



## รายงานการวิจัย

เรื่อง

ผลของแรงดึงแบบเป็นรอบต่อระดับการแสดงออกของเอนไซม์ที่ย่อยสลาย  
เมทริกซ์นอกเซลล์ในเซลล์เอ็นยิดปริทันต์ของมนุษย์

**Effect of cyclic stretch on extracellular matrix proteinase expressions in  
Human periodontal ligament fibroblasts**

โดย

รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร. นีรชา สารชวณะกิจ  
รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร. ปิยมาศ สำเร็จกาญจนกิจ  
ศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร. ประสิทธิ์ ภาวสันต์  
คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล

ประจำปีงบประมาณ 2558

## บทคัดย่อ

เซลล์เอ็นซีคปริทันต์มนุษย์มีบทบาทสำคัญในการรักษาสมดุลของเนื้อเยื่อเอ็นซีคปริทันต์ภายใต้สภาวะที่ได้รับแรงจากการบาดเจ็บ หรือแรงจากการจัดฟัน อย่างไรก็ตามกลไกการควบคุมดังกล่าวยังไม่มีความชัดเจน สมดุลของเนื้อเยื่อเกิดจากสมดุลระหว่างการสร้างและการทำลายเมทริกซ์โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบ เอนไซม์และไซโตไคน์จึงมีบทบาทในการรักษาสมดุลของเนื้อเยื่อในส่วนของกรวยสลายนั่น การวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอิทธิพลของแรงดึงต่อการแสดงออกของเอนไซม์กลุ่มเมทริกซ์เมทโลโปรตีนเอสและตัวยับยั้งของเอนไซม์ รวมทั้งระดับและสัดส่วนการแสดงออกของรีเซพเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แคปปาบีไลแกนด์ และ ออสติโอโปรเทคเกอร์ริน ซึ่งมีบทบาทสำคัญในกระบวนการสร้างเซลล์สลายกระดูก โดยศึกษาอิทธิพลของแรงดึงภายใต้ปัจจัยของ รูปแบบแรง ขนาด ความถี่ และระยะเวลา ทำการศึกษาในห้องปฏิบัติการ โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้จากเอ็นซีคปริทันต์ของมนุษย์ ซึ่งกระบวนการได้มาของเซลล์ ผ่านการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมในมนุษย์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เซลล์ได้รับแรงจากเครื่องกำเนิดแรงดึงซึ่งพัฒนาขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ แรงที่ให้เป็นแรงดึงเชิงเส้นแกนเดียว ออกแบบการทดลองโดยปรับเปลี่ยนปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับแรง ได้แก่ รูปแบบของแรง ขนาด ความถี่ และระยะเวลา อาร์เอ็นเอจะถูกสกัดจากเซลล์เพื่อตรวจวัดการแสดงออก ระดับยีนของเมทริกซ์เมทโลโปรตีนเอส ตัวยับยั้งเอนไซม์ รีเซพเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แคปปาบีไลแกนด์ และ ออสติโอโปรเทคเกอร์ริน ซึ่งพบว่า แรงดึงในรูปแบบต่างๆ เพิ่มการแสดงออกในระดับยีนอย่างมีนัยสำคัญเฉพาะเอนไซม์เอ็มเอ็ม1-13 โดยไม่พบการเปลี่ยนแปลงในระดับโปรตีนอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่แรงดึงแบบเป็นรอบ เพิ่มการแสดงออกในระดับยีนทั้ง แรงบีไลแกนด์ และ โอฟีจี ตั้งแต่ที่ 2 ชั่วโมง และพบสัดส่วนระหว่างแรงบีไลแกนด์ต่อโอฟีจีเพิ่มขึ้นตามความถี่ที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้พบว่า เมื่อเพิ่มปัจจัยขนาดของแรงให้กับเซลล์ มีการเปลี่ยนแปลงของระดับสัดส่วนของแรงบีไลแกนด์ต่อโอฟีจีที่ไปจากเดิม จากที่ได้รับอิทธิพลจากปัจจัยของรูปแบบของแรง เช่น แบบต่อเนื่อง หรือแบบเป็นช่วง แต่เพียงอย่างเดียว ซึ่งในสภาวะจริงปัจจัยของ ขนาด ความถี่ และรูปแบบ ไม่ได้เป็นอิสระจากกัน และประกอบเข้าด้วยกันในสัดส่วนที่หลากหลาย งานวิจัยนี้แสดงผลในเบื้องต้นว่า เซลล์เอ็นซีคปริทันต์จะพยายามรักษาสมดุลของระดับสัดส่วนของแรงบีไลแกนด์ต่อโอฟีจีให้คงที่ ภายใต้ปัจจัยที่เปลี่ยนไป แต่เมื่อแรงดึงในระดับความถี่หรือขนาดที่มากเกินไปเซลล์จะรักษาสมดุลนี้ได้ การตอบสนองของเซลล์เอ็นซีคปริทันต์ จะเป็นไปในทิศทางที่สนับสนุนการทำลายกระดูก จากสัดส่วนของแรงบีไลแกนด์ต่อโอฟีจีที่เพิ่มขึ้น

คำสำคัญ: เซลล์เอ็นซีคปริทันต์มนุษย์, แรงดึง, เมทริกซ์เมทโลโปรตีนเอส, รีเซพเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แคปปาบีไลแกนด์, ออสติโอโปรเทคเกอร์ริน

## Abstract

Periodontal ligament cells play an important role in maintaining periodontal homeostasis upon mechanical loading caused by mastication or orthodontic force. However, the mechanism of the phenomenon still remains unclear. As proteolytic enzymes and cytokines play roles in the degradation part of the tissue homeostatic process. The present study aims to examine the tension-induced regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors, TIMPs, including the expressions and the expression ratio of receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand and osteoprotegerin, the key regulators of bone remodeling, by investigating the effect of factors regarding the tension force; pattern, magnitude, frequency and duration. The study was performed using monolayer primary culture of the human periodontal ligament cells. Approval of the Human Research Ethics Committee of the Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University and informed consent were obtained. Tensile force was introduced to the cells using stretch apparatus which developed in our laboratory. Cells were subjected to uni-axial tensile strain which programmed different strain regimens regarding the pattern, magnitude, frequency and duration. The expressions of MMPs, TIMPs, RANKL and OPG were initially analyzed by quantitative real-time PCR. The results demonstrated that with the variety of the tensile strain regimens, a significant increase was only observed on MMP-13 at the gene expression level, however, not at the protein level. While cyclic tensile strain clearly increased both RANKL and OPG expressions since 2 hours and the ratio of RANKL/OPG was increased in a frequency-dependence manner. In addition, the factor of magnitude could modulate the expressions of RANKL and OPG in HPDL cells in responses to static or cyclic strain, and subsequently change the RANKL/OPG ratio. Therefore with an appropriate combination of factors, HPDL cells could maintain the ratio of RANKL/OPG in some extent, however if an inappropriate combination was generated, the RANKL/OPG ratio was increased. The results suggest that HPDL cells when perceive excess tensile strain may support osteoclastogenesis resulting in alveolar bone resorption.

Keywords: human periodontal ligament cells, tensile force, matrix metalloproteinases, receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand, osteoprotegerin

## สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อ	i
Abstract	ii
สารบัญเรื่อง	iii
สารบัญภาพ	iv
คำย่อที่ใช้ในการวิจัย	vi
บทนำ	1
วิธีดำเนินการวิจัย	12
ผลการวิจัย	15
วิจารณ์	26
สรุป	30
บรรณานุกรม	32
ประวัติคณະนักวิจัย	37

## สารบัญภาพ

	หน้า
<p><b>รูปที่ 1</b> แผนภูมิแท่งแสดงจำนวนเท่าของการแสดงออกของ MMPs/TIMPs เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Q-PCR เปรียบเทียบกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับแรงดึงกับความถี่ของแรงดึงแบบ cyclic ที่ระยะยืดออกร้อยละ 10 ความถี่ 15, 30, 60 และ 90 รอบ/นาที 2 ชั่วโมง</p> <p>ในเซลล์เอ็นดอทีลียัลบนแผ่นซิลิโคนที่เคลือบด้วยเจลาติน</p>	16
<p><b>รูปที่ 2</b> แผนภูมิแท่งแสดงจำนวนเท่าของการแสดงออกของ MMPs/TIMPs เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Q-PCR เปรียบเทียบกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับแรงดึงกับความถี่ของแรงดึงแบบ cyclic ที่ระยะยืดออกร้อยละ 10 ความถี่ 15, 30, 60 และ 90 รอบ/นาที 2 ชั่วโมง</p> <p>ในเซลล์เอ็นดอทีลียัลบนแผ่นซิลิโคนที่เคลือบด้วยคอลลาเจน ชนิดที่ 1</p>	17
<p><b>รูปที่ 3</b> แผนภูมิแท่งแสดงจำนวนเท่าของการแสดงออกของ MMPs/TIMPs เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Q-PCR เปรียบเทียบกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับแรงดึงกับความถี่ของแรงดึงแบบ cyclic ที่ระยะยืดออกร้อยละ 10 ความถี่ 60 รอบ/นาที เปรียบเทียบการแสดงออกของยีนที่ 2 และ 6 ชั่วโมง</p> <p>ในเซลล์เอ็นดอทีลียัลบนแผ่นซิลิโคนที่เคลือบด้วยคอลลาเจน ชนิดที่ 1</p>	18
<p><b>รูปที่ 4</b> แผนภูมิแท่งแสดงจำนวนเท่าของการแสดงออกของ RANKL OPG และ RANKL/OPG ratio เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Q-PCR เปรียบเทียบกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับแรงดึงกับความถี่ของแรงดึงแบบ cyclic ระยะยืดออกร้อยละ 10 ความถี่ 15, 60 และ 90 รอบ/นาที 2 ชั่วโมง</p> <p>ในเซลล์เอ็นดอทีลียัลบนแผ่นซิลิโคนที่เคลือบด้วยเจลาติน</p>	21

## สารบัญภาพ

	หน้า
<p><b>รูปที่ 5</b> แผนภูมิแท่งแสดงจำนวนเท่าของการแสดงออกของ RANKL OPG และ RANKL/OPG ratio เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Q-PCR เปรียบเทียบกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับแรงดึง กับแรงดึงแบบต่อเนื่อง ระยะยึดออกร้อยละ 10 และ 20 2 ชั่วโมง ในเซลล์เอ็นดอทีคปริทันต์บนแผ่นซิลิโคนที่เคลือบด้วยเจลาติน</p>	23
<p><b>รูปที่ 6</b> แผนภูมิแท่งแสดงจำนวนเท่าของการแสดงออกของ RANKL OPG และ RANKL/OPG ratio เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Q-PCR เปรียบเทียบกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับแรงดึง กับแรงดึงแบบเป็นรอบ ที่ความถี่ 60รอบ/นาที ระยะยึดออกร้อยละ 10 และ 20 2 ชั่วโมง ในเซลล์เอ็นดอทีคปริทันต์บนแผ่นซิลิโคนที่เคลือบด้วยเจลาติน</p>	25

## คำย่อที่ใช้ในการวิจัย

HPDL	Human periodontal ligament
MMPs	Matrix metalloproteinases
TIMPs	Tissue inhibitor of metalloproteinases
RANKL	Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand
OPG	Osteoprotegerin
Cox-2	Cyclooxygenase-2
RT	Reverse transcription
Q-PCR	Quantitative-polymerase chain reaction

## บทนำ

### ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โดยทั่วไปแล้วแรง (mechanical forces) มีบทบาทสำคัญในการควบคุมสมดุลของการสร้างและการทำลาย ตลอดจนการทำงานของเนื้อเยื่อโดยทั่วไป ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์ในร่างกายได้รับแรงกระทำอยู่ตลอดเวลา เช่นแรงที่เกิดจากการเคลื่อนไหวของร่างกาย การหดตัวของกล้ามเนื้อ การไหลเวียนของโลหิต รวมทั้งแรงโน้มถ่วงของโลก โดยรูปแบบของแรงที่เซลล์ได้รับในขณะใดขณะหนึ่งนั้น พบได้ในหลายรูปแบบ ทั้งแรงกด (stress/compression) แรงดึง (stretch/strain/tension) หรือ แรงเฉือน (shear) ที่เกิดจากการเคลื่อนที่ของ tissue fluid ผ่านผิวเซลล์ โดยมีหลักฐานปรากฏว่า เซลล์ในร่างกายสามารถรับรู้ การเปลี่ยนแปลงของแรงกระทำเหล่านี้ และแปลงสัญญาณของแรงที่มีต่อเซลล์นี้ ให้กลายเป็นสัญญาณทางเคมีภายในเซลล์ นำไปสู่การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน และการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรม หรือ คุณลักษณะของเซลล์ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับขนาด (magnitude) ทิศทาง (direction) ความถี่ (frequency) และระยะเวลา (duration) ที่ได้รับแรง (Pauwels F, 1980; Buschmann MD, *et al.*, 1995; Liu SQ, 1998; Mikuni-Takagaki Y, 1999; Jen CJ, *et al.*, 2000; Chiquet M, *et al.*, 2003; Michalopoulos E, *et al.*, 2012)

สำหรับช่องปาก ในสภาวะปกติ แรงบดเคี้ยวจัดเป็นแรงหลักที่อวัยวะและเนื้อเยื่อต่างๆ ทั้งในและรอบๆ ช่องปากได้รับอย่างสม่ำเสมอ แรงที่เกิดขึ้นจะส่งผ่านจากฟันไปยังกระดูกเบ้าฟัน ผ่านเอ็นยึดปริทันต์ ซึ่งทำหน้าที่ยึดฟันไว้กับกระดูกขากรรไกร โดยยึดระหว่างเคลือบรากฟัน (cementum) และ กระดูกเบ้าฟัน (alveolar bone) และโครงสร้างของเอ็นยึดปริทันต์นั้น จะประกอบขึ้นจากมัดใยของคอลลาเจนที่มีความยืดหยุ่น ทำให้ฟันสามารถขยับได้เล็กน้อยภายในกระดูกเบ้าฟันระหว่างการบดเคี้ยว

เมื่อมีแรงเกิดขึ้น เอ็นยึดปริทันต์ถูกกดหรือยืดออกตามทิศทางของแรงที่มากระทำ และทำให้เซลล์เอ็นยึดปริทันต์ ซึ่งแทรกตัวอยู่ระหว่างเส้นใยคอลลาเจนได้รับแรงทั้งในรูปแบบของแรงกด แรงดึง ตลอดจนแรงเฉือน มีรายงานที่แสดงว่า เซลล์เอ็นยึดปริทันต์สามารถตอบสนองต่อแรงได้โดยตรง และส่งผลให้เกิดการเพิ่มจำนวนเซลล์ (proliferation) การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ (differentiation) ตลอดจนการสร้างและการทำลายของเมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix) ได้ (Pavlin D and Gluhak-Heinrich J, 2001; Murakami Y, *et al.*, 2003; Pini M, *et al.*, 2004; Zheng L, *et al.*, 2012)

เป็นที่ยอมรับกันว่า เซลล์เอ็นยึดปริทันต์ (periodontal ligament cells) ซึ่งเป็นเซลล์หลักที่พบในเนื้อเยื่อเอ็นยึดปริทันต์นั้น ทำหน้าที่สำคัญในการรักษาสมดุลของเนื้อเยื่อปริทันต์ โดยมีส่วนร่วมทั้งในส่วนของ การสร้าง การทำลาย การซ่อมแซม และการคงไว้ซึ่งสภาวะสมดุล (Lackler KP, *et al.*, 2000; Lekic P and McCulloch CA, 1996) และยังพบว่าเซลล์เอ็นยึดปริทันต์มีคุณสมบัติในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์



สร้างกระดูก (osteoblasts) และเซลล์สร้างเคลือบรากฟัน (cementoblasts) ได้ (Shuttleworth CA, *et al.*, 1983) อย่างไรก็ดี ความสัมพันธ์ของแรงกับหน้าที่ของเซลล์เอ็นยิดปริทันต์ในประเด็นเหล่านี้ ยังไม่มีความชัดเจน

ในกรณีของโรคปริทันต์ ซึ่งเป็นโรคของเนื้อเยื่อปริทันต์ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย ร่วมกับผลของกลไกการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อแบคทีเรียและสารหลังจากแบคทีเรียนั้นๆ ส่งผลให้เกิดการอักเสบ (inflammation) ซึ่งนำไปสู่การทำลายของเหงือก เอ็นยิดปริทันต์ กระดูกเบ้าฟัน และทำให้สูญเสียการยึดอยู่ของฟันในที่สุด ปรากฏหลักฐานว่า ภายในเนื้อเยื่อของรอยโรค จะพบ interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) ซึ่งเป็น primary pro-inflammatory cytokines ที่สำคัญ มีระดับสูงกว่าปกติ โดย Cytokines นี้ จะหลังจาก เซลล์เม็ดเลือดขาว และมีผลต่อเซลล์ต่างๆ ในเนื้อเยื่อปริทันต์ รวมทั้งเซลล์เอ็นยิดปริทันต์ ในส่วนของเซลล์เอ็นยิดปริทันต์ พบว่า เซลล์เหล่านี้ สามารถรับรู้และตอบสนองต่อ IL-1 $\beta$  โดยเพิ่มการผลิต inflammatory cytokines ตัวอื่นๆ ต่อไปเป็นลำดับ ซึ่งผลของ IL-1 $\beta$  และ ไซโตไคน์เหล่านี้นำไปสู่การเพิ่มการผลิตเอนไซม์ในกลุ่มโปรติเอส ซึ่งนำไปสู่การทำลายของเนื้อเยื่อเอ็นยิดปริทันต์

