

การแสดงออกของซีฟอสในไตรเจมินัลนิวเคลียสและน้ำหนักของหนูทดลองภายหลังเนื้อเยื่อในฟันกรามอักเสบ

C-Fos Expression in Trigeminal Nucleus and Bodyweight of Rats after Pulpitis in Molar Tooth

อานนท์ชัย จันทรสุนทรภาส¹, อุไรวรรณ โชคชนะชัยสกุล¹

Arnonchai Junsuntonpass¹, Uraiwan Chokechanachaisakul¹

¹ภาควิชาทันตกรรมหัตถการ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย

¹Department of Operative Dentistry, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

บทคัดย่อ

การแสดงออกของซีฟอสที่พบได้ในนิวเคลียสของเซลล์ประสาทเกี่ยวข้องกับความรู้สึกเจ็บปวดภายหลังกระตุ้นด้วยสิ่งเร้าที่เป็นอันตรายหลายชนิด และถูกใช้เป็นเครื่องบ่งชี้ความเจ็บปวด ในกรณีที่ได้รับการบาดเจ็บที่ฟันยังมีวิธีวัดความเจ็บปวดในสัตว์ทดลองโดยใช้การลดลงของน้ำหนัก ซึ่งเป็นการวัดความเจ็บปวดทางอ้อมจากการพฤติกรรมทานอาหารที่เปลี่ยนแปลงจากความเจ็บปวด วัดอุปสรรคการศึกษาคือเพื่อศึกษาน้ำหนักของหนูทดลองที่เปลี่ยนแปลงร่วมกับการแสดงออกของซีฟอส หนูทดลองเพศผู้ถูกนำมาเลี้ยงและวัดน้ำหนักเป็นเวลา 1 สัปดาห์ แบ่งหนูทดลองออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลอง นำหนูทดลองกลุ่มควบคุมมากรอฟันกรามล่างซ้ายลึก 0.5 มม. ขณะที่กลุ่มทดลองกรอฟันลึกจนทะลุโพรงประสาทฟันและเลี้ยงต่อเพื่อชั่งน้ำหนักอีก 1 สัปดาห์ หลังจากนั้นนำหนูมากรอขนาดเพื่อเก็บชิ้นเนื้อสมองและฟัน นับจำนวนเซลล์ประสาทที่มีการแสดงออกของซีฟอส ในบริเวณสมองด้านเดียวกันและฝังตรงข้ามด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี และวิเคราะห์ความแตกต่างของน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นก่อนและหลังการทดลองด้วยสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่เป็นอิสระจากกัน ส่วนเนื้อเยื่อในฟันที่อักเสบวิเคราะห์ด้วยผลทางจุลพยาธิวิทยา จากผลการทดลองพบว่า กลุ่มทดลองมีจำนวนเซลล์ประสาทที่มีฟอสแสดงออกในสมองข้างเดียวกันมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หนูทดลองทุกกลุ่มมีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นหลังการทดลองช้าลงกว่าก่อนการทดลอง และความแตกต่างของน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นก่อนและหลังการทดลองของกลุ่มทดลอง มีค่าน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลทางจุลพยาธิวิทยาของฟันกรามล่างซ้ายซี่ที่ 1 ในกลุ่มควบคุมพบ ลักษณะของเนื้อเยื่อในฟันที่ปกติ ในขณะที่กลุ่มทดลองพบการตายของเนื้อเยื่อในฟัน มีการขยายตัวของหลอดเลือด และมีการแทรกซึมของเซลล์อักเสบเรื้อรัง ดังนั้นน้ำหนักที่เปลี่ยนแปลงไปเป็นวิธีที่ง่ายต่อการวัดและสามารถใช้เป็นวิธีวัดความเจ็บปวดที่เกิดขึ้นจากฟันทางอ้อมได้ รวมถึงวิธีการทดลองนี้ยังมีประโยชน์ต่อการประเมินความเจ็บปวดในสัตว์ทดลองอีกด้วย

คำสำคัญ : น้ำหนัก, ซีฟอส, เนื้อเยื่อในฟันอักเสบ, ไตรเจมินัลนิวเคลียส

Abstract

The c-Fos expression, found in nuclei of neurons, was associated with nociception after many types of noxious stimuli and introduced as a marker of pain. In case of teeth injuries, another detection method of pain sensation in animal models can be inferred from weight loss as an indirect pain measurement of feeding behavior, resulting from pain. The aim of this study was to detect pulpal pain via bodyweight combine with c-Fos expression in the rat model. Ten male Sprague-Dawley rats were nurtured and recorded their pre-operative weights for 1 week. All rats were randomly divided into control and experimental groups. The lower left first mandibular molar was drilled 0.5 mm. in the control

group while the pulp was exposed in the experimental group and all rats were parented and recorded their post-operative weights for 1 week. Then, all rats were euthanized and the brain tissues and the teeth were collected. The number of Fos immunoreactive (IR) neurons from the ipsilateral and contralateral brain were detected by immunohistochemistry. The difference of pre- and post-operative increasing weight was analyzed by *t*-test. Pulpitis was histologically diagnosed. The Fos-IR neurons were significantly higher in the ipsilateral trigeminal nucleus in the experimental group, compared to the control group. In all rats, the post-operative increasing weights increased slower than pre-operative increasing weights and the difference of pre- and post-increasing operative weight of the experimental group was significantly lower than that of the control group. The histologic findings of first molar rats showed normally dental pulp morphology in the control group while the pulp of exposure group exhibited an area of necrosis, enlarged blood vessels and chronic inflammatory cell infiltration. Thus, bodyweight changing can be easily used as an indirect pain measurement of pulpal pain. The methods developed are also useful in pain assessment in animal models.

