อภิปรายและสรุป

อภิปรายผลการทดลอง

การเกิดรอยโรครอบรากฟันนั้นเกี่ยวข้องกับการอักเสบ และการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Birkedal-Hansen, 1993) การอักเสบทำให้เกิดการขยายตัวและทำให้มีการซึมผ่านที่มากขึ้นของเส้นเลือด ส่งผลให้มีสิ่งรั่วข้นออกมาจากเส้นเลือดและมีการคั่งค้างอยู่ในเนื้อเยื่อบริเวณที่มีการอักเสบ สิ่งรั่วข้นมีการผสมผสานเข้ากับสารชีวโมเลกุลที่สร้างและหลั่งออกมาจากเซลล์ในบริเวณที่เกิดการอักเสบ สารชีวโมเลกุลที่สร้างและหลั่งจากเชื้อจุลชีพ และรวมกับเศษเนื้อเยื่อของร่างกายที่ถูกทำลายในบริเวณนั้น และจากหลายการศึกษาพบว่าสิ่งรั่วข้น สามารถซึมแผ่เข้ามาภายในช่องว่างของคลองรากฟันได้เป็นสิ่งรั่วข้นในคลองรากฟัน (Alptekin *et al.*, 2005; Matsuo *et al.*, 1994; Wahlgren *et al.*, 2002)

จากการศึกษาของ Matsuo และคณะในปี 1994 ได้รายงานถึงการพบสารชีวโมเลกุล จำพวกไซโตไคน์ (cytokine) คือ อินเตอร์ลิวคินชนิดที่ 1 แอลฟา และอินเตอร์ลิวคินชนิดที่ 1 เบต้า อยู่ในสิ่งรั่วข้นในคลองรากฟัน และในขณะที่มีการรักษารากฟันระดับความเข้มข้นของสารชีวโมเลกุลทั้งสองนี้ก็มีการเปลี่ยนแปลงไป โดยระดับของอินเตอร์ลิวคินชนิดที่ 1 แอลฟามีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นแต่อินเตอร์ลิวคินชนิดที่ 1 เบต้ามีระดับที่ลดลง (Matsuo *et al.*, 1994) ได้แสดงให้เห็นถึงความพยายามที่ต้องการหาสารชีวโมเลกุลในสิ่งรั่วข้นในคลองรากฟันที่สามารถบ่งชี้ถึงสภาวะการดำเนินของโรค หรือ biomarker แต่ในปัจจุบันการศึกษาในเรื่องดังกล่าวมีอยู่น้อย ดังนั้นการวิจัยนี้จึงต้องศึกษาการหาสารชีวโมเลกุลที่มีคุณสมบัติสามารถนำมาใช้เป็น biomarker ได้ซึ่งในที่นี้คือ เมทริกเมทัลโลโปรติเนส

การศึกษาในครั้งนี้ต้องการวิเคราะห์ระดับของ MMP-2 และ MMP-8 ในสิ่งรั่วข้นในคลองรากฟันโดยวิธี ELISA สามารถพบ MMP-2 และ MMP-8 ได้ในสิ่งรั่วข้นในคลองรากฟัน โดยในสิ่งรั่วข้นในคลองรากฟันของฟันที่มีรอยโรครอบรากฟันอยู่นั้นมีปริมาณความเข้มข้นของ MMP-2 และ MMP-8 อยู่ในระดับที่สูง และลดลงอย่างชัดเจนในระหว่างที่ฟันซี่นั้นได้รับการรักษารากฟัน จนความเข้มข้นอยู่ในระดับที่ไม่แตกต่างจากระดับของ MMP-2 และ MMP-8 ที่พบในฟันที่อยู่ในสภาวะปกติ การที่ระดับของทั้ง MMP-2 และ MMP-8 ลดลงนั้นสามารถบอกได้ว่า การอักเสบของรอยโรคบริเวณรอบปลายรากฟันลดลง มีการทำลายของเนื้อเยื่อบริเวณรอบปลายรากฟันลดลง หรืออาจบอกได้ถึงการเริ่มมีการหายของรอยโรครอบรากฟัน

