ผลของโคบอลต์คลอไรด์ต่อความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันแท้ของมนุษย์

นางสาวกัณฒพร ลักษณา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาทันตกรรมสำหรับเด็ก ภาควิชาทันตกรรมสำหรับเด็ก
คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2555
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

EFFECT OF COBALT CHLORIDE ON STEMNESS IN HUMAN DENTAL PULP CELLS

Miss Kantaporn Laksana

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Pediatric Dentistry

Department of Pediatric Dentistry

Faculty of Dentistry

Chulalongkorn University

Academic Year 2012

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของโคบอล ต์คลอไรด์ต่อความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด ของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันแท้ของมนุษย์
โดย	นางสาวกัณฒพร ลักษณา
สาขาวิชา	ทันตกรรมสำหรับเด็ก
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.วรรณธิดา ศรีอาจ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.สิรีรัตน์ สูอำพัน

คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะทันตแพทยศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร.สุชิต พูลทอง)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.ทิพวรรณ ธราภิวัฒนานนท์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.วรรณธิดา ศรีอาจ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(อาจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.สิรีรัตน์ สูอำพัน)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.บุษยรัตน์ สันติวงศ์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.นิรดา ธเนศวร)

กัณฒพร ลักษณา : ผลของโคบอลต์คลอไรด์ต่อความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันแท้ของมนุษย์. (EFFECT OF COBALT CHLORIDE ON STEMNESS IN HUMAN DENTAL PULP CELLS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : อ.ทญ.ดร.วรรณธิดา ศรีอาจ, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : อ.ทญ.ดร.สิรีรัตน์ สูอำพัน, 60 หน้า.

วัตถุประสงค์ การศึกษานี้มีวัตถุประส งค์เพื่อศึกษาผลของ โคบอลต์ คลอไรด์ ต่อการแบ่งตัวของเซลล์ การแสดงออกของยีนที่แสดงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด และการแปรสภาพไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันแท้ของมนุษย์ **วัสดุและวิธีการ** นำเซลล์จากเนื้อเยื่อในฟันแท้มนุษย์ มาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ โดยการเติมสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 ไมโครโมลาร์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ทำการศึกษาการเพิ่มจำนวนของเซลล์ด้วยเทคนิคเอ็มทีที ที่ระยะเวลา 1 วัน 3 วันและ 6 วัน การวิเคราะห์จำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนสโตร -1 ด้วยเทคนิคโฟลวไซโตเมทรี ทำการศึกษาการแสดงออกของยีนที่แสดงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดได้แก่ เร็กซ์- 1 อ็อกท์-4 นาน็อก และซ็อกซ์- 2 โดยการวัดระดับการแสด งออกของอาร์เอ็นเอนำรหัสใช้วิธีรีเวอร์ส ทรานสคิปชั่น โพลิเมอร์เลสเชน รีแอ คชั่น (อาร์ที-พีซีอาร์) และทำศึกษาการแปรสภาพไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งโดยการวัดค่าการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส และการหาปริมาณตะกอนแคลเซียมด้วยสีอลิซารินเรด เอส ทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยสถิติวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว และวิธีทดสอบทีชนิดตัวอย่าง อิสระ ($p<0.05$) **ผลการศึกษา** พบว่าเซลล์จากเนื้อเยื่อในฟันแท้ของมนุษย์ที่เพาะเลี้ยงด้วย อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีโคบอลต์คลอไรด์สามารถเพิ่มสัดส่วนการแสดงออก ของโปรตีนสโตร -1 และการแสดงออกของยีนที่แสดงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด ยับยั้งการแปรสภาพเซลล์ไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง ได้ดีกว่าการเพาะเลี้ยงใน อาหารเลี้ยงเซลล์ เพียงอย่างเดียว โดยพบว่าในความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์แสดงผลชัดเจนกว่า ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ **สรุป** จากผลการศึกษาที่พบอาจสรุปได้ว่าโคบอลต์คลอไรด์ ส่งเสริม ความเป็นเซล ล์ต้นกำเนิด ของเซลล์จากเนื้อเยื่อในฟันแท้ของมนุษย์ได้โดยการเติมสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ในอาหารเลี้ยงเซลล์น่าจะเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดในห้องปฏิบัติการ

ภาควิชา ทันตกรรมสำหรับเด็ก ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา ทันตกรรมสำหรับเด็ก ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

ปีการศึกษา 2555 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5376103232 : MAJOR PEDIATRIC DENTISTRY
KEYWORDS : COBALT CHLORIDE / HUMAN DENTAL PULP CELLS / STEMNESS
KANTAPORN LAKSANA : EFFECT OF COBALT CHLORIDE ON STEMNESS IN HUMAN DENTAL PULP CELLS. ADVISOR : WANTIDA SRIARJ, Ph.D., CO-ADVISOR : SIREERAT SOOAMPON, Ph.D., 60 pp.

Objective This study is to investigate the effect of cobolt chloride ($CoCl_2$) on cell proliferation, the level of gene expression of stem cell markers, and the osteogenic differentiation of human dental pulp cells. **Materials and mathod** Human dental pulp cells (hDPCs) were cultured in the presence or absence of $CoCl_2$ at the concentration of 25 and 50 μM, respectively. The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay was used to determine cell proliferation at 1, 3 and 6 days of culture. The number of STRO-1^+ cells was determined using flow cytometry. The level of mRNA expression of stem cell markers; Rex-1, Oct-4, Nanog and Sox-2 were examined by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The osteogenic differentiation was assessed by alkaline phosphatase activity and alizarin red S staining. The data were analyzed by one way ANOVA and Independence sample t-test ($p<0.05$). **Result** The results showed that hDPCs treated with $CoCl_2$ significantly increased STRO-1^+ cells and the mRNA expression of stem cell markers, while inhibited osteogenic differentiation. In addition, potency of 50 μM of $CoCl_2$ in maintaining stem cell is greater than that of 25 μM of $CoCl_2$. **Conclusion** These findings suggests that cobalt chloride could enhance stemness of human dental pulp cells. The addition of 50 uM CoCl2 in the culture media might be the suitable condition for maintaining stem cells in the laboratory.

Department : Pediatric Dentistry	Student's Signature :
Field of Study : Pediatric Dentistry	Advisor's Signature :
Academic Year : 2012	Co-advisor's Signature:

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณผู้มีส่วนร่วมให้วิทยานิพนธ์นี้เสร็จสมบูรณ์ดังรายนามต่อไปนี้

อ.ทญ.ดร.วรรณธิดา ศรีอาจ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ อ.ทญ.ดร.สิรีรัตน์ สูอำพัน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาชี้แนะ ให้คำปรึกษา คำแนะนำ และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ในการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ศ.ทพ.ดร.ประสิทธิ์ ภวสันต์ ที่ช่วยกรุณาชี้แนะ และให้คำปรึกษาที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย

คณะกรรมการสอบโครงร่างวิทยานิพนธ์ และสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ทุกท่านที่ให้คำแนะนำ ชี้แนะข้อบกพร่องและแนวทางปรับปรุงแก้ไขวิทยาพนธ์

การสนับสนุนทุนวิจัยจาก “ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ” กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช (THE 90th ANNIVERSARY OF CHULALONGKORN UNIVERSITY FUND)

อาจารย์สาขาวิชาทันตกรรมสำหรับเด็ก ภาควิชาทันตกรรมสำหรับเด็ก จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ได้ถ่ายทอดความรู้ ความใฝ่รู้ ตลอดจนจริยธรรมให้แก่ข้าพเจ้า

พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ที่ หน่วยปฏิบัติการวิจัยเนื้อเยื่ออินทรีย์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านในไมตรีจิตที่มอบให้ และ คำแนะนำต่างๆในการทำวิจัยในครั้งนี้เป็นอย่างดี

คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เป็นสถานที่ให้ความรู้ อบรมจริยธรรมและปลูกจิตสำนึกที่ดีแก่ข้าพเจ้า

เพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ทั้งในและนอกคณะทันตแพทยศาสตร์ ที่ให้ความช่วยเหลือและ เป็นกำลังใจมาโดยตลอด

อาสาสมัครทุกท่านที่ยินยอมบริจาคฟันที่ถอนออกมาร่วมการวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายนี้ผู้ทำวิทยานิพนธ์ขอขอบพระคุณบิดา มารดาและครอบครัว ตลอดจนผู้มีพระคุณทุกท่านที่ไม่ได้กล่าวถึง ประโยชน์ใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้ทำวิทยานิพนธ์ขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน ซึ่งมีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์สำเร็จลงด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฌ

สารบัญภาพ..... ญ

บทที่ 1 บทนำ..... 1

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย..... 1

คำถามการวิจัย..... 3

วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 3

สมมติฐานการวิจัย..... 4

กรอบแนวคิดของงานวิจัย..... 4

คำจำกัดความในการวิจัยและข้อตกลงเบื้องต้น..... 5

คำสำคัญ..... 5

ชนิดของการศึกษา..... 5

ข้อจำกัดของการวิจัย..... 6

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 6

ข้อพิจารณาด้านจริยธรรม..... 6

บทที่ 2 เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 7

เซลล์ต้นกำเนิด..... 7

เนื้อเยื่อในฟัน..... 8

สภาวะพร่องออกซิเจน..... 10

กลไกการตอบสนองต่อสภาวะพร่องออกซิเจน..... 11

สภาวะพร่องออกซิเจนกับเนื้อเยื่อในฟัน..... 13

การจำลองสภาวะพร่องออกซิเจนในห้องปฏิบัติการ..... 13

หน้า

บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย..... 16
ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง..... 16
จำนวนตัวอย่าง..... 16
สถานที่ทำการวิจัย..... 16
เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย..... 17
ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย..... 20
การวิเคราะห์ข้อมูล..... 25
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล..... 26
การศึกษาการเพิ่มจำนวนของเซลล์ 26
การศึกษาปริมาณโปรตีนสโตร-1..... 27
การศึกษาปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอของยีนเร็กซ์-1 อ็อกท์-4 นาน็อก และซ็อกซ์-2..... 28
การศึกษาค่าการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส..... 29
การศึกษาปริมาณตะกอนแคลเซียมที่ย้อมด้วยสีอลิซารินเรด เอส..... 31
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ..... 32
อภิปรายผลการวิจัย..... 32
สรุปผลการวิจัย..... 35
ข้อเสนอแนะ..... 35
รายการอ้างอิง..... 36
ภาคผนวก..... 44
ภาคผนวก ก เอกสารพิจารณาจริยธรรม คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย..... 45
ภาคผนวก ข เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับอาสาสมัครที่เข้าร่วมในการวิจัย..... 47
ภาคผนวก ค เอกสารยินยอมเข้าร่วมการวิจัย..... 51
ภาคผนวก ง เอกสารยกเลิกเข้าร่วมวิจัย..... 53
ภาคผนวก จ รายละเอียดการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ..... 54
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 60

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ลำดับเบสของไพร์มเมอร์ที่จำเพาะต่อเอ็มอาร์เอ็นเอของยีนเร็กซ์-1 อ็อกท์-4 นาน็อก ซ็อกซ์-2 และ 18เอส..... 23

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 กรอบแนวคิดของงานวิจัย..... 4
ภาพที่ 2 แสดงการสลายและคงสภาพของ HIF-1α..... 12
ภาพที่ 3 แสดงการคงสภาพ HIF-1α ผ่านทางโคบอลต์..... 14
ภาพที่ 4 กราฟแสดงการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่วัดด้วยเทคนิคเอ็มทีที..... 26
ภาพที่ 5 กราฟแสดงปริมาณโปรตีนสโตร-1 โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโฟลวไซโตเมทรี. 27
ภาพที่ 6 การแสดงออกของยีนที่แสดงสภาวะของการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดโดยการ
วิเคราะห์ด้วยวิธีอาร์ที-พีซีอาร์..... 28
ภาพที่ 7 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส..... 30
ภาพที่ 8 แสดงการย้อมตะกอนแคลเซียม และกราฟค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนแสงของปริมาณ
ตะกอนแคลเซียมที่ย้อมด้วยสีอลิซารินเรด เอส..... 31

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันการนำเซลล์ต้นกำเนิดมาใช้ในการรักษา (stem cell therapy) กำลังอยู่ในความสนใจของแพทย์และนักวิจัยจำนวนมาก เนื่องจากเซลล์ต้นกำเนิดมีคุณลักษณะเฉพาะตัวที่สามารถแบ่งตัวได้อย่างไม่มีขีดจำกัด และสามารถพัฒนาเป็นเซลล์ต่างๆ ได้หลายชนิด ดังนั้นเซลล์ต้นกำเนิดจึงมีบทบาทสำคัญในกระบวนการสร้างและซ่อมแซมเนื้อเยื่อ (1) มีรายงานที่แสดงถึงความพยายามของแพทย์และนักวิจัย ในการนำเซลล์ต้นกำเนิดมาใช้ในการรักษาโรคต่างๆ หลายชนิดด้วยกัน เช่น โรคมะเร็ งเม็ดเลือดขาว (2) โรคโลหิตจางธาลัสซีเมีย (3) พาร์กินสัน (4) โรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด (5) และเบาหวาน (6) เป็นต้น อย่างไรก็ดี นอกเหนือจากโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวแล้ว การนำเซลล์ต้นกำเนิดมาใช้ในการรักษารอยโรคอื่นๆ นั้นยังไม่ประสบความสำเร็จและยังไม่เป็นที่ยอมรับในทางการแพทย์

เซลล์ต้นกำเนิดอาจจำแนกตามแหล่งที่พบได้ 2 ชนิด (1) คือ เซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อน (embryonic stem cell) และเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อโตเต็มวัย (adult stem cell) ถึงแม้เซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อนจะมีข้ อดีในแง่ของความสามารถในการพัฒนาเป็นเซลล์ต่างๆ ในร่างกายได้ทุกชนิด แต่การใช้เซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อนยังมีข้อถกเถียงทางจริยธรรม และมีข้อจำกัดเรื่องความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อผู้ป่ วยกับเซลล์ที่นำมาใช้ในการรักษา ในปัจจุบันการศึกษาเกี่ยวกับเซลล์ต้นกำเนิดจึงมุ่ งเน้นไปที่เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อโตเต็มวัย ซึ่งสามารถพบได้ในเนื้อเยื่อต่างๆ ในร่างกายหลายชนิด เช่น ไขกระดูก (7) เนื้อเยื่อไขมัน (8) ผิวหนัง (9) กล้ามเนื้อ (10) สมอง (11) และฟัน (12, 13)

ฟันจัดเป็นอีกแหล่งหนึ่งของเซลล์ต้นกำเนิดที่อยู่ในความสนใจของนักวิจัย เนื่องจากสามารถเก็บเนื้อเยื่อฟันมาใช้เพื่อการศึกษาได้สะดวก ทั้งจากฟันน้ำนมที่หลุดเองโดยธ รรมชาติ หรือจากฟันแท้ที่มี ข้อบ่งชี้ในการถอนฟัน เช่น ฟันคุด หรือฟันที่ถอนเพื่อการจั ดฟัน รายงานการศึกษาพบว่าเนื้อเยื่อในฟันของทั้งฟันแท้และฟันน้ำนมจะพบเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคมอล (mesenchymal stem cell) จำนวนมาก เซลล์ต้นกำเนิดเหล่านี้มีคุณสมบัติในการแบ่งตัวได้อย่างต่อเนื่อง และสามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันได้ทุกชนิด อันได้แ ก่ เซลล์สร้างกระดูก (osteoblast) (12) เซลล์ประสาท (neuron) เซลล์ไขมัน (adipocyte) (14) เซลล์กล้ามเนื้อเรียบ (myocyte) และเซลล์กระดูกอ่อน (chondrocyte) (15) ดังนั้นเซลล์จากเนื้อเยื่อในฟันจึงมีศักยภาพในการนำมาใช้ในทางคลินิกเพื่อส่งเสริมให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อทดแทนในบริเวณที่มีการทำลาย

