# รายงานความก้าวหน้าผลการดำเนินการวิจัยปีที่ 1

เรื่อง

## ผลของแรงเชิงกลต่อการเกิดการละลายภายในคลองรากฟันและการพัฒนาแนวทางในการรักษา

## Effect of mechanical stimulation on internal root resorption and the development of its therapeutic treatment


โดย

อาจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร. พัชรี ฤทธิ์ประจักษ์

ศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร. ประสิทธิ์ ภวสันต์

คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล

ประจำปีงบประมาณ 2557



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

# สารบัญ

หน้า


| | |
|---|---|
| บทคัดย่อ | 1 |
| บทนำ | 2 |
| วิธีดำเนินการวิจัย | 12 |
| ผลการวิจัย | 15 |
| วิจารณ์และสรุปผล | 26 |
| การดำเนินงานในช่วงต่อไป | 27 |
| อุปสรรคการดำเนินงานและแนวทางการแก้ไข | 27 |
| เอกสารอ้างอิง | 28 |

สัญญาเลขที่ GRB_APS_02_57_32_02

**โครงการวิจัยเรื่อง** ผลของแรงเชิงกลต่อการเกิดการละลายภายในคลองรากฟันและการพัฒนาแนวทางในการรักษา

Effect of mechanical stimulation on internal root resorption and the development of its therapeutic treatment

รายงานความก้าวหน้าผลการดำเนินงานปีที่ 1 ฉบับสมบูรณ์

.....


รายงานช่วงระยะเวลาตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2556 ถึงวันที่

ชื่อหัวหน้าโครงการ อ.ทญ.ดร.พัชรี ฤทธิ์ประจักษ์ (Patcharee Ritprajak)

หน่วยงาน ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ 02 218-8680 E-mail Patcharee.R@chula.ac.th


การดำเนินงาน: √ ได้ดำเนินงานตามแผนงานที่วางไว้ทุกประการ

[ ] ได้เปลี่ยนแปลงแผนงานที่วางไว้ดังนี้คือ


**บทคัดย่อ**

การบาดเจ็บจากแรงเชิงกลส่งผลให้เกิดการละลายภายในคลองรากฟัน ซึ่งเป็นปัญหาหนึ่งของการสูญเสียฟัน ดังนั้นการศึกษากลไกการเกิดการละลายภายในคลองรากฟันจึงมีผลต่อการพัฒนาแนวทางในการรักษาผู้ป่วยทางคลินิก ในงานวิจัยนี้คณะผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์หลักในการศึกษากลไกการเกิดการละลายภายในคลองรากฟัน โดยคณะผู้วิจัยมีสมมุติฐานเบื้องต้นว่าความเครียดจากแรงเชิงกล ส่งผลให้เกิดการอักเสบของเซลล์โพรงฟัน ทำให้เซลล์โพรงฟันหลั่งสารที่มีผลต่อการแปรสภาพและการทำงานของเซลล์สลายกระดูก/สลายฟัน ซึ่งเซลล์ดังกล่าวนี้จะไปทำลายเนื้อฟันและทำให้เกิดลักษณะทางคลินิกของการละลายภายในคลองรากฟัน จากผลการทดลองพบว่าเมื่อเซลล์โพรงฟันได้รับความเครียดจากแรงกด นอกจากเซลล์โพรงฟันจะมีการหลั่งไซโตไคน์ IL-1 และ IL-6 ซึ่งเป็นสารที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบแล้ว ยังมีการหลั่งสารกลุ่ม Danger Associated Molecular Pattern (DAMPs) อันได้แก่ S100A7, S100A8 และ S100A9 อีกด้วย โดยมีรายงานว่าสาร S100 ดังกล่าวมีผลต่อการเพิ่มการแปรสภาพและการทำงานของเซลล์สลายกระดูก นอกจากนี้ผู้วิจัยยังพบว่าความเครียดจากแรงกดยังมีผลต่อการแสดงออกของตัวรับสัญญาณ GPCR และ P2Y6R ซึ่งผู้วิจัยมีสมมุติฐานว่าถ้ามีสัญญาณที่ผ่านตัวรับสัญญาณดังกล่าวน่าจะเกี่ยวข้องกับการหลั่งสาร S100A7, S100A8 และ S100A9 อย่างไรก็ตามคณะผู้วิจัยยังต้องทำการศึกษาเพิ่มเติม เพื่อให้ได้กลไกการเกิดการละลายคลองรากฟันที่ชัดเจนยิ่งขึ้น โดยคณะผู้วิจัยคาดหวังว่าองค์ความรู้ทั้งหมดนี้จะนำไปประยุกต์ต่อการรักษาผู้ป่วยทางคลินิกในอนาคต

บทนำ

**ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย**

การละลายของรากฟัน (dental root resorption) เป็นกระบวนการที่ทำให้เกิดการสูญเสียของเนื้อเยื่อแข็งของฟันบริเวณส่วนราก ซึ่งมักเกิดได้ตั้งแต่บริเวณคอฟันที่ต่อกับส่วนรากฟัน (cervico-apical junction) จนถึงบริเวณปลายรากฟัน (root apex) (1)

การละลายของรากฟันเป็นปัญหาหนึ่งของการสูญเสียฟัน โดยเฉพาะถ้าหากผู้ป่วยไม่ได้รับการวินิจฉัยและรักษาอย่างถูกต้องภายในเวลาอันเหมาะสม สาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการละลายของรากฟันที่ผิดปกติได้แก่ การบาด เจ็บที่เกิดจากแรงภายนอก หรือความร้อนแรงดันจากเนื้องอกและฟันคุด แรงจากการจัดฟัน การติดเชื้อในโพรงประสาทฟัน (dental pulp) หรือในเนื้อเยื่อปริทันต์ (periodontal tissue) และการฟอกสีฟัน เป็นต้น

การละลายของรากฟันอาจจัดแบ่งประเภทตามบริเวณที่เกิดกับความสัมพันธ์กับผิวรากฟันได้เป็น การละลายของรากฟันจากภายนอก และการละลายจากภายในคลองรากฟัน (2)

การละลายของรากฟันจากภายนอก (external root resorption) พบได้บ่อยกว่าการละลาย จากภายในคลองรากฟัน และมักมีสาเหตุหลักมาจากแรงเคลื่อนฟันจากการจัดฟัน (orthodontic force) รองลงมาได้แก่ แรงจากการบาดเจ็บ (traumatic injury) การติดเชื้อและแรงดันจากเนื้องอกและฟันคุด การละลายของรากฟันจากภาย นอกจะไม่ดำเนินต่อถ้าเอาสาเหตุออก เช่น ลดแรงกระแทกที่ฟัน หรือลดหรือหยุดแรงจากการจัดฟัน เป็นต้น ซึ่งถ้ารากฟันถูกทำลายเป็นบริเวณไม่ใหญ่มาก ก็จะเกิดกระบวนการซ่อมแซมตนเองตามธรรมชาติภายในเวลา 2-3 อาทิตย์ (3) ดังนั้นสิ่งสำคัญที่สุดในการรักษาการละลายของรากฟันจากภายนอกนั้น คือการกำจัดเอาสาเหตุที่มีผลต่อการละลายของรากฟันนั้นออกไป เช่น การลดแรงจากการจัดฟัน การกำจัดแรงที่ทำให้เกิดการบาดเจ็บ และการกำจัดการติดเชื้อ เป็นต้น (4)

การละลายภายในคลองรากฟัน (internal root resorption) พบได้น้อยกว่าการละลายของรากฟันจากภาย นอกโดยการละลายภายในคลองรากฟันพบว่า 45% นั้นมีสาเหตุหลักมาจาก แรงจากการบาดเจ็บซึ่งมักจะเป็นแรงต่างๆ ที่ทำให้เกิดการเคลื่อนที่อย่างผิดปกติของฟัน (luxation injury) รวมถึงการได้รับความร้อนจากการกรอฟันด้วยหัวกรอเร็วโดยมีการสเปรย์น้ำไม่เพียงพอ (5, 6) โดยปัจจุบันยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัดว่า สาเหตุดังกล่าวข้างต้นส่งผลให้เกิดการละลายภายในคลองรากฟัน ได้อย่างไร

อย่างไรก็ตามหลายการศึกษาพบว่าการละลายภายในคลองรากฟัน เป็นผลมาจากการอักเสบเรื้อรังของโพรงประสาทฟัน (chronic pulpal inflammation) ร่วมกับการทำลายของชั้นพรีเดนทัล (predentin) และเซลล์สร้างเนื้อฟัน (odontoblast) และมีการกระตุ้นการทำงานของเซลล์สลายกระดูก/เซลล์สลายฟัน

(7, 8) จากการศึกษาในฟันของลิง พบว่าเนื้อเยื่อแข็งในฟัน (mineralized dentin) ต้องมีการสัมผัส (exposed) กับเซลล์โพรงฟัน (dental pulp cell) จึงจะมีกระบวนการละลายของรากฟันเกิดขึ้น (8) นอกจากนี้ยังมีสมมุติฐานกล่าวถึงความ สัมพันธ์ของเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟัน (dental pulp tissue) เซลล์สร้างเนื้อฟัน กับการทำงานของเซลล์สลายกระดูก/เซลล์สลายฟันว่าเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันที่ตายแล้ว จะเป็นตัวกระตุ้นทำให้เกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันที่ยังมีชีวิตอยู่ ซึ่งการอักเสบนี้จะมีผลต่อการแปรสภาพ (differentiation) และการทำงานของเซลล์สลายกระดูก/เซลล์สลายฟัน (6) ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่า การบาดเจ็บเป็นตัวกระตุ้นทำให้เซลล์โพรงฟัน และเซลล์สร้างเนื้อฟันเกิดการอักเสบและตาย โดยการอักเสบและการตายของเซลล์เหล่านี้ มีผลต่อการกระตุ้นการทำงานของเซลล์สลายกระดูก/เซลล์ สลายฟัน ทำให้เกิดการละลายภายในคลองรากฟัน

จากหลายการศึกษาพบว่ารากฟันที่มีการละลายไม่ว่าจะเกิดจากสาเหตุใดก็ตาม จะพบเซลล์สลายกระดูก/เซลล์สลายฟันอยู่บริเวณเนื้อฟันที่มีการละลาย (6, 8, 9) โดยการทำงานของเซลล์สลาย กระดูก/เซลล์สลายฟัน จำเป็นต้องมีการจับติดแน่นของเซลล์กับผิวของกระดูกหรือผิวฟัน หลังจากเซลล์ยึดเกาะกับผิวกระดูกหรือผิวฟันแล้ว เซลล์สลายกระดูก/เซลล์สลายฟัน จะมีการปรับสภาพความเป็นกรดด่างให้เหมาะกับการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยสลายสารที่อยู่ระหว่างเซลล์ (extracellular matrix) โดยความเป็นกรดที่เหมาะสมคือ pH ประมาณ 4.5 จะให้เซลล์สลายกระดูกมีประสิทธิภาพในการละลายเนื้อเยื่อแข็งได้ดี (10)

การยับยั้งการแปรสภาพและการทำงานของเซลล์สลายกระดูก มีความสำคัญในการหยุดกระบวนการละลาย กระดูกและฟัน ดังนั้นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนองต่อการอักเสบ ของเซลล์โพรงฟันและเซลล์สร้าง เนื้อฟันต่อการแปรสภาพและการทำงานของเซลล์สลายกระดูก/เซลล์ สลายฟัน จึงมีความสำคัญในการพัฒนาแนว ทางในการรักษาการละลายของรากฟันของผู้ป่วย

ปัจจุบันการรักษาการละลายภายในคลองรากฟัน มุ่งเน้นไปที่การตัดเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันออก และทำ

การรักษาคลองรากฟัน เพื่อกำจัดแหล่งกำเนิดของการอักเสบ ถึงแม้ว่าการรักษาคลองรากฟัน จะให้ผลประสบความ สำเร็จในการรักษาสูง แต่การรักษาคลองรากฟันนั้นมีราคาแพง และอาจมีภาวะแทรกซ้อนต่าง ๆ ได้เช่น ฟันเกิด ความเปราะและแตกหักได้ง่ายเนื่องจากฟันสูญเสียความมีชีวิต มีการติดเชื้อซ้ำเนื่องจากกำจัดเชื้อออกไม่หมด หรือมี การอุดคลองรากฟันที่ไม่แน่นหนาพอ (11) นอกจากนี้ผู้ป่วยที่รับการรักษาคลองรากฟันอาจมีอาการปวดเรื้อรังได้ อีกด้วย (12, 13) การพัฒนาแนวทางในการรักษาการละลายภายในคลองรากฟันจึงเป็นสิ่งจำเป็น เพื่อช่วยรักษาฟัน ผู้ป่วยให้มีชีวิตอยู่ได้ยาวนาน และสามารถใช้งานได้อย่างสมบูรณ์

และมีประสิทธิภาพ แนวทางการรักษาการละลาย ภายในคลองรากฟันในอนาคต จึงควรมุ่งเน้นไปที่การลดการอักเสบ การต้านเชื้อ การยับยั้งการละลายของรากฟัน โดยเซลล์สลายกระดูก/เซลล์สลายฟัน การกระตุ้นให้เกิดการงอกใหม่ของเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟัน (pulpal regeneration) และการกระตุ้นให้เกิดการซ่อมแซม โดยการสร้างเนื้อฟันใหม่ (reparative dentin) ดังนั้นการหา สารที่มีคุณสมบัติต่าง ๆ ดังกล่าว ในการรักษาการละลายของรากฟัน จึงควรได้รับการศึกษาและพัฒนาอย่างจริงจัง เพื่อนำมาใช้เป็นวิถีทางในการบำบัดโรคทดแทนการรักษาคลองรากฟัน

ในการวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์ต้องการศึกษากลไกการเกิดการละลายภายในคลองรากฟันที่เกิดจาก แรงเค้น-แรงเครียด ซึ่งเป็นสาเหตุหลักในการเกิดการละลายของรากฟัน โดยจะทำการศึกษาความสัมพันธ์ของแรงเค้น-แรงเครียดต่อการตอบสนองการอักเสบของเซลล์โพรงฟัน เซลล์สร้างเนื้อฟัน เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน และเซลล์สลายกระดูก/เซลล์สลายฟัน และศึกษาความสัมพันธ์ของการอักเสบดังกล่าวต่อการแปรสภาพและการทำงานของเซลล์สลายกระดูก/ เซลล์สลายฟัน นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังมีวัตถุประสงค์ในการ นำเอาสมุนไพรไทยชนิดต่าง ๆ มาพัฒนาใช้ในการรักษาการละลายภายในคลองรากฟัน ซึ่งประโยชน์ในการศึกษานี้ จะสามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาการรักษาการละลายภายในคลองรากฟัน และยังอาจสามารถใช้เป็นแนวทาง ในการรักษาการอักเสบต่าง ๆ ที่เกิดกับโพรงประสาทฟันรวมถึงยังสามารถนำไปเป็นแนวทางในการรักษาการละลาย ของกระดูกจากการอักเสบได้อีกด้วย

**วัตถุประสงค์หลัก**

1. ศึกษาผลของแรงเครียด-แรงเค้นต่อการตอบสนองการอักเสบของเซลล์โพรงฟัน
2. ศึกษาผลของการอักเสบของเซลล์โพรงฟันที่ถูกกระตุ้นด้วยความเค้น-ความเครียด ต่อเซลล์สร้างกระดูก
3. ศึกษาผลของการอักเสบของเซลล์โพรงฟันที่ถูกกระตุ้นด้วยความเค้น-ความเครียดต่อการแปรสภาพ และการทำงานของเซลล์สลายกระดูก/เซลล์สลายฟัน

**การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (review literature)**

การละลายของกระดูกและฟัน (bone and tooth resorption) เป็นกระบวนการสำคัญ ที่เกิดขึ้นในร่างกายทั้งในสภาวะทางสรีระวิทยาปกติ (normal physiologic condition) และในภาวะที่มีพยาธิสภาพ (pathologic condition) ในสภาวะปกติจะพบการหมุนเวียนของกระดูก (bone turnover) โดยการละลายและการสร้างกระดูกใหม่ ซึ่งเป็นผลมาจากการทำงานของพาราไทรอยด์ฮอร์โมน (parathyroid hormone,

PTH) ที่ทำหน้าที่ควบคุมระดับแคลเซียมในกระแสโลหิต (14) ส่วนการละลายของฟันที่พบได้ในสภาวะปกติได้แก่การละลายของฟันน้ำนมโดยแรงดันจากฟันแท้ที่อยู่ข้างใต้

การละลายของฟันที่เกิดจากภาวะที่มีพยาธิสภาพมักมีสาเหตุมาจากการบาดเจ็บที่เกิดจากแรงภายนอก หรือความร้อนแรงดันจากเนื้องอกและฟันคุด แรงจากการจัดฟัน การติดเชื้อในโพรงประสาทฟัน (dental pulp) หรือในเนื้อเยื่อปริทันต์ (periodontal tissue) และการฟอกสีฟัน เป็นต้น

**การละลายของรากฟัน (root resorption)**

การละลายของรากฟัน (dental root resorption) เป็นกระบวนการที่ทำให้เกิดการสูญเสีย ของเนื้อเยื่อแข็งของฟันบริเวณส่วนราก ซึ่งมักเกิดได้ตั้งแต่บริเวณคอฟันที่ต่อกับส่วนรากฟัน (cervico-apical junction) จนถึงบริเวณปลายรากฟัน (root apex) (1) การละลายของรากฟัน อาจจัดแบ่ง ประเภทตามบริเวณที่เกิดกับความ สัมพันธ์กับผิวรากฟันได้เป็นการละลายของรากฟันจากภายนอกและการละลายจากภายในคลองรากฟัน (2)

<u>การละลายของรากฟันจากภายนอก</u> (<u>external root resorption</u>)

การละลายของรากฟันจากภายนอกพบได้บ่อยกว่าการละลายจากภายในคลองรากฟัน การละลายของรากฟันจากภายนอกมักมีสาเหตุหลักมาจาก แรงเคลื่อนฟันจากการจัดฟัน (orthodontic force) รองลงมาได้แก่ แรงจากการบาดเจ็บ (traumatic injury) การติดเชื้อ และแรงดันจากเนื้องอกและฟันคุด (3) กลไกการเกิดการละลายของรากฟันจากภายนอกนั้นมีการศึกษากันเป็นจำนวนมาก โดยนักวิจัยพบว่าการบาดเจ็บ การติดเชื้อ และแรงจากภายนอกจะส่งผลทำให้เกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อปริทันต์ ที่อยู่รอบๆ รากฟันและมีการดึงดูดเซลล์สลายกระดูก (osteoclast)/เซลล์สลายฟัน (odontoclast) เข้ามาละลายรากฟัน

เซลล์เอ็นยึดปริทันต์ (periodontal ligament cell; PDL cell) เป็นองค์ประกอบหลักของเนื้อเยื่อเอ็นยึด บริทันต์ที่อยู่รอบรากฟัน มีบทบาทหน้าที่สำคัญในการเกิดการละลายกระดูกและฟัน รวมทั้ง การเกิดก่อรูปกระดูกใหม่ (bone remodeling) โดยเซลล์เอ็นยึดปริทันต์สามารถทำหน้าที่ได้ทั้งกระตุ้น และยับยั้งการแปรสภาพของเซลล์ต้นกำเนิด (progenitor cell) ไปเป็นเซลล์สลายกระดูก/เซลล์สลายฟัน (15) จากการศึกษาในหนูทดลอง (16) พบว่าเมื่อเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ได้รับแรงเคลื่อนฟัน เซลล์จะหลั่งสารเมทริกซ์เมททัลโลโปรตีนเนส-9 (metrix metalloproteinase 9; MMP-9) ซึ่งเป็นโมเลกุลสำคัญที่เกี่ยวข้องในการเคลื่อนที่ (migration) และการย่อยสลายคอลลาเจนของเซลล์สลายกระดูก (17, 18) ทำให้มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์สลายกระดูกในบริเวณเนื้อเยื่อปริทันต์ และรากฟันที่ได้รับแรง นอกจากนี้จากการทดลองในห้องปฏิบัติการ (15) พบว่าเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ สามารถกระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียร์ (peripheral blood mononuclear cell; PBMC) แปรสภาพไปเป็นเซลล์สลายกระดูกได้โดยการเกิดรูป

สัมพันธ์ระหว่างเซลล์ (cell-to-cell interaction) ทั้งสองชนิดดังกล่าว ผ่านทางรีเซ็บเตอร์แอคทิเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเทอร์ แคปปาบีไลแกนด์ (receptor activator of nuclear kappa B ligand; RANKL) ที่แสดงออกบนผิวเซลล์เอ็นยึดปริทันต์กับตัวรับสัญญาณ (receptor) ของ RANKL ซึ่งก็คือ RANK ที่ถูกแสดงออกบนเซลล์สลายกระดูก

การละลายของรากฟันจากภายนอกจะมีกระบวนการซ่อมแซมเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติ ซึ่งปกติแล้วพบว่าการละลายของรากฟันจากภายนอกนั้นจะไม่ดำเนินต่อถ้าเอาสาเหตุออก เช่น ลดแรงกระแทกที่ฟัน หรือลดหรือหยุดแรงจากการจัดฟัน เป็นต้น ซึ่งถ้ารากฟันถูกทำลายเป็นบริเวณไม่ใหญ่มาก ก็จะเกิดกระบวนการซ่อมแซมตนเองภายในเวลา 2-3 อาทิตย์ (3) โดยเซลล์เอ็นยึดปริทันต์จะไปกระตุ้นให้เกิดกระบวนการการสร้างเคลือบรากฟัน (cementogenesis) ทำให้มีการสร้างเนื้อเยื่อคล้ายเคลือบรากฟัน (cementum-like tissue) ขึ้นมาทดแทนในส่วนของผิวรากฟันที่มีการละลายบางส่วน (19)

นอกจากนี้มีการศึกษาพบว่า (20, 21) ในกระดูกอ่อน (cartilage) ผนังเส้นเลือด เคลือบรากฟัน (cementum) และเอ็นยึดปริทันต์ สามารถหลั่งสารที่เรียกว่า "แอนไท-อินเวชั่นแฟกเตอร์ (anti-invasion factor)" ซึ่งเป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก มีคุณสมบัติยับยั้งการย่อยสลายโปรตีน (proteolytic activity inhibitor) จากการทดลองในห้องปฏิบัติการ (20) พบว่าแอนไท-อินเวชั่นแฟกเตอร์ ที่สกัดจากกระดูกอ่อนและผนังเส้นเลือดใหญ่ของมนุษย์มีผลต่อการยึดเกาะและยับยั้งการละลายกระดูกของเซลล์สลายกระดูก และมีบางการศึกษาพบว่าเอ็นยึดปริทันต์ที่มีชีวิต สามารถยับยั้งการรุกรานจากเซลล์กระดูกที่อยู่โดยรอบได้ ในขณะเดียวกันพบว่ามีการรุกรานของเซลล์กระดูกเข้าสู่บริเวณเอ็นยึดปริทันต์ที่ตายแล้ว (22) ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าแอนไทอินเวชั่นแฟกเตอร์ที่มีการกล่าว ถึงกันนั้นมีหน้าที่สำคัญในการช่วยคงสภาพของอวัยวะปริทันต์ที่อยู่รอบๆรากฟัน และป้องกันการรุกรานจากกระดูกที่ล้อมรอบอวัยวะปริทันต์ได้อีกด้วย

สิ่งสำคัญที่สุดในการรักษาการละลายของรากฟันจากภายนอกนั้น คือการกำจัดเอาสาเหตุที่มีผลต่อการละลายของรากฟันนั้นออกไป เช่น การลดแรงจากการจัดฟัน การกำจัดแรงที่ทำให้เกิดการบาดเจ็บ การกำจัดการติดเชื้อ เป็นต้น (4) ซึ่งโดยส่วนใหญ่แล้วถ้าการละลายของรากฟันนั้นเกิดจากแรงจัดฟัน หรือแรงจากการบาดเจ็บ เมื่อนำเอาสาเหตุออก การละลายของรากฟันก็จะหยุดลง และกระบวนการซ่อมแซมก็จะเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติ (3) การละลายของรากฟันที่เกิดจากการติดเชื้อบริเวณเอ็นยึดปริทันต์ การรักษาก็ต้องทำโดยการกำจัดเชื้อและเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อ รวมถึงเนื้อเยื่อแกรนูเลชั่น (granulation tissue) จากนั้นอาจทำการกรอผิวฟันที่มีเชื้อออก และบูรณะ (restoration) ด้วยวัสดุอุดฟัน (3, 23) ถ้าการละลายของรากฟันจากภายนอกนั้นเกิดจากการติดเชื้อที่โพรงประสาทฟันก็จำเป็นต้องทำการรักษาโพรงประสาทฟัน (pulpectomy) และให้การรักษารากฟัน (root canal treatment) อย่างไรก็ตามการติดเชื้อที่โพรง

ประสาทฟันมักเป็นสาเหตุทำให้เกิดการละลายภายในคลองรากฟันมากกว่าการละลายของรากฟันจากภายนอก (3, 4)

การละลายภายในคลองรากฟัน (internal root resorption)

การละลายภายในคลองรากฟันพบได้น้อยกว่าการละลายของรากฟันจากภายนอก โดยการละลายภายในคลองรากฟันพบว่า 45% นั้นมีสาเหตุหลักมาจากแรงจากการบาดเจ็บ ซึ่งมักจะเป็นแรงต่างๆ ที่ทำให้เกิดการเคลื่อน ที่อย่างผิดปกติของฟัน (luxation injury) รวมถึงการได้รับความร้อนจากการกรอฟันด้วยหัวกรอเร็ว (high-speed drill) โดยมีการสเปรย์น้ำไม่เพียงพอ (5, 6) สำหรับสาเหตุอื่น ๆ ของการละลายภายในคลองรากฟันนั้นพบว่า 25% เป็นสาเหตุมาจากรอยโรคฟันผุ (carious lesion) และ 14% เป็นสาเหตุมาจากรอยโรคฟันผุร่วมกับรอยโรคปริทันต์ (periodontol lesion) (6) ส่วนสาเหตุที่เหลืออาจมาจากการฟอกสีฟัน รอยแตกของฟัน แรงจากการจัดฟัน การปิดทับเนื้อเยื่อในโพรงฟัน (pulp capping) ด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ หรือสาเหตุที่ยังไม่ทราบแน่ชัดแต่ส่งผลทำให้เกิดความผิดปกติของโพรงประสาทฟัน เป็นต้น (24-26) โดยสาเหตุต่าง ๆ เหล่านี้จะส่งผลให้เกิดการอักเสบเรื้อรังของโพรงประสาทฟัน (chronic pulpal inflammation) เกิดการทำลายของชั้นพรีเดนทีน (predentin) และเซลล์สร้างเนื้อฟัน (odontoblast) และทำให้เกิดการละลายของเนื้อฟันจากภายในคลองรากฟันโดยเซลล์สลายกระดูก/เซลล์สลายฟัน (9)

ปัจจุบันยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัดว่าเหตุใดสาเหตุต่างๆ ดังกล่าวข้างต้นจึงส่งผลให้เกิดการละลายภายในคลองรากฟันได้ อย่างไรก็ตามมีการศึกษาในฟันของลิงพบว่าเนื้อเยื่อแข็งในฟัน (mineralized dentin) ต้องมีการสัมผัส (exposed) กับเซลล์โพรงฟัน (dental pulp cell) จึงจะมีกระบวนการละลายของรากฟันเกิดขึ้น (8) การละลายของรากฟันจะเกิดเป็นแบบชั่วคราว (transient) หรือดำเนินต่อเนื่องไป (progressive) ก็ได้ โดยพบว่าการอักเสบของโพรงประสาทฟันและการถูกทำลายของชั้นพรีเดนทีนและเซลล์สร้างเนื้อฟัน เป็นจุดเริ่มต้นของการเกิดการละลายภายในคลองรากฟัน และการอักเสบเรื้อรังของโพรงประสาทฟัน ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการติดเชื้อจากแบคทีเรีย จะทำให้เกิดการละลายของรากฟันอย่างต่อเนื่องได้ (2, 8)

