

ความเจ็บปวดที่เกิดจากแรงทางทันตกรรมจัดฟันเพิ่มการแสดงออกของตัวรับทรานเซียนทีรีเซปเตอร์โพเทนเซียลวานิลลอยด์ 1 และสารสื่อประสาทซัสแตนซ์ พี

Pain induced by orthodontic force upregulates Transient Receptor Potential subtype 1 and Substance P expressions

เพ็งเฉลย ธรรมาณิชาณนท์¹, อันวยา แก้วพิทักษ์², ชิดชนก ลิธนะกุล¹

Peungchaleoy Thammanichanon¹, Aunwaya Kaewpitak², Chidchanok Leethanakul¹

¹อนุสาขาวิชาทันตกรรมจัดฟัน สาขาวิชาทันตกรรมป้องกัน คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จังหวัดสงขลา ประเทศไทย

¹Section of Orthodontics, Department of Preventive Dentistry, Faculty of Dentistry, Prince of Songkla University, Songkhla, Thailand

²อนุสาขาวิชาทันตกรรมสำหรับเด็ก สาขาวิชาทันตกรรมป้องกัน คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จังหวัดสงขลา ประเทศไทย

²Section of Pediatric Dentistry, Department of Preventive Dentistry, Faculty of Dentistry, Prince of Songkla University, Songkhla, Thailand

บทคัดย่อ

เพื่อศึกษาลักษณะของตัวรับทรานเซียนทีรีเซปเตอร์โพเทนเซียลวานิลลอยด์ 1 (Transient receptor potential vanilloid subtype 1, TRPV1) ในเซลล์ประสาทของเส้นประสาทคู่ที่ 5 และความสัมพันธ์ของตัวรับทรานเซียนทีรีเซปเตอร์โพเทนเซียลวานิลลอยด์ 1 กับซัสแตนซ์ พี (Substance P, SP) ระหว่างการได้รับแรงทางทันตกรรมจัดฟัน หนูทดลองสายพันธุ์วิสตา (Wistar) เพศผู้ 8 สัปดาห์ จำนวน 25 ตัว ได้รับแรงทางทันตกรรมจัดฟันต่อเนื่องขนาด 50 กรัมเป็นเวลา 12 ชั่วโมง, 24 ชั่วโมง, 3 วัน และ 7 วัน ส่วนกลุ่มควบคุมไม่ได้รับแรงกระตุ้นค่าความเจ็บปวดที่แสดงออกของใบหน้า (Rat Grimace Scale Scores, RGS scores) ใช้เพื่อวัดพฤติกรรมความเจ็บปวด ความสัมพันธ์ของตัวรับทรานเซียนทีรีเซปเตอร์โพเทนเซียลวานิลลอยด์ 1 และซัสแตนซ์ พี ประเมินด้วยวิธีทางอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ คะแนนค่าความเจ็บปวดที่แสดงออกของใบหน้าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่เวลา 24 ชั่วโมง และ 3 วัน การวัดขนาดเซลล์พบว่าเซลล์ที่แสดงออกของตัวรับทรานเซียนทีรีเซปเตอร์โพเทนเซียลวานิลลอยด์ 1 ประมาณ 75 - 84 เปอร์เซ็นต์ เป็นเซลล์ขนาดเล็กถึงกลาง ร้อยละของเซลล์ที่แสดงออกของตัวรับทรานเซียนทีรีเซปเตอร์โพเทนเซียลวานิลลอยด์ 1 และสารสื่อประสาทซัสแตนซ์ พี และร้อยละการแสดงออกร่วมกันระหว่างตัวรับทรานเซียนทีรีเซปเตอร์โพเทนเซียลวานิลลอยด์ 1 และซัสแตนซ์ พี เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญใน 24 ชั่วโมงและวันที่ 3 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ความสัมพันธ์ของคะแนนค่าความเจ็บปวดที่แสดงออกของใบหน้าที่ตัวรับทรานเซียนทีรีเซปเตอร์โพเทนเซียลวานิลลอยด์ 1 และซัสแตนซ์ พี กับตัวรับทรานเซียนทีรีเซปเตอร์โพเทนเซียลวานิลลอยด์ 1 เป็นความสัมพันธ์เชิงบวก แรงทางทันตกรรมจัดฟันกระตุ้นให้เกิดความเจ็บปวดโดยการกระตุ้นการแสดงออกของตัวรับทรานเซียนทีรีเซปเตอร์โพเทนเซียลวานิลลอยด์ 1 ซึ่งชักนำให้หลังซัสแตนซ์ พี ตัวรับทรานเซียนทีรีเซปเตอร์โพเทนเซียลวานิลลอยด์ 1 เป็นเป้าหมายหนึ่งในการรักษาที่สำคัญเพื่อลดความเจ็บปวด

คำสำคัญ : ตัวรับความรู้สึกเจ็บปวด, การเคลื่อนฟัน, เซลล์ประสาทของเส้นประสาทคู่ที่ 5

Abstract

To evaluate the characteristics of TRPV1 receptor in trigeminal ganglion neurons and the interaction of TRPV1 with SP after orthodontic force application. Twenty five 8-week-old Wistar rats were applied continuous orthodontic force (50 g) on both maxillary first molars at 12 hours, 24 hours, 3 days, and 7 days. Control group received any no intervention. Rat grimace scale scores (RGS scores) was used to measure orthodontic pain. The relationship of TRPV1 with SP was evaluated using double immunofluorescence staining. Application of orthodontic force increased the

RGS score at 24 hours and 3 days, compared to control group. Cell size measurements showed that TRPV1 expressing trigeminal neurons is derived from of small and medium diameter. Moreover, the percentages of TRPV1- and SP-positive cells relative to the total number of cells and the percentages of trigeminal neurons co-expressing TRPV1/SP significantly increased at 24 hours and 3 days. Correlation coefficients indicated RGS scores correlated positively with the levels of TRPV1. TRPV1 was also correlated positively with the levels of SP. Orthodontic force activates orthodontic pain via stimulation of expressed TRPV1, which induce SP releasing. TRPV1 serves as one of important therapeutic target to decrease orthodontic pain.