รายงานเกี่ยวกับผลของแรง ที่มีต่อการตอบสนองของเซลล์ในสภาวะอักเสบของโรคปริทันต์ ยังมีน้อยมาก มิได้พบเพียงรายงานการศึกษาของ Nokhbehsaim และคณะ ในเซลล์เอ็นยิดปริทันต์ของมนุษย์ ที่รายงานความสัมพันธ์ระหว่าง ผลของ cyclic tensile strain ในสภาวะที่เติม IL-1 $\beta$  เพื่อเลียนแบบสภาวะอักเสบ พบว่าระดับการแสดงออกของคอลลาเจนและโปรตีน ที่เกี่ยวข้องในการสร้างกระดูกจะลดลง (Nokhbehsaim M, *et al.*, 2010) ดังนั้น จึงเป็นไปได้ที่ แรงจากการบดเคี้ยวภายใต้สภาวะอักเสบของเนื้อเยื่อจากโรคปริทันต์เพิ่มความรุนแรงให้กับโรคปริทันต์เนื่องจากความบกพร่องของกลไกการซ่อมแซม

นอกจากนี้การที่แรงมีความสำคัญต่อสมดุลการสร้างและการทำลายกระดูก แรงจึงมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงและการทำงานของทั้งเซลล์สร้างกระดูก (osteoblasts) และเซลล์สลายกระดูก (osteoclasts) ผ่านการทำงานของ cytokines ที่หลังจากเซลล์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง (Matsuda *et al.*, 1998)

สัดส่วนของ RANKL ต่อ OPG จึงเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญในการที่จะส่งเสริม หรือยับยั้งการสร้างเซลล์สลายกระดูก (Hofbauer LC *et al.*, 2000; Boyce BF and Xing L, 2007) เซลล์เอ็นยิดปริทันต์มีความสามารถในการสร้าง cytokines ทั้งสองนี้ด้วย มีรายงานว่า เซลล์เอ็นยิดปริทันต์เมื่อได้รับแรงดึง จะเพิ่มระดับ OPG โดยที่ไม่เปลี่ยนแปลงระดับของ RANKL (Tsuji K *et al.*, 2004) แต่ก็มีผลการศึกษาที่พบว่าแรงดึงก็สามารถเพิ่มได้ทั้งระดับ OPG และ RANKL (Kanzaki H *et al.*, 2006) ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาระดับของ RANKL และ OPG ควบคู่กันในเชิงของสัดส่วน RANKL/OPG

วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้ ต้องการศึกษากิจกรรมของแรงดึง ซึ่งมีปัจจัยของรูปแบบแรง ขนาด ความถี่ และระยะเวลา ที่มีต่อสัดส่วนและระดับการสร้างเอนไซม์กลุ่ม matrix metalloproteinases

(MMPs) ซึ่งเป็นเอนไซม์กลุ่มเดียวที่มีความสามารถในการย่อยสลายคอลลาเจนและมีความสามารถในการย่อยสลายเมทริกซ์นอกเซลล์ที่ไม่ใช่คอลลาเจนอีกหลายชนิด ตลอดจนศึกษาระดับของตัวยับยั้งการทำงาน (TIMPs) ตลอดจนระดับและสัดส่วนการแสดงออกของ RANKL/OPG ในเซลล์เอ็นดอทีลียัลปริทันต์ซึ่งยังมีการศึกษาไม่มากนัก เนื่องจากส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในเซลล์สร้างกระดูก (Tang L *et al.*, 2006) โดยองค์ความรู้ที่ได้ จะเป็นประโยชน์ในการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อพัฒนาวิธีการบูรณะและซ่อมแซมเนื้อเยื่อปริทันต์ต่อไป

### วัตถุประสงค์การวิจัย

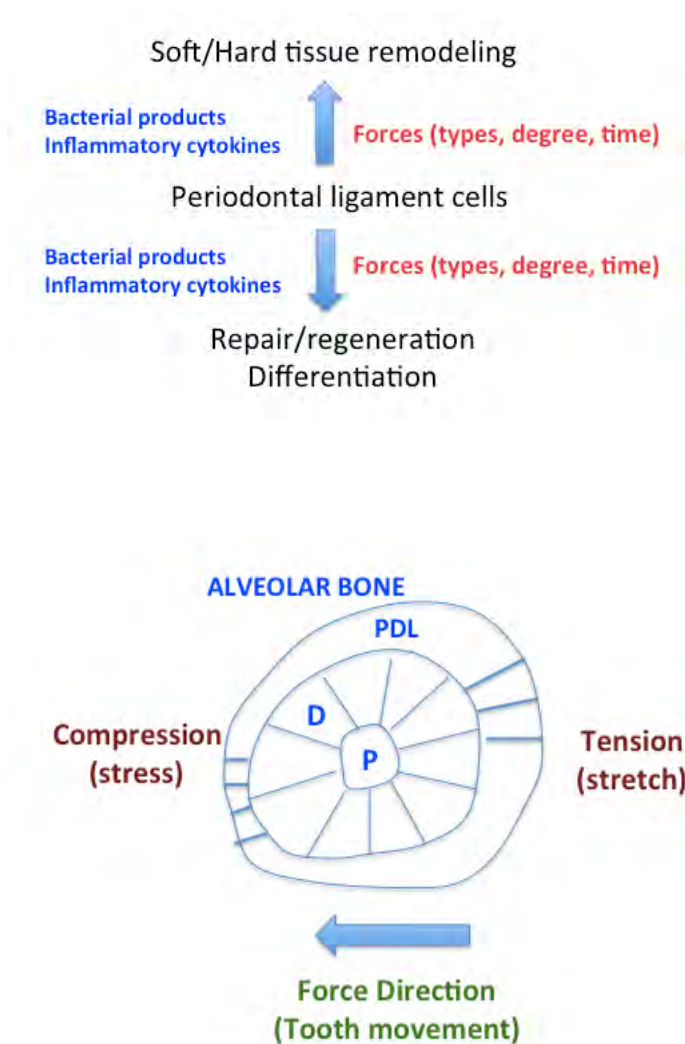
1. ศึกษาอิทธิพลของความถี่ (frequency) และเวลาที่เกิดจากแรงดึงแบบเป็นรอบ (cyclic) ต่อระดับการแสดงออกของเอนไซม์ MMPs และ TIMPs ในเซลล์เอ็นดอทีลียัลปริทันต์ของมนุษย์ เมื่อเทียบกับสภาวะที่ไม่ได้รับแรง
2. ศึกษาอิทธิพลของความถี่ (frequency) รูปแบบของแรงดึงแบบต่อเนื่อง (static) และแรงดึงแบบเป็นรอบ (cyclic) ที่มีต่อระดับการแสดงออกของ RANKL, OPG และสัดส่วนการแสดงออกของ RANKL/OPG ในเซลล์เอ็นดอทีลียัลปริทันต์ เมื่อเทียบกับสภาวะที่ไม่ได้รับแรง

### ขอบเขตการวิจัย

เป็นโครงการวิจัยพื้นฐาน ที่ทำในห้องปฏิบัติการ โดยทำการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้จากเนื้อเยื่อเอ็นดอทีลียัลปริทันต์ และทดสอบผลของแรงในรูปแบบและระยะเวลาต่างๆ กัน ด้วยเครื่องมือสำหรับสร้างแรงดึงในห้องปฏิบัติการ ที่มีต่อพฤติกรรมของเซลล์ ทั้งนี้เซลล์จะเพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อเอ็นดอทีลียัลปริทันต์ของมนุษย์ ที่ได้จากฟันกรามใหญ่ซี่ที่ 3 ที่ได้รับการวินิจฉัยให้ถอนหรือผ่าออกและ/หรือ ฟันกรามเล็กที่ต้องถูกถอนด้วยเหตุที่ต้องจัดฟัน โดยฟันดังกล่าวต้องไม่มีพยาธิสภาพ การทดลองและวิเคราะห์ผลในแต่ละส่วนของการศึกษาจะทำอย่างน้อย 3 ครั้ง ผลการทดลองที่ได้จะเพิ่มความเข้าใจพฤติกรรมการตอบสนองของเซลล์ต่อเมื่อได้รับแรงในรูปแบบของการยืด-คลาย (stretch-relax) ในรูปแบบที่ใกล้เคียงกับแรงในธรรมชาติที่เอ็นดอทีลียัลปริทันต์ได้รับ ต่อระดับการแสดงออกของเอนไซม์ MMPs/TIMPs และสัดส่วนของ RANKL/OPG ซึ่งการศึกษานี้ จะทำให้เข้าใจส่วนหนึ่งของกลไกที่ควบคุมสมดุลของเนื้อเยื่อ และพัฒนาการของรอยโรคปริทันต์ได้มากขึ้น เพื่อประโยชน์ในการพัฒนาวิธีการให้การรักษา หรือการซ่อมแซมเนื้อเยื่อในรอยโรคต่อไป

## สมมุติฐานและกรอบแนวคิดของการวิจัย

สมมุติฐานของงานวิจัยนี้ ตั้งอยู่บนพื้นฐานที่ว่า แรงที่เหมาะสมจะมีผลต่อการทำหน้าที่ของเซลล์เอ็นไซม์ปริทันต์ เช่นเดียวกับที่พบในเซลล์กระดูก โดยการให้แรงในรูปแบบของแรงกด หรือแรงดึงแบบเป็นรอบ (cyclic force) มีผลส่งเสริมการเกิด tissue remodeling คือมีสมดุลของการสร้างและการทำลายของเนื้อเยื่อ ตลอดจนมีอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ที่สม่ำเสมอ และคงสภาพของความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดไว้ได้ ทั้งนี้โดยแปรผันต่อขนาดและความถี่ของแรงที่เกิดขึ้น ในขณะที่แรงกด หรือแรงดึงแบบคงที่ (static force) จะให้ผลในการกระตุ้นการแปรสภาพของเซลล์ โดยแปรผันตามขนาดของแรง และระยะเวลาที่เซลล์ได้รับแรง โดยอาจกระตุ้นให้เซลล์เพิ่มระดับการทำลายเนื้อเยื่อหรือเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้าง/ทำลายกระดูก (diagram)



## บททวนวรรณกรรม

### บทบาทและความสำคัญของแรง

แรง (mechanical forces) เป็นปัจจัยแวดล้อมหนึ่งที่เซลล์ในร่างกายได้รับอยู่ตลอดเวลา เริ่มตั้งแต่แรงดึงดูดของโลก แรงที่เกิดจากการเคลื่อนไหวของร่างกาย การหดตัวของกล้ามเนื้อ การไหลเวียนของโลหิต เป็นต้น แรงในระดับที่เหมาะสมเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญในการควบคุมสมดุลของการสร้างและการทำลาย ตลอดจนการทำงานของเนื้อเยื่อของร่างกาย เป็นที่ทราบกันดีว่าการเจ็บป่วยที่ทำให้ไม่สามารถเคลื่อนไหวที่ได้ หรือต้องนอนบนเตียงตลอดเวลา (Bloomfield SA, 1997) นำไปสู่การฝ่อลีบของกล้ามเนื้อ และสูญเสียความแข็งแรงของกระดูก ตลอดจนการอยู่ในสภาวะไร้น้ำหนัก เช่นในอวกาศ ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน (Johnson RB, 1998) ทั้งนี้ระดับของแรงที่เซลล์รับรู้ว่าจะเหมาะสม มากเกินไป หรือน้อยเกินไปในแต่ละสภาวะ หรือกิจกรรมนั้นๆ แยกต่างกันไปตามชนิดของเซลล์ที่อยู่ในเนื้อเยื่อ หรืออวัยวะที่มีแรงมากระทำ โดยทั่วไปแล้วทิศทางของแรงที่กระทำกับเซลล์แบ่งออกได้เป็น 3 รูปแบบคือ แรงกด (stress/compression) แรงดึง (stretch/strain/tension) หรือ แรงเฉือน (shear) ที่เกิดจากการเคลื่อนที่ของ tissue fluid ผ่านผิวเซลล์ อย่างไรก็ตามถ้าพิจารณาที่เซลล์เพียงหนึ่งเซลล์ แรงที่กระทำกับเซลล์จะมีแรงทั้ง 3 ชนิดเกิดขึ้นพร้อมๆ กัน เพียงแต่ในตำแหน่งที่ต่างกันบนพื้นผิวเซลล์ (Chiquet M *et al.*, 2003)

กลไกการรับรู้แรงของเซลล์นั้น มีข้อสันนิษฐานว่า น่าจะเกิดจากการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (deformation) ของเมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix) ที่เซลล์ยึดเกาะอยู่ เกิดเป็นวิถีสัญญาณผ่านเข้าสู่เซลล์ 3 ทางใหญ่ๆ ได้แก่ ทางการเปลี่ยนแปลงของโครงร่างเซลล์ (cytoskeleton) ซึ่งประกอบขึ้นจากโปรตีนหลักคือ แอกติน (actin) แล้วนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน (Rubin J *et al.*, 2006) หรือผ่านทางตัวรับบนผิวเซลล์ (surface receptor) ที่ทำหน้าที่รับรู้ต่อแรง เช่น อีออนแชนแนลที่ถูกกระตุ้นด้วยแรง (stress-activated ion channel) และ จีโปรตีนคอปเปิล รีเซปเตอร์ (G-protein coupling receptors) (Li C and Xu Q, 2000) เป็นต้น หรือผ่านทางกลุ่มของตัวรับบนผิวเซลล์ ที่เรียกว่า อินทิกริน (integrins) ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวรับของเมทริกซ์นอกเซลล์ (Chiquet M *et al.*, 2003) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงไม่ว่าจะผ่านไปทางใด ก็จะส่งผลในการกระตุ้นการส่งผ่านสัญญาณภายในเซลล์ และสามารถนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน แล้วนำไปสู่การปรับเปลี่ยนพฤติกรรมของเซลล์

อิทธิพลของแรงที่มีต่อพฤติกรรมและการทำงานของเซลล์นั้น มีรายงานในเซลล์หลายชนิด เช่น รายงานการศึกษา ที่แสดงว่า แรงดึง มีผลต่อการเคลื่อนที่และทิศทางการเรียงตัวของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบที่ล้อมรอบผนังหลอดเลือด (Liu SQ, 1998; Grabellus F *et al.*, 2007) และการเพิ่มจำนวนของเซลล์เอ็นดอทีเลียล (Kletsas D *et al.*, 1998) ในขณะที่ แรงกด มีผลต่อระดับการสร้าง proteoglycans ในเซลล์กระดูกอ่อน

(Buschmann MD *et al.*, 1995) รวมทั้งมีผลในการ กระตุ้นการแบ่งตัวและการสร้างโปรตีนของเซลล์กระดูก ซึ่งอาจทำหน้าที่โดยลำพังหรือร่วมกับการทำงานของเอสโตรเจนหรือพาราไทรอยด์ฮอร์โมนในกระบวนการสร้างกระดูก (Mikuni-Takagaki Y, 1999) ส่วนแรงเฉือนนั้น พบว่ามีบทบาทสำคัญในการควบคุมแรงดันเลือดผ่านทางกระตุ้นด้วยแรงดันเลือดภายในหลอดเลือดเอง โดยมีผลต่อเซลล์บุผนังหลอดเลือด ส่งผลต่อการหลั่งฮอร์โมน การถ่ายทอดสัญญาณผ่านแคลเซียมภายในเซลล์ และมีผลต่อการจัดเรียงตัวของโครงสร้างภายในของเซลล์ (rearrangement of cell cytoskeleton) (Jen CJ *et al.*, 2000)

นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่า แรงมีผลต่อการเปลี่ยนแปลง (differentiation) และพฤติกรรมของเซลล์ต้นกำเนิดด้วย โดยพบว่า undifferentiated mesenchymal cells สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่แตกต่างกันได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ ขนาด (magnitude) ทิศทาง (direction) ความถี่ (frequency) และระยะเวลา (duration) ที่ได้รับแรง (Pauwels F, 1980) โดยมีรายงานว่า เมื่อให้แรงกดแบบ cyclic (cyclic compressive force) พบว่าสามารถกระตุ้น mesenchymal stem cells ของมนุษย์ให้เปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติของเซลล์กระดูก และกระดูกอ่อนได้โดยกระตุ้นในความถี่ และระยะเวลาที่แตกต่างกัน (Michalopoulos E *et al.*, 2012)

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าแรงมีบทบาทต่อทั้งการควบคุมกลไกการทำงานของในหลายๆ ส่วนของร่างกายให้เป็นไปตามปกติ และยังมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อต่างๆ ให้พัฒนาขึ้นมาเพื่อช่วยในกระบวนการซ่อมแซมของเนื้อเยื่อเมื่อเกิดการบาดเจ็บหรือถูกทำลาย การได้รับแรงที่มากเกินไป หรือน้อยเกินไปจะทำให้เสียสมดุล ซึ่งส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการทำงานของเซลล์ และอาจนำไปสู่พยาธิสภาพได้ในที่สุด

สำหรับช่องปาก เนื้อเยื่อเอ็นยึดปริทันต์ซึ่งองค์ประกอบขึ้นจากเส้นใยคอลลาเจนเป็นส่วนใหญ่ ยึดระหว่างเคลือบรากฟัน (cementum) และ กระดูกเบ้าฟัน (alveolar bone) เป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันอีกชนิดหนึ่งที่ได้รับแรงอยู่ตลอดเวลา ทั้งแรงจากการบดเคี้ยว การพูด และการทำงานของกล้ามเนื้อโดยรอบช่องปาก เพราะมีหน้าที่หลักในการพยุงฟัน และกระจายแรงดังกล่าวข้างต้นที่เกิดขึ้นกับฟัน สู่กระดูกเบ้าฟันที่รองรับอยู่ โดยฟันจะมีการขยับได้เล็กน้อยตามทิศทางของแรงที่มากกระทำ ทำให้เซลล์เอ็นยึดปริทันต์ (periodontal ligament cells) ซึ่งเป็นเซลล์หลักที่พบในเนื้อเยื่อเอ็นยึดปริทันต์ ที่แทรกตัวอยู่ระหว่างเส้นใยคอลลาเจนได้รับแรงทั้งในรูปแบบของแรงกด แรงดึง และแรงเฉือนอยู่ตลอดเวลา