การละลายภายในคลองรากฟันแบ่งได้เป็น 2 ชนิด ได้แก่ การละลายภายในคลองรากฟันจากการอักเสบเรื้อรัง และการละลายภายในคลองรากฟันที่มีการสร้างเนื้อเยื่อแข็งชนิดอื่นมาทดแทน (27, 28)

- **การละลายภายในคลองรากฟันจากการอักเสบเรื้อรัง (internal inflammtory resorption)**

  พบได้ทุกในบริเวณของคลองรากฟัน ลักษณะเด่นทางรังสีวิทยาคือจะพบเงาดำรูปไข่ โดยมีขอบเขตชัดเจน

คลุมคลองรากฟันจนไปถึงชั้นของเนื้อฟัน ถ้าเกิดการละลายบริเวณคอฟันถึงตัวฟัน จะเห็นสีชมพูในตัวฟัน (pink spot) การละลายภายในคลองรากฟันที่เกิดจากการอักเสบเรื้อรังนั้น จะทำให้เกิดการสูญเสียเนื้อฟันที่อยู่ติดกับคลองราก และมีการขยายขอบเขตกว้างขึ้นเรื่อย ๆ โดยที่ไม่มีการเนื้อเยื่อแข็ง (hard tissue) เจริญมาทดแทนเนื้อฟันที่สูญเสียไป การละลายภายในคลองรากฟันชนิดนี้เกิดจากการอักเสบเรื้อรังของโพรงประสาทฟัน โดยอาจมีการติดเชื้อแบคทีเรียร่วมด้วยหรือไม่ก็ได้ แต่ต้องมีการทำลายของชั้นพรีเดนทินและเซลล์สร้างเนื้อฟัน และมีการกระตุ้นการทำงานของเซลล์สลายกระดูก/เซลล์สลายฟัน จึงจะทำให้รอยโรคดำเนินขึ้นได้ (7)

มีสมมุติฐานกล่าวถึงความสัมพันธ์ของเซลล์โพรงฟันกับการทำงานของเซลล์สลาย กระดูก/เซลล์สลายฟันว่าเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟัน (dental pulp tissue) ที่ตายแล้ว จะเป็นตัวกระตุ้นทำให้เกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันที่ยังมีชีวิตอยู่ (6) จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเซลล์กระดูกเซลล์ (osteocyte) และการทำงานของเซลล์สลายกระดูก พบว่าการตายของเซลล์กระดูกแบบอะพอพโทซิส (apoptosis) ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของเซลล์สลายกระดูก (29, 30) เซลล์โพรงฟันและเซลล์สร้างเนื้อฟันนั้น เปรียบได้กับเซลล์ กระดูก ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าการบาดเจ็บ และการติดเชื้อเป็นตัวกระตุ้นทำให้เซลล์โพรงฟัน และเซลล์สร้างเนื้อฟันเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส เมื่อเซลล์ทั้งสองชนิดดังกล่าว เข้าสู่กระบวนการตายแบบอะพอพโทซิส เซลล์จะหลั่งสารไซโตไคน์ (cytokine) ที่เหนี่ยวนำให้เซลล์ โพรงฟันและเซลล์สร้างเนื้อฟันที่เหลืออยู่เกิดการอักเสบ ส่งผลทำให้เกิดการละลายภายในคลองรากฟัน

- **การละลายภายในคลองรากฟันที่มีการสร้างเนื้อเยื่อแข็งชนิดอื่นมาทดแทน (internal replacement resorption)**

การละลายภายในคลองรากฟันชนิดนี้มีลักษณะเด่นทางรังสีวิทยาคือ พบเงาตำรูปทรงไม่แน่นอน ร่วมกับเงาขาวจาง ๆ ที่แสดงถึงการอุดตันของคลองรากฟัน การละลายภายในคลองรากฟันที่มีการสร้างเนื้อเยื่อแข็งชนิดอื่นมาทดแทนมักมีสาเหตุมาจากการอักเสบแบบไม่รุนแรง (low-grade inflammation) ของเนื้อเยื่อในโพรงฟัน เช่นการเกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อในโพรงฟันแบบไม่ผันกลับ (irriversible pulpitis) และการตายของเนื้อเยื่อโพรงประ สาทฟันบางส่วน (partial pulp necrosis) เป็นต้น ลักษณะพยาธิวิทยาพบว่ามีการอักเสบเรื้อรังของโพรงประสาทฟัน มีการทำลายของชั้นพรีเดนทิน และเซลล์สร้างเนื้อฟันเช่นเดียวกับการละลายภายในคลองรากฟันจากการอักเสบเรื้อรัง นอกจากนี้ยังพบเนื้อเยื่อแข็งคล้ายกระดูกหรือเคลือบรากฟันเจริญมาทดแทนเนื้อฟัน (dentin) ที่ละลายไป (8) ลักษณะการเปลี่ยนแปลงแบบผันกลับได้ (reversible change) ที่มีการทดแทนเซลล์หนึ่งด้วยเซลล์อีกชนิดหนึ่งนี้เรียกว่า "เมทาเพลเซีย (metaplasia)" มีหลายสมมุติฐานกล่าวถึงการเกิดเมทาเพลเซียในโพรงประสาทฟันและคลองรากฟันว่า เซลล์คล้ายเซลล์สร้างกระดูก

(odontoblast-like cell) ที่เจริญมาทดแทนเซลล์สร้างเนื้อฟัน น่าจะแปรสภาพมาจากเซลล์ต้นกำเนิดในโพรงประสาทฟัน (dental pulp stem cell) (31, 32) มีบางสมมุติฐานเชื่อว่าเมตาพลาเซียของเนื้อเยื่อแข็งนั้นไม่ได้มีต้นกำเนิดมาจากเซลล์โพรงฟัน แต่มีต้นกำเนิดมาจากเซลล์ที่เคลื่อนที่ออกมาจากเส้นเลือดในโพรงประสาทฟัน หรือเซลล์จากเนื้อเยื่อปริทันต์ (33-35) อย่างไรก็ตามการเกิดเมทาพลาเซียของเนื้อเยื่อแข็งนั้น เป็นการตอบสนองต่อการอักเสบเรื้อรังที่เกิดขึ้นในโพรงประสาทฟันและคลองรากฟัน

ปัจจุบันการรักษาการละลายภายในคลองรากฟันจะมุ่งเน้นไปที่การเอาเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันที่เกิดการอักเสบออก เนื่องจากการอักเสบเรื้อรังของเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟัน เป็นปัจจัยหลักที่ทำให้รอยโรค มีการดำเนินอย่างต่อเนื่อง หลังจากกำจัดเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันทั้งหมดออกแล้ว ทันตแพทย์จะทำการล้างคลองรากฟันด้วยสารเคมีที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ และอุดคลองรากฟันชั่วคราวด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์เพื่อกำจัดเชื้อที่เหลืออยู่ออกให้มากที่สุด จากนั้นค่อยทำการอุดคลองรากฟันถาวรต่อไป

<u>บทบาทหน้าที่ของเซลล์สลายกระดูก/เซลล์สลายฟันในการละลายเนื้อเยื่อฟัน</u>

เซลล์สลายกระดูก (osteoclast) เป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ประกอบด้วยหลายนิวเคลียส (multinecleated giant cell) บริเวณขอบเซลล์มีลักษณะเป็นคลื่นหรือมีรอยหยักเรียกว่า "รัฟเฟิลบอเดอร์ (ruffled border)" และสามารถเคลื่อนที่ได้ เซลล์สลายกระดูกแปรสภาพมาจาก การรวมกัน (fusion) ของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิต (hematopoietic stem cell) ชนิดเดียวกับเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ หรือแมคโครเฟจ ซึ่งเซลล์ต้นกำเนิดดังกล่าวนี้ มาจากม้ามและไขกระดูก (36) เมื่อเกิดการอักเสบเซลล์ต่างๆ ที่อยู่ในบริเวณนั้น รวมถึงเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันจะมีการหลั่งคีโมไคน์ (chemokine) และไซโตไคน์ที่กระตุ้นการอักเสบ (proinflammatory cytokine) ทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของเซลล์สลายกระดูกไปยังบริเวณรอยโรค และเกิดการกระตุ้นการทำงานของเซลล์สลายกระดูก นอกจากนี้คีโมไคน์และไซโตไคน์ที่ถูกหลั่งออกมายังส่งผลให้เกิดการดึงดูดเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สลายกระดูกเข้ามาในบริเวณรอยโรค และแปรสภาพไปเป็นเซลล์สลายกระดูกอีกด้วย (10, 37, 38)

เซลล์สลายฟัน (odontoclast) เป็นเซลล์ที่แปรสภาพมาจากเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิต ที่อยู่ในกระแสโลหิต (39) ซึ่งเซลล์ต้นกำเนิดนี้พบได้ในโพรงประสาทฟันและเอ็นยึดปริทันต์ โดยเซลล์สลายฟันมีรูปร่างลักษณะและคุณสมบัติคล้ายคลึงกับเซลล์สลายกระดูก เช่นมีการแสดงออกของโปรตีน ที่ทำหน้าที่ในการละลายกระดูกซึ่งได้แก่ คาเทปซินเค (cathepsin K) ทาเทรต-รีซิสแทนต์เอซิด ฟอสฟาเทส (tartrate-resistant acid phosphatase; TRAP) โปรตอนเอท์พีเอส (H$^+$-ATPase) และ MMP-9 เป็นต้น (39)

แฟกเตอร์สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการแปรสภาพของเซลล์สลายกระดูกได้แก่ แมกโครเฟจโคโลนีสทิมูเลติง แฟกเตอร์ (M-CSF) และ RANKL (40) M-CSF เป็นไซโตไคน์ที่ถูกหลั่งออกมาจากเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์

เซลล์เอ็นโดธีเลียม (endothelial cell) และเม็ดเลือดขาวชนิดแกรนูโลไซต์ (granulocyte) ซึ่งการหลั่ง M-CSF ของเซลล์เหล่านี้ถูกกระตุ้นโดยไซโตไคน์อินเตอร์ลิวคิน-1 (interlukin-1; IL-1) แพลทเลทดีไรฟ์วต์โกรท แฟกเตอร์ (platelet derived growth factor; PDGF) อินเตอร์เฟียรอน-แกมมา (interferon-γ; IFN-γ) และ แกรนูโลไซต์แมกโครเฟจโคโลนีสทิมูเลติงแฟกเตอร์ (granulocyte-macrophage colony stimulating factor; GM-CSF) (41) RANKL ถูกแสดงออกในเซลล์สร้างกระดูก มีเซนไคมอลเซลล์ mesenchymal cell) ที่อยู่ในส่วนของกระดูกอ่อน และเซลล์กระดูกอ่อน ที่มีการขยายขนาด (hypertrophied chondrocyte) (42) ในฟันและอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับฟัน พบว่ามีการแสดงออกของ RANKL ในเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ที่อยู่รอบๆ รากฟันน้ำนมที่มีการละลายเซลล์โพรงฟัน เซลล์สร้างเนื้อฟัน เซลล์สร้างเคลือบรากฟัน (cementoblast) และ เซลล์สร้างเคลือบฟัน (ameloblast) (43-45) การแสดงออกของ RANKL ถูกเหนี่ยวนำโดยสารที่เกี่ยวข้องกับการสลายกระดูก เช่น กลูโคคอร์ทิคอยด์ (glucocorticoids) วิตามินดี3 อินเตอร์ลิวคิน-1 อินเตอร์ลิวคิน-6 อินเตอร์ลิวคิน 11 อินเตอร์ลิวคิน-17 ทิวเมอร์เน็กโครซิสแฟกเตอร์แอลฟา (tumornecrosis factor alpha; TNF-α) พรอสทาแกรนดินอี2 (prostaglandin E2; PGE2) และ พาราไทรอยด์ฮอร์โมน (42)

M-CSF มีบทบาทในการกระตุ้นการแสดงออกของ RANK ในเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิต โดย RANK จะเป็นตัวรับสัญญาณของ RANKL ในสภาวะที่มีสัญญาณจาก M CSF และ RANK-RANKL เซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจะแปรสภาพไปเป็นเซลล์สลายกระดูก ซึ่งกระบวนการเกิดเซลล์สลายกระดูกนี้เรียกว่า "ออสติโอคลาสโทเจนนิซิส (osteoclastogenesis) (46)

จากหลายการศึกษาพบว่ารากฟันที่มีการละลายไม่ว่าจะเกิดจากสาเหตุใดก็ตาม จะพบเซลล์สลายกระดูก/เซลล์สลายฟันอยู่บริเวณเนื้อฟันที่มีการละลาย (6, 8, 9) โดยการทำงานของเซลล์สลายกระดูก/เซลล์สลายฟัน จำเป็นต้องมีการจับติดแน่นของเซลล์กับผิวของกระดูกหรือผิวฟัน โดยปฏิสัมพันธ์นี้เกิดจากการทำงานของอินทริกริน (integrin) ที่อยู่บนผิวของเซลล์สลายกระดูก/เซลล์สลายฟัน หลังจากเซลล์ยึดเกาะกับผิวกระดูกหรือผิวฟันแล้ว บริเวณรัฟเฟิลบอเดอร์ของเซลล์สลายกระดูก/ เซลล์สลายฟัน จะมีการแลกเปลี่ยนอิออนเพื่อปรับสภาพความเป็นกรดด่าง ให้เหมาะกับการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยสลายสารเคลือบเซลล์ (extracellular matrix) โดยความเป็นกรดที่เหมาะสมคือ pH ประมาณ 4.5 จะให้เซลล์สลายกระดูกมีประสิทธิภาพในการละลายเนื้อเยื่อแข็งสภาพความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมจะช่วยกระตุ้นการทำงานของเอ็นไซม์ต่างๆ ที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายกระดูกและเนื้อเยื่อ เกี่ยวพัน (connective tissue) เช่น คาเทปซินเคเมพริกเมทัลโลโปรตีนเนส และ TRAP เป็นต้น (10)