ของกระดูก เนื้อฟัน หรือเส้นประสาทได้อย่างสมบูรณ์ (complete regeneration) อย่างไรก็ตามในการนำเอาเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในฟันมาใช้ในทางคลินิกนั้นจำเป็นต้องมีการศึกษาวิจัย เพื่อเพิ่มความเข้าใจในพฤติกรรมและการตอบสนองของเซลล์ต่อสิ่งแวดล้อม ทั้งนี้เพื่อที่จะนำเซลล์ไปใช้ได้อย่างปลอดภัย มีประสิทธิภาพและเกิดประโยชน์สูงสุด

โดยทั่วไปในการศึกษาถึงคุณสมบัติการเป็นเซลล์ต้นกำเนิด มักจะทำการศึกษาถึงการแสดงออกของยีน เช่น เร็กซ์-1 (Rex-1) อ็อกเทเมอร์-4 หรืออ็อกท์-4 (POU transcription factor Octamer-4; Oct-4) นาน็อก (Nanog) และซ็อกซ์-2 (Sox-2) ซึ่งเป็นทรานสคริปชั่นแฟคเตอร์ (transcription factor) ที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการเป็นเซลล์ต้นกำเนิด (16-20) และยังศึกษาถึงความสามารถในการแปรสภาพไปเป็นเซลล์อื่นๆ เช่น เซลล์สร้างกระดูก ดังที่ยกตัวอย่างไปแล้วข้างต้น

ระดับของออกซิเจนภายในเนื้อเยื่อจัดเป็นปัจจัยข้อหนึ่งที่ส่งผลต่อพฤติกรรมของเซลล์ต้นกำเนิด โดยมีการศึกษาพบว่าระดับออกซิเจนที่เหมาะสมถือเป็นสิ่งแวดล้อมที่สำคัญต่อการแบ่งตัวและคงสภาพความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด โดยพบว่าในสภาวะตามปกติเนื้อเยื่อต่างๆ จะมีปริมาณออกซิเจนที่ต่ำกว่าระดับของออกซิเจนในอากาศ หรือที่เรียกว่าสภาวะพร่องออกซิเจน (hypoxia) มีการวัดระดับของออกซิเจนที่เนื้อเยื่อต่างๆ เช่น สมองมีระดับของออกซิเจนอยู่ที่ร้อยละ 0.5 ถึง 7 (21) ไขกระดูกมีระดับออกซิเจนร้อยละ 0 ถึง 4 (22) ส่วนเนื้อเยื่อในฟันนั้นได้มีการศึกษาวัดระดับออกซิเจนในเนื้อเยื่อฟันของหนูและกระต่าย พบว่ามีระดับออกซิเจนเพียงร้อยละ 3 และ 4.5 ตามลำดับ (23, 24) จึงอาจกล่าวได้ว่าระดับของออกซิเจนที่ภาวะปกติของอวัยวะเหล่านั้นเป็นสภาวะพร่องออกซิเจนเมื่อเทียบกับระดับของออกซิเจนที่วัดได้ในบรรยากาศทั่วไป หรือเรียกว่าเป็นระดับพร่องออกซิเจนทางสรีรวิทยา (physiologic hypoxia) (25)

โดยปกติการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในฟันในห้องปฏิบัติการนั้น มักทำที่ระดับออกซิเจนร้อยละ 21 เทียบเท่ากับระดับออกซิเจนในบรรยากาศ ซึ่งมีความแตกต่างจากสภาพแวดล้อมตามความเป็นจริงของเซลล์ต้นกำเนิด ระดับของออกซิเจนอาจจะทำให้พฤติกรรมและความสามารถในการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดถูกเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ในการจำลองสภาวะพร่องออกซิเจนในห้องปฏิบัติการนั้นสามารถทำได้ 2 วิธี คือทางกายภาพและการเติมสารเคมี การจำลองสภาวะพร่องออกซิเจนทางกายภาพนั้นยากต่อการควบคุมและการคงระดับออกซิเจนให้สม่ำเสมอ ดังนั้นการจำลองสภาวะพร่องออกซิเจนโดยการเติมสารเคมีจึงถือเป็นอีกทางเลือกหนึ่งเพื่อให้การเพาะเลี้ยงเซลล์ในห้องปฏิบัติการทำได้ง่ายขึ้น ซึ่งวิธีการหนึ่งในการจำลองสภาวะพร่องออกซิเจนโดยใช้สารเคมี คือ การเติมโคบอลต์คลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (26) โดยโคบอลต์

คลอไรด์สามารถจำลองสภาวะพร่องออกซิเจนในห้องปฏิบัติการได้โดยการคงสภาพการแสดงออกของโปรตีนไฮพ็อกเซียอินดิวซิเบิลแฟคเตอร์ (hypoxia inducible factor; HIF) ไม่ให้ถูกทำลายโดยออกซิเจน

รายงานการศึกษาเซลล์ต้นกำเนิดในสภาวะพร่องออกซิเจนยังมีไม่มากนัก แต่ก็เป็นที่ชัดเจนว่าในสภาวะพร่องออกซิเจนนั้น HIF จะมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น โดยโปรตีนชนิดนี้เป็นโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญในการถอดรหัสของยีนที่ตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของออกซิเจนในระดับเซลล์ และทำหน้ าที่เกี่ยวข้องกับการรักษาสภาพความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด (27) มีการรายงานที่แสดงให้ เห็นว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์จากเนื้อเยื่อในฟันที่ระดับออกซิเจนร้อยละ 3 สามารถเพิ่มปริมาณเซลล์และยับยั้งการแปรสภาพของเซลล์ได้ (28, 29) และสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของ HIF นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ที่ไม่มีการแสดงออกของ HIF จะมีการลดลงของการแสดงออกของอ็อกท์-4 นาน็อก และซ็อกซ์-2 ซึ่งเป็นยีนที่แสดงสภาวะของการเป็นเซลล์ต้นกำเนิด (30)

อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีการศึกษาถึงผลของโคบอลต์คลอไรด์ในห้องปฏิบัติการเพื่อจำลองการเกิดสภาวะพร่องออกซิเจนที่ส่งผลต่อความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์จากเนื้อเยื่อในฟันแท้ของมนุษย์ ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของ ความเข้มข้นของโคบอลต์คลอไรด์ต่อความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์จากเนื้อเยื่อในฟันแท้ของมนุษย์ โดยพิจารณาจากการ เพิ่มจำนวน ของเซลล์ การแสดงออกของยีนที่แสดงสภาวะการเป็นเซลล์ต้นกำเนิด และการแปรสภาพไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง

คำถามของการวิจัย

โคบอลต์คลอไรด์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันมีผลต่อความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์จากเนื้อเยื่อในฟันแท้ของมนุษย์หรือไม่ อย่างไร

