

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โรคปริทันต์อักเสบ (periodontal disease/periodontitis) เป็นปัญหาทางทันตสาธารณสุขที่มีผลกระทบกับคุณภาพชีวิตมากที่สุดปัญหาหนึ่ง ทั้งในระดับประเทศ และในระดับโลก (Holt et al., 1999; Williams, 1990) โรคนี้มีจุดเริ่มต้นจากเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต โดยเฉพาะเชื้อ *Porphyromonas gingivalis* ซึ่งเป็นหนึ่งในเชื้อที่เป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรค ลักษณะที่ปรากฏของโรค จะเกิดจากการที่แบคทีเรียหรือสารหลังของแบคทีเรีย โดยเฉพาะ lipopolysaccharides (LPS) กระตุ้นตอบสนองของเซลล์ทั้งในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย และเซลล์ของเนื้อเยื่อ และก่อให้เกิดการอักเสบที่เรื้อรัง (chronic inflammation) ซึ่งนำไปสู่การทำลายของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และกระดูกเบ้าฟัน และเกิดการสูญเสียฟันในที่สุด

เซลล์ที่มีบทบาทในกระบวนการอักเสบของเนื้อเยื่อปริทันต์ นอกจากเซลล์เม็ดเลือดขาวแล้ว เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเนื้อเยื่อเหงือก และเอ็นยึดปริทันต์ ก็มีส่วนร่วมในกระบวนการอักเสบนี้ด้วย เซลล์เหล่านี้ สามารถตอบสนองต่อแบคทีเรีย และสารหลังจากแบคทีเรีย โดยการเพิ่มการผลิต pro-inflammatory cytokine และไซโตไคน์ตัวหนึ่งที่มีบทบาทอย่างมากในรอยโรคปริทันต์ คือ tumor necrosis factor- α (TNF- α)

บทบาทของ TNF- α ในการดำเนินไปของโรคปริทันต์ จะเริ่มตั้งแต่อิทธิพลของ TNF- α ในการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวให้เพิ่มการสร้างโมเลกุลยึดจับ (adhesion molecules) กับ endothelial cells เพื่อเพิ่มอัตราการเคลื่อนเข้ามาสู่บริเวณที่มีการอักเสบ การกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ให้เพิ่มการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย extracellular matrix โดยเฉพาะกลุ่ม matrix metalloproteinases (MMPs) รวมทั้งการเพิ่มระดับการสร้าง prostaglandins และ RANKL ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ และ macrophages ซึ่งมีผลในการกระตุ้นการทำลายของเซลล์สลายกระดูก นอกจากนี้ ยังสามารถกระตุ้นการเกิด apoptosis ของไฟโบรบลาสต์ทำให้กระบวนการซ่อมแซมเกิดขึ้นได้ช้า (Graves and Cochran, 2003)

แม้จะมีรายงานว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเนื้อเยื่อเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์สามารถตอบสนองต่อ LPS โดยการเพิ่มการสร้าง TNF- α ได้ (Takemura et al., 1998; Wang and Ohura, 2002; Yamaji et al., 1995) แต่กลไกการรับรู้ของเซลล์ที่มีต่อ LPS และกลไกการถ่ายทอดสัญญาณภายในเซลล์นั้น ยังไม่ชัดเจน แม้จะมีการศึกษาในเซลล์จากเนื้อเยื่อเหงือกบ้าง แต่ก็ยังไม่มากนัก (Irwin et al., 1994) ในขณะที่ การศึกษากระบวนการนี้ในเซลล์จากเนื้อเยื่อ

เอ็นอีคปริทันต์นั้น มีน้อยมาก ทำให้ยังไม่มี ความชัดเจนว่าเซลล์เหล่านี้ ตอบสนองต่อ LPS อย่างไร

นอกจากนี้ การศึกษาส่วนใหญ่ที่ผ่านมา จะเลือกใช้ LPS ที่ได้จากเชื้อ *E. coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มี well-conserved lipid A และจัดเป็น typical bacterial endotoxin โดยพบว่า เซลล์เม็ดเลือดขาว และ ไฟโบรบลาสต์จากเหงือกสามารถตอบสนองต่อ LPS ผ่านทาง receptor ในกลุ่ม Toll-like receptors (TLRs) คือ TLR-4 และส่งสัญญาณผ่านทาง nuclear factor kappa-B (NF- κ B) (Hirschfeld et al., 2001; Martin et al., 2001; Wang et al., 2000; Wang and Ohura, 2002) อย่างไรก็ตาม LPS จากเชื้อ *P. gingivalis* นั้น จะมีโครงสร้างที่ต่างไปจากของ *E. coli* (Darveau et al., 2004; Hashimoto et al., 2004; Werts et al., 2001) และแม้จะมีรายงานว่า LPS จาก *P. gingivalis* สามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของ TNF- α ได้เช่นเดียวกับ *E. coli* ก็ตาม (Hirschfeld et al., 2001; Zhang et al., 2008) แต่การเพิ่มขึ้นของ TNF- α นั้น จะพบในปริมาณ และคุณภาพที่ต่างกัน จึงเป็นไปได้ที่กลไกการรับรู้และส่งถ่ายสัญญาณภายในเซลล์มีความแตกต่างกัน ระหว่าง LPS ของเชื้อ *P. gingivalis* และ *E. coli*

นอกเหนือจากการติดเชื้อซึ่งก่อให้เกิดโรคปริทันต์แล้ว ยังพบว่า มีปัจจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคปริทันต์ ได้แก่ ผลของความร้อนที่เกิดขึ้นในช่องปาก อันเนื่องมาจากพฤติกรรมต่างๆ เช่น การสูบบุหรี่ การดื่มชา กาแฟ ทั้งนี้ ช่องปากเป็นอวัยวะหนึ่งของร่างกายที่มีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิค่อนข้างสูง จึงเป็นประเด็นที่น่าสนใจว่า การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมินี้ สามารถชักนำให้เกิดโรคปริทันต์อักเสบได้หรือไม่

โดยทั่วไปแล้ว เมื่อเซลล์เผชิญกับความร้อนจะมีการปรับตัวให้ดำรงอยู่ในสภาวะนั้น โดยเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนต่างๆ ภายในเซลล์ กลุ่มของยีนที่มีการศึกษามากที่สุดในเรื่องของความร้อน คือ heat shock proteins ซึ่งเชื่อว่ามีบทบาทสำคัญในการปกป้องเซลล์ไม่ให้ถูกทำลายเมื่ออยู่ในสภาวะที่อุณหภูมิสูง (Craig et al., 1993) นอกจากนั้นแล้ว ความร้อนยังทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนอีกหลายชนิด เช่น การเพิ่มการแสดงออกของ basic fibroblast growth factor (b-FGF) (Erdos et al., 1995), MMP-1 (Li et al., 2007) และการลดการแสดงออกของ c-fos (Wennborg et al., 1995)

ในการศึกษาครั้งนี้ คณะผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาถึงผลของความร้อนต่อการแสดงออกของ TNF- α ซึ่งเป็น cytokine ที่มีบทบาทสำคัญต่อการเกิดโรคปริทันต์อักเสบ โดยผลของการศึกษาเบื้องต้น ในไฟโบรบลาสต์จากเนื้อเยื่อเอ็นอีคปริทันต์พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 45 และ 50 องศาเซลเซียส จะพบการเพิ่มขึ้นของ TNF- α ทั้งในระดับ mRNA และ ในระดับโปรตีน แต่ก็ยังไม่ชัดเจนว่า กลไกที่เกิดขึ้นเป็นอย่างไร

Transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) เป็น receptor ที่พบมากในเซลล์ของระบบประสาท และทำหน้าที่เป็น nociceptor ในการรับความร้อนเมื่ออุณหภูมิมากกว่า 43 องศาเซลเซียส (Caterina et al., 1997) จากการศึกษาเบื้องต้นของคณะผู้วิจัย สามารถตรวจพบ TRPV1 ในไฟโบรบลาสต์จากเอ็นยัดปริทันต์เช่นกัน และเมื่อทำการทดลองเบื้องต้นโดยการใส่สารยับยั้งการทำงานของ TRPV1 (capsazepine) พบว่าความร้อนไม่สามารถเพิ่มการแสดงออกของ TNF- α ได้ จึงอาจเป็นไปได้ว่า TRPV1 ที่อยู่ในไฟโบรบลาสต์จากเอ็นยัดปริทันต์มีบทบาทในการทำให้เกิดโรคปริทันต์อักเสบ โดยการรับสัญญาณความร้อนและชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ TNF- α

โดยสรุป วัตถุประสงค์ในงานวิจัยนี้ จึงต้องการศึกษาถึงการตอบสนองของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเหงือก และไฟโบรบลาสต์จากเอ็นยัดปริทันต์ของมนุษย์ต่อ LPS จาก *P. gingivalis* เปรียบเทียบกับ *E. coli* ว่ามีกลไกการรับรู้และส่งถ่ายสัญญาณภายในเซลล์เพื่อควบคุมการแสดงออกของ TNF- α ที่เหมือนหรือแตกต่างกันอย่างไร นอกจากนี้ ยังศึกษากลไกที่เกี่ยวข้องในการถ่ายทอดสัญญาณความร้อนซึ่งนำไปสู่การเพิ่มการแสดงออกของ TNF- α รวมทั้งบทบาทของ TRPV1 ต่อการควบคุมการแสดงออกของ TNF- α ด้วย ประโยชน์ที่ได้จากการศึกษานี้จะเพิ่มความเข้าใจในกลไกการควบคุมการแสดงออกของ TNF- α ซึ่งจะเป็นประโยชน์ ในการนำไปประยุกต์เพื่อพัฒนาใหม่ๆ เพื่อใช้ควบคุมระดับการแสดงออกของ TNF- α ซึ่งเป็น pro-inflammatory cytokine ที่สำคัญนี้ ให้อยู่ในระดับที่ไม่มากเกินไป น่าจะเป็นกลไกหนึ่งที่ควบคุมการลุกลามของโรคปริทันต์ได้

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. ศึกษาผลของ LPS จาก *P. gingivalis* และ *E. coli* และโดยความร้อนที่มีต่อการแสดงออกของ TNF- α ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเหงือก (GF) และไฟโบรบลาสต์จากเอ็นยัดปริทันต์ (PDL) ของมนุษย์
2. ศึกษากลไกระดับโมเลกุล (molecular) ในการควบคุมการแสดงออกของ TNF- α โดย LPS จาก *P. gingivalis* และ *E. coli* และโดยความร้อนเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ GF และเซลล์ PDL

ขอบเขตการวิจัย

เป็นโครงการวิจัยพื้นฐาน ที่ทำในห้องปฏิบัติการ โดยใช้เซลล์ GF และเซลล์ PDL ที่เตรียมขึ้นจากฟันกรามใหญ่ซี่ที่ 3 ที่ได้รับการวินิจฉัยให้ถอนหรือผ่าออกและฟันกรามเล็กที่ต้องถูกถอนด้วยเหตุที่ต้องจัดฟันโดยฟันดังกล่าวต้องไม่มีพยาธิสภาพ การทดลองและวิเคราะห์ผลในแต่ละส่วนจะทำอย่างน้อย 3 ครั้ง ผลการทดลองที่ได้จะเพิ่มความเข้าใจในกลไกในการรับรู้

และการถ่ายทอดสัญญาณภายในเซลล์ เมื่อได้รับ LPS จาก *P. gingivalis* และระดับอุณหภูมิที่สูงมากกว่าปกติต่อการสร้าง TNF- α ซึ่งจะไปสู่เป้าหมายที่ชัดเจนและมีความจำเพาะเพื่อป้องกันหรือควบคุมระดับของ inflammation ให้อยู่ในระดับที่ไม่มากเกินไป ที่จะลุกลามไปเป็นโรคปริทันต์ได้

สมมุติฐานและกรอบแนวความคิดของการวิจัย

P. gingivalis เป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทและเป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรคปริทันต์ โดย LPS ซึ่งพบเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ จัดเป็นสารเหนี่ยวนำการอักเสบที่มีประสิทธิภาพสูง ในการศึกษาครั้งนี้ คณะผู้วิจัยต้องการศึกษาเปรียบเทียบชนิดของ receptor ที่เซลล์ใช้และโมเลกุลหลักที่รับถ่ายทอดสัญญาณภายในเซลล์ที่นำไปสู่การแสดงออกของ TNF- α ระหว่าง LPS ที่ได้จาก *P. gingivalis* กับ *E. coli* ในเซลล์ GF และเซลล์ PDL ทั้งนี้เนื่องจากการศึกษาในเซลล์ PDL มีไม่มากนัก และอาจแตกต่างไปจากเซลล์ GF

นอกจากนี้จะศึกษาถึงผลของความร้อนต่อการแสดงออกของ TNF- α และกลไกที่เกี่ยวข้องในการถ่ายทอดสัญญาณดังกล่าว จากการศึกษาเบื้องต้นที่พบว่า ความร้อนสามารถเพิ่มการแสดงออกของ TNF- α และการตอบสนองนี้จะถูกยับยั้งเมื่อได้สารต้านการทำงานของ TRPV1 (Capsazepine) จึงมีสมมุติฐานว่า TRPV1 น่าจะมีบทบาทสำคัญในการส่งถ่ายสัญญาณความร้อนและเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของ TNF- α โดยความร้อนน่าจะส่งผ่านสัญญาณโดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของผิวเซลล์ ซึ่งนำไปสู่การเปิดของ TRPV1 channel ion จากนั้นจะมีการไหลของแคลเซียมจากภายนอกเข้าสู่ภายในเซลล์ ซึ่งแคลเซียมที่เพิ่มขึ้นภายในเซลล์นี้จะทำหน้าที่เป็น secondary messenger ในการถ่ายทอดสัญญาณให้มีการเพิ่มการแสดงออกของ TNF- α ทั้งนี้เนื่องจากความร้อนมักจะกระตุ้นการแสดงออกของ HSP ดังนั้นการศึกษานี้จะรวมถึงบทบาทของ HSP ในการเพิ่มการแสดงออกของ TNF- α

ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษานี้ จะเป็นข้อมูลที่จะนำไปสู่แนวทางในการควบคุมระดับการแสดงออกของ TNF- α ซึ่งเป็น primary pro-inflammatory cytokine ให้อยู่ในระดับที่ไม่มากเกินไป ซึ่งน่าจะควบคุมการอักเสบไม่ให้ลุกลามไปเป็นโรคปริทันต์

บททวนวรรณกรรม

โรคปริทันต์เป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียร่วมกับผลของกลไกการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อแบคทีเรียและสารหลังจากแบคทีเรียนั้นๆ ส่งผลให้เกิดการอักเสบที่เรื้อรัง (chronic inflammation) นำไปสู่การทำลายของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และกระดูกเบ้าฟัน ทำให้เกิดการสูญเสียฟันในที่สุด ในส่วนของเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคปริทันต์พบว่าเชื้อ *Porphyromonas gingivalis* ซึ่งเป็น gram negative แบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโตนั้น เป็นเชื้อหลักที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคปริทันต์ โดยที่ lipopolysaccharides (LPS) ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่พบที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย gram negative น่าจะเป็นสาเหตุเบื้องต้นที่สำคัญในการเหนี่ยวนำกระบวนการอักเสบ (inflammation) ซึ่งสามารถพัฒนาต่อไปเป็นโรคปริทันต์ (Holt et al., 1999; Williams, 1990)

โดยปกติแล้วการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมด้วยระบบภูมิคุ้มกันและกลไกการตอบสนองของร่างกายโดยเกิดการอักเสบนั้น เป็นส่วนหนึ่งของกลไกการป้องกันตัวของร่างกาย (defense mechanism) กระบวนการอักเสบเกิดจากการตอบสนองของเซลล์ต่อสารเหนี่ยวนำ โดยเซลล์ที่มีบทบาทในกระบวนการอักเสบ ได้แก่ เซลล์จากระบบภูมิคุ้มกัน เช่น monocyte, macrophage, lymphocyte และ granulocyte ตลอดจน epithelial cell, endothelial cell, osteoblast, osteoclast และ ไฟโบรบลาสต์ การตอบสนองต่อแบคทีเรียหรือสารหลังจากแบคทีเรียนี้ จะกระตุ้นการหลั่ง primary pro-inflammatory cytokines โดยเฉพาะ interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6 และ tumor necrosis factor- α (TNF- α) จากนั้น ไซโตไคน์เหล่านี้ จะเหนี่ยวนำเซลล์ของเนื้อเยื่อและเซลล์เม็ดเลือดขาวให้หลั่ง inflammatory cytokines ตัวอื่นๆ เป็นลำดับต่อไป เช่น platelet-activating factor, histamine, bradykinin และ prostaglandins เป็นต้น ซึ่งจะทำให้เกิดอาการปวด บวม แดง ร้อนขึ้น รวมทั้งกระตุ้นการหลั่ง chemokines จากเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันทำให้การตอบสนองต่อการอักเสบลุกลามมากขึ้น แต่ในขณะเดียวกัน cytokines ในส่วนที่เป็น anti-inflammatory cytokines เช่น IL-4, IL-10, IL-11 และ TGF- β ก็ถูกหลั่งออกมาด้วยเพื่อควบคุมไม่ให้เกิดการทำลายที่มากเกินไป (Morita et al., 2001, Takashiba, 2003 #10) อย่างไรก็ตามการอักเสบที่มากเกินไปและเรื้อรังเป็นระยะเวลานาน จึงนำไปสู่การเกิดพยาธิสภาพทำให้สูญเสียเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและกระดูกตามมา (Graves and Cochran, 2003)

