

## การชักนำเซลล์เนื้อเยื่อในฟันของฟันมนุษย์เป็นเซลล์สลายเนื้อฟัน: การศึกษาในหลอดทดลอง

### Induction of Human Dental Pulp Cells to Odontoclasts: An *In Vitro* Study

อาสา เบญจรวางศ์ (Asa Benjarurawong)\* ดร.ภูมิกัด เลาวกุล (Dr.Phumisak Louwakul)\*\*

ดร.ชยารพ สุพรรณชาติ (Dr.Chayarop Supanchart)\*\*\*

#### บทคัดย่อ

การสูญเสียจากภายในของรากฟันเป็นพยาธิสภาพที่ทำให้เกิดการสูญเสียเนื้อฟันเริ่มจากในคลองรากฟัน เซลล์ที่เป็นสาเหตุและแหล่งที่ยังไม่ทราบแน่ชัดเนื่องจากบริเวณนั้นมีเซลล์หลายชนิด อาจเป็นโมโนไซต์ที่สามารถเปลี่ยนเป็นเซลล์สลายเนื้อเยื่อแข็งได้ หรือเป็นเซลล์เนื้อเยื่อในฟันซึ่งประกอบด้วยเซลล์หลายชนิดที่มีศักยภาพในการเปลี่ยนสภาพเป็นเซลล์ชนิดอื่นได้ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความสามารถของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันของมนุษย์ในการเปลี่ยนสภาพเป็นเซลล์สลายเนื้อฟัน โดยกระตุ้นด้วย RANKL และ M-CSF ซึ่งเป็นปัจจัยชักนำให้เปลี่ยนสภาพเปรียบเทียบกับโมโนไซต์ หลังจาก 7 วันพบว่า เซลล์เนื้อเยื่อในฟันไม่มีการเปลี่ยนสภาพเป็นเซลล์รูปร่างคล้ายเซลล์สลายเนื้อเยื่อแข็ง ส่วนโมโนไซต์ที่พบการเปลี่ยนสภาพในอัตราร้อยละ 89 ภายใต้สภาวะการทดลองนี้อาจสรุปผลได้ว่า เซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อในฟันของมนุษย์ไม่มีความสามารถในการเปลี่ยนสภาพเป็นเซลล์สลายเนื้อฟัน

#### ABSTRACT

Internal root resorption is a resorption of dentin, which starts in the pulpal cavity and destroys surrounding dental hard tissues. The etiology and cell of origins that responsible for the resorption are partially understood. Areas of resorption compose of various cell types: monocytes which can differentiate into clastic cells and human dental pulp cells (hPDCs) which have potential to differentiate into many types of cells. The aim of this study was to evaluate the differentiation of hPDCs to odontoclasts. hPDCs were induced by RANKL and M-CSF which are essential cytokines for differentiation to clast-like cells. Monocytes were used as control. After 7 days, no clast-like cell was found in the hPDCs group, but 89% of clast-like cells were observed from the monocyte group. Within the limitations of this study, it may be concluded that hPDCs cannot differentiate to odontoclasts.

**คำสำคัญ:** เซลล์เนื้อเยื่อในฟัน โมโนไซต์ การเปลี่ยนสภาพ

**Key Words:** Dental pulp cells, Monocytes, Differentiation

\* นักศึกษา หลักสูตรทันตแพทยศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาเอนโดคอนต์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

\*\* อาจารย์ ภาควิชาทันตกรรมบูรณะและปริทันตวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

\*\*\* อาจารย์ ภาควิชาศัลยศาสตร์ช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