ปัจจุบันพบว่ามีสารยับยั้งการแปรสภาพและการทำงานของเซลล์สลายกระดูกอยู่หลายตัว เช่น

- ออสติโอโพรทีเจอริน (osteoprotegerin; OPG) หรือออสติโอคลาสโตเจนิซิส อินฮิบิเทอรีแฟกเตอร์ (osteoclastogenesis inhibitory factor; OCIF) เป็นโปรตีนที่ถูกสร้างและหลั่งออกมาจากเซลล์ ซึ่งเซลล์ที่พบการแสดงออกของ OPG เป็นจำนวนมากได้แก่ เซลล์สร้างกระดูก นอกจากนี้ยัง สามารถพบการแสดงออกของ OPG ได้ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ เช่น หัวใจ ตับ ไต ม้าม และไขกระดูก OPG จะแย่งจับกับ RANK ทำให้ RANKL ไม่สามารถจับกับ RANK ได้ ดังนั้น กระบวนการแปรสภาพและการ กระตุ้นการทำงานของเซลล์สลายกระดูก จะถูกยับยั้งโดยการทำงานของ OPG (47) จากการศึกษา ในหนูทดลอง (48) โดยการฉีดสาร OPG เข้าไปบริเวณร่องฟันที่ได้รับแรงเคลื่อนฟันพบว่าสามารถ หยุดการละลายของกระดูก และฟันได้
- แคลซิโทนิน (calcitonin) เป็นโปรตีนถูกสร้างและหลั่งโดยซีเซลล์ (C cell) ในต่อมไทรอยด์ซึ่งเซลล์สลายกระดูกจะมีตัวรับสัญญาณของแคลซิโทนินอยู่บนผิวเซลล์ เมื่อเซลล์สลายกระดูกถูกกระตุ้นด้วยแคลซิโทนิน เซลล์จะหลุดออกจากผิวกระดูกที่เกาะอยู่ทำให้กระบวนการละลายกระดูก ถูกยับยั้ง (49)
- อินเตอร์เฟียรอนแกรมมา (interferon-γ; IFN γ) ทีเซลล์ (T cell) จะเป็นเซลล์หลักในการสร้างและหลั่ง IFN-γ พบว่า IFN γ สามารถยับยั้งการแปรสภาพจากเซลล์ต้นกำเนิด ไปเป็นเซลล์สลาย กระดูกได้ (50)
- อินเตอร์เฟียรอนเบตา (interferon-β ; IFN-β) เซลล์ในส่วนของภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (innate immunity) บางชนิดเช่น เดนไดรทิกเซลล์ (dendritic cell) จะหลั่ง IFN-β เพื่อช่วยในการกำจัดไวรัส เป็นต้น มีการศึกษาพบว่า IFN-β สามารถยับยั้งวิถีสัญญาณ RANK/RANKL ในกระบวนการ osteoclastogenesis ได้ (51)

การยับยั้งการแปรสภาพและการทำงานของเซลล์สลายกระดูก มีความสำคัญในการหยุดกระบวนการ ละลายกระดูกและฟัน ดังนั้นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนองต่อการอักเสบของเซลล์โพรงฟัน และ เซลล์สร้างเนื้อฟันต่อการแปรสภาพ และการทำงานของเซลล์สลายกระดูก/เซลล์สลายฟัน จึงมีความสำคัญในการ พัฒนาแนวทางในการรักษาการละลายของรากฟันของผู้ป่วย

งานวิจัยนี้คณะผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์ต้องการศึกษากลไกการเกิดการละลายภายในคลองรากฟันที่เกิดจากแรงเค้น-แรงเครียด ซึ่งเป็นสาเหตุหลักในการเกิดการละลายของรากฟัน โดยจะทำการศึกษาความสัมพันธ์ของแรงเค้น-แรงเครียดต่อการตอบสนองการอักเสบของเซลล์โพรงฟัน, เซลล์สร้างเนื้อฟัน เซลล์ใน

ระบบภูมิคุ้มกันและเซลล์สลายกระดูก/เซลล์สลายฟัน และศึกษาความสัมพันธ์ของการอักเสบดังกล่าวต่อการแปรสภาพและการทำงานของเซลล์สลายกระดูก/เซลล์สลายฟัน ซึ่งประโยชน์ในการศึกษานี้ จะสามารถใช้ เป็นแนวทางในการพัฒนาการรักษาการละลายภายในคลองรากฟัน และยังอาจสามารถใช้เป็นแนว ทางในการรักษาการอักเสบต่าง ๆ ที่เกิดกับโพรงประสาทฟัน รวมถึงยังสามารถนำไปเป็นแนวทางในการรักษาการละลายของกระดูกจากการอักเสบได้อีกด้วย

**วิธีการดำเนินการวิจัย**

**1. การเพาะเลี้ยงเซลล์**

การเลี้ยงเซลล์โพรงฟัน

ล้างฟันที่ถอนมาด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลายน์ที่ปราศจากเชื้อหลายๆครั้ง เพื่อกำจัดเลือดและสิ่งสกปรกออกจากตัวฟัน จากนั้นแบ่งฟันออกเป็นสองส่วนและดึงเนื้อเยื่อในออกจากโพรงฟันนำมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 1x1 มิลลิเมตร นำไปย่อยด้วยเอนไซม์คอลลาจิเนสชนิดที่ 1 ที่ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยวางบนเครื่องหมุนความเร็วต่ำ จากนั้นนำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 2000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และนำส่วนตกตะกอนไปเพาะเลี้ยงในจานเลี้ยง ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ชนิดดีเอ็มอีเอ็ม (Dulbecco's Modified Eagle Medium; DMEM, Gibco, USA) ที่มีซีรัมจากฟีตัลวัว (feta bovine serum) ร้อยละ 10 ยาปฏิชีวนะและยาต้านจุลชีพร้อยละ 1 และแอลกลูตามีนร้อยละ 1 (L-glutamine 200mM, Invitrogen, USA) และเพาะเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนวันเว้นวัน จนกระทั่งเซลล์คลานออกจากชิ้นเนื้อ และเมื่อเซลล์เจริญเติบโตเต็มจานเลี้ยง ก็จะถูกถ่ายลงจานใหม่และนับเป็นเซลล์รุ่นที่ 1 เซลล์ที่ใช้สำหรับการทดลองเป็นเซลล์รุ่นที่ 3-9

การเพาะเลี้ยงเซลล์สลายกระดูก

เซลล์ทำลายกระดูกจะได้จากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวที่แยกจากกระแสเลือด โดยการเจาะเลือดมาปั่นแยกในสารไฟคอล (Ficoll) ที่ความเร็ว 4000xg เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงดูดเซลล์จากชั้นเม็ดเลือดขาวใต้ต่อชั้นไลเซอนบน และนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี RANKL และ M-CSF เพื่อกระตุ้นการเกิดเซลล์สลายกระดูก

การเพาะเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูก

เซลล์สร้างกระดูกจะได้จากชิ้นกระดูกที่ถูกตัดออกจากกระดูกขากรรไกรเนื่องจากการถอนฟันคุดหรือจาก การผ่าตัดกระดูกขากรรไกรตามแผนการรักษา ชิ้นกระดูกจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์คอลลาจิเนส เพื่อ

กำจัดส่วนของ เซลล์อื่นๆที่ปนเปื้อนมา จากนั้นหว่านชิ้นกระดูกลงในจานเลี้ยงเพื่อให้เซลล์กระดูกเคลื่อนออกจากชิ้นกระดูก

**2. การกระตุ้นเซลล์ด้วยแรงเครียด-แรงเค้น**

เซลล์จะถูกหว่านลงในจานเลี้ยงเป็นเวลา 1 คืน จากนั้นจึงกดทับด้วยน้ำหนักขนาด 1 2.5 กรัม/ตาราง เซนติเมตร เป็นเวลา 1-4 ชั่วโมง

**3. การตรวจวัดการตอบสนองของเซลล์**

เมื่อครบกำหนดเวลา RNA จะถูกสกัดจากเซลล์เพื่อนำไปตรวจสอบการแสดงออกของยีนของไซโตไคน์ต่างๆ โดยวิธีรีเวอส์ทรานส์ คริบชันโพลีเมอเรสเชนรีแอคชัน (RT-PCR- reverse transcription polymerase chain reaction)

<u>การสกัด RNA</u>

เซลล์ถูกล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์จำนวน 3 ครั้ง และเติมสารไตรซอล (TRIzol reagent) ปริมาตร 1 มิลลิ ลิตรลงและทำการผสมด้วยการดูดขึ้นลงในปิเปตต์ จากนั้นจึงถ่ายสารละลายที่ได้ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิ ลิตรจากนั้นเติมคลอโรฟอร์มปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วทำการผสมให้เข้ากันด้วยและตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงนำไปปั่นที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำส่วนไสด้วน บนถ่ายลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตรอันใหม่ทำการตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยการเติมไอโซโพรพานอลที่เย็นจัดปริมาตร 1 เท่าของ สารละลาย และผสมให้เข้ากันตั้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำ RNA pellet ที่ได้มาล้างด้วย แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซล เซียส ค่อยๆนำส่วนสารละลายทิ้งไปและปล่อยให้ pellet แห้ง ที่อุณหภูมิห้อง นำ RNA pellet ที่ได้มาละลายด้วยน้ำ DEPC (diethylpyro-carbonate) treated water และทำการวัดปริมาณอาร์เอ็นเอ ด้วยเครื่องวัดค่าการดูด กลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260-280 นาโนเมตร

การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบวัดปริมาณ (<u>Quant</u>i<u>tative</u> Po<u>l</u>ymerase Chain <u>Reaction</u>; qPCR)

RNA ที่สกัดได้ จะนำไปผ่านกระบวนการรีเวอร์ส ทรานสคริปชั่น เพื่อสร้างคอมพลีเมน ทารีดีเอ็นเอ (complementary DNA) โดยนำอาร์เอ็นเอที่ได้มาผสมกับ 50 μM oligo $(dT)_{20}$ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และ 10 mM dNTP mixtures (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร จากนั้นจึงนำไว้ที่

อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และนำมาแช่บนน้ำแข็ง จากนั้นจึงนำ reaction mix มาเติม 5 x first buffer ปริมาตร 4 ไมโครลิตร 0.1 M DTT ปริมาตร 1 ไมโครลิตร 40 units/µl recombinant RNase inhibitor ปริมาตร 1 ไมโครลิตรและ 200 units/µl superscript III reverse transcriptase ปริมาตร 1 ไมโครลิตร โดยบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และหยุดปฏิกิริยาโดย บ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นลดอุณหภูมิลงมาที่ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นตรวจดูการเพิ่มปริมาณของสารพันธุกรรมแบบวัดปริมาณ จะทำในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบวัดปริมาณ (Lightcycler 480) โดยใช้ SYBR green เป็นตัวตรวจจับปริมาณสารพันธุกรรมที่เพิ่มขึ้น

**3. ผลต่อเซลล์สลายกระดูกและเซลล์สร้างกระดูก**

ผลต่อเซลล์กระดูกทั้งสองชนิดจะเป็นผลโดยอ้อมโดยดูผลของสารอักเสบที่ตรวจพบจากเซลล์โพรงฟันที่ถูกกระตุ้นด้วยแรงเชิงกลต่อเซลล์กระดูกทั้งสองชนิด

ผลต่อการเกิดและการทำงานของเซลล์สลายกระดูก จะวัดจากการย้อมเพื่อตรวจสอบการแสดงออกของเอนไซม์แอซิด ฟอสฟาเตส โดยใช้ชุดตรวจสอบตามวิธีการที่แนะนำโดยบริษัทผู้ผลิต และการตรวจวัดจำนวนเซลล์ที่มีนิวเคลียสมากกว่าสามนิวเคลียสในส่วนการทำงาน ของเซลล์ทำลายกระดูก จะทำโดยการหว่านเซลล์ทำลายกระดูกลงบนแผ่นเนื้อฟัน จากนั้นจึงล้างเซลล์ออกด้วยด่าง และนำไปตรวจดู resorption pit ด้วย กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด

ผลต่อการเกิดเซลล์สร้างกระดูก

ตรวจดูผลต่อการแปรสภาพของเซลล์สร้างกระดูก โดยการดูการแสดงออกของเอนไซม์อัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส โดยใช้ชุดตรวจวัดและทำตามวิธีการที่แนะนำโดยบริษัทผู้ผลิต รวมทั้งตรวจดูความสามารถในการสร้าง ตะกอนแคลเซียมในจานเลี้ยงโดยการย้อมด้วยสีอะริซารินเรด

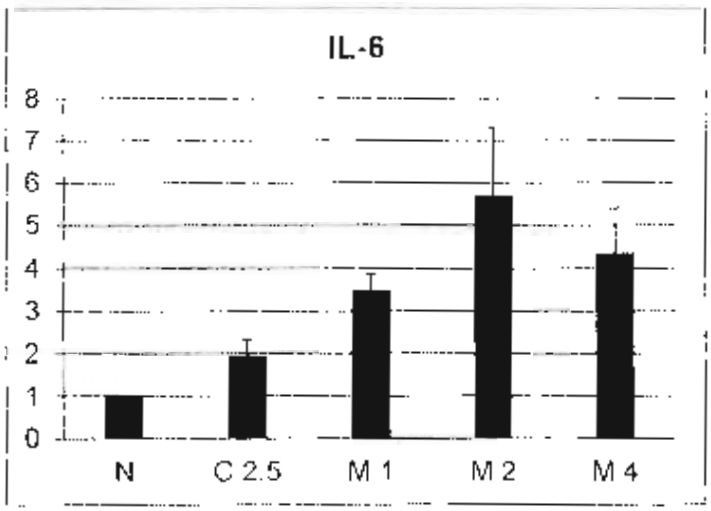
**4. การวิเคราะห์ข้อมูลเชิงสถิติ**

ค่าการแสดงออกของยีนที่แสดงผลด้วยโปรแกรมภายหลังการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Q-PCR จากการทดลอง 3 ครั้ง ถูกนำมาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยใช้สถิติ unpaired T-test โดย มีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

ผลการวิจัย

**1. ทดสอบผลของความเค้น-ความเครียดต่อการเกิดการอักเสบของเซลล์โพรงฟัน โดยเปรียบเทียบแรงเชิงกลจากการใช้เหรียญและแรงเชิงกลจากเครื่องสร้างแรงกด (compressive strength)**