TNF- α ถูกค้นพบตั้งแต่ปี 1975 หลังจากพบว่าหนูที่ติดเชื้อ *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) นั้น จะหลั่งสารชนิดหนึ่งออกมาในซีรัมซึ่งสารชนิดนี้มีฤทธิ์ทำให้เกิดการตายของเนื้องอกได้ Carswell E.A. จึงตั้งชื่อสารชนิดนี้ว่า tumor necrosis factor (Carswell et al., 1975) หลังจากนั้นได้มีการศึกษาถึง TNF- α อย่างแพร่หลายทั้งใน *in vitro* และ *in vivo* และพบว่า

TNF- α นั้นมีความเกี่ยวข้องกับพยาธิสภาพต่างๆ มากมาย ไม่ว่าจะเป็น การติดเชื้อ การเกิดมะเร็ง และการอักเสบ

เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย อันได้แก่ macrophages และ T lymphocytes เป็นเซลล์หลักที่สำคัญซึ่งจะสร้าง TNF- α เมื่อมีสิ่งเร้ามากระตุ้น นอกจากนี้ยังพบว่า เซลล์อื่นๆ เช่น endothelial cells, smooth muscle cells, osteoclasts และ fibroblasts ยังสามารถสร้าง TNF- α ได้อีกด้วย โดย TNF- α ที่ถูกสร้างขึ้นมานั้น จะอยู่ในรูป membranes-associated TNF- α ซึ่งจะอยู่บริเวณผิวเซลล์ จากนั้น extracellular domain ของมัน จะถูกตัดโดย TNF- α converting enzyme (TACE; ADAM-17) เกิดเป็น TNF- α ชนิดที่ละลายได้ (soluble form) ซึ่ง TNF- α ทั้งสองชนิดนี้สามารถทำงานได้ โดยการจับกับ receptor ซึ่งมีอยู่ 2 ตัว คือ TNFR1 และ TNFR2 โดย receptor ทั้งสองนี้มีความแตกต่างกันที่ intracellular domain จึงทำให้เกิดการถ่ายทอดสัญญาณที่แตกต่างกันด้วย (Bradley, 2008) จากการทดลองในหนูที่ไม่มีการแสดงออกของ TNFR1 และ TNFR2 พบว่า การถ่ายทอดสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบนั้น จะถูกกระตุ้นผ่าน TNFR1 ในขณะที่การกระตุ้นผ่าน TNFR2 จะยับยั้งการอักเสบ และเกี่ยวข้องกับการสร้างหลอดเลือดใหม่ (Goukassian et al., 2007; Peschon et al., 1998)

มีการศึกษามากมายที่แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของ TNF- α กับการเกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ โดยพบว่าผู้ป่วยที่เป็นข้ออักเสบชนิด rheumatoid arthritis จะมีระดับของ TNF- α ในซีรัมที่เพิ่มขึ้น ซึ่งความเข้มข้นของ TNF- α นี้จะแปรผันตามความรุนแรงของโรค (Robak et al., 1998) นอกจากนี้ยังพบระดับของ TNF- α ที่สูงขึ้นบริเวณรอยโรคของผู้ป่วยที่เป็นเรื้อรัง (psoriasis) (Ettehad et al., 1994) ในส่วนของโรคปริทันต์อักเสบนั้นมีรายงานการตรวจพบระดับของ TNF- α ที่เพิ่มขึ้นใน periapical exudates ของฟันที่เป็น acute periodontitis (Pezelj-Ribaric et al., 2007) และ ใน gingival crevicular fluid ของผู้ป่วยที่เป็น chronic periodontitis และ aggressive periodontitis (Kurtis et al., 2005)

ในรอยโรคปริทันต์ TNF- α จะมีอิทธิพลต่อเซลล์ชนิดต่างๆ แตกต่างกันไป เช่น ในเซลล์เม็ดเลือดขาว จะกระตุ้นการสร้างโมเลกุลที่ใช้ในการยึดจับ (adhesion molecules) กับ endothelial cells ส่วนในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ TNF- α จะกระตุ้นการหลั่ง chemotactic chemokines เพื่อดึงดูดให้เม็ดเลือดขาวให้เคลื่อนจากกระแสเลือดเข้ามาสู่บริเวณที่มีการอักเสบเพื่อช่วยในการกำจัด (phagocytosis) แบคทีเรีย นอกจากนี้ หากมีปริมาณ TNF- α จำนวนมาก ก็ จะกระตุ้นการสร้าง cyclooxygenases และทำให้ระดับของ prostaglandins ในเนื้อเยื่อเพิ่มขึ้นด้วย และทั้ง prostaglandins และ TNF- α สามารถร่วมกันกระตุ้นการสร้างและการทำงานของเซลล์สลายกระดูก เป็นผลให้เกิดอัตราการละลายตัวของกระดูกเพิ่มสูงขึ้น นอกจากนี้ TNF- α ยังมีผลในการเหนี่ยวนำการสร้างและหลั่งเอนไซม์ โดยเฉพาะกลุ่ม MMPs รวมทั้งการกระตุ้นให้เกิด

apoptosis ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ซึ่งมีบทบาทอย่างมากในขั้นตอนการซ่อมแซมเนื้อเยื่อ ทำให้มีจำนวนเซลล์ที่ลดลงและจำกัดทำให้กระบวนการซ่อมแซมเกิดขึ้นได้ช้า (Graves and Cochran, 2003)

การศึกษาโดยใช้สารยับยั้งการทำงานของ TNF- α โดยพบว่า เมื่อทำการทดลองโดยฉีด soluble TNFR และ IL-1R เข้าไปในบริเวณ interdental papilla ของลิงที่เป็นโรคปริทันต์เพื่อยับยั้งการทำงานของ TNF- α และ IL-1 สามารถลดการรุกรานของโรคปริทันต์ได้ โดยลดการเคลื่อนที่ของ inflammatory cells เข้าสู่กระดูกที่อยู่ล้อมรอบฟัน (Graves et al., 1998) ลดการสูญเสียการยึดเกาะของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ลดการสร้างเซลล์ทำลายกระดูก และ ลดการละลายตัวของกระดูกได้อย่างมีนัยสำคัญ (Delima et al., 2001)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเพื่อยืนยันบทบาทของ TNF- α ในการเกิดโรคปริทันต์ โดยการกระตุ้นด้วยเชื้อ *P. gingivalis* พบว่าหนูที่ไม่มีการแสดงออกของ TNFR (TNFR^{-/-}) จะลดการเกิด apoptosis ของ fibroblasts และลดการสร้างเซลล์ทำลายกระดูกได้อย่างมีนัยสำคัญ (Graves et al., 2001)

ระดับของ TNF- α ที่เพิ่มสูงขึ้นจากรอยโรคปริทันต์นั้น ยังสามารถส่งเสริมความรุนแรงของโรคทางระบบหลายโรค เช่น myocardial infarction , atherosclerosis, coronary heart disease เป็นต้น (Bascones et al., 2005) ดังนั้น รอยโรคปริทันต์ จึงไม่เป็นเพียงปัญหาในช่องปากเท่านั้น แต่ยังส่งผลถึงรอยโรคในระบบด้วย

แม้ว่าเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันจะเป็นเซลล์ที่มีบทบาทโดยตรงในการตอบสนองต่อสารกระตุ้นแต่หลักฐานจากงานวิจัย พบว่า ไฟโบรบลาสต์ซึ่งเป็นเซลล์ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันก็มีบทบาทเกี่ยวข้องด้วยเช่นกัน ซึ่งโดยปกติ ไฟโบรบลาสต์จะทำหน้าที่ในการสร้างและทำลาย extracellular matrix และความสามารถในการตอบสนองต่อ cytokine และ growth factor นั้น จะสัมพันธ์กับสมดุลของการสร้างและการทำลายของ extracellular matrix (Okada and Murakami, 1998; Takashiba et al., 2003) ในส่วนของเนื้อเยื่อปริทันต์ เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์สามารถตอบสนองต่อ LPS โดยการหลั่ง inflammatory cytokines ได้หลายตัว รวมทั้ง TNF- α ด้วย (Takemura et al., 1998; Wang and Ohura, 2002; Yamaji et al., 1995)

Lipopolysaccharide หรือ LPS นั้น เป็นองค์ประกอบที่พบที่ผนังเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรีย gram negative สามารถเหนี่ยวนำกระบวนการอักเสบ (inflammation) โดยกระตุ้นเซลล์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการอักเสบให้หลั่ง inflammatory cytokines และชักนำให้มีการหลั่งของ cytokines อื่นๆ ให้สร้างขึ้นอย่างต่อเนื่อง ซึ่งถ้าการหลั่งของ cytokines ต่างๆ มีมากเกินไป ก็จะนำไปสู่การอักเสบที่เรื้อรัง หรือการอักเสบในวงกว้างของทั้งร่างกาย (systemic

inflammation) ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของภาวะติดเชื้อหรือพิษของแบคทีเรียในกระแสเลือด (sepsis) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตได้

โครงสร้างโมเลกุลของ LPS ประกอบด้วย glucosamine-based phospholipid (lipid A) ซึ่งเป็นส่วนที่คล้ายกันมาก (highly conserved) ของ LPS จากเชื้อแต่ละชนิด โดยส่วน lipid A จะต่ออยู่กับส่วน polysaccharide ซึ่งเป็นส่วนที่มีความแตกต่างกันระหว่าง LPS จากเชื้อแต่ละชนิด

การศึกษากลไกการตอบสนองของเซลล์ต่อ LPS นั้น ส่วนใหญ่จะใช้ LPS ที่เตรียมขึ้นจากแบคทีเรียกลุ่ม *Enterobacteriaceae* คือ *E. coli* เนื่องจากมี well-conserved lipid A ซึ่งจัดเป็น typical bacterial endotoxin และพบว่า การตอบสนองของเซลล์ต่อ prototype LPS นี้ จะเกิดผ่าน TLR4 (Hirschfeld et al., 2000) ซึ่งเป็นตัวรับบนผิวเซลล์

อย่างไรก็ตาม LPS จาก *P. gingivalis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุหลักของในโรคปริทันต์นั้น (Holt et al., 1999) มีส่วนของ lipid A ที่มีโครงสร้างแตกต่างจาก lipid A ของ *E. coli* โดยพบสาย fatty acid ที่แตกแขนงในรูปแบบที่จำเพาะ มีความยาวของสาย carbon ที่มากกว่า และไม่มีหมู่ phosphate ที่ตำแหน่งที่ 4 ของ non-reducing glucosamine รวมทั้งมีความแตกต่างในส่วนปลีกย่อยอีกหลายตำแหน่ง ซึ่งส่งผลต่อคุณสมบัติทางเคมีและการตอบสนองทางชีวภาพของเซลล์ด้วย (Aida et al., 1995; Darveau et al., 2004; Hashimoto et al., 2004; Kumada et al., 1995) โดยมีรายงานที่แสดงให้เห็นว่า LPS จากเชื้อ *P. gingivalis* มีประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบที่ต่ำกว่า LPS จาก *E. coli* (Martin et al., 2001; Ogawa and Uchida, 1996) ซึ่งประสิทธิภาพของ LPS ที่แตกต่างกันในการเหนี่ยวนำการตอบสนองของเซลล์นี้อาจเนื่องมาจากสายพันธุ์ (strain) ที่แตกต่างกันของแบคทีเรียชนิดนั้นๆ วิธีการสกัดและเตรียม ตลอดจนรูปแบบของการทดสอบในแต่ละงานวิจัย

ในเบื้องต้นมีรายงานว่า CD14 เป็น receptor ต่อ LPS ที่จับกับ LPS binding protein (LPB) โดยพบบนผิวเซลล์ monocyte, macrophage และ neutrophil อย่างไรก็ตาม เนื่องจาก CD14 เป็น glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored protein ซึ่งไม่มีส่วนของ transmembrane จึงไม่มีส่วนที่จะถ่ายทอดสัญญาณเข้าสู่ภายในเซลล์ (Wright et al., 1990) นอกจากนี้การใช้ LPS-receptor antagonist ที่ความเข้มข้นต่ำๆ ก็สามารถยับยั้งการกระตุ้นที่เกิดจาก LPS ได้ ทั้งๆที่ ปริมาณของ antagonist น้อยเกินกว่าที่จะสามารถแข่งจับกับ CD14 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และยังมี LPS ที่จับกับ CD14 ในสัดส่วนที่มากอยู่ก็ตาม ทำให้เชื่อว่าน่าจะมีโมเลกุลอื่นร่วมเป็น receptor (co-receptor) ด้วย (Kitchens and Munford, 1995)

Toll receptor family จัดอยู่ในกลุ่ม type I trans-membrane receptor ซึ่งมี intracellular part คล้ายกับส่วน intracellular part ของ IL-1 receptor Toll-like receptor (TLR)

family ในมนุษย์จนถึงปัจจุบันพบมีสมาชิก 9 ตัว ส่วนใหญ่พบแสดงออกในเซลล์เม็ดเลือดขาว ผลการค้นพบในช่วงแรกพบว่า โมเลกุลในกลุ่มนี้เกี่ยวข้องกับการควบคุมพัฒนาการในแนวหน้าหลังของร่างกาย (dorso-ventral polarization) ของ *Drosophila melanogaster* ต่อมาพบว่า Toll และ Toll-homologues receptors ที่พบใน *Drosophila*, หนู และมนุษย์มีบทบาทในการต่อต้านจุลชีพ (microbes) ที่ทำให้เกิดการติดเชื้อ (Aderem and Ulevitch, 2000; Lemaitre et al., 1996)

รูปแบบในการรับรู้ต่อจุลชีพนั้น การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันใช้ receptor ที่จำเพาะต่อจุลชีพแต่ละกลุ่ม เช่น TLR-4 ใช้ในการรับรู้ LPS ของแบคทีเรีย gram negative ส่วน TLR-2 ใช้รับรู้ peptidoglycans และ lipopeptides ของแบคทีเรีย gram positive และ TLR อื่นๆ ใช้รับรู้องค์ประกอบจำเพาะที่พบในจุลชีพอื่นๆ เช่น TLR-5 ใช้รับรู้ bacterial flagellin (Ozinsky et al., 2000; Tabeta et al., 2000; Underhill and Ozinsky, 2002; Wang and Ohura, 2002)

นอกจากเซลล์เม็ดเลือดขาวแล้ว เซลล์อื่นๆ ก็ใช้ TLR ในการรับรู้ต่อแบคทีเรียเช่นกัน เช่น epithelial cells รับรู้ต่อ LPS ของแบคทีเรีย gram negative เช่น *P. intermedia* และ *H. pylori* ผ่านทาง TLR-2 (Smith et al., 2003) การศึกษาในเซลล์ macrophage จากหนู พบว่าเซลล์นี้ รับรู้ LPS จาก *P. gingivalis* ผ่านทั้งทาง TLR-2 และ TLR-4 และพบว่าผ่านไปทาง TLR-2 มากกว่า TLR-4 ด้วย และมีรายงานว่ากระตุ้นการหลั่ง cytokine ทั้งที่เหมือนและแตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับกระตุ้นด้วย LPS ของ *E. coli* (Hirschfeld et al., 2001; Zhang et al., 2008) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในลักษณะคล้ายกันนี้ในเซลล์กลุ่มอื่นๆ ด้วย เช่น human gingival fibroblast และ เซลล์บุผนังหลอดเลือด (endothelial cells) (Cunningham et al., 1999; Kent et al., 1998) และการใช้ anti-TLR-2 antibody ใน human macrophage พบว่ายับยั้งการสร้าง TNF- α ที่เหนี่ยวนำโดย LPS จาก *P. gingivalis* ได้ (Martin et al., 2001) ในเนื้อเยื่อเหงือกของผู้ป่วยโรคปริทันต์ จะพบการแสดงออกของ TLR-2 ที่สูงขึ้นในสัดส่วนที่มากกว่า TLR-4 (Mori et al., 2003) และพบว่า ความแตกต่างบางประการของโครงสร้าง LPS ทำให้การรับรู้ของเซลล์ผ่านทาง TLR-2 มากกว่า TLR-4 (Coats et al., 2003; Hirschfeld et al., 2001; Werts et al., 2001) ดังนั้น TLR-2 และ TLR-4 จึงมีบทบาทในการรับรู้ LPS แตกต่างกันไปตามชนิดของเซลล์ และชนิดของแบคทีเรียที่ใช้เตรียม LPS

อย่างไรก็ตาม นักวิจัยเชื่อว่าการใช้ TLR-2 ในการตอบสนองต่อ LPS พบเฉพาะการศึกษาในห้องปฏิบัติการเท่านั้น การศึกษา *in vivo* ในหนู 2 สายพันธุ์คือ C3H/HeJ และ C57BL10/ScCr ซึ่งมีความผิดปกติของยีน TLR-4 ที่ตำแหน่งต่างๆ พบว่าตอบสนองต่อ LPS ต่ำกว่าปกติมาก (Poltorak et al., 1998) และการศึกษาในหนูที่ถูกขัดขวางการแสดงออกของยีน

TLR-2 เปรียบเทียบกับ TLR-4 ก็ให้ผลในลักษณะเดียวกับการศึกษาข้างต้น และการไม่มี TLR-2 ไม่มีผลต่อระดับการตอบสนองต่อ LPS (Takeuchi et al., 1999)

ในระหว่างที่มีการศึกษาเพื่อพัฒนา LPS antagonist นั้น พบว่า โครงสร้างของ TLR-4 มีความแตกต่างระหว่าง species อันเนื่องมาจากความแตกต่างในลำดับ amino acid ในส่วนที่จดจำต่อ lipid A (lipid A recognition component) ทำให้เกิดการตอบสนองของยาที่แตกต่างกันระหว่าง species (Lien et al., 2000; Poltorak et al., 2000) ดังนั้นผลการศึกษาใน *in vivo* ที่ได้จากการทดลองในหนูอาจยังไม่สามารถนำไปสู่ข้อสรุปที่ว่า TLR-2 เป็นเพียง receptor ที่เซลล์รับรู้เมื่อศึกษาวิจัยในห้องปฏิบัติการ และไม่ทำหน้าที่เป็น *in vivo* receptor ต่อ LPS