## บทนำ

การสูญเสียจากภายใน (internal root resorption) เป็นปรากฏการณ์การสูญเสียของรากฟัน (root resorption) ที่มีจุดเริ่มต้นภายในคลองรากฟัน โดยมีการสูญเสียของเนื้อฟันที่อยู่รอบๆ บริเวณจุดเริ่มต้นสาเหตุอาจเกิดจากอุบัติเหตุหรือการอักเสบชนิดเรื้อรังของเนื้อเยื่อในฟัน (dental pulp) หรือสาเหตุอื่นๆ เมื่อเกิดการสูญเสียจากภายในอาจทำให้เกิดรูทะลุ (perforation) จากภายในสู่ภายนอกรากฟันได้ หรือการละลายอาจหยุดได้เองหากเนื้อเยื่อในฟันตายไปทั้งหมด ฟันที่มีการสูญเสียจากภายในส่วนใหญ่ไม่มีอาการหรืออาการแสดง ยกเว้นกรณีเกิดรูทะลุ อาจพบรูเปิดของหนองได้ การวินิจฉัยทำได้โดยการถ่ายภาพรังสี มักพบเงาโปร่งรังสีที่ไม่เป็นไปตามลักษณะคลองรากฟันปกติ อาจมีลักษณะเป็นรูปไข่หรือไม่แน่นอนตามรูปร่างของคลองรากฟัน หากเกิดบริเวณส่วนต้นของคลองราก ตัวฟันอาจเปลี่ยนเป็นสีชมพู เมื่อเกิดการสูญเสียจากภายในจะทำให้รากฟันมีความแข็งแรงลดลง ถ้าการละลายไม่มากสามารถรักษาได้ด้วยการรักษาคคลองรากฟัน แต่บางกรณีที่มีการสูญเสียเนื้อฟันมาก อาจต้องสูญเสียฟันซี่นั้นไปในที่สุด

อัตราการเกิดการสูญเสียจากภายในพบได้น้อยเมื่อเทียบกับการสูญเสียของรากฟันแบบอื่นๆ ทำให้การค้นหาสาเหตุการเกิดทำได้ยาก และยังไม่เป็นที่เข้าใจโดยกระจ่าง แต่สันนิษฐานว่าสาเหตุน่าจะเกิดจากการอักเสบร่วมกับการสูญเสียสิ่งที่ปกป้องผิวเนื้อฟันภายในคลองรากฟัน ได้แก่ ฟริเดนติน (predentin) และชั้นเซลล์สร้างเนื้อฟัน (odontoblastic layer) ที่ปกคลุมเนื้อฟันภายในคลองรากฟัน ซึ่งยังไม่ทราบแน่ชัดว่าการสูญเสียสิ่งเหล่านี้มาจากสาเหตุใด อย่างไรก็ตามจากการทบทวนวรรณกรรม ส่วนใหญ่เชื่อว่าปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการสูญเสียจากภายในมีได้หลายสาเหตุ ได้แก่ อุบัติเหตุต่อตัวฟัน เนื้อเยื่อในฟันอักเสบ การตัดเนื้อเยื่อในฟันส่วนตัวฟัน (pulpotomy) (Barclay, 1993) ฟันร้าว (Walton & Leonard, 1986) การปลูกถ่ายฟัน (tooth transplant), การทำทันตกรรมหัตถการ, ภาวะ

ฟันในฟัน (dens invagination), การจัดฟัน (Brady & Lewis, 1984) หรือแม้กระทั่งการติดเชื้อไวรัส (Solomon et al., 1986)

Tronstad (1988) ได้อธิบายกลไกการเกิดการสูญเสียจากภายใน โดยคาดว่าเนื้อเยื่อในฟันบริเวณส่วนต้นของคลองรากที่มีการติดเชื้อหรือตายเป็นสิ่งกระตุ้นเรียกเซลล์ตั้งต้นของเซลล์สลายกระดูก (osteoclast progenitors) มาจากกระแสเลือด ในขณะเดียวกันเนื้อเยื่อในฟันบริเวณส่วนปลายของรากฟันยังมีชีวิตอยู่ มีเส้นเลือด ซึ่งเป็นเส้นทางนำพาเซลล์ตั้งต้นของเซลล์สลายกระดูกและสารอาหารเข้ามายังบริเวณที่เกิดการสูญเสียเนื้อฟัน และกระตุ้นให้เกิดการสูญเสียเนื้อฟันเกิดขึ้น