Keywords : Nociceptors, Tooth movement, Trigeminal neuron

Date: Jan 15, 2021 **Revised Date:** Feb 11, 2021 **Accepted Date:** Mar 9, 2021

doi: 10.14456/jdat.2021.30

ติดต่อเกี่ยวกับบทความ :

ชิดชนก ลีธนะกุล, อนุสาขาวิชาทันตกรรมจัดฟัน สาขาวิชาทันตกรรมป้องกัน คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จังหวัดสงขลา 90112 ประเทศไทย โทรศัพท์: 0-7428-7600 อีเมล: chidchanok.l@psu.ac.th or nokleethanakul@yahoo.com

Correspondence to :

Chidchanok Leethanakul, Department of Preventive Dentistry, Faculty of Dentistry, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90112, Thailand. Tel: 0-7428-7600 Email: chidchanok.l@psu.ac.th or nokleethanakul@yahoo.com

บทนำ

ความเจ็บปวดทางทันตกรรมจัดฟันเป็นปัญหาหนึ่งของ การรักษาทางทันตกรรมจัดฟัน ส่งผลให้ผู้ป่วยไม่ต้องการเข้ารับการรักษาหรือรับการรักษานี้ต่อเนื่อง แม้ว่าความเจ็บปวดนี้มีระดับน้อยถึงปานกลางแต่อย่างไรก็ตามอาจส่งผลถึงคุณภาพชีวิตด้านสุขภาพได้ ความเจ็บปวดทางทันตกรรมจัดฟันเกิดจากการให้แรงทางทันตกรรมจัดฟันสู่ตัวฟันเพื่อให้เกิดการเคลื่อนที่ของฟันไปในตำแหน่งใหม่ แรงนี้กระตุ้นให้เกิดการตอบสนองและการเปลี่ยนแปลงทางชีวโมเลกุลภายในช่องว่างเนื้อเยื่อปริทันต์ (Periodontal ligament space) รวมถึงกระตุ้นปลายประสาทรับความรู้สึก (Sensory nerve ending) ที่อยู่ในเนื้อเยื่อปริทันต์¹ หลังสารที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบและทำให้เกิดความเจ็บปวดในระยะแรกของการได้รับแรง² ความเจ็บปวดทางทันตกรรมจัดฟันนี้เริ่มเกิดขึ้นหลังจากได้รับแรงทางทันตกรรมจัดฟันเป็นเวลา 12 ชั่วโมง และสูงสุดในเวลา 1 วัน จากนั้นจะค่อย ๆ ลดลงในวันที่ 3 ถึง 74 และกลับสู่ระดับปกติใน 1 เดือน

ตัวรับทรานเซียนทีรีเซปเตอร์โพเทนเซียลวานิลลอยด์ 1 (Transient receptor potential vanilloid subtype 1, TRPV1) เป็นตัวรับความรู้สึกเจ็บปวดที่มาจากหลายทาง (Polymodal receptor) เช่น ความร้อนที่อุณหภูมิมากกว่า 52 องศาเซลเซียส กรดที่มีค่าความเป็นกรดต่างน้อยกว่า 6.9 กระแสไฟฟ้าและสารแคปไซซิน ตัวรับความ

รู้สึกนี้พบมากในเซลล์ประสาทนำเข้าความรู้สึก (Sensory afferent neuron) เช่น ปมประสาทไขสันหลัง (Dorsal root ganglion, DRG) ปมประสาทของประสาทสมองคู่ที่ 5 (Trigeminal ganglion, TG)³ การศึกษาของ SHIMIZU และคณะ⁴ พบการย้อมติด TRPV1 (TRPV1-immunoreactivity) ในเส้นใยประสาทส่วนเยื่อหุ้มสมองชั้นนอกที่ส่งมาจากปมประสาทของประสาทสมองคู่ที่ 5 นอกจากนี้การกระตุ้น TRPV1 จะเกิดขบวนการฟอสฟอริเลชัน (Phosphorylation) จากการกระตุ้นของโปรตีนไคเนส (Protein kinase) นำไปสู่การเปลี่ยนแปลงความไวต่อการกระตุ้นของความรู้สึกเจ็บปวด (Pain sensitivity)⁷ ปมประสาทของประสาทสมองคู่ที่ 5 ประกอบด้วยเซลล์ประสาทตัวที่หนึ่ง (First order neuron) ของระบบกายสัมผัสทั่วไป (Somatosensory system) ที่ส่งมาจากตัวรับและปลายประสาทที่ไม่มีเปลือกหุ้มในเนื้อเยื่อบริเวณใบหน้าและช่องปาก แสดงว่า TRPV1 มีบทบาทสำคัญต่อการส่งสัญญาณความเจ็บปวดจากช่องปากและใบหน้า⁸ นอกจากนี้ การศึกษาที่ผ่านมาในหนูทดลองพบว่า เมื่อให้แรงทางทันตกรรมจัดฟัน พบความสัมพันธ์ของ TRPV1 กับการหลั่งสารสื่อประสาทชนิดแคลซิโทนิน ยีน รีเลทเตด เปปไทด์ (Calcitonin gene-related peptide, CGRP) ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทที่มีบทบาทสำคัญในระยะแรกของการเคลื่อนฟันในการตอบสนองต่อการอักเสบ โดยเพิ่ม

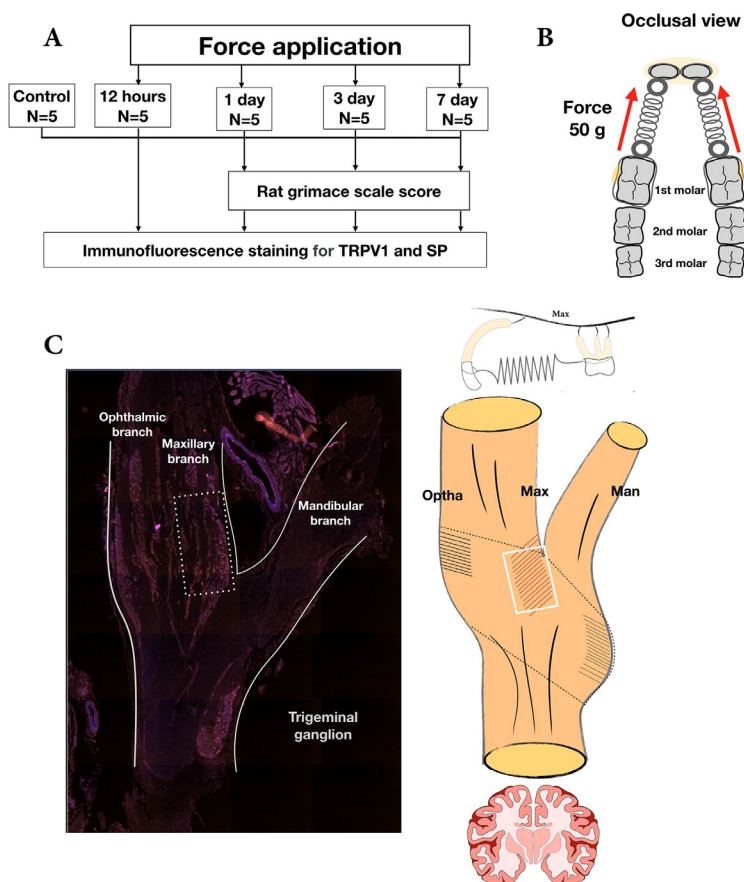
การไหลเวียนของหลอดเลือดและการซึมผ่านของเซลล์ที่ผนังหลอดเลือดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันและชักนำเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น เซลล์แมโครฟาจ (Macrophage) และโมโนไซต์ (Monocyte) เข้ามายังบริเวณที่ได้รับแรงเค้นฟันทันนั้น อย่างไรก็ตามสารสื่อประสาทเหล่านี้ยังมีส่วนในการควบคุมการปรับปรุงกระดูกทั้งการสร้างและการละลายกระดูกอีกด้วย⁹

ซับสแตนท์ พี (Substance P, SP) เป็นหนึ่งในสารสื่อประสาทของความเจ็บปวดและทำหน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกันโดย SP กระตุ้นการสร้างสารไซโตไคน์และคีโมไคน์ ทำให้เกิดการกระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวมาบริเวณที่มีการอักเสบ^{10,11} อย่างไรก็ตามการศึกษาที่ผ่านมายังไม่พบการศึกษาเรื่องความสัมพันธ์ของ TRPV1 กับการหลั่งสารสื่อประสาทชนิด SP ในทางทันตกรรมจัดฟัน ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษานี้คือ เพื่อดูผลของแรงทางทันตกรรมจัดฟันที่ทำให้เกิดความเจ็บปวดต่อการแสดงออกของ TRPV1 และสารสื่อประสาท SP

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

สัตว์ทดลอง (Animal)

หนูขาวใหญ่สายพันธุ์วิสตา เพศผู้ น้ำหนัก 200–250 กรัม อายุ 2 เดือน จากบริษัท โนมูระ สยาม อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด ขั้นตอนการทดลองได้รับการอนุมัติให้ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์จากคณะกรรมการจริยบรรณสัตว์ทดลองมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เลขที่ ศร 0521.11/139 สัตว์ทดลองถูกเลี้ยงก่อนการทดลองอย่างน้อย 1 สัปดาห์ ระหว่างการทดลองสัตว์ทดลองถูกเลี้ยงในสถานที่สะอาด ได้รับอาหารสำเร็จรูปอัดเม็ดใส่ภาชนะสำหรับให้อาหารแขวนในกรง และน้ำผ่านเครื่องกรองชนิด reverse osmosis เพียงพอตลอดทั้งวัน มีการควบคุมเวลากลางวันกลางคืนโดยการกำหนดเปิด-ปิดไฟฟ้าทุก 12 ชั่วโมง และอยู่ในห้องที่มีการควบคุมอุณหภูมิ กลุ่มการทดลองแบ่งออกตามช่วงเวลา คือ กลุ่มควบคุมไม่ได้รับแรงและกลุ่มให้แรงเคลื่อนที่ฟัน 12 ชั่วโมง 1 วัน 3 วัน และ 7 วันดังแสดงตามรูปที่ 1A



รูปที่ 1 A. แผนผังแสดงเวลาการทดลอง B. ภาพการติดสปริงนิกลไกไทเทเนียมชนิด close coil ระหว่างฟันกรามซี่ที่หนึ่งบนไปยังฟันตัดหน้าเพื่อให้แรงในการเคลื่อนฟัน 50 กรัม C. แผนภาพแสดงพื้นที่การวิเคราะห์ผลบริเวณแขนงเส้นประสาทแมกซิลลารี (Maxillary branch) ของปมประสาทของประสาทสมองคู่ที่ 5 ในพื้นที่สี่เหลี่ยมสีขาว

Figure 1 A. Timeline of the experiment. B. Coil-springs were inserted between the incisors and maxillary first molars the springs were activated to exert 50 g force. C. Representative analysis area of the maxillary branch of the trigeminal ganglion (white rectangle)

ขั้นตอนการติดเครื่องมือ (Force application)

หนูที่ได้รับการให้แรงเคลื่อนฟันที่จะถูกทำให้สลบโดยการให้ยาเคตามีน (Ketamine) ปริมาณ 30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมร่วมกับไซลาซีน (Xylazine) ปริมาณ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมเข้าทางช่องท้อง การให้แรงเคลื่อนฟันทำโดยการติดสปริงนิกเกิลไทเทเนียมชนิด close coil ระหว่างฟันกรามซี่ที่หนึ่งบนไปยังฟันตัดหน้าทั้งสองข้าง ตัวสปริงยึดกับฟันโดยใช้ลวดลิกเจอร์ (Ligature wire) ขนาด 0.008 นิ้ว พันรอบตัวฟันและใช้เรซินคอมโพสิตที่ไหลแห้งได้ที่มีการบ่มตัวด้วยแสง (Flowable light cure resin composite) นี๊ดบนลวดทั้งด้านแก้มและด้านเพดานเพื่อกันไม่ให้ลวดเคลื่อนที่หลุดออกจากฟัน แรงสปริงที่ให้แก่ฟันกรามซี่ที่หนึ่งในการเคลื่อนที่ไปทางใกล้กลางมีขนาด 50 กรัม¹² ดังแสดงตามรูปที่ 1B

การวิเคราะห์พฤติกรรมความเจ็บปวด (Pain behavior analysis)

การวิเคราะห์พฤติกรรมความเจ็บปวดในการศึกษานี้ใช้วิธีประเมินค่าความเจ็บปวดที่แสดงออกของใบหน้า (Rat Grimace Scale, RGS)¹³ โดยนำหนูทดลองใส่กล่องพลาสติกใสขนาด 10 x 10 x 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร ในสิ่งแวดล้อมที่สงบ ทำการเก็บข้อมูลในช่วง active phase คือ 12 dark phase ในวันที่ 1 3 และ 7 ด้วยกล้องวิดีโอสองตัววางอยู่ด้านหน้าและหลังกล่อง เป็นเวลา 30 นาที และนำมาแปลงเป็นรูปภาพจำนวน 10 ภาพ มีระยะห่างทุก ๆ 3 นาที รวมเป็น 20 ภาพต่อหนู 1 ตัว การวิเคราะห์คะแนนค่าความเจ็บปวดที่แสดงออกของใบหน้าอ้างอิงจากการศึกษาของ Sotocinal และคณะ¹⁴ คะแนนค่าความเจ็บปวดของแต่ละภาพพิจารณาจาก

การเฉยเคแสนของ 4 ลักษณะของใบหน้าส่วนตา หู จมูก และหนวด โดยแต่ละส่วนมีค่าคะแนน 0 ถึง 2 ดังแสดงตามรูปที่ 2 โดยไม่รวมระยะเวลาที่หนูเกลื่อนหน้าหรือหลับ

1. ลักษณะการเปิดตา

คะแนน 0 คือ เปิดตาปกติ

คะแนน 1 คือ หรีตาไม่เกินครึ่งหนึ่ง

คะแนน 2 คือ หรีตาเกินครึ่งหนึ่ง

2. ลักษณะสันจมูกและร่องระหว่างจมูกกับแก้ม

คะแนน 0 คือ พบสันจมูกและมีร่องระหว่างจมูกกับแก้มชัดเจน

คะแนน 1 คือ พบสันจมูกและมีร่องระหว่างจมูกกับแก้มไม่ชัดเจน

คะแนน 2 คือ ไม่พบพบสันจมูกและมีร่องระหว่างจมูกกับแก้ม

3. ลักษณะรูปร่างและตำแหน่งหู

คะแนน 0 คือ ใบหูรูปร่างกลมตั้งตรงกับหัว

คะแนน 1 คือ ใบหูลู่และเอียงออกจากหัวไม่เกิน 45 องศา

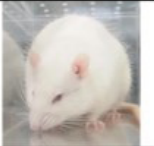
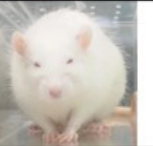
คะแนน 2 คือ ใบหูลู่และเอียงออกจากหัวเกินกว่า 45 องศา