Keyword : Bodyweight, C-Fos, Pulpitis, Trigeminal nucleus

Date: Jun 28, 2020 **Revised Date:** Sep 14, 2020 **Accepted Date:** Oct 12, 2020

doi: 10.14456/jdat.2021.14

ติดต่อเกี่ยวกับบทความ:

อุไรวรรณ โชคชนะชัยสกุล ภาควิชาทันตกรรมหัตถการ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 34 ถนนอังรีดูนังต์ แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330 ประเทศไทย โทร: 089-1295254 แฟกซ์: 02-2188796 อีเมล: uraiwanchoke@gmail.com

Correspondence to:

Uraivan Chokechanachaisakul, Department of Operative Dentistry, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Henri-Dunant Road, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand. Tel: 089-1295254 Fax: 02-2188796 E-mail: uraiwanchoke@gmail.com

บทนำ

โรคเนื้อเยื่อในฟันอักเสบเป็นหนึ่งในสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดอาการปวดฟันซึ่งมีความเกี่ยวข้องโดยตรงกับความไวเจ็บเหตุประสาทส่วนปลาย (peripheral sensitization)¹ และความไวเจ็บเหตุประสาทส่วนกลาง (central sensitization)² ความไวเจ็บเหตุประสาทส่วนกลางสามารถทำให้กระแสประสาทเกิดเอง (spontaneous activity) เพิ่มพื้นที่รับรู้ความรู้สึก (receptive field) ที่ตอบสนองสิ่งเร้าทางกล และลดขีดเริ่มเปลี่ยนของเซลล์ประสาท (threshold of neurons) ส่งผลให้เกิดอาการปวดมากกว่าปกติจากตัวกระตุ้นที่ทำให้ปวด (hyperalgesia) และอาการปวดจากตัวกระตุ้นที่ไม่ทำให้ปวด (allodynia)³ ในหลายการศึกษาพบว่าเมื่อกระตุ้นเนื้อเยื่อในฟันที่อักเสบด้วยสิ่งเร้าที่เป็นอันตราย (noxious stimulation) จะเกิดการเปลี่ยนแปลงภายในโหนดนิวเคลียส (trigeminal nucleus) และ ทาลามัส (thalamus) ของสัตว์ทดลอง⁴⁻⁶ โดยตัวบ่งชี้ที่นิยมใช้ในการศึกษาพื้นฐานเกี่ยวกับความปวดที่เกิดจากการบาดเจ็บโดยตรงคือ ซีฟอส (c-Fos) ซึ่งเป็นยีนที่แสดงออกภายในเซลล์ประสาทที่พบได้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม⁷ ซีฟอสและความเจ็บปวดมีความ

สัมพันธ์กันโดยตรงหลังจากที่มีการกระตุ้นด้วยสิ่งเร้าที่เป็นอันตรายหลายชนิดไปที่เนื้อเยื่อในฟัน เช่น สิ่งเร้าทางกล ทางเคมี ทางไฟฟ้า หรือ ทางอุณหภูมิ^{4,8,9} ดังนั้นการแสดงออกของซีฟอสที่บริเวณสมองและไขสันหลัง จึงถูกใช้เป็นตัวบ่งชี้ของความเจ็บปวดที่เกิดขึ้นจากการกระตุ้นด้วยสิ่งเร้าเพื่อทำให้เกิดความเจ็บปวดรวมถึงความเจ็บปวดจากการอักเสบของเนื้อในฟัน^{10,11}

นอกจากนี้ยังมีวิธีในการวัดความเจ็บปวดในสัตว์ทดลองทางอ้อมจากการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมของสัตว์อีกหลายวิธี เช่น การแลเลิน การเกาที่ใบหน้า และ น้ำหนัก^{9,12} จากการศึกษาในอดีตพบว่า น้ำหนักที่ลดลงของสัตว์ทดลองหลังจากการทำให้บาดเจ็บที่ฟันสามารถใช้ประเมินความเจ็บปวดในสัตว์ทดลองทางอ้อมได้ เนื่องจากการลดลงของน้ำหนักที่เกิดขึ้นจากการบาดเจ็บที่ฟันส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมในการหาอาหารของสัตว์ทดลอง^{12,13}

ในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักของหนูและการแสดงออกของซีฟอสในโหนดนิวเคลียสระหว่างหนูทดลองที่เกิดความเจ็บปวดจาก

การอักเสบของเนื้อเยื่อในฟัน และหนูทดลองที่ไม่มีการเจ็บปวดจากการอักเสบของเนื้อเยื่อในฟัน