การศึกษาเกี่ยวกับการถ่ายทอดสัญญาณภายในเซลล์พบว่า เซลล์รับรู้ต่อ LPS ของแบคทีเรียส่วนใหญ่รวมทั้ง *E. coli* ผ่านทาง TLR-4 และสัญญาณที่ผ่านเข้าสู่เซลล์ ผ่านไปทาง nuclear factor kappa-B (NF-kB) และบางรายงานพบว่าผ่านไปถึง p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK) ด้วย (Hirschfeld et al., 2001; Martin et al., 2001) อย่างไรก็ตามมีรายงานที่พบว่า LPS เหนี่ยวนำเซลล์ microglia ให้หลั่ง TNF- α ผ่านทาง JNK (c-Jun N-terminal kinase) และ p38MAPK โดยไม่ผ่าน NF-kB (Uesugi et al., 2006) และพบว่าใน human monocytic cell line (THP-1) นั้น LPS ของ *P. gingivalis* เหนี่ยวนำการหลั่ง TNF- α ผ่านทาง TLR-2 และ JNK (Zhang et al., 2008) ดังนั้นกลไกและเส้นทางการถ่ายทอดสัญญาณที่มีความจำเพาะต่อการกระตุ้นโดย LPS ของ *P. gingivalis* ในไฟโบรบลาสต์จากเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ โดยเพิ่มระดับการสร้าง TNF- α อาจแตกต่างกันและแตกต่างไปจากที่มีรายงานในเซลล์ชนิดอื่นๆ

นอกจากการติดเชื้อแบคทีเรียแล้ว ยังมีปัจจัยอื่นๆที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคปริทันต์ เช่น การสูบบุหรี่ และความเครียด (Pihlstrom et al., 2005) ในการศึกษาครั้งนี้ คณะผู้วิจัยให้ความสนใจที่ผลของความร้อน ซึ่งเป็นปัจจัยทางกายภาพชนิดหนึ่งที่มักเกิดขึ้นในช่องปากอันเนื่องจากพฤติกรรมต่างๆ เช่น การสูบบุหรี่ การดื่มชา กาแฟ ต่อการการเปลี่ยนแปลงของ TNF- α

โดยทั่วไปแล้ว เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วยความร้อน เซลล์จะมีการปรับตัวให้ดำรงอยู่ในสภาวะนั้นได้โดยเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนต่างๆในร่างกาย กลุ่มของยีนที่มักจะมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อถูกกระตุ้นด้วยความร้อน คือ heat shock proteins (HSP) ซึ่งการสังเคราะห์ HSP นั้นจำเป็นต้องอาศัย heat shock factor (HSF) ในการทำหน้าที่เป็น transcription factor (Morimoto, 1998) HSF ที่ถูกค้นพบในมนุษย์นั้นมี 3 ตัวด้วยกัน คือ HSF1, HSF2 และ HSF4 โดย HSF-1 จะเกี่ยวข้องกับการตอบสนองของเซลล์ต่อความร้อน ในขณะที่ HSF ตัวอื่นๆจะทำหน้าที่เกี่ยวกับ developmental process (Pirkkala et al., 2001)

ในสภาวะที่ไม่มีสิ่งกระตุ้นนั้น HSF-1 จะจับอยู่กับ HSP ในรูป inactive complex แต่เมื่อมีความร้อนมากระตุ้น จะทำให้เกิด denatured protein ซึ่งจะไปกระตุ้นให้เกิดการแยกตัวของ HSF-1 ออกจาก HSP โดย HSF-1 ที่เป็นอิสระนี้จะเข้าสู่นิวเคลียสไปจับกับส่วนของ heat shock element (HSE) ซึ่งอยู่บน promoter ของ HSPs ทำให้มีการสังเคราะห์ HSP ที่เพิ่มขึ้น โดย HSP ที่เพิ่มขึ้นนี้จะทำหน้าที่เป็น chaperon protein คือ ช่วยทำให้โปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นใหม่อยู่ในรูปร่างที่ถูกต้อง และ ช่วยซ่อมแซม denatured protein ที่ถูกทำลายจากความร้อน (Morimoto, 1998) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า HSP สามารถทำหน้าที่เป็น pro-inflammatory cytokine ได้อีกด้วย โดยพบว่า recombinant human HSP70 (rhHSP70) สามารถเหนี่ยวนำให้มีการสร้าง TNF- α และ IL-6 เพิ่มขึ้นใน monocytes (Asea et al., 2000) และ ใน mast cells (Mortaz et al., 2006) ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าการเพิ่มขึ้นของ TNF- α ในไฟโบรบลาสต์จากเอ็นโดทีเลียสที่คณะผู้วิจัยพบในการศึกษาเบื้องต้นนี้น่าจะเกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของ HSP หลังจากถูกกระตุ้นด้วยความร้อน

โปรตีนอีกกลุ่มหนึ่งที่มีความเกี่ยวข้องกับความร้อน คือ โปรตีนที่อยู่ในกลุ่มของ transient receptor potential (TRP) channel family ซึ่งประกอบไปด้วยโปรตีนถึง 30 ชนิด โดยกลุ่มของโปรตีนที่ทำหน้าที่รับความร้อน (Thermo-TRPs) นั้น มีสมาชิกอยู่ 9 ตัวด้วยกัน ประกอบด้วย TRPV1-4, TRPM2, TRPM4, TRPM5, TRPM8 และ TRPA1 ซึ่งโปรตีนแต่ละตัวนั้นจะถูกกระตุ้นที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน (Huang et al., 2006) โดยโปรตีนที่มีการศึกษาอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน ว่าเป็นตัวการสำคัญในกระบวนการรับรู้ความเจ็บปวดอันเนื่องมาจากความร้อนและการอักเสบ คือ TRPV1 หรือ แต่เดิมรู้จักกันในชื่อ vanilloid receptor1 (VR1) เนื่องจากถูกกระตุ้นด้วย capsaicin ซึ่งเป็นสารจำพวก vanilloid ที่อยู่ในพริก (Szallasi and Blumberg, 1999) แต่ต่อมาได้เปลี่ยนชื่อใหม่เป็น TRPV1 เนื่องจากพบว่าโปรตีนตัวนี้มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับโปรตีนในกลุ่ม TRP ion channel และถูกกระตุ้นเมื่ออุณหภูมิมากกว่า 43 องศาเซลเซียส (Caterina et al., 1997) นอกจากนั้นแล้ว TRPV1 ยังถูกกระตุ้นได้ด้วยสารอื่นๆอีก เช่น โปรตอน (Jordt et al., 2000) และ bradykinin (Cesare and McNaughton, 1996) เป็นต้น บทบาทของ TRPV1 ในการทำหน้าที่เป็น nociceptor ได้มีการศึกษาในสัตว์ทดลอง โดยพบว่าหนูที่ไม่มี TRPV1 (TRPV1^{-/-}) จะมีการตอบสนองต่อความเจ็บปวดที่เกิดจากความร้อนลดลง (Caterina et al., 2000)

โครงสร้างของ TRPV1 เป็น homo- หรือ heterotetramers ซึ่งประกอบด้วย 4 subunits (Kedei et al., 2001) โดยแต่ละ subunit จะประกอบด้วย putative six-transmembrane-spanning protein ซึ่ง tetramer นี้ จะประกอบขึ้นเป็น cation-permeable pores โดยมีส่วนของ C-

terminal และ N-terminal ยื่นลงมาในไซโตพลาสซึม เมื่อทำการศึกษาความเฉพาะเจาะจงของ TRPV1 ต่อการเข้าออกของไอออน พบว่า TRPV1 จัดเป็น non-selective ion channel โดยจะยอมให้แคลเซียมจะซึมผ่านเข้าเซลล์ได้ง่ายกว่าไอออนชนิดอื่นๆ ซึ่งแคลเซียมนี้มีบทบาทในการทำให้เกิด desensitization ของ sensory neuron (Caterina et al., 1997) แต่ใน human epidermal keratinocytes นั้น พบว่าการซึมผ่านของแคลเซียมเข้าสู่เซลล์จำเป็นต่อการเพิ่มการแสดงออกของ MMP-1 เมื่อถูกกระตุ้นด้วยความร้อน (Li et al., 2007) จึงอาจเป็นไปได้ว่า ใน non-neuronal cells นั้น แคลเซียมที่ซึมผ่านเข้าสู่เซลล์น่าจะทำหน้าที่เป็น secondary messenger ในการถ่ายทอดสัญญาณของ TRPV1 ซึ่งนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนเป้าหมาย

การทำงานของ TRPV1 นั้น ถูกควบคุมด้วยกลไกที่ค่อนข้างซับซ้อน ในสภาวะปกติ นั้น จะพบ TRPV1 ได้ทั้งในไซโตพลาสซึมและผิวเซลล์ โดยจะอยู่ในรูปที่ไม่สามารถทำงานได้ กล่าวคือ TRPV1 ที่อยู่ในไซโตซอลจะทำงานก็ต่อเมื่อมีสิ่งกระตุ้น ซึ่งจะทำให้เกิดการเคลื่อนย้าย TRPV1 ไปอยู่บริเวณผิวเซลล์ (Morenilla-Palao et al., 2004) ส่วน TRPV1 ที่อยู่บนผิวเซลล์ จะจับอยู่กับ phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) ทำให้ไม่สามารถทำงานได้ ดังนั้น phospholipase C (PLC) ซึ่งสามารถ cleave PIP₂ ได้ จึงสามารถปลดปล่อย TRPV1 ออกจากการควบคุมของ PIP₂ ได้ (Chuang et al., 2001) นอกจากนี้ ยังพบว่า TRPV1 ถูกควบคุมด้วยกระบวนการ phosphorylation การเติมหมู่ฟอสเฟตโดย protein kinase A (PKA) หรือ protein kinase C (PKC) จะเพิ่มความไวของ TRPV1 ต่อสิ่งกระตุ้น ในขณะที่การดึงหมู่ฟอสเฟตออกโดย phosphatase เช่น calcineurin จะลดความไวของ TRPV1 (Mandadi et al., 2006; Mohapatra and Nau, 2005)

เนื่องจากความร้อนเป็นลักษณะทางกายภาพ ซึ่งแตกต่างกับสิ่งกระตุ้นอื่นๆ ที่เป็นสารเคมี เช่น capsaicin ซึ่งสามารถจับกับ receptor ได้อย่างเฉพาะเจาะจง จึงเป็นที่น่าสนใจว่า TRPV1 นั้นรับรู้ความร้อนได้อย่างไร มีรายงานว่า C-terminal domain ของ TRPV1 น่าจะเป็นตำแหน่งที่รับรู้ความร้อน เนื่องจากเมื่อทำ sequential deletion ในตำแหน่ง distal half C-terminal จะทำให้ temperature threshold ลดลง (Kedei et al., 2001) อย่างไรก็ตามกลไกดังกล่าวยังไม่ทราบแน่ชัด David E. Clapham ได้อธิบายว่า น่าจะมีความเป็นไปได้ 3 กรณีด้วยกันในการรับรู้ความร้อนนี้คือ 1) ความร้อนอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการจัดเรียงตัว (rearrangement) ของชั้นไขมันบนผิวเซลล์ ทำให้มีการเปลี่ยนแปลง membrane tension 2) ความร้อนอาจทำให้มีการเปลี่ยนรูปร่าง (denature) ของโปรตีน ทำให้เกิดการเปิดของ channel 3) ความร้อนกระตุ้น secondary messenger ทำให้เกิดการเปิดของ channel (Clapham, 2003)

โดยส่วนใหญ่แล้ว เราจะพบ TRPV1 ในเซลล์ของระบบประสาท เช่น neuron ใน trigeminal ganglia และ dorsal root ganglia (Helliwell et al., 1998) ซึ่งสอดคล้องกับบทบาทของมันในการทำหน้าที่เป็น nociceptor ต่อมาได้มีการค้นพบ TRPV1 ในเซลล์อื่นที่ไม่ใช่เซลล์ประสาท เช่น epidermal keratinocytes (Southall et al., 2003) และ gastric epithelial cells (Kato et al., 2003) จากการศึกษาเบื้องต้นของคณะผู้วิจัยในไฟโบรเบลลาสต์จากเอ็นยัดปริทันต์สามารถตรวจพบการแสดงออกของ TRPV1 เช่นกัน เนื่องจากช่องปากเป็นอวัยวะที่มีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิค่อนข้างสูง ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่า TRPV1 ที่อยู่ในไฟโบรเบลลาสต์จากเอ็นยัดปริทันต์น่าจะทำหน้าที่ในการรับสัญญาณความร้อน และ มีการถ่ายทอดสัญญาณซึ่งเหนี่ยวนำให้มีการเพิ่มการแสดงออกของ TNF- α ดังนั้นคนที่เผชิญกับการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในช่องปากบ่อยๆ น่าจะมีความเสี่ยงต่อการเป็นโรคปริทันต์ที่เพิ่มขึ้น ความรู้ที่ได้รับจากการศึกษาครั้งนี้จะทำให้เข้าใจกลไกการเกิดโรคที่เพิ่มขึ้น และ นำไปสู่การพัฒนายาเพื่อใช้ในการรักษาโรคปริทันต์

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสต์จากเนื้อเยื่อปริทันต์

ไฟโบรบลาสต์จากเหงือก (GF) และเอ็นยึดปริทันต์ (PDL) เตรียมจากเนื้อเยื่อปริทันต์จากฟันของผู้ป่วยที่อยู่ในแผนการรักษาที่มีข้อบ่งชี้ว่าจะต้องถูกถอน โดยฟันนั้นจะต้องไม่มีผุทะลุถึงโพรงประสาทฟันและไม่มีรอยโรคที่ปลายรากฟัน วิธีการเตรียมเซลล์โดยย่อมีดังนี้ นำฟันที่ได้มาล้างด้วย phosphate buffer saline ที่ปราศจากเชื้อหลายๆ ครั้ง สำหรับการเตรียมไฟโบรบลาสต์จากเอ็นยึดปริทันต์ทำโดยใช้มีดขูดเนื้อเยื่อปริทันต์จากส่วนกลาง (middle third) ของรากฟัน ส่วนไฟโบรบลาสต์จากเหงือกจะตัดจากชิ้นเหงือกที่อยู่รอบๆ คอฟัน 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 $\mu\text{g/ml}$ เซลล์จะถูกเลี้ยงในตู้บ่มที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศ 5 % อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนทุกวันจนเซลล์เคลื่อนออกจากชิ้นเนื้อมาอยู่บนจานเลี้ยง จากนั้นอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนสัปดาห์ละ 2 ครั้ง การขยายจำนวนเซลล์จะทำการถ่ายเซลล์ (subculture) ที่เจริญเต็มจานเลี้ยงลงสู่จานเลี้ยงเซลล์ใหม่ในอัตราส่วน 1:3 โดยใช้เอนไซม์ trypsin-EDTA เซลล์จะถูกถ่ายสัปดาห์ละ 1 ครั้ง เซลล์ที่ใช้ในการทดลองจะใช้เซลล์ในรุ่นที่ 3-6 ในแต่ละการทดลอง จะทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง และใช้เซลล์ที่เตรียมจากผู้ป่วย 3 คน

2. กระตุ้นเซลล์ด้วย LPS และ ความร้อน

เซลล์ถูกหว่านในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ที่ความหนาแน่น 50,000 เซลล์ต่อหลุม เลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนจะเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัม เซลล์ในกลุ่มทดลองจะถูกกระตุ้นด้วย LPS ของ *P. gingivalis* (InvivoGen, CA, USA) หรือ *E. coli* (Sigma, MO, USA) ที่ความเข้มข้น และระยะเวลาต่างๆ กัน เพื่อตรวจวัดระดับการแสดงออกพื้นฐานของ TNF- α , TLR-2 และ TLR-4 ในเซลล์จากกลุ่มควบคุม และการเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกของ TNF- α , TLR-2 และ TLR-4 ของเซลล์ในกลุ่มทดลอง โดยวิเคราะห์ทั้งในระดับ mRNA ด้วย เทคนิค RT-PCR และระดับโปรตีนด้วยเทคนิค ELISA เทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการกระตุ้น

สำหรับการกระตุ้นด้วยความร้อนนั้น เซลล์จะถูกนำไปเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10, 20, 30, 60, 120, 240 นาที จากนั้นอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูก

นำไปวิเคราะห์ระดับ TNF- α ด้วยเทคนิค ELISA และตัวเซลล์จะถูกนำไปสกัด RNA เพื่อวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ mRNA ของ TNF- α , HSP-70 และ HSP-47

3. การวิเคราะห์ระดับ mRNA ด้วยเทคนิค reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-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 30 นาที เพื่อให้ได้ complementary DNA (cDNA)

จากนั้นนำ cDNA ที่ได้ไปเพิ่มจำนวนด้วยกระบวนการ PCR ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนในแต่ละรอบดังนี้ initial denaturation, denaturation, annealing และ extension โดยการใช้สาย primer ที่จำเพาะต่อ nucleotide sequence ของ TNF- α , TLR-2, TLR-4, HSP47 และ HSP70 และใช้สาย primer ที่จำเพาะต่อ GAPDH (glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase) ควบคุมกันไป เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมภายใน (internal control) ของการทดลอง สำหรับ nucleotide sequence ของแต่ละยีนที่ศึกษา สามารถตรวจสอบได้จาก GenBank ผ่านทาง website ของ National Institute of Health (NIH) เมื่อสิ้นสุดกระบวนการ PCR แล้ว วิเคราะห์สายพันธุกรรมที่ได้โดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าใน 2% agarose gel และอ่านค่าด้วยเครื่อง gel documentation system (Bio-Rad, USA)

4. การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ TNF- α ด้วยเทคนิค Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ปริมาณ TNF- α ที่หลั่งจากเซลล์ที่ได้รับและไม่ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS และความร้อน จะถูกวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ELISA ดังขั้นตอนโดยย่อดังนี้คือ เซลล์จะถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มี Phenol red (Phenol red-free DME medium) ตลอดการทดลอง เพื่อกำจัดการรบกวนของสีในขั้นตอนการวัดการดูดกลืนแสงของเทคนิคนี้ ภายหลังจากเซลล์ถูกกระตุ้นด้วย LPS นำอาหารเลี้ยงเซลล์ในแต่ละหลุมมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ELISA ตามขั้นตอนที่ระบุไว้โดยบริษัท โดยอาศัยหลักการที่ว่า ในหลุมของ ELISA plate จะถูกเคลือบผิวไว้ด้วยแอนติบอดี (antibody) ที่มีความจำเพาะกับ TNF- α จากนั้น อาหารเลี้ยงเซลล์ที่เก็บหลังจากเซลล์ได้รับการกระตุ้น จะถูกนำมาเติม พร้อมๆ กับ antibody ตัวที่ 2 ที่มีความจำเพาะกับ TNF- α เช่นเดียวกัน

แต่คนละตำแหน่ง (epitope) กับ antibody ตัวแรก และปลายอีกด้านหนึ่งต่ออยู่กับ biotin ซึ่งจะต่อกับตัวแสดงสัญญาณต่อไป ดังนั้น TNF- α ที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์จะจับกับ antibody ทั้งสองตัวและถูกดึงมาติดที่กันหลุม จากนั้น antibody ตัวที่ 2 และโปรตีนส่วนเกินจะถูกล้างออกแล้วเติม horseradish peroxidase-conjugated streptavidin ซึ่งจะไปจับกับ biotin จากนั้นเติมสารตั้งต้น (substrate) ของ peroxidase ก็จะทำให้เกิดเป็นสารละลายสีขึ้น แล้วนำสารละลายที่มีสีนี้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้นำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานก็จะคำนวณกลับมาเป็นปริมาณโปรตีนต่อไป จากนั้นปริมาณโปรตีนที่คำนวณได้จะถูกเปรียบเทียบเป็นปริมาณโปรตีนต่อ จำนวนเซลล์ที่วิเคราะห์ได้จากเทคนิค MTT แล้วจึงนำเสนอเป็นกราฟต่อไป

5. การวิเคราะห์บทบาทของ TLR-2 และ TLR-4 เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วย LPS

เซลล์ถูกหว่านในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ที่ความหนาแน่น 50,000 เซลล์ต่อหลุม เลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนจะเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัม จากนั้นเติมแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ TLR-2 หรือ TLR-4 เป็นเวลา 30 นาทีก่อนที่จะกระตุ้นด้วย LPS ที่ความเข้มข้นและเวลาที่ได้ผ่านการทดลองแล้วพบว่าสามารถกระตุ้นการแสดงออกของ TNF- α ได้ แล้ววิเคราะห์การแสดงออกของ TNF- α ด้วยเทคนิค RT-PCR

6. การวิเคราะห์ความจำเป็นของการสังเคราะห์โปรตีน TLR-2 หรือ TLR-4 ใหม่ เพื่อใช้ในการรับรู้เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วย LPS โดยใช้เทคนิค small interfering RNA (siRNA)

RNA interference (RNAi) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการยับยั้งการแสดงออกของยีนเพื่อใช้ในการศึกษาการทำงานของโปรตีน โดยเป็น posttranscriptional regulation of gene expression หรือ posttranscriptional gene silencing ในการศึกษาจะใช้ siRNA ของ TLR-2 หรือ TLR-4 ซึ่งเป็น RNA สายคู่ มีความยาวประมาณ 21-25 คู่เบส ถูกออกแบบและสังเคราะห์โดยบริษัท Invitrogen เพื่อทำหน้าที่จำเพาะในการตัด mRNA TLR-2 หรือ TLR-4 ที่มีอยู่ในเซลล์ mRNA ที่ถูกย่อยจะถูกทำลาย เป็นผลให้ไม่มี mRNA ผ่านเข้าสู่กระบวนการแปลรหัสไปเป็นโปรตีน ทำให้ไม่มีการสร้างโปรตีนของ TLR-2 หรือ TLR-4 เกิดขึ้น ทำการศึกษาโดยหว่านเซลล์ในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ที่ความหนาแน่น 50,000 เซลล์ต่อหลุม เลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนจะเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัม จากนั้นนำ siRNA ต่อ TLR-2 หรือ TLR-4 เข้าเซลล์ด้วยวิธีการ transfection ด้วย lipofectamine เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนที่จะกระตุ้นด้วย LPS ที่ความเข้มข้นและเวลาที่ได้ผ่านการทดลองแล้วพบว่าสามารถกระตุ้นการแสดงออกของ TNF- α ได้ แล้ววิเคราะห์การแสดงออกของ TNF- α ด้วยเทคนิค RT-PCR

7. การวิเคราะห์ signaling molecules ที่ LPS ส่งถ่ายสัญญาณเพื่อการควบคุมการแสดงออกของ TNF- α ด้วยตัวยับยั้งการทำงานของ signaling molecules ชนิดต่างๆ

เซลล์ถูกหว่านในจานเลี้ยงเซลล์ และกระตุ้นด้วย LPS โดยวิธีการดังที่กล่าวไว้ข้างต้น ในสถานะที่มีและไม่มีตัวยับยั้งการทำงานของ MAPK pathway (ERK; extracellular signal-regulated kinase, JNK; c-Jun N-terminal kinase และ P38 kinase) ตัวยับยั้งการทำงานของ PI3K, Akt และ NF- κ B โดยจะมีกลุ่มควบคุมบวกคือกลุ่มที่ได้รับเฉพาะ LPS และ กลุ่มควบคุมลบคือกลุ่มที่เดิมเฉพาะตัวยับยั้งการทำงานของตัวยับยั้งการทำงานต่างๆ ข้างต้น และกลุ่มที่ไม่ได้รับการเติมสารใดๆ แล้ววิเคราะห์การแสดงออกของ TNF- α ด้วยเทคนิค RT-PCR

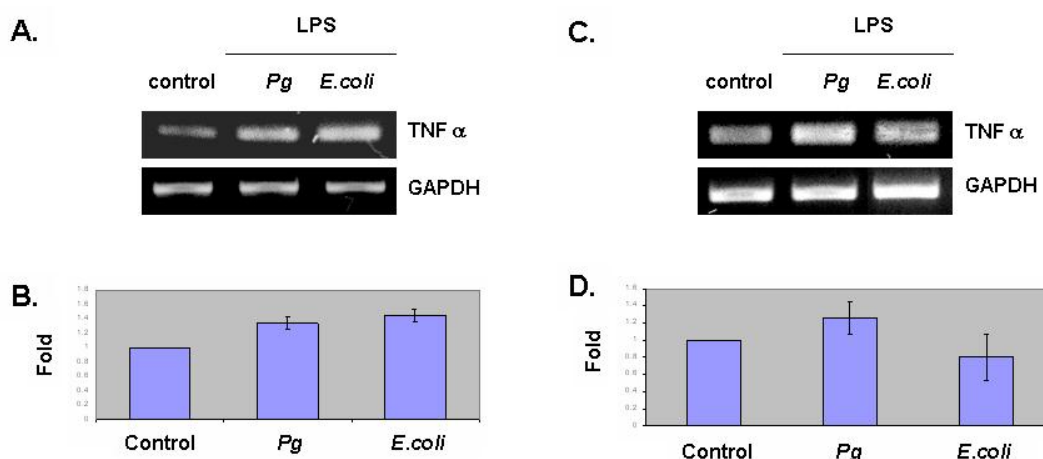
8. การวิเคราะห์กลไกที่เกี่ยวข้องในการที่ความร้อนถ่ายทอดสัญญาณเพื่อควบคุมการแสดงออกของ TNF- α โดยใช้สารยับยั้งชนิดต่างๆ

เซลล์ถูกหว่านในจานเลี้ยงเซลล์ และกระตุ้นด้วยความร้อน โดยวิธีการดังที่กล่าวไว้ข้างต้น ในสถานะที่มีและไม่มีสารยับยั้งชนิดต่างๆ ได้แก่ capsazepine เพื่อศึกษาบทบาทของ TRPV1 สาร EGTA เพื่อทำให้อาหารเลี้ยงเซลล์ปราศจากแคลเซียม และใช้ในการศึกษาบทบาทของแคลเซียม สารยับยั้ง myosin light chain kinase และ cytochalasin-B เพื่อศึกษาผลของความร้อนต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของฟิวเซลล์ และ cyclohexamide เพื่อศึกษาบทบาทของ HSPs ซึ่งถูกสร้างขึ้นเมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วยความร้อน โดยจะวิเคราะห์ผลของสารต่างๆ ดังกล่าวต่อระดับการแสดงออกของ TNF- α โดยวิเคราะห์ระดับ TNF- α ด้วยเทคนิค RT-PCR

ผลการวิจัย

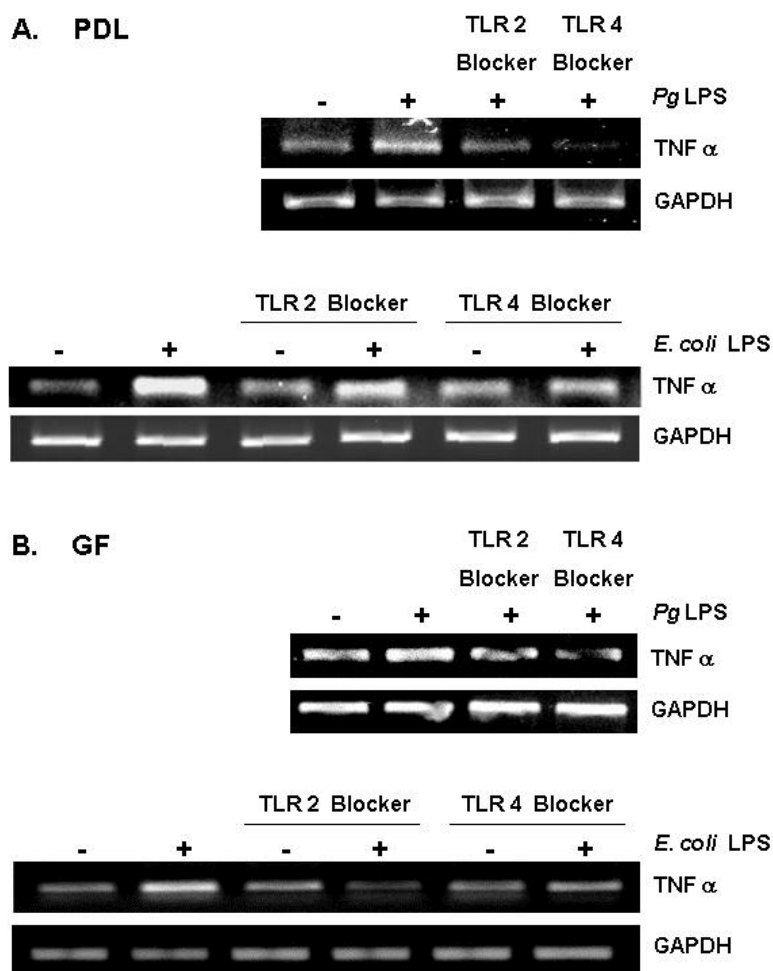
1. ผลของ LPS จาก *P. gingivalis* และ *E. coli* ที่มีต่อการแสดงออกของ TNF- α ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเหงือก (GF) และไฟโบรบลาสต์จากเอ็นยึดปริทันต์ของมนุษย์ (PDL)

เมื่อกระตุ้นเซลล์ PDL และ GF ด้วย *P. gingivalis* และ *E. coli* LPS ที่ความเข้มข้น 10 ug/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบการเพิ่มขึ้นของระดับการแสดงออกของ mRNA และโปรตีนของ TNF α ได้ในเซลล์ทั้งสองชนิดโดยเซลล์แต่ละชนิดสามารถตอบสนองต่อ LPS ทั้งสองชนิดด้วยเช่นกัน ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงการเพิ่มขึ้นของระดับการแสดงออกของ TNF α ใน PDL ใน A. ระดับ mRNA และ B. จำนวนเท่า (fold) ของระดับโปรตีน และ ระดับการแสดงออกของ TNF α ใน GF C. ระดับ mRNA และ B. จำนวนเท่า (fold) ของระดับโปรตีนเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย *Pg* และ *E. coli* LPS วิเคราะห์โดยเทคนิค RT-PCR และ ELISA

2. บทบาทของ TLR-2 และ TLR-4 เมื่อกระตุ้นเซลล์ PDL และ GF ด้วย LPS จาก *P. gingivalis* และ *E. coli*



รูปที่ 2 แสดงระดับการแสดงออกของ mRNA ของ TNF α โดยแสดงเทียบกับระดับการแสดงออกของ GAPDH ซึ่งเป็น internal control ในเซลล์ PDL (A) และ GF (B) เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย *Pg* และ *E. coli* LPS ที่ความเข้มข้น 10 ug/ml ในสถานะที่มี specific blocking antibodies ต่อ TLR2 และ TLR4 (TLR2 และ TLR4 Blockers)

ในรูปนี้แสดงการใช้ antibodies ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีน TLR2 หรือ 4 ที่ความเข้มข้น 20 ug/ml (ความเข้มข้นที่บริษัทผู้ผลิต; Invivogen แนะนำคือ 10 ug/ml) ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงที่สุดที่ทดสอบแล้วว่าไม่เป็นพิษต่อเซลล์ด้วยเทคนิค MTT (ไม่ได้แสดงผล) เข้าไปจับกับ TLR2 หรือ 4 ซึ่งอยู่บนผิวเซลล์ ทำให้ขัดขวางการจับของ LPS ต่อ TLR2 หรือ 4 (ทำหน้าที่เป็น blocker) เพื่อศึกษาความสำคัญ และความจำเพาะของ TLR2 หรือ TLR4 ในการรับรู้เพื่อตอบสนองต่อการกระตุ้นเซลล์ PDL และเซลล์ GF ด้วย *Pg* LPS หรือ *E. coli* LPS

รูปที่ 2A ผลการทดลองพบว่าเมื่อเซลล์ PDL ได้รับการกระตุ้นด้วย *Pg* LPS (รูป 2A. แถวบน) การแสดงออกของ TNF α เพิ่มขึ้น (TNF α , lane 2) แต่เมื่อได้รับ blockers ต่อ TLR2

(TNF α , lane 3) พบการแสดงออกของ TNF α ลดลงสู่ระดับเดียวกับกลุ่มที่ไม่ถูกกระตุ้น และเมื่อได้รับ blockers ต่อ TLR4 (TNF α , lane 4) พบการลดลงของ TNF α อย่างชัดเจน

ในขณะเดียวกันเมื่อกระตุ้นเซลล์ PDL ด้วย *E. coli* LPS (รูป 2A. แถวล่าง) พบการเพิ่มขึ้นของระดับ TNF α mRNA (TNF α , lane 2) แต่เมื่อได้รับ *E. coli* LPS ร่วมกับ blockers ต่อ TLR2 (TNF α , lane 4) พบการลดลงเล็กน้อยของ TNF α และมีการลดลงสู่ระดับเดียวกับเซลล์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้น เมื่อได้รับ TLR4 blocker (TNF α , lane 6) ทั้งนี้ระดับการแสดงออกของ TNF α ในสถานะที่ใส่ blockers ต่อ TLR2 (TNF α , lane 3) หรือ TLR4 (TNF α , lane 5) แต่เพียงอย่างเดียวโดยไม่มี LPS พบว่าไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่า blockers ไม่มีผลต่อการแสดงออกปกติของ TNF α ในเซลล์ PDL

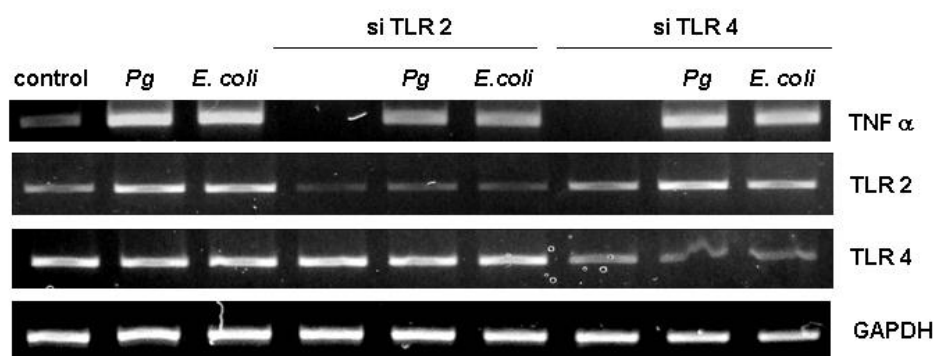
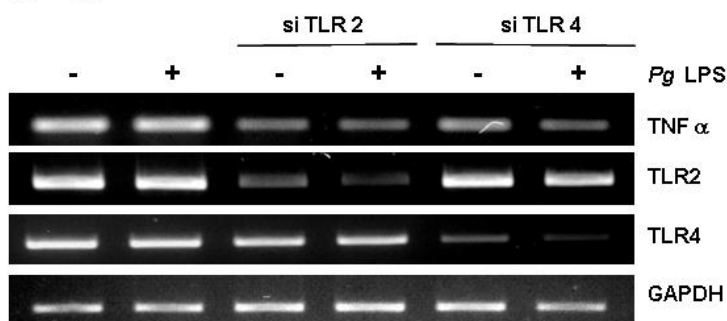
ข้อมูลในส่วนนี้แสดงให้เห็นว่าเซลล์ PDL นั้นรับรู้ *Pg* LPS และ *E. coli* LPS ได้ทั้งทาง TLR2 และ 4 ซึ่งส่งผลต่อการเพิ่มการแสดงออกในระดับ mRNA ของ TNF α