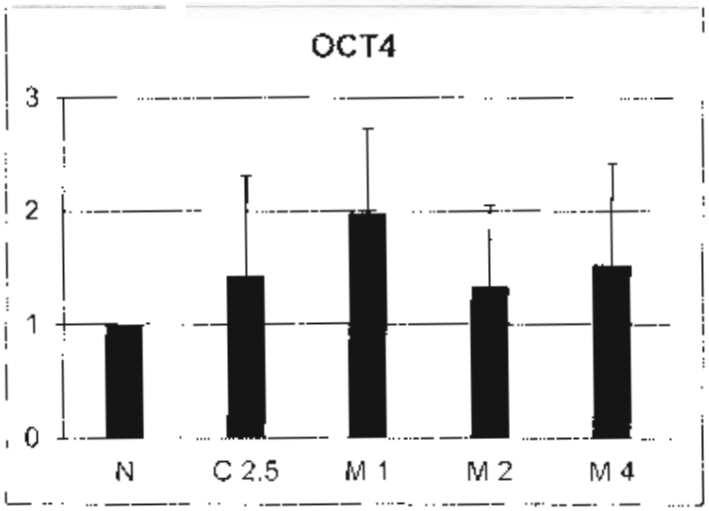
เนื่องจากการใช้แรงกดจากเหรียญเป็นการจำลองแรงกดที่ไม่สามารถคำนวณหาแรงที่เกิดขึ้นจริงได้ เพราะมีข้อจำกัดในการทดลองหลายประการ ดังนั้นผู้วิจัยจึงนำเครื่องสร้างแรงกดที่สามารถทราบค่าแรงกดเกิดขึ้นจริงได้มาทดสอบเบื้องต้น โดยเปรียบเทียบกับแรงกดที่ใช้เหรียญ จากผลงานวิจัยของ Govitvattana และคณะ(52) พบว่าเมื่อให้แรงกดด้วยเหรียญจำนวน 2.5 กรัม เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ส่งผลให้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นของยีนส์ Interleukin-6 (IL-6) ในเซลล์โพรงฟัน ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการทดลอบเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนส์ IL-6 ในเซลล์โพรงฟันที่เกิดจากแรงกดจากน้ำหนักเหรียญ 2.5 กรัม และแรงกดขนาดต่างๆ จากเครื่องให้แรงกด โดยทำการทดสอบเบื้องต้นจำนวนในเซลล์โพรงฟัน จากผลการทดสอบพบว่าการให้แรงด้วยเครื่องให้แรงกดสามารถเหนี่ยวนำเซลล์โพรงฟันให้มีการแสดงออกของยีนส์ Il -6 ได้ดีกว่าการให้แรงกดด้วยเหรียญ (รูปที่ 1)



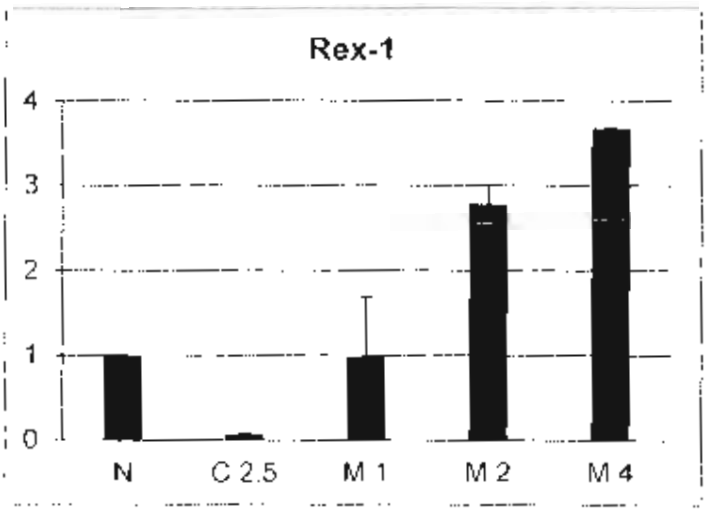

**รูปที่_1** แสดงค่า Relative mRNA expression โดยวิธี qPCR ของ Il -6 ในเซลล์โพรงฟันที่ได้รับแรงกดนาน 2 ชั่วโมง (n =3) Control= ไม่มีแรงกด; C 2.5 g – ให้แรงกดด้วยเหรียญน้ำหนัก 2.5 กรัม; M 1 g, 2 g และ 4 g = ให้แรงกดด้วยเครื่องสร้างแรงกด โดยมีขนาดของแรง 1, 2 และ 4 กรัม ตามลำดับ

นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ตรวจสอบการแสดงออกของยีน OCT4 (รูปที่ 2) Rex-1 (รูปที่ 3) และ IL-1β (รูปที่ 4) เพื่อเปรียบเทียบแรงจากการกดด้วยเหรียญ และแรงจากการใช้เครื่องสร้างแรงกด พบว่าไม่มีความแตกต่างของ OCT4 แต่เครื่องสร้างแรงกดสามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของ Rex-1 และ IL-1β ได้มากกว่าการใช้เหรียญกด และการตอบสนองของยีนทั้งสองดังกล่าวเพิ่มขึ้นเมื่อให้แรงกดด้วยเครื่องเพิ่มขึ้น (dose dependent)

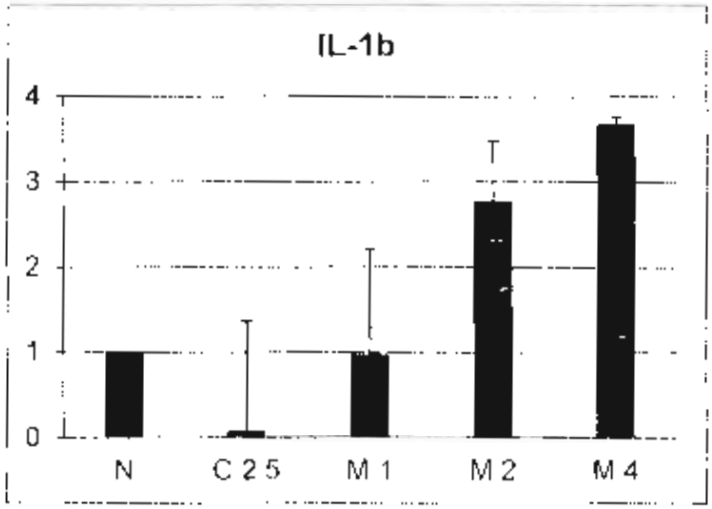
Rex-1 เป็น stem cell marker ซึ่งถูกควบคุมโดย IL-6 จากผลการทดลอง (รูปที่ 1 และ รูปที่ 3) พบว่าการแสดงออกของ Rex-1 นั้น สองคล้องกับการแสดงออกของ IL-6




**รูปที่ 2** แสดงค่า Relative mRNA expression โดยวิธี qPCR ของ OCT4 ในเซลล์โพรงฟันที่ได้รับแรงกดนาน 2 ชั่วโมง (n =3) Control= ไม่มีแรงกด; C 2.5 g = ให้แรงกดด้วยเหรียญน้ำหนัก 2.5 กรัม; M 1 g, 2 g และ 4 g = ให้แรงกดด้วยเครื่องสร้างแรงกด โดยมีขนาดของแรง 1, 2 และ 4 กรัม ตามลำดับ




**รูปที่ 3** แสดงค่า Relative mRNA expression โดยวิธี qPCR ของ Rex-1 ในเซลล์โพรงฟันที่ได้รับแรงกดนาน 2 ชั่วโมง (n =3) Control= ไม่มีแรงกด; C 2.5 g = ให้แรงกดด้วยเหรียญน้ำหนัก 2.5 กรัม; M 1 g, 2 g และ 4 g = ให้แรงกดด้วยเครื่องสร้างแรงกด โดยมีขนาดของแรง 1, 2 และ 4 กรัม ตามลำดับ




**รูปที่ 4** แสดงค่า Relative mRNA expression โดยวิธี qPCR ของ IL-1 ในเซลล์โพรงฟันที่ได้รับแรงกดนาน 2 ชั่วโมง (n =3) Control- ไม่มีแรงกด; C 2.5 g = ให้แรงกดด้วยเหรียญน้ำหนัก 2.5 กรัม; M 1 g, 2 g และ 4 g = ให้แรงกดด้วยเครื่องสร้างแรงกด โดยมีขนาดของแรง 1, 2 และ 4 กรัม ตามลำดับ

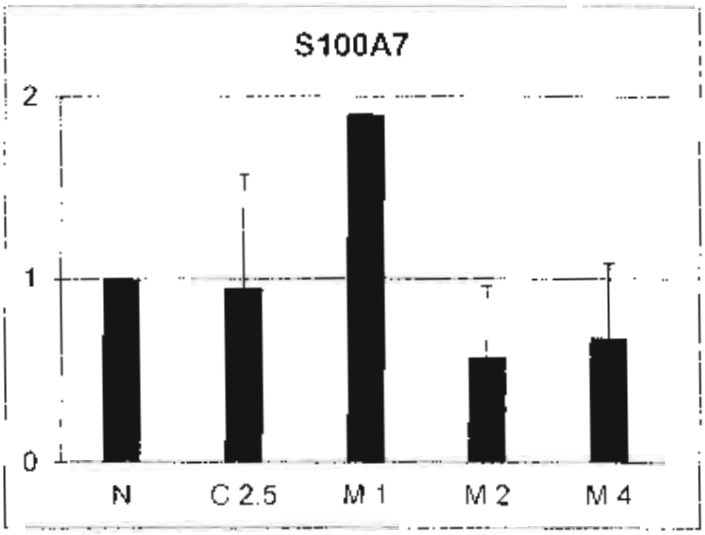
**2. ทดสอบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการละลายของกระดูกหรือคลองรากฟัน**

การแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ IL 1β (รูปที่ 4) แสดงถึงแรงกดที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้เกิดการอักเสบของเซลล์โพรงฟัน ซึ่งผลการทดลองเบื้องต้นของผู้วิจัยนี้สอดคล้องกับการศึกษากลไกการละลายภายในคลองรากฟัน (53, 54) กล่าวคือการละลายภายในคลองรากฟันเป็นผลมาจากการอักเสบเรื้อรังของโพรงประสาทฟัน (chronic pulpal inflammation) โดยการอักเสบเรื้อรังที่เกิดขึ้นนั้นมีสาเหตุหนึ่งมาจากการตายของเซลล์โพรงฟันแบบ necrosis

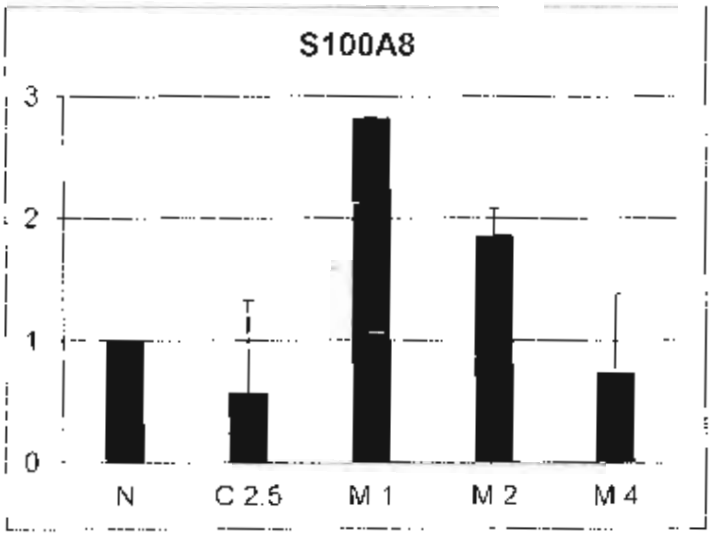
การตายของเซลล์แบบ necrosis มีผลต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย โดย necrotic cell จะถูกระบบภูมิคุ้มกันรับรู้และจดจำผ่านทางตัวรับสัญญาณที่อยู่ในเซลล์ (intracellular receptor) ที่เรียกว่า DAMP (Danger associated molecular pattern) การตอบสนองของ DAMP ส่งผลให้เกิดการอักเสบและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (innate immunity) และภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (adaptive immunity) (55) ปัจจุบันการศึกษาเกี่ยวกับ DAMP ยังมีไม่มากนัก อย่างไรก็ตามพบว่าการตอบสนองของ DAMP เกิดได้จากสัญญาณผ่านทาง TLRs (Toll-like receptors) เช่น TLR-4 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS นอกจากนี้ยังพบว่าวิถีสัญญาณ DAMP สามารถถูกกระตุ้นได้โดย hyaluronan และ S100 proteins (56, 57)

S100 proteins เป็นกลุ่มของ calcium-binding protein ประกอบด้วย S100A1 – A16, S100B, S100P และ CALB3 หน้าที่หลักของ S100 ได้แก่ protein phosphorylation, enzyme activity, calcium homeostasis, ควบคุมการทำงานของ cytoskeletal components และ ควบคุมการทำงานของ transcriptional factors (58) การศึกษาการทำงานของ S100 protein ที่มีผลต่อการละลายของกระดูกยังมีไม่มากนัก อย่างไรก็ตามมีการศึกษาพบว่า S100A4, S100A7 และ S100A8