โดยทั่วไปเซลล์ที่มีหน้าที่หลักในการสลายเนื้อเยื่อแข็ง คือ เซลล์สลายเนื้อเยื่อแข็ง (clastic cell) มีต้นกำเนิดจากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยว (human peripheral blood mononuclear cell; PBMC) หรือโมโนไซต์ (monocyte) ที่มาจากไขกระดูก (bone marrow) ถ้ามีหน้าที่สลายกระดูกเรียกว่าเซลล์สลายกระดูก (osteoclast) แต่ถ้าอยู่ในคลองรากฟันทำหน้าที่สลายเนื้อฟันจะเรียกว่า เซลล์สลายเนื้อฟัน (odontoclast) (Sahara et al., 1992) ซึ่งจะทำหน้าที่ได้ก็ต่อเมื่อได้รับสัญญาณจากเซลล์จากไขกระดูกในชั้นเนื้อเยื่อโครง (stroma) ต่างๆที่อยู่ในบริเวณนั้น เช่น เซลล์สร้างกระดูก เซลล์สร้างเนื้อฟัน เซลล์สร้างเส้นใย (fibroblast) เป็นต้น

เซลล์สลายเนื้อเยื่อแข็งเป็นเซลล์ที่มีลักษณะพิเศษคือ เซลล์มีขนาดใหญ่ มีหลายนิวเคลียส เกิดจากการรวมกันของโมโนนิวเคลียร์โอดอนโตคลาสต์พรีเคอร์เซอร์ (mononuclear odontoclast precursor) เช่นเดียวกับเซลล์สลายเนื้อฟัน (Domon et al., 1998) โดยจะรวมตัวและทำงานได้ต่อเมื่อได้รับไซโตไคน์ (cytokine) ที่สำคัญ คือ แม็กโครแฟกโคโลนีสติมูเลตติงแฟกเตอร์ (macrophage colony-stimulating factor; M-CSF) และ รีเซพเตอร์แอกทิเวตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบีไลแกนด (receptor activator of

nuclear factor kappa-B ligand; RANKL) (Lacey et al., 1998)

ในปัจจุบันเชื่อว่า เซลล์ที่ทำหน้าที่สลายเนื้อฟันภายในคลองรากฟันมีต้นกำเนิดมาจากโมโนไซต์ที่สร้างจากไขกระดูก ซึ่งเป็นเซลล์เริ่มต้นในกระบวนการเปลี่ยนสภาพเป็นเซลล์สลายเนื้อฟัน แต่เนื่องจากบริเวณที่เกิดการสูญเสียจากภายในมีปริมาณเซลล์หนาแน่นและมีความหลากหลายของเซลล์ ได้แก่ เซลล์สร้างเนื้อฟัน (odontoblast), เซลล์สร้างเส้นใย, แมกโครเฟจ (macrophage), เดนไดรติกเซลล์ (dendritic cell) และสเต็มเซลล์จากเนื้อเยื่อในฟัน ซึ่งเซลล์บางชนิดสามารถสร้างไซโตไคน์ (cytokines) ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนสภาพไปเป็นเซลล์สลายเนื้อเยื่อแข็งได้ รวมทั้งศักยภาพของเซลล์บางชนิดที่สามารถเปลี่ยนสภาพไปเป็นเซลล์อื่นๆ ได้ จากการศึกษาของ Duan และคณะ ในปี 2012 พบว่าเซลล์ที่มีต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อบริเวณปุ่มเนื้อกำเนิดฟัน (dental papilla) ในหนูทดลองสามารถทำหน้าที่สลายเนื้อเยื่อแข็งได้ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่เซลล์เนื้อเยื่อในฟันที่มีต้นกำเนิดมาจากปุ่มเนื้อกำเนิดฟันจะมีศักยภาพในการเปลี่ยนสภาพไปเป็นเซลล์สลายเนื้อเยื่อแข็งได้

อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาที่ยืนยันถึงความสามารถของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันของมนุษย์ในการเปลี่ยนสภาพไปเป็นเซลล์สลายเนื้อฟัน และเพื่อศึกษาสาเหตุที่ทำให้เกิดการสูญเสียจากภายใน งานวิจัยนี้จึงมีสมมติฐานว่า เซลล์เนื้อเยื่อในฟันของมนุษย์ไม่มีความสามารถในการเปลี่ยนสภาพเป็นเซลล์สลายเนื้อฟันได้

### วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาความสามารถในการเปลี่ยนสภาพเป็นเซลล์คล้ายเซลล์สลายสลายเนื้อเยื่อแข็ง (clast-like cells) ของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันในหลอดทดลอง

### วิธีการวิจัย

#### 1. การคัดแยกเซลล์เนื้อเยื่อในฟัน

เซลล์เนื้อเยื่อในฟันปฐมนิยามได้จากการแยกเนื้อเยื่อในฟันของฟันกรามซี่ที่ 3 ที่ไม่มีโรค จากอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี อายุระหว่าง 20-30 ปี และได้รับการถอนฟันเนื่องจากเหตุผลด้านการจัดฟันจำนวน 3 ราย โดยทำการผ่าแยกฟันด้วยงานแบ่งฟันชนิดคาโบรันดัม (carborundum disc) ด้วยวิธีปลอดเชื้อ นำเนื้อเยื่อในฟันมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงมีนัมเอชเซนเซียมมีเดียมิเอิลเชนดิอัลฟา (minimum essential medium eagle alpha modifications หรือ MEM  $\alpha$ ; Gibco<sup>®</sup>, California, USA) ที่มีซีรัมจากลูกวัว (fetal calf serum; Gibco<sup>®</sup>) ปริมาตรร้อยละ 10 และยาปฏิชีวนะและยาต้านเชื้อรา (Gibco<sup>®</sup>) ปริมาตรร้อยละ 1 บนจานเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.5 มิลลิเมตร ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์จนถึงรุ่น (passage) ที่ 3 โดยใช้ทริปซินอีดีทีเอ (trypsin-EDTA; Gibco<sup>®</sup>) ร้อยละ 0.5 ในการแยกเซลล์จากหุ่นหนึ่งๆ ไปสู่รุ่นต่อไป

#### 2. การคัดแยกเซลล์โมโนไซต์

เซลล์โมโนไซต์หรือเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สลายกระดูก (osteoclast progenitor) ได้จากการคัดแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวจากเลือดมนุษย์ โดยนำตัวอย่างเลือดปริมาตร 5 มิลลิลิตร ซึ่งได้จากหลอดเลือดดำของอาสาสมัครที่มีอายุระหว่าง 20-30 ปี จำนวน 3 ราย นำไปปั่นคัดแยกด้วยวิธีเดนซิทีเกรเดียนเซนทริฟูกชัน (density gradient centrifugation) กับสารละลายไฟคอลเพก (Ficoll-Paque<sup>™</sup>, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) นำเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวที่แยกได้ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM  $\alpha$  ที่มีซีรัมจากลูกวัว (fetal calf serum; Gibco<sup>®</sup>) ปริมาตรร้อยละ 10 และยาปฏิชีวนะและยาต้านเชื้อรา (Gibco<sup>®</sup>) ปริมาตรร้อยละ 1

#### 3. การเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์สลายเนื้อเยื่อแข็ง

เซลล์เนื้อเยื่อในฟันและเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวถูกย้ายไปเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม จำนวน  $1.5 \times 10^3$  และ  $1.5 \times 10^5$  เซลล์ต่อหลุม ตามลำดับ เพื่อให้ได้ความหนาแน่นของหลุมที่

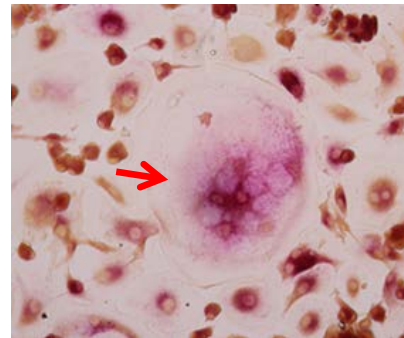
เท่าๆกัน ในปริมาณร้อยละ 80 โดยแบ่งกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลองดังต่อไปนี้ กลุ่มควบคุมบวก คือ เซลล์ เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวที่จะทำการใส่ปัจจัย กระตุ้นทั้ง M-CSF และ RANKL กลุ่มควบคุมลบ คือ เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวที่ไม่ใส่ปัจจัย กระตุ้นใดๆ กลุ่มทดลองบวก คือ เซลล์เนื้อเยื่อในฟันที่จะทำการใส่ปัจจัยกระตุ้นทั้ง M-CSF และ RANKL และกลุ่มทดลองลบ คือ เซลล์เนื้อเยื่อในฟันที่ไม่ใส่ ปัจจัยกระตุ้นใดๆ