มีรายงานว่าเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ สามารถตอบสนองต่อแรงทั้ง 3 ชนิดได้โดยตรง แม้ว่ากลไกการตอบสนองจะยังไม่ชัดเจน โดยเชื่อว่าผลของแรงนั้น เป็นปัจจัยหลักที่เกี่ยวข้องกับการทำหน้าที่ของเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ ในการรักษาสมดุลของเนื้อเยื่อปริทันต์โดยมีส่วนร่วมทั้งในส่วนของการสร้าง การทำลาย การซ่อมแซม และการคงไว้ซึ่งภาวะสมดุล (Davidovitch Z *et al.*, 1988; Lekic P and McCulloch CA

1996; Lackler KP *et al.*, 2000; Kasamatsu *et al.*, 2005) และยังสามารถเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก (osteoblasts) และเซลล์สร้างเคลือบรากฟัน (cementoblasts) ของเซลล์เอ็นยิดปริทันต์ (Shuttleworth CA *et al.*, 1983) การขาดแรงกดเคี้ยวจากการไม่ได้ใช้งานหรือการสูญเสียฟันคู่สบ จะทำให้ periodontal space กว้างขึ้น เนื่องจากการละลายตัวของกระดูกเบ้าฟันที่รองรับและการฝ่อลีบของเนื้อเยื่อปริทันต์ (Cohn SA, 1966) และเมื่อให้แรงกดเคี้ยวในขนาดที่เหมาะสมพบว่าสามารถยับยั้งการละลายของกระดูกรอบรากฟัน และรักษาสภาพที่ปกติให้กับเอ็นยิดปริทันต์ (Cohn 1965, 1966; Yamashiro *et al.*, 2007; Saminathan *et al.*, 2012)

#### ผลของแรงต่อพฤติกรรมของเซลล์เอ็นยิดปริทันต์

ผลของแรงต่อเซลล์เอ็นยิดปริทันต์นั้น พบว่าแรงดึงและแรงกดจะให้ผลตรงกันข้ามกัน โดยพบว่าแรงดึงจะมีผลในการเหนี่ยวนำ osteogenic differentiation ซึ่งน่าจะนำไปสู่การสร้างกระดูก (Wescott DC *et al.*, 2007) การศึกษาในห้องปฏิบัติการโดยใช้เทคนิค gene array พบว่าแรงดึงที่ 12% ซึ่งเป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการแปลผลโดยใช้ finite element ของแรงที่กระทำต่อพื้นหน้าบนบริเวณกึ่งกลางรากในสภาวะปกติ (Natali AN *et al.*, 2004) ที่ความถี่ 6 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพิ่มระดับการแสดงออกของโปรตีนของเมทริกซ์นอกเซลล์ เอนไซม์ ไซโตไคน์ และโกรทแฟกเตอร์กว่า 20 ชนิด ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสร้างกระดูก เช่น คอลลาเจน, osteopontin, alkaline phosphatase, BMP, Insulin-like growth factor, transforming growth factor beta, MMP-2 และ integrin เป็นต้น (Liu M *et al.*, 2012)

แรงยังมีผลต่อการทำงานของเซลล์เอ็นยิดปริทันต์ ในการควบคุมสมดุลของกระดูกด้วย มีรายงานแสดงว่า เมื่อเซลล์เอ็นยิดปริทันต์ได้รับแรงดึงจะมีผลกระตุ้นการแสดงออกของ โปรตีน osteoprotegerin (OPG) ในขณะที่แรงกดในเซลล์เอ็นยิดปริทันต์ มีผลในการเหนี่ยวนำการแสดงออกของ RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa b ligand) และโดยที่โปรตีนทั้งสองชนิดนี้ เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการเกิดเซลล์สลายกระดูก (osteoclast) (Kanzaki H *et al.*, 2002; Yamaguchi M *et al.*, 2006; Wongkhantee S *et al.*, 2007) โดย RANKL จะเพิ่มการทำลายกระดูก ในขณะที่ OPG ลดการทำลายกระดูก ดังนั้น แรงดึง ซึ่งมีผลทำให้สัดส่วนการแสดงออกของ RANKL/OPG ลดลง จึงสามารถยับยั้งการทำลายกระดูกได้ (Tsuji K *et al.*, 2004; Kanzaki H *et al.*, 2006)

นอกจากนี้ แรงกดจากการจัดฟัน ยังสามารถ กระตุ้นการแสดงออกของ osteopontin ได้ทั้งในกระดูกเบ้าฟัน และในเนื้อเยื่อเอ็นยิดปริทันต์ สอดคล้องกับผลจากห้องปฏิบัติการ ที่พบว่า ทั้งเซลล์สร้างกระดูก และเซลล์เอ็นยิดปริทันต์ สามารถตอบสนองต่อแรงกด โดยการเพิ่มการแสดงออกของ OPN (Kanzaki H *et al.*, 2002; Wongkhantee S *et al.*, 2007; You J *et al.*, 2001; Morinobu M *et al.*, 2003;

Wongkhantee S *et al.*, 2008) รวมทั้งยังพบว่า แรงกดสามารถกระตุ้นการสร้างไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ในเซลล์เอ็นดอทีลียัลได้หลายชนิด เช่น interleukin-6; IL-6 และ interleukin-8; IL-8 เป็นต้น (Yamamoto T *et al.*, 2006; Yamaguchi M *et al.*, 2006 ซึ่งเป็นไซโตไคน์ที่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ RANKL และ MMPs ซึ่งนำไปสู่การทำลายทั้ง เนื้อเยื่ออ่อนและเนื้อเยื่อแข็งได้ แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของแรงที่มีสมมูลของกระดูกเข้าพื้น ผ่านทางเซลล์เอ็นดอทีลียัล

นอกจากนี้แรงดึงกระตุ้นให้มีการสร้างหลอดเลือดใหม่ โดยกระตุ้นการสร้าง vascular endothelial growth factor ในเซลล์เอ็นดอทีลียัล เมื่อใช้แรงดึงที่ 14% ที่ความถี่ 12 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเมื่อนำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์เอ็นดอทีลียัลภายใต้แรงดึงมาใช้เลี้ยงเซลล์บุผนังหลอดเลือดพบว่าทำให้เกิดหลอดเลือด (tube formation) ในห้องปฏิบัติการได้ (Yoshino H *et al.*, 2003) แสดงถึงบทบาทของแรงในการกระตุ้นการหาย และการซ่อมแซมเนื้อเยื่อเอ็นดอทีลียัล

ระดับของแรง จะมีผลต่อการตอบสนองของเซลล์เอ็นดอทีลียัล ระดับแรงดึงที่ต่ำ (แรงที่เพิ่มความยาวของเซลล์ขึ้นร้อยละ 2 และ 3) จะเพิ่มการแสดงออกของคอลลาเจนชนิดที่ 1 และ โปรตีน decorin แต่ไม่มีผลต่อระดับการสร้างเอนไซม์ alkaline phosphatase ในขณะที่แรงดึงที่สูง (แรงที่เพิ่มความยาวของเซลล์ขึ้นร้อยละ 10 และ 18) ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง จะเพิ่มการแสดงออกของคอลลาเจนชนิดที่ 1 และ โปรตีน decorin เช่นกันแต่กลับลดการสร้างเอนไซม์ alkaline phosphatase ผลการศึกษาจึงแสดงให้เห็นว่าระดับของแรงดึงที่ต่างกัน มีผลต่อการตอบสนองของเซลล์ที่ต่างกัน (Ozaki S *et al.*, 2005)

นอกจากนี้ยังพบว่าแรงดึงมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์และตัวยับยั้งของเอนไซม์ที่ย่อยสลายเมทริกซ์นอกเซลล์ในกลุ่มของ matrix metalloproteinases (MMPs) คือ MMP-1, MMP-2, TIMP-1 และ TIMP-2 ในขณะที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของ MT-1 MMP และ TIMP-3 และไม่พบการแสดงออกของ MMP-9 นอกจากนี้ยังพบการเปลี่ยนแปลงของระดับ integrin ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวรับรู้แรงด้วยดั่งที่กล่าวข้างต้นโดยพบการเพิ่มของ  $\alpha_6$  และ  $\beta_1$  และ การลดลงของ  $\alpha_5$  ในสภาวะที่เป็นแรงดึงแบบต่อเนื่องที่แรงขนาด 20 กิโลปาสคาล เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเซลล์รับรู้ต่อแรงโดยอาจผ่านทาง integrins และ มีผลต่อการปรับเปลี่ยนเมทริกซ์นอกเซลล์ (Bolcato-Bellemin AL *et al.*, 2000)

แรงเฉือนมีผลต่อการจัดเรียงทิศทางการใหม่ของ actin filament ภายในเซลล์ โดยมาจัดเรียงตัวอย่างหนาแน่นอยู่ใต้ผิวเซลล์และพบว่ามัดของ actin filament มีขนาดใหญ่ขึ้น ที่ขนาดของแรง 9-12 dyn/cm<sup>2</sup> ซึ่งรูปแบบการจัดเรียงตัวใหม่ของ actin filament นี้ ต่างจากกรณีที่ได้รับแรงดึง ซึ่งจะทำให้ actin filament เรียงตัวตั้งฉากกับทิศทางของแรงดึง (Chiba M *et al.*, 2004; Nguyen TD *et al.*, 2009) นอกจากนี้แรงเฉือนยังเพิ่มการแสดงออกของ MMP-1, MMP-2, TIMP-1 และลดการแสดงออกของ TIMP-2 ที่ขนาดของแรง

ตั้งแต่ 9 dyn/cm<sup>2</sup> ขึ้นไป โดยพบการเพิ่มขึ้นในระดับของโปรตีน MMP-1 ก่อนที่ 8 ชั่วโมง ส่วนการเพิ่มขึ้นของ MMP-2 และ TIMP-1 เกิดขึ้นภายหลังที่ 12 ชั่วโมง (Zheng L *et al.*, 2012)

จากการศึกษาต่างๆ ข้างต้นจะเห็นว่ารายละเอียดของแรง ไม่ว่าจะเป็ขนาด ระยะเวลา ตลอดจนความถี่ที่เซลล์ได้รับแรงแตกต่างกันไป ทำให้ยังไม่ได้ข้อมูล หรือข้อสรุปที่ชัดเจนว่าที่แท้จริงแล้วเซลล์เอ็นโดพริตันต์มีรูปแบบการตอบสนองต่อแรงอย่างไร แต่ข้อมูลดังกล่าวเป็นหลักฐานที่แสดงให้เห็นว่า แรงในรูปแบบที่ต่างกัน มีผลให้การตอบสนองของเซลล์แตกต่างกันออกไป

### เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนส (Matrix metalloproteinases; MMPs)

การเปลี่ยนแปลงระดับของเอนไซม์โปรตีนเนส ที่สามารถย่อยสลายเมทริกซ์นอกเซลล์เป็นสิ่งที่มีความสำคัญต่อสมดุลของเนื้อเยื่อเอ็นโดพริตันต์

Matrix metalloproteinases (MMPs) เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม endopeptidase ที่สมาชิกกว่า 25 ตัว เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเมทริกซ์นอกเซลล์ได้เกือบทุกชนิด โดยเฉพาะโปรตีนในกลุ่มคอลลาเจน เนื่องจากเอนไซม์ที่ย่อยสลายเมทริกซ์นอกเซลล์ในกลุ่มอื่นๆ ไม่สามารถย่อยสลายโครงสร้าง triple helix ของคอลลาเจนได้ MMPs จึงมีบทบาทสำคัญในกระบวนการ matrix remodeling ของเนื้อเยื่อเกือบทุกส่วนในร่างกาย นอกจากนี้ยังสามารถควบคุมและปรับการทำงานของโกรทแฟกเตอร์ไฮโดรโคโรน ตลอดจนโปรตีนพื้นผิวเซลล์หลายๆ ชนิดได้ ซึ่งส่งผลต่อพฤติกรรมของเซลล์ เช่น การเคลื่อนที่ การเพิ่มจำนวน และการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ได้ โดยการตัดบางส่วนของโมเลกุลเหล่านั้นเพื่อกระตุ้นหรือยับยั้งการทำงาน (Page-McCaw A *et al.*, 2007; Varghese S, 2006)

การทำงานของเอนไซม์กลุ่มนี้ ถูกควบคุมได้ใน 3 ระดับ คือ ระดับการแสดงออกของยีน ระดับการทำงาน เนื่องจากเอนไซม์ในกลุ่มนี้ถูกสร้างและหลั่งออกมาในรูปแบบที่ยังไม่พร้อมทำงาน (latent form) ซึ่งต้องถูกกระตุ้นให้ทำงาน โดยการตัดส่วน propeptide domain ออกก่อน และ การควบคุมในระดับสุดท้ายคือ โดยการยับยั้งการทำงาน โดยอาศัยตัวยับยั้งการทำงาน tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) ซึ่งมีความจำเพาะกับ MMPs และยับยั้งการทำงานในสัดส่วนของโมเลกุล MMP:TIMP ที่ 1:1

MMPs แบ่งเป็นกลุ่ม โดยอาศัยชนิดของโปรตีนที่เอนไซม์สามารถย่อยได้ออกเป็นกลุ่มหลักๆ ได้แก่ collagenases, gelatinases, stromelysins และ matrilysins อย่างไรก็ตาม ภายหลังพบว่ามีความเหมือนซ้อนของโปรตีนที่เอนไซม์แต่ละกลุ่มสามารถย่อยได้ ตลอดจนมีผลการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่า MMPs สามารถย่อยหรือตัดบางส่วนของโปรตีนที่ไม่ใช่เมทริกซ์นอกเซลล์ได้ ปัจจุบันจึงจัดกลุ่มโดยอาศัยลักษณะโครงสร้างที่ใช้ยึดเกาะผิวเซลล์ โดยแบ่งได้เป็นสองกลุ่มใหญ่ๆ คือ กลุ่มที่ถูกหลั่งออกมาภายนอกเซลล์ (secreted type) และกลุ่มที่อยู่บนผิวเซลล์ (membrane type)



โดยทั่วไปแล้ว MMPs จะถูกสร้างในปริมาณที่ต่ำ หรือไม่สร้างเลย แต่เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย โกรทแฟคเตอร์ ไซโตไคน์ รวมทั้ง physiologic cellular interactions ต่างๆ สามารถส่งสัญญาณไปกระตุ้น การสร้าง MMPs ได้ มีรายงานว่าแรงดึงมีผลต่อระดับการสร้าง MMPs และ TIMPs เช่น พบการเพิ่มขึ้นของ MMP-1, MMP-2, TIMP-1 และ TIMP-2 ในเซลล์บุผนังหลอดเลือด เซลล์กล้ามเนื้อเรียบ เซลล์เนื้อเยื่อเอ็น และเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ (Magid R *et al.*, 2003; Grubellus F *et al.*, 2007; Yamane T *et al.*, 2010; O'Callaghan CJ and Williams B, 2000; Palumbo R *et al.*, 2000; Zhou D *et al.*, 2005; Aitken KJ *et al.*, 2006; Husse B *et al.*, 2007) การเพิ่มขึ้นของ MMP-13 ในเซลล์สร้างกระดูกของหนู (MC 3T3-E1) (Yang CM *et al.*, 2004) และมีรายงานการลดระดับ MMP-1 และ MMP-13 แต่ไม่มีผลต่อระดับของ MMP-3 ใน เซลล์บุผนังข้อต่อเข้าของมนุษย์ (fibroblast-like synoviocyte) เมื่อได้รับแรงดึงแบบ cyclic ที่เทียบเคียงได้ กับแรงจากการออกกำลังกายปกติ ทั้งนี้ผลการศึกษาดังกล่าวต้องการนำเสนอว่า แรงในระดับที่เหมาะสมจะควบคุม ระดับของเอนไซม์กลุ่มนี้ไว้ให้อยู่ในระดับที่ไม่เป็นอันตรายกับเนื้อเยื่อ (Wang P *et al.*, 2009)

สำหรับในเซลล์เอ็นยึดปริทันต์มีรายงานว่าพบการเพิ่มขึ้นของ MMP-1, MMP-2 และ TIMP-1 แต่ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของ MT-1 MMP และ TIMP-3 เมื่อได้รับแรงเฉือน (Zheng L *et al.*, 2012) พบการ เพิ่มขึ้นของ MMP-2 เมื่อได้รับแรงดึงแบบ cyclic (Liu M *et al.*, 2012) การเพิ่มขึ้นของ MMP-1, MMP-2, TIMP-1 และ TIMP-2 เมื่อได้รับแรงดึงแบบ static (Bolcato-Bellemin AL *et al.*, 2000) และพบการเพิ่มขึ้น ของ MMP-13 (Ziegler N *et al.*, 2010) จะเห็นได้ว่าระดับการแสดงออกของ MMPs และ TIMPs เปลี่ยนแปลงได้ ตามรูปแบบของแรงต่างๆ กัน

### RANKL และ OPG

แรงเชิงกลมีความสำคัญต่อสมดุลการสร้างและการทำลายกระดูก โดยแรงมีผลต่อการเปลี่ยนแปลง และการทำงานของทั้งเซลล์สร้างกระดูก (osteoblasts) และเซลล์สลายกระดูก (osteoclasts)

มีรายงานมากมายที่แสดงให้เห็นว่าแรงดึงแบบเป็นรอบ กระตุ้นการเกิดเซลล์สร้างกระดูก (Matsuda *et al.*, 1998) และยับยั้งการสร้างเซลล์สลายกระดูก ผ่านทางการทำงานของ cytokines ที่หลั่ง จากเซลล์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องเมื่อได้รับแรงดึง

ดังกล่าวข้างต้น การเกิดเซลล์สลายกระดูก เป็นส่วนหนึ่งในกระบวนการรักษาสมดุลของกระดูก รวมทั้งกระดูกเบ้าฟัน ซึ่ง cytokines หลัก 2 ชนิดที่มีบทบาทสำคัญในกลไกการสร้างเซลล์สลายกระดูกคือ receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) และ macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) (Udagawa N, 2002; Udagawa N *et al.*, 2002) โดยที่ osteoprotegerin (OPG) ทำหน้าที่ เป็น orphan receptor เพื่อไปแย่งจับกับ RANKL เพื่อไม่ให้ RANKL จับกับ RANK ที่อยู่บนบนผิวเซลล์

preosteoclasts ดังนั้นสัดส่วนของ RANKL ต่อ OPG จึงเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญมากกว่าปริมาณ ในการที่จะส่งเสริม หรือยับยั้งการสร้างเซลล์สลายกระดูก (Hofbauer LC *et al.*, 2000; Boyce BF and Xing L, 2007)

