

การแสดงออกของตัวรับเมลาโทนิชนิดที่ 1 และ 2 ของเนื้อเยื่อในฟันอักเสบแบบผันกลับไม่ได้

Expression of Melatonin Receptors 1 and 2 on Human Dental Pulp Tissues with Irreversible Pulpitis

ปิยะพร จิตอำมาตย์ (Piyabhorn Jit-armart)* ดร.อุทัยวรรณ อารยะตระกูลลิขิต (Dr.Uthaiwan Arayatrakoollikit)**

ดร.พลธรรม ไชยฤทธิ์ (Dr.Ponlatham Chaiyarit)***

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้เพื่อศึกษาการแสดงออกของตัวรับเมลาโทนิชนิดที่ 1 และ 2 ในเนื้อเยื่อในฟันมนุษย์ของผู้ป่วยโรคเนื้อเยื่อในฟันอักเสบแบบผันกลับไม่ได้ (irreversible pulpitis) ประกอบไปด้วย กลุ่มผู้ป่วยที่มีโรคเนื้อเยื่อในฟันอักเสบแบบผันกลับไม่ได้จำนวน 6 รายและกลุ่มควบคุมคืออาสาสมัครที่มีเนื้อเยื่อในฟันปกติจำนวน 12 ราย ทำการศึกษาการแสดงออกของตัวรับเมลาโทนิชนิดที่ 1 และ 2 บนเซลล์เนื้อเยื่อในฟันมนุษย์ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี (immunohistochemistry) ผลการศึกษาพบว่ามีแสดงออกของตัวรับเมลาโทนิชนิดที่ 1 และ 2 บนเนื้อเยื่อในฟันปกติและเนื้อเยื่อในฟันอักเสบแบบผันกลับไม่ได้ ระดับคะแนนการย้อมติดสีที่จำเพาะต่อตัวรับเมลาโทนิชนิดที่ 1 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ระดับคะแนนการย้อมติดสีที่จำเพาะต่อตัวรับเมลาโทนิชนิดที่ 2 ในกลุ่มเนื้อเยื่อในฟันมนุษย์ของผู้ป่วยโรคเนื้อเยื่อในฟันอักเสบแบบผันกลับไม่ได้ ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.01$) โดยสรุปภาวะการอักเสบของเนื้อเยื่อในฟันอาจมีผลกระทบต่อแสดงออกของตัวรับเมลาโทนิ ข้อมูลในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการอักเสบเรื้อรังอาจรบกวนการทำงานของเมลาโทนิในเนื้อเยื่อในฟันมนุษย์ของผู้ป่วยโรคเนื้อเยื่อในฟันอักเสบแบบผันกลับไม่ได้

ABSTRACT

The purpose of this research was to study the expression of melatonin receptors 1 and 2 on irreversible pulpitis. There were 6 irreversible pulpitis patients and 12 healthy subjects as a controlled group included in this study. The immunohistochemical method was employed to detect the expression of melatonin receptors 1 and 2 in biopsy specimens derived from dental pulp tissues. The results revealed expression of melatonin receptors 1 and 2 on irreversible pulpitis and normal pulp tissues. The levels of immunostaining scores of melatonin receptor 1 were not significantly different between two investigated groups. The levels of immunostaining scores of melatonin receptor 2 were significantly decreased in dental pulp tissues derived from irreversible pulpitis patients ($p=0.01$). In conclusion, Inflammation in dental pulp tissues may affect the expression of melatonin receptor. These findings demonstrate that chronic inflammation may interfere melatonin's functions in dental pulp tissues of irreversible pulpitis patients.

คำสำคัญ: เนื้อเยื่อในฟันมนุษย์ เมลาโทนิ การแสดงออกของตัวรับเมลาโทนิชนิด 1 และ 2

Keywords: Human dental pulp tissue, Melatonin, Expression of melatonin receptor 1 and 2

* นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาทันตแพทยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาทันตกรรมบูรณะ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

*** รองศาสตราจารย์ ภาควิชาวินิจฉัยโรคช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ กลุ่มวิจัยโรคอักเสบเรื้อรังของช่องปากและโรคทางระบบที่สัมพันธ์กับสุขภาพช่องปาก มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทนำ

เนื้อเยื่อในฟันอักเสบ (pulpitis) มักเกิดจากสาเหตุหลักได้แก่ ฟันผุ การเกิดอันตรายต่อฟันที่ทำให้เนื้อเยื่อในฟันเผยอ (dental pulp exposed) ทำให้มีการลุกลามของเชื้อแบคทีเรียเข้าไปยังเนื้อเยื่อในฟัน กลไกการป้องกันตนเองของฟันต่ออันตรายได้แก่ ลดความสามารถซึมผ่านของท่อเนื้อฟัน สร้างเนื้อฟันทุติยภูมิ (tertiary dentin) การอักเสบและการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกัน เป้าหมายหลักในการรักษาฟันที่ได้รับอันตรายต่างๆ คือการรักษาความมีชีวิตของฟันและเพื่อให้เกิดการเจริญทดแทน (regeneration) ของเนื้อฟัน