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

ขั้นตอนการเตรียมสัตว์ทดลอง

การศึกษานี้ได้รับการพิจารณาจริยธรรมในสัตว์ทดลองจาก คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยหมายเลข 1832005 นำหนูแรทสายพันธุ์ Sprague-Dawley เพศผู้ จำนวน 10 ตัว อายุ 6 สัปดาห์ แบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มควบคุม (non-exposed pulp) และ กลุ่มทดลอง (exposed pulp) กลุ่มละ 5 ตัว เลี้ยงภายใต้ระยะเวลาการให้แสงสว่าง 12 ชั่วโมง และมีด 12 ชั่วโมง และชั่งน้ำหนักหนูทดลองทุกวันเป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดเวลาทำการสลับหนูทดลองด้วยวิธีการฉีดยาใต้เยื่อช่องท้องด้วยเพนโทบาร์บิทอล (pentobarbital) ขนาด 40 มก./กก. และฉีดยาชาด้วยเมพิวาเคนความเข้มข้นร้อยละ 2 ร่วมกับอีพีนเฟรินอัตราส่วน 1:100,000 ปริมาณ 0.1 มล. (2% mepivacaine with epinephrine 1:100,000, 0.1 ml) ที่ปลายรากฟันกรามล่างซ้ายซี่ที่ 1 หลังจากนั้นนำหนูทดลองกลุ่มควบคุมมากรอฟันกรามล่างซ้ายซี่ที่ 1 ทางด้านบดเคี้ยว ขนาด 0.5 มม. x 0.5 มม. และลึก 0.5 มม. ด้วยหัวกรออัลตราโซนิค (ASLD ultrasonic tip, Acteon Thailand, Bangkok, Thailand) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (microscope SZ61, Olympus corporation, Tokyo, Japan) ในกลุ่มทดลองทำการกรอฟันกรามล่างซ้ายซี่ที่ 1 ทางด้านบดเคี้ยวจนทะลุโพรงประสาทฟัน โดยสังเกตจากจุดเลือดออกภายในตัวฟันและเลี้ยงหนูทั้ง 2 กลุ่ม รวมถึงชั่งน้ำหนักต่อไปอีก 7 วัน เมื่อครบ 1 สัปดาห์ ทำการการุณยฆาตหนูทดลอง ทั้ง 2 กลุ่ม เริ่มด้วยการสลับหนูทดลอง และผ่าตัดเปิดช่องอก สอดเข็มผ่านทางหัวใจห้องล่างซ้ายเพื่อเติม 0.1 M phosphate buffered saline ที่ pH 7.4 เข้าไปในหัวใจและกระจายไปทั่วตัว แล้วเปิดหัวใจห้องบนขวาเพื่อให้เลือดไหลออกจากร่างกาย หลังจากนั้นทำการเติม 4% paraformaldehyde ใน 0.1 M phosphate buffered saline ที่ pH 7.4 250 มล. (transcardial perfusion) เปิดกะโหลกศีรษะเพื่อเก็บเนื้อเยื่อสมองที่บริเวณก้านสมองขนาด 4 มม. นำตัวอย่างทั้งหมดไปรักษาสภาพใน 4% paraformaldehyde ที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บขากระดูกกลางของหนูทดลองทั้งสองข้างไปรักษาสภาพใน 10% neutral buffer formalin เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และแช่ใน 10% EDTA ที่ pH 7.4 ต่อเป็นเวลา 14 วัน หลังจากนั้นนำตัวอย่างที่เก็บมาทั้งหมดผ่านกระบวนการเตรียมชิ้นเนื้อในพาราฟิน

การวัดน้ำหนักหนูทดลอง

ก่อนทำการทดลองหนูทดลองทุกตัวถูกวัดน้ำหนักทุกวันในตอนเช้าเป็นเวลา 7 วัน และนำมาคำนวณเป็นอัตราส่วนน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อวันก่อนการทดลอง หลังจากการกรอฟันหนูทดลองทั้ง 2 กลุ่ม ในวันที่ 7 หนูทดลองถูกนำมาวัดน้ำหนักอีกครั้งเป็นเวลา

7 วันหลังการกรอฟันเพื่อนำมาคำนวณเป็นอัตราส่วนของน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อวันหลังการทดลอง จากนั้นนำอัตราส่วนน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อวันหลังการทดลองลบอัตราส่วนน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อวันก่อนการทดลองจะได้ค่าความแตกต่างระหว่างอัตราส่วนน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นก่อน-หลังการทดลอง เปรียบเทียบของความแตกต่างของทั้ง 2 กลุ่ม ก่อนและหลังการทดลองด้วยการใช้สถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่เป็นอิสระจากกัน (independent *t*-test) กำหนดค่านัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ขั้นตอนทางอิมมูโนฮิสโตเคมี (Immunohistochemical procedures)

นำสมองของหนูทดลองที่ผ่านขั้นตอนการเตรียมชิ้นเนื้อในพาราฟินเรียบร้อยแล้ว มาตัดแบ่งในแนวหน้า-หลัง (coronal plane) ที่ความหนา 5 ไมครอน จำนวน 89 สไลด์ต่อหนูทดลอง 1 ตัว นำสไลด์ที่ได้เข้ากระบวนการย้อมทางอิมมูโนฮิสโตเคมีด้วยการกำจัดพาราฟินและคืนน้ำเข้าเนื้อเยื่อ จากนั้นนำสไลด์แช่ในสารละลาย TE buffer pH 9.0 ร่วมกับการให้ความร้อนเป็นเวลา 10 นาที และล้างออกนำสไลด์ที่ผ่านการต้มแล้วมาบ่มใน 3% hydrogen peroxide เป็นเวลา 10 นาที และล้างออก นำมาบ่มต่อด้วยแอนติบอดีหลัก (primary antibody) จาก mouse monoclonal anti c-Fos ที่อัตราส่วน 1:50 ในสารละลาย PBS ใน 1% bovine serum albumin (sc-166940, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, U.S.A.) ที่ทิ้งไว้เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการย้อมต่อด้วยแอนติบอดีทุติยภูมิ (secondary antibody) Dako EnVision+System-HRP labelled polymer Anti-mouse (K4001, Dako North America, Inc., real Carpinteria, CA, U.S.A.) เป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ขั้นตอนสุดท้ายทำการย้อมสีด้วย Dako Liquid DAB Substrate Chromogen System ที่อัตราส่วน 1:50 (K3468, Dako North America, Inc., real Carpinteria, CA, U.S.A.) เป็นเวลา 5 นาที และย้อมสีทับ (counterstaining) ด้วยสี light green ทำการนับจำนวนของเซลล์ประสาทที่ติดสีซีฟอสในบริเวณสมองทั้งสองข้างของไทรเจมินัลนิวเคลียส ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10X ด้วยโปรแกรม Java image processing and analysis เพื่อเปรียบเทียบของความแตกต่างของไทรเจมินัลนิวเคลียสข้างเดียวกัน (ipsilateral side) ระหว่าง 2 กลุ่มด้วยการสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่เป็นอิสระจากกัน และเปรียบเทียบความแตกต่างของไทรเจมินัลนิวเคลียสข้างเดียวกันและฝั่งตรงข้าม (contralateral side) ภายในกลุ่มด้วยสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่ไม่เป็นอิสระจากกัน (dependent *t*-test) กำหนดค่านัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง

การเตรียมชิ้นเนื้อทางจุลพยาธิวิทยา (Histopathology)