รูปที่ 2B ในส่วนของเซลล์ GF ได้รับการกระตุ้นด้วย *Pg* LPS (รูป 2B. แถวบน) การแสดงออกของ TNF α เพิ่มขึ้น (TNF α , lane 2) แต่เมื่อได้รับ blockers ต่อ TLR2 (TNF α , lane 3) หรือ TLR4 (TNF α , lane 4) ร่วมด้วย พบการแสดงออกของ TNF α ลดลงเช่นกัน

และเมื่อกระตุ้นเซลล์ GF ด้วย *E. coli* LPS (รูป 2B. แถวล่าง) พบการเพิ่มขึ้นของระดับ TNF α mRNA (TNF α , lane 2) แต่เมื่อได้รับ *E. coli* LPS ร่วมกับ blockers ต่อ TLR2 (TNF α , lane 4) พบการแสดงออกของ TNF α ลดลงอย่างชัดเจนและต่ำกว่าระดับ baseline expression ในขณะที่เมื่อได้รับ *E. coli* LPS ร่วมกับ blockers ต่อ TLR4 (TNF α , lane 6) ก็สามารถลดการแสดงออกของ TNF α ในระดับ mRNA ลดลงสู่ระดับ baseline คือเท่ากับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการกระตุ้น ทั้งนี้ระดับการแสดงออกของ TNF α ในสถานะที่ใส่ blockers ต่อ TLR2 (TNF α , lane 3) หรือ TLR4 (TNF α , lane 5) แต่เพียงอย่างเดียวโดยไม่มี LPS พบว่าไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่า blockers ไม่มีผลต่อการแสดงออกปกติของ TNF α ในเซลล์ GF เช่นเดียวกับที่ไม่มีผลต่อเซลล์ PDL

ข้อมูลในส่วนนี้แสดงให้เห็นว่าเซลล์ GF นั้นก็รับรู้ *Pg* LPS และ *E. coli* LPS ได้ทั้งทาง TLR2 และ 4 เช่นเดียวกับในเซลล์ PDL แล้วเพิ่มการแสดงออกของ TNF α

อย่างไรก็ตามจากระดับของ TNF α ที่ลดลงเล็กน้อยต่างกันดังแสดงในรูปที่ 2 นั้นยังไม่สามารถสรุปได้ชัดเจนว่าในการรับรู้ LPS แต่ละชนิดนั้น เซลล์ใช้ TLR2 หรือ TLR4 ในการรับรู้มากกว่ากัน ทั้งนี้เนื่องจากไม่ได้ศึกษาปริมาณการแสดงออกของ TLR ทั้งสองชนิดในรูปของโปรตีนเฉพาะที่อยู่บนผิวเซลล์ และไม่ได้พิสูจน์ประสิทธิภาพในการ block ของ antibody ทั้งสองในเซลล์ชนิดนี้ว่าที่ความเข้มข้นเดียวกันสามารถยับยั้งจำนวนโมเลกุลของ TLR ที่เท่ากันหรือไม่

A. PDL**B. GF**

รูปที่ 3 แสดงระดับการแสดงออกของ mRNA ของ TNF α TLR2 และ TLR4 ในเซลล์ A. PDL และ B. GF เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย *Pg* และ *E. coli* LPS ที่ความเข้มข้น 10 ug/ml ในสถานะที่มี siRNA ต่อ TLR2 และ TLR4 (siTLR2, siTLR4)

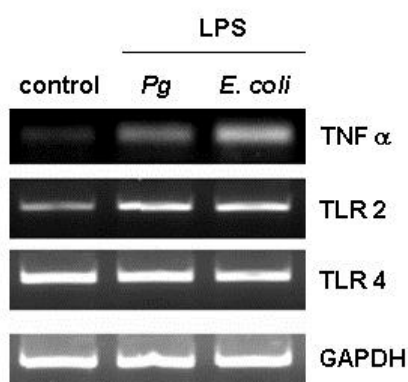
ในการศึกษานี้ใช้ siRNA ของ TLR-2 หรือ TLR-4 ซึ่งเป็น RNA สายคู่ ขนาดสั้น ความยาวประมาณ 21-25 คู่เบส ถูกออกแบบให้มีเบสคู่สมกับช่วงเบสที่มีความจำเพาะของ TLR-2 หรือ TLR-4 mRNA ดังนั้นถ้ามี TLR-2 หรือ TLR-4 mRNA แสดงออกอยู่ในเซลล์ mRNA จะถูกจับและถูกย่อยทำลายไป จึงไม่มีหรือลดจำนวน mRNA ของ TLR-2 หรือ TLR-4 ที่จะถูกแปลรหัสไปเป็นโปรตีน ทำให้ไม่มีการสร้างโปรตีนของ TLR-2 หรือ TLR-4 ขึ้น หรือมีการสร้างที่ลดลงแต่ไม่ทั้งหมด ทั้งนี้ขึ้นกับประสิทธิภาพในการยับยั้งและความเป็นพิษ (toxicity) ของสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการด้วย ผลการศึกษาในส่วนนี้วิเคราะห์จากระดับการแสดงออกของ TNF- α โดยเทคนิค RT-PCR

รูปที่ 3A แสดงให้เห็นว่าเมื่อเซลล์ PDL ได้รับการกระตุ้นด้วย *Pg* หรือ *E. coli* LPS สามารถเพิ่มระดับการแสดงออกของ mRNA ของ TNF α ได้อย่างชัดเจน นอกจากนี้ การกระตุ้นด้วย LPS ทั้งสองชนิดยังมีผลเพิ่มการแสดงออกของ TLR2 ในขณะที่การกระตุ้นด้วย LPS ทั้งสองชนิดไม่มีผลเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของ TLR4 (lane 1-3) จากนั้นเมื่อเซลล์ได้รับ

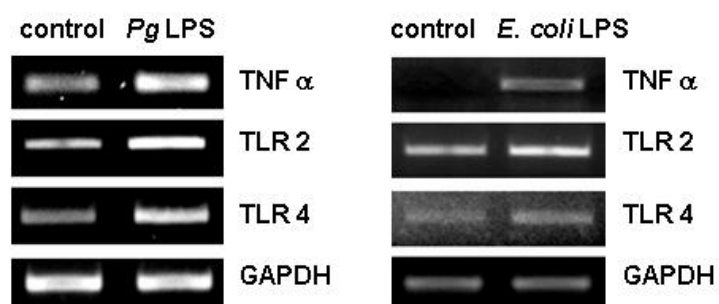
การกระตุ้นด้วย *Pg* หรือ *E. coli* LPS ในสภาวะที่มี siRNA ต่อ TLR2 และ TLR4 พบว่าระดับการแสดงออกของ mRNA ของ TNF α ลดลง (lane 5-6 และ lane 8-9 ตามลำดับ) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเพียง *Pg* LPS (lane 2) หรือ *E. coli* LPS (lane 3) เท่านั้น ทั้งนี้ประสิทธิภาพของ siRNA ต่อ TLR2 และ TLR4 ในเซลล์ PDL แสดงจากความสามารถในการลดระดับ mRNA ของ TLR2 (lane 4-6) และ TLR4 (lane 7-9) ได้อย่างชัดเจน แม้ว่าไม่สามารถลดระดับ mRNA ได้ทั้งหมดก็ตาม ผลการศึกษานี้ร่วมกับผลการศึกษาโดยใช้ TLR2 และ TLR4 blocking antibodies (รูปที่ 2 A) แสดงให้เห็นว่าทั้ง *Pg* และ *E. coli* LPS เพิ่มการแสดงออกของ TNF α ผ่านทาง TLR2 และ TLR4

รูปที่ 3B แสดงให้เห็นว่าในขณะที่เซลล์ GF ได้รับการกระตุ้นด้วย *Pg* LPS แล้วส่งผลให้มีการเพิ่มขึ้นของระดับการแสดงออกของ mRNA ของ TNF α นั้น (TNF α , lane 2) ส่งผ่านไปทั้งทาง TLR2 และ TLR4 เนื่องจากเมื่อได้รับ siRNA ต่อ TLR2 หรือ TLR4 ส่งผลต่อการลดลงของการแสดงออกของ TNF α อย่างชัดเจน (TNF α , lane 4 และ 6) รวมทั้งมีผลลด baseline expression ของ TNF α เมื่อได้รับแต่เพียง siRNA ต่อ TLR2 (TNF α , lane 3) หรือ TLR4 (TNF α , lane 5) นอกจากนี้ประสิทธิภาพในการลดระดับ mRNA ของ TLR2 (panel 2) และ TLR4 (panel 3) ลดลงอย่างชัดเจนเมื่อใช้ siRNA ของทั้ง TLR2 และ TLR4 ซึ่งทำอยู่ในการทดลองเดียวกัน ยืนยันผลที่ได้จากการใช้ siRNA ต่อ TLR2 และ TLR4 ในเซลล์ GF ผลการศึกษานี้ร่วมกับผลการศึกษาโดยใช้ TLR2 และ TLR4 blocking antibodies (รูปที่ 2 B) ให้ข้อสรุปว่า การกระตุ้นด้วย *Pg* LPS ในเซลล์ GF นำไปสู่การเพิ่มขึ้นของ TNF α โดยผ่านทาง TLR2 และ TLR4

A. PDL



B. GF



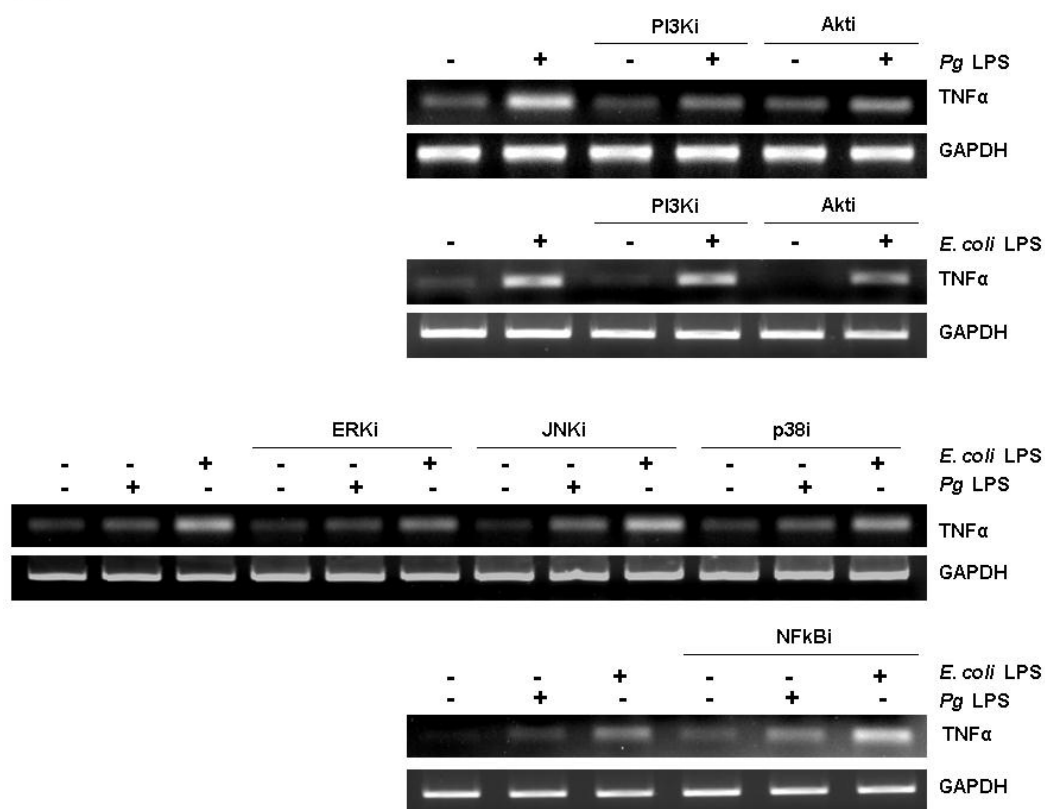
รูปที่ 4 แสดงระดับการแสดงออกของ mRNA ของ TNF α , TLR2 และ TLR4 ใน A. PDL และ B. GF เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย *Pg* และ *E. coli* LPS ที่ความเข้มข้น 10 ug/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ผลการศึกษายืนยันการเพิ่มการแสดงออกของ TNF α ในเซลล์ทั้ง 2 ชนิดเมื่อได้รับ *Pg* หรือ *E. coli* LPS อย่างชัดเจน และเป็นที่น่าสนใจว่าระดับการแสดงออกของ TLR2 ก็เพิ่มขึ้นด้วยในเซลล์ทั้ง 2 ชนิด ในขณะที่การแสดงออกของ TLR4 ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อได้รับ *Pg* หรือ *E. coli* LPS ในเซลล์ PDL แต่พบเพิ่มการแสดงออกเฉพาะในเซลล์ GF เมื่อได้รับ *Pg* หรือ *E. coli* LPS

3. การส่งถ่ายสัญญาณภายในเซลล์ PDL และ GF เพื่อเพิ่มการแสดงออกของ TNF- α เมื่อได้รับ *Pg* หรือ *E. coli* LPS

signaling molecules ชนิดต่างๆ ที่อยู่ในเส้นทางหลักของการถ่ายทอดสัญญาณภายในเซลล์และที่เคยมีรายงานในเซลล์ชนิดต่างๆ ว่าเกี่ยวข้องกับการส่งถ่ายสัญญาณภายในเซลล์เมื่อกระตุ้นด้วย LPS ถูกเลือกมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ โดยประกอบด้วยตัวยับยั้งการทำงาน (inhibitors) ของ MAPK pathway (ERK, JNK และ p38 kinase), PI3K, Akt และ NF- κ B

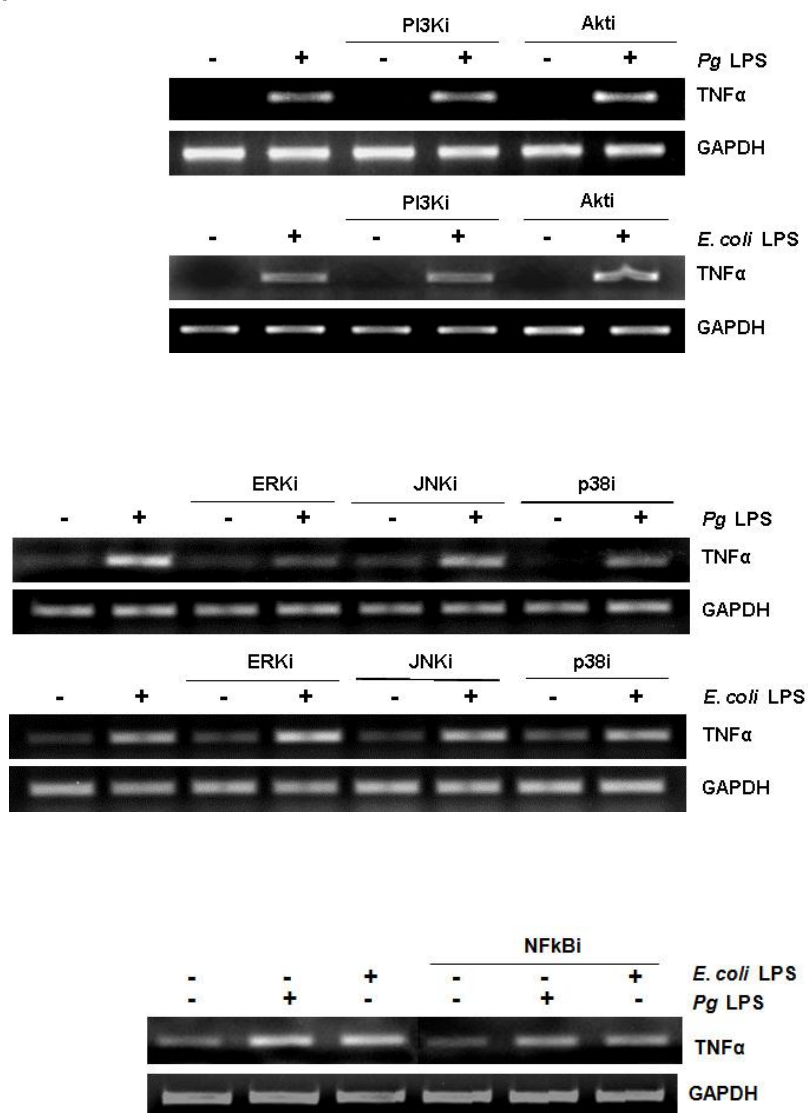
PDL



รูปที่ 5 แสดงระดับการแสดงออกของ mRNA ของ TNF α และ GAPDH ในเซลล์ PDL เมื่อได้รับตัวยับยั้งการทำงาน (inhibitors) ของ PI3K, Akt, ERK, JNK, p38 kinase, และ NF- κ B เป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อนที่จะกระตุ้นเซลล์ด้วย *Pg* หรือ *E. coli* LPS ที่ความเข้มข้น 10 ug/ml ต่ออีกเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ผลการทดลองพบว่าตัวยับยั้งการทำงานของ PI3K และ Akt สามารถลดระดับการแสดงออกของ TNF α เมื่อเซลล์ PDL ได้รับ *Pg* LPS ในขณะที่มีเพียงตัวยับยั้งการทำงานของ Akt และ ERK เท่านั้นที่ลดระดับการแสดงออกของ TNF α เมื่อเซลล์ PDL ได้รับ *E. coli* LPS