จากตัวอย่างจากกลุ่ม ฟันที่เนื้อเยื่อในฟันตายและมีรอยโรครอบรากฟันทั้งหมด 12 ตัวอย่างมีอยู่สองตัวอย่าง คือ ตัวอย่าง B และ C ที่มีการเก็บตัวอย่าง 4 ครั้ง เนื่องมาจากในการเพาะเชื้อครั้งที่สองให้ผลเป็น**บวก** รวมทั้งผู้ป่วยมีอาการปวดขณะเคี้ยว และปวดขณะเคาะบนตัวฟัน ฟันทั้งสองซี่นี้เป็นฟันที่อยู่ในผู้ป่วยคนเดียว จึงประเมินใส่ยาแคลเซียมไฮดรอกไซด์ในคลองรากฟันอีกครั้ง จากผลของ ELISA ก็พบว่าระดับของ MMP-2 และ MMP-8 ของตัวอย่างเก็บครั้งที่สองลดลงจากครั้งแรก กลับเพิ่มขึ้นในตัวอย่างเก็บครั้งที่สาม และมีระดับของ MMP-2 และ MMP-8 ลดลงในตัวอย่างสิ่งรั่วข้นในคลองรากฟันเก็บครั้งที่สี่ และในการเก็บตัวอย่างครั้งที่สี่ผู้ป่วยไม่มีอาการทางคลินิกแล้ว และในตัวอย่าง

D ผลของการวัดระดับ MMP-8 ในตัวอย่างเก็บครั้งที่สาม พบว่าระดับของ MMP-8 สูงขึ้นจากการเก็บครั้งที่สองมากและสูงกว่าระดับของ MMP-8 ในตัวอย่างเก็บครั้งที่หนึ่ง โดยที่ผู้ป่วยไม่มีอาการทางคลินิกที่แสดงให้เห็นถึงลักษณะการอักเสบจากสาเหตุทางเอ็นโดดอนติกส์ มีความเป็นไปได้ที่อาจเกิดการปนเปื้อน หรือมีการกระตุ้นเซลล์ที่ทำหน้าที่หลั่ง MMP-8 เช่น โพลีมอร์โฟนิวเคลียร์ ลิวโคไซต์ทำให้ระดับของ MMP-8 ในสิ่งรั่วข้นในคลองรากฟันสูงขึ้นมาก

ฟันที่มีการติดเชื้อภายในคลองรากฟัน มักนำไปสู่การเกิดรอยโรครอบรากฟันซึ่งเกิดจากกระบวนการอักเสบและการทำลายเนื้อเยื่อบริเวณรอบปลายรากฟัน ซึ่งเป็นกระบวนการที่มีปัจจัยหลายปัจจัยเข้ามาเกี่ยวข้อง เริ่มจากการรุกรานของเชื้อจุลชีพ และสารคัดหลั่งของเชื้อจุลชีพมีผลไปกระตุ้นเซลล์ในร่างกายให้สร้างสารชีวโมเลกุลบางชนิดออกมามากกว่าในสภาวะปกติ ซึ่งสารชีวโมเลกุลที่หลั่งออกมานั้นอาจก่อให้เกิดการทำลายของเนื้อเยื่อในบริเวณที่เกิดการอักเสบ (Birkedal-Hansen, 1993) เมทริกเมทัลโลโปรติเนส ก็เป็นเอ็นไซม์ชนิดหนึ่งในร่างกายที่เซลล์ในร่างกายสร้างขึ้นมาทั้งในสภาวะที่ร่างกายเป็นปกติ และในสภาวะที่ร่างกายถูกรุกรานโดยจุลชีพ