ผลของแรงดึงต่อสมดุลของกระดูกเบ้าฟัน ส่วนหนึ่งผ่านทาง การตอบสนองต่อแรงของเซลล์เอ็นดอไคปริทันต์ มีรายงานแสดงว่า เซลล์เอ็นดอไคปริทันต์ที่ได้รับแรงดึง จะเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน osteoprotegerin (OPG) ในขณะที่แรงกดแบบต่อเนื่อง (continuous compression) จะกระตุ้นการหลั่ง PGE2 ซึ่งเป็นโมเลกุลที่สามารถเหนี่ยวนำหรือเพิ่มการแสดงออกของ RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa b ligand) (Kanzaki H *et al.*, 2002, Luckprom P *et al.*, 2010) ดังนั้น แรงดึงซึ่งมีผลทำให้สัดส่วนการแสดงออกของ RANKL/OPG ลดลง จึงสามารถยับยั้งการทำลายกระดูกได้ (Tsuji K *et al.*, 2004; Kanzaki H *et al.*, 2001) อย่างไรก็ตาม แม้มีรายงานว่า เซลล์เอ็นดอไคปริทันต์เมื่อได้รับแรงดึง จะเพิ่มระดับ OPG โดยที่ไม่เปลี่ยนแปลงระดับของ RANKL (Tsuji K *et al.*, 2004) แต่ก็มีผลการศึกษาที่พบว่าแรงดึงแบบเป็นรอบ เพิ่มได้ทั้งระดับ OPG และ RANKL (Kanzaki H *et al.*, 2006) ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาระดับของ RANKL และ OPG ควบคู่กันในเชิงของสัดส่วน RANKL/OPG

มีการศึกษาอย่างกว้างขวางในเซลล์สร้างกระดูก เกี่ยวกับปัจจัยของขนาด (magnitude) ความถี่ (frequency) และระยะเวลา (duration) ของแรงดึงที่มีผลต่อพฤติกรรมและการตอบสนองของเซลล์ (Tang L *et al.*, 2006) อย่างไรก็ตาม การศึกษาในแง่ดังกล่าว โดยเฉพาะปัจจัยของขนาด และความถี่ ในเซลล์เอ็นดอไคปริทันต์ ยังมีไม่มากนัก การศึกษาในครั้งนี้จึงมุ่งเน้นไปที่ อิทธิพลของขนาด และความถี่ ของแรงดึงแบบเป็นรอบต่อระดับและสัดส่วนการแสดงออกของ RANKL/OPG ในเซลล์เอ็นดอไคปริทันต์

## วิธีการดำเนินการวิจัย

### 1. การเพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสต์จากเนื้อเยื่อปรีทันต์

เซลล์เอ็นอีคปรีทันต์เตรียมจากเนื้อเยื่อปรีทันต์จากฟันของผู้ป่วยที่อยู่ในแผนการรักษาที่มีข้อบ่งชี้ว่า จะต้องถูกถอน โดยฟันนั้นจะต้องไม่มีเศษทะลุถึงโพรงประสาทฟันและไม่มีรอยโรคที่ปลายรากฟัน วิธีการเตรียมเซลล์โดยย่อมีดังนี้ นำฟันที่ได้มาล้างด้วย phosphate buffer saline ที่ปราศจากเชื้อหลายๆ ครั้ง ใช้มีดขูดเนื้อเยื่อปรีทันต์จากส่วนกลาง (middle third) ของรากฟัน นำมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แล้ววางบนจานเลี้ยงเซลล์ (tissue culture dish; Nunc) อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้คือ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่มี 10% fetal bovine serum (FBS) กลูตามีน (L-Glutamine) 2 mM เพนนิซิลลิน (penicillin) 100 unit/ml สเตร็ปโตมัยซินซัลเฟต (streptomycin sulfate) 100  $\mu\text{g/ml}$  และแอมโฟเทอริซินบี (amphotericin B) 0.25  $\mu\text{g/ml}$  เซลล์จะถูกเลี้ยงในตู้บัพที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศ 5 % อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนทุกวันจนเซลล์เคลื่อนออกจากชิ้นเนื้อมาอยู่บนจานเลี้ยง จากนั้นอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนสัปดาห์ละ 2 ครั้ง การขยายจำนวนเซลล์จะทำการถ่ายเซลล์ (subculture) ที่เจริญเต็มจานเลี้ยงลงสู่จานเลี้ยงเซลล์ใหม่ในอัตราส่วน 1:3 โดยใช้เอนไซม์ trypsin-EDTA เซลล์จะถูกถ่ายสัปดาห์ละ 1 ครั้ง เซลล์ที่ใช้ในการทดลองจะใช้เซลล์ในรุ่นที่ 3-6 ในแต่ละการทดลองจะทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง และใช้เซลล์ที่เตรียมจากผู้ป่วย 3 คน และจะนำข้อมูลมาคำนวณทางสถิติโดยใช้ one-way ANOVA

### 2. การเตรียมแผ่น gelatin coated silicone

แผ่น silicone (polydimethylxyloxane; Silastic T-4, Dow Corning) ซึ่งมีสมบัติ hydrophobic ขนาด 3x3.5 ตารางเซนติเมตร ถูกปรับคุณสมบัติพื้นผิว ด้วยการทำให้ plasma activation เพื่อเพิ่ม wettability ที่ 300 Hz 60kV ระยะห่าง 4 มิลลิเมตร ภายใต้อากาศในโตรเจน เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นทำการ crosslink พันธะของโมเลกุลบนพื้นผิวที่เปลี่ยนไปด้วย 3.5% glutaraldehyde ทันทที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยน้ำ 3 รอบ แล้วทิ้งให้แห้งและเก็บที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำมาใช้เลี้ยงเซลล์จะเคลือบพื้นผิวอีกครั้งด้วย สารละลาย 0.1% gelatin

### 3. การกระตุ้นเซลล์ด้วยแรง

เซลล์ถูกหว่านบน gelatin coated silicone membrane (Silastic T-4, Dow Corning, GmbH, Germany) ที่ความหนาแน่น 20,000 เซลล์/cm<sup>2</sup> ที่มี 10% FBS เลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะแผ่

และ confluence แล้วนำแผ่น silicone ไปประกอบเข้ากับ stretching apparatus ที่ประดิษฐ์ขึ้นเองโดยกลุ่มผู้วิจัย ซึ่งการทำงานของเครื่องสามารถกำหนดค่าระยะการยืดของแผ่น silicone (ร้อยละ) จำนวนรอบต่อ นาที (Hz) และระยะเวลาในการให้แรงได้ ทั้งนี้แผ่น silicone ที่มีเซลล์จะถูกยึดกับเครื่องยืด และอยู่ในจานเลี้ยงเซลล์ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ตลอดช่วงเวลาของการทดลอง โดยอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนเป็น serum-free DMEM ก่อนเริ่มการทดลองเป็นเวลา 16 ชม และเปลี่ยนอีกครั้งเมื่อเริ่มการทดลอง เซลล์จะถูกเลี้ยงในตู้บ่มที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศ 5 % ตลอดการทดลอง เซลล์ในกลุ่มทดลองจะถูกกระตุ้นด้วยแรงในรูปแบบ และระยะเวลาต่างๆ กัน

เมื่อสิ้นสุดการทดลองจะตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของเอนไซม์ที่ใช้อย่างสลายเมทริกซ์นอกเซลล์และตัวยับยั้งการทำงาน เช่น เอนไซม์กลุ่ม MMPs, TIMPs, RANKL และ OPG โดยเทียบกับระดับการแสดงออกพื้นฐานเซลล์จากกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับแรง ระดับการแสดงออกดังกล่าวจะถูกวิเคราะห์ในระดับ mRNA ด้วย เทคนิค Quantitative-PCR และเฉพาะตัวที่มีการเปลี่ยนแปลงจะถูกตรวจวัดระดับโปรตีนด้วยเทคนิค ELISA เทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการกระตุ้น

#### 4. การวิเคราะห์ระดับ mRNA ด้วยเทคนิค Quantitative PCR (Q-PCR)

RNA จะถูกสกัดจากเซลล์โดยใช้ TRIzol (Gibco, MD, USA) ตามวิธีการที่แนะนำของบริษัทผู้ผลิต จากนั้นวัดปริมาณ RNA ที่สกัดได้ด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 260 nm RNA จำนวน 1  $\mu$ g จากแต่ละตัวอย่างจะถูกนำไปผ่านกระบวนการ reverse transcription (RT) โดยใช้เอนไซม์ Avian myeloblastosis virus (AMV; Promega, WI, USA) และ oligo dT primer (Promega, WI, USA) ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้ได้ complementary DNA (cDNA)

จากนั้น cDNA ตั้งต้นถูกเพิ่มจำนวนขึ้นในปฏิกิริยาของ PCR โดยการใช้สาย primer ที่จำเพาะต่อ nucleotide sequence ของเอนไซม์ที่ใช้อย่างสลายเมทริกซ์นอกเซลล์และตัวยับยั้งการทำงาน เช่น เอนไซม์กลุ่ม MMPs, TIMPs, RANKL และ OPG และใช้สาย primer ที่จำเพาะต่อ 18S หรือ GAPDH ควบคู่กันไป เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมภายใน (internal control) ของการทดลอง ทำการติดฉลากด้วยสารเรืองแสง SYBR-Green I Dye ซึ่งจะจับกับ DNA ตรงตำแหน่ง minor groove ของ DNA สายคู่ เมื่อสารนี้ถูกกระตุ้นด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต จะมีการคายพลังงานออกมาเป็นแสงของฟลูออเรสเซนซ์ ทำให้สามารถวัดปริมาณของ DNA ได้ โดยสามารถตรวจวัดปริมาณ DNA ที่เพิ่มขึ้นในปฏิกิริยา PCR ในแต่ละรอบได้ ทำให้สามารถติดตามปริมาณ DNA ในช่วง exponential phase ได้อย่างแม่นยำ ทำให้ได้ค่าที่แปรผันตามปริมาณเริ่มต้นของ DNA เป้าหมาย และสามารถวัดปริมาณ DNA ที่เพิ่มขึ้นมาได้ทันที โดยโปรแกรมจะทำการวิเคราะห์และแปลผล

## 5. การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงด้วยเทคนิค Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ปริมาณเอนไซม์และตัวยับยั้ง เช่น กลุ่ม MMPs และ TIMPs ที่หลั่งจากเซลล์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วยแรง และได้รับการกระตุ้นด้วยแรง ในรูปแบบต่างๆ จะถูกวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ELISA ดังขั้นตอนโดยย่อ ดังนี้คือ นำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เก็บภายหลังจากเซลล์ได้รับการกระตุ้นด้วยแรงมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ELISA ตามขั้นตอนที่ระบุไว้โดยบริษัท โดยอาศัยหลักการที่ว่า ในหลุมของ ELISA plate จะถูกเคลือบผิวไว้ด้วยแอนติบอดี (antibody) ที่มีความจำเพาะกับโปรตีนนั้นๆ อาหารเลี้ยงเซลล์ที่เก็บหลังจากเซลล์ได้รับการกระตุ้น จะถูกนำมาเติม พร้อมๆ กับ antibody ตัวที่ 2 ที่มีความจำเพาะกับโปรตีนเช่นเดียวกัน แต่คนละตำแหน่ง (epitope) กับ antibody ตัวแรก และปลายอีกด้านหนึ่งต่ออยู่กับ biotin ซึ่งจะต่อกับตัวแสดงสัญญาณต่อไป ดังนั้นเอนไซม์ หรือตัวยับยั้งที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์จะจับกับ antibody ทั้งสองตัวและถูกดึงมาติดที่ก้นหลุม จากนั้น antibody ตัวที่ 2 และโปรตีนส่วนเกินจะถูกล้างออก แล้วเติม horseradish peroxidase-conjugated streptavidin ซึ่งจะไปจับกับ biotin จากนั้นเติมสารตั้งต้น (substrate) ของ peroxidase ก็จะทำให้เกิดเป็นสารละลายสีขึ้น แล้วนำสารละลายที่มีสีนี้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้นำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานก็จะคำนวณกลับมาเป็นปริมาณโปรตีนต่อไป จากนั้นปริมาณโปรตีนที่คำนวณได้จะถูกเปรียบเทียบเป็นปริมาณโปรตีนต่อจำนวนเซลล์ที่วิเคราะห์ได้จากเทคนิค MTT แล้วจึงนำเสนอเป็นกราฟต่อไป

### 5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

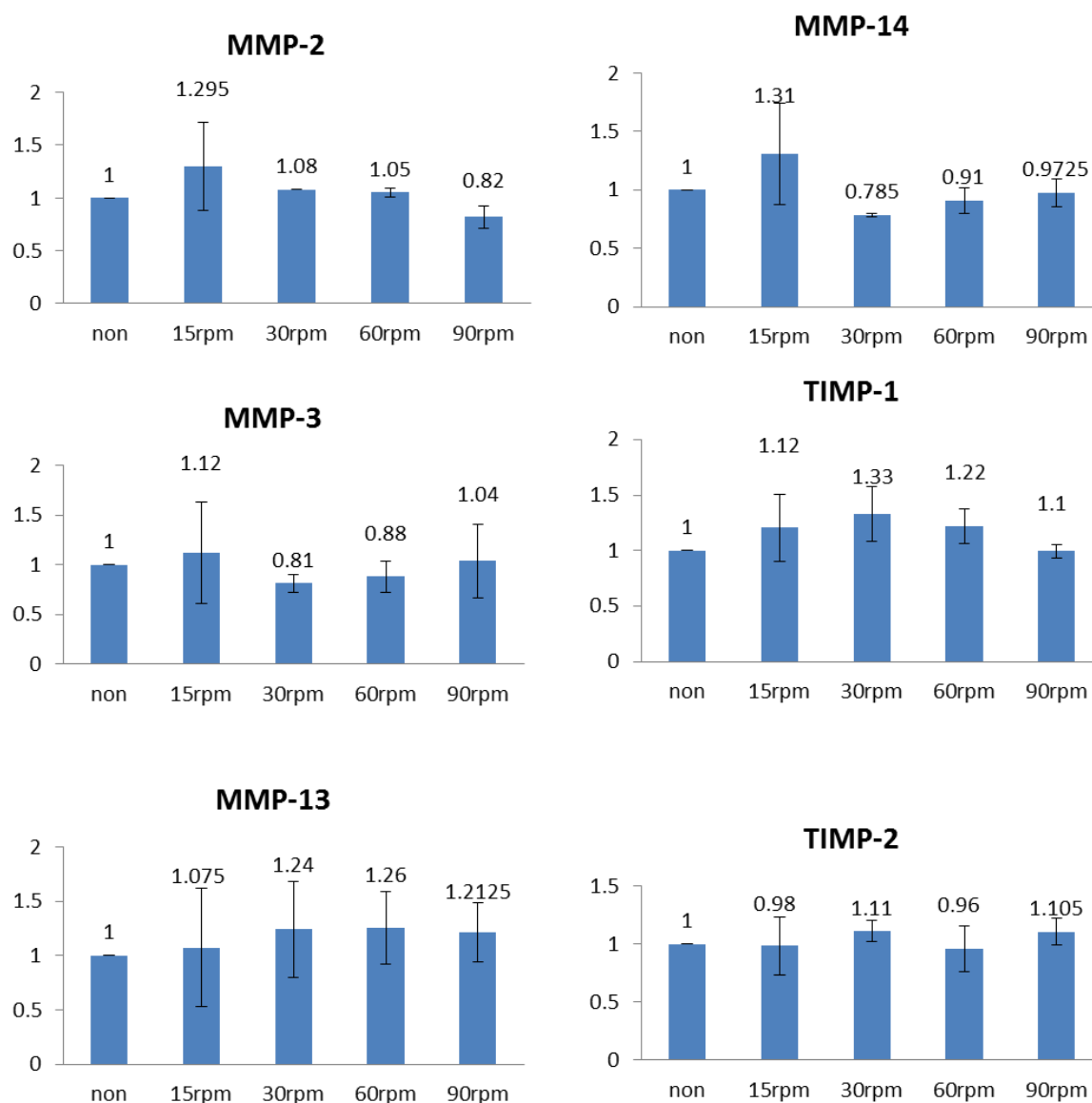
ค่าการแสดงออกของยีนที่แสดงผลด้วยโปรแกรมภายหลังการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Q-PCR จากการทดลอง 3 ครั้ง ถูกนำมาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยใช้สถิติ unpaired T-test โดย มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่  $p < 0.05$