4. ลักษณะหนวด

คะแนน 0 คือ หนวดปกติจะกระจายและไม่เกร็งและเอียงต่ำเข้าหาใบหน้า

คะแนน 1 คือ หนวดเกร็งและลู่อ้วนกัน

คะแนน 2 คือ หนวดเกร็งและลู่อ้วนกันชัดเจนและเอียงตั้งฉากใบหน้า หลังจากนั้นทำการเฉยเคแสนจาก 20 ภาพของหนู 1 ตัว ทำการวิเคราะห์หนูทดลองกลุ่มควบคุมและกลุ่มให้แรงเคลื่อนที่ฟัน 1 วัน 3 วัน และ 7 วัน กลุ่มละ 5 ตัว

	0	1	2
ลักษณะการเปิดตา			
ลักษณะสันจมูกและแก้ม			
ตำแหน่งและรูปร่างของหู			
ลักษณะหนวด			

รูปที่ 2 การให้คะแนนค่าความเจ็บปวดที่แสดงออกของใบหน้า

Figure 2 Rat Grimace Scale scoring

การเตรียมตัวอย่างและการย้อมอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ (Histological procedure and immunofluorescence staining)

หลังจากเก็บข้อมูลพฤติกรรมความเจ็บปวด หนูทดลอง กลุ่มควบคุมและกลุ่มให้แรงเคลื่อนที่ฟัน 12 ชั่วโมง 1 วัน 3 วัน และ 7 วัน ถูกวางยาสลบและทำการฉีดยาด้วยวิธี perfusion โดยสารน้ำ Phosphate Buffer Saline (PBS) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ตามด้วย paraformaldehyde (PFA) ความเข้มข้นร้อยละ 4 ปริมาตร 400 มิลลิลิตร จากนั้นจึงผ่าเปิดกะโหลกเพื่อเก็บส่วน ปมประสาทของประสาทสมองคู่ที่ 5 นำชิ้นเนื้อเยื่อแช่สาร PFA ร้อยละ 4 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เพื่อป้องกันการเสื่อมสลายและคงสภาพของเนื้อเยื่อด้วยตามด้วยสารซูโครส (Sucrose) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 30 เพื่อป้องกันการอันตรายจากการเกิดผื่นน้ำแข็ง (Cryoprotection) เนื้อเยื่อปมประสาทของประสาทสมองคู่ที่ 5 ถูกแช่ในน้ำยาดักกลางช่วยยึดตัวอย่างเนื้อเยื่อ (Tissue freezing medium) และตัดที่ความหนา 5 ไมโครเมตร มีระยะห่าง 50 ไมโครเมตรตามแนว sagittal ด้วยเครื่องตัดเย้น

จากนั้นทำการคืนสภาพแอนติเจน (Antigen retrieval technique) โดยนำสไลด์แช่ สารน้ำ Citrate Buffer ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ที่มีค่า pH เท่ากับ 6.0 เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ล้างด้วย PBS 10 นาที 3 ครั้ง บ่มใน 10% normal donkey serum ใน PBS ที่มีส่วนผสมของ Triton X-100 ร้อยละ 0.25 เป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ตามลำดับ หลังจากนั้นบ่มไว้ข้ามคืนด้วยแอนติบอดี ชนิดที่ 1 (Primary antibody) คือ polyclonal rabbit anti-TRPV1 และ polyclonal guinea pig anti-Substance P โดยใช้อัตราส่วน 1:500 ละลายกับ normal donkey serum ร้อยละ 5 ใน PBS ที่ผสม Triton X-100 ร้อยละ 0.25 ล้างด้วย PBS 10 นาที 3 ครั้งบ่มด้วยแอนติบอดี ชนิดที่ 2 (Second antibody) donkey anti-guinea pig IgG-Brilliant Violet 421 และ donkey anti-rabbit IgG- Cyanine (Cy3) เป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำตัวอย่างสไลด์ดูผลผ่านกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ กลุ่มควบคุมเชิงลบ (Negative control) ทำการย้อมเช่นเดียวกันกับกลุ่มอื่นแต่ไม่ย้อมด้วยแอนติบอดี ชนิดที่ 1

การเก็บข้อมูล (Data collection)

การเก็บผลการทดลองของทุกกลุ่มทำการกำหนดกรอบตำแหน่งที่สนใจ (Regions of interest) คือ บริเวณจากจุดแยก (Bifurcation) ของแขนงเส้นประสาทแมกซิลลารี (Maxillary branch) และเส้นประสาทแมนดิบูลาร์ (Mandibular branch) ของปมประสาทของประสาทสมองคู่ที่ 5 ขนานตามแนวของแขนงเส้นประสาทแมกซิลลารี ขนาด 500 × 1000 ตารางไมโครเมตร

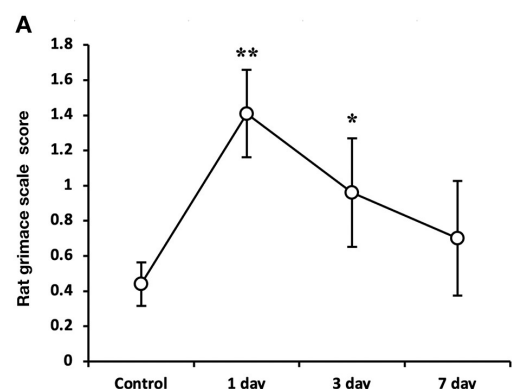
ดังแสดงตามรูปที่ 1C การวิเคราะห์จำนวนเซลล์ประสาทในกรอบตำแหน่งที่สนใจมีจำนวนแต่ละกลุ่มการทดลองอยู่ที่ 2360 – 2885 เซลล์ แบ่งขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเซลล์ตามการศึกษาของ Messlinger และ Russo¹⁵ ออกเป็น 3 ขนาด คือ ขนาดเล็ก (ขนาดเล็กกว่า 20 ไมโครเมตร) ขนาดกลาง (ขนาด 20 - 35 ไมโครเมตร) และขนาดใหญ่ (ขนาดใหญ่กว่า 35 ไมโครเมตร) และการวิเคราะห์จำนวนเซลล์ประสาทที่แสดงออกของ TRPV1 และ SP ทั้งหมดในตำแหน่งที่สนใจโดยใช้โปรแกรม Zen software version 2.6 blue edition (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล (statistical analysis)

ข้อมูลการทดลองวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมสถิติ SPSS (version 17.0, SPSS Inc.) ข้อมูลของผลพฤติกรรมความเจ็บปวดและการย้อมพิเศษทางอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์แสดงเป็นค่าเฉลี่ยเลขคณิตและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน พิจารณาการแจกแจงแบบปกติด้วยสถิติ Shapiro-Wilk test ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละกลุ่มของข้อมูลพฤติกรรมความเจ็บปวด และค่าการย้อมพิเศษทางอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ในแต่ละช่วงเวลาหลังจากการได้รับแรงทางทันตกรรมจัดฟันโดยใช้สถิติ One way analysis of variance (One-way ANOVA) การทดสอบสมมติฐานกำหนดระดับนัยสำคัญที่ 0.05