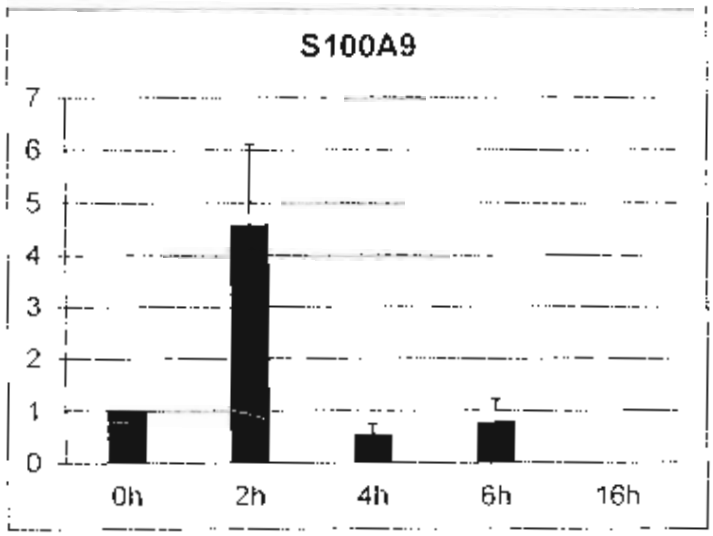
สามารถกระตุ้นการทำงานของ osteoclast ได้ทั้งทางตรงและทางอ้อม (59-61) ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการทดลองโดยให้แรงกดแก่เซลล์โพรงฟันในขนาดต่าๆ ต่างกันเพื่อตรวจดูการแสดงออกของยีน S100A4, S100A7 (รูปที่ 5) และ S100A8/A9 (S100A8 สามารถ form เป็น heterodimer กับ S100A9 ได้) (รูปที่ 6 และ 7) จากผลการทดลองพบว่าการให้แรงกดขนาด 2.5 กรัมด้วยเหรียญ ไม่สามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนทั้ง 4 ชนิดได้ การให้แรงกดด้วยเครื่องทุกขนาดไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน S100A4 (อยู่ระหว่างการยืนยันผลการทดลอง จึงไม่ได้แสดงผลในรายงาน) แต่การมีผลต่อการแสดงออกของยีน S100A7, S100A8 และ S100A9 โดยการให้แรงกดขนาด 1 กรัมด้วยเครื่อง สามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีน S100A7 และ S100A8 ได้มากที่สุด ส่วนการให้แรงกดขนาด 4 กรัมด้วยเครื่องสามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีน S100A9 ได้มากที่สุด




**รูปที่ 5** แสดงค่า Relative mRNA expression โดยวิธี qPCR ของ S100A7 ในเซลล์โพรงฟันที่ได้รับแรงกดนาน 2 ชั่วโมง (n =3) Control= ไม่มีแรงกด; C 2.5 g = ให้แรงกดด้วยเหรียญน้ำหนัก 2.5 กรัม; M 1 g, 2 g และ 4 g = ให้แรงกดด้วยเครื่องสร้างแรงกด โดยมีขนาดของแรง 1, 2 และ 4 กรัม ตามลำดับ



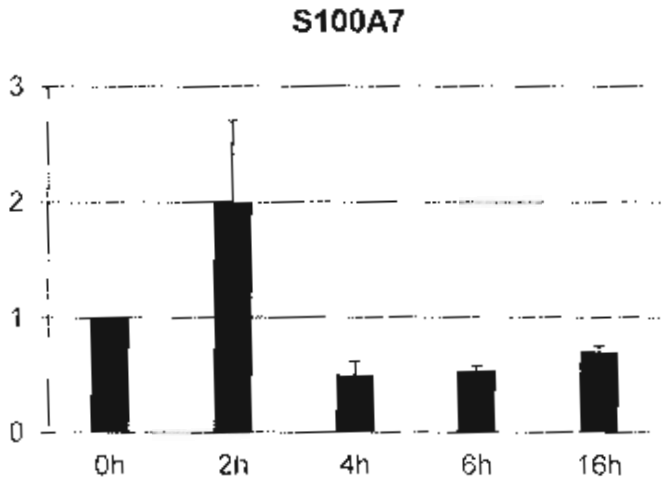

**รูปที่ 6** แสดงค่า Relative mRNA expression โดยวิธี qPCR ของ S100A8 ในเซลล์โพรงฟันที่ได้รับแรงกดนาน 2 ชั่วโมง (n = 3) Control= ไม่มีแรงกด; C 2.5 g = ให้แรงกดด้วยเหรียญน้ำหนัก 2.5 กรัม; M 1 g, 2 g และ 4 g = ให้แรงกดด้วยเครื่องสร้างแรงกด โดยมีขนาดของแรง 1, 2 และ 4 กรัม ตามลำดับ



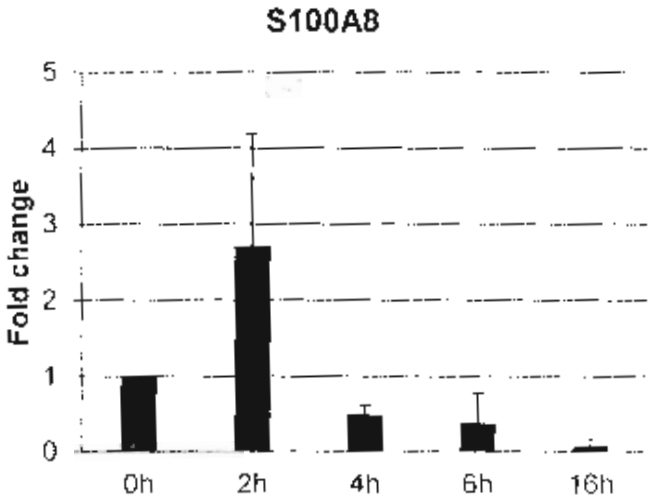

**รูปที่ 7** แสดงค่า Relative mRNA expression โดยวิธี qPCR ของ S100A9 ในเซลล์โพรงฟันที่ได้รับแรงกดนาน 2 ชั่วโมง (n = 3) Control= ไม่มีแรงกด; C 2.5 g = ให้แรงกดด้วยเหรียญน้ำหนัก 2.5 กรัม; M 1 g, 2 g และ 4 g = ให้แรงกดด้วยเครื่องสร้างแรงกด โดยมีขนาดของแรง 1, 2 และ 4 กรัม ตามลำดับ

3. ทดสอบการแสดงออกของยีน S100 เมื่อให้แรงกด (compressive strength) ด้วยเครื่องกด แก่เซลล์โพรงฟัน ในเวลาที่ต่างกัน

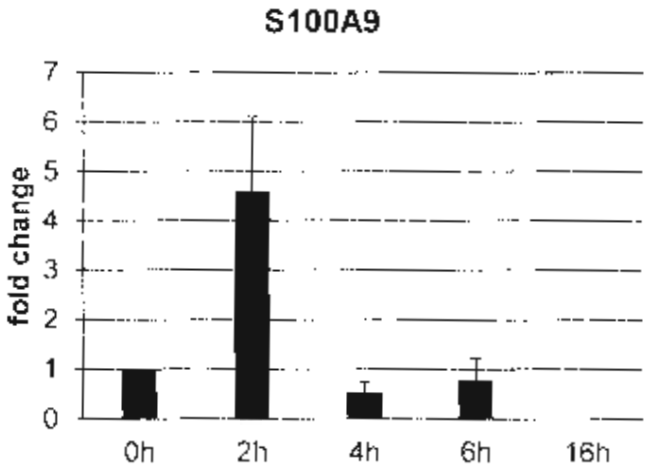
ในการทดลองนี้ผู้วิจัยได้ทดสอบการแสดงออกของยีนส์ S100A7, S100A8 และ S100A9 ในเซลล์โพรงฟันได้รับแรงกดจากเครื่องสร้างแรงกดขนาด 1 กรัม เป็นเวลา 2, 4, 6 และ 16 ชั่วโมง โดยเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับแรงกด จากผลการทดลองพบว่าเซลล์โพรงฟันมีการแสดงออกของยีนส์ทั้ง 3 ชนิด ดังกล่าว เมื่อได้รับแรงกดนาน 2 ชั่วโมง (รูปที่ 8, รูปที่ 9 และ รูปที่ 10)




**รูปที่ 8** แสดงค่า Relative mRNA expression โดยวิธี qPCR ของยีนส์ชนิด S100A7 ในเซลล์โพรงฟันที่ได้รับแรงกดด้วยเครื่องสร้างแรงกดขนาด 1 กรัม เป็นเวลานาน 2, 4, 6 และ 16 ชั่วโมง โดยมีกลุ่มควบคุมคือเซลล์ที่ไม่ได้รับแรงกด (0h) โดยมีจำนวนตัวอย่างคือ n = 3



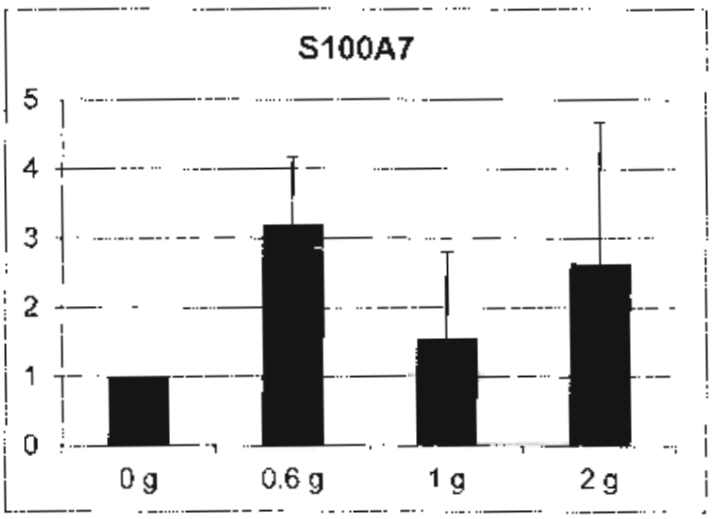

**รูปที่ 9** แสดงค่า Relative mRNA expression โดยวิธี qPCR ของยีนส์ชนิด S100A8 ในเซลล์โพรงฟันที่ได้รับแรงกดด้วยเครื่องสร้างแรงกดขนาด 1 กรัม เป็นเวลานาน 2, 4, 6 และ 16 ชั่วโมง โดยมีกลุ่มควบคุมคือเซลล์ที่ไม่ได้รับแรงกด (0h) โดยมีจำนวนตัวอย่างคือ n = 3 แกน Y แสดงค่า relative mRNA ของแต่ละเวลาโดยเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับแรงกด



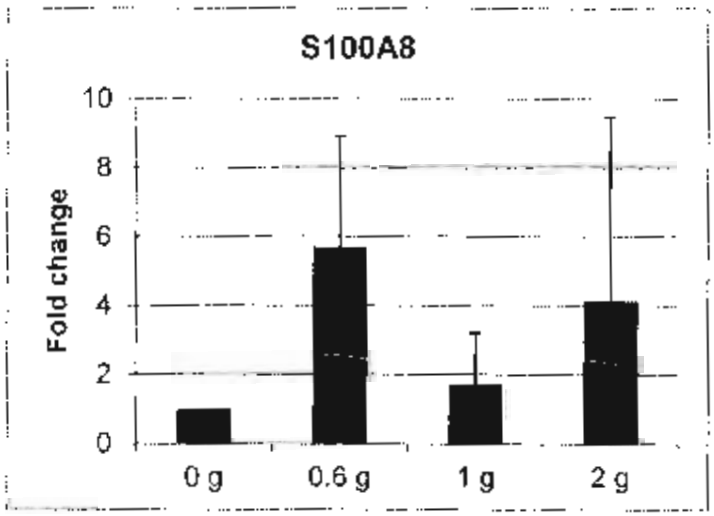

**รูปที่ 10** แสดงค่า Relative mRNA expression โดยวิธี qPCR ของยีนส์ชนิด S100A9 ในเซลล์โพรงฟันที่ได้รับแรงกดด้วยเครื่องสร้างแรงกดขนาด 1 กรัม เป็นเวลานาน 2, 4, 6 และ 16 ชั่วโมง โดยมีกลุ่มควบคุมคือเซลล์ที่ไม่ได้รับแรงกด (0h) โดยมีจำนวนตัวอย่างคือ n = 3 แกน Y แสดงค่า relative mRNA ของแต่ละเวลาโดยเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับแรงกด

**4. ทดสอบการแสดงออกของยีน S100 เมื่อให้แรงกดด้วยเหรียญที่มีน้ำหนักต่าง ๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แก่เซลล์โพรงฟัน**

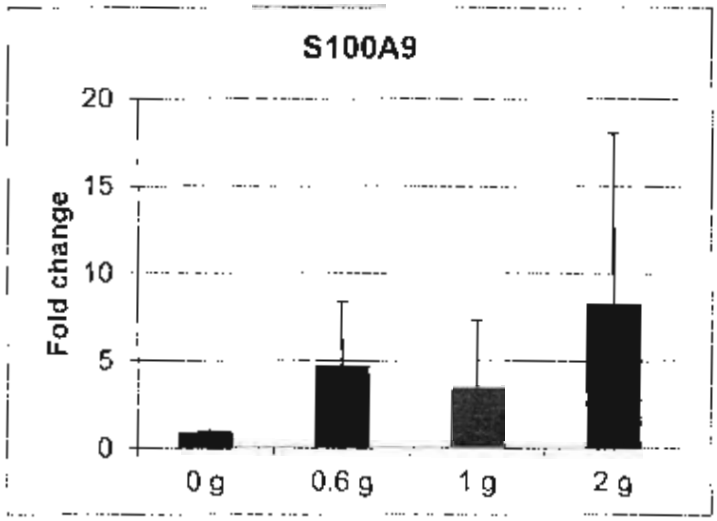
จากผลการทดลองพบว่าเครื่องสร้างแรงกดไม่สามารถให้แรงกดที่คงที่ ทำให้ผลการทดลองมีความคลาดเคลื่อนจากความเป็นจริง ดังนั้นจึงต้องเปลี่ยนจากเครื่องสร้างแรงกด มาใช้การกดด้วยเหรียญ ดังงานวิจัยของ Govitvattana และคณะ(52) จากผลการทดสอบหลายครั้งที่ผ่านมาพบว่าการให้แรงกดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง สามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนส์ S100 ได้ดีที่สุด ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการทดสอบโดยให้แรงกดบริมาณ 0, 0.6, 1 และ 2 กรัม เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง จากผลการทดลองพบว่าการให้แรงกดด้วยเหรียญปริมาณ 0.6 กรัม สามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนส์ S100A7 (รูปที่ 11), S100A8 (รูปที่ 12) และ S100A8 (รูปที่ 13) ได้ดีที่สุด




**รูปที่ 11** แสดงค่า Relative mRNA expression โดยวิธี qPCR ของยีนส์ชนิด S100A7 ในเซลล์โพรงฟันที่ได้รับแรงกดด้วยเหรียญปริมาณ 0, 0.6, 1 และ 2 กรัม เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง โดยมีจำนวนตัวอย่างคือ n = 3 แกน Y แสดงค่า relative mRNA ของแต่ละเวลาโดยเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับแรงกด



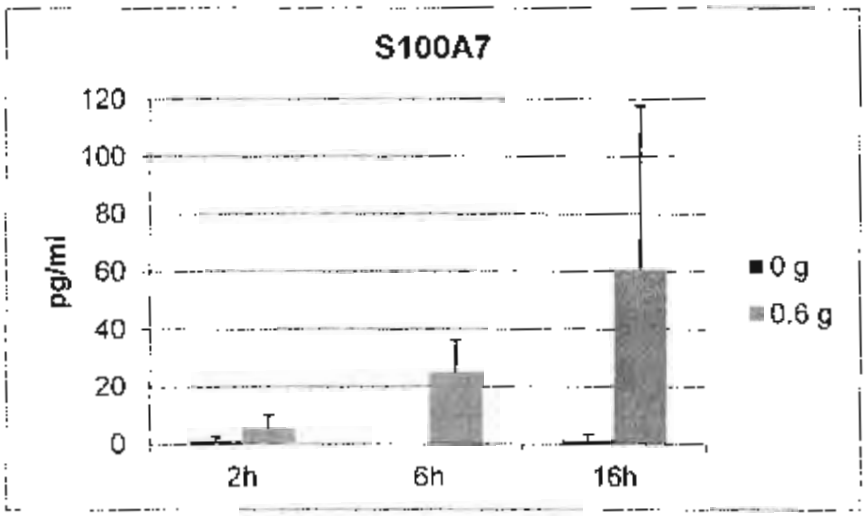

**รูปที่ 12** แสดงค่า Relative mRNA expression โดยวิธี qPCR ของยีนส์ชนิด S100A8 ในเซลล์โพรงฟันที่ได้รับแรงกดด้วยเหรียญปริมาณ 0, 0.6, 1 และ 2 กรัม เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง โดยมีจำนวนตัวอย่างคือ n = 3 แกน Y แสดงค่า relative mRNA ของแต่ละเวลาโดยเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับแรงกด




**รูปที่ 13** แสดงค่า Relative mRNA expression โดยวิธี qPCR ของยีนส์ชนิด S100A9 ในเซลล์โพรงฟันที่ได้รับแรงกดด้วยเหรียญปริมาณ 0, 0.6, 1 และ 2 กรัม เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง โดยมีจำนวนตัวอย่างคือ n = 3 แกน Y แสดงค่า relative mRNA ของแต่ละเวลาโดยเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับแรงกด

**5. ทดสอบการหลั่งโปรตีนชนิด S100A7 จากเซลล์โพรงฟันที่ได้รับแรงกดจากเหรียญปริมาณ 0 และ 0.6 ไมโครกรัมเป็นเวลานาน 2, 6 และ 16 ชั่วโมง**

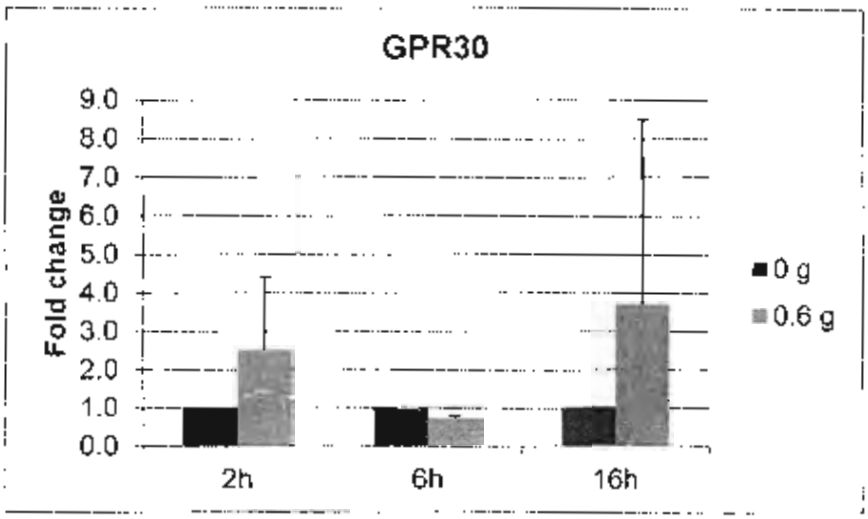
ในการศึกษานี้ผู้วิจัยมีความสนใจ S100A7 เนื่องจากมีลักษณะเป็น homodimer สามารถทำการศึกษาได้ง่าย ต่างจาก S100A8 และ S100A9 ซึ่งมีรูปแบบทั้ง homodimer และ heterodimer ทำให้มีความซับซ้อนมากในการศึกษา การทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อวัดการหลั่งโปรตีน S100A7 โดยการให้แรงกดด้วยเหรียญปริมาณ 0.6 ไมโครกรัมแก่เซลล์โพรงฟัน จากผลการทดลอง (รูปที่ 14) พบว่าการให้แรงกดเป็นเวลาที่นานขึ้นจะส่งผลให้เซลล์มีการหลั่งโปรตีน S100A7 ในปริมาณที่มากขึ้น



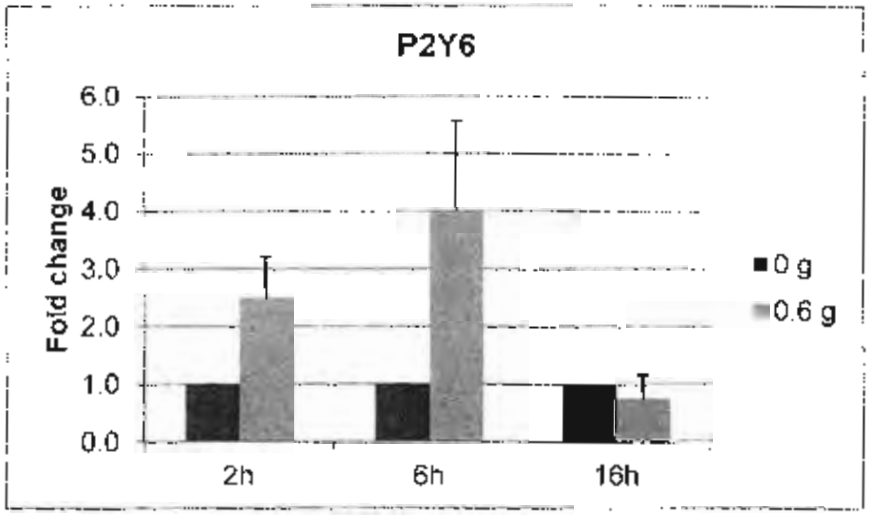

<u>รูปที่ 14</u> แสดงปริมาณโปรตีน S100A7 ด้วยวิธี ELISA ที่หลั่งจากเซลล์โพรงฟันที่ได้รับแรงกดขนาด 0 และ 0.6 กรัม เป็นเวลานาน 2, 6 และ 16 ชั่วโมง โดยมีจำนวนตัวอย่างคือ n = 3

**6. การทดสอบการแสดงออกของยีนส์ต่าง ๆ ที่ถูกกระตุ้นด้วยแรงเชิงกล**

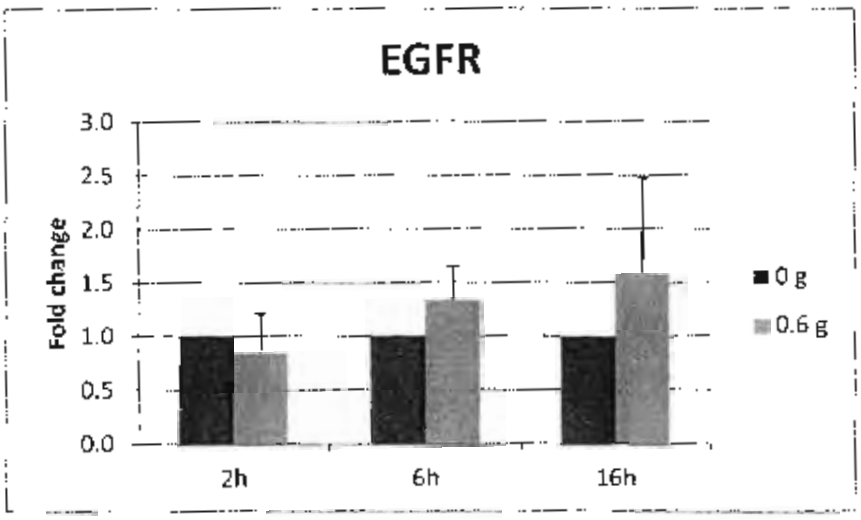
การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาตัวรับสัญญาณ (receptor) และวิถีสัญญาณ (signaling pathway) ที่เกี่ยวข้องกับแรงเชิงกล และการแสดงออกของ S100A7 จากการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นด้วยแรงเชิงกลในเซลล์ต่าง ๆ พบว่า แรงเชิงกลจะมีผลต่อตัวรับสัญญาณและวิถีสัญญาณชนิด G protein coupling receptor (GPCR) (62-64), Epidermal growth factor receptor (EGFR) (65) และ Purinergic receptor type 6 (P2Y6R) (66) ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการยืนยันผลดังกล่าวในเซลล์โพรงฟัน โดยให้แรงกดด้วยเหรียญปริมาณ 0 และ 0.6 กรัม เป็นเวลานาน 2, 6 และ 16 ชั่วโมง จากผลการทดลองพบว่าเมื่อเซลล์ได้รับแรงกดจะมีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของยีนส์ GPR30 (รูปที่ 15) และ P2Y6 (รูปที่ 16) แต่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนส์ EGFR (รูปที่ 17)




**รูปที่ 15** แสดงค่า Relative mRNA expression โดยวิธี qPCR ของยีนส์ชนิด GPR30 ในเซลล์โพรงฟัน เมื่อเซลล์ได้รับแรงกดด้วยเหรียญปริมาณ 0 และ 0.6 กรัม เป็นเวลานาน 2, 6 และ 16 ชั่วโมง โดยมีจำนวนตัวอย่างคือ n = 3 แกน Y แสดงค่า relative mRNA ของแต่ละเวลาโดยเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับแรงกด




**รูปที่ 16** แสดงค่า Relative mRNA expression โดยวิธี qPCR ของยีนส์ชนิด P2Y6 ในเซลล์โพรงฟัน เมื่อเซลล์ได้รับแรงกดด้วยเหรียญปริมาณ 0 และ 0.6 กรัม เป็นเวลานาน 2, 6 และ 16 ชั่วโมง โดยมีจำนวนตัวอย่างคือ n = 3 แกน Y แสดงค่า relative mRNA ของแต่ละเวลาโดยเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับแรงกด




**รูปที่ 17** แสดงค่า Relative mRNA expression โดยวิธี qPCR ของยีนส์ชนิด P2Y6 ในเซลล์โพรงฟัน เมื่อเซลล์ได้รับแรงกดด้วยเหรียญปริมาณ 0 และ 0.6 กรัม เป็นเวลานาน 2, 6 และ 16 ชั่วโมง โดยมีจำนวนตัวอย่างคือ n = 3 แกน Y แสดงค่า relative mRNA ของแต่ละเวลาโดยเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับแรงกด

**วิจารณ์และสรุปผล**

งานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์หลักในการศึกษากลไกการเกิดการละลายภายในคลองรากฟัน เพื่อนำองค์ความรู้ไปพัฒนาต่อยอดในการรักษาผู้ป่วยในคลินิก มีนักวิจัยทำการศึกษากลไกการละลายในคลองรากฟัน และตั้งสมมุติฐานว่าแรงเชิงกลส่งผลให้เกิดการอักเสบเรื้อรังของเซลล์โพรงฟัน และทำให้เกิดการตายของเซลล์โพรงฟันแบบ apoptosis ซึ่งการตายนี้จะส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของเซลล์สลายกระดูก/เซลล์สลายฟัน (29, 30) และทำให้เกิดการละลายภายในคลองรากฟัน (9) อย่างไรจนถึงปัจจุบันยังไม่มีการรายงานผลที่แน่ชัดถึงกลไกการเกิดการละลายภายในคลองรากฟัน ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงทำการศึกษากลไกดังกล่าวโดยการกระตุ้นการอักเสบของเซลล์โพรงฟันมนุษย์โดยให้แรงเชิงกลแก่เซลล์โพรงฟันในห้องทดลอง จากผลการทดลองพบว่าเมื่อเซลล์โพรงฟันได้รับความเครียดจากแรงเชิงกล ทำให้เกิดการหลั่งโปรตีน S100A7, S100A8 และ S100A9 ซึ่งเป็น endogenous danger associated molecular patterns (DAMPs) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานการศึกษาที่ผ่านมาว่าการบาดเจ็บแบบปลอดเชื้อ (sterile injury) มีผลต่อการกระตุ้นการหลั่ง DAMPs (67) และจากองค์ความรู้ในปัจจุบันพบว่ากระตุ้นการทำงานของ DAMPs นี้เป็นผลโดยตรงมาจากกระบวนการตายแบบ necrosis (55) อย่างไรก็ตามคณะผู้วิจัยยังต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันกลไกนี้ ในเซลล์โพรงฟัน

สำหรับกลไกของความเครียดจากแรงเชิงกลที่ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการหลั่ง S100 ดังกล่าวยังไม่ทราบแน่ชัด จากการศึกษาที่ผ่านมามีรายงานว่าความเครียดจากแรงเชิงกลจะมีผลต่อตัวรับสัญญาณและวิถีสัญญาณชนิด G-protein coupling receptor (GPCR) (62-64), Epidermal growth factor receptor (EGFR) (65) และ Purinergic receptor type 6 (P2Y6R) (66) และจากผลการทดลองของคณะผู้วิจัยพบว่าในเซลล์โพรงฟันที่ได้รับความเครียดจากแรงเชิงกล จะมีการแสดงออกยีนส์ที่เพิ่มขึ้นของตัวรับสัญญาณชนิด GPCR และ P2Y6R แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของยีนส์ EGFR อย่างไรก็ตามผู้วิจัยยังต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาความสัมพันธ์ของความเครียดจากแรงเชิงกล ตัวรับสัญญาณดังกล่าวและโบรตีน S100

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า S100A7 และ S100A8 สามารถกระตุ้นการทำงานของ osteoclast ได้ทั้งทางตรงและทางอ้อม (59-61) คณะผู้วิจัยจึงมีสมมุติฐานว่าการละลายภายในคลองรากฟันน่าจะเป็นผลมาจากการกระตุ้นการแปรสภาพและการทำงานของเซลล์สลายกระดูก/สลายฟัน โดยโปรตีน S100A7, S100A8 และ S100A9 ที่หลั่งจากเซลล์โพรงฟันที่ได้รับความเครียดจากแรงเชิงกล ซึ่งผู้วิจัยจะทำการพิสูจน์กลไกนี้เพื่อให้ได้องค์ความรู้ที่มีประโยชน์ต่อการรักษาการละลายภายในคลองรากฟันในคลินิกต่อไป

**การดำเนินงานในช่วงต่อไป**

1. ทดสอบหาความสัมพันธ์ของ S100 ต่อการแปรสภาพและการทำงานของเซลล์สลายกระดูก
2. ทดสอบหาความสัมพันธ์ของวิถีสัญญาณ GPR และ PY26 ต่อการเหนี่ยวนำการแสดงออกของ S100A7

**อุปสรรคในการดำเนินงาน และแนวทางการแก้ไข**

เครื่องสร้างแรงกดไม่สามารถให้แรงที่คงที่ได้ในทุก ๆ การทดลอง คณะผู้วิจัยจึงต้องใช้เหรียญเพื่อให้น้ำหนักแก่เซลล์แทนการใช้แรงกดจากเครื่อง ดังนั้นผลการวิจัยจึงล่าช้ากว่ากำหนดเล็กน้อย

**เอกสารอ้างอิง**


1. Gunraj MN. Dental root resorption. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. [Review]. 1999 Dec;88(6):647-53.