## ผลการวิจัย

ได้ดำเนินงานตามแผนงานหลักที่วางไว้ แต่มีการปรับเปลี่ยนตามผลการศึกษาที่ได้ ดังนี้คือ ในระหว่างที่ทำการศึกษาวิจัยนี้ได้มีการพัฒนา stretch apparatus อย่างต่อเนื่องซึ่งขณะนี้ได้ยื่นเรื่องเพื่อขอรับสิทธิบัตรแล้ว โดยอยู่ในระหว่างขั้นตอนการพิจารณา โดยเครื่องที่ได้พัฒนาต่อมา จะทำงานโดยการส่งผ่านแรงควบคุมอิเล็กทรอนิกส์ ที่มีโปรแกรมที่สามารถกำหนด และปรับเปลี่ยนค่าปัจจัยที่เกี่ยวข้องของแรงในช่วงที่ทำการศึกษาได้ในช่วงที่ละเอียดและครอบคลุมมากกว่า การเคลื่อนที่ของแขนจับแผ่น silicone ซึ่งเคลื่อนที่ในรูปแบบของแรงดึงเชิงเส้น ด้วยแรงที่สม่ำเสมอคงที่ได้ระยะดึงและความถี่ที่สม่ำเสมอ ทำให้ค่าปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการศึกษา มีความเที่ยงตรงมากยิ่งขึ้นกว่าเครื่องต้นแบบเดิมที่ใช้ในการทดลองช่วงแรก ดังนั้นจึงมีการทำการทดลองบางส่วนซ้ำโดยใช้เครื่องมือใหม่ และวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วย Q-PCR (realtime PCR) เพื่อยืนยันผลการศึกษา เมื่อทำการทดลองซ้ำด้วยเครื่องใหม่พบว่า การเปลี่ยนแปลงของยีนที่ศึกษาเปลี่ยนไปจากที่ได้จากเครื่องดั้งเดิม คือไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจนภายใต้สภาวะที่ทำการศึกษา ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทดลองเปลี่ยนชนิดของ ECM ที่ใช้ในการเคลือบพื้นผิวซิลิโคนเป็นคอลลาเจน (type I collagen) ซึ่งพบเฉพาะการแสดงออกของ MMP-13 เพิ่มขึ้นภายในเวลา 2 ชั่วโมงที่ให้แรงดึงแบบ cyclic โดยเพิ่มอย่างมีนัยสำคัญที่ความถี่ 60rpm และเมื่อทดสอบที่ความถี่ 60 rpm ต่อเนื่องเป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่าระดับการแสดงออกของ MMP-13 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญตามเวลาเช่นกัน อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่าการเพิ่มการแสดงออกของยีนนั้นอยู่ในระดับที่ไม่สูงนัก ซึ่งได้แสดงผลไว้ในรูปที่ 1-3

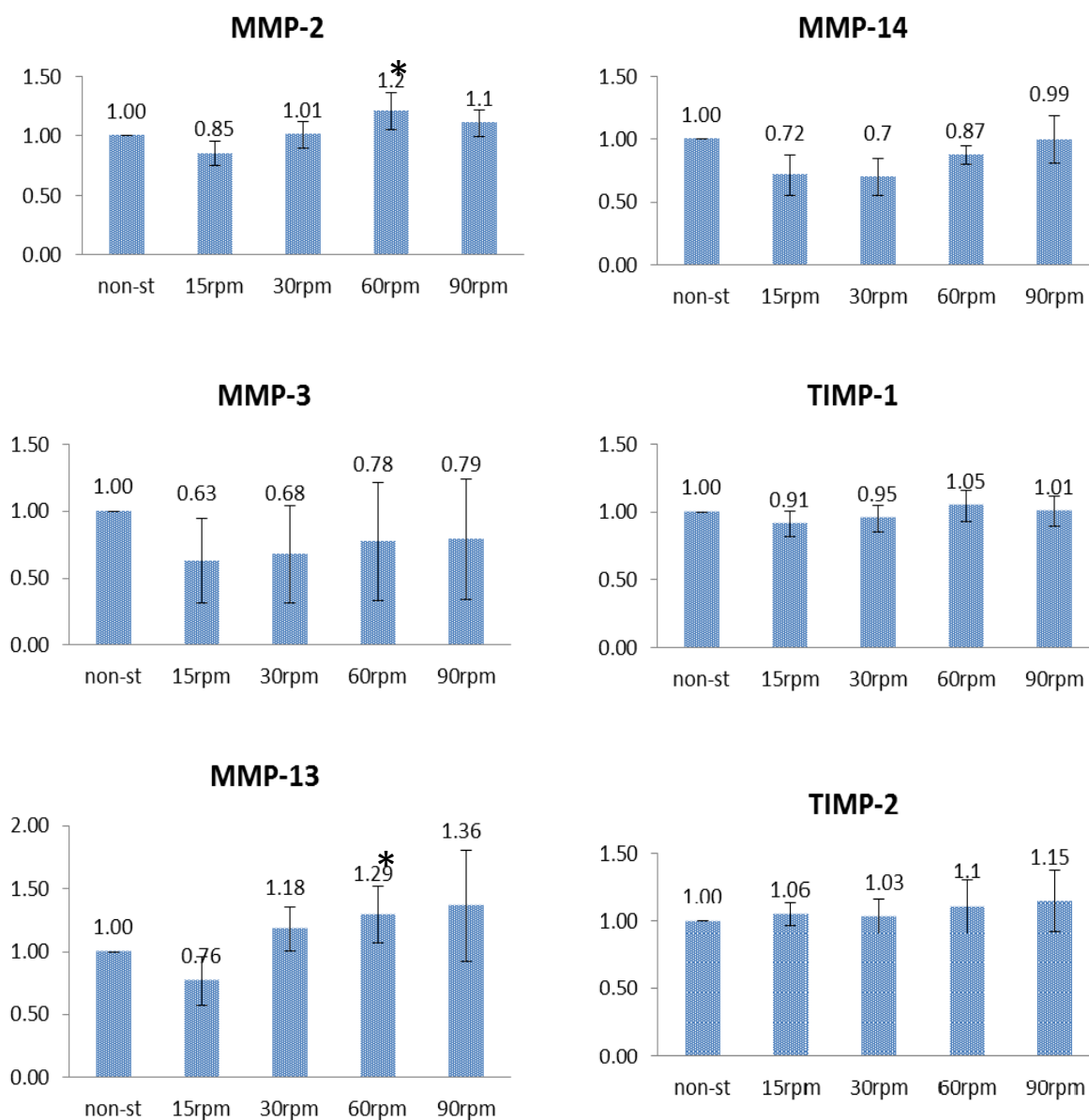
### การทดสอบผลของความถี่ (จำนวนรอบต่อนาที) ของแรงดึงแบบเป็นรอบ (cyclic)

ทำการทดลองซ้ำโดยให้แรงดึงแบบ cyclic ที่ความถี่ 15, 30, 60 และ 90 รอบต่อนาที ที่ระยะที่ยืดออกร้อยละ 10 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อเลี้ยงเซลล์บนแผ่นซิลิโคนที่เคลือบด้วยเจลาติน ผลการทดลอง ไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญของระดับการแสดงออกของยีนที่ศึกษา ดังแสดงในรูปที่ 1



**รูปที่ 1** แผนภูมิแท่งแสดงจำนวนเท่าของการแสดงออกของ MMPs/TIMPs เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Q-PCR เปรียบเทียบกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับแรงดึง (non) กับความถี่ของแรงดึงแบบ cyclic ที่ระยะยืดออกร้อยละ 10 ความถี่ 15, 30, 60 และ 90 รอบ/นาที (rpm) 2 ชั่วโมง ในเซลล์เอ็นดอทีลียัลบนแผ่นซิลิโคนที่เคลือบด้วยเจลาติน (ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจาก 3 การทดลอง)

เมื่อทดลองเลี้ยงเซลล์เอ็นซีคปริทันต์บนแผ่นซิลิโคนที่เคลือบด้วยคอลลาเจนชนิดที่ 1 แทนเจลาตินแล้ว ทำการทดสอบผลของความถี่อีกครั้ง พบว่าที่ความถี่ 60 rpm มีการแสดงออกของยีน MMP-2 และ 13 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ดังแสดงในรูปที่ 2

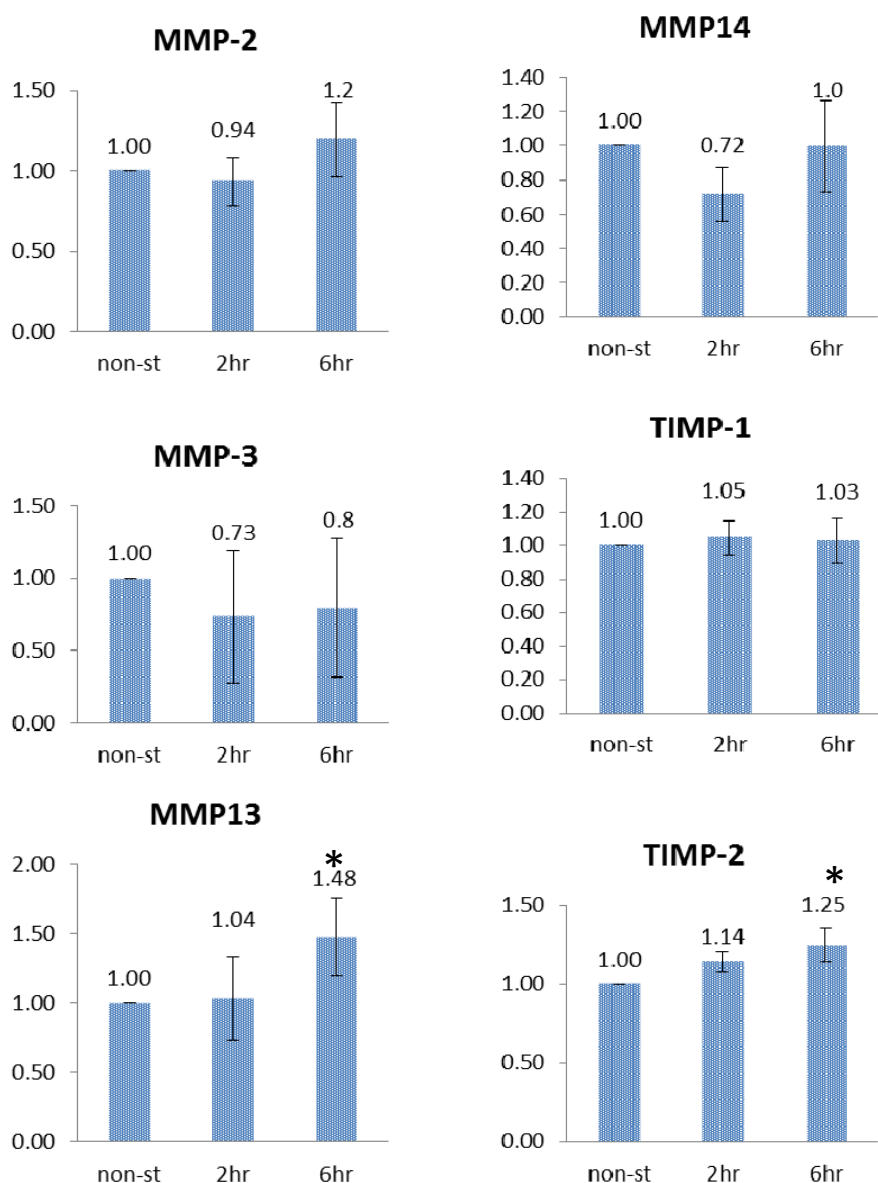


**รูปที่ 2** แผนภูมิแท่งแสดงจำนวนเท่าของการแสดงออกของ MMPs/TIMPs เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Q-PCR เปรียบเทียบกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับแรงดึง (non-st) กับความถี่ของแรงดึงแบบ cyclic ที่ระยะยึดออกร้อยละ 10 ความถี่ 15, 30, 60 และ 90 รอบ/นาที (rpm) 2 ชั่วโมง ในเซลล์เอ็นซีคปริทันต์บนแผ่นซิลิโคนที่เคลือบด้วยคอลลาเจนชนิดที่ 1 (ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจาก 3 การทดลอง \*  $p < 0.05$  เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม)



### การทดสอบผลของระยะเวลา (time) เมื่อเซลล์ได้รับแรงดึงแบบ cyclic

เมื่อได้แรงดึงแบบ cyclic ความถี่ 60 รอบต่อนาที ที่ระยะที่ยืดออกร้อยละ 10 ตามที่อธิบายข้างต้น ที่ระยะเวลา 2 และ 6 ชั่วโมง พบว่าการแสดงออกของ MMP-13 และ TIMP-2 มีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ดังแสดงในรูปที่ 3 อย่างไรก็ตาม การศึกษาในช่วงต่อไปจะเลือกทำการศึกษการเปลี่ยนแปลงเฉพาะของ MMP-13 เนื่องจากเป็นยีนเดียวที่มีการเปลี่ยนแปลงตั้งแต่ช่วง 2 ชั่วโมงแรก และเห็นการเปลี่ยนแปลงต่อเนื่องเมื่อเวลาผ่านไป



**รูปที่ 3** แผนภูมิแท่งแสดงจำนวนเท่าของการแสดงออกของ MMPs/TIMPs เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Q-PCR เปรียบเทียบกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับแรงดึง (non-st) กับความถี่ของแรงดึงแบบ cyclic ที่ระยะยืดออกร้อยละ 10 ความถี่ 60 รอบ/นาที เปรียบเทียบการแสดงออกของยีนที่ 2 และ 6 ชั่วโมง (hr) ในเซลล์เอ็นดีคปริทันต์บนแผ่นซิลิโคนที่เคลือบด้วยคอลลาเจน ชนิดที่ 1 (ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจาก 3 การทดลอง \*  $p < 0.05$  เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม)

อย่างไรก็ตาม เมื่อทำการตรวจวัดระดับโปรตีน MMP-13 ด้วยเทคนิค ELISA แล้วไม่พบการเปลี่ยนแปลงของระดับโปรตีน MMP-13 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับแรงดึง ทั้งนี้มีความเป็นไปได้ที่การแสดงออกของยีนที่เพิ่มขึ้นแม้มีนัยสำคัญ แต่ก็ไม่ได้เพิ่มขึ้นอย่างมากๆ นั้น ส่งผลให้การเปลี่ยนแปลงในระดับโปรตีนเกิดขึ้นได้ไม่ชัดเจน ดังนั้นผู้วิจัยจึงไม่ได้ดำเนินการต่อในส่วนของการศึกษาการถ่ายทอดสัญญาณภายในเซลล์ ต่อการแสดงออกของ MMP-13 แต่ทั้งนี้ยังมียีนอื่นๆ ที่น่าสนใจในการศึกษาอิทธิพลของแรงดึงโดยใช้เครื่องมือที่ได้พัฒนาขึ้นมาแล้วดังกล่าว จึงได้ปรับเปลี่ยนเป็นการศึกษาอิทธิพลของแรงดึงเป็นรอบ (cyclic stretch) และแบบต่อเนื่อง (static) ต่อระดับการแสดงออกของโปรตีน RANKL และ OPG รวมทั้งสัดส่วน (ratio) ระดับการแสดงออกของ RANKL/OPG ซึ่งมีบทบาทสำคัญในกระบวนการรักษาสมดุล(การสร้าง/สลาย) ของกระดูกเบ้าฟัน โดยศึกษาอิทธิพลของปัจจัยของขนาด (magnitude) และความถี่ (frequency) ของ static/cyclic stretch

### แรงดึงแบบเป็นรอบเพิ่มการแสดงออกของระดับยีนของ RANKL และ OPG ในเซลล์เอ็นดอปรีทันต์

เมื่อเซลล์เอ็นดอปรีทันต์ได้รับแรงดึงแบบเป็นรอบ ที่ความถี่ 15, 60 และ 90 รอบต่อนาที ทำการดึงแผ่น silicone ให้ยึดออกเป็นระยะร้อยละ 10 ของความยาวเดิม เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่าเพิ่มการแสดงออกของระดับยีนของ RANKL อย่างมีนัยสำคัญ ตั้งแต่ที่ 15 รอบ/นาที และที่ทุกความถี่ที่ศึกษาเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับแรงดึง ( $p < 0.05$ ) อย่างไรก็ตาม ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของการแสดงออกของยีนเมื่อเทียบระหว่างกลุ่มที่ได้รับความถี่ต่างกัน แม้ว่าจากกราฟจะพบแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นตามความถี่ที่เพิ่มขึ้น (รูปที่ 4A)

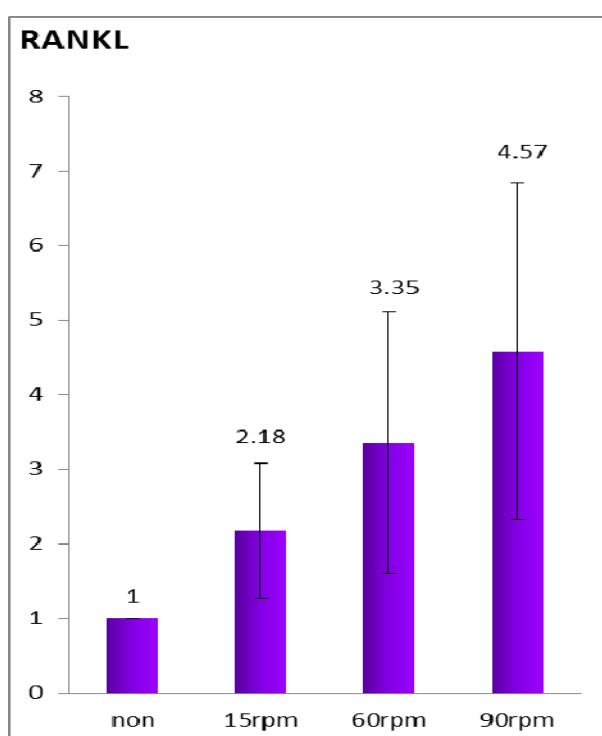
สำหรับการแสดงออกของระดับยีนของ OPG พบการเพิ่มอย่างมีนัยสำคัญเช่นเดียวกัน ตั้งแต่ที่ 15 รอบ/นาที และที่ทุกความถี่ที่ศึกษาเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับแรงดึง ( $p < 0.05$ ) นอกจากนี้ เมื่อเทียบระหว่างกลุ่มความถี่ พบการระดับการแสดงออกของ OPG ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ จากกลุ่มความถี่ที่ 15 รอบ/นาที กับกลุ่ม 90 รอบ/นาที ( $p < 0.05$ ) (รูปที่ 4B)

เมื่อวิเคราะห์สัดส่วนระดับการแสดงออกของ RANKL/OPG พบว่าที่ความถี่ 15 และ 60 รอบ/นาที ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าสัดส่วนดังกล่าวเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับแรง แต่พบการเพิ่มของสัดส่วนนี้อย่างมีนัยสำคัญที่ความถี่ 90 รอบ/นาที ( $p < 0.05$ ) (รูปที่ 4C)

