

การแสดงผลของไฮโดรออกซีจีเนส
รีเซปเตอร์แอคติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์ และออสทีโอโปรเทจรีน
ในเซลล์กระดูกเข้าพินมนุษย์เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาทันตกรรมคลินิก (วิทยาเอ็นโดดอนต์)

กันยายน 2560

การแสดงผลของไฮโดรออกซีจีน
รีเซปเตอร์แอดิเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์ และออกซีไอโปรเทจรีน
ในเซลล์กระดูกเข้าพินมนุษย์เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์



ปริญญาานิพนธ์
ของ
พีรรัตน์ หลีกาพันธ์

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาทันตกรรมคลินิก(วิทยาเอ็นโดดอนต์)

กันยายน 2560

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การแสดงออกของไซโคลออกซีจีเนส
รีเซปเตอร์แอคติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์ และออสทีโอโปรเทจรีน
ในเซลล์กระดูกเข้าพินมนุษย์เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาทันตกรรมคลินิก (วิทยาเอ็นโดดอนต์)

กันยายน 2560

พีรรัตน์ หลีกาพันธ์. (2560). การแสดงออกของไซโคลออกซีจีเนสของ รีเซปเตอร์แอดิเวเตอร์ออฟ นิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์ และออสทีโอโปรเทจรีนในเซลล์กระดูกเข้าพันมนุษย์ เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ ปริณูยานิพนธ์ วท.ม.ทันตกรรมคลินิก (วิทยาเอ็นโดดอนต์). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.
อาจารย์ที่ปรึกษาปริณูยานิพนธ์ : รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร. นิรดา ธเนศวร.

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษามลของไลโปโพลีแซคคาไรด์ ต่อการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอของไซโคลออกซีจีเนสของ รีเซปเตอร์แอดิเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์ และออสทีโอโปรเทจรีนในเซลล์กระดูกเข้าพันมนุษย์

วิธีดำเนินการวิจัย ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์จากกระดูกเข้าพันมนุษย์ในอาหารที่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้แปรสภาพเป็นเนื้อเยื่อแข็งเป็นเวลา 14 วัน จากนั้นแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มคือกลุ่มที่ 1 คือกลุ่มควบคุมไม่ได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ กลุ่มที่ 2 ได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ กลุ่มที่ 3 ได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการสกัดอาร์เอ็นเอและศึกษาการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอของไซโคลออกซีจีเนสของ รีเซปเตอร์แอดิเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์ และออสทีโอโปรเทจรีนด้วยวิธีเรียลไทม์พีซีอาร์

ผลการวิจัย เมื่อเซลล์กระดูกเข้าพันมนุษย์ได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ จะพบการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอของไซโคลออกซีจีเนส และรีเซปเตอร์แอดิเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์เพิ่มขึ้น แต่การแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอของออสทีโอโปรเทจรีนลดลง และพบสัดส่วนการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอของรีเซปเตอร์แอดิเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์ต่อออสทีโอโปรเทจรีนเพิ่มขึ้นตามปริมาณความเข้มข้นของไลโปโพลีแซคคาไรด์

บทสรุป ภายใต้สภาวะการศึกษาวิจัยในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าไลโปโพลีแซคคาไรด์สามารถกระตุ้นเซลล์กระดูกเข้าพันมนุษย์ให้มีการแสดงออกของไซโคลออกซีจีเนสและรีเซปเตอร์แอดิเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์เพิ่มขึ้น ในขณะที่มีผลลดการแสดงออกของออสทีโอโปรเทจรีน

STUDY OF CYCLOOXYGENASE-2, RECEPTOR ACTIVATOR OF NUCLEAR FACTOR
KAPPA-B LIGAND AND OSTEOPROTEGERIN IN HUMAN ALVEOLAR BONE CELLS
IN RESPONSE TO LIPOPOLYSACCHARIDE STIMULATION.



Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Master of Science Degree in Clinical Dentistry
at Srinakharinwirot University

September 2017

Peerarat Leekhaphan. (2017). Study of Cyclooxygenase-2 Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand and Osteoprotegerin in Human Alveolar Bone Cells in Response to Lipopolysaccharide Stimulation. Master's thesis, M.Sc. Clinical Dentistry (Endodontics). Bangkok : Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Associate Professor Dr. Nirada Dhanesuan.

Objectives: To examine mRNA expression of Cyclooxygenase - 2 (COX-2), Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand (RANKL) and Osteoprotegerin (OPG) in human alveolar bone cells stimulated by Lipopolysaccharide (LPS).

Material and methods: Three lines of human alveolar bone cells were cultured in osteogenic media for fourteen days and then divided into three groups; 1) control group with no LPS stimulation, 2) treated with LPS at concentration of 0.5 ug/ml, and 3) treated with LPS at concentration of 5 ug/ml in the culture for forty eight hours. RNA was then extracted and RNA expression of COX-2, RANKL and OPG were performed by real-time PCR.

Results: Upon stimulation by LPS, the expression of COX-2 and RANKL in human alveolar bone cells were increased, whereas the expression of OPG was decreased. It was also found that the ratio of RANKL/OPG was increased, with the dosage dependent on LPS stimulation.

Conclusions: The present findings suggested that COX-2 and RANKL expression were up-regulated, whereas OPG expression was down-regulated in response to stimulation by LPS.

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การแสดงออกของไซโคลออกซิจีเนสทู รีเซปเตอร์แอคติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบี
ไลแกนด์และออสทีโอโปรเทจริน ในเซลล์กระดูกบ้ำฟันมนุษย์
เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์

ของ

พีรรัตน์ หลีกาพันธ์

ได้รับการอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาทันตกรรมคลินิก(วิทยาเอ็นโดดอนต์)
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

.....ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ทพญ. ดร. นිරดา ธเนศวร)

.....ประธาน
(อาจารย์ ทพญ.ดร. จารุมา ศักดิ์ดี)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ทพญ.ดร. นිරดา ธเนศวร)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทพญ.ดร. ชุติมา ระติสุนทร)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาและคำแนะนำจากคณาจารย์หลายท่าน ความร่วมมือจากผู้ช่วย รวมทั้งความช่วยเหลือ จากบุคลากรในห้องปฏิบัติการ ผู้วิจัยมีความทราบซึ่ง และขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร. นีรดา ธเนศวร อาจารย์ผู้ควบคุม ปริญญานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง อินทรา วงศ์เยาว์ฟ้า ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ รวมทั้งชี้แนะแนวทางในขั้นตอนการทำวิจัยของข้าพเจ้าอย่างยิ่ง

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทันตแพทย์หญิง ดร. มานีสา ศรีชลเพชร ภาควิชาศัลยศาสตร์ ช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่กรุณาให้คำแนะนำในการใช้ เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆในการศึกษาวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทันตแพทย์ กิตติวัตร กิตติเรือพัชร ภาควิชาศัลยศาสตร์ช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้ความกรุณาในการเก็บกระดูกตัวอย่างในการศึกษาวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร. ชุติมา ระติสุนทร และ อาจารย์ทันตแพทย์หญิง ดร. จารุมา ศักดิ์ดี ที่ให้ความกรุณาร่วมเป็นกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ ตลอดจนให้คำแนะนำและข้อเสนอแนะต่างๆ รวมทั้งให้ความกรุณาตรวจแก้ไขปริญญานิพนธ์ ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาโอบุรุษวิทยา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒทุกท่านที่อำนวยความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการและอุปกรณ์ที่จำเป็นในการศึกษาวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ผู้เป็นที่รักยิ่ง ที่คอยสนับสนุนและเป็นกำลังใจที่ดีตลอดมา จนสำเร็จการศึกษา

พีรรัตน์ หลีกาพันธ์

สารบัญ

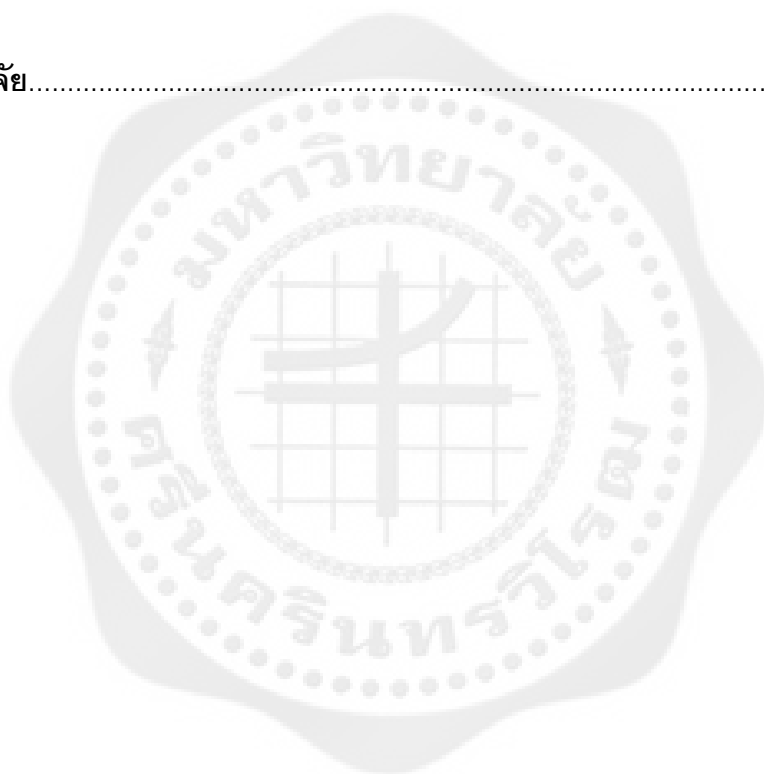
บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง.....	2
คำถามวิจัย.....	4
ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	4
ความสำคัญของการวิจัย.....	4
ขอบเขตของการวิจัย.....	5
ตัวแปรที่ศึกษา.....	5
นิยามศัพท์เฉพาะ.....	6
กรอบแนวคิดการวิจัย.....	6
สมมุติฐานการวิจัย.....	7
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	8
ไลโปโพลีแซคคาไรด์.....	8
ไซโคลออกซิจีเนสและพรอสตาแกลนดินอื่นๆ.....	10
ขบวนการสร้างเซลล์สลายกระดูกที่เกี่ยวข้องกับวิถีสัญญาณรีเซปเตอร์แอกติ เวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบี รีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิว เคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์และออสทีโอโปรเทจรีน (RANK-RANKL-OPG dependent pathway).....	11
ขบวนการสร้างเซลล์สลายกระดูกที่ไม่เกี่ยวข้องกับวิถีสัญญาณรีเซปเตอร์แอกติ เวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบี รีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์ แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์และออสทีโอโปรเทจรีน (RANKL-OPG dependent pathway).....	16
ความแตกต่างของเซลล์จากกระดูกเข้าพินมนุษย์และเซลล์กระดูกมนุษย์ ในตำแหน่งอื่น.....	18

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	19
การกำหนดกลุ่มตัวอย่าง.....	19
การเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกเบาพันธุ์.....	19
การเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้แปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง.....	20
การทดสอบความสามารถในการสะสมแร่ธาตุในจานเลี้ยง.....	20
การทดสอบความสามารถในการตกตะกอนแคลเซียมในจานเลี้ยง.....	21
การทดสอบตัวบ่งชี้จำเพาะของเซลล์สร้างกระดูกด้วยฮอสทีโอแคลซิน.....	21
การเตรียมไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเอสเชอริเชีย โคไล.....	21
การกระตุ้นเซลล์กระดูกเบาพันธุ์ด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้แปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง.....	22
วิเคราะห์การแสดงออกของไซโคลออกซีจีเนสทู รีเซปเตอร์แอคติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์ และฮอสทีโอโปรทีจรีนด้วยวิธีเรียลไทม์โพลีเมอร์เชนรีแอคชัน.....	22
การวิเคราะห์ข้อมูล.....	24
4 ผลการวิจัย.....	25
การสะสมแร่ธาตุและการตกตะกอนแคลเซียม.....	26
การแสดงออกของฮอสทีโอแคลซิน.....	27
ผลของไลโปโพลีแซคคาไรด์ต่อการแสดงออกของไซโคลออกซีจีเนสทู.....	28
ผลของไลโปโพลีแซคคาไรด์ต่อการแสดงออกของรีเซปเตอร์แอคติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์.....	29
ผลของไลโปโพลีแซคคาไรด์ต่อการแสดงออกของฮอสทีโอโปรทีจรีน.....	30
ผลของไลโปโพลีแซคคาไรด์ต่อการแสดงออกของรีเซปเตอร์แอคติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์ต่อฮอสทีโอโปรทีจรีน.....	31

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
5 อภิปรายผลและบทสรุป.....	32
อภิปรายผล.....	33
บทสรุป.....	41
บรรณานุกรม.....	42
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	52



บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 แสดงโปรแกรมของไซโคลออกซิจีเนสซูรีเทปเตอร์แอดติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์ แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนค์ ออสทีโอโปรเทจรีน และจีเอพีดีเอช.....	23
2 แสดงแหล่งที่มาของเซลล์กระดูกเข้าฟันจากผู้ป่วยที่มารับการผ่าฟันคุด.....	25



บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ

หน้า

1	แสดงขอบเขตการพัฒนาของเซลล์สลายกระดูกผ่านระบบการปฏิสัมพันธ์ระหว่างรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์และออสทีโอโปรเทจรีน.....	2
2	แสดงบทบาทของไลโปโพลีแซคคาไรด์ต่อการเกิดการละลายกระดูก.....	9
3	โครงสร้างของรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์.....	12
4	โครงสร้างของออสทีโอโปรเทจรีน.....	13
5	โครงสร้างของรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบี.....	13
6	แสดงการส่งสัญญาณภายในเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สลายกระดูกในขอบเขตการสร้างเซลล์สลายกระดูก.....	13
7	แสดงบทบาทของรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์ออสทีโอโปรเทจรีนในสภาวะปกติและสภาวะเกิดการอักเสบ.....	14
8	แสดงบทบาทหน้าที่ของรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์และออสทีโอโปรเทจรีนในขอบเขตการสร้างเซลล์สลายกระดูก.....	15
9	แสดงผลการทดสอบการสะสมแร่ธาตุและการตกตะกอนแคลเซียมของเซลล์กระดูกเข้าพื้นมนุษย์ 3 โหลน์ โดยการยับยั้งอะลิซารินเรดเอสและอัลคาไลด์ฟอสฟาเตส.....	26
10	กราฟแท่งแสดงสัดส่วนการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอของออสทีโอแคลซิน.....	27
11	กราฟแท่งแสดงสัดส่วนการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอของไซโคลออกซีจีเนสทู.....	28
12	กราฟแท่งแสดงสัดส่วนการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอของรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์.....	29
13	กราฟแท่งแสดงสัดส่วนการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอของออสทีโอโปรเทจรีน.....	30
14	กราฟแท่งแสดงสัดส่วนการแสดงออกของรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์ต่อออสทีโอโปรเทจรีน.....	31

บทที่ 1

บทนำ

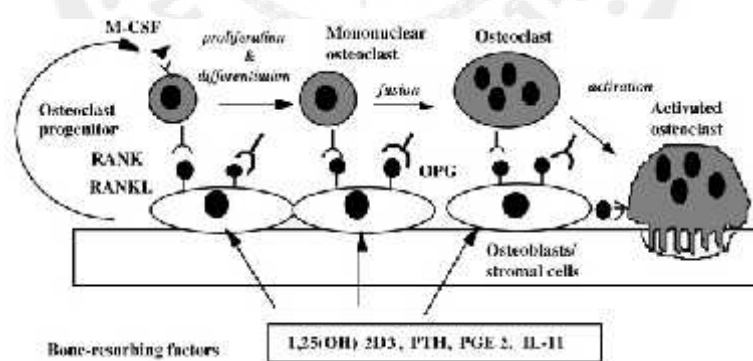
ภูมิหลัง

การอักเสบของเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟัน (Periapical inflammation) คือ กลไกการเกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เพื่อต่อต้านสิ่งระคายเคืองที่อยู่ภายในระบบคลองรากฟัน ป้องกันการรุกรานจากสิ่งระคายเคืองหรือสิ่งแปลกปลอมต่างๆ ที่สามารถจะก่อให้เกิดอันตรายกับเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟัน^(1, 2) โดยสิ่งระคายเคืองที่เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการตอบสนองดังกล่าว คือ การติดเชื้อจุลชีพภายในระบบคลองรากฟัน ; าจถือได้ว่าการอักเสบของเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟัน เป็นปฏิกริยาระหว่างเชื้อจุลชีพกับการตอบสนองของร่างกาย^(3, 4) สิ่งระคายเคืองจากเชื้อจุลชีพที่มีบทบาทสำคัญในการก่อให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน คือ ไลโปโพลีแซคคาไรด์ (Lipopolysaccharide: LPS) ซึ่งจัดเป็นปัจจัยที่มีความรุนแรง (Virulence factor) โดยเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบ ไลโปโพลีแซคคาไรด์นั้นจะไปกระตุ้นให้เกิดการหลั่งของไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (Proinflammatory cytokines) เช่น อินเตอร์ลิวคิน-1 (Interleukin-1: IL-1) ทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์แอลฟา (Tumor necrosis factor alpha : TNF- α) รวมทั้งสารตัวกลางที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น พรอสตาแกลนดินอี₂ (Prostaglandin E₂) ก่อให้เกิดการกระตุ้นขบวนการสร้างเซลล์สลายกระดูก (Osteoclastogenesis) และเกิดการละลายของกระดูกรอบปลายรากฟันตามมา^(1, 2, 4, 5)