เซลล์โพลีมอร์โฟนิวเคลียร์ ลิวโคไซต์ เป็นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันกลุ่มแรกที่เข้ามาป้องกันร่างกายต่อการรุกรานของเชื้อจุลชีพซึ่งนอกจากจะทำหน้าที่ในการกินเชื้อแบคทีเรียแล้ว เซลล์โพลีมอร์โฟนิวเคลียร์ ลิวโคไซต์ยังมีการหลั่งเมทริกเมทัลโลโปรติเนส อย่าง MMP-8 ออกมาทำลายเนื้อเยื่อที่อยู่ในบริเวณนั้น (Barkhordar *et al.*, 1992) มาโครฟาจ ลิมโฟไซต์ และพลาสมาเซลล์ ซึ่งเป็นเซลล์ภูมิคุ้มกันที่ตามมาก็พบว่ามีการสร้าง MMP-1, MMP-2 และ MMP-3 (Shin *et al.*, 2002) นอกจากนี้มาโครฟาจยังมีการสร้าง และแสดงออกของยีนที่เกี่ยวกับการสร้าง MMP-8 และ MMP-13 (Kiili *et al.*, 2002; Prikk *et al.*, 2001) ได้อีกด้วย นอกจากเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายเซลล์อื่น ๆ ของร่างกายก็ได้ผลกระทบจากการรุกรานของเชื้อจุลชีพด้วยเช่นกัน จากการศึกษาของ Fravalo และคณะในปี 1996 ได้เลี้ยงเซลล์ เซลล์เยื่อบุผิวเหงือก ของมนุษย์ และทดสอบด้วยแบคทีเรีย *Porphyromonas gingivalis* ที่มีชีวิต *Porphyromonas gingivalis* ที่ถูกทำลายด้วยความร้อน และผิวนอกของแบคทีเรีย สิ่งทดสอบทั้งสามชนิดมีผลให้ เซลล์เยื่อบุผิวเหงือก มีการสร้าง MMP-9 มากขึ้นแต่มีความพิเศษในกลุ่มที่ทดสอบด้วยแบคทีเรียที่มีชีวิตคือ เมื่อปริมาณของแบคทีเรียมากขึ้นจนถึงจุดหนึ่งกลายเป็นการยับยั้งทำให้ เซลล์เยื่อบุผิวเหงือก มีการสร้าง MMP-9 ลดลง (Fravalo *et al.*, 1996) และ จากการศึกษาโดย Pattamapun และคณะในปี 2003 ได้ใช้สารคัดหลั่งของ *Porphyromonas gingivalis* มาทดสอบกับเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ ของมนุษย์ทำให้เซลล์ เอ็นยึดปริทันต์ มีการสร้าง MMP-2 มากขึ้นและสามารถกระตุ้นให้มี activeMMP-2 มากขึ้นเนื่องจากมีการสร้าง MT1-MMP ที่เพิ่มขึ้น แบคทีเรีย *Actinobacillus actinomycetemcomitans* และสารคัดหลั่งของมันก็สามารถกระตุ้นให้เซลล์ในร่างกายมนุษย์อย่างเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ ให้มีการสร้าง MMP-2 และ MMP-9 มากขึ้นได้และสามารถกระตุ้นให้มี activeMMP-2 มากขึ้นเนื่องจากมีการสร้าง MT1-MMP ที่เพิ่มขึ้นได้เช่นเดียวกัน (Chang *et al.*, 2002; Tiranathanagul *et al.*, 2004) ในทำนองเดียวกัน *Prevotella intermedia* ก็สามารถเพิ่มการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวกับการสร้าง MMP-1 และ MMP-8 ในเซลล์ เอ็นยึดปริทันต์ ของมนุษย์รวมทั้งมีการสร้าง MMP-1 และ MMP-8 ที่เพิ่มขึ้นด้วย (Guan *et al.*, 2009) ดังนั้นเมื่อประเมินร่วมกับผลการทดลองของ

การศึกษานี้ อาจกล่าวได้ว่าการลดจำนวนของแบคทีเรียหรือจุลชีพที่อยู่ภายในคลองรากฟันโดยการรักษารากฟัน ส่งผลให้การตอบสนองของร่างกายโดยการสร้างชีวโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ และทำลายเนื้อเยื่ออย่างเมทริกเมทัลโลโปรติเนสลดลง