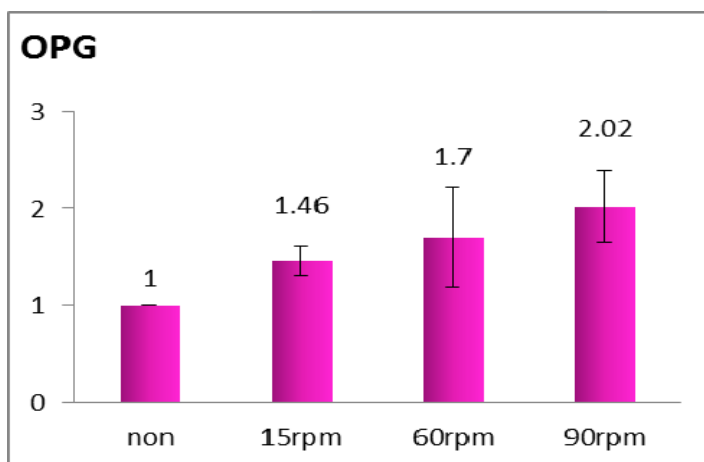
ผลการทดลองในส่วนนี้ให้ข้อสรุปในเบื้องต้นว่าแรงดึงแบบเป็นรอบ สามารถเพิ่มการแสดงออกของระดับยีนได้ทั้ง RANKL และ OPG อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งในส่วนของ RANKL ยังไม่เคยมีรายงานในเซลล์เอ็นดอปรีทันต์มาก่อน นอกจากนี้ยังพบว่าแม้การแสดงออกของยีนทั้งสองจะเพิ่มขึ้น แต่การเพิ่มขึ้นนี้

ไม่รบกวนต่อสมดุลของยีนทั้งสองซึ่งอาจส่งผลต่อสมดุลของกระดูก ถ้าความถี่นั้นไม่ได้อยู่ในระดับที่สูงมาก

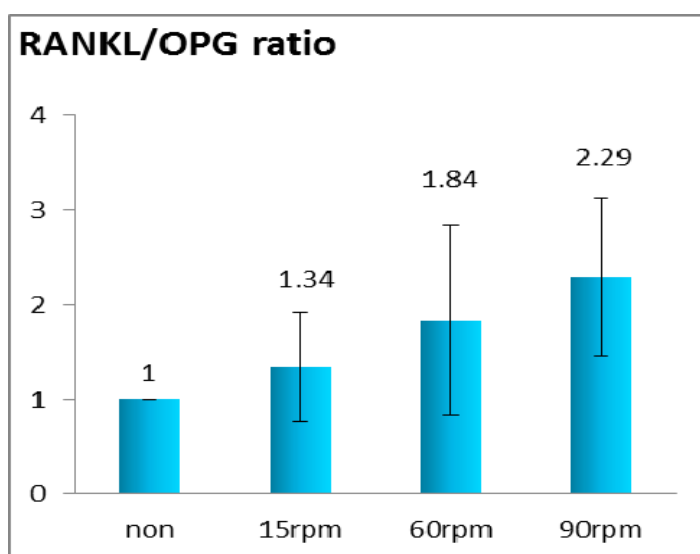
4A



4B



4C



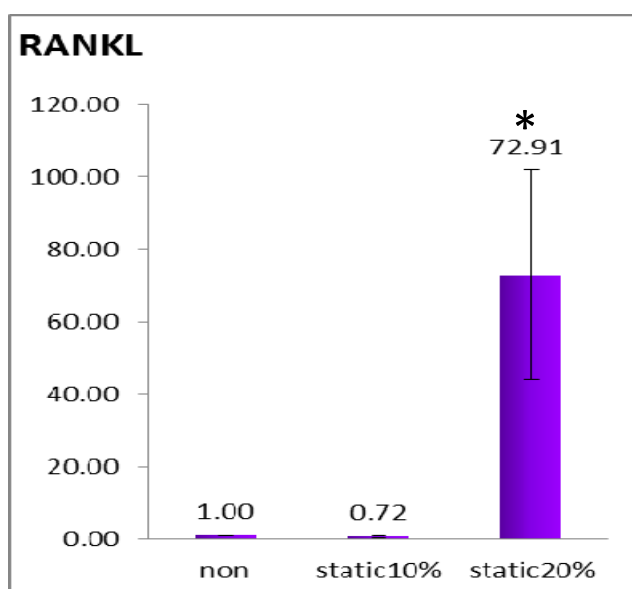
**รูปที่ 4** แผนภูมิแท่งแสดงจำนวนเท่าของการแสดงออกของ RANKL (4A) OPG (4B) และ RANKL/OPG ratio (4C) เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Q-PCR เปรียบเทียบกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับแรงดึง (non) กับความถี่ของแรงดึงแบบ cyclic ระยะยืดออกร้อยละ 10 ความถี่ 15, 60 และ 90 รอบ/นาที (rpm) 2 ชั่วโมง ในเซลล์เอ็นดอปรีตันต้นบนแผ่นซิลิโคนที่เคลือบด้วยเจลาติน (จาก 3 การทดลอง \*  $p < 0.05$  vs. control, #  $p < 0.05$  between 2 experimental groups)

อิทธิพลของขนาดของแรง (ร้อยละของระยะที่ยืดออก) ร่วมกับรูปแบบของแรงดึงแบบต่อเนื่อง (static) ต่อระดับการแสดงออกของระดับยีน RANKL และ OPG และ สัดส่วน RANKL/OPG ในเซลล์เอ็นดอทีลียัล

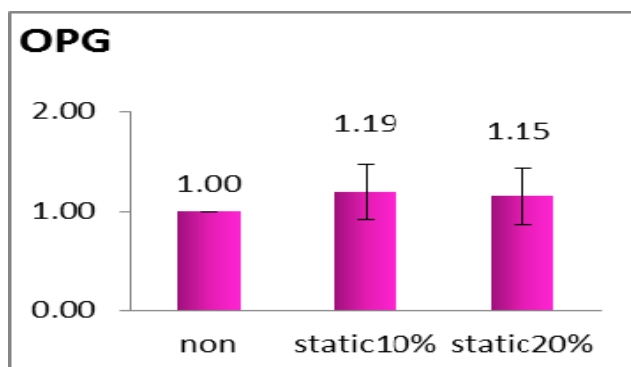
จากนั้นผู้วิจัยได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบผลของแรงดึงแบบต่อเนื่องกับแรงดึงแบบเป็นรอบ เมื่อให้ขนาดของแรงที่แตกต่างกัน ซึ่งการเพิ่มขนาดของแรงทำได้โดยการเพิ่มระยะที่ยืดออกเป็นร้อยละให้เพิ่มขึ้นในการศึกษานี้จึงทำการเปรียบเทียบที่ระยะที่ยืดออกร้อยละ 10 และ 20 ซึ่งระยะดังกล่าวนี้ ยังอยู่ในขนาดที่เซลล์เอ็นดอทีลียัลได้รับในขณะใช้งานตามที่เคยมีรายงานไว้

ผลการศึกษาพบว่าแรงดึงแบบต่อเนื่องที่ขนาดร้อยละ 10 ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีน RANKL และ OPG ไปจากระดับปกติ คือไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ได้รับแรง (รูปที่ 5A และ B) แต่เมื่อเพิ่มขนาดของแรงดึงแบบต่อเนื่องเป็นร้อยละ 20 พบการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของระดับการแสดงออกของยีน RANKL ( $p < 0.05$ ) (รูปที่ 5A) ในขณะที่ภายใต้สภาวะเดียวกันนี้ ระดับการแสดงออกของยีน OPG ไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปจากระดับปกติ คือมีระดับเดียวกับกลุ่มที่ไม่ได้รับแรง และกลุ่มที่ได้รับแรงขนาดร้อยละ 10 (รูปที่ 5B) ดังนั้นเมื่อวิเคราะห์สัดส่วนระดับการแสดงออกของ RANKL/OPG จึงพบการเพิ่มของสัดส่วนนี้อย่างมีนัยสำคัญที่ขนาดของแรงดึงแบบต่อเนื่องที่ขนาดร้อยละ 20 ( $p < 0.05$ ) (รูปที่ 5C)

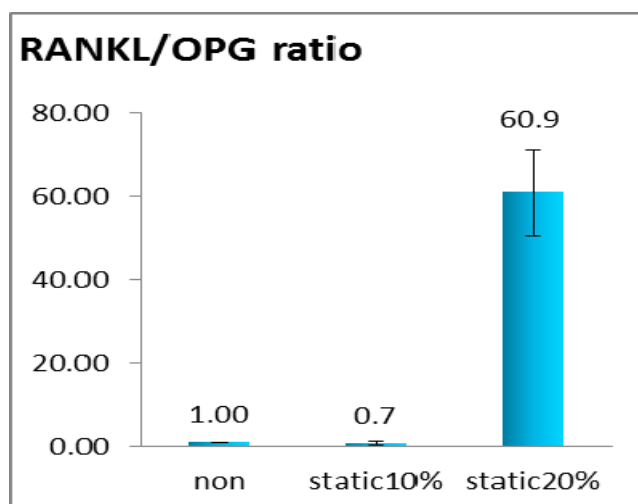
5A



5B



5C



**รูปที่ 5** แผนภูมิแท่งแสดงจำนวนเท่าของการแสดงออกของ RANKL (5A) OPG (5B) และ RANKL/OPG ratio (5C) เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Q-PCR เปรียบเทียบกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับแรงดึง (non) กับแรงดึงแบบต่อเนื่อง (static) ระยะยืดออกร้อยละ 10 และ 20 2 ชั่วโมง ในเซลล์เอ็นดอปรีทีนต้นบนแผ่นซิลิโคนที่เคลือบด้วยเจลาติน (จาก 3 การทดลอง \*  $p < 0.05$  vs. control)

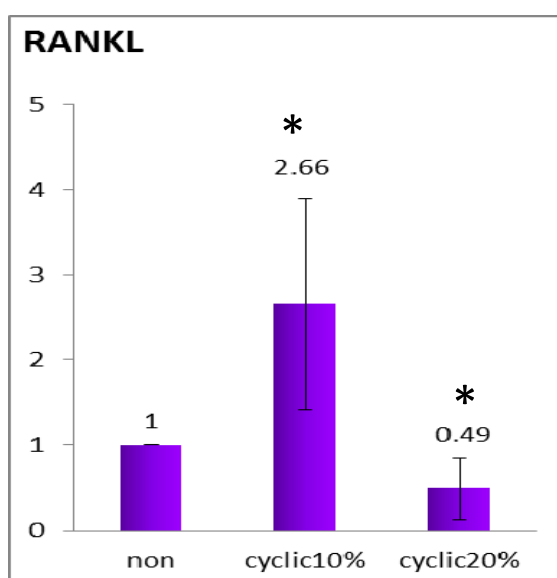
อิทธิพลของขนาดของแรง (ร้อยละของระยะที่ยืดออก) ร่วมกับรูปแบบของแรงดึงแบบเป็นรอบ (cyclic) ต่อระดับการแสดงออกของยีน RANKL และ OPG และ สัดส่วน RANKL/OPG ในเซลล์เอ็นโดพริทันต์

ผลการศึกษาในส่วนของแรงดึงแบบเป็นรอบ ที่ความถี่ 60 รอบ/นาที ร่วมกับขนาดของแรงร้อยละ 10 การเพิ่มระดับการแสดงออกของยีน RANKL และ OPG อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับแรง (รูปที่ 6A และ B) และสอดคล้องกับผลที่แสดงไว้ในรูปที่ 4A และ B แต่ตรงข้ามกับผลที่เกิดจากเมื่อได้รับแรงดึงในรูปแบบต่อเนื่อง ที่แสดงไว้ในรูปที่ 5A และ B นอกจากนี้ เมื่อเพิ่มขนาดของแรงดึงแบบเป็นรอบเป็นร้อยละ 20 กลับพบการลดลงอย่างมีนัยสำคัญของระดับการแสดงออกของยีน RANKL ( $p < 0.05$ ) (รูปที่ 6A) ในขณะที่ภายใต้สภาวะเดียวกันนี้ ระดับการแสดงออกของยีน OPG ยังคงอยู่ในระดับที่มีการเพิ่มขึ้นในระดับใกล้เคียงกับเมื่อได้รับขนาดของแรงร้อยละ 10 (รูปที่ 6B)

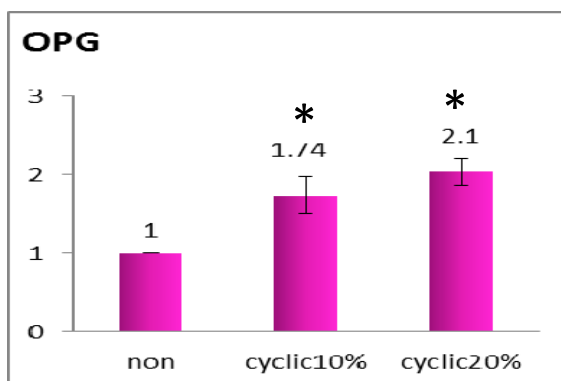
ดังนั้นเมื่อวิเคราะห์สัดส่วนระดับการแสดงออกของ RANKL/OPG จึงพบว่า ที่ขนาดของแรงร้อยละ 10 ของแรงดึงแบบเป็นรอบ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญของสัดส่วนนี้ แต่เมื่อเพิ่มขนาดของแรงเป็นร้อยละ 20 พบการลดลงของสัดส่วนนี้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับแรงรวมทั้งกลุ่มทดลองที่ได้รับแรงดึงแบบเป็นรอบ ที่ขนาดของแรงร้อยละ 10 ( $p < 0.05$ ) (รูปที่ 6C)

ผลการทดลองในส่วนนี้ให้ข้อสรุปในเบื้องต้นว่า รูปแบบการดึง (static/cyclic) มีอิทธิพลต่อการแสดงออกของยีน RANKL และ OPG ที่แตกต่างกันในเซลล์เอ็นโดพริทันต์ และรูปแบบการแสดงออกของยีนดังกล่าวสามารถถูกปรับเปลี่ยนได้ ด้วยปัจจัยของขนาดของแรงอีกด้วย การทดลองนี้แสดงอิทธิพลของปัจจัยต่างๆ ของแรงต่อสัดส่วนการแสดงออกของ RANKL/OPG ซึ่งบอกถึงอิทธิพลของแรงต่อสมดุลของกระดูก

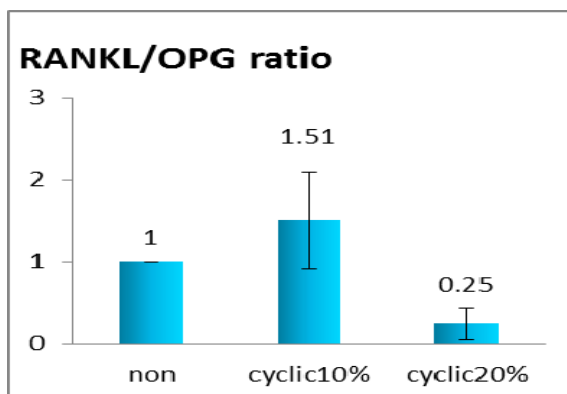
6A



6B



6C



**รูปที่ 6** แผนภูมิแท่งแสดงจำนวนเท่าของการแสดงออกของ RANKL (6A) OPG (6B) และ RANKL/OPG ratio (6C) เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Q-PCR เปรียบเทียบกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับแรงดึง (non) กับแรงดึงแบบเป็นรอบ (cyclic) ที่ความถี่ 60 รอบ/นาที ระยะยืดออกร้อยละ 10 และ 20 2 ชั่วโมง ในเซลล์เอ็นดีบริต้นต้นบนแผ่นซิลิโคนที่เคลือบด้วยเจลาติน (จาก 3 การทดลอง \*  $p < 0.05$  vs. control)



## วิจารณ์

งานวิจัยนี้ศึกษาการตอบสนองเซลล์เอ็นดอทีลียัล เมื่อได้รับแรงดึงภายใต้ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับแรง ได้แก่ ขนาด (ระยะดึง) เวลา ความถี่ รวมทั้งลักษณะของแรง เช่น การให้แรงดึงแบบต่อเนื่อง (static) และแบบเป็นรอบต่อเนื่อง (cyclic) โดยมุ่งเน้นไปที่การตอบสนองในช่วงระยะเวลาสั้น เพื่อต้องการเทียบเคียงให้เข้าใกล้กับเวลาที่ใช้ในการบาดเจ็บจริง

โดยใช้ stretch apparatus ที่ประดิษฐ์ขึ้นเองในห้องปฏิบัติการเนื่องจากเครื่องกำเนิดแรงดึง และผลิตภัณฑ์ที่ใช้ประกอบ ไม่มีจำหน่ายในประเทศ ประกอบกับมีราคาสูงมาก

แม้ว่าการพัฒนา stretch apparatus ไม่ได้อยู่ภายใต้โครงการวิจัยนี้ และเครื่องต้นแบบได้พัฒนาแล้วเสร็จก่อนเริ่มงานวิจัยนี้ แต่ในระหว่างดำเนินงานวิจัยก็ได้มีการปรับปรุงและพัฒนาประสิทธิภาพของเครื่องมือต้นแบบเพื่อใช้ในการทดลองภายใต้โครงการวิจัยนี้มาโดยตลอดจนสำเร็จ และได้ยื่นเสนอขอรับการจดสิทธิบัตรแล้ว เพื่อให้ได้เครื่องกำเนิดแรงดึงที่ให้แรงที่สม่ำเสมอคงที่ในแต่ละครั้งที่ทำการทดลองภายใต้แรงควบคุมที่มีความเที่ยงตรง แต่ด้วยเหตุที่ทดลองส่วนหนึ่งทำในเครื่องต้นแบบ และบางส่วนทำในเครื่องที่พัฒนาแล้วเสร็จ ทำให้ต้องมีการทำการทดลองซ้ำในช่วงคาบเกี่ยวเมื่อเปลี่ยนรูปแบบของเครื่องเพื่อยืนยันผลอีกครั้งหนึ่ง ซึ่งทำให้ผลการศึกษาในส่วนของเอนไซม์ MMP-2, 3, 13, 14 และ TIMP-1 และ 2 มีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมเมื่อใช้เครื่องใหม่ ดังปรากฏในผลการทดลอง

เมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษานี้ที่ผ่านมามีเป็นรายงานการศึกษาถึงผลของแรงดึงต่อการแสดงออกของยีนชนิดเดียวกัน แต่ให้ผลการศึกษาที่แตกต่างกันออกไปบ้าง เมื่อพิจารณาในรายละเอียดพบว่าเกิดได้ทั้งจากการออกแบบการทดลอง และข้อจำกัดบางประการของเครื่องมือ นอกจากนี้ เครื่องกำเนิดแรงดึงที่ใช้ มีทั้งแบบที่มีจำหน่าย และแบบที่ประดิษฐ์ใช้เองในห้องปฏิบัติการ ก็มีรูปแบบการให้แรงผ่านดิ่งแผ่นตัวกลางที่เซลล์ใช้ยึดเกาะอยู่หลายรูปแบบ เช่น uni-axial, bi-axial plane หรือ 3-D เป็นต้น

ในช่วงแรกของการศึกษา เริ่มจากทดสอบการทำงานของเครื่องมือที่ประดิษฐ์ขึ้นว่า จะสามารถสร้างแรงดึงให้เซลล์รับรู้ และเกิดการตอบสนองไปในทิศทางเดียวกับการศึกษาของคณะผู้วิจัยอื่นๆ โดยใช้การแสดงออกของยีน cox-2 ซึ่งมีรายงานการเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับ tensile force ในเซลล์เอ็นดอทีลียัล (Shimizu N, *et al.*, 1998) อย่างไรก็ตาม การเพิ่มขึ้นของ cox-2 ในการศึกษาของ Shimizu พบที่ 3 วัน หลังจากได้รับ cyclic tensile force ที่ความถี่ 6 รอบต่อนาที จากการให้แรงผ่านระบบ Flexcell™ ที่ใช้คู่กับ flexi-bottomed plate ให้แรงดึงแบบ Equibi-axial plane ที่ magnitude (ระยะยืดออก) 18% ในขณะที่งานวิจัยนี้สร้างแรงดึงแบบ uni-axial plane ที่ความถี่ 60 รอบต่อนาที ที่ magnitude 10% โดยพบการตอบสนองได้ที่ 2 ชั่วโมง ซึ่งการเพิ่มขึ้นของระดับ cox-2 นี้ ก็พบในลักษณะเดียวกันเมื่อใช้ stretch

apparatus ที่พัฒนาแล้วเสร็จ จะเห็นได้ว่าการปรับเปลี่ยนเงื่อนไขของปัจจัยของความถี่ ขนาดของแรง รูปแบบทิศทางของแรง ส่งผลต่อเวลาที่เซลล์ใช้ในการตอบสนอง ถ้าปัจจัยเหล่านั้นไม่ส่งผลปรับเปลี่ยน หรือขัดขวางขั้นตอนการส่งถ่ายสัญญาณภายในเซลล์เพื่อให้เกิด transcription ของยีนนั้น ในท้ายที่สุด transcription นั้นก็จะเกิดขึ้น แต่อาจด้วยคุณภาพที่ต่างกัน อย่างไรก็ตามผลการทดลองในส่วนนี้ยืนยันว่า เกิดการรับรู้ของเซลล์ต่อแรงดึงจาก stretch apparatus และตอบสนองไปในทิศทางเดียวกับที่เคยมีรายงาน มาก่อน

มีรายงานค่าเฉลี่ยของความถี่ของการการบดเคี้ยวอยู่ที่ 70 รอบ/นาที (Pini M thesis, 1999) งานวิจัยนี้จึงศึกษาความถี่ในช่วงที่คาบเกี่ยวกับความถี่ของการการบดเคี้ยวดังกล่าว คือ 15, 60 และ 90 รอบ/นาที และมีการศึกษาโดยใช้ finite element ในฟัน maxillary central incisor เมื่อได้รับแรงบดเคี้ยว พบการขยับของฟันในแนวระนาบ (horizontal displacement) อยู่ในช่วงร้อยละ 8-25 ขึ้นกับตำแหน่งของรากฟันที่วิเคราะห์และลักษณะพื้นผิวฟันรากฟัน (Natali AN *et al.*, 2004) นอกจากนี้ มีรายงานกล่าวว่า ขนาดของแรงที่ทำให้เอ็นยึดปริทันต์ยึดออกไม่เกินร้อยละ 24 ถือว่าอยู่ในช่วงขนาดของแรงปกติ ที่เซลล์เอ็นยึดปริทันต์ได้รับในการใช้งาน (Yamaguchi M, 1994) การศึกษาในครั้งนี้จึงเลือกใช้ที่ขนาดของแรงร้อยละ 10 และ 20 ซึ่งพบมีการใช้ในหลายๆ งานวิจัย (Yamaguchi M *et al.*, 1994; Kanzaki H *et al.*, 2001; Kanzaki H *et al.*, 2006)

เมื่อทำการทดลองซ้ำด้วยเหตุผลดังอธิบายไว้ในตอนต้น ประกอบกับการแสดงออกของ MMP-13 เพิ่มขึ้นภายในเวลา 2 ชั่วโมงที่ให้แรงดึงแบบ cyclic โดยเพิ่มอย่างมีนัยสำคัญที่ความถี่ 60rpm และเมื่อทดสอบที่ความถี่ 60 rpm ต่อเนื่องเป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่าระดับการแสดงออกของ MMP-13 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญตามเวลาเช่นกัน อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่าการเพิ่มการแสดงออกของยีนนั้นอยู่ในระดับที่ไม่สูงนัก ซึ่งเมื่อตรวจวัดในระดับโปรตีนด้วย ELISA ไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจน จึงได้ปรับเปลี่ยนยีนเป้าหมายมาเป็น RANKL และ OPG

เป็นที่ทราบกันดีว่า มีหลักฐานสนับสนุนความสำคัญของแรงดึงแบบเป็นรอบต่อสมดุลของการสร้าง-การทำลายของกระดูก ซึ่งเซลล์เอ็นยึดปริทันต์มีบทบาทร่วมในการรักษาสมดุลนี้ (Davidovitch *et al.*, 1988, Kanzaki H *et al.*, 2005) ทั้งนี้ เนื่องจากเซลล์เอ็นยึดปริทันต์สามารถสร้างได้ทั้ง RANKL และ OPG จึงมี 2 บทบาทในกระบวนการควบคุมการทำลายกระดูก ผ่านทางการควบคุมการสร้างเซลล์ทำลายกระดูก (osteoclastogenesis) มีรายงานว่าเซลล์เอ็นยึดปริทันต์เพิ่มการสร้าง OPG เพื่อยับยั้งการเกิด differentiation ของ osteoclast ในขณะที่ไปเร่งขั้นตอนสุดท้ายของการ differentiation ผ่านทางการสร้าง RANKL เพื่อเป็น ligand ให้กับ RANK ที่อยู่บนผิวของ pre-osteoclast (Kanzaki H *et al.*, 2001)

อย่างไรก็ตามมีรายงานการเพิ่มขึ้นของทั้ง RANKL และ OPG ในเซลล์เอ็นดอทีคปริทันต์เมื่อได้รับแรงดึงแบบเป็นรอบ แต่พบว่าการเพิ่มขึ้นของทั้ง RANKL และ OPG นี้กลับไม่กระตุ้น osteoclastogenesis ใน peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) ซึ่งผู้วิจัยได้อธิบายว่า ในการดึงนั้น ขณะเดียวกันก็เพิ่มระดับของ TGF-beta ซึ่งให้ผลส่งเสริมการสร้าง OPG ทำให้ระดับ OPG สูงอย่างต่อเนื่อง ทำให้สัดส่วนการสร้างของ RANKL/OPG ยังคงที่ (Kanzaki H *et al.*, 2006) ประกอบกับเคยมีรายงานว่า การเพิ่มขึ้นของ TGF-beta จะไปลดการสร้าง RANK ที่เซลล์เป้าหมาย ทำให้แม้มี RANKL ในปริมาณที่สูง ก็ไม่มี receptor เพียงพอที่จะนำไปสู่การเกิด differentiation ได้ (Karsdal MA *et al.*, 2003) จึงคาดว่าแรงดึงแบบเป็นรอบ น่าจะนำไปสู่การลดสัญญาณภายในเซลล์ที่เกิดจากการจับกันระหว่าง RANK-RANKL

ผลจากการศึกษาในครั้งนี้ แม้พบการเพิ่มขึ้นของทั้ง RANKL และ OPG เมื่อได้รับแรงดึงแบบเป็นรอบ แต่เมื่อพิจารณาสัดส่วน RANKL/OPG จะพบมีค่าที่คงที่ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเซลล์ได้รับแรงที่มีความถี่อยู่ในช่วงที่ไม่เกินค่าปกติที่ 15 และ 60 รอบ/นาทีก ในขณะที่ ที่ความถี่ 90 รอบ/นาทีก ค่าสัดส่วนระหว่าง RANKL/OPG เริ่มสูงขึ้น มีความเป็นไปได้ที่ ในช่วงของความถี่ที่เพิ่มขึ้นช่วงหนึ่ง ยังอยู่ในระดับที่เซลล์เอ็นดอทีคปริทันต์สามารถรักษาสสมดุลของการสร้าง RANKL และ OPG ของเซลล์ไว้ได้ แต่ความถี่ที่มากเกินไป นำไปสู่การเสียสมดุลซึ่งอาจนำไปสู่บทบาทในการสนับสนุนการสร้างเซลล์ทำลายกระดูกของเซลล์เอ็นดอทีคปริทันต์

นอกจากนี้งานวิจัยนี้ก็ได้แสดงปัจจัยของขนาดของแรง ที่สามารถเข้าไปปรับเปลี่ยนรูปแบบการแสดงออกของยีนทั้งสอง เมื่อได้เพิ่มเป็นปัจจัยร่วมเข้าไป ซึ่งให้ผลตรงข้ามกันอย่างน่าสนใจ โดยเฉพาะเมื่อมีการให้แรงขนาดหนึ่งแบบต่อเนื่อง (static) เทียบกับแรงขนาดเดียวกันแต่ให้เป็นรอบ (cyclic) ดังนั้นจะเห็นว่า การตอบสนองของเซลล์ต่อการกระตุ้นด้วยแรงดึงที่ประกอบขึ้นจากสัดส่วนของปัจจัยที่แตกต่างกัน สามารถส่งผลต่อพฤติกรรมของเซลล์ที่แตกต่างกันได้ ดังที่เห็นจากผลการศึกษานี้ ผลการวิจัยในครั้งนี้ ให้ข้อเสนอแนะในเบื้องต้นว่า แรงดึงแบบเป็นรอบในช่วงความถี่ปกติ ช่วยลดสัดส่วนของ RANKL/OPG เมื่อได้รับแรงดึงในขนาดของแรงที่สูงได้ สนับสนุนบทบาทของแรงบดเคี้ยวในการรักษาสสมดุลของกระดูก ในขณะที่แรงดึงที่ความถี่ที่สูงกว่าระดับปกติ จะนำไปสู่การเพิ่มสัดส่วนของ RANKL/OPG และนำไปสู่การเกิดการทำลายของกระดูกได้

แม้ว่าผลการศึกษาภายใต้โครงการวิจัยนี้ จะยังไม่สามารถให้ข้อสรุปได้ชัดเจน ภายใต้เงื่อนไขที่ใช้ในการทดลอง ด้วยเหตุปัจจัยดังกล่าวข้างต้น แต่มีประเด็นที่น่าสนใจที่สามารถใช้เป็นแนวทางในการศึกษาในลำดับต่อไปได้ดังต่อไปนี้

งานวิจัยนี้สามารถตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนที่เปลี่ยนไปในเซลล์เอ็นดอทีคปริทันต์ได้ เมื่อให้แรงดึงแบบ cyclic ตั้งแต่ที่ 2 ชั่วโมงขึ้นไป ซึ่งเป็นระยะเวลาที่น้อยกว่าที่เคยมีรายงานมาคือ 12

ชั่วโมง (Bolcato-Bellemin AL, *et al.*, 2000) หรือ 2 วัน (Tsuji K, *et al.*, 2004) เป็นต้น โดยคาดว่าจะทำให้สามารถทดสอบในเวลาที่ไม่ใกล้เคียงมากขึ้นกับเวลาที่ใช้ในการบริโภคอาหาร และจากการศึกษาให้ข้อมูลในเบื้องต้นถึงอิทธิพลของความถี่ (frequency) ร่วมกับการให้แรงแบบ cyclic ด้วย ซึ่งการทดลองเปรียบเทียบในเชิงความถี่ยังมีการศึกษาน้อยมาก

การตรวจวัดระดับการแสดงออกของ RANKL และ OPG ในระดับโปรตีน และความสามารถของโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นนี้ในการเหนี่ยวนำการเกิด osteoclastogenesis ใน peripheral blood mononuclear cells เปรียบเทียบภายใต้สภาวะที่มีสัดส่วนของ RANKL/OPG ที่สูง/ต่ำ รวมทั้งกลไกการควบคุม

การศึกษากลุ่มงานในส่วนของอิทธิพลของแรงดึงต่อการเกิด osteogenesis ในส่วนของ osteogenic factors และ cytokines ที่เกี่ยวข้อง ตลอดจนกลไกที่ใช้ในการควบคุม เนื่องจากเป็นที่ทราบกันดีว่าแรงดึงสามารถกระตุ้นการแปรสภาพของเซลล์เอ็นดอทีคัลไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก โดยแรงดึงแบบเป็นรอบกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่เป็น osteogenic markers ได้แก่ collagen I, ALP, BMP-2, BMP-4, Runx-2 และ Osx (Enokiya Y *et al.*, 2010; Tang N *et al.*, 2012) รวมทั้งยังลดการแสดงออกของ b-FGF (Enokiya Y *et al.*, 2010) และ EGF receptor (Matsuda N *et al.*, 1998) ซึ่งเป็น cytokines ที่ยับยั้งการแปรสภาพของเซลล์ PDL ไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก (Takayama S *et al.*, 1997) ทั้งนี้เพื่อสนับสนุนบทบาทของเซลล์เอ็นดอทีคัลในการพยายามรักษาสมดุลของเนื้อเยื่อ โดยเกี่ยวข้องกับกลไกทั้งในส่วนของ การสร้าง และการทำลายเนื้อเยื่อ นอกเหนือจากบทบาทดังกล่าวแล้ว เซลล์เอ็นดอทีคัลยังมีบทบาทในการคงสภาพของเนื้อเยื่อ เช่น การที่เซลล์เอ็นดอทีคัล หลั่ง TGF-beta กระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ แต่ยับยั้งการแปรสภาพของเซลล์เอ็นดอทีคัลไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง (Brady TA *et al.*, 1998) หรือการหลั่ง prostaglandins เพื่อยับยั้งการสะสมแร่ธาตุ (calcification) ของทั้งเซลล์กระดูกและเซลล์เอ็นดอทีคัล (Ogiso B *et al.*, 1991; Ogiso B *et al.*, 1992) รวมทั้งการหลั่ง osteoprotegerin เพื่อยับยั้งการละลายกระดูก (Ginger MS *et al.*, 1991) เป็นต้น จะเห็นได้ว่า ยังมีประเด็นที่น่าสนใจ และยังต้องการคำอธิบายอีกมากเกี่ยวกับอิทธิพลของแรงดึง และบทบาทของเซลล์เอ็นดอทีคัลในการรักษาสมดุลของเนื้อเยื่อผ่านทาง การควบคุมผ่านโปรตีนอื่นๆ อีกมาก

## สรุป

1. แรงดึงแบบเป็นรอบที่ความถี่ปกติช่วยลดสัดส่วนของ RANKL/OPG เมื่อได้รับแรงดึงในขนาดของแรงที่สูงได้ สนับสนุนบทบาทของแรงปกติในการรักษาสมดุลของกระดูก ผ่านทางเซลล์เอ็นดอทีคัลปริทันต์ ในขณะที่แรงดึงที่ความถี่ที่สูงกว่าระดับปกติ จะนำไปสู่การเพิ่มสัดส่วนของ RANKL/OPG และนำไปสู่การเกิดการทำลายของกระดูกได้

2. ไม่พบการเปลี่ยนแปลงในระดับโปรตีนอย่างมีนัยสำคัญของ MMPs และ TIMPs เมื่อได้รับแรงดึง ภายใต้สภาวะตามเงื่อนไขการศึกษา

3. งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าเซลล์เอ็นดอทีคัลปริทันต์มีบทบาทในการรักษาสมดุลของเยื่อเอ็นดอทีคัลปริทันต์ ภายใต้สภาวะที่ได้รับแรง แต่ทั้งนี้ขึ้นกับปัจจัยต่างๆ ของแรง ได้แก่ ขนาด ความถี่ เวลา โดยต้องคำนึงว่าปัจจัยดังกล่าวไม่ได้เป็นอิสระจากกัน เอ็นดอทีคัลปริทันต์จะโต้ตอบกับปัจจัยต่างๆ ที่ประกอบเข้าด้วยกันในสัดส่วนที่หลากหลาย และส่งผลต่อพฤติกรรมของเซลล์ และเนื้อเยื่อในที่สุด