2. Tronstad I . Root resorption--etiology, terminology and clinical manifestations. Endod Dent Traumatol. [Review]. 1988 Dec;4(6):241-52.

3. Fuss Z, Tsesis I, Lin S. Root resorption -diagnosis, classification and treatment choices based on stimulation factors. Dent Traumatol. 2003 Aug;19(4):175-82.

4. Larson TD. Causes and treatment of root resorption. Northwest Dent. [Review]. 2010 May Jun;89(3):45-7.

5. Caliskan MK, Turkun M. Prognosis of permanent teeth with internal resorption: a clinical review. Endod Dent Traumatol. 1997 Apr;13(2):75-81.

6. Patel S, Ricucci D, Durak C, Tay F. Internal root resorption: a review. J Endod. [Review]. 2010 Jul;36(7):1107-21.

7. Masterton JB. Internal Resorption of the Dentine; a Complication Arising from Unhealed Pulp Wounds. Br Dent J. 1965 Mar 16;118:241-9.

8. Wedenberg C, Lindskog S. Experimental internal resorption in monkey teeth. Endod Dent Traumatol. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 1985 Dec;1(6):221-7.

9. Wedenberg C, Zetterqvist L. Internal resorption in human teeth--a histological, scanning electron microscopic, and enzyme histochemical study. J Endod. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 1987 Jun;13(6):255-9.

10. Edwards JR, Mundy GR. Advances in osteoclast biology: old findings and new insights from mouse models. Nat Rev Rheumatol. [Review]. 2011 Apr;7(4):235-43.

11. Siqueira JF, Jr. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. Int Endod J. [Research Support, Non-U.S. Gov't
Review]. 2001 Jan;34(1):1-10.

12. Nixdorf DR, Moana-Filho EJ, Law AS, McGuire LA, Hodges JS, John MT. Frequency of nonodontogenic pain after endodontic therapy: a systematic review and meta analysis. J Endod. [Meta-Analysis
Research Support, N.I.H., Extramural
Review]. 2010 Sep;36(9):1494-8.

13. Nixdorf DR, Moana-Filho EJ, Law AS, McGuire LA, Hodges JS, John MT. Frequency of persistent tooth pain after root canal therapy: a systematic review and meta analysis. J Endod. [Meta Analysis

Research Support, N.I.H., Extramural
Review]. 2010 Feb;36(2):224-30.
14. Parfitt AM. The actions of parathyroid hormone on bone: relation to bone remodeling and turnover, calcium homeostasis, and metabolic bone diseases. II. PTH and bone cells: bone turnover and plasma calcium regulation. Metabolism. [Review]. 1976 Aug;25(8):909 55.
15. Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H. Dual regulation of osteoclast differentiation by periodontal ligament cells through RANKL stimulation and OPG inhibition. J Dent Res. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2001 Mar;80(3):887-91.
16. Xie R, Kuijpers-Jagtman AM, Maltha JC. Osteoclast differentiation and recruitment during early stages of experimental tooth movement in rats. Eur J Oral Sci. [Comparative Study
Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2009 Feb;117(1):43-50.
17. Spessotto P, Rossi FM, Degan M, Di Francia R, Perris R, Colombatti A, et al. Hyaluronan-CD44 interaction hampers migration of osteoclast like cells by down-regulating MMP 9. J Cell Biol. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2002 Sep 16;158(6):1133-44.
18. Sato T, Foged NT, Delaisse JM. The migration of purified osteoclasts through collagen is inhibited by matrix metalloproteinase inhibitors. J Bone Miner Res. 1998 Jan;13(1):59-66.
19. Melcher AH. On the repair potential of periodontal tissues. J Periodontol. [Review]. 1976 May;47(5):256-60.
20. Kuettner KE, Hiti J, Eisenstein R, Harper E. Collagenase inhibition by cationic proteins derived from cartilage and aorta. Biochem Biophys Res Commun. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1976 Sep 7;72(1):40-6.
21. Lindskog S, Hammarstrom L. Evidence in favor of an anti-invasion factor in cementum or periodontal membrane of human teeth. Scand J Dent Res. 1980 Apr;88(2):161-3.
22. Melcher AH, Turnbull RS. Inhibition of osteogenesis by periodontal ligament. J Periodontal Res. 1972(10):16-7.
23. Dumfahrt H, Moschen I. A new approach in restorative treatment of external root resorption. A case report. J Periodontol. [Case Reports]. 1998 Aug;69(8):941-7.
24. Rabinowitch BZ. Internal resorption. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1972 Feb;33(2):263 82.

25. Cabrini RL, Manfredi EE. Internal resorption of dentine; histopathologic control of eight cases after pulp amputation and capping with calcium hydroxide. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1957 Jan;10(1):90-6.

26. Ashrafi MH, Sadeghi FM. Idiopathic multiple internal resorption: report of case. ASDC J Dent Child. [Case Reports]. 1980 May-Jun;47(3):196-9.

27. Ne RF, Witherspoon DE, Gutmann JL. Tooth resorption. Quintessence Int. [Review]. 1999 Jan;30(1):9-25.

28. Heithersay GS. Management of tooth resorption. Aust Dent J. 2007 Mar;52(1 Suppl):S105-21.

29. Gu G, Mulari M, Peng Z, Hentunen TA, Vaananen HK. Death of osteocytes turns off the inhibition of osteoclasts and triggers local bone resorption. Biochem Biophys Res Commun. 2005 Oct 7;335(4):1095-101.

30. Cardoso L, Herman BC, Verborgt O, Laudier D, Majeska RJ, Schaffler MB. Osteocyte apoptosis controls activation of intracortical resorption in response to bone fatigue. J Bone Miner Res. [Research Support, N.I.H., Extramural
Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.]. 2009 Apr;24(4):597-605.

31. Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. J Dent Res. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 2002 Aug;81(8):531-5.

32. Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. J Dent Res. [Comparative Study
Research Support, N.I.H., Extramural
Review]. 2009 Sep;88(9):792-806.

33. Ostby BN. The role of the blood clot in endodontic therapy. An experimental histologic study. Acta Odontol Scand. 1961 Dec;19:324-53.

34. Nygaard-Ostby B, Hjortdal O. Tissue formation in the root canal following pulp removal. Scand J Dent Res. 1971;79(5):333-49.

35. Horsted P, Nygaard-Ostby B. Tissue formation in the root canal after total pulpectomy and partial root filling. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1978 Aug;46(2):275-82.

36. Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, Tanaka H, Sasaki T, Nishihara T, et al. Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal

cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Sep;87(18):7260-4.

37. Silva TA, Garlet GP, Fukada SY, Silva JS, Cunha FQ. Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. J Dent Res. [Review]. 2007 Apr;86(4):306-19.

38. Takayanagi H. New immune connections in osteoclast formation. Ann N Y Acad Sci. [Research Support, Non-U.S. Gov't
Review]. 2010 Mar;1192:117-23.

39. Sahara N, Toyoki A, Ashizawa Y, Deguchi T, Suzuki K. Cytodifferentiation of the odontoclast prior to the shedding of human deciduous teeth: an ultrastructural and cytochemical study. Anat Rec. 1996 Jan;244(1):33-49.

40. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. Nature. [Review]. 2003 May 15;423(6937):337-42.

41. Ross FP, Teitelbaum SL. alphavbeta3 and macrophage colony-stimulating factor: partners in osteoclast biology. Immunol Rev. [Review]. 2005 Dec;208:88-105.

42. Theill LE, Boyle WJ, Penninger JM. RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. Annu Rev Immunol. [Research Support, Non-U.S. Gov't
Review]. 2002;20:795-823.

43. Fukushima H, Kajiya H, Takada K, Okamoto F, Okabe K. Expression and role of RANKL in periodontal ligament cells during physiological root-resorption in human deciduous teeth. Eur J Oral Sci. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2003 Aug;111(4):346-52.

44. Lossdorfer S, Gotz W, Jager A. Immunohistochemical localization of receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK) and its ligand (RANKL) in human deciduous teeth. Calcif Tissue Int. 2002 Jul;71(1):45-52.

45. Rani CS, MacDougall M. Dental cells express factors that regulate bone resorption. Mol Cell Biol Res Commun. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 2000 Mar;3(3):145-52.

46. Takayanagi H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. Nat Rev Immunol. [Research Support, Non-U.S. Gov't
Review]. 2007 Apr;7(4):292-304.

47. Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. Trends Mol Med. [Review]. 2006 Jan;12(1):17-25.

48. Dunn MD, Park CH, Kostenuik PJ, Kapila S, Giannobile WV. Local delivery of osteoprotegerin inhibits mechanically mediated bone modeling in orthodontic tooth movement. Bone. [Research Support, N.I.H., Extramural

Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2007 Sep;41(3):446-55.

49. Chambers TJ, Magnus CJ. Calcitonin alters behaviour of isolated osteoclasts. J Pathol. 1982 Jan;136(1):27-39.

50. Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S, Chiba T, Murata S, Sato K, et al. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. Nature. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2000 Nov 30;408(6812):600-5.

51. Takayanagi H, Kim S, Taniguchi T. Signaling crosstalk between RANKL and interferons in osteoclast differentiation. Arthritis Res. [Review]. 2002;4 Suppl 3:S227-32.

52. Govitvattana N, Osathanon T, Taebunpakul S, Pavasant P. IL-6 regulated stress-induced Rex-1 expression in stem cells from human exfoliated deciduous teeth. Oral Dis. Oct;19(7):673-82.

53. Masterton JB. Internal Resorption of the Dentine; a Complication Arising from Unhealed Pulp Wounds. Br Dent J. 1965 Mar 16;118:241-9.

54. Wedenberg C, Lindskog S. Experimental internal resorption in monkey teeth. Endod Dent Traumatol. 1985 Dec;1(6):221-7.

55. Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, Herbst R, Coyle AJ. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. Annu Rev Immunol.28:367-88.

56. Foell D, Wittkowski H, Vogl T, Roth J. S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage associated molecular pattern molecules. J Leukoc Biol. 2007 Jan;81(1):28-37.

57. Taylor KR, Yamasaki K, Radek KA, Di Nardo A, Goodarzi H, Golenbock D, et al. Recognition of hyaluronan released in sterile injury involves a unique receptor complex dependent on Toll-like receptor 4, CD44, and MD-2. J Biol Chem. 2007 Jun 22;282(25):18265-75.

58. Salama I, Malone PS, Mihaimeed F, Jones JL. A review of the S100 proteins in cancer. Eur J Surg Oncol. 2008 Apr;34(4):357-64.

59. Erlandsson MC, Svensson MD, Jonsson IM, Bian L, Ambartsumian N, Andersson S, et al. Expression of metastasin S100A4 is essential for bone resorption and regulates osteoclast function. Biochim Biophys Acta. Dec;1833(12):2653-63.

60. Grevers LC, de Vries TJ, Vogl T, Abdollahi-Roodsaz S, Sloetjes AW, Leenen PJ, et al. S100A8 enhances osteoclastic bone resorption in vitro through activation of Toll-like receptor 4: implications for bone destruction in murine antigen-induced arthritis. Arthritis Rheum. May;63(5):1365-75.

61. Paruchuri V, Prasad A, McHugh K, Bhat HK, Polyak K, Ganju RK. S100A7-downregulation inhibits epidermal growth factor-induced signaling in breast cancer cells and blocks osteoclast formation. PLoS One. 2008;3(3):e1741.

62. Jean-Baptiste G, Yang Z, Khoury C, Gaudio S, Greenwood MT. Peptide and non-peptide G-protein coupled receptors (GPCRs) in skeletal muscle. Peptides. [Research Support, Non-U.S. Gov't
Review]. 2005 Aug;26(8):1528 36.

63. Liverman CS, Brown JW, Sandhir R, McCarson KE, Berman NE. Role of the oestrogen receptors GPR30 and ERalpha in peripheral sensitization: relevance to trigeminal pain disorders in women. Cephalalgia. [Research Support, N.I.H., Extramural
Research Support, Non U.S. Gov't]. 2009 Jul;29(7):729-41.

64. Gold MS, Gebhart GF. Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. Nat Med. [Research Support, N.I.H., Extramural]. 2010 Nov;16(11):1248 57.

65. Stabley DR, Jurchenko C, Marshall SS, Salaita KS. Visualizing mechanical tension across membrane receptors with a fluorescent sensor. Nat Methods. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2012 Jan;9(1):64-7.

66. Satrawaha S, Wongkhantee S, Pavasant P, Sumrejkanchanakij P. Pressure induces interleukin-6 expression via the P2Y6 receptor in human dental pulp cells. Arch Oral Biol. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2011 Nov;56(11):1230-7.

67. Hirsiger S, Simmen HP, Werner CM, Wanner GA, Rittirsch D. Danger signals activating the immune response after trauma. Mediators Inflamm.2012:315941.