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

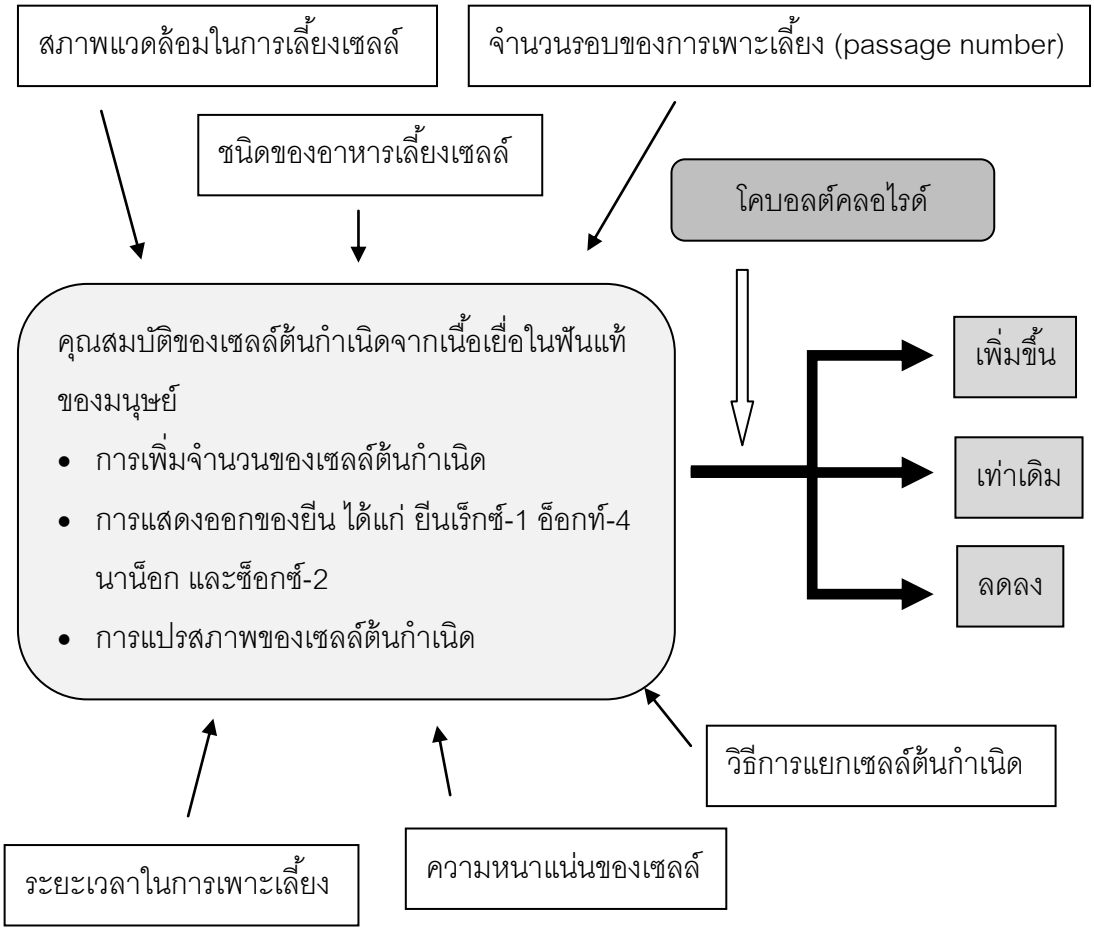
1. เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของโคบอลต์คลอไรด์ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์จากเนื้อเยื่อในฟันแท้ของมนุษย์
2. เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของโคบอลต์คลอไรด์ต่อการส่งเสริมความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์จากเนื้อเยื่อในฟันแท้ของมนุษย์ โดยพิจารณาจากการแสดงออกของตัวบ่งชี้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด (stem cell markers) ได้แก่ ยีนเร็กซ์-1 อ็อกท์-4 นาน็อก และซ็อกซ์-2

3. เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของโคบอลต์คลอไรด์ต่อการยับยั้งการแปรสภาพของเซลล์จากเนื้อเยื่อในฟันแท้ของมนุษย์ โดยพิจารณาจากการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง

สมมติฐานของการวิจัย

1. โคบอลต์คลอไรด์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันสามารถเพิ่มจำนวนของเซลล์จากเนื้อเยื่อในฟันแท้ของมนุษย์ได้แตกต่างกัน
2. โคบอลต์คลอไรด์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันสามารถส่งเสริมความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์จากเนื้อเยื่อในโพรงฟันแท้ของมนุษย์ได้แตกต่างกัน
3. โคบอลต์คลอไรด์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันสามารถยับยั้งการแปรสภาพของเซลล์จากเนื้อเยื่อในโพรงฟันแท้ของมนุษย์ได้แตกต่างกัน

กรอบแนวคิดของงานวิจัย



ภาพที่ 1 กรอบแนวคิดของงานวิจัย

คำจำกัดความในการวิจัยและข้อตกลงเบื้องต้น

1. เซลล์จากเนื้อเยื่อในฟันแท้ของมนุษย์ หมายถึง เซลล์ที่เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อในโพรงฟันแท้ของมนุษย์ที่ไม่มีรอยผุและไม่มีรอยโรคที่ปลายรากฟัน
2. ระดับออกซิเจนในบรรยากาศ (normoxia) หมายถึง สภาวะที่มีระดับออกซิเจนปกติ ในอากาศที่ระดับน้ำทะเล ที่มีระดับออกซิเจนร้อยละ 21 หรือเทียบเท่ากับ 160 มิลลิเมตรปรอท
3. สภาวะพร่องออกซิเจน หมายถึง สภาวะที่มีระดับของออกซิเจนต่ำกว่าระดับออกซิเจนในอากาศที่ระดับน้ำทะเล
4. อาหารเลี้ยงเซลล์ หมายถึง อาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่ผสมซีรัมจากฟีตัสวัวร้อยละ 10 (Fetal bovine serum; FBS, Gibco, USA) แอลกลูตามีนร้อยละ 5 (L-glutamine, Invitrogen, USA) และยาปฏิชีวนะร้อยละ 1 ประกอบด้วยเพนนิซีลินจีโซเดียม (Penicillin G sodium, Invitrogen, USA) และแอมโฟเทอริซินบี (Amphotericin B, Invitrogen, USA)
5. อาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง หมายถึง อาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็ มอีเอ็มที่มีซีรัมจากฟีตัสวัวร้อยละ 10 แอลกลูตามีนร้อยละ 5 และยาปฏิชีวนะร้อยละ 1 ประกอบด้วยเพนนิซีลินจีโซเดียม และแอมโฟเทอริซินบี ผสมกับกรดแอสคอร์บิคที่มีความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Ascorbic acid, Sigma, USA) เดกซาเมทาโซน 100 นาโนโมลาร์ (Dexamethasone, Sigma, USA) และเบต้า-กลีเซอโรฟอสเฟต 10 มิลลิโมลาร์ (β-glycerophosphate, Sigma, USA)

คำสำคัญ

ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด โคบอลต์คลอไรด์ เซลล์จากเนื้อเยื่อในโพรงฟันแท้ของมนุษย์

ชนิดของการศึกษา

การวิจัยเชิงทดลองในห้องปฏิบัติการ (laboratory experimental research)

ข้อจำกัดของการวิจัย

การศึกษานี้ใช้โคบอลต์คลอไรด์ในการจำลองสภาวะพร่องออกซิเจนในห้องปฏิบัติการ อย่างไรก็ดีการใช้โคบอลต์คลอไรด์จะมีข้อจำกัด คือไม่สามารถเปรียบเทียบความเข้มข้นของโคบอลต์คลอไรด์ที่ใช้ในการทดลองกับร้อยละของออกซิเจนได้โดยตรง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การศึกษานี้เป็นการศึกษาถึงผลของโคบอลต์คลอไรด์ต่อความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์จากเนื้อเยื่อในฟันแท้ของมนุษย์จึงเป็นการค้นหาสภาวะแวด ล้อมที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์ ซึ่งอาจนำไปสู่การพัฒนาอาหารเลี้ยงเซลล์ นอกจากนี้ผลการศึกษานอกจากจะเป็นการสร้างองค์ความรู้ใหม่ในทางทันตกรรมแล้ว ยังจะเป็นประโยชน์สำหรับการพัฒนางานวิจัยในอนาคต โดยองค์ความรู้ที่ได้จะเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการออกแบบการศึกษาวิจัยในขั้นต่อไป รวมทั้งจะเป็นข้อมูลสำหรับการวางแผนการวิจัยทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อในอนาคต