ปัจจุบันมีหลายการศึกษาค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับสารที่มีคุณสมบัติด้านการอักเสบในเซลล์เนื้อเยื่อในฟันมนุษย์ เมลาโทนินเป็นฮอร์โมนที่สร้างจากต่อมไพเนียล ซึ่งการสังเคราะห์เมลาโทนินเป็นกระบวนการที่มีลักษณะเป็นจังหวะในแต่ละวัน มีอิทธิพลจากวงจรความมืดสว่าง หรือกลางวันกลางคืนมาเกี่ยวข้อง โดยการสร้างและหลั่งของเมลาโทนินถูกควบคุมโดยแสงสว่าง พบว่ามีการสร้างปริมาณมากในเวลากลางคืนและน้อยในเวลากลางวัน (Stehle et al., 2011) เมลาโทนินมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย เช่น ควบคุมการอักเสบ เป็นต้น ปัจจุบันมีการศึกษาพบว่าเมลาโทนินมีผลลดการอักเสบในเซลล์เนื้อเยื่อในฟันมนุษย์ (Li et al., 2015) โดยกลไกลดการอักเสบของเมลาโทนินพบว่าเมลาโทนินจะจับกับตัวรับตัวรับเมลาโทนินชนิด 1 และ 2 ทำหน้าที่ยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ฟอสโฟไลเปส และลดปริมาณกรดอะราคิโดนิก (Li et al., 2000) นอกจากนี้เมลาโทนินยังไปจับกับตัวรับภายในนิวเคลียส (nuclear membrane receptor) คือตัวรับ เรตินอยด์ ซี หรือตัวรับเรตินอยด์ ออเฟน (retinoid Z receptors/retinoid orphan receptors; RZR/ROR) ส่งผลทำให้ลดการแสดงออกของเอนไซม์ไลพอกซีจีเนส (Radogna et al., 2009) ส่งผลให้ลดการอักเสบในระยะหลังของการอักเสบ (late phase of inflammation) แต่อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีการศึกษาใดเคยรายงานการแสดงผลของตัวรับเมลาโทนินบนเนื้อเยื่อในฟันมนุษย์ ดังนั้นหากทำการศึกษาลดการแสดงออกของตัวรับเมลาโทนินบนเนื้อเยื่อในฟันมนุษย์จะทำให้ทราบข้อมูลเบื้องต้นถึงกลไกการควบคุมการอักเสบของเมลาโทนินต่อเซลล์เนื้อเยื่อในฟันมนุษย์ อาจมีผลต่อการต้านการอักเสบและเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการทดแทนของเนื้อฟันได้

วัตถุประสงค์การวิจัย

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการแสดงออกของตัวรับเมลาโทนินชนิดที่ 1 และ 2 ในเนื้อเยื่อในฟันมนุษย์ของผู้ป่วยโรคเนื้อเยื่อในฟันอักเสบแบบผันกลับไม่ได้

วิธีการวิจัย

การวิจัยในครั้งนี้ได้รับพิจารณาและอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น หมายเลขสำคัญโครงการ HE592265

กลุ่มตัวอย่างของการวิจัย แบ่งเป็น

กลุ่มที่ 1: กลุ่มอาสาสมัครที่เป็นกลุ่มควบคุม เป็นฟันกรามน้อยแท้และฟันกรามซี่ที่ 3 ไม่มีรอยผุ ไม่มีรอยอุดหรือพยาธิสภาพใดๆ บนตัวฟัน และไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ ที่มารับการถอนฟันด้วยเหตุผลทางทันตกรรมจัดฟันหรือผ่าฟันคุด จำนวน 12 ซี่

กลุ่มที่ 2: กลุ่มอาสาสมัครที่เป็นโรคเนื้อเยื่อในฟันอักเสบแบบผันกลับไม่ได้, ไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ และต้องได้รับการรักษาด้วยการถอนฟัน จำนวน 6 ซี่

ขั้นตอนการเตรียมชิ้นเนื้อเยื่อในฟันมนุษย์

หลังจากถอนฟันจะทำการตัดฟันตรงตำแหน่งคอฟัน จากนั้นใช้ปากคีบจับเนื้อเยื่อในออกจากฟัน แล้วนำเนื้อเยื่อในฟันมาแช่ในน้ำยาฟอรัลลิน นาน 24 ชั่วโมง แล้วนำไปเก็บรักษาสภาพในแท่งพาราฟิน จากนั้นทำการตัดออกเป็นแผ่นบางๆ หนาประมาณ 5 ไมโครเมตรด้วยเครื่องตัดชนิดไมโครโทม โดยตัวอย่างเนื้อเยื่อในฟันจากอาสาสมัครแต่ละราย จะได้แผ่นชิ้นเนื้อเยื่อในฟันจำนวน 4 แผ่น นำไปติดยังแผ่นสไลด์ โดยแผ่นชิ้นเนื้อเยื่อในฟันจะถูกย้อมด้วยสีฮีมาทอกซิลินและอีโอซิน (hematoxylin and eosin ; H&E) เพื่อใช้สำหรับอ้างอิง และย้อมด้วยแอนติบอดีชนิดปฐมภูมิ (primary antibody) ซึ่งจะทำการปฏิกิริยาจำเพาะต่อตัวรับเมลาโทนินชนิดที่ 1 และ 2 สำหรับแผ่นชิ้นเนื้อเยื่อในฟันสุดท้ายจะถูกใช้เป็นตัวควบคุมลบ