ผลการศึกษาของการให้แรงการเคลื่อนฟันต่อคะแนนค่าความเจ็บปวดที่แสดงออกของใบหน้า

คะแนนค่าความเจ็บปวดที่แสดงออกของใบหน้าหลังรับแรงทางทันตกรรมจัดฟันเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญและมีค่าสูงสุดที่ 24 ชั่วโมงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และยังคงเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในวันที่ 3 จากนั้นมีค่าลดลงถึงระดับปกติในวันที่ 7 (รูปที่ 3) ผลการศึกษานี้บ่งบอกการให้แรงทางทันตกรรมจัดฟันกระตุ้นความเจ็บปวดขึ้น



รูปที่ 3 กราฟแสดงคะแนนค่าความเจ็บปวดที่แสดงออกของใบหน้าหลังรับแรงทางทันตกรรมจัดฟัน

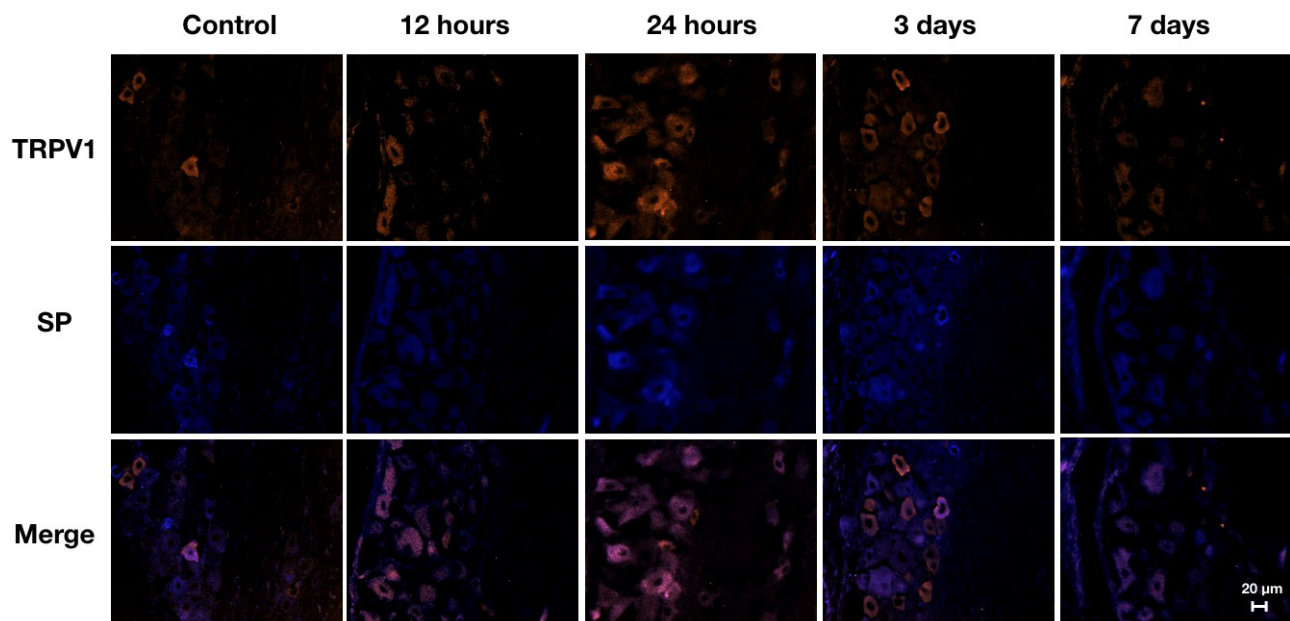
Figure 3 Line graph showing rat grimace scale score following the application of orthodontic force

ผลการศึกษาของการให้แรงกระตุ้นต่อการแสดงออกของ TRPV1 และ SP ทางการย้อมอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์

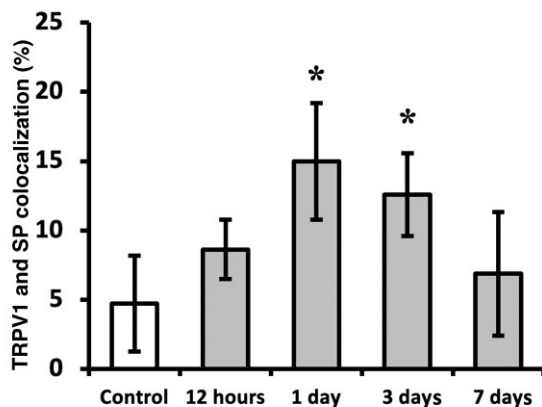
เมื่อให้แรงทางทันตกรรมจัดฟันบนตัวฟันร้อยละของเซลล์ที่แสดงออกของ TRPV1 และสารสื่อประสาท SP เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในวันที่ 1 และ 3 ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

(รูปที่ 4B) นอกจากนี้ค่าร้อยละของการแสดงออกร่วมกันในเซลล์เดียวกัน (Percentages of cells co-expressing) ของ TRPV1 และสารสื่อประสาท SP เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในวันที่ 1 และ 3 ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 4C)

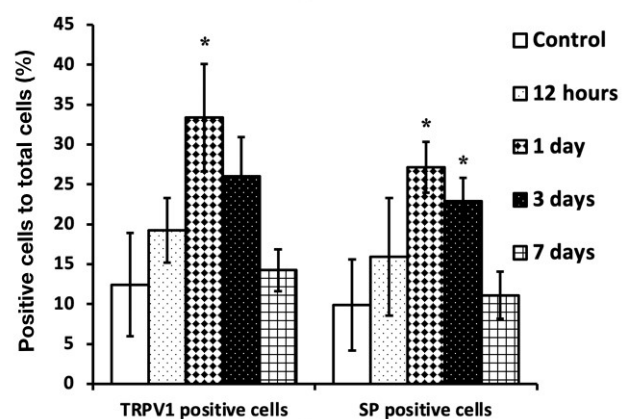
A



B



C



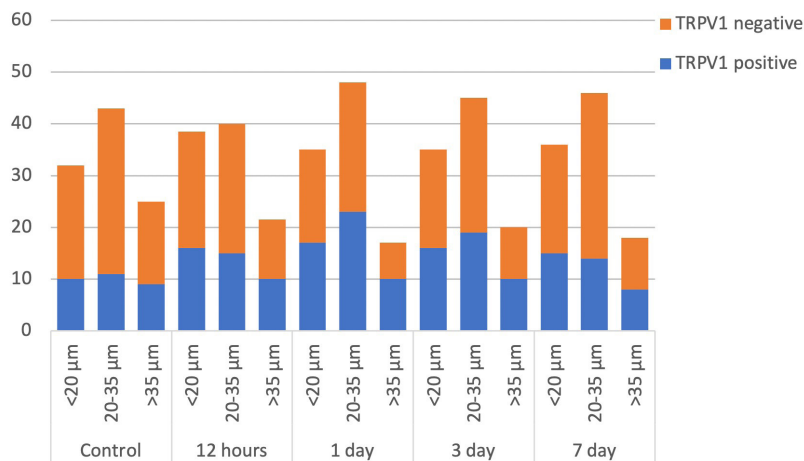
รูปที่ 4 A. รูปการย้อมอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ แถวบน คือ การย้อม TRPV1 แถวกลาง คือ การย้อมสารสื่อประสาท SP แถวล่าง คือ การย้อมร่วมกันของ TRPV1 และ SP B. กราฟแสดงร้อยละของเซลล์ที่แสดงออกของ TRPV1 และร้อยละของเซลล์ที่แสดงออกของ SP C. ร้อยละของการแสดงออก ร่วมกันในเซลล์เดียวกันของ TRPV1 และ SP