ข้อพิจารณาปัญหาทางจริยธรรม

1. รายละเอียดข้อมูลโครงการวิจัย ผ่านการพิจารณาและได้รับคำรับรองด้านจริยธรรมของโครงการวิจัยจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย ของคณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. อาสาสมัครได้รับการอธิบายและตอบข้อซักถามถึงรายละเอียดของวิธีการวิจัยโดยไม่ปิดบังซ่อนเร้น และยินยอมลงนามในเอกสารใบยินยอมด้วยความเต็มใจโดยมีสำเนาใบยินยอมเก็บไว้เป็นหลักฐาน

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เซลล์ต้นกำเนิด (stem cell)

เซลล์ต้นกำเนิดหรือสเต็มเซลล์ เป็นเซลล์ที่ยังไม่มีการพัฒนาไปเป็นเซลล์ชนิดใดช นิดหนึ่งที่มีคุณสมบัติเฉพาะ มีความสามารถในการเพิ่มจำนวนอย่างไม่มีขีดจำกัด (self-renewal) โดยผ่านกระบวนการแบ่งตัวทำให้ได้เซลล์ลูกที่มีคุณสมบัติเดิมเช่นเดี ยวกับเซลล์แม่ ซึ่งเป็นเซลล์ที่ไม่มีความจำเพาะในการทำหน้าที่ (unspecialized cell) นอกจากนี้เซลล์ต้นกำเนิดยังมีความสามารถที่จะแปรสภาพ (differentiation) ไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่เฉพาะเจาะจงได้เมื่อได้รับการกระตุ้นที่เหมาะสม (1)

ประเภทของเซลล์ต้นกำเนิดสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มตามแหล่งที่มา (1) คือ เซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อน และเซลล์ต้นกำเนิดที่แยกจากเนื้อเยื่อที่โตเต็มวัย โดยเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อนนั้นเป็นเซลล์ที่ได้มาจากเซลล์ชั้นใน (inner cell mass) ของบลาสโทซิสท์ (blastocyst) จากตัวอ่อนหรือเนื้อเยื่อของทารกในครรภ์ จะเริ่มพบเมื่อ 4-5 วันแรกหลังการปฏิสนธิในมนุษย์ โดยเซลล์ในกลุ่มนี้จะมีความสามารถในการเปลี่ยนสภาพไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่เฉ พาะเจาะจงได้ทุกชนิดในร่างกาย (31) ส่วนเซลล์ต้นกำเนิดที่แยกจากเนื้อเยื่อที่โตเต็มวัยนั้นเป็นเซลล์ที่พบกระจายอยู่ในเนื้อเยื่อต่างๆ ในสิ่งมีชีวิตที่พัฒนาไปเกินกว่าระยะตัวอ่อน โดยเซลล์เหล่านี้สามารถพั ฒนาไปเป็นเซลล์จำเพาะชนิดต่างๆ ของเนื้อเยื่อนั้นๆ ดังนั้นเซลล์ต้นกำเนิดที่แยกจากเนื้อเยื่อที่โตเต็มวัยจึงทำหน้าที่หลักในการแบ่งตัวเพื่อรักษาและซ่อมแซมเซลล์เดิมที่ตายหรือถูกทำลายไป (1) ตัวอย่างของเซลล์ต้นกำเนิดที่แยกจากเนื้อเยื่อโตเต็มวัย ได้แก่ เซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดในไขกระดูก (hematopoietic stem cells) สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์เม็ดเลือดได้ทุกชนิด เซลล์ต้นกำเนิดประสาท (neural stem cells) พบได้ที่สมองและไขสันหลัง และเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคมอล ซึ่งเป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่มีการพัฒนามาจากเนื่อเยื่อชั้นกลาง (mesoderm) สามารถที่จะแปรสภาพไปเป็นเซลล์ของเนื้อเยื่อต่างๆ ได้แก่ กระดูก กระดูกอ่อน ไขมัน เอ็น กล้ามเนื้อและกล้ามเนื้อ (32) โดยเซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้สามารถพบได้หลายตำแหน่งในร่างกาย เช่น ไขกระดูก (7) เนื้อเยื่อไขมัน (8) ผิวหนัง (9) กล้ามเนื้อ (10) สมอง (11) และฟัน (12, 13)

การบ่งชี้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดชนิดต่างๆ นั้นขึ้นอยู่กับการแสดงออกของโปรตีนที่มีลักษณะเฉพาะ ทำให้สามารถแยกเก็บหรือบ่งชี้ความเป็ นเซลล์ต้นกำเนิดออกจากเซลล์ทั่วไป นอกจากนี้ยังทำให้สามารถทราบถึงชนิดหรือแหล่งที่มาของเซลล์ต้นกำเนิดนั้นๆ (16) เช่น การตรวจพบยีนชนิดเร็กซ์- 1 อ็อกท์-4 นาน็อก และซ็อกซ์- 2 ซึ่งทำหน้าที่เป็นทรานสคริปชันแฟคเตอร์

(transcription factor) ที่บ่งชี้ถึงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน โดยที่การแสดงออกของอ็อกท์- 4 นาน็อก และซ็อกซ์-2 นั้นสอดคล้องกับคุณสมบัติในการแบ่งตัวอย่างต่อเนื่องและความสามารถในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์จำเพาะในร่างกายได้เกือบทุกชนิด (pluripotent state) (18-20) ในขณะที่การแสดงออกของเร็กซ์- 1 สอดคล้องกับความสามารถในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์จำเพาะชนิดต่างๆในร่างกาย (17) นอกจากนี้การ ควบคุมการแสดงออกของโปรตีนกลุ่มนี้มีความสัมพันธ์ต่อกัน โดยอ็อกท์- 4 สามารถควบคุมการแสดงออกของ เร็กซ์- 1 นาน็อก และซ็อกซ์-2 (33) ในขณะที่นาน็อกยังสามารถควบคุมการแสดงออกของเร็กซ์ -1 ได้อีกด้วย (34) ดังนั้นในการระบุความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดต้องอาศัยการแสดงออกของโปรตีนหลายชนิดร่วมกันเพื่อเพิ่มความแม่นยำในการระบุชนิดและแหล่งกำเนิดของเซลล์ต้นกำเนิด

จากความสามารถของเซลล์ต้นกำเนิดในการเพิ่มจำนวนอย่างไม่มีขีดจำกัดและการแปรสภาพไปเป็นเซลล์ชนิดต่างๆนั้น ทำให้มีการนำเซลล์ต้ นกำเนิดไปใช้ในการรักษา โร ค อันเนื่องมาจากเซลล์ เนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่เสียหายหรือเสื่อมสภาพไป โดยในปัจจุบันทั้งทางวิจัยและทางการแพทย์ ได้มีความพยายามในการนำเซลล์ต้นกำเนิดมาใช้ในการรักษาโรคต่างๆ หลายชนิดด้วยกัน อาทิ โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว (2) โรคโลหิตจางธาลัสซีเมีย (3) พาร์กินสัน (4) โรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด (5) และเบาหวาน (6) แต่ก็ยังมีปัญหาในเรื่องของความรู้และความเข้าใจในเรื่องของปัจจัยที่มีผลต่อคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดทำให้มีข้อจำกัดในการรักษา ดังนั้นหากมีการศึกษาที่ให้ความเข้าใจในรายละเอียดของเซลล์ต้นกำเนิดที่มากขึ้น จะช่วยเพิ่มความสำเร็จในการรักษาด้วยเซลล์ต้นกำเนิดและเป็นความหวังที่จะใช้ในการรักษาโรคอื่นๆ ได้ต่อไป

เนื้อเยื่อในฟัน (dental pulp)