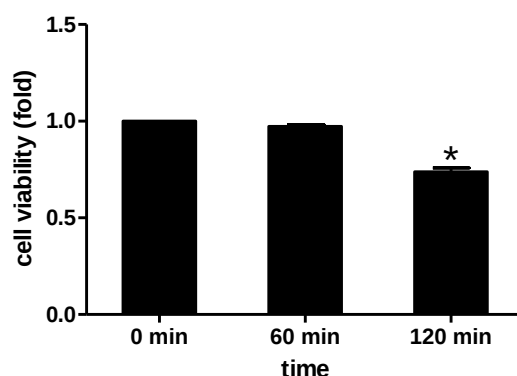
GF



รูปที่ 6 แสดงระดับการแสดงออกของ mRNA ของ TNF α และ GAPDH ในเซลล์ GF เมื่อได้รับตัวยับยั้งการทำงาน (inhibitors) ของ PI3K, Akt, ERK, JNK, p38 kinase, และ NF- κ B เป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อนที่จะกระตุ้นเซลล์ด้วย *Pg* หรือ *E. coli* LPS ที่ความเข้มข้น 10 μ g/ml ต่ออีกเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

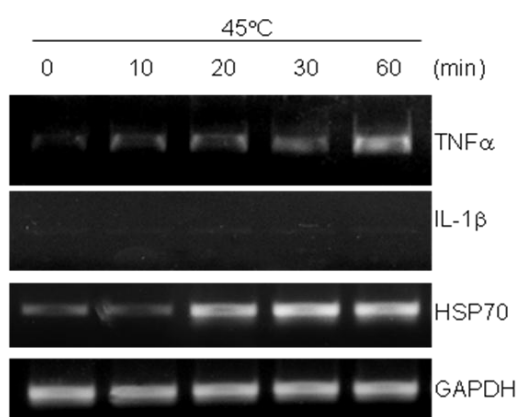
ผลการทดลองพบว่าตัวยับยั้งการทำงานของ ERK, p38 kinase และ NF- κ B สามารถลดระดับการแสดงออกของ TNF α เมื่อเซลล์ GF ได้รับ *Pg* LPS ในขณะที่มีเพียงตัวยับยั้งการทำงานของ NF- κ B เท่านั้นที่ลดระดับการแสดงออกของ TNF α เมื่อเซลล์ GF ได้รับ *E. coli* LPS

4. ผลของความร้อนต่อการแสดงออกของ TNF- α ในเซลล์ GF และเซลล์ PDL



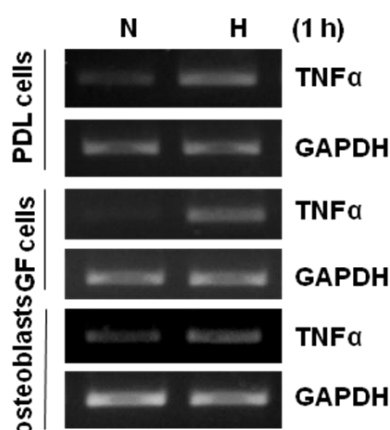
รูปที่ 7 แสดงผลของความร้อนต่อการมีชีวิตของเซลล์ PDL โดยนำเซลล์ไปเลี้ยงในตู้อบที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 60 นาที และ 120 นาที จากนั้นทำการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay

ข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า การกระตุ้นเซลล์ด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 60 นาที ไม่มีผลต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ในขณะที่ การกระตุ้นเซลล์ด้วยความร้อนเป็นเวลา 2 ชั่วโมง มีผลลดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต เหลือเพียง 72 % จากผลดังกล่าว คณะผู้วิจัยจึงวางแผนที่จะทดสอบผลของความร้อนต่อการแสดงออกของ TNF α ในช่วงระยะเวลาน้อยกว่า 1 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะเวลาที่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์



รูปที่ 8 แสดงระดับการแสดงออกของ mRNA ของ TNF α , IL-1 β และ HSP70 ในเซลล์ PDL เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 45°C เป็นระยะเวลาต่างๆ ดังแสดงในภาพ

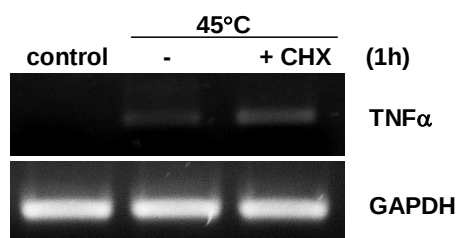
ข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเมื่อเซลล์ PDL ได้รับความร้อน เซลล์จะมีการตอบสนองโดยเพิ่มการแสดงออกของ TNF α mRNA ซึ่งการแสดงออกนี้จะค่อยๆ เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เซลล์ได้รับความร้อน ในขณะที่ระดับการแสดงออกของ IL-1 β mRNA นั้นแทบไม่มีการเปลี่ยนแปลง แสดงให้เห็นว่าการตอบสนองของเซลล์ต่อความร้อนนั้นค่อนข้างจำเพาะเจาะจงต่อ TNF α นอกจากนี้ยังพบว่าระดับการแสดงออกของ HSP70 mRNA นั้นสอดคล้องกับการแสดงออกของ TNF α mRNA คือ ค่อยๆ เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เซลล์ได้รับความร้อน ซึ่งการเพิ่มขึ้นของ HSP70 mRNA เป็นการยืนยันให้เห็นว่าในสภาวะที่ทำการทดลองนั้นเซลล์ได้รับความร้อนจริง



รูปที่ 9 แสดงระดับการแสดงออกของ mRNA ของ TNF α ในเซลล์ PDL เซลล์ GF และเซลล์สร้างกระดูก (osteoblasts) ของมนุษย์ เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

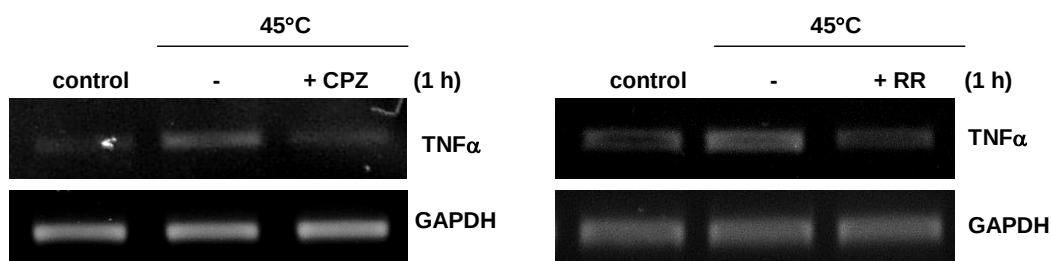
การศึกษาถึงผลของความร้อนในเซลล์ที่เป็นองค์ประกอบหลักของเนื้อเยื่อปริทันต์ พบว่าความร้อนสามารถเพิ่มการแสดงออกของ TNF α mRNA ได้ทั้งในเซลล์ PDL เซลล์ GF และเซลล์สร้างกระดูก (osteoblasts) ของมนุษย์

5. กลไกที่เกี่ยวข้องในการที่ความร้อนถ่ายทอดสัญญาณเพื่อควบคุมการแสดงออกของ TNF- α โดยใช้สารยับยั้งชนิดต่างๆ



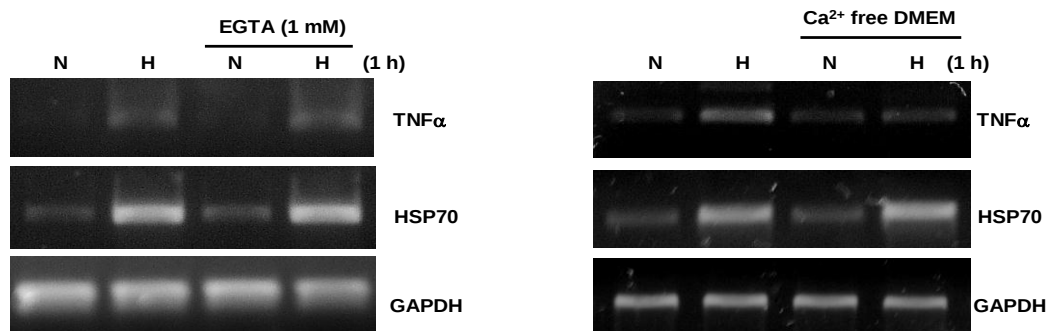
รูปที่ 10 แสดงระดับการแสดงออกของ mRNA ของ TNF α ในเซลล์ PDL เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 45°C ในสถานะที่มี cyclohexamide (CHX) 1 μ g/ml เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

ข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า cyclohexamide ซึ่งเป็นสารที่ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนภายในเซลล์ ไม่สามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของ mRNA ของ TNF α ในเซลล์ PDL หลังจากการกระตุ้นด้วยความร้อนได้ ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า การเพิ่มการแสดงออกของ TNF α นั้นไม่ได้เกิดจากการเพิ่มการสร้างโปรตีนในระหว่างที่เซลล์ได้รับความร้อน



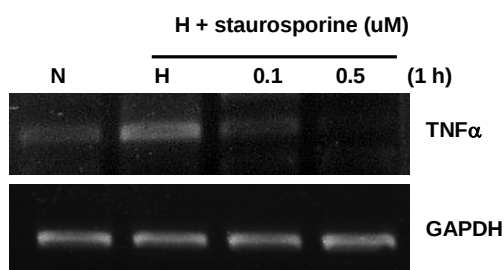
รูปที่ 11 แสดงระดับการแสดงออกของ mRNA ของ TNF α ในเซลล์ PDL เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 45°C ในสถานะที่มี capsazepine (CPZ) 10 μ M หรือ Ruthenium Red (RR) 10 μ M เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

ข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าทั้ง Capsazepine และ Ruthenium Red ซึ่งเป็นสารที่ยับยั้งการทำงานของ TRPV1 (TRPV1 antagonist) สามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของ mRNA ของ TNF α ในเซลล์ PDL หลังจากการกระตุ้นด้วยความร้อนได้ ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า TRPV1 น่าจะเป็น receptor ที่สำคัญในการรับความร้อนและส่งผ่านสัญญาณไปเพิ่มการสังเคราะห์ TNF α



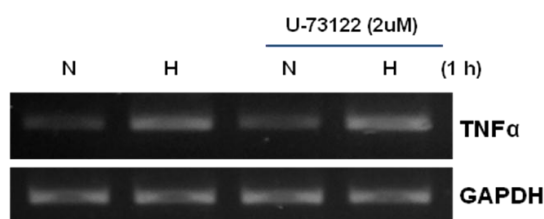
รูปที่ 12 แสดงระดับการแสดงออกของ mRNA ของ TNF α ในเซลล์ PDL เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 45°C ในสถานะที่มี EGTA 1 μ M หรือ ในสถานะที่ไม่มีแคลเซียมในอาหารเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

ข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า EGTA ซึ่งเป็น calcium chelator ไม่สามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของ mRNA ของ TNF α ในเซลล์ PDL หลังจากการกระตุ้นด้วยความร้อนได้ แต่การเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากแคลเซียมสามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของ mRNA ของ TNF α ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการเติม EGTA ที่ความเข้มข้น 1 mM ไม่มีเพียงพอในการจับกับแคลเซียมที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ แคลเซียมที่หลงเหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์จึงยังทำหน้าที่ส่งสัญญาณไปเพิ่มการสังเคราะห์ TNF α ได้ ดังนั้นการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากแคลเซียมจึงเห็นผลได้ดีกว่า กล่าวโดยสรุป ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า แคลเซียมน่าจะเป็น secondary messenger ที่สำคัญในการส่งผ่านสัญญาณไปเพิ่มการสังเคราะห์ TNF α



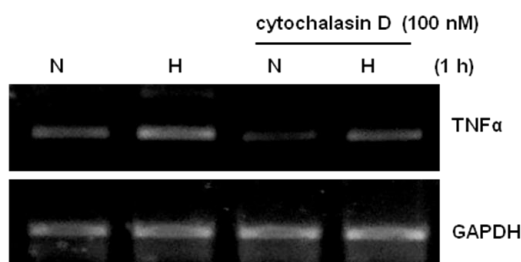
รูปที่ 13 แสดงระดับการแสดงออกของ mRNA ของ TNF α ในเซลล์ PDL เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 45°C ในสถานะที่มี staurosporine 0.1 μ M และ 0.5 μ M เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

ข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าทั้ง staurosporine ซึ่งเป็นสารที่ยับยั้งการทำงานของ Protein Kinase C (PKC) สามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของ mRNA ของ TNF α ในเซลล์ PDL หลังจากการกระตุ้นด้วยความร้อนได้ ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า PKC น่าจะเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการส่งผ่านสัญญาณไปเพิ่มการสังเคราะห์ TNF α



รูปที่ 14 แสดงระดับการแสดงออกของ mRNA ของ TNF α ในเซลล์ PDL เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 45°C ในสภาวะที่มี U-73122 (2 μ M) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

ข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า U-73122 ซึ่งเป็นสารที่ยับยั้งการทำงานของ Phospholipase C (PLC) ไม่สามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของ mRNA ของ TNF α ในเซลล์ PDL หลังจากการกระตุ้นด้วยความร้อนได้ ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มขึ้นของ TNF α ไม่ได้เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ PLC



รูปที่ 15 แสดงระดับการแสดงออกของ mRNA ของ TNF α ในเซลล์ PDL เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 45°C ในสภาวะที่มี cytochalasin D (100 nM) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

ข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า cytochalasin D ซึ่งเป็นสารที่ยับยั้ง actin polymerization สามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของ mRNA ของ TNF α ในเซลล์ PDL หลังจากการกระตุ้นด้วยความร้อนได้ ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการทำงานของ actin เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ TNF α โดยอาจเป็นไปได้ว่า ความร้อนนำไปสู่การ rearrangement ของ cytoskeleton ซึ่งทำให้เกิดการเปิดของ TRPV1 channel

วิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ต้องการศึกษาเปรียบเทียบผลของ LPS จาก *P. gingivalis* และ *E. coli* ที่มีต่อการแสดงออกของ TNF- α ซึ่งเป็น pro-inflammatory cytokine ที่สำคัญ ที่เมื่อหลั่งออกมาแล้วจะนำไปสู่การกระตุ้นหรือเหนี่ยวนำให้มีการหลั่ง inflammatory cytokines อื่นๆ ตามมาเป็นลำดับ นำไปสู่การอักเสบของเนื้อเยื่อในที่สุด การศึกษาส่วนใหญ่ที่ผ่านมาในระดับห้องปฏิบัติการ จะเลือกใช้ LPS ที่ได้จากเชื้อ *E. coli* เพราะเป็นแบคทีเรียที่มี well-conserved lipid A และจัดเป็น typical bacterial endotoxin เพื่อประโยชน์ในการอ้างอิงและเทียบเคียงผลการศึกษา อย่างไรก็ตาม เชื้อ *E. coli* ไม่ใช่เป็นเชื้อโรคที่ควรพบในช่องปาก อีกทั้งไม่ได้เป็นเชื้อโรคที่จัดเป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรคปริทันต์ ในขณะที่ *P. gingivalis* เป็นสาเหตุหลัก

ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า การกระตุ้นด้วย LPS จาก *P. gingivalis* และ *E. coli* ในเซลล์แต่ละชนิดที่ใช้ในการศึกษานี้ (เซลล์ PDL และ GF) ใช้กลไกที่แตกต่างกัน ดังนั้น LPS จากแบคทีเรียต่างชนิดกันก็อาจใช้กลไกที่แตกต่างกันออกไปในการกระตุ้นให้มีการสร้าง cytokine ชนิดเดียวกันได้

มีรายงานแสดงให้เห็นว่า LPS จากเชื้อ *P. gingivalis* มีประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบที่ต่ำกว่า LPS จาก *E. coli* (Martin et al., 2001; Ogawa and Uchida, 1996) ซึ่งประสิทธิภาพของ LPS ที่แตกต่างกันในการเหนี่ยวนำการตอบสนองของเซลล์นั้น อาจเนื่องมาจากสายพันธุ์ (strain) ที่แตกต่างกันของแบคทีเรียชนิดนั้นๆ วิธีการสกัดและเตรียม ตลอดจนรูปแบบของการทดสอบในแต่ละงานวิจัย นอกเหนือจากนั้นในการศึกษานี้พบว่า เนื่องจากเซลล์ที่ใช้เป็น primary culture ทำให้มีความแตกต่างระหว่างเซลล์ที่ได้มาแต่ละ line (จากแต่ละคน) อันเนื่องมาจากความแตกต่างระหว่างบุคคลในระดับปกติที่พบได้ ก็เป็นอีกปัจจัยที่มีผลต่อความแตกต่างของระดับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ TNF- α เมื่อได้รับ LPS แต่ละชนิดด้วย เมื่อเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มที่ได้รับ LPS (รูปที่ 1-6) ซึ่งมีรายงานที่แสดงให้เห็นว่า ความแตกต่างระหว่างบุคคลนี้มีผลต่อโอกาสในการเกิดโรคปริทันต์ในแต่ละบุคคล (Scheres et al., 2010) ดังนั้นการวิจัยนี้ในแต่ละการทดสอบจะเน้นที่การทำซ้ำในส่วนของจำนวน line ที่ได้มาของเซลล์ตัวอย่างจนมั่นใจกับผลที่เกิดขึ้น ด้วยเหตุนี้การศึกษานี้จึงไม่นำเสนอเชิงเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่าง LPS ทั้งสองชนิด