Figure 4 A. Images of trigeminal neurons stained for TRPV1 (Top panel), SP (middle panel) and merged images (Bottom panel). B. Bar graph of the percentage of TRPV1 positive cells and SP positive cells relative to total cells. C. Bar graph of the percentage of TRPV1/SP co-expressing cells

ผลการศึกษาขนาดเซลล์ประสาทที่แสดงออกของ TRPV1 หลังจากการให้แรงการเคลื่อนฟัน

ผลการศึกษาพบว่า TRPV1 มีการแสดงออกเซลล์ประสาทในเซลล์ประสาทขนาดเล็กถึงขนาดกลาง (ขนาดเล็กกว่า 35 ไมโครเมตร) คิดเป็นร้อยละ 75 - 84 ของเซลล์ที่มีการแสดงออกของ TRPV1 เมื่อให้แรงทางทันตกรรมจัดฟันเป็นเวลาวันที่ 1 พบการแสดงออกของ

TRPV1 ในเซลล์ประสาทขนาดเล็กถึงขนาดกลางเพิ่มขึ้น 19 % และในเซลล์ประสาทขนาดใหญ่ (มากกว่า 35 ไมโครเมตร) เพิ่มขึ้น 1% และพบว่าในวันที่ 3 เซลล์ประสาทขนาดเล็กถึงกลางมีการแสดงออกของ TRPV1 เพิ่มขึ้น 14 % และเซลล์ประสาทขนาดใหญ่เพิ่มขึ้น 1% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 5)



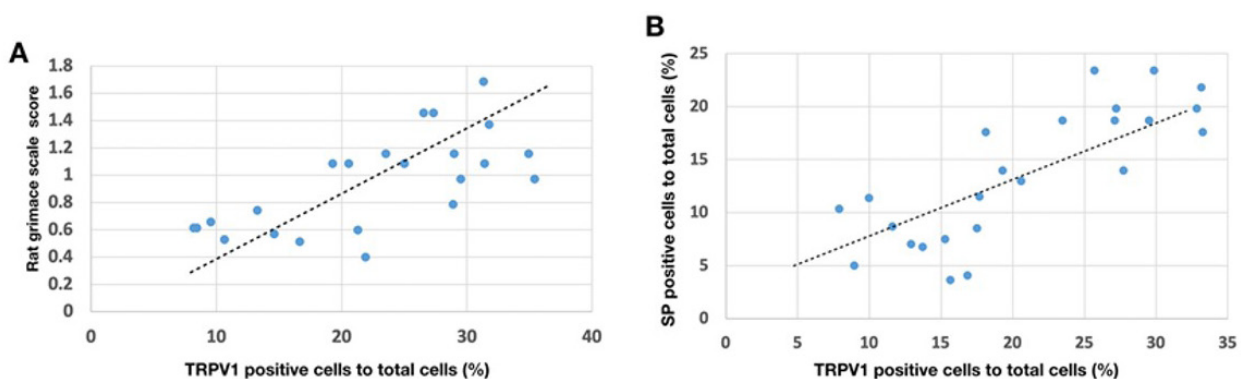
รูปที่ 5 กราฟแสดงขนาดเซลล์ประสาทที่มีการแสดงออกของ TRPV1 หลังได้รับแรงทางทันตกรรมจัดฟัน

Figure 5 Bar graph of cell size distribution analysis of TRPV1 expressing trigeminal neurons following the application of orthodontic force

ผลการศึกษาของความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของเซลล์ที่แสดงออกของ TRPV1 กับพฤติกรรมความเจ็บปวดและร้อยละของเซลล์ที่แสดงออกของสารสื่อประสาท SP

ผลการศึกษาพบความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างร้อยละของเซลล์ที่แสดงออกของ TRPV1 กับคะแนนค่าความเจ็บปวดที่แสดง

ออกของใบหน้า ($p < 0.05$, $r = 0.625$) ดังแสดงตามรูปที่ 6A และความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างร้อยละของเซลล์ที่แสดงออกของ TRPV1 กับร้อยละของเซลล์ที่แสดงออกของสารสื่อประสาท SP ($p < 0.05$, $r = 0.545$) ดังแสดงตามรูปที่ 6B



รูปที่ 6 A. ความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างร้อยละของเซลล์ที่แสดงออกของ TRPV1 กับคะแนนค่าความเจ็บปวดที่แสดงออกของใบหน้า B. ความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างร้อยละของเซลล์ที่แสดงออกของ TRPV1 กับร้อยละของเซลล์ที่แสดงออกของสารสื่อประสาท SP

Figure 6 A. Positive correlation between the percentages of TRPV1- positive cells and rat grimace scale score. B. Positive correlation between the percentages of TRPV1- positive cells and the percentages of SP- positive cells

บทวิจารณ์

ผลการศึกษา พบว่า การให้แรงทางทันตกรรมจัดฟันกระตุ้นให้เกิดความเจ็บปวดทางพฤติกรรมและการเพิ่มขึ้นของร้อยละของเซลล์ที่แสดงออกของ TRPV1 และสารสื่อประสาท SP รวมถึงร้อยละของการแสดงออกร่วมกันในเซลล์เดียวกัน (Percentages of cells co-expressing) ของ TRPV1 และสารสื่อประสาท SP นอกจากนี้ยังพบความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างร้อยละของเซลล์ที่แสดงออกของ TRPV1 กับพฤติกรรมความเจ็บปวดและความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างร้อยละของเซลล์ที่แสดงออกของ TRPV1 กับร้อยละของเซลล์ที่แสดงออกของสารสื่อประสาท SP ผลการศึกษานี้แสดงถึงการกระตุ้น TRPV1 ส่งผลต่อการหลั่งของสารสื่อประสาท SP ที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณความเจ็บปวดภายหลังการให้แรงทางทันตกรรมจัดฟัน

เนื่องจากการรับรู้ความเจ็บปวดเป็นข้อมูลของแต่ละบุคคลที่มีผลมาจากประสบการณ์ความเจ็บปวดที่ได้รับ สภาวะร่างกาย และชนิดของการเคลื่อนฟัน การทดลองนี้จึงเลือกใช้หนูขาวใหญ่สายพันธุ์วิสตาห์ เพื่อลดผลจากปัญหาเหล่านี้ การใช้แรงมาก (Heavy force) คือ ขนาด 50 กรัม เพื่อกระตุ้นให้เกิดการเจ็บปวดฟัน¹² การศึกษานี้ใช้วิธีประเมินค่าความเจ็บปวดที่แสดงออกของใบหน้าเนื่องจากเป็นวิธีที่ปฏิบัติง่าย ทำซ้ำได้ มีความน่าเชื่อถือและไม่ก่อให้เกิดอันตราย¹⁴