ขั้นตอนการย้อมติดการแสดงออกของตัวรับเมลาโทนินชนิด 1 และตัวรับเมลาโทนินชนิด 2 ของเนื้อเยื่อในฟันมนุษย์ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี

1. นำสไลด์ชิ้นเนื้อเยื่อในฟันมากำจัดพาราฟิน (deparafinized) โดยนำไปแช่ในอ่างไซลีน (xylene) จำนวน 3 อ่าง อ่างละ 5 นาที
2. นำสไลด์ชิ้นเนื้อเยื่อในฟันมาแทนที่ด้วยน้ำ (rehydrated) โดยแช่สไลด์ชิ้นเนื้อเยื่อในฟันในอ่างเอทานอล (ethanol) ความเข้มข้นร้อยละ 100 จำนวน 2 อ่าง และเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 จำนวน อ่าง 2 อ่างละ 2 นาที ตามลำดับ แล้วทำการล้างโดยผ่านน้ำประปา 10 นาที และนำมาแช่ในน้ำกลั่น 2 นาที
3. นำสไลด์มาคืนสภาพแอนติเจน (retrieve antigen) โดยต้มในซิเตรตบัฟเฟอร์ (pH 6.0) ในไมโครเวฟ นาน 10 นาที แล้ววางสไลด์ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที จากนั้นล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลาเยน (phosphate buffer saline; PBS) 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที
4. ทำการยับยั้งเอนโดจีนัสเปอร์ออกซิเดส (endogenous peroxidase activity) ด้วยการแช่ในไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) ความเข้มข้นร้อยละ 30 นาน 10 นาที และแช่ในบัฟเฟอร์ 3 อ่าง อ่างละ 5 นาที แล้วทำการล้างโดยผ่านน้ำประปา 5 นาที และนำมาแช่ในน้ำกลั่น 1 นาที
5. ทำการยับยั้งการยึดติดที่ไม่จำเพาะ (non-specific antibody binding) ด้วยสาร Protein Block Serum-free นาน 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง
6. เติมแอนติบอดีชนิดปฐมภูมิ ได้แก่ ตัวรับเมลาโทนินชนิดที่ 1 แอนติบอดี (MTNR1A polyclonal antibody) และ ตัวรับเมลาโทนินชนิดที่ 2 แอนติบอดี (MTNR1B polyclonal antibody) ให้ท่วม แล้ววางสไลด์ในอ่างความชื้น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 1 คืน
7. วันต่อมา นำสไลด์มาล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลาเยน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
8. เติมแอนติบอดีชนิดทุติยภูมิ (DAKO EnVision + System-HRP labeled polymer anti-rabbit) ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลาเยน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
9. หยดสีย้อม 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) ให้ท่วม นาน 2 นาที แล้วทำการล้างด้วยน้ำกลั่น 1 นาที และล้างโดยผ่านน้ำประปา 5 นาที
10. ย้อมทับ (counterstain) ด้วยสีย้อมเมเยอร์ ฮีมาทอกซิลิน (Mayer hematoxylin) นาน 1 นาที 30 วินาที จากนั้นทำการล้างโดยผ่านน้ำประปา 5 นาที
11. นำสไลด์มากำจัดน้ำ (dehydrated) โดยแช่ในอ่างเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 จำนวน 3 อ่าง อ่างละ 2 นาที แล้วแช่ในอ่างเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 100 จำนวน 3 อ่าง อ่างละ 2 นาที และแช่ในอ่างไซลีน จำนวน 2 อ่าง อ่างละ 2 นาที แล้วทำการปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ (cover slips)

การอ่านผลและรายงานผลการย้อมติดการแสดงออกของตัวรับเมลาโทนิซินชนิดที่ 1 และ 2 ของเนื้อเยื่อในฟัน มนุษย์ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี

การอ่านผลการย้อมติดการแสดงออกของตัวรับเมลาโทนิซินชนิดที่ 1 และ 2 ของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันมนุษย์
ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีจะอ่านผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ (light microscope) กำลังขยาย 100 เท่า และมีผู้ตรวจสอบ
จำนวน 2 คน โดยแยกกันบันทึกผล

การรายงานผลจะรายงานเป็นค่าคะแนนเชิงปริมาณ ได้แก่

0 คะแนน: ไม่พบเซลล์ที่ย้อมติดสี

1 คะแนน: ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ที่ย้อมติดน้อยกว่าร้อยละ 25