นำฟันกรามล่างซ้ายซี่ที่ 1 ที่ผ่านขั้นตอนการเตรียมชิ้นเนื้อในพาราฟินเรียบร้อยแล้ว มาตัดในแนวซ้าย-ขวา (sagittal plane)

ที่ความหนา 10 ไมครอน และนำมาย้อมด้วยสีฮีมาทอกซีลิน (Hematoxylin) และ อีโอซิน (Eosin) เพื่อสังเกตลักษณะของเนื้อเยื่อในฟันที่เปลี่ยนแปลงไป โดยดูการปรากฏของเซลล์อักเสบชนิดต่าง ๆ ภายในเนื้อเยื่อในฟันภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 10X

ผลการศึกษา

น้ำหนักของหนูทดลอง

น้ำหนักของหนูทุกกลุ่มค่อย ๆ เพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการทดลอง (รูปที่ 1) โดยกลุ่มควบคุมมีค่าเฉลี่ยอัตราส่วนของน้ำหนัก

ที่เพิ่มขึ้นต่อวันก่อนการทดลองและหลังการทดลองอยู่ที่ 9.23 และ 7.75 กรัม/วัน ตามลำดับ ในขณะที่ค่าเฉลี่ยอัตราส่วนของน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อวันก่อนการทดลองและหลังการทดลองของกลุ่มทดลองอยู่ที่ 10.79 และ 7.33 กรัม/วัน ตามลำดับ เมื่อนำมาคำนวณหาความแตกต่างระหว่างอัตราส่วนของน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นก่อน-หลังการทดลองในกลุ่มควบคุมพบว่า มีค่า -1.47 กรัม/วัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มทดลองที่มีค่า -3.46 กรัม/วัน ($p < 0.05$) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ตารางที่ 1)



รูปที่ 1 การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักหนูทดลอง (n=5 ต่อกลุ่ม)

Figure 1 The weight changing of rats (n=5 in each group)

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยอัตราส่วนของน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และ ความแตกต่างระหว่างอัตราส่วนของน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นก่อน-หลังการทดลอง

Table 1 The mean of weight gain ratio and the difference of pre- and post- operative weight gain

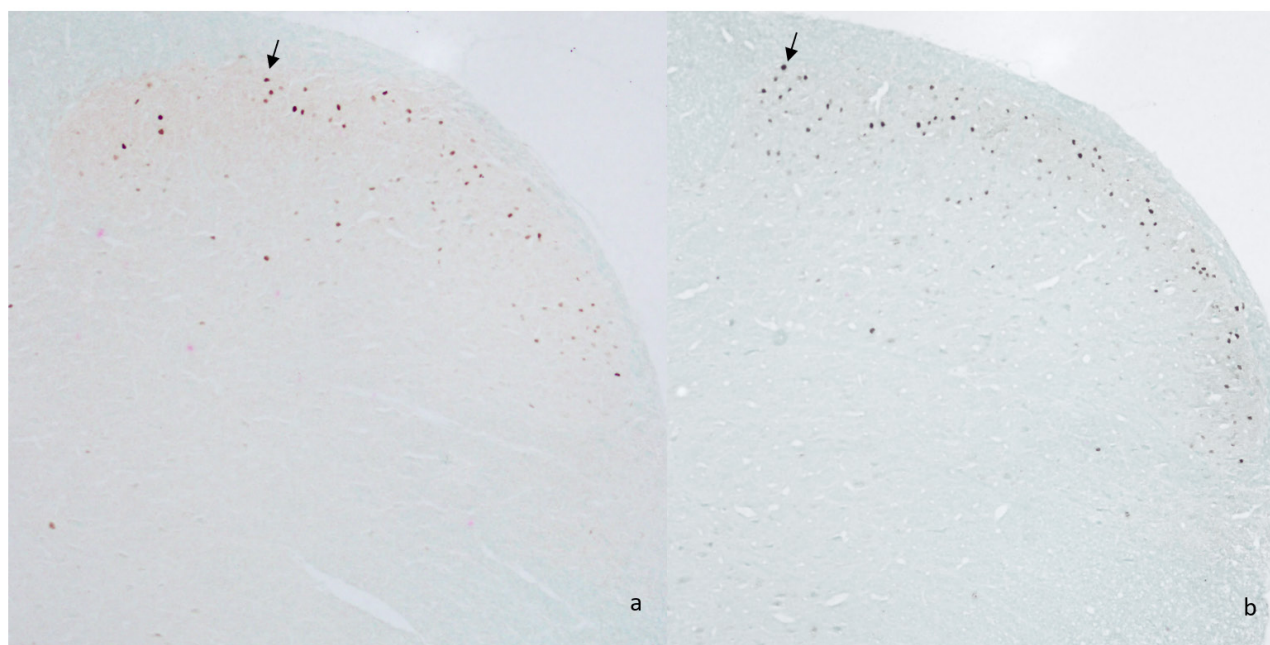
Group	N	Pre-operative weight gain (g/day)	Post-operative weight gain (g/day)	The difference of pre- and post- operative weight gain
Non-exposed pulp	5	9.23 ± 1.03	7.75 ± 0.80	- 1.47 ± 0.16*
Exposed pulp	5	10.79 ± 0.38	7.33 ± 1.14	- 3.46 ± 1.03*

* The mean difference is significant at the 0.05 level

ผลทางอิมมูโนฮิสโตเคมีของไทรเจมินัลนิวเคลียส

จากผลการย้อมทางอิมมูโนฮิสโตเคมีพบการแสดงออกของซีฟอสทั้งสองข้างของไทรเจมินัลนิวเคลียสในทุกกลุ่ม (รูปที่ 2) เมื่อพิจารณาไทรเจมินัลนิวเคลียสข้างเดียวกันและฝั่งตรงข้ามภายในกลุ่มควบคุม พบว่าการแสดงออกของซีฟอสแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ

ทางสถิติ ($p>0.05$) แต่พบการแสดงออกของซีฟอสที่มากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติภายในกลุ่มทดลอง ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของซีฟอสในไทรเจมินัลนิวเคลียสข้างเดียวกันระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองพบว่ามีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.001$) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ตารางที่ 2)



รูปที่ 2 เซลล์ประสาทที่มีการแสดงออกของซีฟอส (ลูกศรสีดำ) ที่ไทรเจมินัลนิวเคลียสข้างเดียวกันที่กำลังขยาย 10x (a = กลุ่มควบคุม และ b = กลุ่มทดลอง)
Figure 2 C-fos immunoreactive neurons (black arrows) in ipsilateral trigeminal nucleus at magnification 10x. (a = non-exposed pulp, b = exposed pulp)

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเซลล์ประสาทที่มีการแสดงออกของซีฟอส

Table 2 Mean and standard deviation of Fos-IR neurons

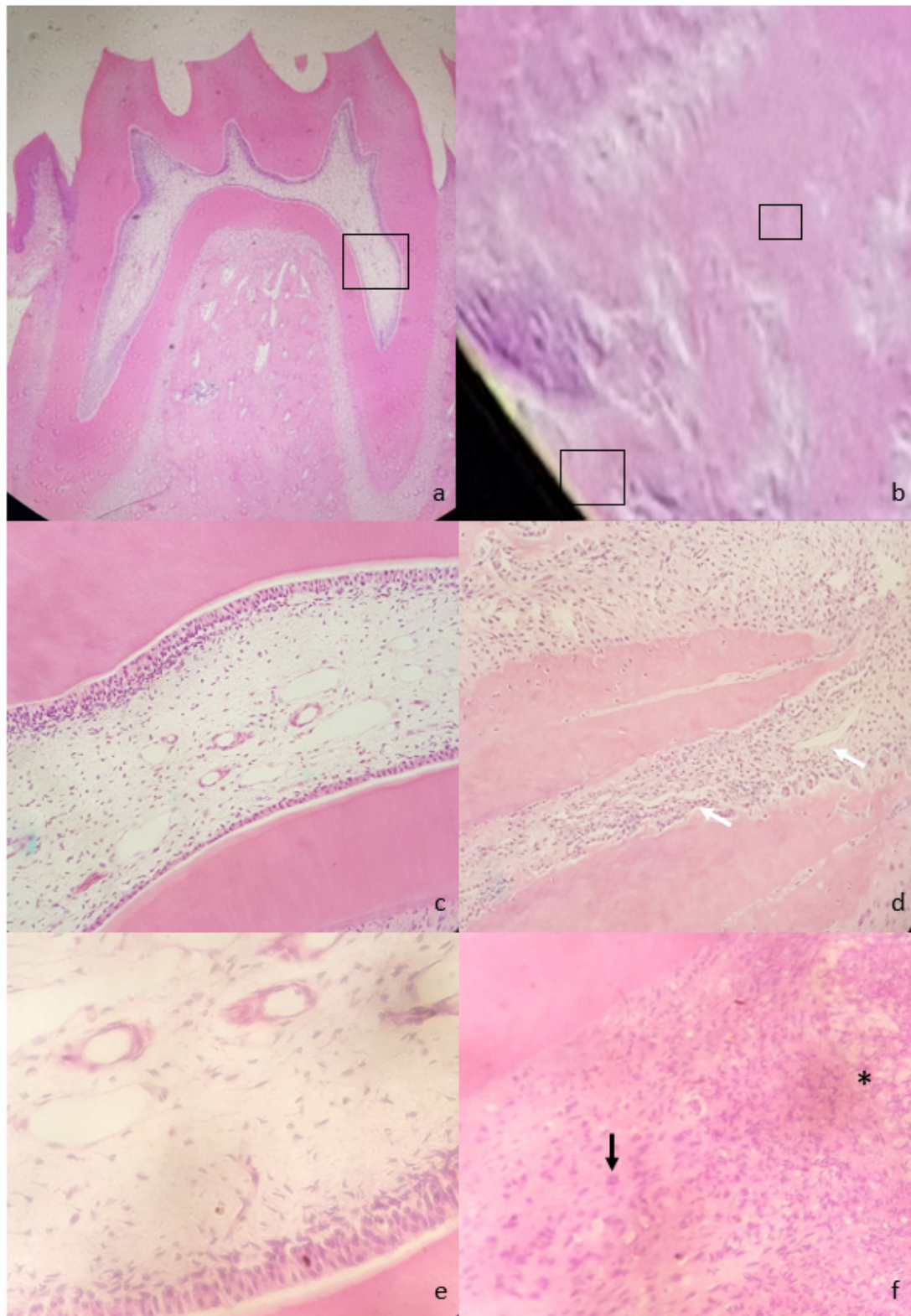
Fos-IR neurons	Non-exposed pulp		Exposed pulp	
	Ipsilateral	Contralateral	Ipsilateral	Contralateral
Mean $\pm$ S.D.	30.70 $\pm$ 2.16	31.52 $\pm$ 0.37	46.95 $\pm$ 2.29*	34.97 $\pm$ 2.50

