



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 ภาสันต์
คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่วันที่การศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
ประจำปีงบประมาณ 2557
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR) are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

บทคัดย่อ

เซลล์เอ็นซีตปริทันต์มนุษย์มีบทบาทสำคัญในการรักษาสมดุลของเนื้อเยื่อเอ็นซีตปริทันต์ภายใต้สภาวะที่ได้รับแรงจากการบาดเจ็บ หรือแรงจากการจัดฟัน อย่างไรก็ตามกลไกการควบคุมดังกล่าวยังไม่มีความชัดเจน สมดุลของเนื้อเยื่อเกิดจากสมดุลระหว่างการสร้างและการทำลายเมทริกซ์โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบ เอนไซม์จึงมีบทบาทในการรักษาสมดุลของเนื้อเยื่อในส่วนของกรย่อยสลาย ดังนั้น การวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอิทธิพลของแรงดึงต่อการแสดงออกของเอนไซม์กลุ่มเมทริกซ์เมทาโลโปรตีนเนสและตัวยับยั้งของเอนไซม์กลุ่มนี้ โดยศึกษาอิทธิพลของแรงดึงภายใต้ปัจจัยของ รูปแบบของแรง ขนาด ความถี่ และระยะเวลาที่เซลล์ได้รับแรง ทำการศึกษาในห้องปฏิบัติการ โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้จากเอ็นซีตปริทันต์ของมนุษย์ ซึ่งกระบวนการได้มาของเซลล์ ได้ผ่านการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมในมนุษย์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เซลล์ได้รับแรงจากเครื่องกำเนิดแรงดึงซึ่งพัฒนาขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ แรงที่ให้เป็นแรงดึงเชิงเส้นแกนเดียว ออกแบบการทดลองโดยปรับเปลี่ยนปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับแรง ได้แก่ รูปแบบของแรง ขนาด ความถี่ และระยะเวลา ตลอดจนศึกษาปัจจัยดังกล่าวภายใต้สภาวะที่เดิมอินเตอร์ลิวคิน -1 เพื่อเลียนแบบสภาวะการอักเสบ อาร์เอ็นเอจะถูกสกัดจากเซลล์เพื่อตรวจวัดการแสดงออกของระดับยีนของเมทริกซ์เมทาโลโปรตีนเนสและตัวยับยั้งของเอนไซม์ภายใต้สภาวะที่กำหนด ซึ่งได้ผลการวิจัยในเบื้องต้นดังนี้ รูปแบบของแรงแบบต่อเนื่องหรือแบบเป็นรอบ ให้ผลแตกต่างสำหรับการแสดงออกของเอ็มเอ็มพี-13 ในขณะที่ขนาดของแรง ในกรณีที่ให้แรงแบบต่อเนื่อง มีผลต่อการแสดงออกของเอ็มเอ็มพี-14 และในกรณีที่เซลล์ได้รับแรงดึงร่วมกับอินเตอร์ลิวคิน -1 พบว่า ระดับของความถี่มีผลในการรักษาระดับการแสดงออกของเอ็มเอ็มพี-2 และเอ็มเอ็มพี-3 ให้อยู่ในระดับปกติ อย่างไรก็ตามยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันผลการทดลอง ตลอดจนตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงในระดับโปรตีน และศึกษาต่อในส่วนของกลไกที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว ทั้งนี้ความเข้าใจผลอันเนื่องมาจากอิทธิพลของแรง หรือทั้งในกรณีของการได้รับแรงร่วมกับสภาวะอักเสบ ในด้านของกลไกการควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ จะเป็นการป้องกันไม่ให้เกิดอันตรายกับเนื้อเยื่อปริทันต์จากการให้แรงที่ไม่เหมาะสม

คำสำคัญ: เซลล์เอ็นซีตปริทันต์มนุษย์, แรงดึง, อินเตอร์ลิวคิน -1, เมทริกซ์เมทาโลโปรตีนเนส

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 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, 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. Effect of inflammation on cells under tensile strain was studied by simulating an inflammatory condition using interleukin-1 β . The expressions of MMPs and TIMPs were initially analyzed by quantitative real-time PCR. The results demonstrated that tensile force, with or without interleukin-1 β , have the effect on the expressions of MMPs and TIMPs, but with the different extents according to the strain regimens. The initial results suggested the role of static/cyclic tensile force on MMP-13 expression, the magnitude of the static mode of tensile force on MMP-14 expression, and the tensile frequency on MMP-2 and MMP-3 homeostasis under an inflammatory condition. Studies on the expression at the protein levels and the mechanism of action must be further investigated. A better understanding of the effect of mechanical loading alone or an interaction with inflammation in the aspect of proteolytic imbalance may raise the concern on an applied force to prevent destruction of periodontal tissues.

Keywords: human periodontal ligament cells, tensile force, interleukin-1 β , MMPs

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อ	i
Abstract	ii
สารบัญเรื่อง	iii
สารบัญภาพ	iv
คำย่อที่ใช้ในการวิจัย	vii
บทนำ	1
วิธีดำเนินการวิจัย	11
ผลการวิจัย	13
วิจารณ์	23
สรุป	26
บรรณานุกรม	27
ประวัติคณະนักวิจัย	32

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 แสดงระดับการแสดงออกของยีนที่ศึกษาในเซลล์เอ็นอีคปริทันต์ที่เพาะเลี้ยงบนจานเลี้ยงเซลล์(Plastic) เปรียบเทียบกับบนแผ่น Gelatin coated silicone ภายหลังเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	13
รูปที่ 2 รูปร่างเซลล์เอ็นอีคปริทันต์	14
รูปที่ 3 แผนภูมิแท่งแสดงจำนวนเท่าของจำนวนเซลล์ วิเคราะห์โดยเทคนิค MTT เมื่อให้แรงดึงแบบ cyclic ทำการดึงแผ่น silicone ให้ยืดยึดออกเป็นระยะร้อยละ 10 ของความยาวเดิม ที่ความถี่ 15, 60 และ 90 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง	15
รูปที่ 4 แผนภูมิแท่งแสดงจำนวนเท่าของระดับการแสดงออกของ cox-2 mRNA เมื่อได้รับแรงดึงแบบ cyclic ที่ความถี่ 60 รอบต่อนาที (60rpm) ดึงแผ่น silicone ให้ยืดยึดออกเป็นระยะร้อยละ 10 ของความยาวเดิมเป็นเวลา 2 ชั่วโมง	16
รูปที่ 5 แผนภูมิแท่งแสดงจำนวนเท่าของระดับการแสดงออกของยีนเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Q-PCR เมื่อให้แรงดึงแบบ cyclic ดึงแผ่น silicone ให้ยืดยึดออกเป็นระยะร้อยละ 10 ของความยาวเดิม ที่ความถี่ 60 รอบต่อนาที (rpm) เปรียบเทียบการแสดงออกของยีนภายหลังได้รับแรงที่ 2, 4 และ 6 ชั่วโมง	17
รูปที่ 6 แผนภูมิแท่งแสดงจำนวนเท่าของการแสดงออกของยีนเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Q-PCR เมื่อให้แรงดึงแบบ cyclic ดึงแผ่น silicone ให้ยืดยึดออกเป็นระยะร้อยละ 10 ของความยาวเดิม ที่ความถี่ 60 รอบต่อนาที (rpm) เปรียบเทียบการแสดงออกของยีนภายหลังได้รับแรงดึงแบบ cyclic ที่ 4 ชั่วโมง พัก 4 ชั่วโมง และ แรงดึงแบบ cyclic ที่ 2 ชั่วโมง พัก 2 ชั่วโมง ดึง 2 ชั่วโมง พัก 2 ชั่วโมง	18

หน้า

- รูปที่ 7** แผนภูมิแท่งแสดงจำนวนเท่าของการแสดงออกของยีนเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Q-PCR ด้วยแรงดึงแบบ cyclic ดึงแผ่น silicone ให้ยี่ดออกเป็นระยะร้อยละ 10 ของความยาวเดิม ที่ความถี่ 15, 30, 60 และ 90 รอบต่อนาที (rpm) ที่เวลา 2 ชั่วโมง 19
- รูปที่ 8** แผนภูมิแท่งแสดงจำนวนเท่าของการแสดงออกของยีนเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Q-PCR โดยให้แรงดึงแบบเป็นรอบ (cyclic) ที่ 15 รอบต่อนาที ดึงแผ่น silicone ให้ยี่ดออกเป็นระยะร้อยละ 10 (cy/10%) และ 20 (cy/20%) และกลุ่มที่ได้รับแรงดึงแบบต่อเนื่อง (static) ที่ระยะยี่ดออกร้อยละ 10 (sta/10%) และ 20 (sta/20%) ที่เวลา 2 ชั่วโมง 20
- รูปที่ 9** แผนภูมิแท่งแสดงจำนวนเท่าของระดับการแสดงออกของยีนเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Q-PCR เมื่อให้แรงดึงแบบ cyclic ดึงแผ่น silicone ให้ยี่ดออกเป็นระยะร้อยละ 10 ของความยาวเดิม ที่ความถี่ 15 และ 60 รอบต่อนาที (rpm) ในสภาวะที่มีและไม่มี 10 ng/ml IL-1 β ที่ 2 ชั่วโมง 22

คำย่อที่ใช้ในการวิจัย

PDL	Periodontal ligament
MMPs	Matrix metalloproteinases
TIMPs	Tissue inhibitor of metalloproteinases
IL-1 β	Interleukin-1 beta
Cox-2	Cyclo-oxygenase-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 หรือคุณลักษณะของเซลล์ 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) และยังพบว่าเซลล์เอ็นยึดปริทันต์มีคุณสมบัติในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก (osteoblasts) และเซลล์สร้างเคลือบรากฟัน (cementoblasts) ได้ (Shuttleworth CA, *et al.*, 1983) อย่างไรก็ตาม ความสัมพันธ์ของแรงกับหน้าที่ของเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ในประเด็นเหล่านี้ ยังไม่มีความชัดเจน

ในกรณีของโรคปริทันต์ ซึ่งเป็นโรคของเนื้อเยื่อปริทันต์ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย ร่วมกับผลของกลไกการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อแบคทีเรียและสารหลังจากแบคทีเรียนั้นๆ ส่งผลให้เกิดการอักเสบ (inflammation) ซึ่งนำไปสู่การทำลายของเหงือก เอ็นยึดปริทันต์ กระดูกเบ้าฟัน และทำให้สูญเสียการยึดอยู่ของฟันในที่สุด ปรากฏหลักฐานว่า ภายในเนื้อเยื่อของรอยโรค จะพบ interleukin-1 β (IL-1 β) ซึ่งเป็น primary pro-inflammatory cytokines ที่สำคัญ มีระดับสูงกว่าปกติ โดย Cytokines นี้ จะหลังจาก เซลล์เม็ดเลือดขาว และมีผลต่อเซลล์ต่างๆ ในเนื้อเยื่อปริทันต์ รวมทั้งเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ ในส่วนของเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ พบว่า เซลล์เหล่านี้ สามารถรับรู้และตอบสนองต่อ IL-1 β โดยเพิ่มการผลิต inflammatory cytokines ตัวอื่นๆ ต่อไปเป็นลำดับ ซึ่งผลของ IL-1 β และ ไซโตไคน์เหล่านี้นำไปสู่การเพิ่มการผลิตเอนไซม์ในกลุ่มโปรติเอส ซึ่งนำไปสู่การทำลายของเนื้อเยื่อเอ็นยึดปริทันต์

รายงานเกี่ยวกับผลของแรง ที่มีต่อการตอบสนองของเซลล์ในสภาวะอักเสบของโรคปริทันต์ ยังมีน้อยมาก มีโดยพบเพียงรายงานการศึกษาของ Nokhbehshaim และคณะ ในเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ของมนุษย์ ที่รายงานความสัมพันธ์ระหว่าง ผลของ cyclic tensile strain ในสภาวะที่เติม IL-1 β เพื่อเลียนแบบสภาวะอักเสบ พบว่าระดับการแสดงออกของคอลลาเจนและโปรตีน ที่เกี่ยวข้องในการสร้างกระดูกจะลดลง (Nokhbehshaim M, *et al.*, 2010) ดังนั้น จึงเป็นไปได้ที่ แรงจากการบดเคี้ยวภายใต้สภาวะอักเสบของเนื้อเยื่อจากโรคปริทันต์เพิ่มความรุนแรงให้กับโรคปริทันต์เนื่องจากความบกพร่องของกลไกการซ่อมแซม

วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้ ต้องการศึกษอิทธิพลของแรงที่มีต่อสัดส่วนและระดับการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix) กลุ่ม matrix metalloproteinases (MMPs) ซึ่งเป็นเอนไซม์กลุ่มเดียวที่มีความสามารถในการย่อยสลายคอลลาเจนและมีความสามารถในการย่อยสลายเมทริกซ์นอกเซลล์ที่ไม่ใช่คอลลาเจนอีกหลายชนิด ตลอดจนศึกษาการทำงานของตัวยับยั้งการทำงาน (inhibitors) ของเอนไซม์กลุ่ม MMPs ทั้งในสภาวะปกติ และสภาวะที่มีพยาธิสภาพร่วมด้วย เช่น สภาวะการอักเสบในโรคปริทันต์ เซลล์เอ็นยึดปริทันต์จะมีการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนและระดับการสร้างเอนไซม์กลุ่ม MMPs และตัวยับยั้งการทำงานไปในรูปแบบและทิศทางใด โดยองค์ความรู้ที่ได้ จะเป็นประโยชน์ในการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อพัฒนาวิธีการบูรณะและซ่อมแซมเนื้อเยื่อปริทันต์ต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย

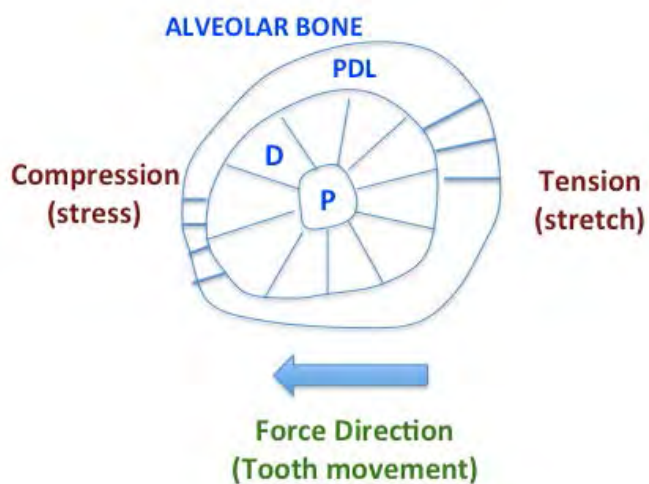
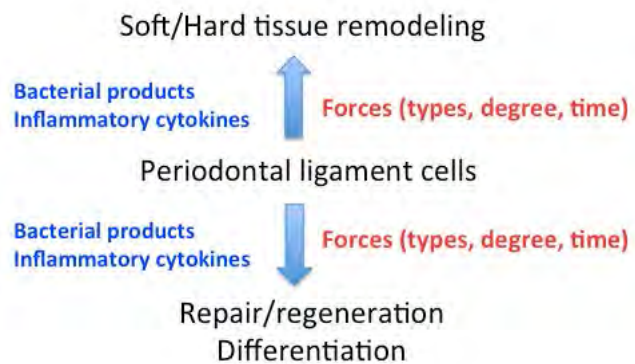
1. ศึกษาผลของ cyclic stretch ที่เกิดจากขึ้นจากแรงในขนาดต่างๆ ที่มีผลต่อระดับการแสดงออกของเอนไซม์ที่ใช้ย่อยสลายเมทริกซ์นอกเซลล์ เช่น เอนไซม์กลุ่ม MMPs และตัวยับยั้ง TIMPs ในเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ของมนุษย์ในสภาวะปกติและในสภาวะที่มี interleukin-1 β
2. ศึกษาผลของ ระยะเวลา และความถี่ ของ cyclic stretch ที่มีต่อ ระดับการแสดงออกของเอนไซม์ที่ใช้ย่อยสลายเมทริกซ์นอกเซลล์ เช่น เอนไซม์กลุ่ม MMPs และตัวยับยั้ง TIMPs ในเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ของมนุษย์ในสภาวะปกติและในสภาวะที่มี interleukin-1 β

ขอบเขตการวิจัย

เป็นโครงการวิจัยพื้นฐาน ที่ทำในห้องปฏิบัติการ โดยทำการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้จากเนื้อเยื่อเอ็นดอทีเลียล และทดสอบผลของแรงในรูปแบบและระยะเวลาต่างๆ กัน ด้วยเครื่องมือสำหรับสร้างแรงดึงในห้องปฏิบัติการ ที่มีต่อพฤติกรรมของเซลล์ ทั้งนี้เซลล์จะเพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อเอ็นดอทีเลียลของมนุษย์ ที่ได้จากพังการวมใหญ่ซี่ที่ 3 ที่ได้รับการวินิจฉัยให้ถอนหรือผ่าออกและ/หรือ พังการวมเล็กที่ต้องถูกถอนด้วยเหตุที่ต้องจัดฟัน โดยฟันดังกล่าวต้องไม่มีพยาธิสภาพ การทดลองและวิเคราะห์ผลในแต่ละส่วนของการศึกษาจะทำอย่างน้อย 3 ครั้ง ผลการทดลองที่ได้จะเพิ่มความเข้าใจพฤติกรรมการตอบสนองของเซลล์ต่อเมื่อได้รับแรงในรูปแบบของการยืด-คลาย (stretch-relax) ในรูปแบบที่ใกล้เคียงกับแรงในธรรมชาติที่เอ็นดอทีเลียลได้รับ และกลไกในการรับรู้และการถ่ายทอดสัญญาณภายในเซลล์ต่อระดับการแสดงออกของเอนไซม์ MMPs และตัวยับยั้ง TIMPs โดยการศึกษาจะทำเปรียบเทียบกับในสถานะที่มีการอักเสบด้วย โดยจำลองสภาวะจากการกระตุ้นร่วมด้วย interleukin-1 β ซึ่งการศึกษานี้ จะทำให้เข้าใจส่วนหนึ่งของกลไกที่ควบคุมสมดุลของเนื้อเยื่อ และพัฒนาการของรอยโรคปริทันต์ได้มากขึ้น เพื่อประโยชน์ในการพัฒนาวิธีการให้การรักษา หรือการซ่อมแซมเนื้อเยื่อในรอยโรคต่อไป

สมมุติฐานและกรอบแนวคิดของการวิจัย

สมมุติฐานของงานวิจัยนี้ ตั้งอยู่บนพื้นฐานที่ว่า แรงที่เหมาะสมจะมีผลต่อการทำหน้าที่ของเซลล์เอ็นดอทีเลียล เช่นเดียวกับที่พบในเซลล์กระดูก โดยการให้แรงในรูปแบบของแรงกด หรือแรงดึงแบบเป็นรอบ (cyclic force) มีผลส่งเสริมการเกิด tissue remodeling คือมีสมดุลของการสร้างและการทำลายของเนื้อเยื่อ ตลอดจนมีอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ที่สม่ำเสมอ และคงสภาพของความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดไว้ได้ ทั้งนี้โดยแปรผันต่อขนาดและความถี่ของแรงที่เกิดขึ้น ในขณะที่แรงกด หรือแรงดึงแบบคงที่ (static force) จะให้ผลในการกระตุ้นการแปรสภาพของเซลล์ โดยแปรผันตามขนาดของแรง และระยะเวลาที่เซลล์ได้รับแรง โดยอาจกระตุ้นให้เซลล์เพิ่มระดับการทำลายเนื้อเยื่อหรือเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก (diagram)



บททวนวรรณกรรม

บทบาทและความสำคัญของแรง

แรง (mechanical forces) เป็นปัจจัยแวดล้อมหนึ่งที่เซลล์ในร่างกายได้รับอยู่ตลอดเวลา เริ่มตั้งแต่แรงดึงดูดของโลก แรงที่เกิดจากการเคลื่อนไหวของร่างกาย การหดตัวของกล้ามเนื้อ การไหลเวียนของโลหิต เป็นต้น แรงในระดับที่เหมาะสมเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญในการควบคุมสมดุลของการสร้างและการทำลาย ตลอดจนการทำงานของเนื้อเยื่อของร่างกาย เป็นที่ทราบกันดีว่าการเจ็บป่วยที่ทำให้ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ หรือต้องนอนบนเตียงตลอดเวลา (Bloomfield SA, 1997) นำไปสู่การฝ่อลีบของกล้ามเนื้อ และสูญเสียความแข็งแรงของกระดูก ตลอดจนการอยู่ในสภาวะไร้น้ำหนัก เช่น ในอวกาศ ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน (Johnson RB, 1998) ทั้งนี้ระดับของแรงที่เซลล์รับรู้ว่าจะเหมาะสม มากเกินไป หรือน้อยเกินไปในแต่ละสภาวะ หรือกิจกรรมนั้นๆ แตกต่างกันไปตามชนิดของเซลล์ที่อยู่ในเนื้อเยื่อ หรืออวัยวะที่มีแรงมากระทำ โดยทั่วไปแล้วทิศทางของแรงที่กระทำกับเซลล์แบ่งออกได้เป็น 3 รูปแบบคือ แรงกด (stress/compression) แรงดึง (stretch/strain/tension) หรือ แรงเฉือน (shear) ที่เกิดจากการเคลื่อนที่ของ tissue fluid ผ่านผิวเซลล์ อย่างไรก็ตามถ้าพิจารณาที่เซลล์เพียงหนึ่งเซลล์ แรงที่กระทำกับเซลล์มีจะมีแรงทั้ง 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) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงไม่ว่าจะผ่านทางใด ก็จะมีผลในการกระตุ้นการส่งผ่านสัญญาณภายในเซลล์ และสามารถนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน แล้วนำไปสู่การปรับเปลี่ยนพฤติกรรมของเซลล์

อิทธิพลของแรงที่มีต่อพฤติกรรมและการทำงานของเซลล์นั้น มีรายงานในเซลล์หลายชนิด เช่น รายงานการศึกษา ที่แสดงว่า แรงดึง มีผลต่อการเคลื่อนที่และทิศทางการเรียงตัวของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบที่ล้อมรอบผนังหลอดเลือด (Liu SQ, 1998; Grabellus F, *et al.*, 2007) และการเพิ่มจำนวนของเซลล์เอ็นดอทีลียัล (Kletsas D, *et al.*, 1998) ในขณะที่ แรงกด มีผลต่อระดับการสร้าง proteoglycans ในเซลล์กระดูกอ่อน (Buschmann MD, *et al.*, 1995) รวมทั้งมีผลในการ กระตุ้นการแบ่งตัวและการสร้างโปรตีนของเซลล์กระดูก ซึ่งอาจทำหน้าที่โดยลำพังหรือร่วมกับการทำงานของเอสโตรเจนหรือพาราไทรอยด์ฮอร์โมนในกระบวนการสร้างกระดูก (Mikuni-Takagaki Y, 1999) ส่วนแรงเฉือนนั้น พบว่ามีบทบาทสำคัญในการควบคุมแรงดันเลือดผ่านทางกระตุ้นด้วยแรงดันเลือดภายในหลอดเลือดเอง โดยมีผลต่อเซลล์บุผนัง

หลอดเลือด ส่งผลต่อการหลั่งฮอร์โมน การถ่ายเทของสัญญาณผ่านแคลเซียมภายในเซลล์ 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 และยังอาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อต่างๆ ให้พัฒนาขึ้นมาเพื่อช่วยในกระบวนการซ่อมแซมของเนื้อเยื่อเมื่อเกิดการบาดเจ็บหรือถูกทำลาย การได้รับแรงที่มากเกินไป หรือน้อยเกินไปจะทำให้เสียสมดุล ซึ่งส่งผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของเซลล์ 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 ในการรักษาสมดุลของเนื้อเยื่อปริทันต์โดยมีส่วนร่วมทั้งในส่วนของ การสร้าง การทำลาย การซ่อมแซม และการคงไว้ซึ่งสภาวะสมดุล (Lackler KP, *et al.*, 2000; Lekic P and McCulloch CA, 1996) และยังอาจเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก (osteoblasts) และเซลล์สร้างเคลือบรากฟัน (cementoblasts) ของเซลล์เอ็นยึดปริทันต์มีคุณสมบัติด้วย (Shuttleworth CA, *et al.*, 1983)

ผลของแรงต่อพฤติกรรมของเซลล์เอ็นยึดปริทันต์

ผลของแรงต่อเซลล์เอ็นยึดปริทันต์นั้น 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 ไฮโดรไลส 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)

แรงยังมีผลต่อการทำงานของเซลล์เอ็นดอทีลียัล ในการควบคุมสมดุลของกระดูกด้วย มีรายงานแสดงว่า เมื่อเซลล์เอ็นดอทีลียัลได้รับแรงดึงจะมีผลกระตุ้นการแสดงออกของ โปรตีน osteoprotegerin (OPG) ในขณะที่แรงกดในเซลล์เอ็นดอทีลียัล 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 แรงดึงจึงมีผลทำให้สัดส่วนการแสดงออกของ RANKL/OPG ลดลง จึงสามารถยับยั้งการทำลายกระดูกได้ (Tsuji K, *et al.*, 2004; Kanzaki H, *et al.*, 2006)