นอกจากนี้ในงานวิจัยนี้ต้องการเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเหงือกและไฟโบรบลาสต์จากเอ็นยึดปริทันต์ ซึ่งจัดเป็นเซลล์เนื้อเยื่อปริทันต์เหมือนกัน แต่มีรายงานวิจัยหลายชิ้นที่แสดงให้เห็นว่าเซลล์ทั้งสองชนิดนี้มีพฤติกรรมและการตอบสนองต่อปัจจัยต่างๆ ในรูปแบบที่ต่างกัน จากการศึกษานี้พบว่า เมื่อ เซลล์ PDL และ GF ได้รับการกระตุ้นจาก LPS ชนิดเดียวกัน (*P. gingivalis* หรือ *E. coli* LPS) พบว่าเซลล์ PDL และ GF ใช้

กลไกการถ่ายทอดสัญญาณภายในเซลล์ที่แตกต่างกัน แม้ว่าจะสามารถเลือกกระตุ้นผ่าน receptor TLR-2 หรือ TLR-4 เพียงตัวใดตัวหนึ่งได้ก็ตาม

จากการศึกษาบทบาทของ TLR-2 และ TLR-4 เมื่อกระตุ้นเซลล์ PDL และ GF ด้วย LPS จาก *P. gingivalis* และ *E. coli* ผลข้างต้นสรุปได้ว่าการตอบสนองของเซลล์ทั้ง 2 ชนิด นั้นอาศัย เพียง TLR2 และ TLR4 ชนิดใดชนิดหนึ่งก็ได้ นอกจากนี้พบว่า *Pg* และ *E. coli* LPS มีผลเพิ่มการแสดงออกของ TLR2 ในเซลล์ทั้ง 2 ชนิด แต่มีผลเพิ่มการแสดงออกของ TLR4 เฉพาะในเซลล์ GF เท่านั้น อย่างไรก็ตามการศึกษารังนี้ไม่ได้วิเคราะห์สัดส่วนการใช้ receptor ดังกล่าวของเซลล์แต่ละชนิด นอกจากนี้ผลการศึกษาจากการใช้ siRNA ยังบ่งชี้ว่าในกระบวนการตอบสนอง *Pg* หรือ *E. coli* LPS ของเซลล์ PDL และ GF จำเป็นต้องอาศัยการสังเคราะห์ โปรตีน TLR2 และ TLR4 ใหม่ เพราะเมื่อยับยั้งการสร้างโปรตีนของ receptor ตัวใดตัวหนึ่งแล้ว มีผลลดการแสดงออกของ TNF α จากภาวะที่ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS อย่างเดียว แต่ไม่สามารถลดลงสู่ระดับ baseline ได้ แสดงว่าเซลล์สามารถเลือกใช้ TLR2 หรือ TLR4 ได้เมื่อไม่มีตัวใดตัวหนึ่ง

การศึกษาเกี่ยวกับเส้นทางหลักของการถ่ายทอดสัญญาณภายในเซลล์พบว่า เซลล์รับรู้ต่อ LPS ของแบคทีเรียส่วนใหญ่รวมทั้ง *E. coli* ผ่านทาง TLR-4 และสัญญาณที่ผ่านเข้าสู่เซลล์ ผ่านไปทาง NF-kB และบางรายงานพบว่าผ่านไปทาง p38 kinase ด้วย (Hirschfeld et al., 2001; Martin et al., 2001) อย่างไรก็ตามมีรายงานที่พบว่า LPS เหนียวนำเซลล์ microglia ให้หลั่ง TNF- α ผ่านทาง JNK และ p38 kinase โดยไม่ผ่าน NF-kB (Uesugi et al., 2006) และพบว่าใน human monocytic cell line (THP-1) นั้น LPS ของ *P. gingivalis* เหนียวนำการหลั่ง TNF- α ผ่านทาง TLR-2 และ JNK (Zhang et al., 2008)

ในการศึกษารังนี้พบว่าเมื่อเปรียบเทียบในเซลล์ชนิดเดียวกัน เมื่อเซลล์ PDL ได้รับ *Pg* LPS จะส่งสัญญาณผ่านไปทาง PI3K และ Akt ในขณะที่เมื่อได้รับ *E. coli* LPS จะส่งสัญญาณผ่านไปทาง Akt และ ERK ในการกระตุ้นการสร้าง TNF- α เป็นที่น่าสนใจว่า โดยปกติแล้ว intracellular domain ของ TLR2 จะส่งสัญญาณผ่านไปทาง PI3K และ Akt นอกจากนี้ยังแยกผ่านไปทาง MyD88 แล้วแยกไปทาง MAPK หรือ NF-kB อีกสองเส้นทางหลัก ในขณะที่ TLR4 จะผ่านไปทาง ไปทาง MyD88 แล้วแยกไปทาง MAPK หรือ NF-kB เช่นกัน หรือผ่านไปกับ IRAK2 แล้วไปทาง NF-kB ดังนั้น การลดการแสดงออกของ TNF- α ได้อย่างชัดเจนด้วยตัวยับยั้งการทำงานของ PI3K และ Akt น่าจะแสดงให้เห็นว่า เซลล์ PDL ใช้ TLR2 เป็นหลักในการรับรู้ LPS ทั้งสองชนิด

ส่วนในเซลล์ GF นั้นเมื่อได้รับ *Pg* LPS จะส่งสัญญาณผ่านไปทาง ERK, p38 kinase และ NF-kB ในขณะที่เมื่อได้รับ *E. coli* LPS จะผ่านไปทาง NF-kB เท่านั้น จากข้อมูลใน

ขณะนี้ยังไม่เพียงพอที่จะบอกได้ว่าเซลล์ GF รับรู้ LPS แต่ชนิดส่วนใหญ่แล้วผ่านไปทาง TLR2 หรือ TLR4 เพราะเส้นทางที่ผ่าน MAPK หรือ NF- κ B เป็นเส้นทางร่วมของ receptor ทั้งสองนี้ จะเห็นได้ว่ามีความแตกต่างของเส้นทางการถ่ายทอดสัญญาณที่มีความจำเพาะต่อการกระตุ้นโดย LPS ทั้งสองชนิด และแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มการสร้าง TNF- α ในเซลล์ PDL และ เซลล์ GF เกิดจากเส้นทางการส่งถ่ายสัญญาณที่แตกต่างกัน

อีกประเด็นหนึ่งที่พบคือเมื่อทำการวิเคราะห์ผลการแสดงออกของ TNF α ในระดับโปรตีนด้วยเทคนิค ELISA พบว่ามีระดับการแสดงออกที่ต่ำมาก และความแตกต่างที่ได้ระหว่างกลุ่มมีน้อย แม้ว่าการแสดงออกในระดับ mRNA จะเห็นชัดเจนก็ตาม ทำให้ไม่ได้แสดงผลในการทดลองช่วงหลังๆ ทั้งนี้มีรายงานว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเอ็นไคปริทันต์ ที่ได้จากคนที่ไม่เป็นโรคปริทันต์ จะตอบสนองต่อการได้รับ Pg LPS แล้วเพิ่มระดับการแสดงออกของ TNF α ไม่ชัดเจนเท่ากับเซลล์ที่ได้จากคนที่เป็โรคปริทันต์ (Scheres N et al, 2011) นอกจากนี้ในภาวะปกติเซลล์ PDL และ GF มิใช่เซลล์หลักที่ทำหน้าที่ตอบสนองในกระบวนการอักเสบ

ความร้อนจัดเป็นปัจจัยทางกายภาพชนิดหนึ่งที่มักเกิดขึ้นในช่องปากอันเนื่องจากพฤติกรรมต่างๆ เช่น การรับประทานอาหารและเครื่องดื่มที่มีอุณหภูมิสูง ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยตั้งสมมติฐานว่าความร้อนที่เกิดขึ้นในช่องปากเกี่ยวข้องกับการอักเสบหรือไม่ โดยทำการศึกษาดังต่อไปนี้ถึงบทบาทของความร้อนต่อการแสดงออกของไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบในเซลล์จากเอ็นไคปริทันต์ที่อุณหภูมิ 45 °C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่รับรู้ความร้อนในระดับที่ก่อให้เกิดความเจ็บปวด (Julius and Basbaum 2001), และพบว่าการกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเอ็นไคปริทันต์ด้วยความร้อนส่งผลเพิ่มการแสดงออกของ TNF α ในระดับ mRNA ได้อย่างชัดเจน โดยผลดังกล่าวมิได้พบในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเอ็นไคปริทันต์เท่านั้น แต่ยังพบในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเหงือก และเซลล์สร้างกระดูกอีกด้วย จึงอาจกล่าวได้ว่าการตอบสนองเซลล์ในช่องปากตอบสนองต่อความร้อนคล้ายๆ กันโดยเพิ่มการสร้าง TNF α ในระดับ mRNA อย่างไรก็ตาม เมื่อทำการศึกษาดังกล่าวถึงผลของความร้อนต่อการแสดงออกของ TNF α ในระดับโปรตีนโดยวิธี ELISA assay (ไม่ได้แสดงผล) พบว่า เซลล์เหล่านี้มีการแสดงออกของโปรตีน TNF α น้อยมาก และระดับการแสดงออกของโปรตีน TNF α มิได้เพิ่มขึ้นภายหลังการกระตุ้นเซลล์ด้วยความร้อน ซึ่งขัดแย้งกับผลที่พบในระดับ mRNA ข้อมูลเหล่านี้อาจตีความได้ว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเอ็นไคปริทันต์ เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเหงือก และเซลล์สร้างกระดูกเซลล์มิใช่เซลล์หลักที่ทำหน้าที่สังเคราะห์ TNF α ผลดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาของ Keller และคณะ ซึ่งทำการตรวจหาระดับของ TNF α ภายหลังการกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเนื้อเยื่อในฟัน (dental pulp fibroblasts) และ เซลล์สร้างกระดูก ด้วย lipoteichoic acid (LTA) และพบการเพิ่มขึ้นของ TNF α อย่างมากในระดับ mRNA แต่ไม่สามารถตรวจพบ TNF α ในระดับ

โปรตีนได้ ในขณะที่ LTA สามารถกระตุ้น dendritic cells ให้มีการหลั่งโปรตีน TNF α เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (Keller, Carrouel et al. 2010) ซึ่งการที่ไม่สามารถตรวจพบโปรตีน TNF α ในเซลล์ไฟโบร بلاสต์จากช่องปาก รวมถึงเซลล์สร้างกระดูกได้นั้น อาจเกิดจากกระบวนการ post-transcriptional modification ที่ขัดขวางการสร้างโปรตีน TNF α ในเซลล์เหล่านี้

การศึกษาเพิ่มเติมถึงกลไกการตอบสนองของเซลล์ไฟโบร بلاสต์จากเอ็นดอปริทันต์ในการเพิ่มการสังเคราะห์ TNF α ในระดับ mRNA ภายหลังจากการถูกกระตุ้นด้วยความร้อน พบว่าการตอบสนองดังกล่าวเกิดขึ้นผ่านการทำงานของ TRPV1 ซึ่งเป็น ion channel receptor ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการรับรู้ความเจ็บปวดและจะถูกกระตุ้นเมื่ออุณหภูมิสูงเกิน 43 °C (Caterina, Schumacher et al. 1997; Tominaga, Caterina et al. 1998) จากการศึกษาก่อนหน้านี้ คณะผู้วิจัยพบว่า TRPV1 มีได้พบในเซลล์ประสาทเท่านั้น แต่ยังพบในเซลล์ไฟโบร بلاสต์จากเนื้อเยื่อปริทันต์ด้วย ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้ศึกษาถึงบทบาทของ TRPV1 ต่อการแสดงออกของ TNF α โดยใช้สารยับยั้งการทำงานของ TRPV1 2 ชนิดคือ Capsazepine และ Ruthenium red และพบว่าสารทั้งสองสามารถยับยั้งผลของความร้อนในการเหนี่ยวนำการแสดงออกของ TNF α ในระดับ mRNA ได้ อย่างไรก็ตามสารดังกล่าวไม่สามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของ HSP70 ภายหลังจากการถูกกระตุ้นด้วยความร้อนได้ จึงอาจเป็นไปได้ว่า การเพิ่มขึ้นของ HSP70 เกิดขึ้นผ่านกลไกอื่นที่มีได้เกี่ยวข้องกับ TRPV1

นอกจากนี้ การศึกษาครั้งนี้ยังแสดงให้เห็นว่า การส่งถ่ายสัญญาณของ TRPV1 ไปควบคุมการเพิ่มขึ้นของ TNF α นั้นจำเป็นต้องอาศัยแคลเซียมไอออน ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการทำงานของ TRPV1 ซึ่งเป็น non-selective cation channel receptor ที่ยอมให้แคลเซียมไอออนผ่านเข้าเซลล์ได้มากกว่าประจุบวกชนิดอื่น (Caterina, Schumacher et al. 1997) จึงอาจเป็นไปได้ว่าความร้อนทำให้เกิดการเปิดของ TRPV1 channel และมีการไหลของแคลเซียมเข้าสู่เซลล์ โดยแคลเซียมน่าจะทำหน้าที่เป็น secondary messenger ในการถ่ายทอดสัญญาณไปเพิ่มการสังเคราะห์ TNF α และจากการทำการทดลองโดยใช้ staurosporine ซึ่งเป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ PKC พบว่า การเพิ่มขึ้นของ TNF α จำเป็นต้องอาศัย PKC เช่นกัน การค้นพบดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาที่พบว่าการทำงานของ TRPV1 ถูกควบคุมด้วยเอนไซม์หลายชนิด โดย PKC สามารถควบคุมการทำงานของ TRPV1 ได้โดยการเติมหมู่ phosphate ที่ตำแหน่ง S502 และ S800 ส่งผลให้ TRPV1 ทำงานได้ดีขึ้น (Mandadi, Tominaga et al. 2006) โดยการทำงานของ PKC น่าจะถูกกระตุ้นผ่านแคลเซียมไอออนที่ไหลเข้าเซลล์ภายหลังจากที่เซลล์ได้รับความร้อน

ในปัจจุบัน กลไกในการรับรู้ความร้อนในระดับเซลล์นั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด มีรายงานว่า C-terminal domain ของ TRPV1 น่าจะเป็นตำแหน่งที่รับรู้ความร้อนเนื่องจากเมื่อทำ sequential deletion ในตำแหน่ง distal half C-terminal จะทำให้ temperature threshold ลดลง (Kedei, Szabo et al. 2001) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์

ระหว่างความร้อนและการทำงานของ cytoskeleton โดยพบว่าในสภาวะที่มีความร้อนนั้น จะเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ และเกิด polymerization ของ actin (Han, Ha et al. 2000) และมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเพิ่มการผ่านเข้าออกของสารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์อีกด้วย (Moseley, Gapen et al. 1994) ในการศึกษาครั้งนี้ ความสัมพันธ์ระหว่างความร้อนและ cytoskeleton ได้ถูกยืนยันโดยทำการเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่มี Cytochalasin D ซึ่งเป็นสารที่ทำหน้าที่ยับยั้งการ polymerization ของ actin พบว่า ในสภาวะดังกล่าว ความร้อนไม่สามารถเหนี่ยวนำการเพิ่มขึ้นของ TNF α mRNA ได้ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า ความร้อนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเยื่อหุ้มเซลล์โดยอาศัยการทำงานของ actin และส่งผลต่อการตอบสนองของเซลล์ต่อความร้อน

กล่าวโดยสรุป การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าความร้อนสามารถเพิ่มการแสดงออกของ TNF α ในระดับ mRNA ได้โดยอาศัยการทำงานของ TRPV1 นอกจากนี้ยังพบว่า แคลเซียม PKC และ actin เกี่ยวข้องในการส่งถ่ายสัญญาณในการควบคุมการแสดงออกของ TNF α ในสภาวะที่มีความร้อน

สรุป

เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์มีกลไกการตอบสนองต่อ LPS จาก *P. gingivalis* และ *E. coli* ในการเพิ่มการแสดงออกของ TNF α ต่างกัน ดังนั้นเพื่อให้เกิดความเข้าใจที่ชัดเจนถึงบทบาทของ LPS ในการเกิดและการดำเนินไปของโรคปริทันต์ ควรมีการศึกษาให้มากขึ้นโดยเน้นไปที่ LPS จาก *P. gingivalis* ซึ่งการศึกษาในลำดับต่อไป เป็นที่น่าสนใจที่จะเปรียบเทียบการตอบสนองของเซลล์ที่ได้จากคนปกติกับผู้ที่เป็โรคปริทันต์ เมื่อได้รับ *P. gingivalis* LPS ทั้งนี้โดยมีข้อสังเกตจากการที่การเปลี่ยนแปลงในระดับโปรตีนของ TNF α ที่ปรากฏในการศึกษาครั้งนี้ไม่ชัดเจน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเซลล์ที่ใช้ทดสอบเป็นเซลล์ที่ได้จากคนปกติ การส่วนการตอบสนองของเซลล์ต่อความร้อนในการเพิ่มการแสดงออกของ TNF α โดยรับรู้ผ่าน TRPV1 แสดงให้เห็นว่าความร้อนน่าจะมีบทบาทในกลไกการเกิด inflammation ในโรคปริทันต์ และเป็นที่น่าสนใจว่าการแสดงออกของ pro-inflammatory cytokines อื่น เช่น interleukin-1 และ interleukin-6 สามารถถูกควบคุมได้ด้วยปัจจัยของอุณหภูมิหรือไม่ เป็นสิ่งที่น่าสนใจที่จะศึกษาต่อไป

