏพีค พบว่าเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในเหงือกปกติและเหงือกโตสาเหตุจากยาปรากฏพีคที่ตรงกันทุกตำแหน่ง อย่างไรก็ตามแนวโน้มการเกิดพีคตำแหน่งต่างกันในช่วง $1700\text{-}1600$ และ $1600\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ ดังนั้นจึงนำสเปกตรัมเฉลี่ยไปปรับปรุงโดยทำเป็นอนุพันธ์อันดับสอง ทำให้พบว่าเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระหว่างเหงือกทั้งสองกลุ่มเกิดพีคที่ตำแหน่งตรงกันทั้งหมด โดยมีพีคที่สัมพันธ์กับคอลลาเจนอยู่หลายตำแหน่งเช่น $1080\text{ }1200\text{ }1280\text{ }1337\text{ cm}^{-1}$ (Movasaghi et al., 2008) อย่างไรก็ตาม ณ พีค 1662 และ 1636 cm^{-1} พบว่าเหงือกทั้งสองชนิดมีสัดส่วนความสูงของพีคในลักษณะตรงกันข้าม คือเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในเหงือกปกติมีพีค 1662 cm^{-1} สูงแต่ 1636 cm^{-1} ต่ำ ในขณะที่เนื้อเยื่อเกี่ยวพันในเหงือกโตสาเหตุจากยามีพีค 1662 cm^{-1} ต่ำแต่ 1636 cm^{-1} สูง ซึ่งพีคที่ 1662 และ 1636 cm^{-1} เกี่ยวข้องกับโครงสร้างคอยล์ (coils) และแผ่นบีตา (β -sheet) ของโปรตีนตามลำดับ (Jackson et al., 1995) แสดงว่าเมื่อเหงือกปกติเปลี่ยนไปเป็นเหงือกโตสาเหตุจากยา โครงสร้างโปรตีนในชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันจะเปลี่ยนแปลงจากรูปแบบที่โครงสร้างคอยล์สูง และแผ่นบีตาต่ำไปเป็นแบบที่โครงสร้างคอยล์ต่ำ และแผ่นบีตาสูง จากการทบทวนวรรณกรรมในเหงือกปกติจะพบคอลลาเจนชนิดที่ 1 มากที่สุด และคอลลาเจนชนิดอื่นๆ คือ คอลลาเจนชนิดที่ 3, 4 และ 5 ในปริมาณน้อยกว่า โดยโครงสร้างของคอลลาเจนชนิดที่ 4 ซึ่งพบบริเวณเบซัล ลามินา (Basal lamina) ของเยื่อบุผิวที่อยู่ติดกับชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (D'souza et al., 2012) มีแผ่นบีตาสูงกว่าคอลลาเจนชนิดที่ 1, 3 และ 5 (Belbachir et al., 2009) ดังนั้นเมื่อเหงือกปกติเปลี่ยนแปลงไปเป็นเหงือกโตสาเหตุจากยาอาจจะเกิดการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของคอลลาเจนชนิดที่ 1 และ 4 ขึ้นในชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เมื่อทำ Principal component regression (PCR) เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของสเปกตรัมในช่วง $1800\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระหว่างเหงือกทั้งสองกลุ่มพบว่าไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มได้ อย่างไรก็ตามพบว่าสเปกตรัมของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือกโตจากยาในกลุ่ม D2 และ D3 ก่อนข้างเกาะกลุ่มกันและเกาะกลุ่มกับเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือกปกติมากกว่าเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือกโตจากยาในกลุ่ม D1 ที่สเปกตรัมมีแนวโน้มจะแยกตัวออกมา ซึ่งจาก loading plot พบว่าพีคของ D1 ที่ทำให้มีแนวโน้มแยกตัวคือ 1562 cm^{-1} ซึ่งสัมพันธ์กับการงอของพันธะ N-H ของโปรตีนในแถบเอไมด์ II (Ismail et al., 1997) สาเหตุที่ D1 มีแนวโน้มแยกจากกลุ่ม D2 และ D3 ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในเหงือกโตจากยาด้วยกันเอง ยังไม่สามารถสรุปได้อย่างชัดเจน แต่จากข้อมูลทางคลินิกพบว่า D1 เป็นเนื้อเยื่อที่มาจากผู้ป่วยโรคลมชักที่ได้รับยาที่สามารถส่งผลให้เหงือกโตหลายชนิด ได้แก่ เฟนิโทอิน และ เบนโซไดอะซีปีน ส่วนใน D2 และ D3 มาจากผู้ป่วยที่ได้รับยาแอมโลดิพีนเพียงชนิดเดียว

ซึ่งการได้รับยาที่สามารถส่งผลให้เหงือกโตหลายตัวร่วมกันหรือการรับยาต่างชนิดกันอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อความรุนแรงของเหงือกโต ส่งผลต่อพันธะทางเคมีในองค์ประกอบ

จากผลการศึกษาสามารถสรุปได้ว่า การเกิดเหงือกโตสาเหตุจากยาไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในเชิงปริมาณและพันธะเคมีภายในขององค์ประกอบของชั้นเยื่อบุผิว และไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเยื่อบุผิวของเหงือกปกติและเหงือกโตจากยาได้ด้วยวิธีการวิเคราะห์ความแตกต่างของอินฟราเรดสเปกตรัม