นอกจากนี้ แรงกดจากการจัดฟัน ยังสามารถ กระตุ้นการแสดงออกของ osteopontin ได้ทั้งในกระดูกเบ้าฟัน และในเนื้อเยื่อเอ็นดอทีลียัล สอดคล้องกับผลจากห้องปฏิบัติการ ที่พบว่า ทั้งเซลล์สร้างกระดูก และเซลล์เอ็นดอทีลียัล 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 แรงกดสามารถกระตุ้นการสร้างไฮโดรไลสที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ในเซลล์เอ็นดอทีลียัลได้หลายชนิด เช่น interleukin-6; IL-6 และ interleukin-8; IL-8 เป็นต้น (Yamamoto T, *et al.*, 2006; Yamaguchi M, *et al.*, 2006) ซึ่งเป็นไฮโดรไลสที่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ RANKL และ MMPs ซึ่งนำไปสู่การทำลายทั้ง เนื้อเยื่ออ่อนและเนื้อเยื่อแข็งได้ แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของแรงที่มีสมดุลของกระดูกเบ้าฟัน 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 และโปรตีน decorin แต่ไม่มีผลต่อระดับการสร้างเอนไซม์ alkaline phosphatase ในขณะที่แรงดึงที่สูง (แรงที่เพิ่มความยาวของเซลล์ขึ้นร้อยละ 10 และ 18) ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง จะเพิ่มการแสดงออกของคอลลาเจนชนิดที่ 1 และโปรตีน 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 α_6 และ β_1 และการลดลงของ α_5 ในสภาวะที่เป็นแรงดึงแบบต่อเนื่องที่แรงขนาด 20 กิโลปาสกาล เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเซลล์รับรู้ต่อแรงโดยอาจผ่านทาง integrins และมีผลต่อการปรับเปลี่ยนเมทริกซ์นอกเซลล์ (Bolcato-Bellemin AL, *et al.*, 2000)

แรงเฉือนมีผลต่อการจัดเรียงทิศทางใหม่ของ actin filament ภายในเซลล์ โดยมาจัดเรียงตัวอย่างหนาแน่นอยู่ใต้ผิวเซลล์และพบว่ามัดของ actin filament มีขนาดใหญ่ขึ้น ที่ขนาดของแรง 9-12 dyn/cm² ซึ่งรูปแบบการจัดเรียงตัวของ 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 ที่ขนาดของแรงดึงตั้งแต่ 9 dyn/cm² ขึ้นไป โดยพบการเพิ่มขึ้นในระดับของโปรตีน MMP-1 ก่อนที่ 8 ชั่วโมง ส่วนการเพิ่มขึ้นของ MMP-2 และ TIMP-1 เกิดขึ้นภายหลังที่ 12 ชั่วโมง (Zheng L, *et al.*, 2012)

จากการศึกษาต่างๆ ข้างต้นจะเห็นว่ารายละเอียดของแรง ไม่ว่าจะเป็นขนาด ระยะเวลา ตลอดจนความถี่ที่เซลล์ได้รับแรงแตกต่างกันไป ทำให้ยังไม่ได้ข้อมูล หรือข้อสรุปที่ชัดเจนว่าที่แท้จริงแล้วเซลล์เอ็นโดปริทันต์มีรูปแบบการตอบสนองต่อแรงอย่างไร แต่ข้อมูลดังกล่าวเป็นหลักฐานที่แสดงให้เห็นว่า แรงในรูปแบบที่ต่างกัน มีผลให้การตอบสนองของเซลล์แตกต่างกันออกไป

เมทริกซ์เมทาโลโปรตีนเอส (Matrix metalloproteinases; MMPs)

การเปลี่ยนแปลงระดับของเอนไซม์โปรตีนเอส ที่สามารถย่อยสลายเมทริกซ์นอกเซลล์เป็นสิ่งหนึ่งที่มีความสำคัญต่อสมดุลของเนื้อเยื่อเอ็นโดปริทันต์

Matrix metalloproteinases (MMPs) เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม endopeptidase ที่สมาชิกกว่า 25 ตัว เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเมทริกซ์นอกเซลล์ได้เกือบทุกชนิด โดยเฉพาะโปรตีนในกลุ่มคอลลาเจน เนื่องจากเอนไซม์ที่ย่อยสลายเมทริกซ์นอกเซลล์ในกลุ่มอื่นๆ ไม่สามารถย่อยสลายโครงสร้าง triple helix ของคอลลาเจนได้ MMPs จึงมีบทบาทสำคัญในกระบวนการ matrix remodeling ของเนื้อเยื่อเกือบทุกส่วนในร่างกาย นอกจากนี้ยังสามารถควบคุมและปรับการทำงานของโกรทแฟกเตอร์ไซโตไคน์ 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) ซึ่งต้องถูกกระตุ้นให้ทำงานโดยการตัดส่วน propeptide domain ออกก่อน และ การควบคุมในระดับสุดท้าย

คือ โดยการยับยั้งการทำงาน โดยอาศัยตัวยับยั้งการทำงาน tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) ซึ่งมีความจำเพาะกับ MMPs และยับยั้งการทำงานในสัดส่วนของ โมเลกุล MMP:TIMP ที่ 1:1

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

โดยทั่วไปแล้ว MMPs จะถูกสร้างในปริมาณที่ต่ำ หรือไม่สร้างเลย แต่เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย โครทแฟกเตอร์ ไซโตไคน์ รวมทั้ง physiologic cellular interactions ต่างๆ สามารถส่งสัญญาณไปกระตุ้นการสร้าง 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; Grabellus 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 ในเซลล์บุผนังข้อต่อเข้าของมนุษย์ (fibroblast-like synoviocyte) เมื่อได้รับแรงดึงแบบ cyclic ที่เทียบเคียงได้กับแรงจากการออกกำลังกายปกติ ทั้งนี้ผลการศึกษาดังกล่าวต้องการนำเสนอว่า แรงในระดับที่เหมาะสมจะควบคุมระดับของเอนไซม์กลุ่มนี้ไว้ให้อยู่ในระดับที่ไม่เป็นอันตรายกับเนื้อเยื่อ (Wang P, *et al.*, 2009)

สำหรับในเซลล์เอ็นดอทีลียัลมีรายงานว่าพบการเพิ่มขึ้นของ MMP-1, MMP-2 และ TIMP-1 แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของ MT-1 MMP และ TIMP-3 เมื่อได้รับแรงเฉือน (Zheng L, *et al.*, 2012) พบการเพิ่มขึ้นของ 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) และพบการเพิ่มขึ้นของ MMP-13 (Ziegler N, *et al.*, 2010) จะเห็นได้ว่าระดับการแสดงออกของ MMPs และ TIMPs เปลี่ยนแปลงได้ ตามรูปแบบของแรงต่างๆ กัน

แรงกับการอักเสบ

นอกจากนี้โรคปริทันต์ ซึ่งเป็นปัญหาทางทันตสาธารณสุขที่มีผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตมากที่สุด ปัญหาหนึ่ง ทั้งในระดับประเทศ และในระดับโลก เนื่องจากการทำลายของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน กระดูกเบ้าฟัน ที่นำไปสู่การสูญเสียฟัน มีจุดเริ่มต้นจากเชื้อแบคทีเรีย โดยลักษณะที่ปรากฏของโรคเกิดจากการอักเสบที่เรื้อรัง เนื่องจากแบคทีเรียหรือสารหลังของแบคทีเรียไปกระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย และเซลล์ของเนื้อเยื่อปริทันต์เองให้หลั่งสารอักเสบออกมา interleukin-1 β (IL-1 β) เป็นสารอักเสบตัวแรกๆ และตัวหลักที่เป็นจุดเริ่มต้นของกระบวนการอักเสบที่เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องโดยจะพบ IL-1 β ในระดับที่สูง

กว่าปกติในเนื้อเยื่อปริทันต์ หลังมาจากเซลล์เม็ดเลือดขาวเป็นส่วนใหญ่ ซึ่ง IL-1 β จะเหนี่ยวนำเซลล์ของเนื้อเยื่อปริทันต์และเซลล์เม็ดเลือดขาวให้หลั่ง inflammatory cytokines ตัวอื่นๆ ต่อไปเป็นลำดับ

เป็นที่ยอมรับว่าแรงกดดันที่ไม่ปกติหรือมากเกินไปที่กระทำต่อฟันทำให้โรคปริทันต์ทวีความรุนแรงขึ้น (Harrel SK, *et al.*, 2006) มีรายงานการศึกษาในเซลล์เอ็นอีคปริทันต์ของมนุษย์เมื่อได้รับแรงดึงแบบ cyclic ร่วมกับ IL-1 β พบการลดลงของระดับการแสดงออกของคอลลาเจนและโปรตีนที่เกี่ยวข้องในการสร้างกระดูก จึงเป็นไปได้ที่แรงกดที่ร่วมกับสภาวะการอักเสบจากโรคปริทันต์เพิ่มความรุนแรงให้กับโรคปริทันต์เนื่องจากความบกพร่องของกลไกการซ่อมแซม (Nokhbehsaim M, *et al.*, 2010) การศึกษาใน เซลล์บุผนังข้อต่อของเข่าของมนุษย์เมื่อได้รับแรงดึงแบบ cyclic ร่วมกับ IL-1 β พบว่าเมื่อเซลล์ได้รับการกระตุ้นด้วย IL-1 β อย่างเดียว ระดับการแสดงออกของ MMP-1 และ MMP-13 เพิ่มขึ้น แต่เมื่อได้รับแรงร่วมด้วย ระดับ MMP-1 และ MMP-13 ลดลงอย่างชัดเจนแต่ยังมากกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการกระตุ้นใดๆ แต่การลดระดับของ MMPs นี้ไม่ปรากฏเมื่อกระตุ้นด้วย TNF- α การศึกษานี้ได้นำเสนอต่อในส่วนของการส่งถ่ายสัญญาณภายในเซลล์ และพบว่าการได้รับแรงทำให้ลดการส่งผ่านของ NF- κ B เข้าสู่นิวเคลียส ซึ่ง NF- κ B นี้รับสัญญาณถ่ายทอดมาจาก IL-1 β เพื่อเปิดยีน MMPs ดังนั้นแรงในระดับที่เหมาะสมช่วยลดการทำลายเนื้อเยื่อจากการอักเสบได้ด้วยกลไกดังกล่าว อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ไม่ได้แสดงเปรียบเทียบให้เห็นว่าในกรณีที่แรงมากกว่าปกติจะให้ผลต่อการแสดงออกของ MMPs ในทางกลับกันหรือไม่ (Wang P, *et al.*, 2009) ผลจากการศึกษาข้างต้นแสดงให้เห็นว่าการได้รับแรงของเนื้อเยื่อที่อักเสบ ไม่จำเป็นที่จะต้องนำไปสู่ความรุนแรงของการอักเสบที่มากขึ้นเสมอไป การได้รับแรงในระดับที่เหมาะสมกลับจะมีส่วนช่วยในกระบวนการหายของเนื้อเยื่อ

จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาอิทธิพลของขนาดและรูปแบบของแรงที่เหมาะสมตลอดจนและระยะเวลาที่เซลล์เอ็นอีคปริทันต์ได้รับแรงภายใต้สภาวะการอักเสบ ว่ามีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับการสร้างเอนไซม์กลุ่ม MMPs และตัวยับยั้ง (TIMPs) ในลักษณะใด ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อกระบวนการซ่อมแซมหรือการทำลายของเนื้อเยื่อปริทันต์

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสต์จากเนื้อเยื่อปรีทันต์

เซลล์เอ็นอีคปรีทันต์เตรียมจากเนื้อเยื่อปรีทันต์จากฟันของผู้ป่วยที่อยู่ในแผนการรักษาที่มีข้อบ่งชี้ว่า จะต้องถูกถอน โดยฟันนั้นจะต้องไม่มีเศษตะกั่วถึงโพรงประสาทฟันและไม่มีรอยโรคที่ปลายรากฟัน 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 สเตรปโตมัยซินซัลเฟต (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 การขยายจำนวนเซลล์จะทำโดยการถ่ายเซลล์ (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 ด้วยการทำ 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 ก่อนนำมาใช้เลี้ยงเซลล์จะเคลือบพื้นผิวอีกครั้งด้วยสารละลาย 0.1% gelatin

3. การกระตุ้นเซลล์ด้วยแรง

เซลล์ถูกหว่านบน gelatin coated silicone membrane ที่ความหนาแน่น 50,000 เซลล์/cm² เลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำแผ่น silicone ไปประกอบเข้ากับ stretching apparatus ที่ประดิษฐ์ขึ้นเองโดยกลุ่มผู้วิจัย โดยการทำงานของเครื่องสามารถกำหนดค่าระยะการยืดของแผ่น silicone (ร้อยละ) จำนวนรอบต่ออนาที (Hz) และระยะเวลาในการให้แรงได้ ทั้งนี้แผ่น silicone ที่มีเซลล์จะถูกยึดกับเครื่องยืด และอยู่ในจานเลี้ยงเซลล์ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ตลอดช่วงเวลาของการทดลอง

เซลล์ในกลุ่มทดลองจะถูกกระตุ้นด้วยแรงในรูปแบบ และระยะเวลาต่างๆ กัน ตลอดจนการศึกษา กลไกการตอบสนองต่อการได้รับแรงดังกล่าว โดยการใช้ตัวบ่งชี้การถ่ายทอดสัญญาณภายในเซลล์ และ ตัวบ่งชี้การทำงานของโปรตีนที่ควบคุมการทำงานของ cytoskeleton ต่างๆ ร่วมด้วย นอกจากนี้ในกรณีที่ ต้องการศึกษารูปแบบของสภาวะการอักเสบจะมีการกระตุ้นเซลล์ด้วย IL-1 β ร่วมกับแรงด้วย เมื่อสิ้นสุดการ ทดลองจะตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของเอนไซม์ที่ใช้ย่อยสลายเมทริกซ์นอกเซลล์และ ตัวบ่งชี้การทำงานของ เช่น เอนไซม์กลุ่ม MMPs และ TIMPs โดยเทียบกับระดับการแสดงออกพื้นฐานเซลล์ จากกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับแรง ระดับการแสดงออกของเอนไซม์และตัวบ่งชี้ดังกล่าวจะถูกวิเคราะห์ทั้งใน ระดับ mRNA ด้วย เทคนิค Quantitative-PCR และระดับโปรตีนด้วยเทคนิค ELISA เทียบกับกลุ่มควบคุมที่ ไม่ได้รับการกระตุ้น

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 μ 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 ของเอนไซม์ที่ใช้ย่อยสลายเมทริกซ์นอกเซลล์และตัวบ่งชี้การทำงานของ เช่น เอนไซม์ กลุ่ม MMPs และ TIMPs และใช้สาย primer ที่จำเพาะต่อ 18S ควบคู่กันไป เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมภายใน (internal control) ของการทดลอง ทำการติดฉลากด้วยสารเรืองแสง SYBR-Green I Dye ซึ่งจะจับกับ DNA ตรงตำแหน่ง minor groove ของ DNA สายคู่ เมื่อสารนี้ถูกกระตุ้นด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต จะมีการคาย พลังงานออกมาเป็นแสงของฟลูออเรสเซนซ์ ทำให้สามารถวัดปริมาณของ DNA ได้ โดยสามารถตรวจวัด ปริมาณ DNA ที่เพิ่มขึ้นในปฏิกิริยา PCR ในแต่ละรอบได้ ทำให้สามารถติดตามปริมาณ DNA ในช่วง exponential phase ได้อย่างแม่นยำ ทำให้ได้ค่าที่แปรผันตามปริมาณเริ่มต้นของ DNA เป้าหมาย และ สามารถวัดปริมาณ DNA ที่เพิ่มขึ้นมาได้ทันที โดยโปรแกรมจะทำการวิเคราะห์และแปลผล

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

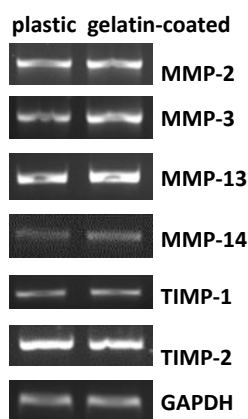
ค่าการแสดงออกของยีนที่แสดงผลด้วยโปรแกรมภายหลังการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Q-PCR จาก การทดลอง 3 ครั้ง ถูกนำมาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยใช้สถิติ unpaired T-test โดย มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

ผลการวิจัย

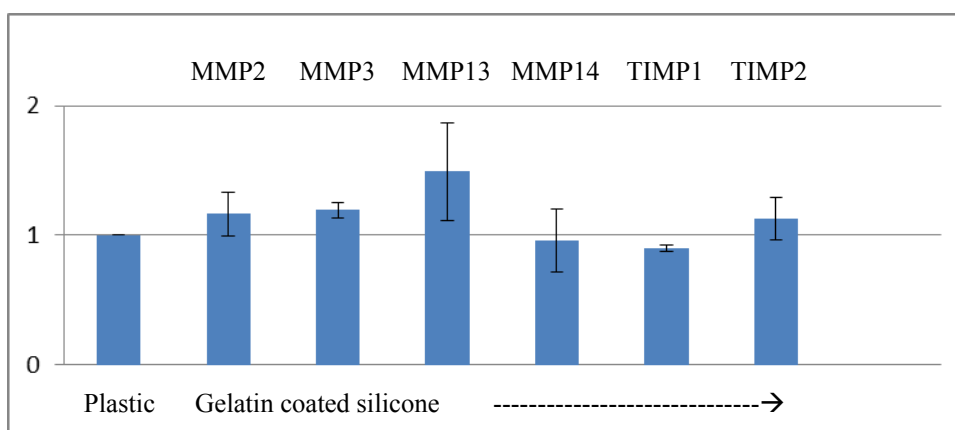
ผลของ gelatin ที่เคลือบบนพื้นผิวแผ่น silicone ต่อการแสดงออกพื้นฐานของยีน

เซลล์เอ็นไคปริตันต์ถูกหว่านลงบนแผ่น gelatin coated-silicone และเลี้ยงจนถึงสภาวะ confluence จากนั้นจึงสกัด RNA เพื่อตรวจสอบระดับการแสดงออกพื้นฐานของยีน MMP-2, -3, -13, -14, TIMP-1 และ -2 เพื่อเปรียบเทียบ ระดับการแสดงออกของยีนนั้นๆ กับระดับการแสดงออกเมื่อเพาะเลี้ยงบนพื้นผิวปกติของจาน เลี้ยงเซลล์ ผลการเปรียบเทียบแสดงในรูปที่ 1 โดยพบว่าการยึดเกาะของเซลล์บน gelatin มีผลเพิ่มการแสดงออกของ MMP-2, 3 และ 13 แต่เพียงเล็กน้อย ในขณะที่ยีนตัวอื่นที่ศึกษาไม่พบความแตกต่าง

A



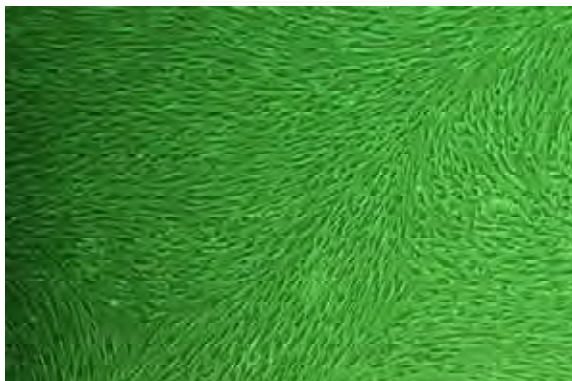
B Relative expression of *MMPs-TIMPs/18s* mRNA (Fold)



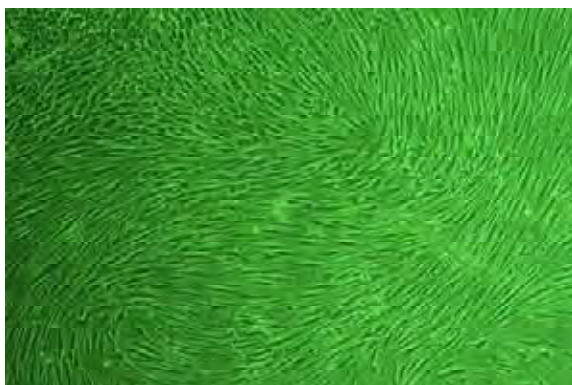
รูปที่ 1 แสดงระดับการแสดงออกของยีนที่ศึกษาในเซลล์เอ็นไคปริตันต์ที่เพาะเลี้ยงบนจานเลี้ยงเซลล์ (Plastic) เปรียบเทียบกับบนแผ่น Gelatin coated silicone ภายหลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ด้วยเทคนิค A. conventional PCR (ผลการทดลองตัวแทนจาก 1 การทดลอง) B. Q real-time PCR (ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจาก 3 การทดลอง)

การปรับปรุงพื้นผิว silicone ด้วย gelatin ทำให้เซลล์สามารถยึดเกาะ เจริญ และเพิ่มจำนวนบนแผ่นตัวกลาง นี้ได้ ในลักษณะเดียวกับการเลี้ยงในงานเลี้ยงเซลล์ปกติ ดังแสดงในรูปที่ 2

A



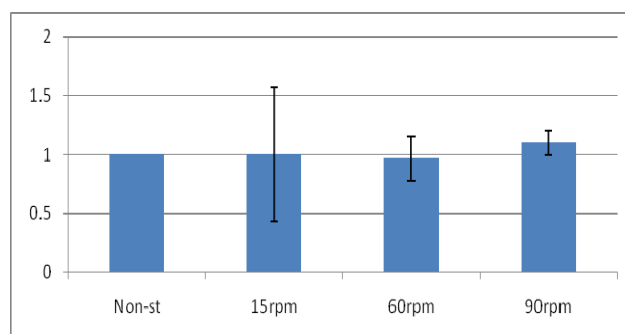
B



รูปที่ 2 รูปร่างเซลล์เอ็นซีดีปริทันต์บน A. งานเลี้ยงเซลล์ปกติ B. แผ่น silicone ที่ทำการปรับปรุงพื้นผิว โดยการเคลือบด้วย gelatin

การตรวจสอบความมีชีวิตของเซลล์ภายใต้แรงดึงที่ความถี่ต่างๆ

ความมีชีวิตของเซลล์วิเคราะห์โดยเทคนิค MTT ดังแสดงในรูปที่ 3 พบว่าการยึดเซลล์ให้มีความยาวเพิ่มขึ้นร้อยละ 10 (โดยคิดจากการยึดแผ่น silicone ให้ยึดออกร้อยละ 10) ด้วยความถี่ 15, 60 และ 90 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ผลการวิเคราะห์ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของจำนวนเซลล์ หรือระดับ activity ของ mitochondria dehydrogenase ซึ่งสัมพันธ์กับกระบวนการหายใจของเซลล์ที่เปลี่ยนไป เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับแรงดึง

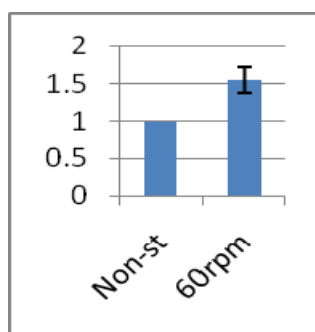


รูปที่ 3 แผนภูมิแท่งแสดงจำนวนเท่าของจำนวนเซลล์ วิเคราะห์โดยเทคนิค MTT เมื่อให้แรงดึงแบบ cyclic ทำการดึงแผ่น silicone ให้ยืดออกเป็นระยะร้อยละ 10 ของความยาวเดิม ที่ความถี่ 15, 60 และ 90 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับแรงดึง (Non-st) ในเซลล์เอ็นดอทีลียัล

การศึกษาเพื่อทดสอบการรับรู้ของเซลล์ต่อแรงดึงจาก stretch apparatus ที่ประดิษฐ์ขึ้น

นำแผ่น gelatin coated silicone ที่มีเซลล์เพาะเลี้ยงจนถึงสภาวะ confluence เหมือนข้างต้น ไปประกอบเข้ากับ stretch apparatus ที่ประดิษฐ์ขึ้น โดยกลุ่มผู้วิจัยและทำการดึงแผ่น silicone นี้ให้ยืดออกเป็นระยะร้อยละ 10 ของความยาวเดิม ด้วยความถี่ 60 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

ทั้งนี้ ผลการศึกษา พบว่าแรงดึงด้วยเครื่องที่ประดิษฐ์ขึ้น ด้วยแรงดังก่อตัวข้างต้น กระตุ้นการแสดงออกของยีน cox-2 ในเซลล์เอ็นดอทีลียัล ดังแสดงในรูปที่ 4 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (เลี้ยงบนแผ่น gelatin coated silicone นำไปประกอบกับเครื่อง แต่ไม่ได้ให้แรงดึง) ซึ่งเป็นไปในลักษณะเดียวกับที่เคยมีการรายงานมาแล้ว (Shimizu N *et al.*, 1998)