การทดลองแต่ละครั้งได้ทำซ้ำกลุ่มละ 3 หลุม หลังจากนั้นใส่ไซโตไคน์ คือ M-CSF ปริมาตร 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ/หรือ RANKL ปริมาตร 30 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรต่อหลุม เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ และไซโตไคน์วันเว้นวัน เมื่อครบ 7 วัน นำเซลล์ที่ได้ ไปตรึงสภาพด้วยสารละลายพาราฟอร์มัลดีไฮด์ ปริมาตรร้อยละ 4 (paraformaldehyde; Sigma-Aldrich®, St. Louise, MO, USA) ที่ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ซาลีน (phosphate buffer saline; PBS, Gibco®) เป็น เวลารวม 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วล้าง ออกด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน 2 ครั้ง นำเซลล์ที่ได้ ไปตรึงสภาพด้วยสารละลายพาราฟอร์มัลดีไฮด์ ปริมาตรร้อยละ 4 (Sigma-Aldrich®) ที่ละลายในฟอส เฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (Gibco®) เป็นเวลารวม 10 นาที ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วล้างออกด้วยฟอสเฟต บัฟเฟอร์ซาลีน 2 ครั้ง นำเซลล์ไปย้อมด้วยเอนไซม์ทาร์ เทรทรีซิสแทนซ์ เอซิดฟอสฟาเทส (Tartrate resistase acid phosphatase; TRAcP) และ 4'6 ไดอะมิโดโน 2 ฟี นิไดอินโดล (4'6-diamidino-2-phenylindol หรือ DAPI) นำเซลล์ที่ผ่านการย้อมไปส่องกล้องจุลทรรศน์ใช้แสง ชนิดหัวกลับเพื่อศึกษาสัณฐานวิทยา (morphology) ของเซลล์และนับจำนวนเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายกับ เซลล์สลายเนื้อเยื่อแข็ง (clast-like cell) (รูปที่ 1) โดยมี เกณฑ์การจำแนก ดังนี้

1. เซลล์มีลักษณะใหญ่ ลักษณะคล้ายไข่ดาว
2. มีนิวเคลียสจำนวนมากหรือเท่ากับ 3 นิวเคลียสขึ้นไป

3. ย้อมติดสีม่วงแดงซึ่งบ่งบอกถึงการ แสดงออกของเอนไซม์ TRAcP

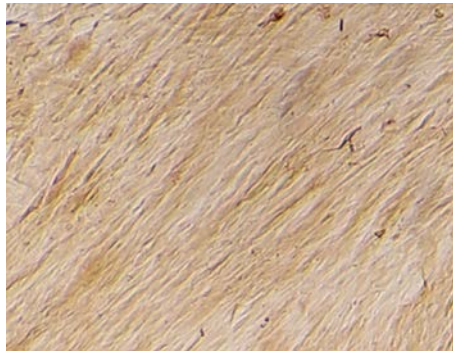
โดยจะทำการนับซ้ำ 2 ครั้ง หลังจากนั้นใช้ สถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistics) ในการอธิบาย ผล



**รูปที่ 1** ลูกศรสีแดงแสดงรูปร่างเซลล์ที่มีลักษณะ คล้ายเซลล์สลายกระดูก โดยจะมีขนาดใหญ่ กว่าเซลล์ปกติลักษณะนิวเคลียสติดสีน้ำตาล หลายนิวเคลียสใน 1 เซลล์ ติดสีม่วงแดงของ เอนไซม์ TRAcP ต่างจากเซลล์รอบๆที่มี ขนาดเล็กติดสีม่วงแดงบ้าง มีการรวมตัวของ นิวเคลียส 1-2 เซลล์บ้าง แต่ไม่ครบเกณฑ์ใน การจำแนกเซลล์สลายเนื้อเยื่อแข็ง