2 คะแนน: ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ที่ย้อมติดร้อยละ 25-50

3 คะแนน: ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ที่ย้อมติดร้อยละ 51-75

4 คะแนน: ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ที่ย้อมติดมากกว่าร้อยละ 75

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ค่าเฉลี่ยร้อยละของการติดสีของจำนวนเซลล์ที่ย้อมติดในแต่ละกลุ่มการทดลอง เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม
โดยใช้การวิเคราะห์แบบแมน-วิทนี (Man-Whitney) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

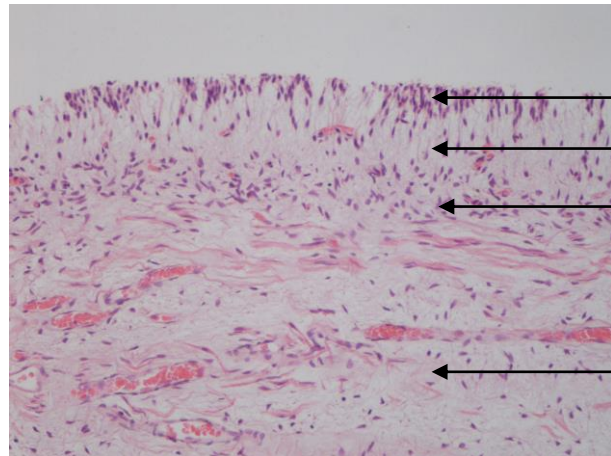
สถานที่และระยะเวลาในการทดลอง

ห้องปฏิบัติการวิจัยพยาธิวิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในช่วงเดือนกรกฎาคม
- ธันวาคม 2559

ผลการวิจัย

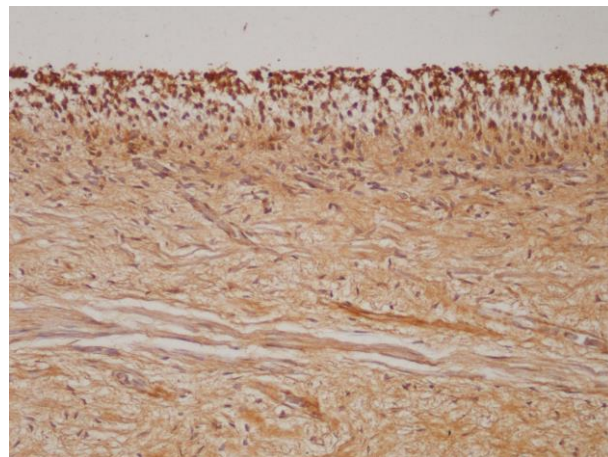
เนื้อเยื่อในฟันอักเสบแบบผันกลับไม่ได้และกลุ่มควบคุมทุกชิ้นเนื้อตัวอย่างพบการย้อมติดสีที่จำเพาะต่อตัวรับ
เมลาโทนิซินชนิดที่ 1 และตัวรับเมลาโทนิซินชนิดที่ 2 โดยสามารถพบการย้อมติดสีที่จำเพาะต่อตัวรับเมลาโทนิซินบริเวณ
เขตเซลล์สร้างเนื้อฟัน (odontoblastic zone) เขตปราศจากเซลล์ (cell-free zone) เขตเซลล์หนาแน่น (cell-rich zone) และ
เขตแกนเนื้อเยื่อในฟัน (pulp core) ดังแสดงในภาพที่ 1

การประเมินผลพบว่าระดับคะแนนการย้อมติดสีที่จำเพาะต่อตัวรับเมลาโทนิซินชนิดที่ 1 ไม่มีความแตกต่าง
อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มเนื้อเยื่อในฟันอักเสบแบบผันกลับไม่ได้และกลุ่มควบคุม ส่วนระดับคะแนนการ
ย้อมติดสีที่จำเพาะต่อตัวรับเมลาโทนิซินชนิดที่ 2 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มเนื้อเยื่อในฟัน
อักเสบแบบผันกลับไม่ได้และกลุ่มควบคุม ($p=0.01$) ดังแสดงในตารางที่ 1 ภาพที่ 2 และ 3 โดยที่คะแนนค่าเฉลี่ยร้อยละ
การติดสีของจำนวนเซลล์ที่ย้อมติดในกลุ่มเนื้อเยื่อในฟันอักเสบแบบผันกลับไม่ได้เป็นไปในทิศทางต่ำกว่ากลุ่มควบคุม
ดังแสดงในภาพที่ 4