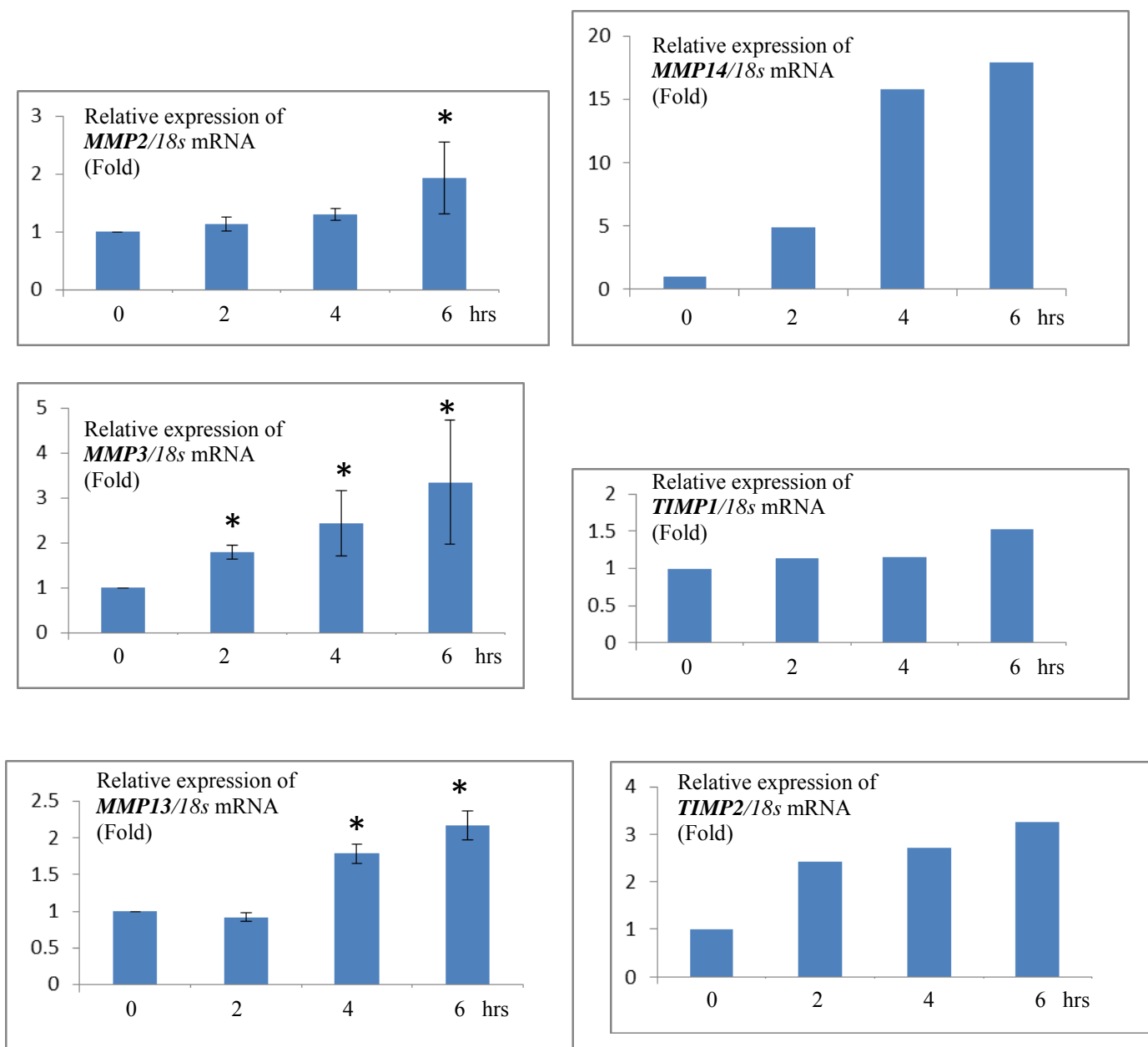


รูปที่ 4 แผนภูมิแท่งแสดงจำนวนเท่าของระดับการแสดงออกของ cox-2 mRNA ในเซลล์เอ็นดอทีลียัลที่ ได้รับแรงดึงแบบ cyclic ที่ความถี่ 60 รอบต่อนาที (60rpm) ทำการดึงแผ่น silicone ให้ยืดออกเป็นระยะร้อยละ 10 ของความยาวเดิมเป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยใช้ stretch apparatus เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับแรงดึง (Non-st) (* $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม)

การทดสอบผลของระยะเวลา (time) เมื่อเซลล์ได้รับแรงดึงแบบ cyclic

เมื่อเซลล์ได้รับแรงดึงแบบ cyclic ความถี่ 60 รอบต่อนาที ที่ระยะที่ยืดออกร้อยละ 10 ตามที่อธิบายข้างต้น ที่ระยะเวลา 2, 4 และ 6 ชั่วโมง พบว่าที่ 2 ชั่วโมง เริ่มพบการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของ MMP-2, 3, 14, TIMP-1 และ 2 แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของ MMP-13 ในขณะที่เมื่อเพิ่มเวลาเป็น 4 ชั่วโมง เริ่มพบการเพิ่มการแสดงออกของยีน MMP-13 โดยภาพรวมแล้วในช่วงระยะเวลาของการศึกษา (2-6 ชั่วโมง) การแสดงออกของยีนที่ศึกษามีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 5

ผลการศึกษาให้ข้อมูลในเบื้องต้นว่า ที่ระยะเวลา 2 ชั่วโมง เพียงพอในการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจากแรงดึงแบบ cyclic ทั้งนี้เนื่องจากการศึกษาที่ผ่านมาใช้เวลาในการให้แรงดึงที่มากกว่านี้ในการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของยีนในกลุ่มนี้ (Takano M *et al.*, 2009) ดังนั้นในการศึกษาในลำดับต่อไปจึงเลือกศึกษาผลของแรงดึงแบบ cyclic ที่เวลาเริ่มต้นที่ 2 ชั่วโมงเป็นต้นไป

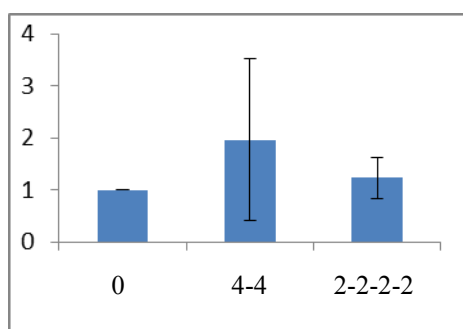


รูปที่ 5 แผนภูมิแท่งแสดงจำนวนเท่าของระดับการแสดงออกของยีนที่ศึกษาเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Q-PCR โดยเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับแรงดึง (0 hr) ในเซลล์เอ็นดอทีลียัลในหลอดทดลอง โดยมีตัวควบคุมภายในคือ ยีน 18S เมื่อให้แรงดึงแบบ cyclic ทำการดึงแผ่น silicone ให้ยืดออกเป็นระยะร้อยละ 10 ของความยาวเดิม ที่ความถี่ 60 รอบต่อนาที (rpm) เปรียบเทียบการแสดงออกของยีนภายหลังได้รับแรงที่ 2, 4 และ 6 ชั่วโมง (ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจาก 3 การทดลอง เฉพาะผลของ MMP-14, TIMP-1 และ TIMP-2 มาจากการทดลอง 1 ครั้ง) (* $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม)

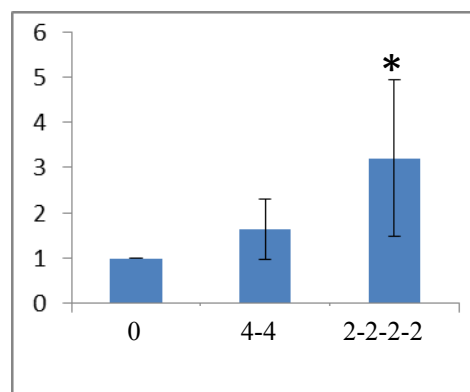
การทดสอบผลของรูปแบบการให้แรงดึงแบบ cyclic แบบเป็นช่วงๆ (intermittent)

เมื่อเซลล์ได้รับแรงดึงแบบ cyclic ที่ความถี่ 60 รอบต่อนาที ที่ระยะยืดร้อยละ 10 เป็นเวลาต่อเนื่อง 4 ชั่วโมง และหยุดให้แรง 4 ชั่วโมง (4-4) รวมเวลา 8 ชั่วโมง ก่อนสกัด RNA เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับแรงดึงแบบ cyclic ต่อเนื่อง 2 ชั่วโมง และหยุดให้แรง 2 ชั่วโมง แล้วได้รับแรงใหม่อีก 2 ชั่วโมง และหยุดให้แรง 2 ชั่วโมง (2-2-2-2) รวม 8 ชั่วโมง ก่อนเก็บผล พบว่ารูปแบบของแรงที่เซลล์ได้รับ ส่งผลต่อระดับการแสดงออกของยีนในเซลล์เอ็นดอปรีทันทันต์แตกต่างกันไปในแต่ละชนิดของยีนที่ศึกษา ดังแสดงในรูปที่ 6

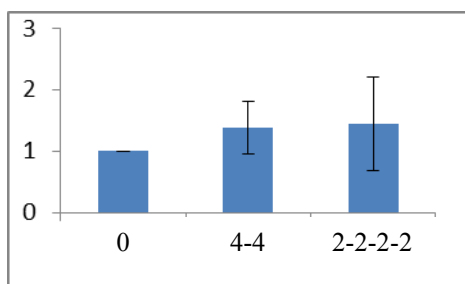
Relative expression of *MMP2*/18s mRNA (Fold)



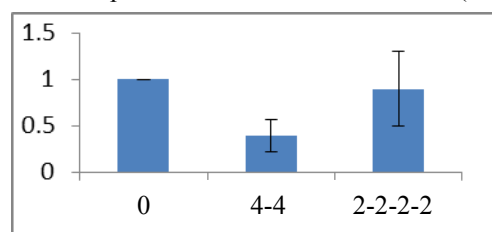
Relative expression of *MMP14*/18s mRNA (Fold)



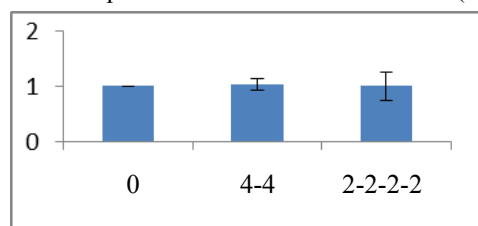
Relative expression of *MMP3*/18s mRNA (Fold)



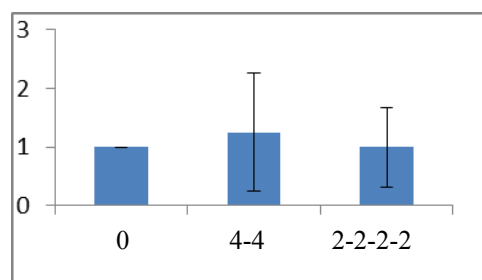
Relative expression of *TIMP-1*/18s mRNA (Fold)



Relative expression of *MMP13*/18s mRNA (Fold)



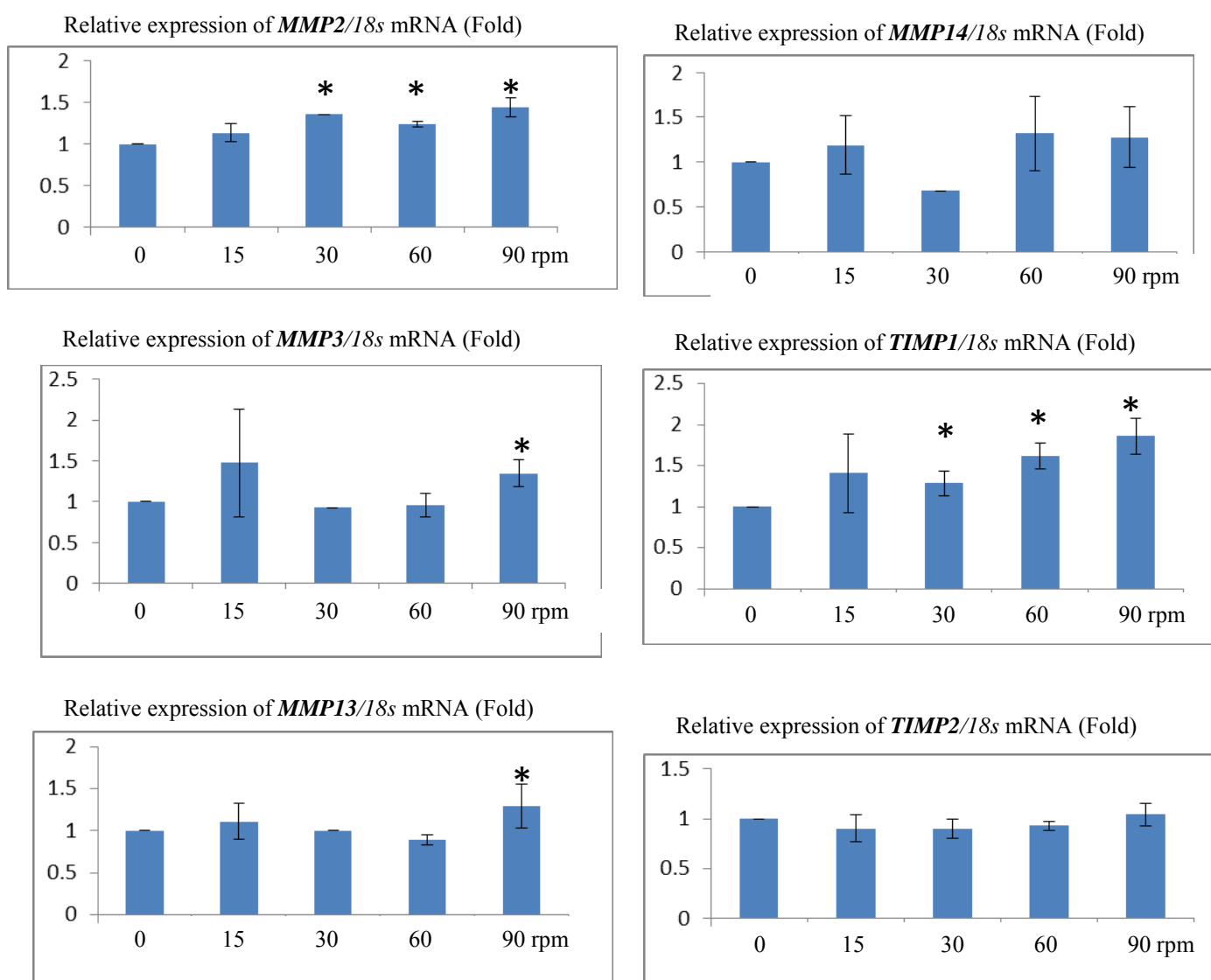
Relative expression of *TIMP-2*/18s mRNA (Fold)



รูปที่ 6 แผนภูมิแท่งแสดงจำนวนเท่าของการแสดงออกของยีนที่ศึกษาเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Q-PCR โดยเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับแรงดึง (0) ในเซลล์เอ็นดอปรีทันทันต์ โดยมีตัวควบคุมภายในคือยีน 18S เมื่อให้แรงดึงแบบ cyclic ทำการดึงแผ่น silicone ให้ยืดออกเป็นระยะร้อยละ 10 ของความยาวเดิม ที่ความถี่ 60 รอบต่อนาที (rpm) เปรียบเทียบการแสดงออกของยีนภายหลังได้รับแรงดึงแบบ cyclic ที่ 4 ชั่วโมง พัก 4 ชั่วโมง (4-4 hr) และ แรงดึงแบบ cyclic ที่ 2 ชั่วโมง พัก 2 ชั่วโมง ถึง 2 ชั่วโมง พัก 2 ชั่วโมง (2-2-2-2 hr) (ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจาก 2 การทดลอง) (* $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม)

การทดสอบผลของจำนวนรอบต่อนาที (ความถี่) ของแรงดึงแบบ cyclic

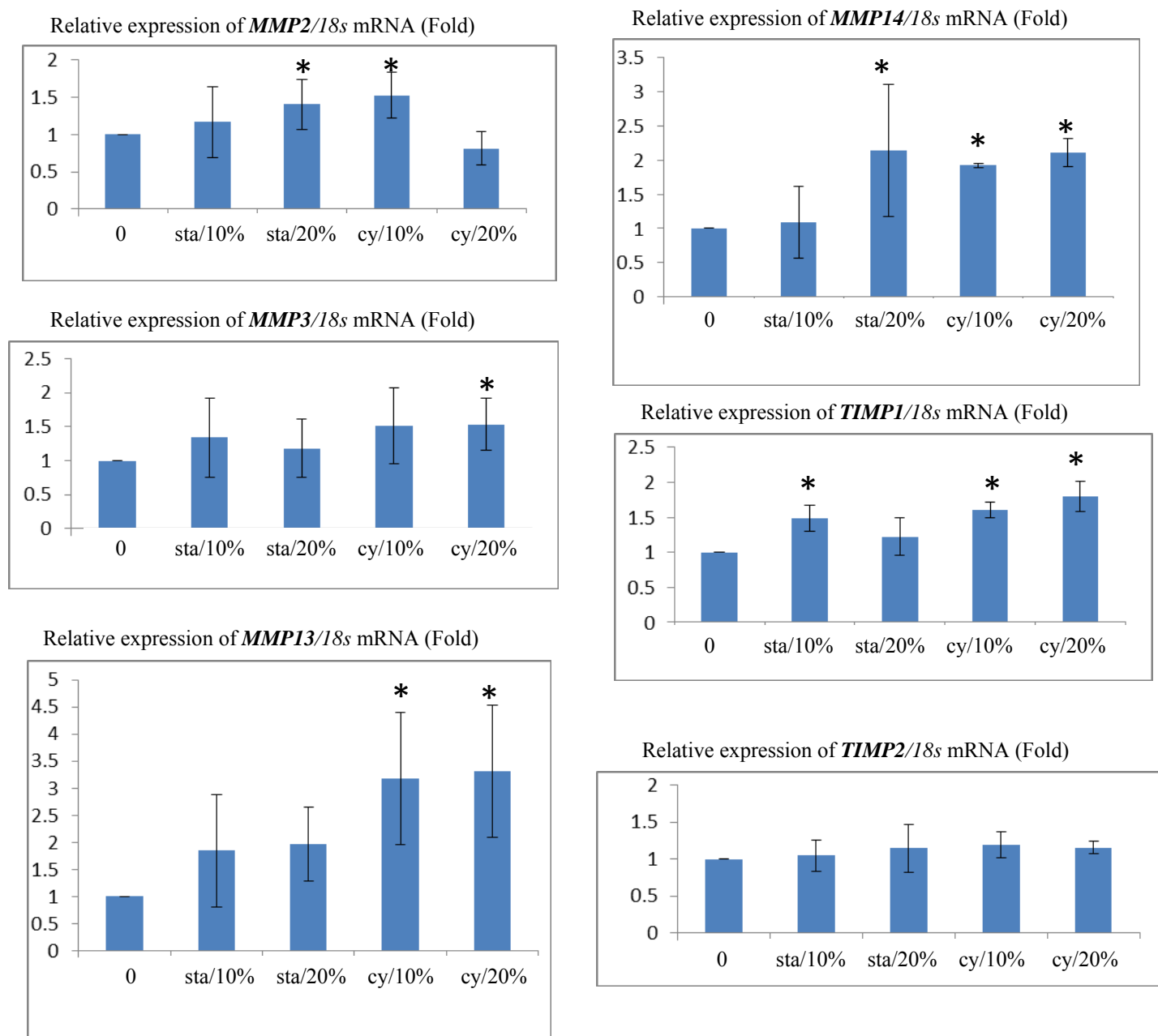
เมื่อออกแบบการทดลองโดยให้แรงดึงแบบ cyclic ที่ความถี่ 15, 30, 60 และ 90 รอบต่อนาที ที่ระยะที่ยืดออกร้อยละ 10 เป็นเวลา 2 ชั่วโมงเท่ากัน ผลการทดลองพบว่า ความถี่ที่เพิ่มขึ้น มีแนวโน้มเพิ่มการแสดงออกของยีน MMP-2, 3, 13, 14 และ TIMP-1 อย่างไรก็ดี พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 เฉพาะที่ความถี่ 90 รอบต่อนาที ยกเว้น TIMP-2 ที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงดังแสดงในรูปที่ 7



รูปที่ 7 แผนภูมิแท่งแสดงจำนวนเท่าของการแสดงออกของยีนที่ศึกษาเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Q-PCR โดยเปรียบเทียบกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับแรงดึง (0) กับความถี่ของแรงดึงแบบ cyclic ทำการดึงแผ่น silicone ให้ยืดออกเป็นระยะร้อยละ 10 ของความยาวเดิม ที่ความถี่ 15, 30, 60 และ 90 รอบต่อนาที (rpm) ที่เวลา 2 ชั่วโมงในเซลล์เอ็นดีปรีทันต์ (ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจาก 3 การทดลอง) (* $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม)

การทดสอบผลของรูปแบบแรงดึง (cyclic/static) และขนาดของแรง (magnitude)

เมื่อออกแบบการทดลองโดยให้แรงดึงแบบ cyclic ที่ความถี่ 15 รอบต่อนาที เปรียบเทียบกับเมื่อให้แรงดึงแบบต่อเนื่อง (static) ที่ระยะการยืดออก (ขนาด; magnitude) ร้อยละ 10 และ 20 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่า การตอบสนองแตกต่างกันไปในแต่ละยีนที่ศึกษา โดยพบว่ายีน MMP-2 เมื่อเซลล์ได้รับแรงดึงแบบ static ระยะดึง (magnitude) ที่มากขึ้นมีแนวโน้มเพิ่มการแสดงออกของยีน แต่ถ้าใช้ระยะดึงดังกล่าวร่วมกับรูปแบบการดึงแบบ cyclic ระยะดึงที่เพิ่มขึ้นจะให้ผลต่อการแสดงออกของยีนในทางกลับกัน สำหรับ MMP-3 แรงดึงส่งผลเพิ่มการแสดงออกของยีน โดยไม่เกี่ยวข้องกับรูปแบบ (cyclic/static) และขนาดของแรง ในขณะที่การแสดงออกของ MMP-13, MMP-14 และ TIMP-1 เพิ่มขึ้นเมื่อได้รับแรงเช่นกัน โดยที่ระดับการแสดงออกจะเพิ่มขึ้นเมื่อให้แรงดึงแบบ cyclic มากกว่า static โดยที่ขนาดของแรงไม่ให้ผลที่แตกต่าง ส่วน TIMP-2 ไม่พบการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกในสภาวะที่ใช้ทดสอบ ดังแสดงในรูปที่ 8

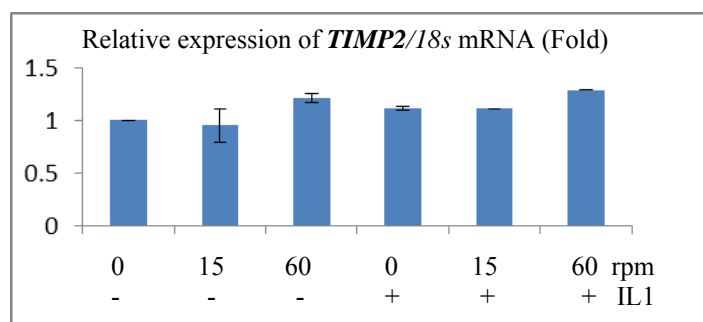
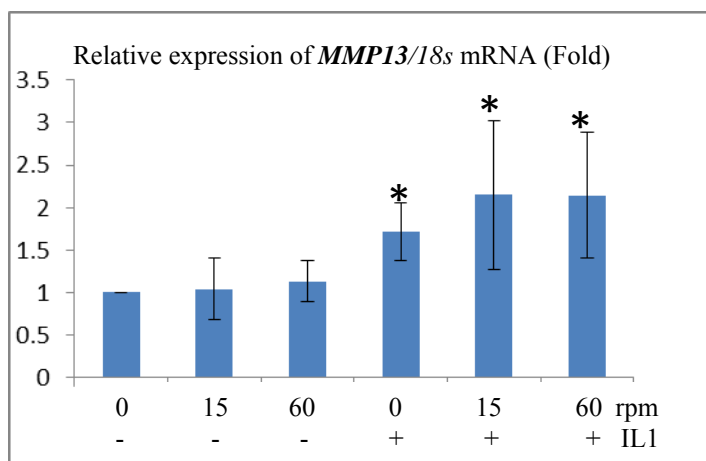
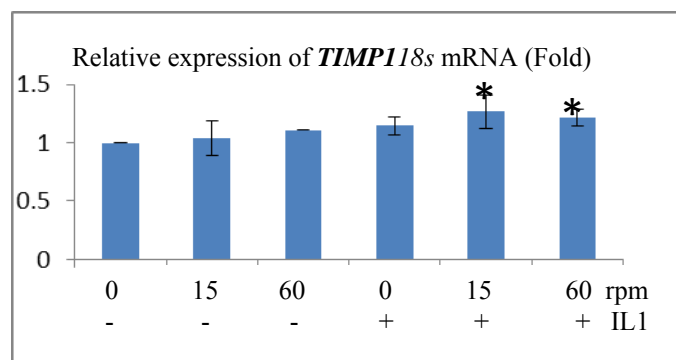
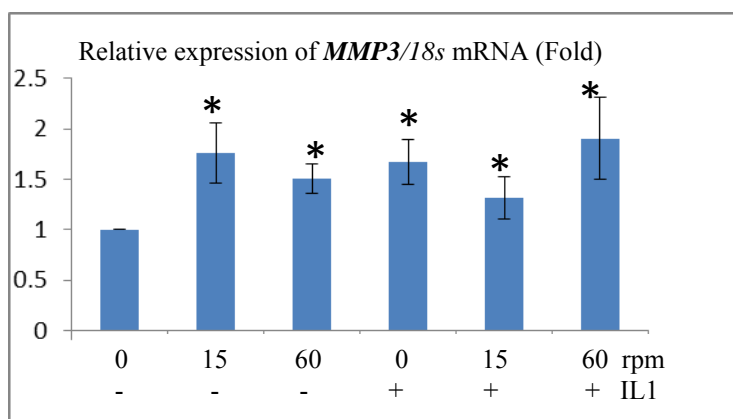
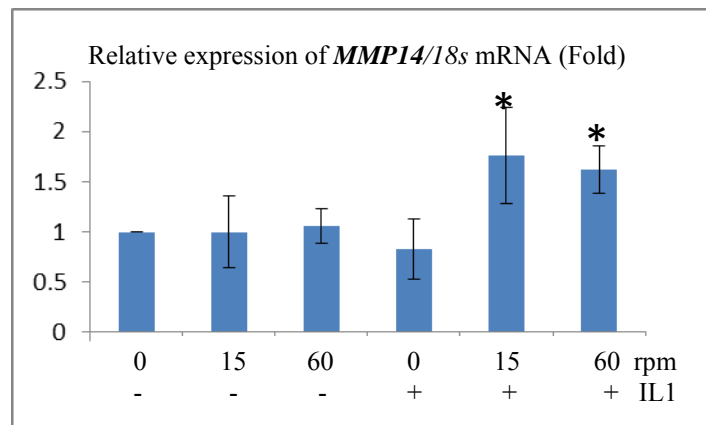
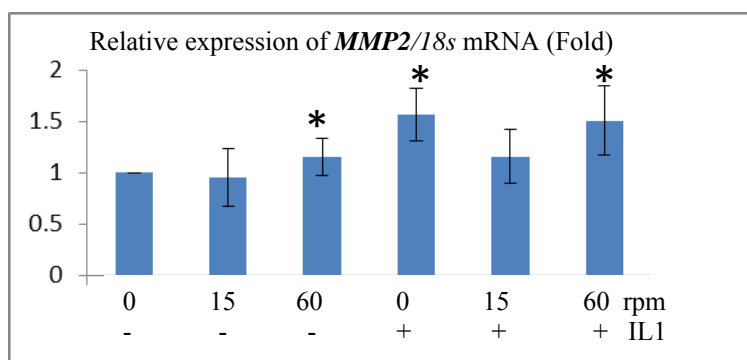


รูปที่ 8 แผนภูมิแท่งแสดงจำนวนเท่าของการแสดงออกของยีนที่ศึกษาเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Q-PCR โดยเปรียบเทียบกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับแรงดึง (0) กับกลุ่มที่ได้รับแรงดึงแบบเป็นรอบ (cyclic) ที่ 15 รอบต่อนาที ทำการดึงแผ่น silicone ให้ยึดออกเป็นระยะร้อยละ 10 (cy/10%) และ 20 (cy/20%) และกลุ่มที่ได้รับแรงดึงแบบต่อเนื่อง (static) ที่ระยะยึดออกร้อยละ 10 (sta/10%) และ 20 (sta/20%) ที่เวลา 2 ชั่วโมงในเซลล์เอ็นดอทีลียัล (ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจาก 2 การทดลอง) (* $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม)

การทดสอบผลของแรงดึงแบบ cyclic ในสถานะที่มี interleukin-1 β

ในการทดลองต่อมา เซลล์ได้รับแรงดึงแบบ cyclic ที่ความถี่ 15 และ 60 รอบต่อนาที ที่ระยะที่ยึดออกร้อยละ 10 ในสถานะที่มีและไม่มี 10 ng/ml IL-1 β เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

เมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย IL-1 β 10 ng/ml พบการแสดงออกของ MMP-2, 3 และ 13 ที่เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน และเมื่อเซลล์ได้รับการกระตุ้นด้วยแรงดึงแบบ cyclic ที่ความถี่ 15 รอบต่อนาที ร่วมกับ IL-1 β มีพบแนวโน้มลดระดับการแสดงออกของ MMP-2 และ 3 ที่สูงขึ้นจากการถูกกระตุ้นด้วย IL-1 β แต่เพียงอย่างเดียว โดยลดลงสู่ระดับการแสดงออกพื้นฐานของยีนแต่ละตัว ทั้งนี้ไม่พบการเปลี่ยนแปลงนี้เมื่อให้แรงดึงแบบ cyclic ที่ความถี่ 60 รอบต่อนาที ในขณะที่การแสดงออกของ MMP-13 และ 14 เมื่อถูกกระตุ้นด้วย IL-1 β ร่วมกับแรงดึง มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอีก ในส่วนของ TIMP-1 และ 2 ไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจนเมื่อได้รับ IL-1 β เพียงลำพัง หรือเมื่อได้รับร่วมกับแรงดึง ดังแสดงในรูปที่ 9



รูปที่ 9 แผนภูมิแท่งแสดงจำนวนเท่าของระดับการแสดงออกของยีนที่ศึกษาเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Q-PCR โดยเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับแรงดึง (0) โดยมีตัวควบคุมภายในคือยีน 18S เมื่อให้แรงดึงแบบ cyclic ทำการดึงแผ่น silicone ให้ยืดออกเป็นระยะร้อยละ 10 ของความยาวเดิม ที่ความถี่ 15 และ 60 รอบต่อนาที (rpm) ในสภาวะที่มีและไม่มี 10 ng/ml IL-1 β ที่ 2 ชั่วโมง ในเซลล์เอ็นดอทีลียัล (ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจาก 2 การทดลอง) (* $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม)

วิจารณ์

งานวิจัยนี้เพื่อศึกษาอิทธิพลของแรงดึง ภายใต้ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับแรง ได้แก่ ขนาด (ระยะดึง) เวลา ความถี่ รวมทั้งลักษณะของแรง เช่น การให้แรงดึงแบบต่อเนื่อง (static) แบบเป็นรอบต่อเนื่อง (cyclic) หรือ แบบให้แรงและหยุดเป็นระยะ (intermittent) โดยใช้ stretch apparatus ที่ประดิษฐ์ขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ เนื่องจากเครื่องกำเนิดแรงดึง และผลิตภัณฑ์ที่ใช้ประกอบ ไม่มีจำหน่ายในประเทศ ประกอบกับมีราคาสูงมาก

การศึกษาในปีแรกของโครงการ ได้ศึกษาผลของปัจจัยต่างๆ ข้างต้นต่อการแสดงออกในระดับยีนของเอนไซม์ MMP-2, 3, 13, 14 และ TIMP-1 และ 2 ซึ่งพบว่าแต่ละปัจจัยส่งผลต่อการแสดงออกที่แตกต่างกันไปในแต่ละชนิดของยีน

อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษารายงานอื่นๆ ที่ผ่านมามีเป็นรายงานการศึกษาถึงผลของแรงดึงต่อการแสดงออกของยีนชนิดเดียวกัน แต่ให้ผลการศึกษาที่แตกต่างกันออกไปบ้าง เมื่อพิจารณาในรายละเอียด พบว่าเกิดจากการออกแบบการทดลอง และข้อจำกัดบางประการของเครื่องมือ นอกจากนี้ เครื่องกำเนิดแรงดึงที่ใช้ มีทั้งแบบที่มีจำหน่าย และแบบที่ประดิษฐ์ใช้เองในห้องปฏิบัติการ ก็มีรูปแบบการให้แรงผ่านดึงแผ่นตัวกลางที่เซลล์ใช้ยึดเกาะอยู่หลายรูปแบบ เช่น uni-axial, bi-axial plane หรือ 3-D เป็นต้น

พื้นผิวยึดเกาะของเซลล์ก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่ง ทั้งนี้ความยืดหยุ่นและความสามารถในการคืนตัวเป็นคุณสมบัติสำคัญที่ทำให้ silicone ถูกนำมาใช้ในการศึกษาเรื่องแรงดึง ประกอบกับ ราคาที่ไม่สูงและขั้นตอนการขึ้นรูปที่ไม่ยาก แต่ความไม่ชอบน้ำของพื้นผิว (hydrophobicity) ทำให้ silicone ต้องถูกปรับพื้นผิวให้อยู่ในสภาวะที่ชอบน้ำ (hydrophilicity) เพื่อให้เซลล์สามารถยึดได้เช่นเดียวกับเมื่อเลี้ยงบน culture plate สำหรับผลิตภัณฑ์ที่มีจำหน่าย เช่น flexi-bottom plate จะเคลือบผิว silicone ด้วย type I collagen แต่ในงานวิจัยนี้ได้ทดลองเคลือบพื้นผิวแผ่น silicone ที่เตรียมขึ้นเองด้วย gelatin เนื่องจากมีราคาไม่แพง เมื่อเทียบกับ type I collagen พบว่าส่งเสริมการเกาะและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้เทียบเคียงกับการเพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ปกติ อย่างไรก็ตามเริ่มมีรายงานการศึกษาที่แสดงถึงอิทธิพลร่วมของแรงกับเมทริกซ์โปรตีนนอกเซลล์ (ECM) ต่อการแสดงออกของยีน เพราะการเกาะยึดของเซลล์บนพื้นผิวนั้น โดยปกติเซลล์จะใช้ surface molecules บนผิวเซลล์จับยึดกับโปรตีนที่อยู่บนพื้นผิวนั้นๆ ได้ ซึ่งชนิดของ surface molecules ที่เซลล์ใช้จะแปรเปลี่ยนไปตามชนิดของโปรตีนที่จะยึดจับ ทั้งนี้สิ่งที่ต้องคำนึงถึงคือในการจับกันระหว่าง surface molecules กับโปรตีนนั้น สามารถเหนี่ยวนำสัญญาณภายในเซลล์ให้เกิดขึ้น ส่งผลต่อการแสดงออกของยีนได้หลายชนิดไปพร้อมๆ กัน (Anastasi, *et al.*, 2008) สำหรับการวิจัยในครั้งนี้ ในขั้นตอนการหาระดับการแสดงออกพื้นฐาน (baseline) ของยีนที่อาจเปลี่ยนแปลงไปเมื่อเลี้ยงเซลล์บน gelatin coated silicone เทียบกับบน culture plate ก็เป็นส่วนหนึ่งที่แสดงให้เห็นอิทธิพลของโปรตีนที่เซลล์ใช้ยึดเกาะ (gelatin) ในสภาวะที่ไม่ได้รับแรง โดยพบว่าส่งผลเพิ่มระดับการแสดงออกพื้นฐานของ MMP-2, 3 และ 13 ด้วยแม้เพียงเล็กน้อย ดังนั้นปัจจัยของชนิดโปรตีนที่เคลือบพื้นผิว ก็อาจมีผลต่อการแสดงออกของ

ยีนที่ศึกษาร่วมไปกับปัจจัยของแรงดึงที่ให้กับเซลล์ ทั้งนี้การศึกษากิจกรรมของชนิดของเมทริกซ์นอกเซลล์ที่เซลล์ใช้ยึดเกาะในขณะที่ได้รับแรงเป็นอีกประเด็นที่น่าสนใจศึกษาต่อไป

ในช่วงแรกของการศึกษา เริ่มจากทดสอบการทำงานของเครื่องมือที่ประดิษฐ์ขึ้นว่า จะสามารถสร้างแรงดึงให้เซลล์รับรู้ และเกิดการตอบสนองไปในทิศทางเดียวกับการศึกษาของคณะผู้วิจัยอื่นๆ โดยใช้การแสดงออกของยีน *cox-2* ซึ่งมีรายงานการเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับ tensile force ในเซลล์เอ็นโดทีลียัล (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 จะเห็นได้ว่าการปรับเปลี่ยนเงื่อนไขของปัจจัยของความถี่ ขนาดของแรง รูปแบบทิศทางของแรง ส่งผลต่อเวลาที่เซลล์ใช้ในการตอบสนอง ถ้าปัจจัยเหล่านั้นไม่ส่งผลปรับเปลี่ยนหรือขัดขวางขั้นตอนการส่งถ่ายสัญญาณภายในเซลล์เพื่อให้เกิด transcription ของยีนนั้น ในท้ายที่สุด transcription นั้นก็จะเกิดขึ้น แต่อาจด้วยคุณภาพที่ต่างกัน อย่างไรก็ตามผลการทดลองในส่วนนี้ยืนยันว่าเกิดการรับรู้ของเซลล์ต่อแรงดึงจาก stretch apparatus และตอบสนองไปในทิศทางเดียวกับที่เคยมีรายงานมาก่อน

แม้ว่าการพัฒนา stretch apparatus ไม่ได้อยู่ภายใต้โครงการวิจัยนี้ และเครื่องต้นแบบได้พัฒนาแล้วเสร็จก่อนเริ่มงานวิจัยนี้ แต่ในระหว่างดำเนินงานวิจัยก็ได้มีการปรับปรุงและพัฒนาประสิทธิภาพของเครื่องมือต้นแบบเพื่อใช้ในการทดลองภายใต้โครงการวิจัยนี้มาโดยตลอดจนสำเร็จ และได้ยื่นเสนอขอรับการจดสิทธิบัตรแล้ว เพื่อให้ได้เครื่องกำเนิดแรงดึงที่ให้แรงที่สม่ำเสมอคงที่ในแต่ละครั้งที่ทำการทดลองภายใต้วงจรควบคุมที่มีความเที่ยงตรง แต่ด้วยเหตุที่ผลการทดลองได้รวบรวมมาจากทั้งส่วนของการทดลองด้วยเครื่องที่อยู่ในช่วงพัฒนา และเครื่องที่พัฒนาแล้วสำเร็จ จึงส่งผลต่อค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ค่อนข้างสูงดังแสดงในส่วนรายงานผล อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองก็ได้แสดงแนวโน้มของการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น แม้ว่าจะไม่ชัดเจนทางสถิติ การศึกษาในปีที่ 2 ของโครงการจะใช้เครื่องที่พัฒนาแล้วเสร็จนี้ คาดว่าผลการทดลองในช่วงต่อไปจากนี้ จะมีค่าความเบี่ยงเบนอันเนื่องมาจากปัจจัยจาก stretch apparatus ลดลง อย่างไรก็ตามค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่เกิดจากปัจจัยความแตกต่างระหว่างเซลล์ เนื่องจากเซลล์ที่ใช้เป็น primary culture ก็ยังคงมีอยู่

แม้ว่าผลการศึกษาในช่วงปีที่ 1 จะยังไม่สามารถให้ข้อสรุปได้ชัดเจน ภายใต้งैื่อนไขที่ใช้ในการทดลอง ด้วยเหตุปัจจัยดังกล่าวข้างต้น แต่มีประเด็นที่น่าสนใจที่สามารถใช้เป็นแนวทางในการศึกษาในลำดับต่อไปได้ดังต่อไปนี้

1. งานวิจัยนี้สามารถตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนที่เปลี่ยนไปในเซลล์เอ็นดอทีลียัลได้เมื่อให้แรงดึงแบบ cyclic ตั้งแต่ที่ 2 ชั่วโมงขึ้นไป ซึ่งเป็นระยะเวลาที่น้อยกว่าที่เคยมีรายงานมาคือ 12 ชั่วโมง (Bolcato-Bellemin AL, *et al.*, 2000) หรือ 2 วัน (Tsuiji K, *et al.*, 2004) เป็นต้น โดยคาดว่าจะทำให้สามารถทดสอบในเวลาใกล้เคียงมากขึ้นกับเวลาที่ใช้ในการบดเคี้ยวอาหาร และจากการศึกษาให้ข้อมูลในเบื้องต้นถึงอิทธิพลของความถี่ (frequency) ร่วมกับการให้แรงแบบ cyclic ด้วย ซึ่งการทดลองเปรียบเทียบกับในเชิงความถี่ยังมีการศึกษาน้อยมาก
2. การตอบสนองของเซลล์ต่อแรงดึงแบบ static ซึ่งเป็นลักษณะของแรงดึงจากการจัดฟันที่เซลล์เอ็นดอทีลียัลได้รับ โดยปกติจะมีค่าสูงสุดและคงที่ในช่วง 48 ชั่วโมงแรก จากนั้นจะลดต่ำลง โดยระหว่างนั้นเนื้อเยื่อจะเกิดการตอบสนองและเข้าสู่ขั้นตอนการ remodeling (Krishnan V and Davidovitch Z, 2006) ซึ่งในการศึกษานี้ พบการแสดงออกของ MMP-14 ที่เพิ่มขึ้น ในขณะที่ไม่มีผลต่อระดับของ TIMPs ทั้งนี้สัมพันธ์กับระยะดึง (magnitude) ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งมีรายงานแสดงอิทธิพลของขนาดของแรงต่อการแสดงออกของยีนหลายชนิดในเซลล์เอ็นดอทีลียัล (Yamguchi M, *et al.*, 1994; Enokiya Y, *et al.*, 2010; Nokhbehssaim M, *et al.*, 2010)
3. ระดับการเปลี่ยนแปลงที่เพิ่มขึ้นค่อนข้างชัดเจนของ MMP-14 เมื่อได้รับแรงแบบ static หรือ cyclic โดยที่ระดับของ TIMP-2 ไม่เปลี่ยนแปลงอาจส่งผลกระทบต่อสมดุลของการทำงานของเอนไซม์ เนื่องจากสัดส่วนของ MMP-14 และ TIMP-2 มีผลต่อการเกิด activation ของ MMP-2 (Holmbeck K, *et al.*, 2004) ซึ่งจะนำไปสู่การเกิด remodeling ในส่วนของ degradation ได้ การตรวจวัดในระดับโปรตีนของ MMP-14 และ activation ของ MMP-2 เป็นส่วนที่น่าศึกษาต่อไป
4. ในสภาวะที่ได้รับ IL-1 β ร่วมกับแรงดึงแบบ cyclic พบการเพิ่มขึ้นของ inflammatory cytokines อื่นๆ อีก และการลดการสร้าง ECM ของเซลล์ ซึ่งสัมพันธ์กับปัจจัยของขนาดของแรง แต่ยังไม่เคยมีรายงานเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงระดับ MMPs/TIMPs ในเซลล์เอ็นดอทีลียัล (Nokhbehssaim M, *et al.*, 2010) ในการศึกษาครั้งนี้ ได้จำลองสภาวะการอักเสบด้วยการกระตุ้นด้วย IL-1 β พบว่าการได้รับแรงดึงที่มีความถี่ต่ำ อาจช่วยรักษาเนื้อเยื่อให้คงอยู่ในสภาวะสมดุล โดยการคงระดับการแสดงออกของเอนไซม์ MMP-2 และ 3 ไว้ แต่ถ้าความถี่ที่สูงเกินระดับที่จะรักษาสมดุลนั้นได้ จะกลายเป็นปัจจัยส่งเสริมภาวะอักเสบให้รุนแรงขึ้นจากปริมาณเอนไซม์ที่ เพิ่มขึ้น ในส่วนของ MMP-13 และ 14 การได้รับ IL-1 β ร่วมกับแรงดึงแบบ cyclic กลับมีแนวโน้มเพิ่ม โดยที่ไม่เกี่ยวกับปัจจัยของความถี่

สรุป

1. เซลล์เอ็นซีทีปริทันต์ตอบสนองต่อแรงดึงที่รูปแบบ ขนาด ความถี่ และ ระยะเวลา ในการแสดงออกของ เอนไซม์ MMP-2, 3, 13, 14 และ TIMP-1 และ 2 แตกต่างกันไปในแต่ละชนิดของยีน
2. ผลการศึกษานำไปสู่ข้อเสนอนี้ในเบื้องต้นว่า ในสถานะที่มีการอักเสบการได้รับแรงในความถี่ต่ำ อาจช่วยรักษาเนื้อเยื่อให้คงอยู่ในสภาวะสมดุล โดยการคงระดับการสร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลายเมทริกซ์ ไว้ในระดับปกติ แต่ถ้าความถี่สูงเกินระดับที่จะรักษาสมดุลนั้นได้ จะกลายเป็นปัจจัยส่งเสริมภาวะอักเสบให้รุนแรงขึ้นได้ จากปริมาณเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อ

การวิจัยในขั้นต่อไป

1. ตรวจวัดการแสดงออกในระดับโปรตีนของ MMPs ที่มีการเปลี่ยนแปลงในระดับยีนที่ชัดเจน
2. ศึกษากลไกการส่งถ่ายสัญญาณภายในเซลล์ที่มีผลต่อการแสดงออกของยีน MMPs และตัวยับยั้งโดยใช้ inhibitors ต่อ signaling molecules ต่างๆ เมื่อได้รับ cyclic stretch ร่วมกับ interleukin-1 β ในเซลล์เอ็นซีทีปริทันต์ของมนุษย์

อุปสรรคในการดำเนินงาน และแนวทางการแก้ไข

1. ในระหว่างที่ทำการศึกษาวิจัยนี้ได้มีการพัฒนา stretch apparatus อย่างต่อเนื่อง โดยในท้ายที่สุด stretch apparatus ที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ จะทำงานโดยการส่งผ่านแรงควบคุมอิเล็กทรอนิกส์ ที่มีโปรแกรมที่สามารถกำหนด และปรับเปลี่ยนค่าปัจจัยที่เกี่ยวข้องของแรงในช่วงที่ทำการศึกษาได้ การเคลื่อนที่ของแขนจับแผ่น silicone จึงเคลื่อนที่ในรูปแบบของแรงดึงเชิงเส้น ด้วยแรงที่สม่ำเสมอคงที่ ทำให้ค่าปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการศึกษา มีความเที่ยงตรงมากยิ่งขึ้นกว่าเครื่องต้นแบบเดิมที่ใช้ในการทดลองช่วงแรก ดังนั้นบางส่วนของโครงการวิจัยนี้ จะต้องมีการทำซ้ำโดยใช้เครื่องมือใหม่ เพื่อยืนยันผลการศึกษาที่ได้
หมายเหตุ: รายละเอียดการประดิษฐ์ stretch apparatus นี้ ได้ยื่นเพื่อขอรับสิทธิบัตรแล้ว
2. stretch apparatus ยังมีเพียง 1 ชุด และทำการทดลองได้ครั้งละ 1 ตัวอย่าง (sample) ทำให้งานค่อนข้างล่าช้า
3. การขาดแคลนเซลล์ในบางช่วง เนื่องจากบางครั้งไม่สามารถเลี้ยงเซลล์เอ็นซีทีปริทันต์จากพื้นที่ได้มาได้ หรือเกิดการติดเชื้อในระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์จากพื้น ตลอดจนเซลล์ที่เลือกใช้ต้องเป็น passage number ที่ไม่เกิน 5 ซึ่งทำให้มีบางช่วงเวลาที่ปัญหาขาดแคลนเซลล์
4. ปัญหาการติดเชื้อแบคทีเรียหรือรา

บรรณานุกรม

- Anastasi G, Cordasco G, Matarese G, Rizzo G, Nucera R, Mazza M, et al. An immunohistochemical, histological, and electron-microscopic study of the human periodontal ligament during orthodontic treatment. *Int J Mol Med*. 2008; 21:545-54.
- 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.
- 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.
- 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.
- Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol*. 2003;74(3):391-401.
- 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.
- Harrel SK, Nunn ME, Hallmon WW. Is there an association between occlusion and periodontal destruction?: Yes--occlusal forces can contribute to periodontal destruction. *J Am Dent Assoc*. 2006;137(10):1380, 1382, 1384 passim. Review.

- Holmbeck K, Bianco P, Yamada S, Birkedal-Hansen H. MT1-MMP: a tethered collagenase. *J Cell Physiol.* 2004;200(1):11-9.
- 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, 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.
- 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.
- Kook SH, Jang YS, Lee JC. Involvement of JNK-AP-1 and ERK-NF-KB signaling in tension-stimulated expression of type I collagen and MMP-1 in human periodontal ligament fibroblasts. *J Appl Physiol.* 2011;111(6):1575-83.
- Krishnan V, Davidovitch Z. Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2006;129:469.e1-e32.
- 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.

- 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.
- 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.
- Nokhbehshaim 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.
- 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 remodeling. *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.
- Rath-Deschner B, Deschner J, Reimann S, Jager A, Gotz W. Regulatory effects of biomechanical strain on the insulin-like growth factor system in human periodontal cells. *J Biomech.* 2009;42(15):2584-9.
- 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.
- Takano M, Yamaguchi M, Nakajima R, Fujita S, Kojima T, Kasai K. Effects of relaxin on collagen type I released by stretched human periodontal ligament cells. *Orthod Craniofac Res.* 2009;12:282-8.
- 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 metalloproteinase-1 and -2. *J Bone Miner Metab.* 2004;22(2):94-103.
- 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.
- Ziros PG, Gil AP, Georgakopoulos T, Habeos I, Kletsas D, Basdra EK, Papavassiliou AG. The bone-specific transcriptional regulator *Cbfa1* is a target of mechanical signals in osteoblastic cells. *J Biol Chem.* 2002;277(26):23934-41.

ประวัติคณะผู้วิจัย

1. นางนรีชา สารชวนะกิจ

Mrs Neeracha Sanchavanakit

ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์

หน่วยงาน ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทร. 02-218-8885 โทรสาร 02-218-8870 E-mail: 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

Prasit Pavasant

ตำแหน่งปัจจุบัน ศาสตราจารย์

หน่วยงาน ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทร. 02-218-8885 โทรสาร 02-218-8870 E-mail: 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

Piyamas Sumrejkanchanakij

ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์

หน่วยงาน ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทร. 02-218-8885 โทรสาร 02-218-8870 E-mail: 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