* The mean difference is significant at the 0.05 level

ผลทางขึ้นเนื้อทางจุลพยาธิวิทยาของฟันกรามล่างซ้ายซี่ที่ 1

ในกลุ่มควบคุมพบลักษณะของโครงสร้างเนื้อเยื่อในฟันที่ปกติ (รูปที่ 3a) ประกอบไปด้วยชั้นของเซลล์สร้างเนื้อฟัน (odontoblastic layer) อยู่บริเวณขอบนอกของเนื้อเยื่อใน ใต้ต่อชั้นของเซลล์สร้างเนื้อฟันพบลักษณะจำนวนเซลล์ที่เบาบาง (cell free zone) ชั้นถัดเข้ามาจะพบลักษณะเซลล์รูปกระสวยจำนวนมาก (cell rich zone) และชั้นในสุดของเนื้อเยื่อในพบเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective

tissues) หลอดเลือด และเส้นประสาท (รูปที่ 3c,e) ในกลุ่มทดลองที่มีการกรอฟันให้ทะลุเนื้อเยื่อในเป็นเวลา 7 วัน (รูปที่ 3b) พบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อในฟันอย่างเห็นได้ชัดคือ มีเซลล์อักเสบจำนวนมากที่เนื้อเยื่อในตลอดทั้งความยาวของคลองรากฟัน เช่น polymorphonuclear leukocytes plasma cells และ lymphocytes มีการขยายตัวของหลอดเลือด และเซลล์ตาย (area of necrosis) (รูปที่ 3d,f)



รูปที่ 3 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของฟันกรามล่างซ้ายซี่ที่1ในหนูทดลองกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลองที่กำลังขยาย 10x (a,b), 20x (c,d) และ 40x (e,f) ตามลำดับ บริเวณเนื้อเยื่อในฟันของกลุ่มทดลองพบการขยายตัวของหลอดเลือด (ลูกศรสีขาว) เซลล์ตาย (ดอกจัน) และเซลล์อักเสบ (ลูกศรสีดำ)

Figure 3 The histologic findings showed whole lower first molar rats in the non-exposed pulp group and the exposed pulp group at magnification 10x (a,b), 20x (c,d) and 40x (e,f), respectively. In pulp of the exposed pulp group showed vasodilation (white arrows), area of necrosis (asterisk) and inflammatory cells (black arrow)

บทวิจารณ์

จากการศึกษาพบว่า หนูทดลองที่เนื้อเยื่อในฟันอักเสบเป็นเวลา 1 สัปดาห์ มีการแสดงออกของซีฟอสเพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่มควบคุมในไทโรเจมินัลนิวเคลียส และอัตราส่วนของน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นก่อน-หลังการทดลองลดลงอย่างมีนัยสำคัญ การแสดงออกของซีฟอสนิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในระดับเซลล์หลังถูกกระตุ้นด้วยสิ่งเร้าที่เป็นอันตราย เพื่อบ่งบอกว่ามีการทำงานของเซลล์ประสาทที่เกี่ยวข้องกับความเจ็บปวด หลายการศึกษาในอดีตแสดงให้เห็นว่าเมื่อทำการให้ NMDA antagonists หรือ ตัดเส้นประสาทไป (axotomy) จะส่งผลให้มีการแสดงออกของซีฟอส หรือความไวเจ็บเหตุประสาทส่วนกลางลดลงอย่างมีนัยสำคัญ¹⁴⁻¹⁶ การแสดงออกของซีฟอสจะสัมพันธ์กับเส้นประสาทรับความรู้สึกที่ไปสิ้นสุดตามบริเวณต่าง ๆ ของสมอง ซึ่งสามารถถูกกระตุ้นได้จากสิ่งเร้าหลายอย่างผ่านทางฟัน เช่น ทางกลทางเคมี หรือ อุณหภูมิ^{2,4,8,9} เป็นที่ทราบกันว่าไทโรเจมินัลนิวเคลียสเป็นบริเวณสมองที่ทำหน้าที่รับความรู้สึกที่มาจากฟัน^{17,18} และสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ส่วน คือ subnucleus oralis, subnucleus interpolaris และ subnucleus caudalis¹⁹ จากการศึกษาในอดีตพบว่าหลังการกระตุ้นให้โพรงประสาทฟันอักเสบด้วย lipopolysaccharide จากแบคทีเรียเป็นเวลา 72 ชั่วโมง จะมีการแสดงออกของซีฟอสเพิ่มขึ้น ในบริเวณ subnucleus caudalis และ transitional zone ระหว่าง subnucleus interpolaris และ caudalis^{9,20} สอดคล้องกับการศึกษาที่มีการแสดงออกของซีฟอสเพิ่มมากขึ้นหลังทำการกระตุ้นเนื้อเยื่อในฟันให้อักเสบผ่านทางกลด้วยหัวกรอและทิ้งไว้เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ดังนั้นรูปแบบการแสดงออกของซีฟอสในสมองส่วนต่าง ๆ มีความสัมพันธ์กับเส้นประสาทรับความรู้สึกโดยเฉพาะอย่างยิ่ง A-delta และ C-fibers จากฟันที่ส่วนใหญ่มักพบที่ไทโรเจมินัลนิวเคลียส^{17,21,22}

แต่อย่างไรก็ตามการแสดงออกของซีฟอสที่ถูกใช้เป็นตัวบ่งบอกความเจ็บปวดในหนูทดลองนี้ ยังสามารถที่จะถูกกระตุ้นได้ด้วยสิ่งเร้าที่ไม่ทำให้เกิดอันตราย (non-noxious stimulus) โดยเฉพาะความเครียด^{23,24} ดังนั้นจำเป็นต้องใช้กลุ่มควบคุมที่มีลักษณะเหมือนกับกลุ่มทดลองมากที่สุดเพื่อนำมาเปรียบเทียบ ซึ่งในการศึกษานี้กลุ่มควบคุมถูกทำการทดลองทุกขั้นตอนเหมือนกลุ่มทดลอง แต่มีเพียงแค่การกรอฟันกลุ่มควบคุมที่ไม่ทะลุเนื้อเยื่อในเท่านั้นเพื่อต้องการให้หนูทดลองทั้งสองกลุ่มได้รับความเครียดจากการทดลองใกล้เคียงกันมากที่สุด ซึ่งสังเกตได้จากการแสดงออกของซีฟอสในไทโรเจมินัลนิวเคลียส ผังตรงข้ามของกลุ่มทดลองมีค่าแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญกับกลุ่มควบคุมในไทโรเจมินัลนิวเคลียสทั้งสองฝั่ง แสดงให้เห็นถึงการมีควบคุมปัจจัยภายในที่ดี