### อุปสรรคในการดำเนินงาน และแนวทางการแก้ไข

1. ในระหว่างที่ทำการศึกษาวิจัยนี้ได้มีการพัฒนา stretch apparatus อย่างต่อเนื่อง โดยในท้ายที่สุด stretch apparatus ที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ จะทำงานโดยการส่งผ่านแรงควบคุมอิเล็กทรอนิกส์ ที่มีโปรแกรมที่สามารถกำหนด และปรับเปลี่ยนค่าปัจจัยที่เกี่ยวข้องของแรงในช่วงที่ทำการศึกษาค้นคว้าได้ การเคลื่อนที่ของแขนจับแผ่น silicone จึงเคลื่อนที่ในรูปแบบของแรงดึงเชิงเส้น ด้วยแรงที่สม่ำเสมอคงที่ ทำให้ค่าปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการศึกษา มีความเที่ยงตรงมากยิ่งขึ้นกว่าเครื่องต้นแบบเดิมที่ใช้ในการทดลองช่วงแรก ดังนั้นบางส่วนของโครงการวิจัยในปีที่ 1 ได้มีการทำซ้ำโดยใช้เครื่องมือใหม่ และพบว่า การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในส่วนการศึกษา MMPs/TIMPs ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ทำให้ต้องมีการปรับเปลี่ยนเป้าหมาย ซึ่งก็ให้ผลที่น่าสนใจ แต่ยังคงอาศัยการศึกษาเพิ่มเติมอีกมาก
2. stretch apparatus ยังมีเพียง 1 ชุด และทำการทดลองได้ครั้งละ 1 ตัวอย่าง (sample) ทำให้งานค่อนข้างล่าช้า
3. ปัญหาการติดเชื้อมาตรที่เรียหรือรา
4. การขาดแคลนเซลล์ในบางช่วงจากแหล่งที่ได้มา หรือเกิดการติดเชื้อในระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์จากพื้น

**ผลลัพธ์**

1. ยื่นขอรับสิทธิบัตรการประดิษฐ์ stretch apparatus
2. Neeracha Sanchavanakit, Yanee Tantilertanant, Jitti Niyompanich, Pitt Supaphol, Prasit Pavasant.  
Poster Presentation “Influence of tensile frequency on RANKL/OPG ratio in HPDL cells” FDI 2015  
Bangkok, Annual World Dental Congress, September 22-25, Bangkok, Thailand

## บรรณานุกรม

- Aitken KJ, Block G, Lorenzo A, Herz D, Sabha N, Dessouki O, Fung F, Szybowska M, Craig L, Bägli DJ. Mechanotransduction of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 mitogen-activated protein kinase activity in smooth muscle is dependent on the extracellular matrix and regulated by matrix metalloproteinases. *Am J Pathol.* 2006;169(2):459-70.
- Bloomfield SA. Changes in musculoskeletal structure and function with prolonged bed rest. *Med Sci Sports Exerc.* 1997;29(2):197-206.
- Bolcato-Bellemin AL, Elkaim R, Abehsera A, Fausser JL, Haikel Y, Tenenbaum H. Expression of mRNAs encoding for alpha and beta integrin subunits, MMPs, and TIMPs in stretched human periodontal ligament and gingival fibroblasts. *J Dent Res.* 2000;79(9):1712-6.
- Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther.* 2007;9 Suppl 1:S1. Review
- Brady TA, Piesco NP, Buckley MJ, Langkamp HH, Bowen LL, Agarwal S. Autoregulation of periodontal ligament cell phenotype and functions by transforming growth factor-beta1. *J Dent Res.* 1998;77(10):1779-90.
- Buschmann MD, Gluzband YA, Grodzinsky AJ, Hunziker EB. Mechanical compression modulates matrix biosynthesis in chondrocyte/agarose culture. *J Cell Sci.* 1995;108 (Pt 4):1497-508.
- Chiba M, Mitani H. Cytoskeletal changes and the system of regulation of alkaline phosphatase activity in human periodontal ligament cells induced by mechanical stress. *Cell Biochem Funct.* 2004;22(4):249-56.
- Chiquet M, Renedo AS, Huber F, Flück M. How do fibroblasts translate mechanical signals into changes in extracellular matrix production? *Matrix Biol.* 2003;22(1):73-80.
- Davidovitch Z, Nicolay OF, Ngan PW, Shanfeld JL. Neurotransmitters, cytokines, and the control of alveolar bone remodeling in orthodontics. *Dent Clin North Am.* 1988;32(3):411-35.
- Enokiya Y, Hashimoto S, Muramatsu T, Jung HS, Tazaki M, Inoue T, Abiko Y, Shimono M. Effect of stretching stress on gene transcription related to early-phase differentiation in rat periodontal ligament cells. *Bull Tokyo Dent Coll.* 2010;51(3):129-37.
- Giniger MS, Norton L, Sousa S, Lorenzo JA, Bronner F. A human periodontal ligament fibroblast clone releases a bone resorption inhibition factor in vitro. *J Dent Res.* 1991;70(2):99-101.

- Grabellus F, Worm K, Schmid KW. Induction of the matrix metalloproteinase-2 activation system in arteries by tensile stress. Involvement of the p38 MAP-kinase pathway. *Pathol Res Pract.* 2007;203(3):135-43.
- Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res.* 2000;15(1):2-12. Review.
- Husse B, Briest W, Homagk L, Isenberg G, Gekle M. Cyclical mechanical stretch modulates expression of collagen I and collagen III by PKC and tyrosine kinase in cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007;293(5):R1898-907.
- Jen CJ, Jhiang SJ, Chen HI. Invited review: effects of flow on vascular endothelial intracellular calcium signaling of rat aortas ex vivo. *J Appl Physiol.* 2000;89(4):1657-62; discussion 1656.
- Johnson RB. The bearable lightness of being: bones, muscles, and spaceflight. *Anat Rec.* 1998;253(1):24-7.
- Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H. Periodontal ligament cells under mechanical stress induce osteoclastogenesis by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand up-regulation via prostaglandin E2 synthesis. *J Bone Miner Res.* 2002;17(2):210-20.
- 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.* 2001;80(3):887-91.
- Kanzaki H, Chiba M, Sato A, Miyagawa A, Arai K, Nukatsuka S, Mitani H. Cyclical tensile force on periodontal ligament cells inhibits osteoclastogenesis through OPG induction. *J Dent Res.* 2006;85(5):457-62.
- Karsdal MA, Hjørth P, Henriksen K, Kirkegaard T, Nielsen KL, Lou H, Delaissé JM, Foged NT. Transforming growth factor-beta controls human osteoclastogenesis through the p38 MAPK and regulation of RANK expression. *J Biol Chem.* 2003;278(45):44975-87.
- Kletsas D, Basdra EK, Papavassiliou AG. Mechanical stress induces DNA synthesis in PDL fibroblasts by a mechanism unrelated to autocrine growth factor action. *FEBS Lett.* 1998;430(3):358-62.
- Lackler KP, Cochran DL, Hoang AM, Takacs V, Oates TW. Development of an in vitro wound healing model for periodontal cells. *J Periodontol.* 2000;71(2):226-37.
- Lekic P, McCulloch CA. Periodontal ligament cell population: the central role of fibroblasts in creating a unique tissue. *Anat Rec.* 1996;245(2):327-41.
- Li C, Xu Q. Mechanical stress-initiated signal transductions in vascular smooth muscle cells. *Cell Signal.* 2000;12(7):435-45.



- Liu M, Dai J, Lin Y, Yang L, Dong H, Li Y, Ding Y, Duan Y. Effect of the cyclic stretch on the expression of osteogenesis genes in human periodontal ligament cells. *Gene*. 2012;491(2):187-93.
- Liu SQ. Influence of tensile strain on smooth muscle cell orientation in rat blood vessels. *J Biomech Eng*. 1998;120(3):313-20.
- Luckprom P, Wongkhantee S, Yongchaitrakul T, Pavasant P. Adenosine triphosphate stimulates RANKL expression through P2Y1 receptor-cyclo-oxygenase-dependent pathway in human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res*. 2010;45(3):404-11.
- Magid R, Murphy TJ, Galis ZS. Expression of matrix metalloproteinase-9 in endothelial cells is differentially regulated by shear stress. Role of c-Myc. *J Biol Chem*. 2003;278(35):32994-9.
- Matsuda N, Yokoyama K, Takeshita S, Watanabe M. Role of epidermal growth factor and its receptor in mechanical stress-induced differentiation of human periodontal ligament cells in vitro. *Arch Oral Biol*. 1998;43(12):987-97.
- Michalopoulos E, Knight RL, Korossis S, Kearney JN, Fisher J, Ingham E. Development of methods for studying the differentiation of human mesenchymal stem cells under cyclic compressive strain. *Tissue Eng Part C Methods*. 2012;18(4):252-62.
- Mikuni-Takagaki Y. Mechanical responses and signal transduction pathways in stretched osteocytes. *J Bone Miner Metab*. 1999;17(1):57-60.
- Morinobu M, Ishijima M, Rittling SR, Tsuji K, Yamamoto H, Nifuji A, Denhardt DT, Noda M. Osteopontin expression in osteoblasts and osteocytes during bone formation under mechanical stress in the calvarial suture in vivo. *J Bone Miner Res*. 2003;18(9):1706-15.
- Murakami Y, Kojima T, Nagasawa T, Kobayashi H, Ishikawa I. Novel isolation of alkaline phosphatase-positive subpopulation from periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontol*. 2003;74(6):780-6.
- Natali AN, Pavan PG, Scarpa C. Numerical analysis of tooth mobility: formulation of a non-linear constitutive law for the periodontal ligament. *Dent Mater*. 2004;20(7):623-9.
- Nguyen TD, Liang R, Woo SL, Burton SD, Wu C, Almarza A, Sacks MS, Abramowitch S. Effects of cell seeding and cyclic stretch on the fiber remodeling in an extracellular matrix-derived bioscaffold. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(4):957-63.
- Nokhbehsaim M, Deschner B, Winter J, Reimann S, Bourauel C, Jepsen S, Jäger A, Deschner J. Contribution of orthodontic load to inflammation-mediated periodontal destruction. *J Orofac Orthop*. 2010;71(6):390-402.
- O'Callaghan CJ, Williams B. Mechanical strain-induced extracellular matrix production by human vascular smooth muscle cells: role of TGF-beta(1). *Hypertension*. 2000;36(3):319-24.

- Ogiso B, Hughes FJ, Melcher AH, McCulloch CA. Fibroblasts inhibit mineralised bone nodule formation by rat bone marrow stromal cells in vitro. *J Cell Physiol.* 1991;146(3):442-50.
- Ogiso B, Hughes FJ, Davies JE, McCulloch CA. Fibroblastic regulation of osteoblast function by prostaglandins. *Cell Signal.* 1992;4(6):627-39.
- Ozaki S, Kaneko S, Podyma-Inoue KA, Yanagishita M, Soma K. Modulation of extracellular matrix synthesis and alkaline phosphatase activity of periodontal ligament cells by mechanical stress. *J Periodontal Res.* 2005;40(2):110-7.
- Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(3):221-33.
- Palumbo R, Gaetano C, Melillo G, Toschi E, Remuzzi A, Capogrossi MC. Shear stress downregulation of platelet-derived growth factor receptor-beta and matrix metalloprotease-2 is associated with inhibition of smooth muscle cell invasion and migration. *Circulation.* 2000;102(2):225-30.
- Pauwels F. A new theory concerning the influence of mechanical stimuli in the differentiation of supporting tissues. *Biomech Locomotor Apparatus.* 1980;375: 458.
- Pavlin D, Gluhak-Heinrich J. Effect of mechanical loading on periodontal cells. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2001;12(5):414-24.
- Pini M, Zysset P, Botsis J, Contro R. Tensile and compressive behaviour of the bovine periodontal ligament. *J Biomech.* 2004;37(1):111-9.
- Rubin J, Rubin C, Jacobs CR. Molecular pathways mediating mechanical signaling in bone. *Gene.* 2006;367:1-16.
- Shimizu N, Ozawa Y, Yamaguchi M, Goseki T, Ohzeki K, Abiko Y. Induction of COX-2 expression by mechanical tension force in human periodontal ligament cells. *J Periodontol* 1998;69:670-7.
- Shuttleworth CA, Smalley JW. Periodontal ligament. *Int Rev Connect Tissue Res* 1983;10:211-247.
- Takayama S, Murakami S, Miki Y, Ikezawa K, Tasaka S, Terashima A, Asano T, Okada H. Effects of basic fibroblast growth factor on human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res.* 1997;32(8):667-75.
- Tang N, Zhao Z, Zhang L, Yu Q, Li J, Xu Z, Li X. Up-regulated osteogenic transcription factors during early response of human periodontal ligament stem cells to cyclic tensile strain. *Arch Med Sci.* 2012;8(3):422-30.
- Tsuji K, Uno K, Zhang GX, Tamura M. Periodontal ligament cells under intermittent tensile stress regulate mRNA expression of osteoprotegerin and tissue inhibitor of matrix metalloprotease-1 and -2. *J Bone Miner Metab.* 2004;22(2):94-103.

- Udagawa N, Kotake S, Kamatani N, Takahashi N, Suda T. The molecular mechanism of osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 2002;4(5):281-9. Review.
- Udagawa N. Mechanisms involved in bone resorption. *Biogerontology.* 2002;3(1-2):79-83. Review.
- Varghese S. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in bone: an overview of regulation and functions. *Front Biosci.* 2006;11:2949-66.
- Wang P, Yang L, You X, Singh GK, Zhang L, Yan Y, Sung KL. Mechanical stretch regulates the expression of matrix metalloproteinase in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Connect Tissue Res.* 2009;50(2):98-109.
- Wescott DC, Pinkerton MN, Gaffey BJ, Beggs KT, Milne TJ, Meikle MC. Osteogenic gene expression by human periodontal ligament cells under cyclic tension. *J Dent Res.* 2007;86(12):1212-6.
- Wongkhantee S, Yongchaitrakul T, Pavasant P. Mechanical stress induces osteopontin expression in human periodontal ligament cells through rho kinase. *J Periodontol.* 2007;78(6):1113-9.
- Wongkhantee S, Yongchaitrakul T, Pavasant P. Mechanical stress induces osteopontin via ATP/P2Y1 in periodontal cells. *J Dent Res.* 2008;87(6):564-8.
- Yamaguchi M, Shimizu N, Goseki T, Shibata Y, Takiguchi H, Iwasawa T, Abiko Y. Effect of different magnitudes of tension force on prostaglandin E2 production by human periodontal ligament cells. *Arch Oral Biol.* 1994;39(10):877-84.
- Yamaguchi M, Aihara N, Kojima T, Kasai K. RANKL increase in compressed periodontal ligament cells from root resorption. *J Dent Res.* 2006;85(8):751-6.
- Yamamoto T, Kita M, Kimura I, Oseko F, Terauchi R, Takahashi K, Kubo T, Kanamura N. Mechanical stress induces expression of cytokines in human periodontal ligament cells. *Oral Dis.* 2006;12(2):171-5.
- Yamane T, Mitsumata M, Yamaguchi N, Nakazawa T, Mochizuki K, Kondo T, Kawasaki T, Murata S, Yoshida Y, Katoh R. Laminar high shear stress up-regulates type IV collagen synthesis and down-regulates MMP-2 secretion in endothelium. A quantitative analysis. *Cell Tissue Res.* 2010;340(3):471-9.
- Yang CM, Chien CS, Yao CC, Hsiao LD, Huang YC, Wu CB. Mechanical strain induces collagenase-3 (MMP-13) expression in MC3T3-E1 osteoblastic cells. *J Biol Chem.* 2004;279(21):22158-65.
- Yoshino H, Morita I, Murota SI, Ishikawa I. Mechanical stress induces production of angiogenic regulators in cultured human gingival and periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontal Res.* 2003;38(4):405-10.
- You J, Reilly GC, Zhen X, Yellowley CE, Chen Q, Donahue HJ, Jacobs CR. Osteopontin gene regulation by oscillatory fluid flow via intracellular calcium mobilization and activation of

- mitogen-activated protein kinase in MC3T3-E1 osteoblasts. *J Biol Chem.* 2001;276(16):13365-71.
- Zheng L, Huang Y, Song W, Gong X, Liu M, Jia X, Zhou G, Chen L, Li A, Fan Y. Fluid shear stress regulates metalloproteinase-1 and 2 in human periodontal ligament cells: Involvement of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and P38 signaling pathways. *J Biomech.* 2012 Aug 2. [Epub ahead of print]
- Zhou D, Lee HS, Villarreal F, Teng A, Lu E, Reynolds S, Qin C, Smith J, Sung KL. Differential MMP-2 activity of ligament cells under mechanical stretch injury: an in vitro study on human ACL and MCL fibroblasts. *J Orthop Res.* 2005;23(4):949–57.
- Ziegler N, Alonso A, Steinberg T, Woodnutt D, Kohl A, Müssig E, Schulz S, Tomakidi P. Mechano-transduction in periodontal ligament cells identifies activated states of MAP-kinases p42/44 and p38-stress kinase as a mechanism for MMP-13 expression. *BMC Cell Biol.* 2010;11:10.

## ประวัติคณะผู้วิจัย

### 1. นางนীরชา สารชวณะกิจ

Mrs Neeracha Sanchavanakit

ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์

หน่วยงาน ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทร. 02-218-8885 โทรสาร 02-218-8870 E-mail: [sneeracha@yahoo.com](mailto:sneeracha@yahoo.com)

ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขา	ปี พ.ศ. ที่จบ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ท.บ.	ทันตแพทยศาสตร์	2537
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วท.ด.	ชีววิทยาช่องปาก	2544

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ Cell Biology

### 2. นายประสิทธิ์ ภูวสันต์

Mr. Prasit Pavasant

ตำแหน่งปัจจุบัน ศาสตราจารย์

หน่วยงาน ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทร. 02-218-8885 โทรสาร 02-218-8870 E-mail: [prasit215@gmail.com](mailto:prasit215@gmail.com)

ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขา	ปี พ.ศ. ที่จบ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ท.บ.	ทันตแพทยศาสตร์	2528
Georgetown University	PhD	Cell Biology	2538

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ Cell biology

### 3. นางสาวปิยมาศ สำเร็จกาญจนกิจ

Ms. Piyamas Sumrejkanchanakij

ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์

หน่วยงาน ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทร. 02-218-8885 โทรสาร 02-218-8870 E-mail: [piyamas.s@chula.ac.th](mailto:piyamas.s@chula.ac.th)

ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขา	ปี พ.ศ. ที่จบ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ท.บ.	ทันตแพทยศาสตร์	2538
Tokyo Medical and Dental University	Ph.D.	Developmental Biology	2545

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ Cell biology, Cell cycle control