ไซโคลออกซีจีเนสทู (Cyclooxygenase-2) คือ เอนไซม์สำคัญในการผลิตพรอสตาแกลนดิน ซึ่งเป็นสารตัวกลางที่มีผลทำให้เกิดกระบวนการอักเสบ อาการปวด การละลายของกระดูกและเกิดพยาธิสภาพของรอยโรครอบปลายรากฟัน^(2, 6) กลุ่มของพรอสตาแกลนดินที่พบมากและมีบทบาทสำคัญในการเกิดการอักเสบ คือ พรอสตาแกลนดินอี₂ (Prostaglandins E₂) เมื่อเกิดการอักเสบจะพบการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ไซโคลออกซีจีเนสทู ทำให้มีการผลิตพรอสตาแกลนดินอี₂เพิ่มมากขึ้น⁽⁷⁾

กระบวนการละลายของกระดูกรอบปลายรากฟันเมื่อเกิดการอักเสบ เกิดจากการทำหน้าที่ของเซลล์สลายกระดูก โดยเซลล์สลายกระดูกจะทำหน้าที่ได้ต้องมีปัจจัยกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์

ต้นกำเนิดของเซลล์สลายกระดูก (Osteoclast precursor cells) ให้มีการพัฒนามาเป็น เซลล์สลายกระดูกเจริญเต็มที่ (Mature osteoclasts) ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว คือ ไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น อินเตอร์ลิวคิน-1 อินเตอร์ลิวคิน-6 อินเตอร์ลิวคิน-8 ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์แอลฟา โนตริกออกไซด์ รวมทั้งพรอสตาแกลนดินอื่นๆ โดยจะเกิดขึ้นจาก กระบวนการตอบสนองของร่างกายเมื่อมีการอักเสบของเนื้อเยื่อในและเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟัน ปัจจัยดังกล่าวจะทำให้เกิดการพัฒนาของเซลล์สลายกระดูกโดยตรง⁽⁸⁾ หรือ กระตุ้นการพัฒนาของ เซลล์สลายกระดูกโดยผ่านการตอบสนองจากเซลล์สร้างกระดูก โดยมีปัจจัยที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ วิตามินดี อินเตอร์ลิวคิน-11 พาราไธรอยด์โฮโมน และ พรอสตาแกลนดินอื่นๆ⁽⁹⁾ ซึ่งการกระตุ้นผ่านเซลล์สร้าง กระดูกนั้นต้องอาศัยระบบการปฏิสัมพันธ์ระหว่างรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์ แคปปาบีไลแกนด (Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand: RANKL) ที่ผลิตและ แสดงออกบนเซลล์สร้างกระดูกกับรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบี (Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B: RANK) ที่อยู่บนเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สลายกระดูก ส่งผล ให้เกิดการเรียกเข้ามา (Recruitment) การเปลี่ยนสภาพเซลล์ (Cell differentiation) การกระตุ้นการ ทำงาน(Activation) และการมีชีวิตรอด (Survival) ของเซลล์สลายกระดูก เพื่อจะทำหน้าที่สลายกระดูก ต่อไป^(3, 9-12) ดังภาพประกอบ 1



ภาพประกอบ 1 แสดงขบวนการพัฒนาของเซลล์สลายกระดูกผ่านระบบการปฏิสัมพันธ์ระหว่าง รีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบี รีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์ แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด และออสทีโอโปรเทจรีน⁽¹³⁾

ในขณะเดียวกันเซลล์สร้างกระดูกเองยังสามารถสร้างออสทีโอโปรเทจรีน(Osteoprotegerin) เมื่อได้รับการกระตุ้นจากไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น อินเตอร์ลิวคิน-1-แอลฟา

อินเตอร์ลิวคิน-1 เบตา ทุเมอร์แนคโครซิสแฟกเตอร์แอลฟา และทุเมอร์แนคโครซิสแฟกเตอร์เบตา⁽¹⁴⁾ ซึ่งออสทีโอโปรเทจรีนที่สร้างขึ้นมานั้น มีบทบาทในการยับยั้งการเปลี่ยนสภาพ การเจริญเต็มที่ และการทำหน้าที่ของเซลล์สลายกระดูก^(11, 12, 15) โดยไปแย่งจับกับรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนดเพื่อขัดขวางการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนดกับรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนดให้เกิดการยับยั้งการเปลี่ยนสภาพของเซลล์สลายกระดูก และลดการสลายของกระดูกได้^(14, 16-18)

นอกจากการศึกษาในห้องปฏิบัติการแล้ว ยังมีการศึกษาทางคลินิกในมนุษย์ พบว่าภายในรอยโรครอบปลายรากฟันที่มีการอักเสบแบบเฉียบพลันสามารถตรวจพบปริมาณพรอสตาแกลนดินอีทูมากกว่ารอยโรคที่มีการอักเสบเรื้อรัง⁽¹⁹⁾ และพบว่าพรอสตาแกลนดินอีทูมีความสัมพันธ์กับอาการปวดที่เกิดขึ้นเอง (spontaneous pain) การเคาะเจ็บ (sensitive to percussion) รวมทั้งขนาดของรอยโรครอบปลายรากฟัน⁽²⁰⁾ นอกจากนี้ยังสามารถตรวจพบรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกน ภายในเนื้อเยื่ออักเสบรอบปลายรากฟันของมนุษย์ที่มีการละลายของของกระดูกรอบปลายรากฟันอีกด้วย^(21, 22)

การศึกษาที่ผ่านมายังไม่มีการศึกษาที่ศึกษาในเซลล์กระดูกที่ได้จากกระดูกบ้ำฟันมนุษย์เกี่ยวกับผลของไลโปโพลีแซคคาไรด์ต่อการแสดงออกของไซโคลออกซิจีเนสทู รีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนดและออสทีโอโปรเทจรีน ซึ่งการศึกษาในสัตว์ทดลอง หรือในเซลล์สำเร็จรูป (Cell line) ที่ผ่านมานั้นยังไม่แน่ชัดว่า การเกิดขบวนการสร้างเซลล์สลายกระดูก เพื่อทำหน้าที่ละลายกระดูกรอบปลายรากฟันนั้น เกี่ยวข้องกับรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนดและออสทีโอโปรเทจรีนที่สร้างจากเซลล์สร้างกระดูก หรือสามารถเกิดกระบวนการสร้างเซลล์สลายกระดูกได้โดยตรง โดยไม่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณผ่านเซลล์สร้างกระดูก และหากต้องอาศัยการส่งสัญญาณผ่านเซลล์สร้างกระดูก จะมีความเกี่ยวข้องกับไซโคลออกซิจีเนสทูหรือไม่ จึงทำให้ผู้วิจัยมีความสนใจที่ศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับผลของไลโปโพลีแซคคาไรด์ต่อการแสดงออกของไซโคลออกซิจีเนสทู รีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนดและออสทีโอโปรเทจรีนจากเซลล์กระดูกที่ได้จากกระดูกบ้ำฟันมนุษย์

คำถามวิจัย

เมื่อเซลล์กระดูกที่ได้จากกระดูกเข้าพื้นมนุษย์ ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ มีผลต่อการแสดงออกของไซโคลออกซีจีเนสทู รีเซปเตอร์แอดิเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์และฮอสทีโอโปรเทจรินหรือไม่

ความมุ่งหมายของการวิจัย

เพื่อทำการศึกษาในห้องปฏิบัติการ ถึงผลของไลโปโพลีแซคคาไรด์ต่อการแสดงออกของไซโคลออกซีจีเนสทู รีเซปเตอร์แอดิเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์ และฮอสทีโอโปรเทจรินในเซลล์กระดูกที่ได้จากกระดูกเข้าพื้นมนุษย์

ความสำคัญของการวิจัย

เมื่อเกิดการติดเชื้อจุลชีพในระบบคลองรากฟัน เชื้อจุลชีพและพิษจากเชื้อนั้นๆจะกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย มีการหลั่งของไซโตไคน์อักเสบต่างๆขึ้นมา เช่น อินเตอร์ลิวคิน-1 อินเตอร์ลิวคิน-6 และทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ นอกจากนี้ยังพบว่าไลโปโพลีแซคคาไรด์ซึ่งจัดเป็นปัจจัยที่มีความรุนแรงของเชื้อจุลชีพ มีส่วนสำคัญในการกระตุ้นให้ร่างกายสร้างไซโคลออกซีจีเนสทูและผลิตพรอสตาแกลนดินอื่นๆ ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่ออาการทางคลินิก การอักเสบของเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟันและการละลายของกระดูกรอบปลายรากฟัน จากการทำหน้าที่ของเซลล์สลายกระดูก ซึ่งเซลล์สลายกระดูกจะทำหน้าที่ดังกล่าวได้ ต้องอาศัยการติดต่อสื่อสารระหว่างเซลล์สร้างกระดูกและเซลล์สลายกระดูกโดยผ่านโปรตีนที่เซลล์สร้างกระดูกผลิตขึ้นมา เช่น รีเซปเตอร์แอดิเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์ และ ฮอสทีโอโปรเทจริน ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาอิทธิพลของไลโปโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อจุลชีพ ที่มีต่อไซโคลออกซีจีเนสทู รีเซปเตอร์แอดิเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์ และฮอสทีโอโปรเทจริน ซึ่งการศึกษาต่างๆ ที่ผ่านมาจะทำการศึกษาในเซลล์สำเร็จรูป ทั้งจากมนุษย์และสัตว์ทดลอง หรือ เซลล์กระดูกที่เพาะเลี้ยงได้จากสัตว์ทดลอง ส่วนการศึกษาในเซลล์กระดูกที่เพาะเลี้ยงได้จากกระดูกเข้าพื้นมนุษย์ยังมีไม่มากนัก ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะทำการศึกษามูลของไลโปโพลีแซคคาไรด์ ต่อการแสดงออกของไซโคลออกซีจีเนสทู

รีเซ็ปเตอร์แอดติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์ และ ออสทีโอโปรเทจรีนในเซลล์กระดูกเบาพันธ์มนุษย์ดังกล่าว ซึ่งน่าจะแสดงความชัดเจนและยังสะท้อนกลไกที่เกิดขึ้นบริเวณกระดูกรอบปลายรากฟันของมนุษย์ได้มากยิ่งขึ้น และอาจสามารถใช้พัฒนาแนวทางการตรวจวินิจฉัยโรคของเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟัน กระบวนการการรักษาคลองรากฟัน รวมทั้งสามารถเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับวัสดุต่างๆที่ใช้ในการรักษาคลองรากฟัน การซ่อมแซมรอยทะลุ และการอุดย่นปลายรากฟัน ซึ่งจะทำให้การรักษามีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น และลดการอักเสบของเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟันได้ ซึ่งสอดคล้องกับวัตถุประสงค์ของการรักษาคลองรากฟัน คือ ป้องกันและรักษาการเกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟันได้มากขึ้นด้วย

ขอบเขตของการวิจัย

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ เป็นการศึกษาวิจัยพื้นฐาน (Basic research) ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกจากกระดูกเบาพันธ์มนุษย์ เพื่อศึกษาการแสดงออกของไซโคลออกซิจีเนสทูรีเซ็ปเตอร์แอดติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์และออสทีโอโปรเทจรีน เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเอสเชอริเชีย โคไล

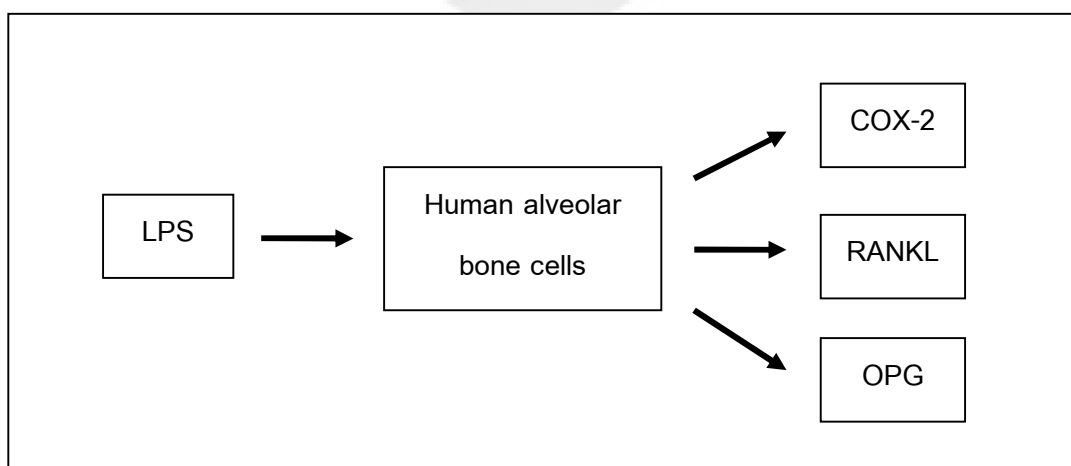
ตัวแปรที่ศึกษา

1. ตัวแปรอิสระ ได้แก่ ไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเอสเชอริเชีย โคไล
2. ตัวแปรตาม แบ่งเป็น
 - 2.1 ไซโคลออกซิจีเนสทูรี
 - 2.2 รีเซ็ปเตอร์แอดติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์
 - 2.3 ออสทีโอโปรเทจรีน

นิยามศัพท์เฉพาะ

1. Human alveolar bone cells หมายถึง เซลล์กระดูกเบาโพรงจมูก
2. Osteoblasts หมายถึง เซลล์สร้างกระดูก
3. Osteoclasts หมายถึง เซลล์สลายกระดูก
4. Lipopolysaccharide หมายถึง ไลโปโพลีแซคคาไรด์
5. Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand (RANKL) หมายถึง รีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์
6. Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B (RANK) หมายถึง รีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบี
7. Osteoprotegerin (OPG) หมายถึง ออสทีโอโปรเทจรีน
8. Cyclooxygenase-2 (COX-2) หมายถึง ไซโคลออกซีจีเนสทู
9. Prostaglandin E₂ (PGE₂) หมายถึง พรอสตาแกลนดินอีทู
10. Osteoclastogenesis หมายถึง ขบวนการสร้างเซลล์สลายกระดูก
11. Bone resorption หมายถึง การละลายกระดูก

กรอบแนวคิดการวิจัย



สมมติฐานการวิจัย

1. ไลโปโพลีแซคคาไรด์มีผลต่อการแสดงออกของไซโคลออกซีจีเนสทูจากเซลล์กระดูกที่ได้จากกระดูกเข้าฟันมนุษย์
2. ไลโปโพลีแซคคาไรด์มีผลต่อการแสดงออกของรีเซปเตอร์แอสติวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แพกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์จากเซลล์กระดูกที่ได้จากกระดูกเข้าฟันมนุษย์
3. ไลโปโพลีแซคคาไรด์มีผลต่อการแสดงออกของออสทีโอโปรเทจรีนจากเซลล์กระดูกที่ได้จากกระดูกเข้าฟันมนุษย์



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

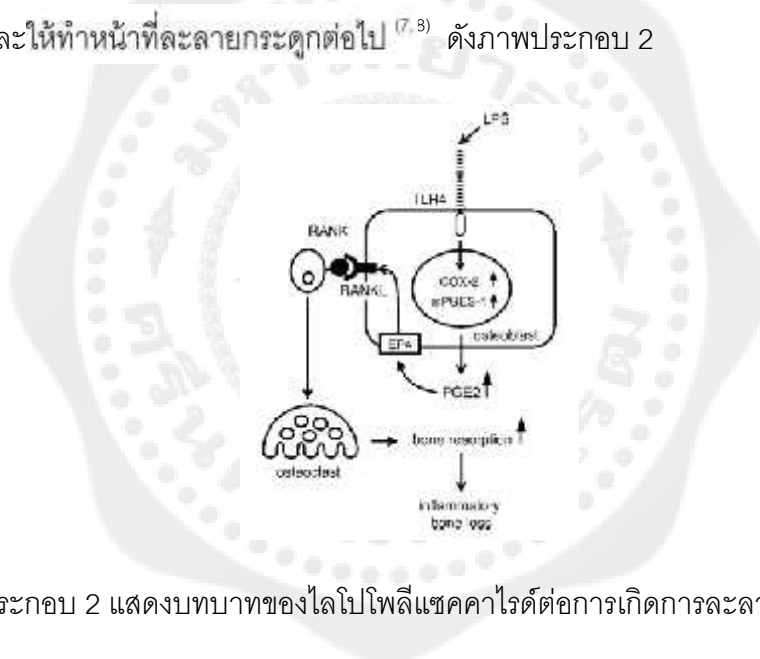
ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และได้นำเสนอตามหัวข้อต่อไปนี้

1. ไลโปโพลีแซคคาไรด์
2. ไชโคลออกซิจีเนสทู และพรอสตาแกลนดินอีทู
3. ขบวนการสร้างเซลล์กระดูก ที่เกี่ยวข้องกับวิถีสัญญาณรีเซปเตอร์แอคติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบี รีเซปเตอร์แอคติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด และออสทีโอโปรเทจรีน (RANK-RANKL-OPG dependent pathway)
4. ขบวนการสร้างเซลล์กระดูก ที่ไม่เกี่ยวข้องกับวิถีสัญญาณรีเซปเตอร์แอคติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบี รีเซปเตอร์แอคติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด และออสทีโอโปรเทจรีน (RANK-RANKL-OPG independent pathway)
5. ความแตกต่างของเซลล์จากกระดูกเบ้าฟันมนุษย์และเซลล์กระดูกมนุษย์ในตำแหน่งอื่น

ไลโปโพลีแซคคาไรด์

ไลโปโพลีแซคคาไรด์ คือ ปัจจัยที่มีความรุนแรง (Virulence factors) ที่พบได้ในเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มแกรมลบ ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มแกรมลบที่สำคัญที่มีความเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อในระบบคลองรากฟันและส่งผลให้เกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟัน คือ พอร์ไฟโรโมนาส เอนโดดอนทัลลิส (*Porphyromonas endodontalis*)^(1, 2) โดยจะพบว่าที่ผนังชั้นนอกของเซลล์จะประกอบด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งโมเลกุลของไลโปโพลีแซคคาไรด์นั้นจะมีด้านหนึ่งเป็นด้านที่ชอบน้ำ (Hydrophilic) อยู่ด้านนอกของผนังเซลล์ชั้นนอก เรียกว่า โอแอนติเจน (O-antigen) และมีแกนกลางเป็นโอลิโกแซคคาไรด์ (Oligosaccharide) ส่วนปลายอีกด้านเป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) จะอยู่ที่ด้านในของผนังเซลล์ชั้นนอก เรียกว่า ไลปิดเอ (Lipid-A)⁽³⁾ เมื่อมีการแตก