ในการศึกษานี้ใช้การเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วนน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นก่อน-หลังการทดลองเพื่อดูการเจริญเติบโตแทนการใช้

น้ำหนักที่วัดได้จากสัตว์ทดลองโดยตรง เนื่องด้วยข้อจำกัดของการเลี้ยงสัตว์ทดลองจึงทำให้น้ำหนักเริ่มต้นของหนูทดลองในวันที่ 1 แตกต่างกันเล็กน้อยในแต่ละตัว แต่เมื่อวิเคราะห์ด้วยการทดสอบของครัสคาลและวัลลิส (Kruskal-Wallis Test) พบว่ามีค่าแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ อีกทั้งการศึกษานี้ใช้กรรมล้างซ้ายซี่ที่ 1 ในการทำให้เกิดความเจ็บปวดซึ่งอยู่ทางด้านในของช่องปาก จึงไม่สามารถสังเกตพฤติกรรมสัตว์ทดลองจากวิธีอื่นได้เช่น การแลบลิ้นไปสัมผัสบริเวณที่เจ็บปวด หรือการเกาที่ใบหน้า ดังนั้นเพื่อลดอคติที่อาจเกิดขึ้นจึงได้พิจารณาใช้การเจริญเติบโตมาวิเคราะห์แทนน้ำหนัก และพบว่าการเปลี่ยนแปลงไปตามลักษณะความรุนแรงของสิ่งเร้าที่ทำให้เจ็บปวดตามวิธีการทดลอง โดยในกลุ่มควบคุมหนูทดลองถูกรอฟันเพียงเล็กน้อย ทำให้การเจริญเติบโตของหนูช้าลงเมื่อเปรียบเทียบกับก่อนทำการทดลอง เช่นเดียวกับกลุ่มทดลองหนูทดลองถูกรอฟันจนกระทั่งทะลุเนื้อเยื่อใน ทำให้การเจริญเติบโตของหนูลดลงมากเมื่อเปรียบเทียบกับก่อนทำการทดลอง และลดลงมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากการวัดความเจ็บปวดในสัตว์ทดลองทางอ้อมโดยใช้การเจริญเติบโตแสดงให้เห็นว่า ความเจ็บปวดเกิดขึ้นจากเนื้อเยื่อในฟันที่อักเสบทำให้การเจริญเติบโตของหนูในกลุ่มทดลองช้ากว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งคล้ายคลึงกับหลายการศึกษาในอดีตที่แสดงให้เห็นว่า เมื่อวัดน้ำหนักโดยตรงจากสัตว์ทดลองที่ถูกกรอฟันกรามจนทะลุโพรงประสาทฟันทิ้งไว้ 72 ชั่วโมง พบว่าน้ำหนักจะลดลงเมื่อเวลาผ่านไปทั้งกลุ่มที่กรอฟัน 2 ซี่หรือ 4 ซี่ ก็ตาม แต่ในขณะที่พฤติกรรมอื่น ๆ เช่น การสำรวจ ในกลุ่มหนูทดลองที่กรอฟัน 2 ซี่ พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 3 วัน สัตว์ทดลองมีพฤติกรรมกลับมาเป็นปกติไม่ต่างจากกลุ่มควบคุม^{12,13} ในการศึกษาครั้งนี้มีการกรอฟันให้เกิดเนื้อเยื่อในอักเสบเพียง 1 ซี่ เท่านั้นเป็นระยะเวลา 7 วัน และยืนยันการอักเสบของเนื้อเยื่อในฟันด้วยผลทางขึ้นเนื้อทางจุลพยาธิวิทยาของฟันที่พบการอักเสบตลอดทั้งคลองรากฟันแต่ไม่พบรอยโรคที่บริเวณปลายรากฟัน ซึ่งเป็นการทำให้เกิดการบาดเจ็บเพียงเล็กน้อย จึงทำให้น้ำหนักของหนูทดลองไม่ลดลงแต่กลายเป็นน้ำหนักที่ค่อย ๆ เพิ่มขึ้นหลังการบาดเจ็บของหนูทดลองช้าลง ควบคู่กับการแสดงออกของซีฟอสที่เพิ่มมากขึ้นในไทโรเจมินัลนิวเคลียสของกลุ่มทดลองซึ่งบ่งบอกว่าการรับรู้ความเจ็บปวดเกิดขึ้น ดังนั้นการสังเกตพฤติกรรมของสัตว์ทดลองจากอัตราการเพิ่มขึ้นที่ช้าลงของน้ำหนัก สามารถใช้ช่วยประเมินความเจ็บปวดที่เกิดขึ้นในสัตว์ทดลองได้

ทั้งนี้การแสดงออกของซีฟอส ยังสามารถใช้ชดเชยการย้อมทางอิมมูโนฮิสโตเคมีร่วมกับตัวบ่งชี้ชนิดต่าง ๆ เพื่อบอกลักษณะเฉพาะของเซลล์ชนิดนั้น ๆ รวมถึงรูปแบบการกระตุ้นภายในสมอง^{25,26} และ

ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับความเจ็บปวดที่เกิดภายหลังการตายของเนื้อเยื่อใน ร่วมกับการมีรอยโรคปลายรากฟัน ในระยะเวลาที่แตกต่างกันไป ร่วมกับการเปลี่ยนแปลงของพฤติกรรมในสัตว์ทดลองด้วยวิธีอื่น ๆ เพื่อใช้เป็นวิธีการสังเกตในการทดลองที่เกี่ยวข้องกับความเจ็บปวดที่เกิดขึ้นจากเนื้อเยื่อในฟัน

บทสรุป

การศึกษานี้สรุปได้ว่า การอักเสบของเนื้อเยื่อในฟันซึ่งก่อให้เกิดความเจ็บปวด จะพบการแสดงออกของซีฟอสเพิ่มมากขึ้นในไทโรเจมินัลนิวเคลียส และมีอัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักรากฟันที่ซาลงในหนูทดลอง