การเกิดเหงือกโตสาเหตุจากยาทำให้ปริมาณของสารชีวโมเลกุลในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเพิ่มมากขึ้นกว่าเหงือกปกติ และเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโปรตีนจากแบบที่มีโครงสร้างคอยล์สูง และแผ่นบีต๋าต่ำ ไปเป็นโครงสร้างคอยล์ต่ำ แผ่นบีต๋าสูงซึ่งอาจเป็นการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของคอลลาเจนชนิดที่ 1 และ 4

อย่างไรก็ตามไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือกโตจากยาและเหงือกปกติได้ด้วยการวิเคราะห์ความแตกต่างจากตำแหน่งพีคของอินฟราเรดสเปกตรัม

เอกสารอ้างอิง

- Araújo Batista, A. L., Pereira de Mendonça, A. K., de Almeida Freitas, R., Muniz Alves, P., Pin a Godoy, G., Weege Nonaka, C. F., & Alves Uchôa Lins, R. D. (2017). Immunohistochemical Analysis of Cell Proliferation and Bcl-2 Expression in Drug-Induced Gingival Overgrowth. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada*, 17(1), 1-10.
- Baker, M. J., Trevisan, J., Bassan, P., Bhargava, R., Butler, H. J., Dorling, K. M., Fielden, P. R., Fogarty, S. W., Fullwood, N. J., Heys, K. A., Hughes, C., Lasch, P., Martin-Hirsch, P. L., Obinaju, B., Sockalingum, G. D., Sulé-Suso, J., Strong, R. J., Walsh, M. J., Wood, B. R., Gardner, P., ... Martin, F. L. (2014). Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. *Nature protocols*, 9(8), 1771-1791.
- Belbachir, K., Noreen, R., Gouspillou, G., & Petibois, C. (2009). Collagen types analysis and differentiation by FTIR spectroscopy. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 395(3), 829-837.
- Brown, R. S., & Arany, P. R. (2015). Mechanism of drug-induced gingival overgrowth revisited: a unifying hypothesis. *Oral diseases*, 21(1), e51-e61.
- Crăițoiu, Ș., Bobic, A. G., Manolea, H. O., Mehedinți, M. C., Pascu, R. M., Florescu, A. M., Petcu, I. C., Osman, A., Fărcaș-Berechet, C. M., & Iacov-Crăițoiu, M. M. (2019). Immunohistochemical study of experimentally drug-induced gingival overgrowth. *Romanian journal of morphology and embryology*, 60(1), 95-102.
- D'souza, Z., Chettiankandy, T.J., Ahire, MS., Thakur, A., Sonawane, SG., & Sinha, A. (2020) Collagen-structure, function and distribution in orodental tissues. *Journal of Global Oral Health*, 2(2), 134-139.
- Fujii, S., Sato, S., Fukuda, K., Okinaga, T., Ariyoshi, W., Usui, M., Nakashima, K., Nishihara, T., & Takenaka, S. (2016). Diagnosis of Periodontal Disease from Saliva Samples Using Fourier Transform Infrared Microscopy Coupled with Partial Least Squares Discriminant Analysis. *Analytical sciences: the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*, 32(2), 225-231.
- Fukuyama, Y., Yoshida, S., Yanagisawa, S., & Shimizu, M. (1999). A study on the differences between oral squamous cell carcinomas and normal oral mucosas measured by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biospectroscopy*, 5(2), 117-126.

- Ganesh P. R. (2016). Immunoexpression of interleukin-6 in drug-induced gingival overgrowth patients. *Contemporary clinical dentistry*, 7(2), 140-145.
- Hallmon, W. W., & Rossmann, J. A. (1999). The role of drugs in the pathogenesis of gingival overgrowth. A collective review of current concepts. *Periodontology 2000*, 21, 176-196.
- Ismail, A.A., Voort, F.R., & Sedman, J. (1997). Chapter 4 Fourier transform infrared spectroscopy: Principles and applications. *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*, 18, 93-139.
- Jackson, M., & Mantsch, H. H. (1995). The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein structure. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 30(2), 95-120.
- Movasaghi, Z., Rehman, S., & ur Rehman, D.I. (2008). Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, 43, 134-179.
- Parker, F.S. (1971). *Amides and amines*. Applications of Infrared Spectroscopy in Biochemistry, Biology, and Medicine, 165-172.
- Saito, K., Mori, S., Iwakura, M., Tanda, N., Sakamoto, S., Ikawa, K., & Koseki, T. (2005). Immunohistochemical study on the pathogenesis of drug-induced gingival hyperplasia. *International Congress Series*, 1284, 85-86.
- Seymour, R. A., Ellis, J. S., & Thomason, J. M. (2000). Risk factors for drug-induced gingival overgrowth. *Journal of clinical periodontology*, 27(4), 217-223.
- Singh, B. R., DeOliveira, D. B., Fu, F.-N., & Fuller, M. P. (1993). Fourier transform infrared analysis of amide III bands of protein for the secondary structure estimation. *Biomolecular Spectroscopy III*, 1890, 47-55.

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).