บรรณานุกรม

- Aderem, A., and Ulevitch, R.J. (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406, 782-787.
- Aida, Y., Kusumoto, K., Nakatomi, K., Takada, H., Pabst, M.J., and Maeda, K. (1995). An analogue of lipid A and LPS from *Rhodobacter sphaeroides* inhibits neutrophil responses to LPS by blocking receptor recognition of LPS and by depleting LPS-binding protein in plasma. *J Leukoc Biol* 58, 675-682.
- Asea, A., Kraeft, S.K., Kurt-Jones, E.A., Stevenson, M.A., Chen, L.B., Finberg, R.W., Koo, G.C., and Calderwood, S.K. (2000). HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med* 6, 435-442.
- Bascones, A., Noronha, S., Gomez, M., Mota, P., Gonzalez Moles, M.A., and Villarroel Dorrego, M. (2005). Tissue destruction in periodontitis: bacteria or cytokines fault? *Quintessence Int* 36, 299-306.
- Bradley, J.R. (2008). TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol* 214, 149-160.
- Carswell, E.A., Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N., and Williamson, B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 3666-3670.
- Caterina, M.J., Leffler, A., Malmberg, A.B., Martin, W.J., Trafton, J., Petersen-Zeit, K.R., Koltzenburg, M., Basbaum, A.I., and Julius, D. (2000). Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288, 306-313.
- Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., and Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389, 816-824.
- Cesare, P., and McNaughton, P. (1996). A novel heat-activated current in nociceptive neurons and its sensitization by bradykinin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 15435-15439.
- Chuang, H.H., Prescott, E.D., Kong, H., Shields, S., Jordt, S.E., Basbaum, A.I., Chao, M.V., and Julius, D. (2001). Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P₂-mediated inhibition. *Nature* 411, 957-962.
- Clapham, D.E. (2003). TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426, 517-524.
- Coats, S.R., Reife, R.A., Bainbridge, B.W., Pham, T.T., and Darveau, R.P. (2003). *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide antagonizes *Escherichia coli*

- lipopolysaccharide at toll-like receptor 4 in human endothelial cells. *Infect Immun* 71, 6799-6807.
- Craig, E.A., Gambill, B.D., and Nelson, R.J. (1993). Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis. *Microbiol Rev* 57, 402-414.
- Cunningham, M.D., Bajorath, J., Somerville, J.E., and Darveau, R.P. (1999). *Escherichia coli* and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide interactions with CD14: implications for myeloid and nonmyeloid cell activation. *Clin Infect Dis* 28, 497-504.
- Darveau, R.P., Pham, T.T., Lemley, K., Reife, R.A., Bainbridge, B.W., Coats, S.R., Howald, W.N., Way, S.S., and Hajjar, A.M. (2004). *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide contains multiple lipid A species that functionally interact with both toll-like receptors 2 and 4. *Infect Immun* 72, 5041-5051.
- Delima, A.J., Oates, T., Assuma, R., Schwartz, Z., Cochran, D., Amar, S., and Graves, D.T. (2001). Soluble antagonists to interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor (TNF) inhibits loss of tissue attachment in experimental periodontitis. *J Clin Periodontol* 28, 233-240.
- Erdos, G., Lee, Y.J., Cho, J.M., and Corry, P.M. (1995). Heat-induced bFGF gene expression in the absence of heat shock element correlates with enhanced AP-1 binding activity. *J Cell Physiol* 164, 404-413.
- Ettehadi, P., Greaves, M.W., Wallach, D., Aderka, D., and Camp, R.D. (1994). Elevated tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) biological activity in psoriatic skin lesions. *Clin Exp Immunol* 96, 146-151.
- Goukassian, D.A., Qin, G., Dolan, C., Murayama, T., Silver, M., Curry, C., Eaton, E., Luedemann, C., Ma, H., Asahara, T., *et al.* (2007). Tumor necrosis factor-alpha receptor p75 is required in ischemia-induced neovascularization. *Circulation* 115, 752-762.
- Graves, D.T., and Cochran, D. (2003). The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 74, 391-401.
- Graves, D.T., Delima, A.J., Assuma, R., Amar, S., Oates, T., and Cochran, D. (1998). Interleukin-1 and tumor necrosis factor antagonists inhibit the progression of inflammatory cell infiltration toward alveolar bone in experimental periodontitis. *J Periodontol* 69, 1419-1425.

- Graves, D.T., Oskoui, M., Volejnikova, S., Naguib, G., Cai, S., Desta, T., Kakouras, A., and Jiang, Y. (2001). Tumor necrosis factor modulates fibroblast apoptosis, PMN recruitment, and osteoclast formation in response to *P. gingivalis* infection. *J Dent Res* 80, 1875-1879.
- Han, S. I., Ha, K.S., Kang, K.I., Kim, H.D., Kang, H.S. (2000). Heat shock-induced actin polymerization, SAPK/JNK activation, and heat-shock protein expression are mediated by genistein-sensitive tyrosine kinase(s) in K562 cells. *Cell Biol Int* 24, 447-457.
- Hashimoto, M., Asai, Y., and Ogawa, T. (2004). Separation and structural analysis of lipoprotein in a lipopolysaccharide preparation from *Porphyromonas gingivalis*. *Int Immunol* 16, 1431-1437.
- Helliwell, R.J., McLatchie, L.M., Clarke, M., Winter, J., Bevan, S., and McIntyre, P. (1998). Capsaicin sensitivity is associated with the expression of the vanilloid (capsaicin) receptor (VR1) mRNA in adult rat sensory ganglia. *Neurosci Lett* 250, 177-180.
- Hirschfeld, M., Ma, Y., Weis, J.H., Vogel, S.N., and Weis, J.J. (2000). Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine toll-like receptor 2. *J Immunol* 165, 618-622.
- Hirschfeld, M., Weis, J.J., Toshchakov, V., Salkowski, C.A., Cody, M.J., Ward, D.C., Qureshi, N., Michalek, S.M., and Vogel, S.N. (2001). Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infect Immun* 69, 1477-1482.
- Holt, S.C., Kesavalu, L., Walker, S., and Genco, C.A. (1999). Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol* 2000 20, 168-238.
- Huang, J., Zhang, X., and McNaughton, P.A. (2006). Modulation of temperature-sensitive TRP channels. *Semin Cell Dev Biol* 17, 638-645.
- Irwin, C.R., Picardo, M., Ellis, I., Sloan, P., Grey, A., McGurk, M., and Schor, S.L. (1994). Inter- and intra-site heterogeneity in the expression of fetal-like phenotypic characteristics by gingival fibroblasts: potential significance for wound healing. *J Cell Sci* 107 (Pt 5), 1333-1346.
- Jordt, S.E., Tominaga, M., and Julius, D. (2000). Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 8134-8139.
- Julius, D. and Basbaum, A.I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413, 203-210.

- Kato, S., Aihara, E., Nakamura, A., Xin, H., Matsui, H., Kohama, K., and Takeuchi, K. (2003). Expression of vanilloid receptors in rat gastric epithelial cells: role in cellular protection. *Biochem Pharmacol* 66, 1115-1121.
- Kedei, N., Szabo, T., Lile, J.D., Treanor, J.J., Olah, Z., Iadarola, M.J., and Blumberg, P.M. (2001). Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1. *J Biol Chem* 276, 28613-28619.
- Keller, J. F., Carrouel, F., Colomb, E., Durand, S.H., Baudouin, C., Msika, P., Bleicher, F., Vincent, C., Staquet, M.J., Farges, J.C. (2010). Toll-like receptor 2 activation by lipoteichoic acid induces differential production of pro-inflammatory cytokines in human odontoblasts, dental pulp fibroblasts and immature dendritic cells. *Immunobiology* 215, 53-59.
- Kent, L.W., Rahemtulla, F., Hockett, R.D., Jr., Gilleland, R.C., and Michalek, S.M. (1998). Effect of lipopolysaccharide and inflammatory cytokines on interleukin-6 production by healthy human gingival fibroblasts. *Infect Immun* 66, 608-614.
- Kitchens, R.L., and Munford, R.S. (1995). Enzymatically deacylated lipopolysaccharide (LPS) can antagonize LPS at multiple sites in the LPS recognition pathway. *J Biol Chem* 270, 9904-9910.
- Kumada, H., Haishima, Y., Umemoto, T., and Tanamoto, K. (1995). Structural study on the free lipid A isolated from lipopolysaccharide of *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol* 177, 2098-2106.
- Kurtis, B., Tuter, G., Serdar, M., Akdemir, P., Uygur, C., Firatli, E., and Bal, B. (2005). Gingival crevicular fluid levels of monocyte chemoattractant protein-1 and tumor necrosis factor-alpha in patients with chronic and aggressive periodontitis. *J Periodontol* 76, 1849-1855.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86, 973-983.
- Li, W.H., Lee, Y.M., Kim, J.Y., Kang, S., Kim, S., Kim, K.H., Park, C.H., and Chung, J.H. (2007). Transient receptor potential vanilloid-1 mediates heat-shock-induced matrix metalloproteinase-1 expression in human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 127, 2328-2335.

- Lien, E., Means, T.K., Heine, H., Yoshimura, A., Kusumoto, S., Fukase, K., Fenton, M.J., Oikawa, M., Qureshi, N., Monks, B., *et al.* (2000). Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. *J Clin Invest* 105, 497-504.
- Mandadi, S., Tominaga, T., Numazaki, M., Murayama, N., Saito, N., Armati, P.J., Roufogalis, B.D., and Tominaga, M. (2006). Increased sensitivity of desensitized TRPV1 by PMA occurs through PKCepsilon-mediated phosphorylation at S800. *Pain* 123, 106-116.
- Martin, M., Katz, J., Vogel, S.N., and Michalek, S.M. (2001). Differential induction of endotoxin tolerance by lipopolysaccharides derived from *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli*. *J Immunol* 167, 5278-5285.
- Mohapatra, D.P., and Nau, C. (2005). Regulation of Ca²⁺-dependent desensitization in the vanilloid receptor TRPV1 by calcineurin and cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 280, 13424-13432.
- Morenilla-Palao, C., Planells-Cases, R., Garcia-Sanz, N., and Ferrer-Montiel, A. (2004). Regulated exocytosis contributes to protein kinase C potentiation of vanilloid receptor activity. *J Biol Chem* 279, 25665-25672.
- Mori, Y., Yoshimura, A., Ukai, T., Lien, E., Espevik, T., and Hara, Y. (2003). Immunohistochemical localization of Toll-like receptors 2 and 4 in gingival tissue from patients with periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 18, 54-58.
- Morimoto, R.I. (1998). Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev* 12, 3788-3796.
- Morita, Y., Yamamura, M., Kawashima, M., Aita, T., Harada, S., Okamoto, H., Inoue, H., and Makino, H. (2001). Differential in vitro effects of IL-4, IL-10, and IL-13 on proinflammatory cytokine production and fibroblast proliferation in rheumatoid synovium. *Rheumatol Int* 20, 49-54.
- Mortaz, E., Redegeld, F.A., Nijkamp, F.P., Wong, H.R., and Engels, F. (2006). Acetylsalicylic acid-induced release of HSP70 from mast cells results in cell activation through TLR pathway. *Exp Hematol* 34, 8-18.
- Moseley, P. L., Gapen, C., Wallen, E.S., Walter, M.E., Peterson, M.W. (1994). Thermal stress induces epithelial permeability. *Am J Physiol* 267, C425-434.

- Ogawa, T., and Uchida, H. (1996). Differential induction of IL-1 beta and IL-6 production by the nontoxic lipid A from *Porphyromonas gingivalis* in comparison with synthetic *Escherichia coli* lipid A in human peripheral blood mononuclear cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 14, 1-13.
- Okada, H., and Murakami, S. (1998). Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 9, 248-266.
- Ozinsky, A., Underhill, D.M., Fontenot, J.D., Hajjar, A.M., Smith, K.D., Wilson, C.B., Schroeder, L., and Adereem, A. (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13766-13771.
- Peschon, J.J., Torrance, D.S., Stocking, K.L., Glaccum, M.B., Otten, C., Willis, C.R., Charrier, K., Morrissey, P.J., Ware, C.B., and Mohler, K.M. (1998). TNF receptor-deficient mice reveal divergent roles for p55 and p75 in several models of inflammation. *J Immunol* 160, 943-952.
- Pezelj-Ribaric, S., Magasic, K., Prpic, J., Miletic, I., and Karlovic, Z. (2007). Tumor necrosis factor-alpha in peripical tissue exudates of teeth with apical periodontitis. *Mediators Inflamm* 2007, 69416.
- Pihlstrom, B.L., Michalowicz, B.S., and Johnson, N.W. (2005). Periodontal diseases. *Lancet* 366, 1809-1820.
- Pirkkala, L., Nykanen, P., and Sistonen, L. (2001). Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *FASEB J* 15, 1118-1131.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., *et al.* (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science* 282, 2085-2088.
- Poltorak, A., Ricciardi-Castagnoli, P., Citterio, S., and Beutler, B. (2000). Physical contact between lipopolysaccharide and toll-like receptor 4 revealed by genetic complementation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2163-2167.
- Robak, T., Gladalska, A., and Stepień, H. (1998). The tumour necrosis factor family of receptors/ligands in the serum of patients with rheumatoid arthritis. *Eur Cytokine Netw* 9, 145-154.
- Scheres, N., Laine, M.L., de Vries, T.J., Everts, V., van Winkelhoff, A.J. (2010) Gingival and periodontal ligament fibroblasts differ in their inflammatory response to viable *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res* 45, 262-70.

- Scheres, N., Laine, M.L., Sipos, P.M., Bosch-Tijhof, C.J., Crielaard, W., de Vries, T.J., Everts, V. (2011) Periodontal ligament and gingival fibroblasts from periodontitis patients are more active in interaction with *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res* 46, 407-16.
- Smith, M.F., Jr., Mitchell, A., Li, G., Ding, S., Fitzmaurice, A.M., Ryan, K., Crowe, S., and Goldberg, J.B. (2003). Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for *Helicobacter pylori*-induced NF-kappa B activation and chemokine expression by epithelial cells. *J Biol Chem* 278, 32552-32560.
- Southall, M.D., Li, T., Gharibova, L.S., Pei, Y., Nicol, G.D., and Travers, J.B. (2003). Activation of epidermal vanilloid receptor-1 induces release of proinflammatory mediators in human keratinocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 304, 217-222.
- Szallasi, A., and Blumberg, P.M. (1999). Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev* 51, 159-212.
- Tabeta, K., Yamazaki, K., Akashi, S., Miyake, K., Kumada, H., Umemoto, T., and Yoshie, H. (2000). Toll-like receptors confer responsiveness to lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* in human gingival fibroblasts. *Infect Immun* 68, 3731-3735.
- Takashiba, S., Naruishi, K., and Murayama, Y. (2003). Perspective of cytokine regulation for periodontal treatment: fibroblast biology. *J Periodontol* 74, 103-110.
- Takemura, A., Matsuda, N., Kimura, S., Fujiwara, T., Nakagawa, I., and Hamada, S. (1998). *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide modulates the responsiveness of human periodontal ligament fibroblasts to platelet-derived growth factor. *J Periodontal Res* 33, 400-407.
- Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K., and Akira, S. (1999). Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 11, 443-451.
- Tominaga, M., Caterina, M.J., Malmberg, A.B., Rosen, T.A., Gilbert, H., Skinner, K., Raumann, B.E., Basbaum, A.I., Julius, D. (1998). The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21, 531-543.
- Uesugi, M., Nakajima, K., Tohyama, Y., Kohsaka, S., and Kurihara, T. (2006). Nonparticipation of nuclear factor kappa B (NFkappaB) in the signaling cascade of c-Jun N-terminal kinase (JNK)- and p38 mitogen-activated protein kinase

- (p38MAPK)-dependent tumor necrosis factor alpha (TNF α) induction in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated microglia. *Brain Res* 1073-1074, 48-59.
- Underhill, D.M., and Ozinsky, A. (2002). Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol* 14, 103-110.
- Wang, P.L., Azuma, Y., Shinohara, M., and Ohura, K. (2000). Toll-like receptor 4-mediated signal pathway induced by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in human gingival fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 273, 1161-1167.
- Wang, P.L., and Ohura, K. (2002). *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide signaling in gingival fibroblasts-CD14 and Toll-like receptors. *Crit Rev Oral Biol Med* 13, 132-142.
- Wennborg, A., Classon, M., Klein, G., and von Gabain, A. (1995). Downregulation of c-myc expression after heat shock in human B-cell lines is independent of 5' mRNA sequences. *Biol Chem Hoppe Seyler* 376, 671-680.
- Werts, C., Tapping, R.I., Mathison, J.C., Chuang, T.H., Kravchenko, V., Saint Girons, I., Haake, D.A., Godowski, P.J., Hayashi, F., Ozinsky, A., *et al.* (2001). Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat Immunol* 2, 346-352.
- Williams, R.C. (1990). Periodontal disease. *N Engl J Med* 322, 373-382.
- Wright, S.D., Ramos, R.A., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J., and Mathison, J.C. (1990). CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249, 1431-1433.
- Yamaji, Y., Kubota, T., Sasaguri, K., Sato, S., Suzuki, Y., Kumada, H., and Umemoto, T. (1995). Inflammatory cytokine gene expression in human periodontal ligament fibroblasts stimulated with bacterial lipopolysaccharides. *Infect Immun* 63, 3576-3581.
- Zhang, D., Chen, L., Li, S., Gu, Z., and Yan, J. (2008). Lipopolysaccharide (LPS) of *Porphyromonas gingivalis* induces IL-1 β , TNF- α and IL-6 production by THP-1 cells in a way different from that of *Escherichia coli* LPS. *Innate Immunity* 14 99-107.

ประวัติคณะผู้วิจัย

1. นางนรีชา (เรืองพานิช) สารชวณะกิจ

Mrs Neeracha (Ruangpanit) 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. นางสาวสิริรัตน์ ปลื้มสัมพันธุ์

Mrs Sireerat Pluemsampant

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

หน่วยงาน ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทร. 02-218-8877 โทรสาร 02-218-8882 E-mail: pl_sireerat@yahoo.com

ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขา	ปี พ.ศ. ที่จบ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ท.บ.	ทันตแพทยศาสตร์	2546
Tokyo Medical and Dental University	Ph.D.	Oral biology	2550

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ Cell Biology