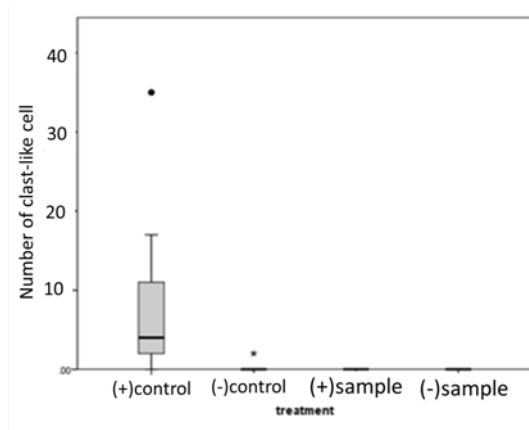
#### ผลการทดลอง

ในกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวที่ ใส่ปัจจัยกระตุ้น M-CSF และ RANKL พบเซลล์ที่มี ลักษณะคล้ายเซลล์สลายเนื้อเยื่อแข็งอยู่ 8 ใน 9 หลุม โดยพบเซลล์ที่มีขนาดใหญ่กว่าโมโนไซต์ปกติ ตัว เซลล์ติดสีม่วงแดง นิวเคลียสติดสีน้ำตาล และภายใน เซลล์พบหลายนิวเคลียส (รูปที่ 1) ในขณะที่กลุ่มเซลล์ เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวที่ไม่ใส่ปัจจัยกระตุ้น พบเพียง 2 หลุมเท่านั้น โดยพบลักษณะของโมโนไซต์ ปกติ รูปร่างลักษณะมีทั้งกลมและกระสวย ขนาดไม่ ใหญ่ ตัวเซลล์มีทั้งที่ติดและไม่ติดสีม่วงแดง นิวเคลียส ติดสีน้ำตาล และภายในเซลล์พบเพียง 1-2 นิวเคลียส เท่านั้น



**รูปที่ 2** ลักษณะของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันที่มีการใส่ปัจจัยกระตุ้น RANKL และ M-CSF ที่ผ่าน การย้อมเอนไซม์ TRAcP และ DAPI จะพบ ลักษณะเซลล์เป็นกระสวยสานกัน รูปร่างไม่สามารถจำแนกขอบเขตได้ชัดเจน โดยเฉพาะ สีนํ้าตาลที่ใช้ย้อมนิวเคลียส ไม่ติดสีม่วงแดง ที่เป็นการแสดงออกของเอนไซม์ TRAcP

ในขณะที่ทั้งกลุ่มเซลล์เนื้อเยื่อในฟันที่ใส่ปัจจัยกระตุ้น M-CSF และ RANKL (รูปที่ 2) และกลุ่มเซลล์เนื้อเยื่อในฟันที่ไม่ใส่ปัจจัยกระตุ้นไม่พบเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์สลายเนื้อเยื่อแข็งเลยแม้แต่เซลล์เดียวซึ่งแสดงในกราฟ (รูปที่ 3)



**รูปที่ 3** กราฟแสดงจำนวนเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์สลายเนื้อเยื่อแข็งที่นับได้ในทุกกลุ่มการทดลอง

### อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

ในการศึกษานี้ใช้เซลล์โมโนไซต์ที่อยู่ในกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยว ซึ่งเป็นเซลล์ที่สามารถเปลี่ยนสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูกเป็นตัวแทนของกลุ่มควบคุม เนื่องจากเซลล์สลายเนื้อเยื่อที่มีลักษณะที่คล้ายคลึงกับเซลล์สลายกระดูก กล่าวคือ มีจำนวนนิวเคลียสหลายนิวเคลียสภายในหนึ่งเซลล์เหมือนกัน สามารถสลายเนื้อเยื่อแข็งได้โดยปลดปล่อยเอนไซม์ชนิดเดียวกัน สร้างหาวิพลาสมา (Howship's lacunae) บนผิวของเนื้อเยื่อที่มีการพอกพูนของแร่ธาตุได้เช่นเดียวกัน แต่เซลล์สลายเนื้อเยื่อมีขนาดเล็กกว่า (Linskog et al., 1983) ในการศึกษานี้ผู้วิจัยได้ย้อมเอนไซม์ TRAcP ซึ่งติดสีชมพู เพื่อดูการแสดงออกของการทำงานของเซลล์และ DAPI ซึ่งติดสีน้ำเงิน เพื่อดูลักษณะนิวเคลียสของเซลล์ (Supanchart et al., 2012)