สลายของเซลล์จุลชีพจะมีการหลั่งของไลโปโพลีแซคคาไรด์ออกมา ไปกระตุ้นให้เซลล์ต่างๆ เช่น แมคโครฟาจ เซลล์สร้างเส้นใย และเซลล์สร้างกระดูก มีการหลั่งไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น อินเตอร์ลิวคิน-1 อินเตอร์ลิวคิน-6 และทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์แอลฟา รวมทั้งสารตัวกลางที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น พรอสตาแกลนดินอีทู (4, 5) รวมทั้งกระตุ้นการหลั่งของรีเซปเตอร์แอดิเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์ ส่งผลให้เกิดการเหนี่ยวนำขบวนการสร้างเซลล์สลายกระดูกและเกิดการละลายของกระดูกรอบปลายรากฟันตามมา (4-6) มีรายงานว่า เซลล์สร้างกระดูกสามารถจดจำไลโปโพลีแซคคาไรด์ได้โดยมีตัวรับสำคัญคือ ตัวรับสัญญาณทอล-ไลค์ 4 (Toll-like receptor 4: TLR-4) ทำให้ไลโปโพลีแซคคาไรด์สามารถเหนี่ยวนำเซลล์สร้างกระดูกให้มีการแสดงออกของรีเซปเตอร์แอดิเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์ไปกระตุ้นขบวนการสร้างเซลล์สลายกระดูกและให้ทำหน้าที่ละลายกระดูกต่อไป (7,8) ดังภาพประกอบ 2



ภาพประกอบ 2 แสดงบทบาทของไลโปโพลีแซคคาไรด์ต่อการเกิดการละลายกระดูก (9)

ตัวรับสัญญาณทอล-ไลค์ (Toll-like receptor: TLR) เป็นโปรตีนที่แทรกอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ชนิดที่ 1 (Type I transmembrane protein) ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการอักเสบ โดยสามารถจดจำโมเลกุลที่เป็นปัจจัยก่อโรคของเชื้อจุลชีพ ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นไซโตไคน์อักเสบต่างๆ। อินเตอร์ลิวคิน-1 และทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์แอลฟา ซึ่งในมนุษย์สามารถพบตัวรับสัญญาณทอล-ไลค์ ได้ 10 ชนิด แต่ชนิดที่มีความสำคัญต่อการตอบโต้ไลโปโพลีแซคคาไรด์ คือ ตัวรับสัญญาณทอล-ไลค์ 4 ซึ่งสามารถพบการแสดงออกได้ในหลากหลายเซลล์ เช่น เซลล์แมคโครฟาจ เซลล์สร้างเส้นใย เซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สลายกระดูก เซลล์มีเซนไคมัล รวมทั้งเซลล์สร้างกระดูก โดย ตัวรับสัญญาณทอล-ไลค์ 4 มีความสามารถในการจดจำไลโปโพลีแซคคาไรด์ที่จัดเป็นปัจจัยก่อโรคที่สำคัญในเชื้อจุ

กลุ่มแกรมลบ ส่งผลให้มีการส่งสัญญาณต่างๆไปกระตุ้นการหลั่งของไซโตไคน์อักเสบได้⁽¹⁰⁾ โดยมีการศึกษาในทางคลินิกพบว่าจะมีการแสดงออกของตัวรับสัญญาณทอล-ไลค์ 4 เพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟันที่มีการอักเสบ เช่น แกรนูโลมา (Periapical granuloma) หรือ ถุงน้ำปลายรากฟัน (Periapical cyst)⁽¹¹⁾

มีการศึกษาพบว่าไลโปโพลีแซคคาไรด์จากพอร์ไฟโรโมนัส เอ็นโดดอนทัลลิสส่งผลต่อการแสดงออกของรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์และออสทีโอโปรเทจรีน ไม่แตกต่างจากไลโปโพลีแซคคาไรด์จากเอสเชอริเชีย โคไล⁽¹²⁾ และการศึกษาของ Ito และคณะ⁽¹³⁾ พบว่าไลโปโพลีแซคคาไรด์จากพอร์ไฟโรโมนัส จินจิวาสิส (*Porphyromonas gingivalis*) และเอสเชอริเชีย โคไล (*Escherichia coli*) ส่งเสริมขบวนการสร้างเซลล์สลายกระดูกไม่แตกต่างกัน เนื่องจากมีโครงสร้างส่วนของไลปิดที่เหมือนกัน

ไซโคลออกซิจีเนสและพรอสตาแกลนดินอื่นๆ

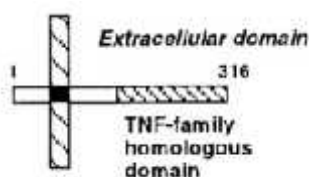
ไซโคลออกซิจีเนส คือ เอนไซม์ที่ทำหน้าที่เปลี่ยนกรดไขมันไม่อิ่มตัว (Arachidonic acid) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ ให้กลายเป็นพรอสตาแกลนดิน ซึ่งจัดเป็นสารสื่อกลางในกลุ่มไขมันที่มีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับขบวนการอักเสบ (Inflammatory mediators)^(14, 15) พรอสตาแกลนดินสามารถถูกผลิตได้จากเซลล์หลายชนิด เช่น เซลล์อักเสบ เซลล์สร้างเส้นใย รวมทั้งเซลล์สร้างกระดูก⁽¹⁶⁾ กลุ่มของพรอสตาแกลนดินที่มีบทบาทสำคัญในขบวนการอักเสบ คือ พรอสตาแกลนดินอื่นๆ⁽¹⁷⁾ เมื่อเกิดการอักเสบจะพบการเพิ่มขึ้นของไซโคลออกซิจีเนส ส่งผลให้มีการผลิตพรอสตาแกลนดินอื่นๆเพิ่มขึ้น⁽¹⁵⁾ โดยที่เอนไซม์ลิพอกซิเกเนส-1 ไซโคลออกซิจีเนสและพรอสตาแกลนดินสังเคราะห์รวมกันไลโปโพลีแซคคาไรด์สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตไซโคลออกซิจีเนสเพิ่มขึ้น⁽⁸⁾ และพรอสตาแกลนดินอื่นๆมากขึ้น⁽¹⁹⁾ ตรงกับการศึกษาของ Suda และคณะ⁽⁸⁾ ที่พบว่าเมื่อเซลล์สร้างกระดูกได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์จะมีการเพิ่มขึ้นของไซโคลออกซิจีเนสและพรอสตาแกลนดินอื่นๆ

มีรายงานการศึกษาทางคลินิกพบความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของพรอสตาแกลนดินอีทูในช่องเหลวปลายรากฟัน (Periapical exudates) กับอาการอาการปวดขึ้นเอง (Spontaneous pain) และอาการเคาะเจ็บ (Pain on percussion) โดยพบว่ากลุ่มผู้ป่วยที่มีอาการปวดขึ้นเองและมีการเคาะเจ็บจะมีความเข้มข้นของพรอสตาแกลนดินอีทูมากกว่ากลุ่มที่ไม่มีอาการอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และความเข้มข้นของพรอสตาแกลนดินอีทูในกลุ่มที่มีรอยโรครอบปลายรากฟันมากกว่ากลุ่มที่ไม่มีรอยโรครอบปลายรากฟัน⁽²⁰⁾ นอกจากนี้ McNicholas และคณะ⁽²¹⁾ ศึกษาความเข้มข้นของพรอสตาแกลนดินอีทูภายในเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟันของมนุษย์ที่มีการอักเสบ พบว่าการอักเสบของเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟันแบบเฉียบพลัน จะตรวจพบความเข้มข้นของพรอสตาแกลนดินอีทูมากกว่าการอักเสบแบบเรื้อรัง และมีการศึกษาพบว่าการรักษาคลองรากฟันสามารถลดความเข้มข้นของพรอสตาแกลนดินในช่องเหลวปลายรากฟันได้⁽²²⁾ และการใช้ยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (Nonsteroidal anti-inflammatory drug: NSAIDs) คือ ไบรูโพรเฟน (Ibuprofen) ก็สามารถลดความเข้มข้นของพรอสตาแกลนดินทั้งภายในเนื้อเยื่ออักเสบรอบปลายรากฟัน⁽²¹⁾ และในช่องเหลวปลายรากฟันได้เช่นเดียวกัน⁽²³⁾ แสดงให้เห็นว่าพรอสตาแกลนดินอีทูมีความเกี่ยวข้องกับการอักเสบของเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟัน และการละลายของกระดูกรอบปลายรากฟัน

ขบวนการสร้างเซลล์กระดูกที่เกี่ยวข้องกับวิถีสัญญาณรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบี รีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์และออสทีโอโปรเทจรีน (RANK-RANKL-OPG dependent pathway)

รีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์ คือ โปรตีนที่แทรกอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ชนิดที่ 2 (Type II transmembrane protein) จัดอยู่ในกลุ่มทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ซูเปอร์แฟมิลี มีชื่อเรียกอย่างอื่น เช่น ทรานเซ (TRANCE: TNF-related activation induced cytokine) หรือ ออสทีโอโปรเทจรีนไลแกนด์ (Osteoprotegerin ligand :OPGL)^(24, 25) มีขนาดโมเลกุลกรดอะมิโน 316 ยูนิต⁽²⁶⁾ สามารถสร้างได้จากเซลล์สร้างกระดูกเมื่อได้รับการกระตุ้นจากวิตามินดี, อินเตอร์ลิวคิน-1, อินเตอร์ลิวคิน-11, พาราไทรอยด์ฮอร์โมน และพรอสตาแกลนดินอีทู⁽²⁷⁾ มี

บทบาทสำคัญในขบวนการสร้างเซลล์สลายกระดูก โดยเมื่อถูกกระตุ้นจะทำให้มีการผลิตออกมามากขึ้นและไปจับกับรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีบนเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สลายกระดูก ส่งผลให้เซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สลายกระดูกมีการเปลี่ยนสภาพเซลล์ไปเป็นเซลล์สลายกระดูก ที่สมบูรณ์และกระตุ้นการทำงานของเซลล์สลายกระดูกให้เกิดการละลายของกระดูกต่อไป^(27, 28)



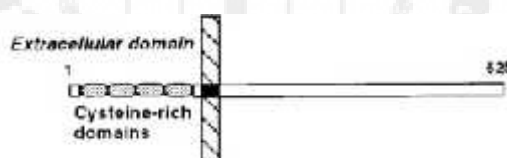
ภาพประกอบ 3 โครงสร้างของรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด⁽²⁸⁾

ออสทีโอโปรเทจรีน คือ ไกลโคโปรตีน ที่จัดอยู่ในกลุ่มทูเมอร์เนครอซิสแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ซูเปอร์แฟมิลี (Tumor necrosis factor receptor superfamily: TNFR) มีขนาดโมเลกุลกรดอะมิโน 401 ยูนิต⁽²⁶⁾ สามารถสร้างขึ้นได้จากหลายเซลล์ในร่างกาย เช่น เซลล์จากไขกระดูกและเซลล์สร้างกระดูก^(29, 30) มีบทบาทสำคัญในการยับยั้งการเกิดขบวนการสร้างเซลล์สลายกระดูกโดยยับยั้งขบวนการเปลี่ยนสภาพเซลล์จากเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สลายกระดูก และยับยั้งการทำงานของเซลล์สลายกระดูก^(31, 32) อีกทั้งยังพบว่าสามารถยับยั้งการเข้ามาของเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สลายกระดูก และยับยั้งการอยู่รอดของเซลล์สลายกระดูกส่งผลให้การละลายกระดูกลดลง หรืออาจเรียกว่าเป็นปัจจัยขัดขวางขบวนการสร้างเซลล์สลายกระดูก (Osteoclastogenesis inhibitory factor : OCIF) โดยจะไปขัดขวางการส่งสัญญาณระหว่างรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนดกับรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบี^(16, 24, 33, 34) นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาของ O'Brien และคณะ⁽³⁵⁾ ทำการศึกษาในเซลล์กระดูกกระโหลกศีรษะของหนูพบว่า ออสทีโอโปรเทจรีน ส่งผลทำให้เซลล์สลายกระดูกเปลี่ยนการยึดเกาะจากบริเวณผิวกระดูก (bone surface) มาอยู่ที่เยื่อหุ้มเอ็นโดครีเนียม (Endocranial membrand) ทำให้การทำงานของเซลล์สลายกระดูกในการละลายกระดูกลดลง ปัจจัยที่ส่งผลต่อการแสดงออกของออสทีโอโปรเทจรีน ได้แก่ วิตามินดี อินเตอร์ลิวคิน-1 อินเตอร์ลิวคิน-6 พรอสตาแกลนดินอีทู และพาราไทรอยด์ฮอร์โมน โดยจะมีผลลดการแสดงออกของออสทีโอโปรเทจรีน⁽³⁶⁾

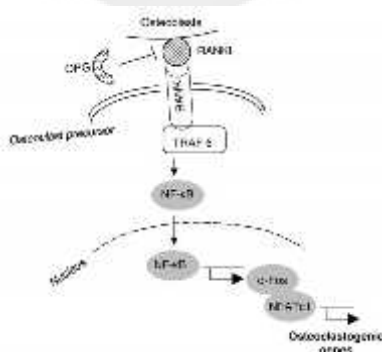


ภาพประกอบ 4 โครงสร้างของออสทีโอโปนทีจิน⁽²⁸⁾

รีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบี คือ โปรตีนที่แทรกอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ชนิดที่ 1 (Type I transmembrane protein) มีขนาดโมเลกุลกรดอะมิโน 625 ยูนิต มีโครงสร้างคล้ายกับออสทีโอโปนทีจิน คือส่วนที่อยู่ด้านนอกเซลล์จะมี cysteine-rich domain 4 ตำแหน่ง⁽²⁶⁾ สามารถพบได้ในเซลล์ต่างๆ เช่น เซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สลายกระดูก เซลล์สลายกระดูก และเซลล์ลิพโซด์⁽³⁷⁾ ทำหน้าที่เป็นตัวรับของรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์ เมื่อรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์จับกับรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบี จะส่งสัญญาณผ่านโปรตีนในกลุ่มทราฟ (TRAF: Tumor necrosis factor receptor associated factor) ที่สำคัญคือ ทราฟ-6 (TRAF-6) แล้วไปกระตุ้นโปรตีนนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบี (Nuclear factor kappa B: NF- κ B) ทำให้เกิดการถอดรหัสของยีนส์ที่จำเป็นในขบวนการสร้างเซลล์สลายกระดูก ดังแสดงในภาพประกอบ 6

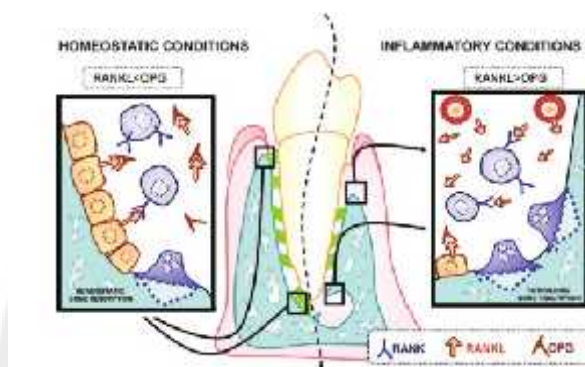


ภาพประกอบ 5 โครงสร้างของรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบี⁽²⁸⁾



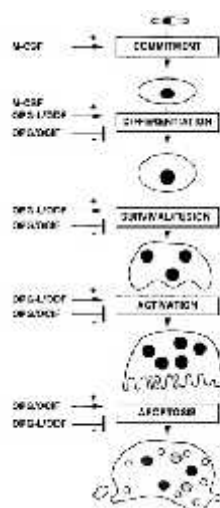
ภาพประกอบ 6 แสดงการส่งสัญญาณภายในเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สลายกระดูกในขบวนการสร้างเซลล์สลายกระดูก⁽³⁰⁾

ในภาวะปกติร่างกายมีการผลิตรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์และออสทีโอโปรเทจรีนเพื่อควบคุมสมดุลย์ของกระดูก แต่เมื่อมีปัจจัยหรือสิ่งกระตุ้นที่ทำให้เกิดการอักเสบ จะมีการผลิตรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์ในสัดส่วนที่มากกว่าออสทีโอโปรเทจรีนส่งผลให้เกิดการละลายของกระดูกรอบปลายรากฟัน ดังภาพประกอบ 7



ภาพประกอบ 7 แสดงบทบาทของรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์และออสทีโอโปรเทจรีนในสภาวะปกติและสภาวะเกิดการอักเสบ⁽¹⁶⁾

ปัจจัยหรือสิ่งกระตุ้นที่ทำให้เกิดการอักเสบจะทำให้เกิดการตอบสนองของร่างกายและเกิดการละลายกระดูกขึ้นได้นั้นต้องมีขบวนการสร้างเซลล์สลายกระดูกและพัฒนาไปเป็นเซลล์สลายกระดูกที่สมบูรณ์สามารถทำหน้าที่ละลายกระดูกได้โดยปกติ กลไกสำคัญในการควบคุมขบวนการสร้างเซลล์สลายกระดูก คือ ควบคุมผ่านการสื่อสารกันระหว่างรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์บนเซลล์สร้างกระดูกและรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์บนเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สลายกระดูก⁽²⁶⁾ ทำให้เกิดขบวนการสร้างเซลล์สลายกระดูก โดยกระตุ้นให้มีการเข้ามาของเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สลายกระดูก การเปลี่ยนแปลงสภาพเซลล์ การมีชีวิตรอด และการทำหน้าที่ของเซลล์สลายกระดูก นอกจากนี้ยังมีผลยับยั้งการขจัดตัวเองของเซลล์สลายกระดูกส่งผลให้เกิดการละลายกระดูกต่อไป^(24, 25, 30, 34) นอกจากนี้เซลล์สร้างกระดูกเองยังสามารถผลิตออสทีโอโปรเทจรีนที่จะทำหน้าที่ยับยั้งขบวนการสร้างเซลล์สลายกระดูกได้อีกด้วย ส่งผลให้เกิดการควบคุมขบวนการสร้างและการทำงานหน้าที่ของเซลล์สลายกระดูก⁽²⁶⁾ ดังแสดงในภาพประกอบ 8



ภาพประกอบ 8 แสดงบทบาทหน้าที่ของรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบี

ไลแกนดและออสทีโอโปรเทจรีนในขบวนการสร้างเซลล์สลายกระดูก (26)

การศึกษาที่พบว่าขบวนการสร้างเซลล์สลายกระดูก อาศัยการส่งสัญญาณสื่อสารระหว่างเซลล์สร้างกระดูกและเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สลายกระดูกผ่านวิถีสัญญาณรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบี รีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด และออสทีโอโปรเทจรีน เช่น การศึกษาของ Jiang และคณะ⁽³⁸⁾ พบว่าไลโปโพลีแซคคาไรด์อย่างเดียวจะเพิ่มการแสดงออกของยีนที่เฉพาะต่อเซลล์สลายกระดูก (Osteoclast-specific gene markers) ได้แก่ แทรป (TRAP: Tartrate-resistant acid phosphatase) คาแทปซินเค (Cathepsin K) และ ตัวรับแคลซิโตนิน (Calcitonin receptor) เพียงเล็กน้อยแต่หากมีรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด ร่วมด้วยจะทำให้มีการแสดงออกของยีนเหล่านั้นเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ ไลโปโพลีแซคคาไรด์สามารถกระตุ้นให้เซลล์สร้างกระดูกผลิตพรอสตาแกลนดินอีทู ซึ่งพรอสตาแกลนดินอีทูที่ผลิตขึ้นมานี้จะไปกระตุ้นรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนดส่งผลให้เกิดการละลายของกระดูกได้⁽⁹⁾ โดยมีการศึกษาในเซลล์จากสัตว์ทดลองพบว่าไลโปโพลีแซคคาไรด์ มีผลเพิ่มการแสดงออกของไซโคลออกซีจีเนสทู พรอสตาแกลนดินอีทูและรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด แต่ลดการแสดงออกของออสทีโอโปรเทจรีน^(8, 39) และพบว่าอัตราส่วนของรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบี ไลแกนดต่อออสทีโอโปรเทจรีนจะเพิ่มขึ้น 2 - 3 สัปดาห์หลังจากมีการฉีดยาของเนื้อเยื่อใน ซึ่งเป็นช่วงเวลาพบว่าเกิดการละลายของกระดูกรอบปลายรากฟัน⁽⁴⁰⁾ ซึ่งการเพิ่มขึ้นของพรอสตาแกลนดิน

อีทูจะมีบทบาทในการเพิ่มการแสดงออกของรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์และลดการแสดงออกของออสทีโอโปรเทจรีน ส่งผลให้เกิดขบวนการสร้างเซลล์สลายกระดูก^(41, 42) โดยมีการศึกษาพบว่าพรอสตาแกลนดินอีทูจะมีบทบาทในการเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเซลล์และการทำหน้าที่ของเซลล์สลายกระดูกได้ ต้องอาศัยรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์⁽⁴³⁾ และยังมีการศึกษาในเซลล์กระดูกจากกระดูกหน้าแข้งของมนุษย์พบว่าพรอสตาแกลนดินอีทูมีผลลดการหลั่งของออสทีโอโปรเทจรีนจากเซลล์กระดูก^(44, 45)

นอกจากการศึกษาในห้องปฏิบัติการแล้ว ยังมีการศึกษาทางคลินิกของ Sebati และคณะ⁽⁴⁶⁾ พบว่าสามารถตรวจพบรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนภายในเนื้อเยื่ออักเสบรอบปลายรากฟัน กรณีที่มีการคงอยู่ของรอยโรครอบปลายรากฟันหลังจากการได้รับการรักษาคลองรากฟันไปแล้ว ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Vernal และคณะ⁽⁴⁷⁾ ที่พบว่าสามารถตรวจพบรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนได้ภายในเนื้อเยื่ออักเสบรอบปลายรากฟัน และยังมีการศึกษาที่รายงานว่าพบรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนและออสทีโอโปรเทจรีนภายในถุงน้ำปลายรากฟันอีกด้วย⁽⁴⁸⁾ แสดงให้เห็นว่ารีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนมีความสัมพันธ์กับการอักเสบของเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟัน และการละลายของกระดูกรอบปลายรากฟัน

ขบวนการสร้างเซลล์กระดูกที่ไม่เกี่ยวข้องกับวิถีสัญญาณรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบี รีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกน และออสทีโอโปรเทจรีน (RANK-RANKL-OPG independent pathway)

นอกจากขบวนการสร้างเซลล์สลายกระดูกจะเกี่ยวข้องกับรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนที่อยู่บนเซลล์สร้างกระดูกแล้ว ยังมีการศึกษาที่พบขบวนการสร้างเซลล์สลายกระดูกสามารถเกิดได้จากการกระตุ้นเซลล์ต้นกำเนิดโดยตรงหรือผ่านวิถีสัญญาณอื่น ดังเช่นการศึกษาของ Kim และคณะ⁽⁴⁹⁾ ทำการศึกษาในหนูที่ไม่มีการแสดงออกของยีนส์รีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกน และรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์

แฟกเตอร์แคปแปปี พบว่าสามารถเกิดกระบวนการสร้างเซลล์สลายกระดูกได้เมื่อได้รับการกระตุ้นจากทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์แอลฟาโดยตรงไม่เกี่ยวข้องกับการปฏิสัมพันธ์ระหว่างรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์นิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปแปปีไลแกนด และรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์นิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปแปปี สอดคล้องกับการศึกษาของ Islam และคณะ⁽⁵⁰⁾ ที่ทำการศึกษาพบว่าไลโปโพลีแซคคาไรด์กระตุ้นให้เกิดการเพิ่มจำนวนของเซลล์สลายกระดูกได้ ซึ่งเมื่อใส่สารต้านทานต่อทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์แอลฟา(TNF- α antibody) จะพบว่าเซลล์สลายกระดูกลดลง แต่เมื่อใส่สารต้านต่อรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปแปปีไลแกนด (RANKL antibody) พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์สลายกระดูก นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อใส่สารยับยั้งไซโคลออกซิจีเนสทู (NS398) ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในการผลิตพรอสตาแกลนดินอีทู ก็ยังคงไม่มีผลต่อจำนวนเซลล์สลายกระดูก แสดงว่าการที่ไลโปโพลีแซคคาไรด์ส่งเสริมกระบวนการสร้างเซลล์สลายกระดูกนี้ ไม่เกี่ยวข้องกับการรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปแปปีไลแกนดและพรอสตาแกลนดินอีทู แต่เกี่ยวข้องกับทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์แอลฟา นอกจากนี้ Suda และคณะ⁽⁵¹⁾ ยังศึกษาพบว่าไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเอสเชอริเชีย โคไล สามารถทำให้เซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สลายกระดูก (Preosteoclasts : pOCs) พัฒนาไปเป็นเซลล์สลายกระดูกได้โดยตรง และเมื่อเติมออกทีโอโปรเทจรีนซึ่งเชื่อว่ามีบทบาทในการยับยั้งกระบวนการสร้างเซลล์สลายกระดูก กลับพบว่าไม่สามารถลดจำนวนเซลล์สลายกระดูกได้ แสดงว่าพบว่าไลโปโพลีแซคคาไรด์มีบทบาทโดยตรงในการทำให้เซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สลายกระดูกมีการพัฒนามาเป็นเซลล์สลายกระดูกและส่งเสริมการอยู่รอดของเซลล์สลายกระดูก โดยไม่เกี่ยวข้องกับการรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์นิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปแปปีไลแกนดและออกทีโอโปรเทจรีน จากการศึกษาต่างๆเหล่านี้แสดงว่าไลโปโพลีแซคคาไรด์สามารถกระตุ้นการเกิดกระบวนการสร้างเซลล์สลายกระดูกได้โดยตรง หรือเกี่ยวข้องกับการทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์แอลฟา ซึ่งไม่ต้องอาศัยการติดต่อสื่อสารผ่านการทำงานของเซลล์สร้างกระดูกโดยวิธีสัญญาณ รีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปแปปี รีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปแปปีไลแกนด และออกทีโอโปรเทจรีน

ความแตกต่างของเซลล์จากกระดูกเบ้าฟันมนุษย์และเซลล์กระดูกมนุษย์ในตำแหน่งอื่น

เซลล์กระดูกที่มาจากตำแหน่งที่ต่างกัน จะมีความแตกต่างกันเนื่องจากมีแหล่งกำเนิดจากเซลล์ต่างชนิดกัน มีกระบวนการสร้างกระดูกที่ต่างกัน มีการเจริญเติบโตต่างกัน มีส่วนประกอบที่แตกต่างกัน อาจส่งผลให้มีการตอบสนองต่อการกระตุ้นและการแสดงออกของยีนส์ที่แตกต่างกัน⁽⁵²⁾ ดังนั้น กระดูกขากรรไกรที่เจริญมาจากเซลล์นิวรัลเครส (Neural crest cells) และมีการสร้างกระดูกแบบ อินทราเมมเบรนาส (Intramembranous ossification) จะมีความแตกต่างจากกระดูกอื่นๆ เช่น กระดูกหน้าแข้งและกระดูกเชิงกราน ที่กำเนิดมาจากเซลล์มีโซเดิร์ม (Mesoderm cells) และสร้างกระดูกแบบ เอนโดครอนดราล (Endochondral ossification) โดยมีการศึกษาเปรียบเทียบกระดูกขากรรไกรและกระดูกหน้าแข้งของหนู พบว่าเซลล์กระดูกที่มาจากกระดูกขากรรไกรมีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก (Osteogenic differentiation potential) ได้ดีกว่าเซลล์ที่มาจากกระดูกหน้าแข้ง⁽⁵³⁾ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในกระดูกมนุษย์ที่พบว่าเซลล์กระดูกที่มาจากกระดูกขากรรไกรจะมีการเพิ่มจำนวน (Proliferation rate) ที่รวดเร็วกว่า สนับสนุนการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก (Osteoblast differentiation) มากกว่า และสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างกระดูก (Osteogenic induction) ได้มากกว่า⁽⁵⁴⁾ ดังนั้นการศึกษาที่ผ่านมาถึงแม้จะศึกษาในเซลล์กระดูกที่ได้จากมนุษย์ เช่น กระดูกหน้าแข้ง ซึ่งมีต้นกำเนิดและการสร้างกระดูกที่แตกต่างกับกระดูกขากรรไกร อาจไม่สามารถแสดงถึงการเกิดโรคปลายรากฟันที่อยู่บริเวณกระดูกขากรรไกรได้มากนัก

จากการศึกษาที่ผ่านมาทั้งในห้องปฏิบัติการและทางคลินิกจะเห็นได้ว่าไลโปโพลีแซคคาไรด์มีส่วนสำคัญต่อการเกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟันและส่งผลให้เกิดการละลายของกระดูกรอบปลายรากฟัน โดยมีเกี่ยวข้องกับบิริเทบเตอร์แอดิเวเตอร์ออพนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบี ไลแกนด์และฮอสทีโอโปรเจจรีน หากมีการศึกษาเพิ่มเติมในเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ซึ่งเป็นตำแหน่งที่เกิดโรครอบปลายรากฟันจริง สนับสนุนการศึกษาต่างๆ ก่อนหน้า อาจเป็นพื้นฐานในการศึกษาพัฒนาแนวทางการรักษาลดการอักเสบหรือการใช้ยาและวัสดุต่างๆ เพื่อป้องกันและยับยั้งการลุกลามการอักเสบของเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟัน อันจะมีประโยชน์ในการลดการละลาย ของกระดูกรอบปลายรากฟันได้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การกำหนดกลุ่มตัวอย่าง

ตัวอย่างที่นำมาใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ประกอบด้วยเซลล์ที่ได้จากกระดูกเบ้าฟันมนุษย์จากผู้ป่วยที่มารับการผ่าตัดที่ภาควิชาศัลยศาสตร์และเวชศาสตร์ช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ โดยผู้ป่วยไม่มีโรคประจำตัว ไม่มีรอยโรคของฟัน ไม่มีรอยโรคของเนื้อเยื่อปริทันต์และเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟัน และได้รับการยินยอมจากผู้ป่วย ซึ่งได้รับความเห็นชอบจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมในงานวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เลขที่ 21/2558

เพื่อควบคุมลักษณะของเซลล์กระดูกเบ้าฟันที่นำมาศึกษาให้มีความใกล้เคียงกันจึงกำหนดช่วงอายุของผู้ป่วยอยู่ระหว่าง 20-25 ปี และเป็นกระดูกเบ้าฟันที่มาจากการผ่าตัดในตำแหน่งของขากรรไกรล่างเท่านั้น

การเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์

นำชิ้นกระดูกเบ้าฟัน ที่ได้จากการผ่าตัดจากผู้ป่วย 3 ราย มาล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลายน์ กำจัดเนื้อเยื่อเยื่อหุ้มออกให้หมดโดยใช้มีดผ่าตัดตัดกระดูกให้เป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นนำกระดูกไปวางในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 35 มิลลิเมตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็มเอฟ 12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium F 12: DMEM/F12 , Gibco®) ที่มีส่วนผสมของซีรัมจากลูกอ่อนวัวร้อยละ 10 (10% fetal calf serum: FCS, Gibco®) กลูตามีน (L-glutamine, Invitrogen, NY) ยาปฏิชีวนะและยาต้านเชื้อรา (100 IU/ml. penicillin G, 50 µg/ml streptomycin และ amphotericin B 2.5 µg/ml) ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้บ่มที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 รวบรวมเซลล์จากชิ้นกระดูกเจริญออกมาอยู่บนจานเลี้ยงเซลล์ และเจริญเต็มพื้นที่ของจานเลี้ยงเซลล์ (Confluence) จึงทำการถ่ายเซลล์ลงสู่จานเลี้ยงเซลล์ใหม่ (Subculture) ในอัตราส่วน 1:2 (หว่านเซลล์ 1 ใน 2 ของเซลล์ทั้งหมดจากจานเลี้ยงเซลล์เดิมสู่จานเลี้ยงเซลล์ใหม่ 1 จาน โดยใช้ทริปซิน-อีดีทีเอ

(trypsin-EDTA, Gibco®) จากนั้นเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็มเอฟ 12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium F12 : DMEM/F12 , Gibco®) ที่มีส่วนผสมของซีรัมจากลูกอ่อนวัวร้อยละ 10 (10% fetal calf serum: FCS, Gibco®) จนได้เซลล์ปริมาณมากพอ เซลล์ส่วนหนึ่งจะนำมาใช้ในการศึกษาวิจัย และอีกส่วนหนึ่งเก็บไว้โดยการแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลว

การเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้แปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง

นำเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจากกระดูก มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็มเอฟ 12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium F12 : DMEM/F12 , Gibco®) ที่มีส่วนผสมของซีรัมจากลูกอ่อนวัวร้อยละ 10 (10% fetal calf serum: FCS, Gibco®) กลูตามีน (L-glutamine, Invitrogen) ยาปฏิชีวนะและยาต้านเชื้อรา (100 IU/ml. penicillin G, 50 µg/ml , streptomycin และ amphotericin B 2.5 µg/ml) ในภาชนะเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการเลี้ยงเซลล์ต่อด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่มีการเหนี่ยวนำให้แปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง (osteogenic media) ซึ่งมีส่วนผสมของกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid, Gibco®, USA) 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, เบต้ากลีเซอโรฟอสเฟต (β -glycerophosphate, Gibco®, USA) 1.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเดกซาเมธาโซน (Dexamethasone, Gibco®, USA) 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 14 วัน โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3 วัน

การทดสอบความสามารถในการสะสมแร่ธาตุในจานเลี้ยง

หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูก ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่มีการเหนี่ยวนำให้แปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งเป็นเวลา 14 วัน ทำการทดสอบการทำงานของอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสด้วย BCIP/NBT (Substrate for alkaline phosphatase) โดยดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลายน์ เติม 10% ฟอร์มาลีน ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่น เติม BCIP/NBT ทิ้งไว้ 5 นาที สังเกตการเปลี่ยนสี แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น

การทดสอบความสามารถในการตกตะกอนแคลเซียมในจานเลี้ยง

หลังจากเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีการเหนี่ยวนำให้แปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งเป็นเวลา 14 วัน ทำการย้อมสีอะลิซารินเรดเอส (Alizarin red s, Sigma, USA) โดยดูอาหารเลี้ยงเซลล์ออก ล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาลายนีปราศจากเชื้อ เติม 10% ฟอรัมาลีน ทิ้งไว้ 15 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่น เติมสีอะลิซารินเรดทั้งไว้ 20 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่น 4 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

การทดสอบตัวบ่งชี้จำเพาะของเซลล์สร้างกระดูกด้วยออกสติน

(Osteocalcin)

หลังจากเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีการเหนี่ยวนำให้แปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งเป็นเวลา 14 วัน ทำการตรวจสอบการแสดงออกของออกสตินที่โอแคลซินด้วยวิธีเรียลไทม์ไพล์เอมอเรสเซนซ์แอสซาย

ตัวอย่างเซลล์ที่จะนำมาใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ จะเป็นเซลล์จากผู้ป่วย 3 โหลนที่ให้ผลบวกต่อการย้อมสีอะลิซารินเรดเอส อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส และมีการแสดงออกของออกสตินที่โอแคลซิน และเป็นเซลล์ในรุ่นที่ 3-8 เท่านั้น โดยแต่ละเซลล์ตัวอย่างจะถูกนำมาทดลองแบบเดียวกันซ้ำ 3 ครั้ง (Triplicate) ในทุกขั้นตอนของการวิจัย

การเตรียมไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเอสเชอริเชีย โคไล

ใช้สารบริสุทธิ์ไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเอสเชอริเชีย โคไล L2630 (0111:B4, Sigma, USA) โดยเตรียมความเข้มข้นที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

การกระตุ้นเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้แปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง

นำเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อการย้อมสีอะลิซารินเรดเอส อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส และมีการแสดงออกของออสทีโอแคลซิน มาเพาะเลี้ยงในขวดสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ (Tissue culture flask) ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็มเอฟ 12 ที่มีส่วนผสมของซีรัมจากลูกอ่อนวัวร้อยละ 10 กลูตามีน ยาปฏิชีวนะและยาต้านเชื้อราในตู้บัพที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 จากนั้นถ่ายเซลล์ไปเลี้ยงในถาดเลี้ยงเซลล์ ขนาด 6 หลุม (6-well plate) หลุมละ 150,000 เซลล์ ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีการเหนี่ยวนำให้แปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งและมีส่วนผสมของซีรัมจากลูกอ่อนวัวร้อยละ 2.5 เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำไปสกัดอาร์เอ็นเอเพื่อศึกษาการแสดงของไซโคลออกซิจีเนสทูรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด และออสทีโอโปรเทจรีนโดยทำการแบ่งกลุ่มการศึกษาออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

- | | |
|------------|---|
| กลุ่มที่ 1 | ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ |
| กลุ่มที่ 2 | กระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร |
| กลุ่มที่ 3 | กระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร |

วิเคราะห์การแสดงออกของไซโคลออกซิจีเนสทูรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด และออสทีโอโปรเทจรีนด้วยวิธีเรียลไทม์โพลีเมอเรสเชนรีแอคชัน (Real-time polymerase chain reaction, Real-time PCR)

การสกัดอาร์เอ็นเอ (RNA extraction) หลังจากกระตุ้นเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ 48 ชั่วโมงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีการเหนี่ยวนำให้แปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง ทำการสกัดอาร์เอ็นเอโดยใช้ไตรซอล (Trizol[®] Reagent, Gibco) ตามวิธีการที่แนะนำโดยผู้ผลิต จากนั้นทำการเก็บอาร์เอ็นเอที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

การสังเคราะห์คอมพลีเมนแทรีตีเอ็นเอสแตรนด (First strand cDNA synthesis) ทำการสังเคราะห์คอมพลีเมนแทรีตีเอ็นเอสแตรนดโดยชุดสังเคราะห์สำเร็จรูปอิมพรอม-ทูทีเอ็มวีเวอร์ส

รานสคริปชัน (ImProm II TM Reverse Transcription System) ตามคำแนะนำโดยผู้ผลิตจากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้ไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอโดยใช้หลักการเรียลไทม์โพลีเมอเรสเซนรีแอคชัน
(Real-time polymerase chain reaction: Real-time PCR) ทำการเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอด้วยน้ำยาลำเร็จรูป (Real-time PCR master mix, LightCycle[®] 480 SYBR Green I Master, Roach Diagnostics Corporation, IN, USA) ตามคำแนะนำโดยผู้ผลิต โดยไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษานี้ ได้แก่ ไชโคลออกซิจีเนสทู รีเซ็ปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์ และออสทีโอโปรเทจรีน

ตาราง 1 แสดงไพรเมอร์ของออสทีโอแคลซิน ไชโคลออกซิจีเนสทู รีเซ็ปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์ ออสทีโอโปรเทจรีนและจีเอฟพีดีเอช

ไพรเมอร์	ลำดับเบส	แหล่งที่มา
GAPDH	Forward; 5'-GCACCGTCAAGGGTGAGAAC-3' Reverse; 5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGT-3'	(1)
Osteocalcin	Forward; 5'-AGCGAGGTAGTGAAGAGAC-3' Reverse; 5'-GAAAGCCGATGTGGTCAG-3'	(2)
COX-2	Forward; 5'-GGA ACA AAC AGA GTC TGA G-3' Reverse; 5'-AAG GGG ATG GCC AGT GTA TAG A-3'	(1)
RANKL	Forward; 5' TGGATGCCTTGAATAATAAGCAGGA-3' reverse; 5'-AATTTGCGGCACTTGTGGAA -3'	(1)
OPG	Forward; 5'-TGGCACCAAAGTAAACGCAGAG-3' Reveres; 5'-CTCGAAGGTGAGGTTAGCATGTC-3'	(1)

การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิจัยครั้งนี้เปรียบเทียบการแสดงออกของไซโคลออกซีจีเนสทู รีเซปเตอร์แอคติเวเตอร์
ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์และออสทีโอโปรเทจรีน ด้วยสถิติเชิงพรรณนา



บทที่ 4

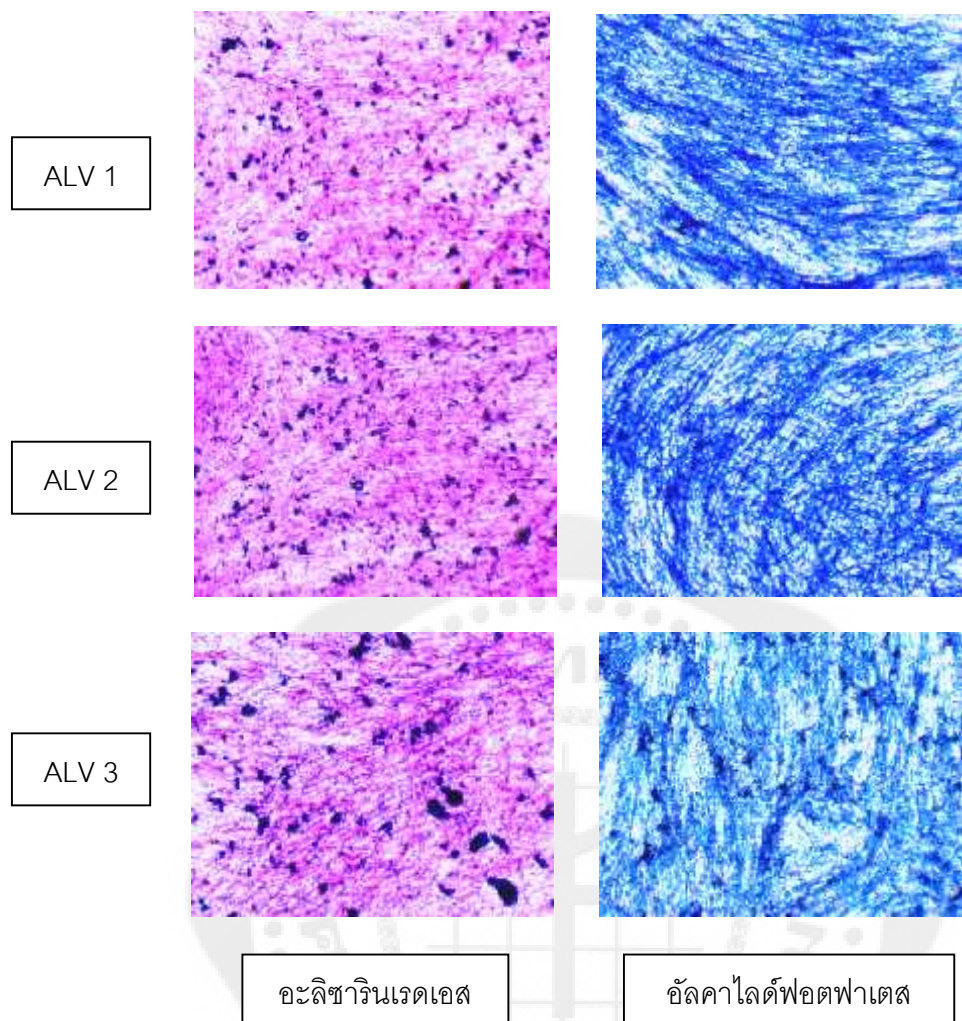
ผลการวิจัย

เซลล์กระดูกเบ้าฟันที่นำมาทำการศึกษามาจากผู้ป่วยที่มารับการผ่าฟันคุดที่คลินิกศัลยกรรม โดยมีเพศ อายุ และตำแหน่งของฟันคุด ดังแสดงในตาราง 2

ตาราง 2 แสดงแหล่งที่มาของเซลล์กระดูกเบ้าฟันจากผู้ป่วยที่มารับการผ่าฟันคุด

ผู้ป่วย	เพศ	อายุ	ตำแหน่งฟันคุด
รายที่ 1	หญิง	21	ขากรรไกรล่าง
รายที่ 2	หญิง	21	ขากรรไกรล่าง
รายที่ 3	หญิง	22	ขากรรไกรล่าง

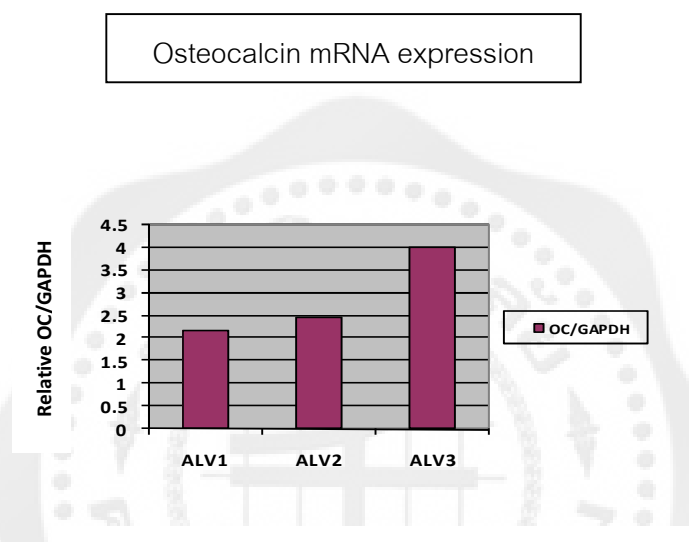
เมื่อเลี้ยงเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ทั้ง 3 ไหล่ ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีฤทธิ์เหนียว นำให้แปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง ในจานเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 14 วัน ทำการทดสอบความสามารถในการสะสมแร่ธาตุและการตกตะกอนแคลเซียม โดยการย้อมอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส และอะลิซารินเรดเอส พบว่าเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ทั้ง 3 ไหล่ (ALV1, ALV2 และ ALV3) ให้ผลบวกต่ออัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและอะลิซารินเรดเอส ดังแสดงในภาพประกอบ 9



ภาพประกอบ 9 แสดงผลการทดสอบการสะสมแร่ธาตุและการตกตะกอนแคลเซียมของเซลล์กระดูก
 เบ้าฟันมนุษย์ 3 ไหลน์ โดยการย้อมอะลิซารินเรดเอส และอัลคาไลด์ฟอตฟาเตส

เมื่อทำการศึกษาการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอด้วยวิธีเรียลไทม์พีซีอาร์ของ

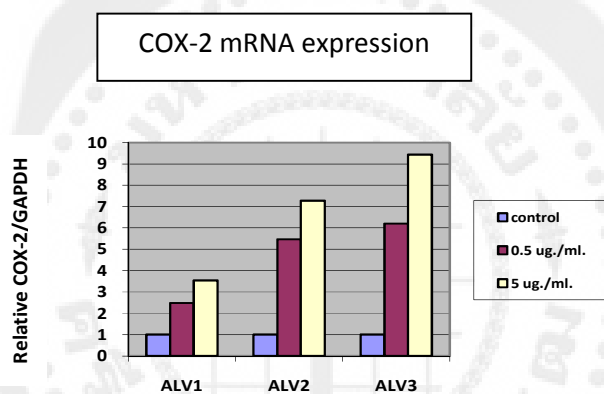
แคลซินเปรียบเทียบกับยีนส์ควบคุมกลีเซอรอลดีไฮด์ไตรฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส : จีเอพีดีเอช (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase: GAPDH) ได้ผล ดังนี้ เซลล์ ALV 1 มีการแสดงออก 2.15 เท่า เซลล์ ALV 2 มีการแสดงออก 2.44 เท่า และ ALV 3 มีการแสดงออก 3.9 เท่า ตามลำดับ ดังแสดงในภาพประกอบ 10



ภาพประกอบ 10 กราฟแท่งแสดงสัดส่วนการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอด้วยวิธีเรียลไทม์พีซีอาร์ของออสทีโอแคลซินเมื่อเปรียบเทียบกับยีนส์ควบคุมจีเอพีดีเอช หลังจากเลี้ยงเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ทั้ง 3 ไหล่ ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้แปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งเป็นเวลา 14 วัน

ผลของไลโปโพลีแซคคาไรด์ต่อการแสดงออกของไซโคลออกซีจีเนสทูในเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์

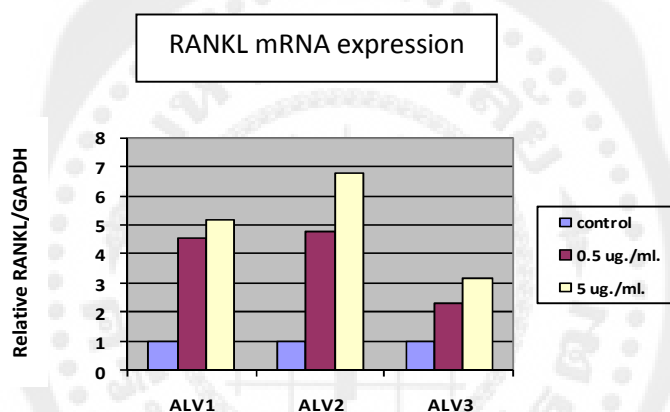
เมื่อกระตุ้นเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ทั้ง 3 โกล์ด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ ที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอของไซโคลออกซีจีเนสทูเปรียบเทียบกับยีนส์ควบคุมจีเอพีดีเอช ดังนี้ เซลล์ ALV 1 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น 2.49 เท่า และ 3.54 เท่า เซลล์ ALV 2 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น 5.46 เท่า และ 7.28 เท่า และเซลล์ ALV 3 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น 6.20 เท่า และ 9.44 เท่า ตามลำดับ ดังแสดงในภาพประกอบ 11



ภาพประกอบ 11 กราฟแท่งแสดงสัดส่วนการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอของไซโคลออกซีจีเนสทูของเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ทั้ง 3 โกล์ เมื่อเปรียบเทียบกับยีนส์ควบคุมจีเอพีดีเอช ภายหลังการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ ที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และปรับให้กลุ่มควบคุมของเซลล์ในทุกโกล์มีค่าเท่ากับ 1

ผลของไลโปโพลีแซคคาไรด์ต่อการแสดงออกของรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์ในเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์

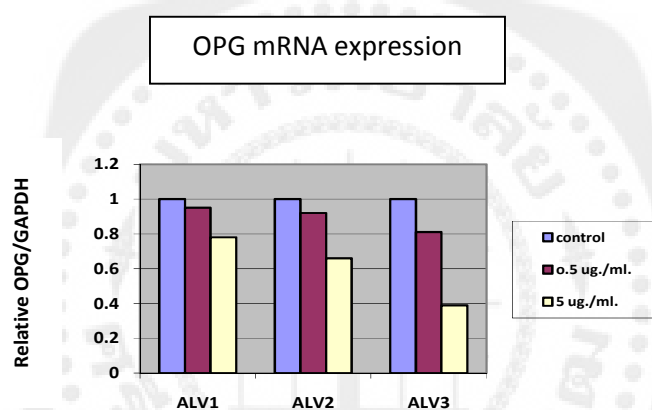
เมื่อกระตุ้นเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ทั้ง 3 โล้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ ที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอของรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์เปรียบเทียบกับยีนส์ควบคุมจีเอฟทีเอส ดังนี้ เซลล์ ALV 1 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น 4.56 เท่า และ 5.16 เท่า เซลล์ ALV 2 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น 4.77 เท่า และ 6.78 เท่า และเซลล์ ALV 3 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น 2.28 เท่า และ 3.15 เท่า ตามลำดับ ดังแสดงในภาพประกอบ 12



ภาพประกอบ 12 กราฟแท่งแสดงสัดส่วนการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอของรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์ของเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ทั้ง 3 โล้น เมื่อเปรียบเทียบกับยีนส์ควบคุมจีเอฟทีเอส ภายหลังการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม ต่อมิลลิตร และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และปรับให้กลุ่มควบคุมของเซลล์ในทุกโหลมีค่าเท่ากับ 1

ผลของไลโปโพลีแซคคาไรด์ต่อการแสดงออกของออสทีโอโปรเทจรีนในเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์

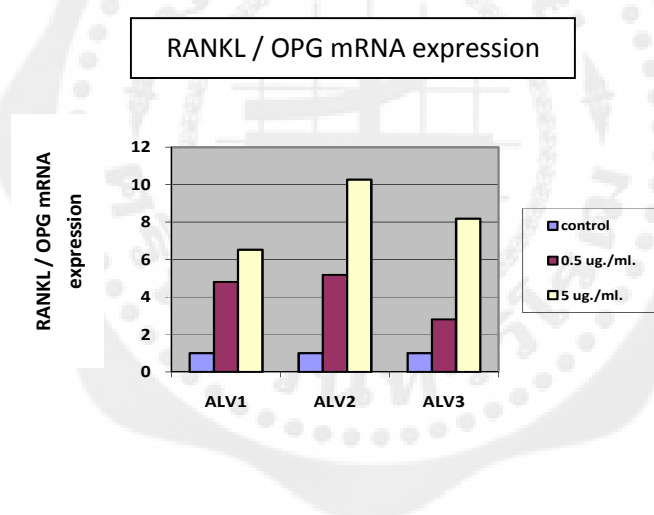
เมื่อกระตุ้นเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ทั้ง 3 โกล์ด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ ที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอของออสทีโอโปรเทจรีนเปรียบเทียบกับยีนส์ควบคุมจีเอพีทีดีเอช ดังนี้ เซลล์ ALV 1 มีการแสดงออกลดลง 0.95 เท่า และ 0.78 เท่า เซลล์ ALV 2 มีการแสดงออกลดลง 0.92 เท่า และ 0.66 เท่า และเซลล์ ALV 3 มีการแสดงออกลดลง 0.81 เท่า และ 0.39 เท่า ตามลำดับ ดังแสดงในภาพประกอบ 13



ภาพประกอบ 13 กราฟแท่งแสดงสัดส่วนการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอของออสทีโอโปรเทจรีนของเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ทั้ง 3 โกล์ เมื่อเปรียบเทียบกับยีนส์ควบคุมจีเอพีทีดีเอช ภายหลังการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ ที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม ต่อมิลลิตร และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และปรับให้กลุ่มควบคุมของเซลล์ในทุกโกล์มีค่าเท่ากับ 1

ผลของไลโปโพลีแซคคาไรด์ต่อสัดส่วนการแสดงออกของรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์ต่อออสทีโอโปรเทจรินในเซลล์กระดูก เบ้าฟันมนุษย์

เมื่อพิจารณาสัดส่วนการแสดงออกของรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์ต่อออสทีโอโปรเทจริน พบว่าเมื่อเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ทั้ง 3 โหลได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะมีสัดส่วนการแสดงออกของรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์ต่อออสทีโอโปรเทจรินเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของไลโปโพลีแซคคาไรด์ดังนี้ เซลล์ ALV1 เพิ่มขึ้น 4.80 เท่า และ 6.52 เท่า เซลล์ ALV2 เพิ่มขึ้น 5.18 เท่า และ 10.27 เท่า และ เซลล์ ALV3 เพิ่มขึ้น 2.81 เท่า และ 8.18 เท่า ตามลำดับ ดังแสดงตามภาพประกอบ 14



ภาพประกอบ 14 กราฟแท่งแสดงสัดส่วนการแสดงออกของรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์ต่อออสทีโอโปรเทจรินของเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ทั้ง 3 โหล ภายหลังการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมงและปรับให้กลุ่มควบคุมของเซลล์ในทุกโหลมีค่าเท่ากับ 1

บทที่ 5

อภิปรายผลและบทสรุป

การศึกษาที่ผ่านมาเกี่ยวกับผลของไลโปโพลีแซคคาไรด์หรือพรอสตาแกลนดินอีทูต่อการเปลี่ยนแปลงของรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนดและออสทีโอโปรเทจรีน ส่วนใหญ่มักทำการศึกษาในเซลล์ที่ได้จากสัตว์ทดลองทั้งในรูปแบบของเซลล์สำเร็จรูป (Cell line) และเซลล์ปฐมภูมิ (Primary cell) ส่วนการศึกษาในเซลล์ของมนุษย์มักจะใช้เซลล์สำเร็จรูปหรือเซลล์ปฐมภูมิที่ได้จากกระดูกจากตำแหน่งอื่นที่ไม่ใช่จากกระดูกขากรรไกรซึ่งเป็นตำแหน่งที่เกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟันและเกิดการละลายของกระดูกรอบปลายรากฟัน ซึ่งการศึกษานี้ได้นำกระดูกที่ได้จากกระดูกเบ้าฟันมนุษย์มาทำการศึกษาเพื่อให้สามารถเป็นตัวแทนของการตอบสนองของตำแหน่งที่เกิดขึ้นจริงเมื่อเกิดการอักเสบรอบปลายรากฟันได้

ผลการศึกษาพบว่าไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเอสเชอริเชีย โคไล สามารถเพิ่มการแสดงออกของไซโคลออกซิจีเนสทูในระดับอาร์เอ็นเอในเซลล์กระดูกจากกระดูกเบ้าฟันมนุษย์ได้ทั้ง 3 โล้น ซึ่งเซลล์กระดูกทั้ง 3 โล้นพบการแสดงออกของไซโคลออกซิจีเนสทูเพิ่มขึ้นแปรผันตรงกับความเข้มข้นของไลโปโพลีแซคคาไรด์ สอดคล้องกับการศึกษาของ Shoji และคณะ⁽¹⁾ ที่ทำการศึกษาในเซลล์มนุษย์สำเร็จรูป (Human osteosarcoma cell line : Saos-2) พบว่าไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเอสเชอริเชีย สามารถเพิ่มการแสดงออกของไซโคลออกซิจีเนสทู โดยการแสดงออกของไซโคลออกซิจีเนสทูที่เพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับปริมาณของไลโปโพลีแซคคาไรด์ นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกของตัวรับอีพี 4 (Ep4 receptor) ซึ่งเป็นตัวรับที่สำคัญของพรอสตาแกลนดินอีทู ส่งผลให้พบการเพิ่มขึ้นของพรอสตาแกลนดินอีทูอีกด้วย สอดคล้องกับการศึกษาในเซลล์จากกระดูกกระดูกสันหลังของหนู ที่พบว่าไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเอสเชอริเชีย โคไล สามารถเพิ่มการแสดงออกของไซโคลออกซิจีเนสทู และพบการเพิ่มขึ้นของพรอสตาแกลนดินอีทู อีกทั้งยังพบว่าไลโปโพลีแซคคาไรด์สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์สลายกระดูกและพบการละลายของกระดูกเพิ่มมากขึ้น^(2,3) นอกจากการศึกษาในห้องปฏิบัติการแล้วยังมีการศึกษาในทางคลินิกที่สนับสนุนว่าพรอสตาแกลนดินอีทูมีความเกี่ยวข้องกับการอักเสบของเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟันและการเกิดรอยโรครอบปลายรากฟัน ดังรายงานของ McNicholas และ

คณะ⁽⁴⁾ พบว่าพื้นที่ที่มีเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟันปกติจะมีปริมาณพรอสตาแกลนดินอีทู 6.28 พิโกกรัมต่อมิลลิลิตร และพื้นที่มีการอักเสบของเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟันแบบเรื้อรังจะมีปริมาณพรอสตาแกลนดินอีทู 37.84 พิโกกรัมต่อมิลลิลิตร แต่หากมีการอักเสบของเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟันแบบฉับพลันจะมีปริมาณพรอสตาแกลนดินอีทูสูงมากถึง 105.87 พิโกกรัมต่อมิลลิลิตร สอดคล้องกับการศึกษาของ Takayama และคณะ⁽⁵⁾ ที่พบปริมาณพรอสตาแกลนดินอีทู 236.8 พิโกกรัมต่อมิลลิลิตรในพื้นที่มีการอักเสบของเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟันร่วมกับการมีรอยโรครอบปลายรากฟันซึ่ง Shimauchi และคณะ⁽⁶⁾ รายงานว่าการรักษาคลองรากฟันสามารถลดปริมาณพรอสตาแกลนดินอีทูได้ จากการศึกษาดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นว่าไลโปโพลีแซคคาไรด์ทำให้เกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟันโดยส่งผลให้เกิดการเพิ่มขึ้นของไซโตไคน์อักเสบและพรอสตาแกลนดินอีทู ซึ่งจะนำไปมีบทบาทสำคัญในการสนับสนุนให้มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์สลายกระดูก ส่งผลให้เกิดการละลายของกระดูกรอบปลายรากฟันตามมา

ผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเอสเชอริเชีย โคไล สามารถเพิ่มการแสดงออกของรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์ ในเซลล์กระดูกจากกระดูกเข้าฟันมนุษย์ได้ทั้ง 3 โล้น ซึ่งเซลล์ทั้ง 3 โล้นพบการแสดงออกของรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์แปรผันตรงกับความเข้มข้นของไลโปโพลีแซคคาไรด์ แต่ในขณะเดียวกันพบการแสดงออกของฮอสทีโอโปรเทจลินลดลงโดยแปรผกผันกับความเข้มข้นของไลโปโพลีแซคคาไรด์ และเมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นยังพบว่า การเปลี่ยนแปลงของรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์ เกิดขึ้นมากกว่าการเปลี่ยนแปลงของฮอสทีโอโปรเทจลินซึ่งผลการศึกษาไปในทิศทางเดียวกับการศึกษาของ Kikuchi และคณะ⁽⁷⁾ ที่ทำการศึกษาในเซลล์กระดูกสำเร็จรูปจากไขกระดูกของหนู (MC3T3-E1) พบว่า ไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเอสเชอริเชีย โคไล ส่งผลเพิ่มการแสดงออกของรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์มากกว่าลดการแสดงออกของฮอสทีโอโปรเทจลิน นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่ทำในเซลล์ปฐมภูมิจากสัตว์ทดลองได้แก่ การศึกษาของ Suda และคณะ⁽²⁾ ที่ทำการศึกษาในเซลล์จากกระดูกซี่โครงของหนู พบว่า ไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเอสเชอริเชีย โคไล ส่งผลเพิ่มการแสดงออกของรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์ และลดการแสดงออกของฮอสทีโอโปรเทจลินเช่นเดียวกัน แต่พบการเปลี่ยนแปลงของฮอสทีโอโปรเทจลินเกิดขึ้นมากกว่า ซึ่งสอดคล้องกับ

การศึกษาของ Ramires-Yanes และคณะ⁽⁸⁾ ที่ทำการศึกษาในเซลล์จากกระดูกซี่โครงและกระดูกยาวของหนู พบว่าพรอสตาแกลนดินอีทูเพิ่มการแสดงออกของรีเซปเตอร์แอดิเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด ลดการแสดงออกของฮอสทีโอโปรเทจรีนและพบการเปลี่ยนแปลงของฮอสทีโอโปรเทจรีนเกิดขึ้นมากกว่า

การศึกษาในเซลล์กระดูกมนุษย์ของ Brandstrom และคณะ^(9, 10) ที่ทำการศึกษาในกระดูกสะโพกและกระดูกหน้าแข้งของมนุษย์ พบว่าพรอสตาแกลนดินอีทูสามารถลดการแสดงออกของฮอสทีโอโปรเทจรีน และการศึกษาในเซลล์กระดูกมนุษย์สำเร็จรูปพบว่าพรอสตาแกลนดินอีทูสามารถเพิ่มการแสดงออกของรีเซปเตอร์แอดิเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด และลดการแสดงออกของฮอสทีโอโปรเทจรีน อีกทั้งยังพบว่ามี的增加จำนวนของเซลล์สลายกระดูกอีกด้วย⁽¹¹⁾

นอกจากการศึกษาในห้องปฏิบัติการแล้วยังมีการศึกษาในสัตว์ทดลองที่ให้ผลการศึกษาสอดคล้องกับการศึกษานี้ ได้แก่ การศึกษาของ Zhang และคณะ⁽¹²⁾ ที่พบว่าเมื่อทำให้เกิดการเผยแผ่ของเนื้อเยื่อในของหนูจะพบการแสดงออกของรีเซปเตอร์แอดิเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนดเพิ่มขึ้นสูงสุดวันที่ 14 และเป็นเวลาเดียวกับที่พบจำนวนเซลล์สลายกระดูกเพิ่มสูงสุดในขณะที่ Kawashima และคณะ⁽¹³⁾ ทำการศึกษาในหนูโดยทำให้เกิดการเผยแผ่ของเนื้อเยื่อในเช่นเดียวกันพบว่าการแสดงออกของรีเซปเตอร์แอดิเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนดและฮอสทีโอโปรเทจรีนเพิ่มขึ้นสูงสุดในช่วงสัปดาห์ที่ 2 และ 3 ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่พบว่าสัดส่วนการแสดงออกของรีเซปเตอร์แอดิเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนดต่อฮอสทีโอโปรเทจรีนเพิ่มขึ้นสูงสุดเช่นเดียวกัน สอดคล้องกับการศึกษาของ Chuang และคณะ⁽¹⁴⁾ ที่กระตุ้นการอักเสบด้วยการใส่ไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเอสเชริเชีย โคไล ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อ 1 มิลลิลิตรเข้าไปในคลองรากฟันของหนูพบว่าในช่วงสัปดาห์ที่ 3 จะมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์สลายกระดูกอย่างมากและขนาดของรอยโรครอบปลายรากฟันเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน อีกทั้งพบการแสดงออกของรีเซปเตอร์แอดิเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนดเพิ่มมากขึ้น ในขณะที่การแสดงออกของฮอสทีโอโปรเทจรีนลดลง ส่งผลให้สัดส่วนของรีเซปเตอร์แอดิเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนดต่อฮอสทีโอโปรเทจรีนสูงขึ้นมากกว่ากลุ่มควบคุม 7.53 เท่า ซึ่งเมื่อพิจารณาผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าเมื่อกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ ที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจะพบสัดส่วนของรีเซปเตอร์แอดิเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนดต่อฮอสทีโอโปรเทจรีน

ที่สูงขึ้น 2.81-5.18 เท่า แต่เมื่อกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ที่ความเข้มข้นสูงขึ้นคือ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจะพบสัดส่วนของรีเซปเตอร์แอคติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนส์ต่อออสทีโอโปรเทจรีนเพิ่มสูงขึ้นเป็น 6.52 - 10.27 เท่า ถึงแม้ว่าปริมาณของไลโปโพลีแซคคาไรด์ที่ใช้ในการศึกษาไม่เท่ากันและเป็นการศึกษาที่ต่างกัน คือ ทำการศึกษาในห้องปฏิบัติการกับศึกษาในสัตว์ทดลอง แต่ก็ให้ผลการศึกษาไปในทางเดียวกัน อาจแสดงให้เห็นว่าไลโปโพลีแซคคาไรด์ที่ความเข้มข้นต่ำหรือเกิดการอักเสบเพียงเล็กน้อยอาจจะยังไม่สามารถเปลี่ยนแปลงสมดุลย์ของสัดส่วน รีเซปเตอร์แอคติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนส์ต่อออสทีโอโปรเทจรีน หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนเพียงเล็กน้อยจึงยังไม่พบการละลายของกระดูกรอบปลายรากฟันได้ชัดเจน แต่หากการอักเสบดำเนินต่อไปเรื่อยๆ หรือมีปริมาณความเข้มข้นของไลโปโพลีแซคคาไรด์เพิ่มขึ้น จนทำให้สัดส่วนของรีเซปเตอร์แอคติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนส์ต่อออสทีโอโปรเทจรีนเพิ่มสูงขึ้น จะส่งผลให้เกิดการละลายของกระดูกรอบปลายรากฟันมากขึ้น เกิดเป็นรอยโรครอบปลายรากฟันขึ้นได้ ดังการศึกษาทางคลินิกในมนุษย์พบว่าฟันที่มีรอยโรครอบปลายรากฟัน จะมีการแสดงออกของรีเซปเตอร์แอคติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนส์เพิ่มมากขึ้น⁽¹⁵⁾

ในสภาวะปกติกระดูกมีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา คือมีการละลายตัวจากการทำหน้าที่ของเซลล์สลายกระดูกและสร้างกระดูกซ่อมแซมโดยเซลล์สร้างกระดูก ซึ่งสภาวะดังกล่าวสามารถตรวจพบการแสดงออกของรีเซปเตอร์แอคติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนส์และออสทีโอโปรเทจรีนในสัดส่วนที่ใกล้เคียงกัน เกิดสภาวะสมดุลย์ของการละลายและการสร้างของกระดูก^(14, 16) แต่หากพบว่าการอักเสบและการละลายของกระดูกรอบปลายรากฟันเกิดขึ้นจะพบการแสดงออกของรีเซปเตอร์แอคติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนส์และออสทีโอโปรเทจรีนเพิ่มมากขึ้น และยังพบสัดส่วนของรีเซปเตอร์แอคติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนส์ต่อออสทีโอโปรเทจรีนเพิ่มขึ้นอีกด้วย^(13, 16) แสดงให้เห็นว่ารีเซปเตอร์แอคติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนส์และออสทีโอโปรเทจรีนมีบทบาททั้งในสภาวะปกติและสภาวะที่เกิดการอักเสบ เพียงแต่แสดงออกในสัดส่วนที่แตกต่างกัน ดังนั้นสิ่งกระตุ้นใดที่มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของรีเซปเตอร์แอคติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนส์และออสทีโอโปรเทจรีนจนเสียสมดุลย์ จะสามารถส่งผลต่อการละลายของกระดูกได้เช่นเดียวกัน

แต่ทั้งนี้การศึกษาของ Menezes และคณะ⁽¹⁶⁾ กลับพบว่าภายในเนื้อเยื่ออักเสบรอบปลายรากฟัน (Periapical granuloma) สามารถตรวจพบการแสดงออกของรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์ได้มากกว่า น้อยกว่า หรือสมมูลกับการแสดงออกของออสทีโอโปรเทจรีน และพบวาร์รอยโรคที่มีขนาดใหญ่กว่า 5 มิลลิเมตรจะพบการแสดงออกของออสทีโอโปรเทจรีน มากกว่าวาร์รอยโรคที่มีขนาดเล็กกว่า 5 มิลลิเมตร การที่พบออสทีโอโปรเทจรีนมากกว่าแสดงให้เห็นวาร์รอยโรคขนาดใหญ่ นั้นอาจเข้าสู่ภาวะสมมูลคือไม่มีการละลายของกระดูกมากขึ้นแล้วพิจารณาได้จากการความสมมูลระหว่างรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์และออสทีโอโปรเทจรีน แต่ในวาร์รอยโรคที่มีขนาดเล็กกว่า 5 มิลลิเมตรจะพบการแสดงออกของรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์มากกว่าออสทีโอโปรเทจรีนแสดงถึงวาร์รอยโรคอาจกำลังอยู่ในช่วงขยายขอบเขตการละลายกระดูก ดังนั้นภายในวาร์รอยโรครอบปลายรากฟัน จะมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นอยู่ตลอดเวลา ขึ้นอยู่กับว่ามีสิ่งกระตุ้นมากน้อยเพียงใดและการเกิดพยาธิสภาพนั้นอยู่ในระยะใด ซึ่งจะส่งผลต่อการดำเนินไปของวาร์รอยโรครอบปลายรากฟัน