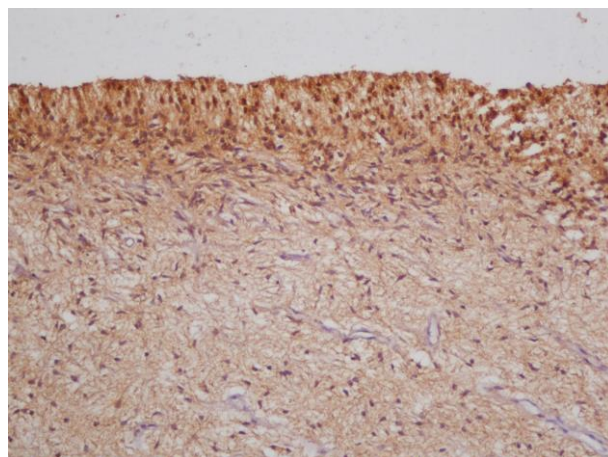


เขตเซลล์สร้างเนื้อฟัน
เขตปราศจากเซลล์
เขตเซลล์หนาแน่น
เขตแกนเนื้อเยื่อในฟัน

(ก) การย้อมติดสีอีมาทอกซิลินและอีโอซิน กำลังขยาย 200 เท่า



(ข) การย้อมติดสีที่จำเพาะต่อตัวรับเมลาโทนิชนิด 1 กำลังขยาย 200 เท่า



(ค) การย้อมติดสีที่จำเพาะต่อตัวรับเมลาโทนิชนิด 2 กำลังขยาย 200 เท่า

ภาพที่ 1 การแสดงออกของตัวรับเมลาโทนิชนิดที่ 1 และ 2 จากตัวอย่างเนื้อเยื่อในฟันของกลุ่มอาสาสมัครปกติ พบการติดสีน้ำตาลแดงแสดงความจำเพาะต่อตัวรับเมลาโทนิชนิดที่ 1 และ 2 ซึ่งพบได้ทั้งเขตเซลล์สร้างเนื้อฟัน เขตปราศจากเซลล์ เขตเซลล์หนาแน่น และเขตแกนเนื้อเยื่อในฟัน

ตารางที่ 1 ระดับคะแนนการย้อมติดสีที่จำเพาะต่อตัวรับเมลาโทนินชนิดที่ 1 และ 2 ของอาสาสมัครกลุ่มเนื้อเยื่อในฟัน
อักเสบแบบฟันกลับไม่ได้และกลุ่มควบคุม ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี

ระดับคะแนน การย้อมติดสี	ตัวรับเมลาโทนินชนิดที่ 1		ตัวรับเมลาโทนินชนิดที่ 2 *	
	กลุ่มควบคุม (n = 12)	กลุ่มเนื้อเยื่อในฟันอักเสบ แบบฟันกลับไม่ได้ (n = 6)	กลุ่มควบคุม (n = 12)	กลุ่มเนื้อเยื่อในฟันอักเสบ แบบฟันกลับไม่ได้ (n = 6)
0	0	0	0	0
1	1	0	0	1
2	0	1	1	3
3	2	1	2	1
4	9	4	9	1

* การแสดงออกของตัวรับเมลาโทนินชนิดที่ 2 ระหว่างกลุ่มเนื้อเยื่อในฟันอักเสบแบบฟันกลับไม่ได้ และกลุ่มควบคุม
แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.01$)

ระดับคะแนนการย้อมติดสี ถูกจัดระดับคะแนนดังนี้

0 คะแนน: ไม่พบเซลล์ที่ย้อมติดสี

1 คะแนน: ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ที่ย้อมติดน้อยกว่าร้อยละ 25

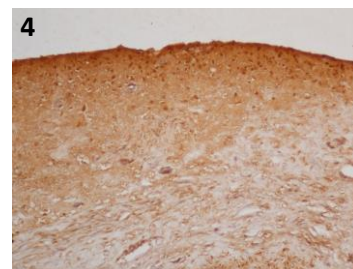
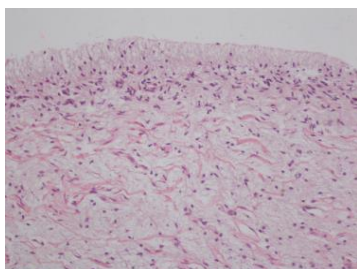
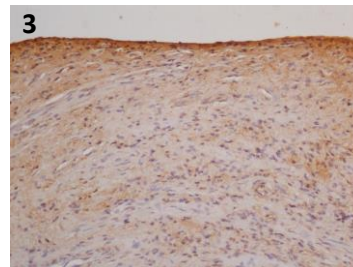
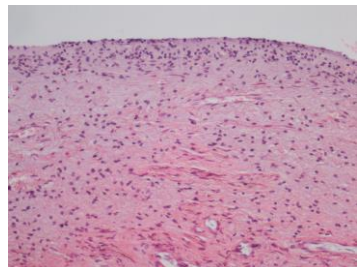
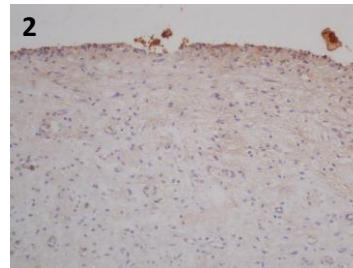
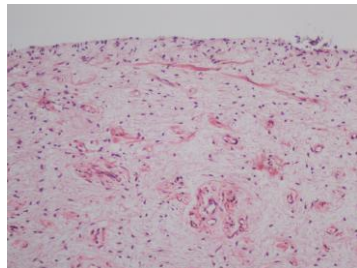
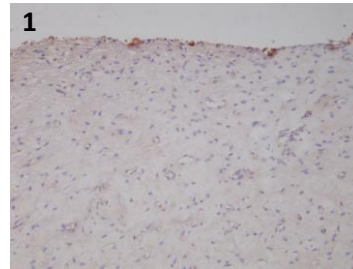
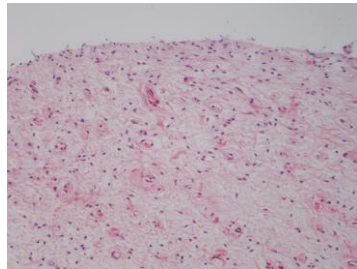
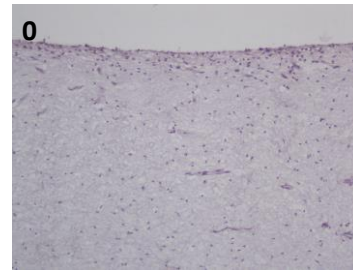
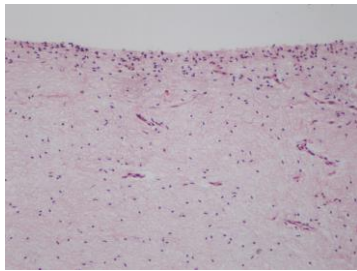
2 คะแนน: ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ที่ย้อมติดร้อยละ 25-50