ในขณะที่ผลการศึกษากลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวที่ใส่ปัจจัยกระตุ้น M-CSF และ RANKL มีความแตกต่างกันมากภายในกลุ่มนั้น คาดว่าเนื่องจากศักยภาพในการเปลี่ยนสภาพของโมโนไซต์เป็นเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายกับเซลล์สลายเนื้อเยื่อแข็ง มีความแตกต่างกันระหว่างอาสาสมัครแต่ละราย ทั้งนี้ อาจเนื่องจากความแตกต่างทางด้านเพศและอายุนอกจากนี้ขั้นตอนการปั่นเลือดเพื่อแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยว มีการปนของเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์รวมมาด้วย เนื่องจากความหนาแน่นของเซลล์ดังกล่าวอยู่ในช่วงที่สูงกว่าโมโนไซต์เพียงเล็กน้อย อาจทำให้เกิดความแตกต่างของปริมาณโมโนไซต์ที่แยกได้จากเลือดของอาสาสมัครแต่ละราย ซึ่งตามปกติมีปริมาณเพียงร้อยละ 10-20 ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวเท่านั้น (Jones et al., 1989) อย่างไรก็ตามวิธีการดังกล่าวยังคงทำให้เกิดเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายกับเซลล์สลายเนื้อเยื่อแข็งได้ในตัวอย่างเกือบทั้งหมด

ในขณะที่บางตัวอย่างของกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวที่ไม่ใส่ปัจจัยกระตุ้นนั้น กลับพบเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์สลายเนื้อเยื่อแข็ง



เช่นกัน อาจเนื่องมาจาก M-CSF ซึ่งเป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดการอยู่รอด และเปลี่ยนสภาพของเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สลายเนื้อเยื่อแข็ง สามารถผลิตได้จากหลายแหล่ง แม้กระทั่งเซลล์บุผนังหลอดเลือด (endothelial cell) ดังนั้นอาจพบการปนเปื้อนของ M-CSF ในตัวอย่างเลือดของอาสาสมัคร ซึ่งอาจทำให้เกิดการรวมตัวของเซลล์ได้

ผลการทดลองนี้แตกต่างจากการศึกษาของ Duan et al. (2012) ที่ใช้เซลล์ เอ็มพีดีซี-23 (MPDC-23) ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งที่แยกได้จากปุ่มเนื้อกำเนิดฟันของหนูทดลอง ที่พบว่าเซลล์ที่สามารถเจริญไปเป็นเนื้อเยื่อในฟันสามารถเปลี่ยนสภาพไปเป็นเซลล์สลายเนื้อฟันและสามารถทำหน้าที่สลายเนื้อฟันได้ อาจเนื่องจากการทดลองนี้เลือกใช้เซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อในฟันมนุษย์ซึ่งเป็นเซลล์ที่ได้ถูกเปลี่ยนสภาพมาแล้ว จึงทำให้ความสามารถในการเปลี่ยนสภาพลดลง เนื่องจากผู้ศึกษาต้องการใช้เซลล์จากบริเวณที่เกิดการสูญเสียจากภายในของรากฟันภายหลังจากที่มีการสร้างรากฟันเสร็จเรียบร้อยแล้ว ทำให้ผลที่ได้มีความแตกต่างกัน ประกอบกับการศึกษานี้ไม่ได้จำแนกชนิดของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันที่ใช้ว่าเป็นเซลล์ใด ดังนั้นเซลล์ที่มีศักยภาพในการเปลี่ยนสภาพเป็นเซลล์สลายเนื้อเยื่อแข็ง เช่น เดนไดรติกเซลล์ (Speziani et al., 2007) อาจมีปริมาณไม่เพียงพอ หรือไม่เกาะกลุ่ม หรือหายไปในช่วงการเพาะเลี้ยงก็เป็นได้ ดังนั้นแม้จะได้รับการกระตุ้นทั้งจาก M-CSF และ RANKL ก็ไม่เกิดการเปลี่ยนสภาพเป็นเซลล์สลายเนื้อเยื่อแข็งได้