การศึกษาที่ผ่านมาสนับสนุนผลการศึกษาในครั้งนี้ โดยมีการรายงานการพบ MMP-8 ได้ในสิ่งรั่วขันในคลองรากฟันที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น ฟันที่เนื้อเยื่อในฟันตายและมีรอยโรครอบรากฟัน และจากการวัดระดับของ MMP-8 ด้วยวิธี immunofuorometric assay (IFMA) พบว่าระดับของ MMP-8 ในสิ่งรั่วขันในคลองรากฟันของฟันที่อยู่ในระหว่างการรักษารากฟันมีแนวโน้มที่ลดต่ำลงตาม visits ในการรักษาโดยระดับของ MMP-8 ในการเก็บตัวอย่างครั้งแรกนั้นมีความแตกต่างจากระดับของ MMP-8 ในการเก็บตัวอย่างครั้งที่สามอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Wahlgren *et al.*, 2002)

การใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์ เป็นยาที่ใส่ในคลองรากฟันก็อาจส่งผลทำให้ระดับของ MMP-2 และ MMP-8 ลดลงได้ด้วยคุณสมบัติที่ กำจัดเชื้อจุลชีพ และสามารถทำให้สารพิษของแบคทีเรียเสียสภาพไป ทำให้ร่างกายมีการตอบสนองต่อสารพิษของแบคทีเรียนั้นลดลง (Yang *et al.*, 2006) รวมทั้งคุณสมบัติที่มีความเป็นเบสของแคลเซียมไฮดรอกไซด์อาจทำให้มีการยับยั้งการเปลี่ยน proMMP ไปเป็น MMP ที่อยู่ในรูปมีฤทธิ์ (Wahlgren *et al.*, 2002) ได้มีการรายงานการศึกษาโดย Paula-Silva และคณะในปี 2010 ได้รักษาคลองรากฟันในฟันสุนัขที่มีรอยโรครอบรากฟัน พบว่าเนื้อเยื่อปลายรากของฟันสุนัขที่ได้รับการรักษารากฟันที่มีการนัดสองครั้ง โดยใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์เป็นยาที่ใส่ในคลองรากฟัน มีระดับของ MMP-1, MMP-2, MMP-8 และ MMP-9 ต่ำกว่าฟันที่ได้รับการรักษารากฟันแบบครั้งเดียว (Paula-Silva *et al.*, 2010)

จากผลของการทดลองโดยวิธี gelatin zymography ในกลุ่มตัวอย่างฟันที่อยู่ในสภาวะปกติไม่มีตัวอย่างใดที่สามารถมองเห็นแถบสีขาวทั้งในแถบของ pro-MMP-2 และแถบของ active MMP-2 ในกลุ่มตัวอย่างที่เป็น ฟันที่เนื้อเยื่อในฟันตายและมีรอยโรครอบรากฟันพบว่า จากตัวอย่างสิ่งรั่วขันในคลองรากฟันทั้งหมด 38 ตัวอย่างมี 10 ตัวอย่างที่ไม่แสดงแถบสีขาว โดย 10 ตัวอย่างนั้นมีค่า**ปริมาณ MMP-2 ต่อปริมาณโปรตีนรวม**เท่ากับศูนย์ รวมทั้งพบว่ามีแนวโน้มของการพบแถบสีขาวของ pro- และ active MMP-2 จางและเล็กลง แต่ในการวิเคราะห์ด้วยสถิติไม่พบความเปลี่ยนแปลงของตัวเลขสัดส่วนเป็นเปอร์เซ็นต์ของปริมาณ active MMP-2 ต่อ ปริมาณ MMP-2 ทั้งหมดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแสดงถึงสัดส่วนของปริมาณ active MMP-2 ที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการรักษาคลองรากฟัน

จากการศึกษาที่ผ่านมาของ Buzoglu และคณะในปี 2009 ได้ใช้ตัวอย่างหนองที่อยู่ในคลองรากฟัน มาทำ gelatin zymography แล้วพบแถบสีขาวที่แสดงถึงการมี MMP-2 และ MMP-9 ทั้งในรูปแบบ pro- และ active MMP สำหรับตัวอย่างที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น chronic apical abscess สามารถพบแถบขาวของ MMP-9 ได้ทั้งสองแถบ แต่ไม่สามารถพบแถบสีขาวของ MMP-2 แต่ในตัวอย่างที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น acute apical abscess เท่านั้นที่สามารถพบแถบของทั้ง MMP-2 และ MMP-9 แต่ในการศึกษานี้สามารถพบแถบสีขาวของ pro- และ active MMP-2 ในกลุ่มตัวอย่างที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น ฟันที่เนื้อเยื่อในฟันตายและมีรอยโรครอบรากฟันในการเก็บตัวอย่างครั้งแรกซึ่งมีกลุ่มที่มีอาการทั้ง

แบบเฉียบพลัน (acute) และ แบบเรื้อรัง (chronic) อยู่ด้วยกันซึ่งสนับสนุนโดย Shin และคณะในปี 2002 สามารถพบ MMP-2 ได้จากวิธี immunohistochemistry เนื้อเยื่อที่มีการอักเสบเรื้อรังบริเวณปลายรากฟัน และ Corotti และคณะในปี 2009 ได้รายงานการศึกษาจากวิธี immunohistochemistry ที่เนื้อเยื่อปลายรากฟันพบ MMP-2 ได้ทั้งในเนื้อเยื่อที่มีการอักเสบแบบเฉียบพลัน และแบบเรื้อรัง แต่พบ MMP-2 ในการอักเสบแบบเรื้อรังได้น้อยกว่าที่พบในการอักเสบแบบเฉียบพลันอย่างชัดเจน (Corotti *et al.*, 2009) จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาข้อสรุปว่าระดับของ MMP-2 เป็นอย่างไรในสภาวะของการอักเสบแบบต่าง ๆ

สรุป

1. การศึกษนี้ำทำการวิเคราะห์ระดับ MMP-2 และ MMP-8 ในสิ่งรั่วข้นในคลองรากฟันของฟันสองกลุ่ม คือฟันที่อยู่ในสภาวะปกติ และฟันที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น ฟันที่เนื้อเยื่อในฟันตายและมีรอยโรครอบรากฟัน พบว่าทั้งสองกลุ่มนี้มีความแตกต่างกันของระดับ MMP-2 และ MMP-8 ในสิ่งรั่วข้นในคลองรากฟันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.000$, $p = 0.000$ ตามลำดับ)

2. ในระหว่างการรักษารากฟันที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น ฟันที่เนื้อเยื่อในฟันตายและมีรอยโรครอบรากฟัน ระดับของ MMP- 2 และ MMP-8 ในสิ่งรั่วข้นในคลองรากฟันมีแนวโน้มที่ลดลง โดยระดับ MMP- 2 และ MMP-8 ในตัวอย่างเก็บครั้งที่หนึ่ง ต่างจากระดับในตัวอย่างเก็บครั้งที่สามอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.000$, $p < 0.01$ ตามลำดับ)

3. ในสิ่งรั่วข้นของคลองรากฟัน ตั้งแต่เริ่มการรักษาคลองรากฟัน จนกระทั่งได้ผลการเพาะเชื้อเป็นลบ มีการลดลงของปริมาณ MMP-2 และ MMP-8 จนใกล้เคียงกับระดับ MMP-2 และ MMP-8 ในสิ่งรั่วข้นในคลองรากฟันที่อยู่ในสภาวะปกติ โดยระดับ MMP- 2 และ MMP-8 ในตัวอย่าง control และในตัวอย่างเก็บครั้งที่สามนั้นไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4. สัดส่วนของปริมาณ active MMP-2 ต่อปริมาณ MMP-2 ทั้งหมด จะไม่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการรักษาคลองรากฟัน