วิธีการทดลอง

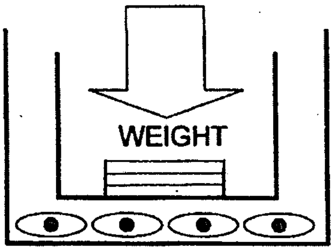
<u>การเพาะเลี้ยงเซลล์จากเนื้อเยื่อเอ็นยึดปริทันต์ของมนุษย์</u>

เซลล์เอ็นยึดปริทันต์จะถูกเพาะเลี้ยงขึ้นจากเนื้อเยื่อเอ็นยึดปริทันต์ของผู้ป่วยที่มาถอนฟันที่ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ ที่ไม่มีรอยโรคของฟันและเนื้อเยื่อปริทันต์ เซลล์ที่ใช้ในการทดลองจะเพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อที่ได้จากคนไข้อย่างน้อย 3 คนและเตรียมเซลล์โดยมีวิธีการโดยย่อดังนี้คือ นำฟันที่ได้มาล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลายน์ (Phosphate buffer saline) ที่ปราศจากเชื้อหลายๆครั้ง จากนั้นใช้ใบมีดผ่าตัดที่ปราศจากเชื้อขูดเนื้อเยื่อปริทันต์ออกจากผิวรากฟันเฉพาะที่บริเวณตอนกลาง (middle 1/3) ของรากฟัน เนื้อเยื่อที่ขูดได้จะถูกตัดออกเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปวางในจานเลี้ยงเซลล์ (tissue culture dish; Nunc) ขนาด 35 มิลลิเมตร อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้คือ DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) ที่เติมซีรัม (fetal bovine serum; FBS) ร้อยละ 10, กลูตามีน (glutamine), ยาปฏิชีวนะ (antibiotics) และยาต่อต้านเชื้อรา (antimycotics) อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนทุกวันจนเซลล์เคลื่อนออกจากชิ้นเนื้อมาอยู่บนจานเลี้ยง จากนั้นอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนสัปดาห์ละ 2 ครั้ง

เมื่อเซลล์บนจานเลี้ยงเจริญจนเต็มพื้นที่ของจานเลี้ยงเซลล์แล้ว เซลล์จะถูกถ่ายออกไปเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ใหม่ขนาด 60 มิลลิเมตร และเริ่มนับเป็นเซลล์รุ่นที่ 1 หลังจากนั้นเซลล์จะถูกหว่านใหม่ในอัตราส่วน 1:3 (หว่านเซลล์ 1 ใน 3 ของเซลล์ทั้งหมดต่อจานเลี้ยงเซลล์ใหม่ 1 จาน) เซลล์ที่ใช้ในการทดลองจะใช้เซลล์ในรุ่นที่ 3-6

<u>การกระตุ้นเซลล์ด้วย compressive force เพื่อสร้างแรงอัดเชิงกล</u>

เซลล์จะถูกหว่านลงในจานเลี้ยงแบบ 6 หลุม เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นจึงกระตุ้นด้วยแรงกดแบบ continuous compressive force โดยใช้ภาชนะขนาดเล็ก วางลงบนอาหารเลี้ยงเซลล์และเติมน้ำหนักลงไปในช่วงตั้งแต่ 1.5-2.5 กรัม/ตารางเซนติเมตร ตามภาพ



จากภาพ น้ำหนักที่กดลงบนของเหลวง จะทำให้เกิดแรงกระทำต่อเซลล์ ตามสมการต่อไปนี้ คือ

$P = \rho gh$

เมื่อ P = pressure, ρ = density of fluid, g = accerelation due to gravity และ h= height of fluid โดยที่ ค่า ρ และ g เป็นค่าคงที่ และ pressure จะแปรผันตามความสูงของของเหลว ซึ่งขึ้นกับแรงกดบนของเหลว และค่าของ pressure จะเท่ากันโดยตลอดทั้งพื้นผิว (Fox and McDonald, 1978;-Munson, 1998)

RNA และโปรตีน จะถูกสกัดเพื่อทำการวิเคราะห์ ที่เวลา 24 ชั่วโมง โดยทำการทดลองซ้ำสามครั้งจากเซลล์ที่เตรียมจากผู้ป่วย 3 ราย

<u>การศึกษากลไกการตอบสนองต่อแรงกดเชิงกลโดยการใช้ตัวยับยั้ง signaling molecules</u>

ในการทดลองเพื่อหากลไกการตอบสนองของเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ ต่อแรงกดเชิงกล เซลล์จะถูกหว่าน และกระตุ้นด้วย compressive force เหมือนที่อธิบายข้างต้น โดยในบางหลุมจะมีการเติมสารยับยั้ง siganaling molecules ลงไป 30 นาที ก่อนเริ่มกระตุ้นด้วยแรง โดยสารยับยั้งที่ใช้ ประกอบด้วย suramin (G protein coupled receptor inhibitor),สารยับยั้ง P2Y1,2 และ P2X1,3 (NF449), สารยับยั้งเฉพาะ P2Y1 (MRS2179), สารทำลาย ATP (Apyrase), Rho kinase inhibitor, สารยับยั้ง cyclooxygenase (indomethacine) เป็นต้น ส่วนตัวยับยั้งอื่นๆ สามารถดูรายละเอียดได้ในบทความในภาคผนวก

การเลือกใช้สารยับยั้งเหล่านี้ เลือกตามที่ได้มีรายงานว่า suramin สามารถยับยั้งการทำงานของ G-protein coupled receptor ซึ่งเป็นกลุ่มหนึ่งของ P2 receptors โดยจากผลการทดลองที่แล้วของคณะวิจัยพบว่า Rho kinase เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของ OPN และมีรายงานว่า G-protein coupled receptor เป็น receptor ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการทำงานของ

Rho kinase และเลือกใช้ NF449 เนื่องจากช่วยจำกัดกลุ่มย่อยของ P2 receptor ให้เล็กลง นอกจากนั้นการเลือกใช้ MSR2179 จะช่วยจำเพาะ receptor ที่เกี่ยวข้องให้ชัดเจนขึ้น

นอกจากนี้ จะมีการใช้ ligand ของ P2 receptor ร่วมด้วย โดยเลือกใช้ ATP เนื่องจากเป็น universal P2 receptor ligand ที่สำคัญ และศึกษาร่วมกับการใช้สารยับยั้ง cyclooxygenase และ สารยับยั้ง Rho kinase เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของสัญญาณในการควบคุมการแสดงออกของ RANKL และ OPN ตามลำดับ (มีรายงานว่า แรงกดเชิงกล มีผลกระตุ้นการตอบสนองของเซลล์ได้ ผ่านทางการกระตุ้นการหลั่ง พลอสตาแกลนดิน จากอิทธิพลของเอนไซม์ cyclooxygenase รวมถึงรายงานถึงความสัมพันธ์ของ Rho kinase กับการแสดงออกของ OPN) ส่วนการทำลาย ATP ด้วย Apyrase จะช่วยให้เข้าใจกลไกการส่งถ่ายสัญญาณได้ดีขึ้น

<u>การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีวิเคราะห์แบบเวสเทิร์นและการจับสัญญาณด้วยเทคนิคฟลูออโรกราฟฟี</u>

โปรตีนจากเซลล์จะถูกสกัดด้วย RIPA บัฟเฟอร์ จากนั้นจึงวัดปริมาณโปรตีนด้วยชุดวัดโปรตีน และจำนวนโปรตีนที่เท่ากันในแต่ละการทดลองจะถูกแยกด้วยไฟฟ้าใน acrylamide gel (polyacrylamide gel electrophoresis) และเคลื่อนย้ายโปรตีนลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (Nitrocellulose) ด้วยไฟฟ้า

นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่ได้ ไปย้อมด้วยแอนติบอดีปฐมภูมิต่อโปรตีนที่ต้องการศึกษา ได้แก่ต่อ OPN, RANKL, OPG, P2Y1, P2Y2, P2X1, และ P2X3 เป็นต้น ต่อด้วยแอนติบอดีทุติยภูมิที่ต่อกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (peroxidase-labeled secondary antibody) สัญญาณของ OPN, RANKL, OPG, P2Y1, P2Y2, P2X1, และ P2X3 จะถูกตรวจสอบด้วยวิธี auto-fluorography โดยการเคลือบแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่ย้อมด้วยแอนติบอดีแล้ว ด้วยชุดขยายสัญญาณแบบเคมี (Chemiluminescence detection system) จากนั้นจึงตรวจจับสัญญาณด้วยแผ่นฟิล์มเอกซ์เรย์

<u>การวิเคราะห์ระดับ mRNA ด้วยวิธี RT-PCR</u>

RNA จากเซลล์ในแต่ละการทดลอง จะถูกแยกด้วย TRI reagent ตามวิธีที่แนะนำโดยบริษัทผู้ผลิต ปริมาณของ RNA ที่แยกได้จะถูกวิเคราะห์ด้วย UV-spectrophotometer ที่ OD 260/280 จากนั้นนำ RNA จำนวน 1 ไมโครกรัมจากแต่ละกลุ่ม

ทดลอง ไปผ่านกระบวนการ reverse transcriptase (RT) โดยใช้เอนไซม์ AMV (avian myeloblastosis virus, Promega) เพื่อสังเคราะห์คอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอ (complementary DNA) หรือ cDNA ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง

cDNA ที่สังเคราะห์ได้ จะถูกนำไปขยายสัญญาณด้วยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction) โดยใช้เอนไซม์ Taq polymerase และใช้ primer ที่จำเพาะต่อโปรตีนที่ต้องการศึกษา ได้แก่ OPN, RANKL, OPG, P2Y1, P2Y2, P2X1, และ P2X3 เป็นต้น โดย primers ทั้งหมดจะออกแบบขึ้นจากลำดับของ mRNA ที่ได้มีรายงานแล้วใน database และในทุกการทดลอง จะใช้ primer ต่อ GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) ซึ่งเป็น house keeping gene ในการขยายสัญญาณควบคู่ไปด้วย เพื่อเป็น internal control ของการทดลองในการตรวจสอบว่าปริมาณของ RNA ตั้งต้นที่ใช้มีปริมาณเท่ากันในทุกกลุ่ม

เมื่อสิ้นสุดกระบวนการ PCR แล้ว สายพันธุกรรมที่ได้จะถูกวิเคราะห์โดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าใน agarose gel ที่มีความเข้มข้นของ agarose ร้อยละ 1.5 และความเข้มของแถบสัญญาณจะถูกวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Scion image analysis

<u>การวัดปริมาณ ATP ด้วย Luciferin-Luciferase bioluminescence assay</u>

การวัดปริมาณ ATP ที่ถูกหลั่งจากเซลล์ออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ ทำหลังจากการกระตุ้นเซลล์ด้วยแรงกดเชิงกลเป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่กระตุ้นด้วยแรงกด 1, 1.5 และ 2 กรัม/ตารางเซนติเมตร กับกลุ่มที่ไม่ถูกกระตุ้น วิธีการวัดทำได้โดยใช้สารเคมีชุดที่ออกแบบมาเพื่อการวัด ATP โดยเฉพาะ (Bioluminescence Detection kit for ATP measurement, Promega) โดยการผสมสารละลาย Luciferase/lluciferin (L/L solution) จากชุดที่ได้มากับอาหารเลี้ยงเซลล์หลังการกระตุ้นด้วยแรงกดเชิงกลในปริมาณ 1 ต่อ 1 (L/L solution 100 ไมโครลิตร / อาหารเลี้ยงเซลล์ 100 ไมโครลิตร) ลงในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม (ยี่ห้อ Packard) ซึ่งจะมีการเรืองแสง Bioluminescence ออกมามากหรือน้อยขึ้นกับปริมาณ ATP ที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ทำการตรวจวัดปริมาณแสงด้วยเครื่องด้วยวัดแสง Luminometer (Victor Light Luminescence Counter, Perkin Elmer Ltd.) ทำค่าที่ได้มาเขียนกราฟและเมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐาน (standard curve)