นอกจากนี้เนื้อเยื่อในฟันยังประกอบด้วยเซลล์หลายชนิดที่สามารถสร้างออสทีโอโปรทีจรีน (osteoprotegerin; OPG) ได้ ซึ่ง OPG เป็นไซโตไคน์ที่สามารถยับยั้งการเปลี่ยนสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูกในสถานะที่มี RANKL มากเกินไป (Simonet et al., 1997)

ภายใต้สภาวะการทดลองนี้ อาจสรุปผลการทดลองได้ว่า เซลล์เนื้อเยื่อในฟันของฟันมนุษย์ไม่มี

ความสามารถในการเปลี่ยนสภาพเป็นเซลล์สลายเนื้อฟัน

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และศูนย์วิจัยชีววิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ทดลองที่ทำให้งานวิจัยสำเร็จได้ด้วยดี

## เอกสารอ้างอิง

- Barclay, C. 1993. Root resorption 2 Internal root resorption. Dent update. 20(7):292-4.
- Brady, J., Lewis, DH. Internal resorption complicating orthodontic tooth movement. 1984 Br J Orthod. 11(3):155-7.
- Domon, T., Yasuda, M., Osanai, M., Suzuki R., Takahashi, S., Yamamoto, T. 1998. Increase in odontoclast nuclei number by cell fusion: a three-dimensional. Anat Rec. 252(3): 462-71
- Duan, X., Yang, T., Zhang, Y., Wen, X., Xue, Y., Zhou, M. 2013. Odontoblast-like MDPC-23 cells function as odontoclasts with the RANKL/M-CSF. Arch Oral Biol. 58(3):272-8.
- Jones, BM., Nicholson, JK., Holman, RC., Hubbard, M. 1989. Comparison of monocyte separation methods using flow cytometric analysis. J Immunol Methods. 125(1-2):41-7.
- Lacey, DL., Timms, E., Tan, HL., Kelley, MJ., Dunstan, CR., Burgess, T., 1998. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. Cell. 93(2): 165-76.

- Lindskog, S., Blomlof, L., Hammarstrom, L. 1983  
Repair of periodontal tissues in vivo and in vitro. *J Clin Periodontol.* 10(2):188-205.
- Praloran, V. 1991. Structure, biosynthesis and biological roles of monocyte-macrophage colony stimulating factor (CSF-1 or M-CSF). *Nouv Rev Fr Hematol.* 33(4):323-33.
- Sahara, N., Okafuji, N., Toyoki, A., Suzuki, I., Deguchi, T., Suzuki, K. 1992. Odontoclastic resorption at the pulpal surface of coronal dentin prior to the. *Arch Histol Cytol.* 55(3):273-85.
- Simonet, WS., Lacey, DL., Dunstan, CR., Kelley, M., Chang, MS., Luthy, R.,. 1997.  
Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell.* 89(2):309-19.
- Solomon, CS., Coffiner, MO., Chalfin, HE. 1986.  
Herpes zoster revisited: Implicated in root resorption. *Journal of Endodontics.* 12(5): 210-3.
- Speziani, C., Rivollier, A., Gallois, A., Coury, F., Mazzorana, M., Azocar, O. 2007. Murine dendritic cell transdifferentiation into osteoclasts is differentially. *Eur J Immunol.* 37(3):747-57.
- Supanchart, C., Thawanaphong, S., Makeudom, A., Bolscher, JG., Nazmi, K., Kornak U. 2012.  
The Antimicrobial Peptide, LL-37, Inhibits in vitro Osteoclastogenesis. *J Dent Res.* 91(11):1071-7
- Tronstad, L. 1988. Root resorption — etiology, terminology and clinical manifestations. *Dental Traumatology.* 4(6):241-52.
- Walton, RE., Leonard, LA. 1986. Cracked tooth: An etiology for “idiopathic” internal resorption? *JOE.* 12(4):167-9.