เนื้อเยื่อในฟันเป็นเนื้อเยื่ออ่อนที่อยู่ภายในฟัน ประกอบด้วยเซลล์หลายชนิด ได้แก่ เซลล์สร้างเนื้อฟัน (odontoblast) เซลล์สร้างเส้นใย (fibroblast) เซลล์บุหลอดเลือด (endothelial cells) เซลล์รอบหลอดเลือด (perivascular cells) เซลล์ประสาท (neural cell) เซลล์ในระบบ ภูมิคุ้มกัน (immunocompetent cells) และเซลล์ที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงสภาพ (undifferentiated mesenchymal cells) โดยเซลล์ต่างๆ เหล่านี้ทำหน้าที่ในการซ่อมแซมเนื้อฟัน และรักษาสมดุลภายในโพรงประสาทฟัน

การซ่อมแซมของเนื้อฟันจะเกิดขึ้นเพื่อตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นจากภายน อกที่กระทำต่อเนื้อฟัน การกระตุ้นที่ไม่รุนแรง ไม่มีการตายของเซลล์สร้างเนื้อฟัน เช่น ฟันสึก รอยผุเพียงเล็กน้อย เซลล์สร้างเนื้อฟันจะทำหน้าที่ในการสร้างเนื้อฟันขึ้นมาใหม่เรียกว่า รีแอกชันนารีเดนทีน

(reactionary dentin) แต่หากเกิดแรงกระตุ้นที่รุนแรง เช่น รอยผุข นาดใหญ่ การแตกหักของฟัน ทำให้เกิดการตายของเซลล์สร้างเนื้อฟัน เกิดกระบวนการซ่อมแซมโดยมีการพัฒนาของเซลล์ที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงสภาพที่อยู่ข้างใต้จะพัฒนามาเป็นเซลล์คล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟันใหม่ทดแทน เรียกว่า เนื้อฟันซ่อมเสริม (reparative dentin) (35) ทำให้เนื้อฟันมีการสร้างเพิ่มได้ตลอดชีวิต แสดงให้เห็นว่ามีเซลล์ที่อยู่ภายในเนื้อเยื่อในฟันที่มีคุณสมบัติในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์คล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟัน เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสม ซึ่งเป็นคุณสมบัติหนึ่งที่แสดงให้เห็นถึงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด โดยจะพบคุณสมบัตินี้ทั้งในฟันแท้และฟันน้ำนม

การศึกษาถึงคุณสมบัติของความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในฟันแท้ของมนุษย์ พบว่าสามารถแบ่งตัวได้อย่างไม่มีขีดจำกัด (14) มีการแสดงออกของโปรตีนบน ผิวเซลล์ที่มีความคล้ายคลึงกับเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคมอล เช่น ซีดี-44 (CD-44) ซีดี-106 (CD-106) ซีดี-146 (CD-146) และสโตร-1 (STRO-1) (14, 36) นอกจากนี้ยังสามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์ต่างๆ ได้แก่ เซลล์สร้างกระดูก เซลล์ประสาท เซลล์ไขมัน เซลล์กล้ามเนื้อเรียบ และเซลล์กระดูกอ่อน (12, 14, 15)

ในการศึกษาถึงคุณสมบัติของความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในฟันน้ำนมของมนุษย์นั้น พบว่ามีคุณสมบัติในการแบ่งตัวและพัฒนาไปเป็นเซลล์ต่างๆ ได้เหมือนกับเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในฟันแท้ของมนุษย์ ได้แก่ เซลล์สร้างกระดูก เซลล์ไขมัน เซลล์ประสาท เซลล์กล้ามเนื้อ และเซลล์กระดูกอ่อน (13, 37) การแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์นั้นมีความคล้ายกับเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในฟันแท้ของมนุษย์ เช่น ซีดี -146 และสโตร-1 (13) แต่พบว่าการแสดงออกของโปรตีนที่แสดงคุณสมบัติในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์จำเพาะในร่างกาย เช่น เร็กซ์-1 อ็อกท์-4 นาน็อก และซ็ อกซ์-2 มีปริมาณสูงกว่าที่พบในเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในฟันแท้ของมนุษย์ (38)

จากคุณสมบัติของเนื้อเยื่อในฟันที่แสดงถึงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด ที่มีความสามารถในการสร้างเซลล์ทดแทนตน เอง ความสามารถในการคงสภาพความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด และความสามารถในการแปรสภาพเป็นเซลล์จำเพาะชนิดต่างๆ ได้ในสภาวะที่เหมาะสม จึงสามารถนำมาใช้ในทางคลินิกเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อทดแทนในบริเวณที่มี การทำลายของกระดูก เนื้อฟัน หรือ เส้นประสาทได้ อีกทั้งก ารที่จะนำเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในฟันสามารถเก็บมาใช้เพื่อการศึกษาได้ง่ายทั้งจากฟันน้ำนมที่หลุดเองโดยธรรมชาติ หรือจากฟันแท้ที่มีข้อบ่งชี้ในการถอนฟัน เช่น ฟันคุด หรือฟันที่ถอนเพื่อการจัดฟัน อย่างไรก็ตามในการนำเอาเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในฟันมาใช้ในทาง คลินิกนั้นจำเป็นต้องมีการศึกษาวิจัย เพื่อเพิ่มความเข้าใจใน

พฤติกรรมและการตอบสนองของเซลล์ต่อสิ่งแวดล้อม ทั้งนี้เพื่อที่จะนำเซลล์ไปใช้ได้อย่างปลอดภัย มีประสิทธิภาพและเกิดประโยชน์สูงสุด

สภาวะพร่องออกซิเจน

ออกซิเจนมีความสำคัญต่อร่างกาย เมื่อออกซิเจนเข้าสู่ร่างกายจะผ่านกระบวนการแลกเปลี่ยนก๊าซบริเวณถุงลมปอด โดยแพร่ผ่าน (diffusion) เข้าไปยังเส้นเลือดฝอยภายในปอด (pulmonary capillaries) เข้าสู่กระแสเลือดและเข้าสู่เซลล์ ภายในเซลล์ออกซิเจนจะผ่านขบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสโฟรีเลชัน (oxidative phosphorylation) ให้กลายเ ป็นพลังงานที่เรียกว่า อะดีโนซีนไทรฟอสเฟส (adenosine triphosphate; ATP) เพื่อให้เซลล์ใช้พลังงานดังกล่าวในการทำกิจกรรมต่างๆ ของร่างกาย

ระดับของออกซิเจนในอากาศทั่วไปมีค่าประมาณร้อยละ 21 และเมื่อวัดระดับ ความดันของออกซิเจนในที่สูดดมเข้าไปที่ระดับน้ำทะเลพบว่ามีค่าประมาณ 160 มิลลิเมตรปรอท (39) ในสภาวะที่ระดับออกซิเจนต่ำกว่าปกติจะเกิดภาวะพร่องออกซิเจนขึ้น ซึ่งในร่างกายของมนุษย์นั้นสามารถพบสภาวะพร่องออกซิเจนได้ทั้งในสภาวะที่มีพยาธิสภาพและในสภาวะปกติ โดยส ภาวะที่มีพยาธิสภาพนั้นมักพบเมื่อร่างกายเกิดความบกพร่องของหลอดเลือดที่มาเลี้ยงเนื้อเยื่อ (40) เช่น โรคหัวใจหรือสมองขาดเลือด เบาหวาน ขบ วนการการอักเสบ หรือโรคมะเร็ง ส่วนในสภาวะปกติของร่างกายจะพบสภาวะพร่องออกซิเจนในการพัฒนาตามปกติของร่างกาย โดยพบว่าบริเวณท่อนำไข่ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีระดับของออกซิเจน ร้อยละ 1.5 ถึง 8 (41) นอกจากนี้ในเนื้อเยื่อแต่ละตำแหน่งพบว่ามีระดับของออกซิเจนที่ต่ำกว่าปกติ เนื่องจากออกซิเจนที่ส่งไปยังอวัยวะต่างๆ ในร่างกายผ่านทางหลอดเลือดที่มีขนาดแตกต่างกัน ทำให้ความดันของออกซิเจนในเลือดที่ไปเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นมีค่าแตกต่างกันไป ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของอวัยวะและระยะทางจากหลอดเลือดไปสู่เนื้อเยื่อเหล่านั้น (39) จากการศึกษาถึงระดับของออกซิเจน ในเลือดที่อวัยวะต่างๆ เช่น สมองของแมวมีค่าร้อยละ 0.5 ถึง 7 ขึ้นกับตำแหน่งของสมอง (21) ม้ามและไทมัสของหนูมีค่าร้อยละ 2.1 และ 1.3 ตามลำดับ (42) ซึ่งเห็นได้ว่าระดับของออกซิเจนที่ภาวะปกติของอวัยวะเหล่านั้นเป็นสภาวะพร่องออกซิเจนเมื่อเทียบกับความดันของออกซิเจนที่วัดได้ในบรรยากาศทั่วไป

แหล่งที่พบเซลล์ต้นกำเนิดที่อยู่ในเนื้อเยื่อโต เต็มวัยนั้นจะอยู่ในเนื้อเยื่อที่มีลักษณะเฉพาะที่แตกต่างกัน โดยในสภาพแวดล้อมที่เซลล์ต้นกำเนิดอาศัยอยู่ เรียกว่า สเต็มเซลล์นีช (stem cell niche) ซึ่งช่วยรักษาหรือคงคุณสมบัติของการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดไว้ โดยคุณสมบัติของการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดถูกควบคุมโดยปัจจัย 2 ปัจจัย (43) คือปัจจัยภายในของเซลล์ต้นกำเนิดซึ่งควบคุมโดยยีนต่างๆ และปัจจัยที่มาจากสิ่งแ วดล้อมภายนอกของเซลล์ต้นกำเนิดเอง โดยระดับ

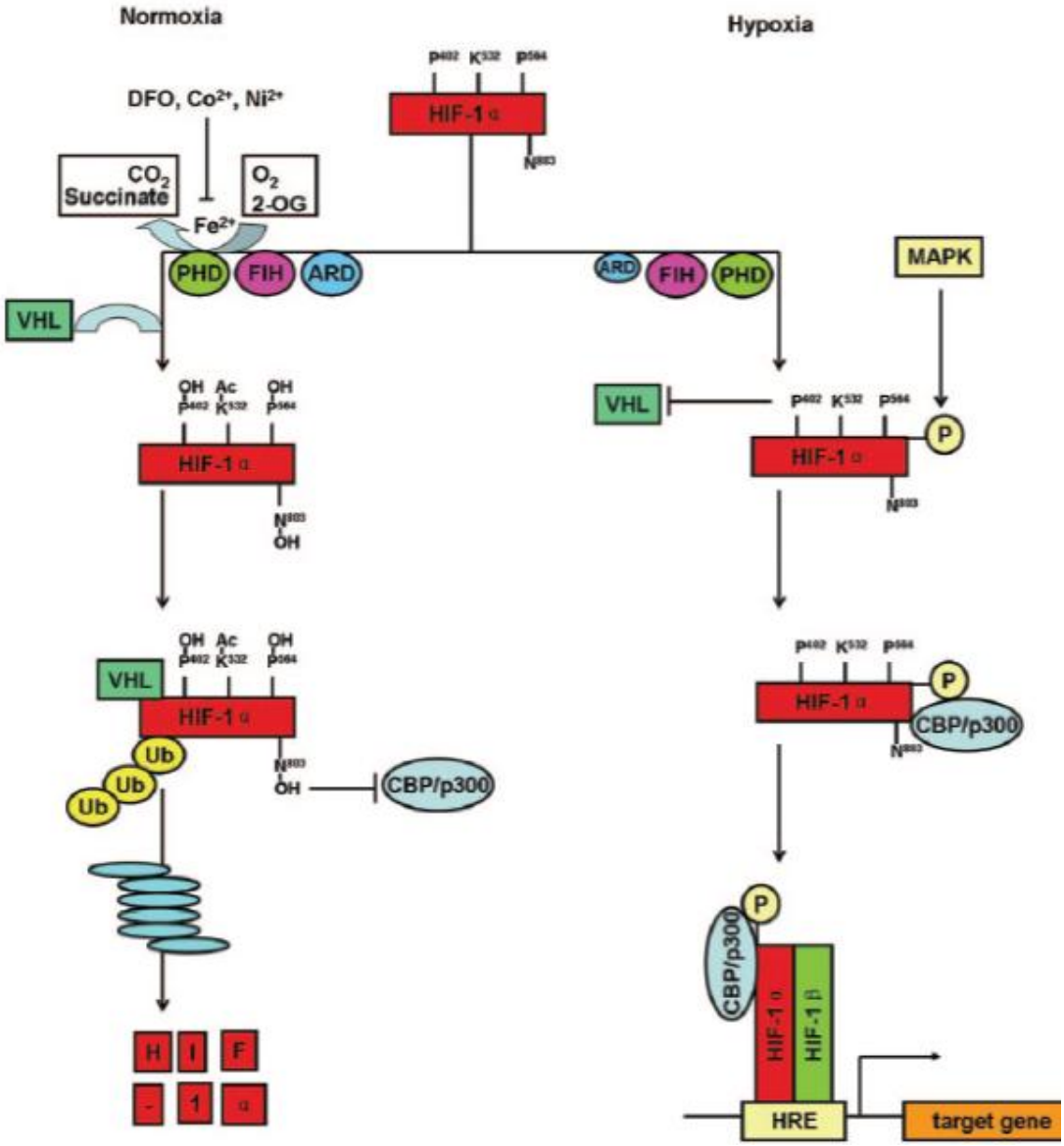
ของออกซิเจนเป็นส่วนสำคัญที่กำหนดสิ่งแวดล้อมภายนอกของเซลล์ต้นกำเนิด และพบว่าระดับออกซิเจนที่สเต็มเซลล์นีชมีค่าเฉลี่ยร้อยละ 1 ถึง 8 (27) เมื่อศึกษาถึงผลของสภาวะพร่องออกซิเจนที่นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดในห้องปฏิบัติการพบว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคมอลจากไขกระดูกของมนุษย์ ที่ระดับออกซิเจนร้อยละ 3 ทำให้เซลล์มีการเพิ่มจำนวน (proliferation) และมีอายุยืนยาวขึ้น (lifespan) มีความสามารถในการแปรสภาพไปเป็นเซลล์สร้างไขมัน (adipogenic differentiation) และเซลล์สร้างกระดูกลดลง (osteogenic differentiation) (44, 45) นอกจากนี้ยังพบว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคมอลจากไขมัน (adipose-derived mesenchymal cells) ที่ระดับออกซิเจนร้อยละ 2 มีผลในการลดความสามารถในการสร้างกระดูกและสร้างกระดูกอ่อน (osteochondrogenesis) (46) ซึ่งเป็นการแสดงถึงบทบาทของออกซิเจนในการคงสภาพความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดไว้ได้

กลไกการตอบสนองต่อสภาวะพร่องออกซิเจน

การศึกษาในระดับโมเลกุลเมื่อเกิดสภาวะพร่องออกซิเจนขึ้น พบว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับ HIF (47) ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการถอดรหัสของยีนที่ตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงออกซิเจนในระดับเซลล์ โดย HIF ประกอบด้วย 2 ซับยูนิต คือ อัลฟาและเบต้าซับยูนิต ในภาวะปกติที่ มีออกซิเจนจะไม่สามารถพบอัลฟา ซับยูนิตได้เนื่องจากอัลฟาซับยูนิตจะถูกทำลายโดยออกซิเจน ปัจจุบันพบว่า HIF-α มี 3 ไอโซฟอร์ม ได้แก่ HIF-1α พบได้ในเนื้อเยื่อเกือบทุกชนิด HIF-2α โครงสร้างคล้าย HIF-1α พบที่เนื้อเยื่อเพียงบางชนิด เช่น ปอด เนื้อเยื่อบุโพรง (endothelium) และคาร์โรทิดบอดี้ (carotid body) และ HIF-3α ซึ่งยังไม่มีการศึกษามากนัก ส่วน HIF-β หรือแอริลไฮโดรคาร์บอนรีเซพเตอร์เทอร์นิวเคลียร์ทรานส์โลเคเทอร์ (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator; ARNT) จะมีการแสดงออกโดยไม่ขึ้นกับระดับของออกซิเจนและสามารถพบได้ในเนื้อเยื่อทุกชนิด