เอกสารอ้างอิง

1. Frisad I. Dental Innervation: Functions and Plasticity After Peripheral Injury. *Acta Odontol Scand* 1997;55(4):236-54.
2. Chiang CY, Park SJ, Kwan CL, Hu JW, Sessle BJ. NMDA Receptor Mechanisms Contribute to Neuroplasticity Induced in Caudalis Nociceptive Neurons by Tooth Pulp Stimulation. *J Neurophysiol* 1998;80(5):2621-31.
3. Woolf CJ. Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain* 2011;152(3 Suppl):S2-15.
4. Byers MR, Chudler EH, Iadarola MJ. Chronic tooth pulp inflammation causes transient and persistent expression of Fos in dynorphin-rich regions of rat brainstem. *Brain Res* 2000;861(2):191-207.
5. Kaneko M, Sunakawa M, Matsui Y, Suda H. Responsiveness Changes of Tooth Pulp-Driven Neurons in Thalamic Ventral Posteromedial and Mediodorsal Nuclei Following Experimental Pulpitis and Naloxone Administration in Rats. *J Oral Biosci* 2005;47(2):135-48.
6. Kaneko M, Kaneko T, Kaneko R, Chokechanachaisakul U, Kawamura J, Sunakawa M, et al. The role of N-methyl-D-aspartate receptor subunits in the rat thalamic mediodorsal nucleus during central sensitization. *Brain Res* 2011;1371:16-22.
7. Curran T, MacConnell WP, van Straaten F, Verma IM. Structure of the FBJ murine osteosarcoma virus genome: molecular cloning of its associated helper virus and the cellular homolog of the v-fos gene from mouse and human cells. *Mol Cell Biol* 1983;3(5):914-21.
8. Chattipakorn SC, Light AR, Narhi M, Maixner W. The effects of noxious dental heating on the jaw-opening reflex and trigeminal Fos expression in the ferret. *J Pain* 2001;2(6):345-53.
9. Chattipakorn SC, Sigurdsson A, Light AR, Narhi M, Maixner W. Trigeminal c-Fos expression and behavioral responses to pulpal inflammation in ferrets. *Pain* 2002;99(1-2):61-9.
10. Harris JA. Using c-fos as a Neural Marker of Pain. *Brain Res Bull* 1998;45(1):1-8.
11. Locher-Claus MT, Erickson TE, Law AS, Johnson WT, Gebhart GF.

Effects of Pre-Emptive Morphine, Ibuprofen or Local Anesthetic on Fos Expression in the Spinal Trigeminal Nucleus Following Tooth Pulp Exposure in the Rat. *J Endod* 2005;31(8):578-83.

12. Chudler EH, Byers MR. Behavioural responses following tooth injury in rats. *Arch Oral Biol* 2005;50(3):333-40.

13. Tarsa L, Balkowiec-Iskra E, Kratochvil FJ, 3rd, Jenkins VK, McLean A, Brown AL, et al. Tooth pulp inflammation increases brain-derived neurotrophic factor expression in rodent trigeminal ganglion neurons. *Neuron* 2010;167(4):1205-15.

14. Chapman V, Honoré P, Buritova J, Besson JM. The contribution of NMDA receptor activation to spinal c-Fos expression in a model of inflammatory pain. *Br J Pharmacol* 1995;116(1):1628-34.

15. Weiser M, Baker H, Wessel TC, Joh TH. Axotomy-induced differential gene induction in neurons of the locus ceruleus and substantia nigra. *Brain Res Mol Brain Res* 1993;17(3):319-27.

16. Weiser M, Baker H, Joh TH. Gene expression in central cholinergic neurons in response to axotomy and deafferentation. *Synapse* 1994;16(2):81-92.

17. Hunt SP, Pini A, Evan G. Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature* 1987;328(6131):632-4.

18. Coggeshall RE. Fos, nociception and the dorsal horn. *Prog Neurobiol* 2005;77(5):299-352.

19. Dubner R, Bennett GJ. Spinal and trigeminal mechanisms of nociception. *Annu Rev Neurosci* 1983;6(1):381-418.

20. Chattipakorn S, Chattipakorn N, Light AR, Narhi M, Maixner W. Comparison of Fos Expression Within the Ferret's Spinal Trigeminal Nuclear Complex Evoked by Electrical or Noxious-Thermal Pulpal Stimulation. *J Pain* 2005;6(9):569-80.

21. Ossipov MH, Dussor GO, Porreca F. Central modulation of pain. *J Clin Invest* 2010;120(11):3779-87.

22. Sessle BJ. Acute and chronic craniofacial pain: brainstem mechanisms of nociceptive transmission and neuroplasticity, and their clinical correlates. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000;11(1):57-91.

23. Grassi-Zucconi G, Menegazzi M, De Prati AC, Bassetti A, Montagnese P, Mandile P, et al. C-fos mRNA is Spontaneously Induced in the Rat Brain During the Activity Period of the Circadian Cycle. *Eur J Neurosci* 1993;5(8):1071-8.

24. Osacka J, Szelle Cernackova A, Horvathova L, Majercikova Z, Pirnik Z, Kiss A. Clozapine impact on c-Fos expression in mild stress preconditioned male rats exposed to a novelty stressor. *J Neurosci Res* 2018;96(11):1786-97.

25. Walker LC, Kastman HE, Krstew EV, Gundlach AL, Lawrence AJ. Central amygdala relaxin-3/relaxin family peptide receptor 3 signalling modulates alcohol seeking in rats. *Br J Pharmacol* 2017;174(19):3359-69.

26. Mahler SV, Aston-Jones GS. Fos activation of selective afferents to ventral tegmental area during cue-induced reinstatement of cocaine seeking in rats. *J Neurosci* 2012;32(38):13309-26.