จากการศึกษาที่ผ่านมาหลายการศึกษาแสดงให้เห็นว่าไลโปโพลีแซคคาไรด์และพรอสตาแกลนดินอีทู ส่งผลเพิ่มการแสดงออกของรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์และลดการแสดงออกของออสทีโอโปรเทจรีน ซึ่งไม่ว่าจะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์หรือออสทีโอโปรเทจรีนมากกว่ากัน แต่ผลสุดท้ายก็ให้ผลการตอบสนองไปในทิศทางเดียวกัน คือ ส่งเสริมขบวนการสร้างเซลล์สลายกระดูก ทำให้เซลล์สลายกระดูกเพิ่มจำนวนมากขึ้น เกิดการละลายของกระดูกมากขึ้นเช่นเดียวกัน

แต่การศึกษาในครั้งนี้ไม่สามารถสรุปได้ว่าการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์และออสทีโอโปรเทจรีนที่เกิดขึ้นเป็นผลมาจากการที่ไลโปโพลีแซคคาไรด์ไปกระตุ้นเอนไซม์ไซโคลออกซีจีเนสทู ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของพรอสตาแกลนดินอีทูหรือไม่ เนื่องจากไม่มีการศึกษาการแสดงออกของตัวรับสัญญาณทอล-ไลค์ 4 ซึ่งตัวรับสัญญาณทอล-ไลค์ 4 ที่อยู่บนเซลล์สร้างกระดูกมีบทบาทสำคัญในการทำหน้าที่เป็นตัวรับของไลโปโพลีแซคคาไรด์ โดยเมื่อรับไลโปโพลีแซคคาไรด์เข้ามาภายในเซลล์แล้วจะสามารถกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มขึ้นของไซโคลออกซีจีเนสทู และพรอสตาแกลนดินอีทู ส่งผลต่อการแสดงออกของรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์และออสทีโอโปรเทจรีน ซึ่งหากเซลล์แต่ละไลน์มีการ

แสดงออกของตัวรับสัญญาณทอล-ไลค์ 4 ที่แตกต่างกัน อาจทำให้เกิดการตอบสนองต่อไลโปโพลีแซคคาไรด์ในระดับที่แตกต่างกัน ส่งผลต่อการแสดงออกของรีเซปเตอร์แอดิเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนดและอสทีโอโปรเทจรีนได้ โดยมีการศึกษาของ Mo และคณะ⁽¹⁷⁾ พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สร้างกระดูก (Human mesenchymal stromal cells) ในอาหารที่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้แปรสภาพเป็นเนื้อเยื่อแข็ง พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลานานมากขึ้น คือ เซลล์มีการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกเรื่อยๆ จะพบการแสดงออกของตัวรับสัญญาณทอล-ไลค์ 4 เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าไลโปโพลีแซคคาไรด์มีผลต่อการเพิ่มจำนวนและส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์สร้างกระดูก และพบว่าไลโปโพลีแซคคาไรด์ส่งผลต่อการแสดงออกของตัวรับสัญญาณทอล-ไลค์ 4 อีกด้วย คือเมื่อเซลล์สร้างกระดูกได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ที่เวลานานมากขึ้นจะพบการแสดงออกของตัวรับสัญญาณทอล-ไลค์ 4 ลดลง ดังนั้นระยะเวลาที่เซลล์สร้างกระดูกเจริญเติบโตและการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์จะส่งผลต่อการแสดงออกของตัวรับสัญญาณทอล-ไลค์ 4 ซึ่งอาจส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของรีเซปเตอร์แอดิเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนดและอสทีโอโปรเทจรีนได้ ดังนั้นในอนาคตอาจต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการแสดงออกของตัวรับสัญญาณทอล-ไลค์ 4 การแสดงออกของตัวรับของพรอสตาแกลนดิน (EP4 receptor) หรือการใส่สารยับยั้งไซโคลออกซิจีเนส (NS-398) รวมทั้งสารยับยั้งพรอสตาแกลนดินอีทู (Indomethacin) เพื่อยืนยันว่าการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของรีเซปเตอร์แอดิเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนดและอสทีโอโปรเทจรีนเป็นผลมาจากการที่ไลโปโพลีแซคคาไรด์ไปกระตุ้น ผ่านการทำงานของเอนไซม์ไซโคลออกซิจีเนสและเหนี่ยวนำการผลิตพรอสตาแกลนดินอีทูต่อไป

นอกจากนี้ยังเป็นที่น่าสังเกตว่าเซลล์ ALV1 เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์พบการแสดงออกของไซโคลออกซิจีเนสเพิ่มขึ้นเล็กน้อยแต่กลับพบการแสดงออกของรีเซปเตอร์แอดิเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนดเพิ่มขึ้นมาก ในขณะที่เซลล์ ALV3 เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์จะพบการแสดงออกของไซโคลออกซิจีเนสเพิ่มขึ้นมากแต่กลับพบการแสดงออกของรีเซปเตอร์แอดิเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนดเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย อาจเป็นไปได้ว่าเมื่อเซลล์สร้างกระดูกได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์แล้ว จะมีการกระตุ้นวิถีสัญญาณอื่นซึ่งไปเหนี่ยวนำการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของไซโตไคน์อื่นๆ ร่วมด้วย ส่งผล

ให้การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของไซโคลออกซีจีเนสไม่ไปในทิศทางเดียวกับการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของรีเซปเตอร์แอดิเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์

การศึกษาของ Coon และคณะ⁽¹⁸⁾ พบว่าเมื่อกระตุ้นเซลล์กระดูกจากกระดูกโครงกระดูกของหนูด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ ของเอสเชอริเชีย โคไล จะลดการแสดงออกทั้งรีเซปเตอร์แอดิเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์และออสทีโอโปรเทจรีน ซึ่งจากการศึกษาที่กล่าวมาก่อนหน้านี้จะพบว่าหากรีเซปเตอร์แอดิเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์มีการแสดงออกลดลงน่าจะทำให้เซลล์สลายกระดูกลดจำนวนลงด้วย แต่กลับยังพบการเพิ่มขึ้นของเซลล์สลายกระดูกได้ อาจเป็นไปได้ว่าไลโปโพลีแซคคาไรด์สามารถทำให้เกิดการละลายกระดูกได้โดยไม่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของรีเซปเตอร์แอดิเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์และออสทีโอโปรเทจรีน นอกจากนี้ Jiang และคณะ⁽¹⁹⁾ ยังศึกษาพบว่าไลโปโพลีแซคคาไรด์สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ตับอ่อนของหนู (Murine spleen cell) มีการพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สลายกระดูกได้โดยไม่ต้องมีการเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์สร้างกระดูก ซึ่งจะพบจำนวนเซลล์สลายกระดูกเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของไลโปโพลีแซคคาไรด์ที่เพิ่มมากขึ้น แสดงว่าขบวนการสร้างเซลล์สลายกระดูกไม่จำเป็นต้องอาศัยการส่งสัญญาณผ่านเซลล์สร้างกระดูกแต่อาจเกิดจากการที่ไลโปโพลีแซคคาไรด์ไปกระตุ้นตัวรับสัญญาณทอล-ไลค์ 4 บนเซลล์สลายกระดูกโดยตรง สนับสนุนโดยการศึกษาของ Suda และคณะ⁽²⁰⁾ พบว่าไลโปโพลีแซคคาไรด์สามารถทำให้เซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สลายกระดูก (Preosteoclasts : pOCs) พัฒนาไปเป็นเซลล์สลายกระดูกได้โดยตรง โดยเมื่อเติมออสทีโอโปรเทจรีน ซึ่งเชื่อว่ามีบทบาทในการยับยั้งกระบวนการสร้างเซลล์สลายกระดูกกลับพบว่าไม่สามารถลดจำนวนเซลล์สลายกระดูกได้ แสดงว่าขบวนการสร้างเซลล์สลายกระดูกไม่เกี่ยวข้องกับรีเซปเตอร์แอดิเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์และออสทีโอโปรเทจรีน สอดคล้องกับการศึกษาของ Hakeda และคณะ⁽²¹⁾ ที่ทำการศึกษาในเซลล์สลายกระดูกที่เจริญเติบโตเต็มที่ของกระต่ายพบว่า การเติมออสทีโอโปรเทจรีนสามารถลดจำนวนเซลล์สลายกระดูกและลดการละลายกระดูกลงได้ แต่กลับไม่พบการแสดงออกของรีเซปเตอร์แอดิเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์ แสดงว่าการละลายกระดูกไม่เกี่ยวข้องกับการรีเซปเตอร์แอดิเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์และออสทีโอโปรเทจรีน ซึ่งการศึกษาของ Kobayashi และคณะ⁽²²⁾ พบว่าขบวนการสร้างเซลล์สลายกระดูกมีความเกี่ยวข้องกับทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์แอลฟาและอินเตอร์ลิวคิน-1 อีกด้วย

จากการศึกษาเหล่านี้ อาจแสดงว่าไลโปโพลีแซคคาไรด์สามารถส่งเสริมกระบวนการละลายกระดูกและทำให้เกิดการละลายของกระดูกได้โดยไม่เกี่ยวข้องกับรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์และออสทีโอโปรเทจรีน แต่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นเซลล์สลายกระดูกโดยตรงหรือกระตุ้นผ่านทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์แอลฟาและอินเตอร์ลิวคิน-1

การตอบสนองต่อไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเซลล์ที่ 3 โหล์นเกิดขึ้นในระดับที่แตกต่างกัน เนื่องจากเซลล์กระดูกเข้าพันมนุษย์ที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นเซลล์ปฐมภูมิซึ่งมีข้อจำกัดในเรื่องของความไม่เป็นอันหนึ่งอันเดียวกันของเซลล์ (Heterogeneous phenotype) คือเซลล์จะมีอัตราการเจริญเติบโตที่ไม่เท่ากัน ทำให้มีทั้งเซลล์ที่เจริญเติบโตเต็มที่แล้วและเซลล์ที่กำลังพัฒนาอยู่รวมกัน ซึ่งอาจส่งผลต่อการแสดงออกยีนส์ได้⁽²³⁾ โดยมีการศึกษาในเซลล์จากกระดูกหนู และเซลล์จากกระดูกมนุษย์ พบว่าเซลล์กระดูกที่มีการเจริญเติบโตในช่วงเวลาที่แตกต่างกันจะส่งผลต่อการแสดงออกของรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์ คือเมื่อเซลล์มีการเจริญเติบโตเต็มที่มากขึ้นจะส่งผลให้มีการแสดงออกของรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์ลดลง ในขณะที่ไม่ค่อยมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของออสทีโอโปรเทจรีน⁽²⁴⁻²⁷⁾ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้จะพบว่าเซลล์ ALV3 จะมีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของรีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์น้อยกว่าอีก 2 โหล์น อาจเนื่องจากเซลล์ ALV3 มีการเจริญเติบโตที่รวดเร็วกว่า ส่งผลให้มีเซลล์ที่เจริญเติบโตเต็มที่แล้วมากกว่า สังเกตจากการที่มีการแสดงออกของออสทีโอแคลซิน มากกว่าเซลล์ ALV1 และ ALV2 ซึ่งออสทีโอแคลซินจะแสดงออกมากขึ้นเมื่อเซลล์กระดูกมีการเจริญเติบโตเต็มที่แล้ว^(28, 29) ส่งผลให้เกิดการตอบสนองในระดับที่แตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตามผลการศึกษาโดยรวมทั้งการแสดงออกของไซโคลออกซิจีเนสทู รีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์ และออสทีโอโปรเทจรีนก็ยังพบการตอบสนองไปในทิศทางเดียวกันทั้ง 3 โหล์น และสอดคล้องกับการศึกษาในเซลล์ปฐมภูมิจากสัตว์ทดลอง และการศึกษาในเซลล์สำเร็จรูปจากสัตว์ทดลองและมนุษย์

ถึงแม้ผลการศึกษาในครั้งนี้จะสอดคล้องกับการศึกษาอื่นๆ แต่การศึกษาที่ใช้เซลล์ต่างกัน จะมีการแสดงออกของลักษณะเซลล์สร้างกระดูก (Osteoblast phenotype) ที่ต่างกัน เช่น เซลล์สำเร็จรูปมนุษย์ชนิด SaOS-2 และเซลล์สำเร็จรูปของหนูชนิด MC3T3-E1 จะมีลักษณะของเซลล์สร้างกระดูกที่เจริญเติบโตเต็มที่ (Mature osteoblasts) แต่เซลล์สำเร็จรูปมนุษย์ชนิด MG-63 จะมีลักษณะ

ของเซลล์สร้างกระดูกที่กำลังพัฒนา (Preosteoblasts) ในขณะที่การใช้เซลล์ปฐมนิยามไม่ว่าจากมนุษย์หรือหนูจะมีเซลล์ที่กำลังพัฒนาอยู่ร่วมกับเซลล์ที่เจริญเติบโตเต็มที่แล้ว⁽²³⁾ ซึ่งการที่เซลล์มีลักษณะที่ต่างกันอาจส่งผลต่อการแสดงออกของยีนส์ได้ นอกจากชนิดของเซลล์แล้ว เซลล์กระดูกที่มาจากตำแหน่งต่างกันก็มีลักษณะที่แตกต่างกันด้วย เนื่องจากการมีต้นกำเนิดที่ต่างกันและได้รับการกระตุ้นรวมทั้งมีการตอบสนองต่อการทำหน้าที่ต่างกัน⁽³⁰⁾ โดยที่เซลล์จากกระดูกขากรรไกรมีคุณสมบัติต่างจากกระดูกในตำแหน่งอื่นๆ เนื่องจากกระดูกขากรรไกรมีต้นกำเนิดมาจากเซลล์นิวรัลเครส และเกิดขบวนการสร้างกระดูกแบบอินทราเมมเบรนาส มีการปรับแต่งรูปกระดูก (Bone remodeling) ที่รวดเร็วกว่าและมีความสามารถในการสร้างกระดูกมากกว่ากระดูกในตำแหน่งอื่นๆ⁽³¹⁾ โดย Kasperk และคณะ⁽³²⁾ พบว่าการที่เซลล์กระดูกขากรรไกรมีการเจริญเติบโตมากกว่ากระดูกสะโพกเนื่องจากการแสดงออกของไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ (Fibroblast growth factor: FGF) และอินซูลินไลค์โกรทแฟกเตอร์-2 (Insulin-like growth factor-2 : IGF-2) มากกว่า นอกจากนี้กระดูกขากรรไกรยังเป็นตำแหน่งที่ได้รับการกระตุ้นทางกล (Mechanical stimuli) ตลอดเวลาทั้งแรงจากกล้ามเนื้อบิดเคี้ยว กล้ามเนื้อบีบหนักรวมทั้งแรงบิดเคี้ยวจากฟันและเอ็นยึดปริทันต์โดยตรง และยังได้รับการกระตุ้นจากสารเคมีหรือไฮโดรโคโรน (Chemical stimuli) ที่เกิดจากตอบสนองต่อเชื้อจุลชีพทั้งจากเนื้อเยื่อในและเนื้อเยื่อปริทันต์โดยตรง อาจส่งผลให้มีการเจริญพัฒนาเซลล์กระดูก รวมทั้งตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นต่างๆมากกว่าเซลล์กระดูกจากตำแหน่งอื่น ดังนั้นการนำเซลล์กระดูกจากกระดูกเข้าฟันมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ น่าจะเป็นแสดงถึงการตอบสนองของเซลล์กระดูกเข้าฟันที่เกิดขึ้นจริงได้ใกล้เคียงกับทางคลินิกได้

นอกจากการตอบสนองของเซลล์กระดูกจากกระดูกเข้าฟันมนุษย์ต่อการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเอสเชอริเชีย โคไล จะส่งผลต่อการแสดงออกของไซโตไคน์ในสตรูมูรินเตอร์แอคทีเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด และฮีสทีโอโปรเทจวิน ดังรายงานการศึกษานี้แล้ว ยังมีรายงานการศึกษาของคณะผู้วิจัยก่อนหน้านี้ ที่ทำการศึกษาในเซลล์กระดูกเข้าฟันมนุษย์จากกลุ่มตัวอย่างเดียวกัน พบว่าไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเอสเชอริเชีย โคไล สามารถเพิ่มการแสดงออกของอินเตอร์ลิวคิน-6 และอินเตอร์ลิวคิน-8 ได้^(33, 34) การตอบสนองเหล่านี้เป็นผลมาจากไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อจุลชีพที่มีบทบาทใน รส่งเสริมให้เกิดการละลายของกระดูกรอบปลายรากฟัน ซึ่งการใช้เซลล์กระดูกจากกระดูกเข้าฟันมนุษย์ซึ่งมีลักษณะเฉพาะดังที่กล่าวมา

น่าจะเป็นตัวแทนที่ดีของการตอบสนองในบริเวณกระดูกรอบปลายรากฟัน ดังนั้นสามารถ:
เซลล์กระดูกจากกระดูกเบ้าฟันมนุษย์เป็นต้นแบบในการศึกษาเกี่ยวกับกลไกการตอบสนองอื่นๆ
เมื่อมีการติดเชื้อในคลองรากฟันและกระบวนการเกิดรอยโรครอบปลายรากฟัน หรือใช้ศึกษาคุณสมบัติ
ของวัสดุที่ใช้ในการรักษาคคลองรากฟันและศัลยกรรมปลายรากฟัน รวมทั้งการตอบสนองของเซลล์ต่อ
วัสดุที่ถูกพัฒนาขึ้นใหม่ ซึ่งพื้นฐานการศึกษาเหล่านี้จะนำไปสู่ความเข้าใจในการตอบสนองของเนื้อเยื่อ
รอบปลายรากฟัน รวมทั้งพัฒนาการรักษาคคลองรากฟันให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

บทสรุป

ภายใต้สภาวะของการวิจัยครั้งนี้พบว่าไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเอสเชอริเชีย โคไล สามารถ
กระตุ้นเซลล์กระดูกจากกระดูกเบ้าฟันมนุษย์ให้มีการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอของ
ไซโตไคน์อักเสบและรีเซปเตอร์แอดิเวเตอร์ของฟีนิลเคลิบ์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด์เพิ่มมากขึ้น
ในทางกลับกันพบการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอของออสทีโอโปรเทจรีนลดลง

บรรณานุกรม

1. Nair SP, Meghji S, Wilson M, Reddi K, White P, Henderson B. Bacterially induced bone destruction: mechanisms and misconceptions. *Infection and immunity*. 1996;64(7):2371-80.
2. Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists*. 2004;15(6):348-81.
3. Graves DT, Oates T, Garlet GP. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *Journal of oral microbiology*. 2011;3(1):5304-18.
4. Takahashi K. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. *International endodontic journal*. 1998;31(5):311-25.
5. Marton IJ, Kiss C. Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis. *Oral microbiology and immunology*. 2000;15(3):139-50.
6. Torabinejad M, Bakland LK. Prostaglandins: their possible role in the pathogenesis of pulpal and periapical diseases, part 1. *Journal of endodontics*. 1980;6(9):733-9.
7. Botting RM. Cyclooxygenase: past, present and future. *Journal of Thermal Biology*. 2006;31(1):208-19.
8. Kim N, Kadono Y, Takami M, Lee J, Lee SH, Okada F, et al. Osteoclast differentiation independent of the TRANCE-RANK-TRAF6 axis. *The Journal of experimental medicine*. 2005;202(5):589-95.
9. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(7):3597-602.