3 คะแนน: ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ที่ย้อมติดร้อยละ 51-75

4 คะแนน: ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ที่ย้อมติดมากกว่าร้อยละ 75

การย้อมติดสีอีมาทอกซินและอีโอซิน

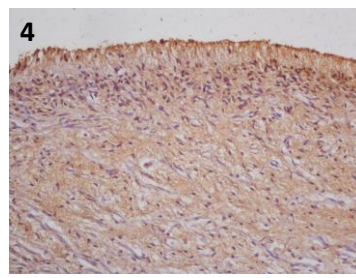
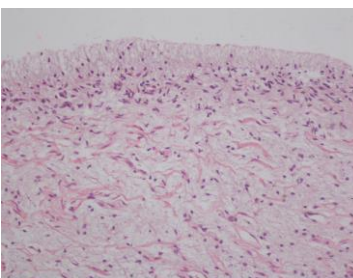
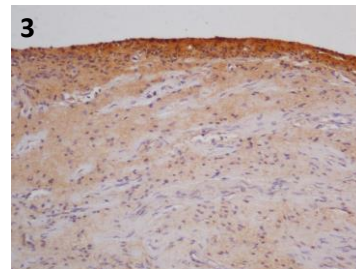
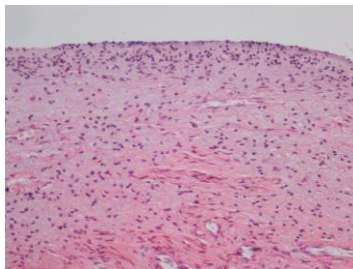
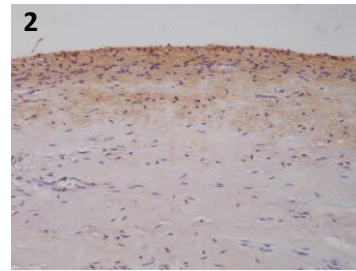
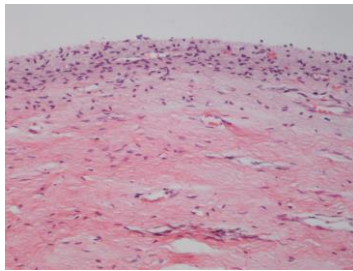
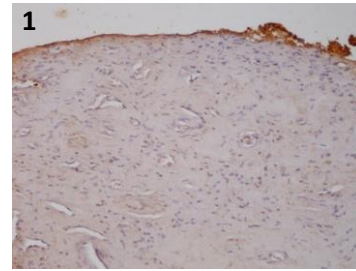
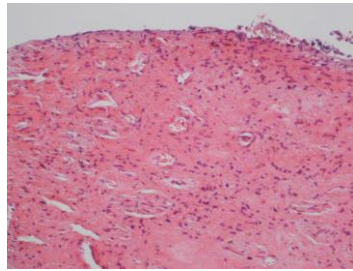
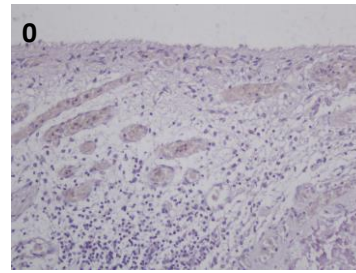
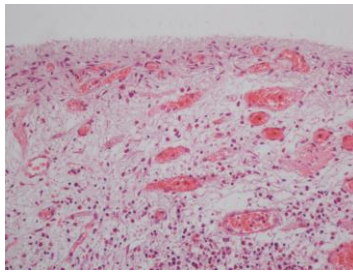
ระดับคะแนนการย้อมติดสีที่จำเพาะต่อตัวรับเมลาโทนิชนิดที่ 1