การให้แรงทางทันตกรรมจัดฟันสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดความเจ็บปวดในช่วง 1 ถึง 3 วันแรกหลังการให้แรงทางทันตกรรมจัดฟัน คิดเป็นร้อยละ 94 ของผู้ป่วยทั้งหมด²² และลดลงใน 7 วัน^{4,16,17} ผลของการศึกษานี้ พบว่า ค่าความเจ็บปวดที่แสดงออกทางใบหน้าของหนูขาวใหญ่สายพันธุ์วิสตาห์ สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในวันที่ 1 และลดลงแต่ยังสูงอย่างมีนัยสำคัญในวันที่ 3 หลังจากได้รับแรงสอดคล้องกับการศึกษาของ Erdinc และ Dincer¹⁷ พบว่า ผู้ป่วยให้ค่ามาตรวัดความปวดด้วยสายตา (Visual analog scale, VAS) สูงอย่างมีนัยสำคัญหลังจากได้รับแรงทางทันตกรรมจัดฟัน 6 ชั่วโมงถึง 4 วันและมีค่าสูงที่สุดในวันที่ 1

นอกจากนี้การศึกษานี้ผ่านมา พบว่า การเกิดความเจ็บปวดดังกล่าวสัมพันธ์กับการกระตุ้นการทำงานและการเพิ่มการแสดงออกของตัวรับความเจ็บปวด TRPV1 ที่เส้นประสาทสมองคู่ที่ 5 โดยการศึกษาของ Qiao และคณะ¹⁹ ที่กระตุ้น TRPV1 ด้วยแรงทางทันตกรรมจัดฟัน พบว่า การให้แรงมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับการแสดงออกของ TRPV1 และมีการแสดงออกแบบขึ้นกับขนาดแรงที่ให้ (dose dependent) นอกจากนี้การศึกษานี้ของ Gao และคณะ²⁰ ยังพบว่า เมื่อใช้สารยับยั้ง TRPV1 หลังจากให้แรงทางทันตกรรมจัดฟันสามารถลดพฤติกรรมความเจ็บปวดของหนูตามการลดลงของ TRPV1 อีกด้วย

อย่างไรก็ตาม แรงทางทันตกรรมจัดฟันเป็นตัวกระตุ้นเชิงกล การตอบสนองของเซลล์ประสาทต่อตัวกระตุ้นเชิงกลนั้นพบ

ในเส้นใยประสาทขนาดใหญ่ (A-beta) แต่ตัวรับความรู้สึกปวด (nociceptors) นั้นอยู่ในเซลล์ที่มีเส้นใย ประสาทขนาดเล็ก คือ เส้นใยประสาทเอ เดลต้า (A delta fiber) และ ซี (C fiber) จากผลการศึกษาพบว่า การแสดงออกของ TRPV1 ส่วนใหญ่นั้นพบในเซลล์ประสาทขนาดเล็กถึงกลาง¹⁵ เป็นไปได้ว่าการกระตุ้น TRPV1 นั้นอาจเป็นผลทางอ้อมจากการเกิดด้วยแรงทางทันตกรรมจัดฟันจากการศึกษาของ Guo และคณะ²³ พบว่า TRPV1 ถูกกระตุ้นได้จากการเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการอักเสบ (inflammation) ซึ่งผลของการให้แรงเคลื่อนฟันนั้นจะทำให้เกิดการอักเสบในบริเวณรอบของฟันที่ได้รับแรง การศึกษานี้ด้วยการให้ตัวยับยั้งที่มีความจำเพาะกับตัวรับ TRPV1 รวมถึงการยับยั้งการแสดงออกของ proinflammatory gene สามารถลดความเจ็บปวดที่เกิดจากการให้แรงทางทันตกรรมได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าความเจ็บปวดที่เกิดขึ้นจากการให้แรงทางทันตกรรมจัดฟันนั้นถูกควบคุมด้วยการกระตุ้นตัวรับ TRPV1 ผ่านการเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการอักเสบ ซึ่งกระบวนการอักเสบนั้นเกิดขึ้นภายใน 24 ชั่วโมงและตามด้วยการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกัน กระบวนการอักเสบจึงลดลงและหายไปทีละสุด²⁴ และการให้การกระตุ้น TRPV1 ยังส่งผลต่อการลดลงของขีดจำกัดการกระตุ้น (Activation threshold) ของ TRPV1 ทำให้เกิดการเปิดของตัวรับเพิ่มขึ้น และพบการเคลื่อนของแคลเซียมไอออนเข้าเซลล์ (Calcium ion influx) ส่งผลให้เกิดการหลั่งสารสื่อประสาทเพิ่มขึ้น

สารสื่อประสาทที่มีบทบาทสำคัญตัวหนึ่ง คือ SP ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทในกลุ่มเทคิไคนิน (tachykinins family) ทำหน้าที่ควบคุมการอักเสบและการส่งสัญญาณความเจ็บปวด การศึกษาที่ผ่านมาพบระดับของ SP ยังคงมีระดับสูงอย่างมีนัยสำคัญ หลังได้รับการกระตุ้นเป็นเวลา 3 วัน และพบการแสดงออกร่วมกันในเซลล์เดียวกันของ TRPV1 และสารสื่อประสาท SP ที่ประสาทในคอเคลีย (cochlear) และหลอดเลือดเวทโทโรบาซิลลา (vertebro-basilar arteries vessel)²¹ SP พบทั้งที่สมองและเนื้อเยื่อประสาทส่วนปลาย (peripheral nerve tissue) มักพบการแสดงออกร่วมกันในเซลล์เดียวกันกับสารสื่อประสาท CGRP การทำงานของ SP และ CGRP มีส่วนที่คล้ายคลึงกัน เช่น ทำให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือด (vasodilation) และเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบรวมถึงการทำให้เกิดความเจ็บปวด^{25,26} การศึกษาที่ผ่านมาพบว่า แรงทางทันตกรรมจัดฟันสามารถเพิ่มการแสดงออกของ CGRP เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในวันที่ 1²⁷ อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ พบว่า SP เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในวันที่ 1 และ 3 หลังจากให้แรงทางทันตกรรมจัดฟัน ซึ่งสัมพันธ์กันกับค่าความเจ็บปวดที่แสดงออกของใบหน้า แสดงให้เห็นการทำงานของ SP

มีฤทธิ์อยู่นาน (long lasting action) กลไกที่เป็นไปได้ของการหลั่งสารสื่อประสาท SP ผ่านการกระตุ้น TRPV1 คือ เมื่อ TRPV1 ถูกกระตุ้นจะทำให้เกิดแคลเซียมไอออนเข้าสู่เซลล์ส่งผลโดยตรงต่อการกระตุ้นโปรตีน Synaptosomal-Associated Protein, 25 (Calcium dependent synaptosome formation) ซึ่งเป็นโปรตีนส่วนประกอบของโครงสร้าง SNARE complex ที่มีความสำคัญในการเชื่อมของเยื่อหุ้มถุงสารสื่อประสาทกับเยื่อหุ้มเซลล์ประสาทก่อนซินแนปส์ (Presynaptic membrane) ส่งผลให้สารสื่อประสาทที่อยู่ภายในถุงเกิดการแพร่กระจายออกสู่นอกเซลล์ (Exocytosis)

จากผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่า SP เป็นสารสื่อประสาทอีกหนึ่งตัวที่สำคัญและมีความเกี่ยวข้องกับ TRPV1 ซึ่งมีบทบาทต่อความเจ็บปวดในระหว่างการรักษาทางทันตกรรมจัดฟัน ดังนั้นเป็นไปได้ว่าการหาวิธีการเพื่อลดการแสดงออกของ TRPV1 ที่ส่งผลต่อการลดลงของ SP สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการลดความเจ็บปวดระหว่างการรักษาทางทันตกรรมจัดฟัน ถ้าทำการลดการแสดงออกของ TRPV1 ที่ส่งผลต่อการลดลงของ SP สำหรับแนวทางในการทำงานวิจัยต่อไป (further study) ผู้วิจัยเห็นว่าควรมีการย้อม isolectin B4 และการเก็บข้อมูลจากกล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอล (Confocal microscope) เพื่อการศึกษาแบบสามมิติให้ได้ผลชัดเจนยิ่งขึ้น และควรมีการศึกษาเพื่อดูผลโดยตรงจากแรงทางทันตกรรมจัดฟันกับเซลล์ประสาทและผลทางอ้อมผ่านการกระตุ้นด้วยสารชักนำการอักเสบ (Inflammatory mediator) เพื่อดูการแสดงออกของ TRPV1

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่สนับสนุนงบประมาณงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Masella RS, Meister M. Current concepts in the biology of orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2006;129(4):458-68.
- Kvinnslund I, Kvinnslund S. Changes in CGRP-immunoreactive nerve fibres during experimental tooth movement in rats. *Eur J Orthod* 1990;12(3): 320-9.
- Long H, Liao L, Gao M, Ma W, Zhou Y, Jian F, *et al.* Periodontal CGRP contributes to orofacial pain following experimental tooth movement in rats. *Neuropeptides* 2015;52:31-7.
- Wang J, Jian F, Chen J, Ye N, Huang Y, Wang S, *et al.* Cognitive behavioral therapy for orthodontic pain control: a randomized trial. *J Dent Res* 2012;91(6):580-5.
- Ichikawa H, Sugimoto T. VR1-immunoreactive primary sensory neurons in the rat trigeminal ganglion. *Brain Res* 2001;890(1):184-8.
- Shimizu T, Toriumi H, Sato H, Shibata M, Nagata E, Gotoh K, *et al.* Distribution and origin of TRPV1 receptor-containing nerve fibers in the dura mater of rat. *Brain Res* 2007;1173:84-91.
- Wang Y. The functional regulation of TRPV1 and its role in pain sensitization. *Neurochem Res* 2008;33(10):2008-12.
- Eriksson J, Jablonski A, Persson AK, Hao JX, Kouya PF, Wiesenfeld-Hallin Z, *et al.* Behavioral changes and trigeminal ganglion sodium channel regulation in an orofacial neuropathic pain model. *Pain* 2005;119(1-3):82-94.
- Deguchi T, Takano-Yamamoto T, Yabuuchi T, Ando R, Roberts WE, Garetto LP. Histomorphometric evaluation of alveolar bone turnover between the maxilla and the mandible during experimental tooth movement in dogs. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2008;133:889-97.
- Harrison S, Geppetti P. Substance p. *Int J Biochem Cell Biol* 2001;33(6):555-76.
- Davidovitch Z, Nicolay OF, Ngan PW, Shanfeld JL. Neurotransmitters, cytokines, and the control of alveolar bone remodeling in orthodontics. *Dent Clin North Am* 1988;32(3):411-35.
- Kraiwananpong K, Samruajbenjakun B. Effects of different force magnitudes on corticotomy-assisted orthodontic tooth movement in rats. *Angle Orthod* 2018;88(5):632-7.
- Deuis JR, Dvorakova LS, Vetter I. Methods used to evaluate pain behaviors in rodents. *Front Cell Neurosci* 2017;10:284.
- Sotocinal SG, Sorge RE, Zaloum A, Tuttle AH, Martin LJ, Wieskopf JS, *et al.* The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Mol Pain* 2011;7(1):55.
- Messlinger K, Russo AF. Current understanding of trigeminal ganglion structure and function in headache. *Cephalalgia* 2019;39(13):1661-74.
- Long H, Wang Y, Jian F, Liao LN, Yang X, Lai WL. Current advances in orthodontic pain. *Int J Oral Sci* 2016;8(2): 7-75.
- Marković E, Fercec J, Šćepan I, Glišić B, Nedeljković N, Juloski J, *et al.* The correlation between pain perception among patients with six different orthodontic archwires and the degree of dental crowding. *Srp Arh Celok Lek* 2015;143:134-40.
- Erdinç AM, Dinçer B. Perception of pain during orthodontic treatment with fixed appliances. *Eur J Orthod* 2004;26(1):79-85.
- Qiao H, Gao Y, Zhang C, Zhou H. Increased expression of TRPV1 in the trigeminal ganglion is involved in orofacial pain during experimental tooth movement in rats. *Eur J Oral Sci* 2015;123(1):17-23.
- Gao Y, Liu Y, Zhu K, Zhang Z, Qiao H, Lu Z, *et al.* Blocking of TRPV-1 in the parodontium relieves orthodontic pain by inhibiting the expression of TRPV-1 in the trigeminal ganglion during experimental tooth movement in rats. *Neurosci Lett* 2016;628:67-72.

21. Vass Z, Dai C, Steyger P, Jancso G, Trune D, Nuttall A. Co-localization of the vanilloid capsaicin receptor and substance P in sensory nerve fibers innervating cochlear and vertebro-basilar arteries. *Neuroscience* 2004;124(4):919-27.
22. Campos MJdS, Fraga MR, Raposo NRB, Ferreira AP, Vitral RWF. Assessment of pain experience in adults and children after bracket bonding and initial archwire insertion. *Dental Press J Orthod* 2013; 18(5):32-7.
23. Guo R, Zhou Y, Long H, Shan D, Wen J, Hu H, *et al.* Transient receptor potential Vanilloid 1-based gene therapy alleviates orthodontic pain in rats. *Int J Oral Sci* 2019;11(1):11.
24. Milošević-Jovčić N, Vujačić A, Konić A, Pavlović J, Todorović V, Glibetić M. The role of cytokines in orthodontic tooth movement. *Srp Arh Celok Lek* 2012;140(5-6):371-8.
25. Cao YQ, Mantyh PW, Carlson EJ, Gillespie AM, Epstein CJ, Basbaum AI. Primary afferent tachykinins are required to experience moderate to intense pain. *Nature* 1998;392(6674):390-4.
26. Guo TZ, Wei T, Shi X, Li WW, Hou S, Wang L, *et al.* Neuropeptide deficient mice have attenuated nociceptive, vascular, and inflammatory changes in a tibia fracture model of complex regional pain syndrome. *Mol Pain* 2012;8:85.
27. Thammanichanon P, Kaewpitak A, Binlateh T, Leethanakul C. Interval vibration reduces orthodontic pain via a mechanism involving down-regulation of TRPV1 and CGRP. *In Vivo* 2020;34(5):2389-99.