10. Udagawa N, Takahashi N, Jimi E, Matsuzaki K, Tsurukai T, Itoh K, et al.
Osteoblasts/stromal cells stimulate osteoclast activation through expression of osteoclast differentiation factor/RANKL but not macrophage colony-stimulating factor: receptor activator of NF-kappa B ligand. *Bone*. 1999;25(5):517-23.
11. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology*. 2001;142(12):5050-5.
12. Neve A, Corrado A, Cantatore FP. Osteoblast physiology in normal and pathological conditions. *Cell and tissue research*. 2011;343(2):289-302.
13. Katagiri T, Takahashi N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral diseases*. 2002;8(3):147-59.
14. Silva I, Branco JC. Rank/Rankl/opg: literature review. *Acta reumatologica portuguesa*. 2011;36(3):209-18.
15. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, et al.
Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 1997;89(2):309-19.
16. Hofbauer LC, Dunstan CR, Spelsberg TC, Riggs BL, Khosla S. Osteoprotegerin production by human osteoblast lineage cells is stimulated by vitamin D, bone morphogenetic protein-2, and cytokines. *Biochemical and biophysical research communications*. 1998;250(3):776-81.
17. Brandstrom H, Bjorkman T, Ljunggren O. Regulation of osteoprotegerin secretion from primary cultures of human bone marrow stromal cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2001;280(3):831-5.
18. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki SI, Yano K, Fujise N, et al. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology*. 1998;139(3):1329-37.
19. McNicholas S, Torabinejad M, Blankenship J, Bakland L. The concentration of prostaglandin E2 in human periradicular lesions. *Journal of endodontics*. 1991;17(3):97-100.

20. Takayama S, Miki Y, Shimauchi H, Okada H. Relationship between prostaglandin E2 concentrations in periapical exudates from root canals and clinical findings of periapical periodontitis. *Journal of endodontics*. 1996;22(12):677-80.
21. Vernal R, Dezerega A, Dutzan N, Chaparro A, Leon R, Chandia S, et al. RANKL in human periapical granuloma: possible involvement in periapical bone destruction. *Oral diseases*. 2006;12(3):283-9.
22. Sabeti M, Simon J, Kermani V, Valles Y, Rostein I. Detection of receptor activator of NF-kappa beta ligand in apical periodontitis. *Journal of endodontics*. 2005;31(1):17-8.
23. Gomes BP, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa EL, Zaia AA, Ferraz CC, et al. *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in endodontic lesions detected by culture and by PCR. *Oral microbiology and immunology*. 2005;20(4):211-5.
24. Machado de Oliveira JC, Siqueira JF, Jr., Alves GB, Hirata R, Jr., Andrade AF. Detection of *Porphyromonas endodontalis* in infected root canals by 16S rRNA gene-directed polymerase chain reaction. *Journal of endodontics*. 2000;26(12):729-32.
25. Siqueira JF, Jr., Rocas IN. Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis. *Brazilian dental journal*. 2007;18(4):267-80.
26. Kikuchi T, Matsuguchi T, Tsuboi N, Mitani A, Tanaka S, Matsuoka M, et al. Gene expression of osteoclast differentiation factor is induced by lipopolysaccharide in mouse osteoblasts via Toll-like receptors. *Journal of immunology*. 2001;166(5):3574-9.
27. Suda K, Udagawa N, Sato N, Takami M, Itoh K, Woo JT, et al. Suppression of osteoprotegerin expression by prostaglandin E2 is crucially involved in lipopolysaccharide-induced osteoclast formation. *Journal of immunology*. 2004;172(4):2504-10.
28. Inada M, Matsumoto C, Uematsu S, Akira S, Miyaura C. Membrane-bound prostaglandin synthase-1-mediated prostaglandin E2 production by osteoblast plays a critical role in lipopolysaccharide-induced bone loss associated with inflammation. *Journal of immunology*. 2006;177(3):1879-85.

29. Lucisano M, Nelson-Filho P, Silva R, Silva L, Rossi D. Role of endotoxin in the etiology of periapical lesions: molecular mechanisms involved in endotoxin's recognition and cell activation. *RGO-Revista Gaúcha de Odontologia*. 2014;62(3):289-98.
30. Leonardi R, Perrotta R, Loreto C, Musumeci G, Crimi S, Dos Santos J, et al. Toll-Like Receptor 4 Expression in the Epithelium of Inflammatory Periapical Lesions.: An immunohistochemical study. *European journal of histochemistry: EJH*. 2015;59(4):279-82.
31. Tang Y, Sun F, Li X, Zhou Y, Yin S, Zhou X. Porphyromonas endodontalis lipopolysaccharides induce RANKL by mouse osteoblast in a way different from that of Escherichia coli lipopolysaccharide. *Journal of endodontics*. 2011;37(12):1653-8.
32. Ito HO, Shuto T, Takada H, Koga T, Aida Y, Hirata M, et al. Lipopolysaccharides from Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia and Actinobacillus actinomycetemcomitans promote osteoclastic differentiation in vitro. *Archives of oral biology*. 1996;41(5):439-44.
33. Torabinejad M. Mediators of acute and chronic periradicular lesions. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*. 1994;78(4):511-21.
34. Sugimoto Y, Narumiya S. Prostaglandin E receptors. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(16):11613-7.
35. Stack E, DuBois RN. Regulation of cyclo-oxygenase-2. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2001;15(5):787-800.
36. Phipps RP, Stein SH, Roper RL. A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. *Immunology today*. 1991;12(10):349-52.
37. Shimauchi H, Takayama S, Miki Y, Okada H. The change of periapical exudate prostaglandin E2 levels during root canal treatment. *Journal of endodontics*. 1997;23(12):755-8.
38. Shahriari S, Rezaei A, Jalalzadeh SM, Mani K, Zamani A. Effect of Ibuprofen on IL-1beta, TNF-alpha and PGE2 levels in periapical exudates: a double blinded clinical trial. *Iranian journal of immunology : IJI*. 2011;8(3):176-82.

39. Hofbauer LC. Osteoprotegerin ligand and osteoprotegerin: novel implications for osteoclast biology and bone metabolism. *European journal of endocrinology*. 1999;141(3):195-210.
40. Takahashi N, Udagawa N, Suda T. A new member of tumor necrosis factor ligand family, ODF/OPGL/TRANCE/RANKL, regulates osteoclast differentiation and function. *Biochemical and biophysical research communications*. 1999;256(3):449-55.
41. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2008;473(2):139-46.
42. Akatsu T, Murakami T, Nishikawa M, Ono K, Shinomiya N, Tsuda E, et al. Osteoclastogenesis inhibitory factor suppresses osteoclast survival by interfering in the interaction of stromal cells with osteoclast. *Biochemical and biophysical research communications*. 1998;250(2):229-34.
43. Reid P, Holen I. Pathophysiological roles of osteoprotegerin (OPG). *European journal of cell biology*. 2009;88(1):1-17.
44. O'Brien EA, Williams JH, Marshall MJ. Osteoprotegerin is produced when prostaglandin synthesis is inhibited causing osteoclasts to detach from the surface of mouse parietal bone and attach to the endocranial membrane. *Bone*. 2001;28(2):208-14.
45. Vega D, Maalouf NM, Sakhaee K. CLINICAL Review #: the role of receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANK)/RANK ligand/osteoprotegerin: clinical implications. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2007;92(12):4514-21.
46. Lerner UH. New Molecules in the Tumor Necrosis Factor Ligand and Receptor Superfamilies with Importance for Physiological and Pathological Bone Resorption. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists*. 2004;15(2):64-81.
47. Jiang J, Li H, Fahid FS, Filbert E, Safavi KE, Spangberg LS, et al. Quantitative analysis of osteoclast-specific gene markers stimulated by lipopolysaccharide. *Journal of endodontics*. 2006;32(8):742-6.

48. Reddi D, Bostanci N, Hashim A, Aduse-Opoku J, Curtis MA, Hughes FJ, et al.
Porphyromonas gingivalis regulates the RANKL-OPG system in bone marrow stromal cells. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2008;10(14-15):1459-68.
49. Kawashima N, Suzuki N, Yang G, Ohi C, Okuhara S, Nakano-Kawanishi H, et al.
 Kinetics of RANKL, RANK and OPG expressions in experimentally induced rat periapical lesions. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2007;103(5):707-11.
50. Li X, Pilbeam CC, Pan L, Breyer RM, Raisz LG. Effects of prostaglandin E2 on gene expression in primary osteoblastic cells from prostaglandin receptor knockout mice. *Bone*. 2002;30(4):567-73.
51. Mayahara K, Yamaguchi A, Takenouchi H, Kariya T, Taguchi H, Shimizu N. Osteoblasts stimulate osteoclastogenesis via RANKL expression more strongly than periodontal ligament cells do in response to PGE(2). *Archives of oral biology*. 2012;57(10):1377-84.
52. Brandstrom H, Jonsson KB, Ohlsson C, Vidal O, Ljunghall S, Ljunggren O. Regulation of osteoprotegerin mRNA levels by prostaglandin E2 in human bone marrow stroma cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 1998;247(2):338-41.
53. Armada L, Marotta Pdos S, Pires FR, Siqueira JF, Jr. Expression and Distribution of Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B, Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand, and Osteoprotegerin in Periradicular Cysts. *Journal of endodontics*. 2015;41(8):1281-7.
54. Islam S, Hassan F, Tumurkhuu G, Dagvadorj J, Koide N, Naiki Y, et al. Bacterial lipopolysaccharide induces osteoclast formation in RAW 264.7 macrophage cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2007;360(2):346-51.
55. Suda K, Woo JT, Takami M, Sexton PM, Nagai K. Lipopolysaccharide supports survival and fusion of preosteoclasts independent of TNF-alpha, IL-1, and RANKL. *Journal of cellular physiology*. 2002;190(1):101-8.
56. Nishimura M, Takase K, Suehiro F, Murata H. Candidates cell sources to regenerate alveolar bone from oral tissue. *International journal of dentistry*. 2012;2012(1):1-5.

57. Aghaloo TL, Chaichanasakul T, Bezouglaia O, Kang B, Franco R, Dry SM, et al.
Osteogenic potential of mandibular vs. long-bone marrow stromal cells. *Journal of dental research*. 2010;89(11):1293-8.
58. Akintoye SO, Lam T, Shi S, Brahim J, Collins MT, Robey PG. Skeletal site-specific characterization of orofacial and iliac crest human bone marrow stromal cells in same individuals. *Bone*. 2006;38(6):758-68.
59. Gartland A, Buckley KA, Dillon JP, Curran JM, Hunt JA, Gallagher JA. Isolation and culture of human osteoblasts. *Human Cell Culture Protocols*. 2005:29-54.
60. Shoji M, Tanabe N, Mitsui N, Suzuki N, Takeichi O, Katono T, et al. Lipopolysaccharide enhances the production of nicotine-induced prostaglandin E2 by an increase in cyclooxygenase-2 expression in osteoblasts. *Acta biochimica et biophysica Sinica*. 2007;39(3):163-72.
61. Ramirez-Yanez GO, Symons AL. Prostaglandin E2 affects osteoblast biology in a dose-dependent manner: an in vitro study. *Archives of oral biology*. 2012;57(9):1274-81.
62. Zhang X, Peng B. Immunolocalization of receptor activator of NF kappa B ligand in rat periapical lesions. *Journal of endodontics*. 2005;31(8):574-7.
63. Chuang FH, Tsai CC, Chen JH, Chen KK, Chen YK, Lin YC. Long-term sequential receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) expression in lipopolysaccharide-induced rat periapical lesions. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2012;41(2):186-93.
64. Menezes R, Garlet TP, Letra A, Bramante CM, Campanelli AP, Figueira Rde C, et al.
Differential patterns of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand/osteoprotegerin expression in human periapical granulomas: possible association with progressive or stable nature of the lesions. *Journal of endodontics*. 2008;34(8):932-8.
65. Mo IF, Yip KH, Chan WK, Law HK, Lau YL, Chan GC. Prolonged exposure to bacterial toxins downregulated expression of toll-like receptors in mesenchymal stromal cell-derived osteoprogenitors. *BMC cell biology*. 2008;9(52):1-12.

66. Coon D, Gulati A, Cowan C, He J. The role of cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory bone resorption. *Journal of endodontics*. 2007;33(4):432-6.
67. Jiang Y, Mehta CK, Hsu TY, Alsulaimani FF. Bacteria induce osteoclastogenesis via an osteoblast-independent pathway. *Infection and immunity*. 2002;70(6):3143-8.
68. Hakeda Y, Kobayashi Y, Yamaguchi K, Yasuda H, Tsuda E, Higashio K, et al. Osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) directly inhibits bone-resorbing activity of isolated mature osteoclasts. *Biochemical and biophysical research communications*. 1998;251(3):796-801.
69. Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Takami M, Kotake S, et al. Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *The Journal of experimental medicine*. 2000;191(2):275-86.
70. Czekanska EM, Stoddart MJ, Richards RG, Hayes JS. In search of an osteoblast cell model for in vitro research. *European cells & materials*. 2012;24:1-17.
71. Atkins GJ, Kostakis P, Pan B, Farrugia A, Gronthos S, Evdokiou A, et al. RANKL expression is related to the differentiation state of human osteoblasts. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2003;18(6):1088-98.
72. Thomas GP, Baker SU, Eisman JA, Gardiner EM. Changing RANKL/OPG mRNA expression in differentiating murine primary osteoblasts. *The Journal of endocrinology*. 2001;170(2):451-60.
73. Gori F, Hofbauer LC, Dunstan CR, Spelsberg TC, Khosla S, Riggs BL. The expression of osteoprotegerin and RANK ligand and the support of osteoclast formation by stromal-osteoblast lineage cells is developmentally regulated. *Endocrinology*. 2000;141(12):4768-76.
74. Deyama Y, Takeyama S, Koshikawa M, Shirai Y, Yoshimura Y, Nishikata M, et al. Osteoblast maturation suppressed osteoclastogenesis in coculture with bone marrow cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2000;274(1):249-54.

75. Seibel MJ. Biochemical markers of bone turnover: part I: biochemistry and variability. The Clinical biochemist Reviews. 2005;26(4):97-122.
76. Martin TJ, Ng KW. Mechanisms by which cells of the osteoblast lineage control osteoclast formation and activity. Journal of cellular biochemistry. 1994;56(3):357-66.
77. Sodek J, McKee MD. Molecular and cellular biology of alveolar bone. Periodontology 2000. 2000;24:99-126.
78. Kasperk C, Wergedal J, Strong D, Farley J, Wangerin K, Gropp H, et al. Human bone cell phenotypes differ depending on their skeletal site of origin. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 1995;80(8):2511-7.
79. อินทรา วงษ์เยาว์ฟ้า, นีรดา ธเนศวร, ชื่นชีวิต ทองศิริ. การตอบสนองของเซลล์สร้างกระดูกจากกระดูกเบ้าฟันมนุษย์เมื่อกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ต่อการแสดงออกของอินเตอร်ลิวคิน 6 และผลต่อการทำงานของอัลคาไรด์ฟอสฟาเตส. ในการประชุมวิชาการระดับชาติเพื่อการพัฒนาความรู้วิจัยอย่างยั่งยืน; 2555: 25-26 ธันวาคม; กรุงเทพมหานคร.
80. จรัสลักษณ์ สุขอวยชัย, อินทรา วงษ์เยาว์ฟ้า, นีรดา ธเนศวร. การแสดงออกของอินเตอร်ลิวคิน-8 ในเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์เมื่อถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์. วิทยาสารทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. 2557;7(1):47-59.



ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นางสาวพีรรัตน์ หลีกาพันธ์
วันเดือนปีเกิด	18 เมษายน 2527
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดสิงห์บุรี
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	2/536 คอนโดสุภาลัยปาร์คแยกเกษตร ถนนประเสริฐมนูกิจ แขวงเสนานิคม เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900
ตำแหน่งหน้าที่การงานในปัจจุบัน	ทันตแพทย์ชำนาญการ
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	แผนกทันตกรรม โรงพยาบาลขุนหาญ ตำบลลิ อำเภอขุนหาญ จังหวัดศรีสะเกษ 33150
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2545	มัธยมศึกษาตอนปลาย จาก โรงเรียนหอวัง
พ.ศ. 2552	ทันตแพทยศาสตรบัณฑิต จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
พ.ศ. 2560	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาทันตกรรมคลินิก จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