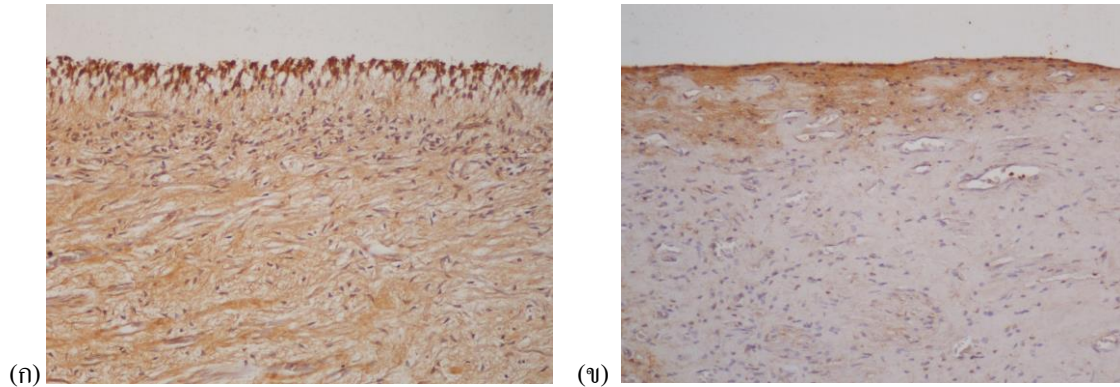
ภาพที่ 2 แสดงระดับคะแนนการย้อมติดสีที่จำเพาะต่อตัวรับเมลาโทนิชนิดที่ 1 ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี และภาพการย้อมติดสีอีมาทอกซินและอีโอซิน สำหรับอ้างอิง กำลังขยาย 200 เท่า

การย้อมติดสีอีมาทอกซิลินและอีโอซิน

ระดับคะแนนการย้อมติดสีที่จำเพาะต่อตัวรับเมลาโทนิનชนิดที่ 2



ภาพที่ 3 แสดงระดับคะแนนการย้อมติดสีที่จำเพาะต่อตัวรับเมลาโทนินชนิดที่ 2 ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี และภาพการย้อมติดสีอีมาทอกซิลินและอีโอซิน สำหรับอ้างอิง กำลังขยาย 200 เท่า



ภาพที่ 4 การแสดงออกของตัวรับเมลาโทนิชนิดที่ 2 (ก) ตัวอย่างเนื้อเยื่อในฟันของกลุ่มอาสาสมัครปกติ และ (ข) กลุ่มเนื้อเยื่อในฟันอักเสบแบบผันกลับไม่ได้ กำลังขยาย 200 เท่า พบว่าคะแนนค่าเฉลี่ยร้อยละการติดสีของจำนวนเซลล์ที่ย้อมติดในกลุ่มเนื้อเยื่อในฟันอักเสบแบบผันกลับไม่ได้เป็นไปในทิศทางต่ำกว่ากลุ่มเนื้อเยื่อในฟันของกลุ่มอาสาสมัครปกติ

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเซลล์เนื้อเยื่อในฟันมีการแสดงออกของตัวรับเมลาโทนิชนิดที่ 1 สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าคือพบว่าการแสดงออกของตัวรับเมลาโทนิชนิด 1 บนเซลล์ปุ่มเนื้อกำเนิดฟัน (dental papillae) และบนเซลล์สร้างเนื้อฟัน (Kumasaka et al., 2010) ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีต้นกำเนิดมาจากชั้นเอ็กโทเมเซนไคม์ (ectomesenchyme origin) เช่นเดียวกันกับเซลล์เนื้อเยื่อในฟัน และพบการติดสีของ ตัวรับเมลาโทนิชนิดที่ 1 และ 2 บริเวณเซลล์สร้างเนื้อฟันอีกด้วย ดังแสดงในภาพที่ 1 แต่การศึกษานี้ยังพบว่าเซลล์เนื้อเยื่อในฟันมีการแสดงออกของตัวรับเมลาโทนิชนิดที่ 2 ซึ่งยังไม่พบว่ามีการศึกษาใดรายงานถึงการแสดงออกของตัวรับเมลาโทนิชนิดที่ 2 ของเนื้อเยื่อในฟันมนุษย์ จากการศึกษาที่ผ่านมาถึงบทบาทของเมลาโทนิต่อการลดการอักเสบพบว่า เมลาโทนิจะจับกับตัวรับตัวรับเมลาโทนิชนิด 1 และ 2 ทำหน้าที่ลดการแสดงออกของไซโตไคน์ และเอนไซม์ในกระบวนการอักเสบ จึงมีความเป็นไปได้ว่า เมลาโทนิสามารถทำหน้าที่ควบคุมการอักเสบโดยจับกับตัวรับตัวรับเมลาโทนิชนิดที่ 1 และ 2 ของเนื้อเยื่อในฟัน

การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการแสดงออกของตัวรับเมลาโทนิในเนื้อเยื่อช่องปากชนิดต่างๆ เช่น เยื่อเมือกในช่องปาก (oral mucosa) นอกจากนี้ยังพบรูปแบบการแสดงออกของตัวรับเมลาโทนิที่เปลี่ยนแปลงไปในรอยโรคของช่องปาก เช่น มะเร็งช่องปากชนิดสแควมัสเซลล์ (Nakamura et al., 2008) สอดคล้องกับการศึกษานี้ซึ่งพบการเปลี่ยนแปลงของรูปแบบการแสดงออกของตัวรับเมลาโทนิชนิดที่ 2 ของเนื้อเยื่อในฟันกลุ่มเนื้อเยื่อในฟันอักเสบแบบผันกลับไม่ได้และกลุ่มควบคุม พบคะแนนค่าเฉลี่ยร้อยละการติดสีของจำนวนเซลล์ที่ย้อมติดในกลุ่มเนื้อเยื่อในฟันอักเสบแบบผันกลับไม่ได้เป็นไปในทิศทางต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้อาจนำไปสู่การตั้งสมมุติฐานถึงกลไกการควบคุมการอักเสบของเมลาโทนิที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของตัวรับเมลาโทนิชนิดที่ 2 อาจแตกต่างไปจากตัวรับเมลาโทนิชนิดที่ 1 ซึ่งไม่พบการเปลี่ยนแปลงของรูปแบบการแสดงออกของตัวรับเมลาโทนิของเนื้อเยื่อในฟันกลุ่มเนื้อเยื่อในฟันอักเสบแบบผันกลับไม่ได้และกลุ่มควบคุม ภาวะการอักเสบของเนื้อเยื่อในฟันอาจมีผลกระทบต่อแสดงออกของตัวรับเมลาโทนิ ข้อมูลในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการอักเสบเรื้อรังอาจ

รบกวนการทำงานของเมลาโทนินในเนื้อเยื่อในฟันมนุษย์ของผู้ป่วยโรคเนื้อเยื่อในฟันอักเสบแบบผันกลับไม่ได้ อย่างไรก็ตามสมมุติฐานนี้จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปเพื่อพิสูจน์ความถูกต้องต่อไป

การศึกษานี้มีข้อจำกัดของจำนวนกลุ่มตัวอย่าง เนื่องจากกลุ่มอาสาสมัครที่เป็นโรคเนื้อเยื่อในฟันอักเสบแบบผันกลับไม่ได้ สามารถรักษาด้วยวิธีการรักษาลong rak pin จึงทำให้เป็นข้อจำกัดในการถอนฟันกลุ่มอาสาสมัครเพื่อนำมาทำการศึกษานี้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณอาสาสมัครทุกท่านที่ได้ให้ความร่วมมือเป็นกลุ่มตัวอย่างสำหรับการวิจัยในครั้งนี้ และผู้วิจัยขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยที่สนับสนุนทุนอุดหนุนและส่งเสริมการทำวิทยานิพนธ์ สำหรับนักศึกษามหาบัณฑิตศึกษาปีการศึกษา 2559 ขอขอบคุณกลุ่มวิจัยโรคอักเสบเรื้อรังของช่องปากและโรคทางระบบที่สัมพันธ์กับสุขภาพช่องปาก ตลอดจนเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการวิจัยพยาธิวิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

- Kumasaka S, Shimozuma M, Kawamoto T, Mishima K, Tokuyama R, Kamiya Y, et al. Possible involvement of melatonin in tooth development: expression of melatonin 1a receptor in human and mouse tooth germs. *Histochemistry and cell biology*. 2010; 133(5): 577-84.
- Li B, Zhang H, Akbar M, Kim HY. Negative regulation of cytosolic phospholipase A(2) by melatonin in the rat pineal gland. *The Biochemical journal*. 2000; 351 Pt 3: 709-16.
- Li JG, Lin JJ, Wang ZL, Cai WK, Wang PN, Jia Q, et al. Melatonin attenuates inflammation of acute pulpitis subjected to dental pulp injury. *American journal of translational research*. 2015; 7(1): 66-78.
- Nakamura E, Kozaki K, Tsuda H, Suzuki E, Pimkhaokham A, Yamamoto G, et al. Frequent silencing of a putative tumor suppressor gene melatonin receptor 1 A (MTNR1A) in oral squamous-cell carcinoma. *Cancer science*. 2008; 99(7): 1390-400.
- Radogna F, Sestili P, Martinelli C, Paolillo M, Paternoster L, Albertini MC, et al. Lipoxigenase-mediated pro-radical effect of melatonin via stimulation of arachidonic acid metabolism. *Toxicology and applied pharmacology*. 2009; 238(2): 170-7.
- Stehle JH, Saade A, Rawashdeh O, Ackermann K, Jilg A, Sebesteny T, et al. A survey of molecular details in the human pineal gland in the light of phylogeny, structure, function and chronobiological diseases. *Journal of pineal research*. 2011; 51(1): 17-43.