ในสภาวะปกติที่มีออกซิเจนจะเกิดกระบวนการไฮดรอกซีเลชัน (hydroxylation) ทำให้ HIF-1α ถูกเติมหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl) ที่ตำแหน่งโปรลีน (proline) โดยเอนไซม์โพรลิวไฮดรอกซีเลส (Prolyle hydroxylase) โดยอาศัยออกซิเจนเป็นปัจจัยร่วม (co-factor) ทำให้โปรตีนที่มีชื่อว่าฟอนฮิพเพิล-ลินเดา (von Hippel-Lindau; VHL) มาจับกับ HIF-1α ที่ผ่านกระบวนการไฮดรอกซีเลชัน จากนั้นเกิดกระบวนการยูบิควิทิเนชัน (ubiquitination) เพื่อนำโมเลกุลไปทำลายที่โพรเทียโซม (proteasome) ทำให้ไม่สามารถพบ HIF-1α ได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน เมื่อเกิดสภาวะพร่องออกซิเจน กระบวนการไฮดรอกซีเลชันไม่สามารถเกิดขึ้นได้ เนื่อง จากขาดออกซิเจนซึ่งเป็นปัจจัยร่วมทำให้ HIF-1α ไม่ถูกทำลายและสามารถไปจับกับ HIF-1α ที่บริเวณไฮพ็อกเซีย เรสพอน

ซีฟเอเลเมนท์ (hypoxia responsive element; HRE) ของยีนเป้าหมาย (ดังแสดงในภาพที่ 2) ส่งผลให้มีการกระตุ้นการควบคุมการแสดงออกของยีนหลายชนิด เช่น อิริโทรโพอีทิน (erythropoietin: Epo) ที่ช่วยในการเพิ่มจำนวนเม็ดเลือดแดง นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มการแสดงออกของวาสคิวลาร์เอนโดทีเลียมโกรว์ท แฟคเตอร์ (vascular endothelial growth factor; VEGF) และแองจิโอโพอิทิน-2 (angiopoietin-2; Ang-2) ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการสร้างเส้นเลือด ทั้งนี้เพื่อเพิ่มจำนวนออกซิเจนไปเลี้ยงเนื้อเยื่อต่างๆ (48-50)



ภาพที่ 2 แสดงการสลายและคงสภาพของ HIF-1α (47)

สภาวะพร่องออกซิเจนกับเนื้อเยื่อในฟัน

จากลักษณะทางกายภาพของเนื้อเยื่อในฟัน พบว่าเนื้อเยื่อในฟันถูกล้อมรอบด้วยเนื้อเยื่อแข็ง และออกซิเจนสามารถผ่านไปเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อในฟันผ่านทางเส้นเลือดที่เข้ามาทางปลายรากฟันซึ่งมีลักษณะเล็กและแคบ ส่งผลให้ระดับของออกซิเจนในเนื้อเยื่อในฟันมีปริมาณต่ำกว่าระดับของออกซิเจนในอากาศทั่วๆ ไป นอกจากนี้การที่ฟันได้รับการบาดเจ็บ เช่น จากรอยโรคฟันผุ จากอุบัติเหตุ หรือการใช้ยาระงับความรู้สึกเฉพาะที่ที่มีส่วนประกอบของสารบีบหลอดเลือด (vasoconstrictors) ส่งผลทำให้ความดันภายในตัวฟันสูงขึ้น เกิดการอุดตันของเส้นเลือดจนนำไปสู่สภาวะพร่องออกซิเจนได้ (51)

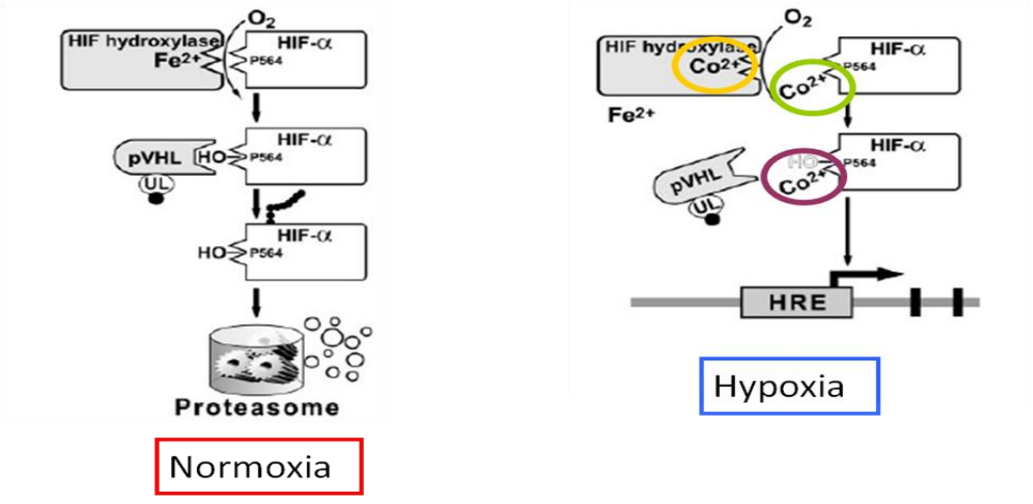
วิธีที่นิยมใช้ในการวัดระดับออกซิเจนในเนื้อเยื่อในฟันคือการใช้อิเล็กโทรดขนาดเล็กที่ไวต่อออกซิเจนสอดเข้าไปในเนื้อเยื่อเพื่อวัดการผลิตออกซิเจนของเนื้อเยื่อนั้น (52) การศึกษาถึงระดับออกซิเจนในเนื้อเยื่อในฟันของมนุษย์นั้นยังไม่พบการรายงาน แต่มีการศึกษาถึงระดับออกซิเจนในเนื้อเยื่อในฟันของกระต่ายและหนูโดยวัดที่ฟันตัดหน้าล่าง พบว่าระดับของออกซิเจนภายในเนื้อเยื่อในฟันของหนูมีค่าร้อยละ 3 (23) และภายในเนื้อเยื่อในฟันของกระต่ายมีค่าร้อยละ 4.5 (24) จะเห็นได้ว่าระดับของออกซิเจนในเนื้อเยื่อในฟันของสัตว์แต่ละชนิดมีค่าไม่เท่ากัน แต่อย่างไรก็ตามภายในเนื้อเยื่อในฟันยังคงมีระดับออกซิเจนที่แสดงถึงสภาวะพร่องออกซิเจนเช่นเดียวกันกับเนื้อเยื่อต่างๆ ในร่างกาย

ผลของสภาวะพร่องออกซิเจนต่อเนื้อเยื่อในฟัน พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเ ยื่อในฟันแท้ของมนุษย์ภายใต้สภาวะพร่องออกซิเจนที่ระดับของออกซิเจนร้อยละ 1 ถึง 3 ส่งผลให้มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์เนื้อเยื่ อในฟัน เพิ่มความสามารถในการ เคลื่อนที่ (migration ability) ยับยั้งความสามารถในการแปรสภาพของเซลล์ไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกและเซลล์สร้างเนื้อฟัน (osteo/odontogenic differentiation) และทำให้เซลล์เนื้อเยื่อในฟันมีการแสดงออกของสโตร- 1 ซึ่งเป็นโปรตีนที่แสดงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคมอลเพิ่มขึ้น (28, 29, 53) จะเห็นได้ว่าการตอบสนองของเนื้อเยื่อในฟันต่อสภาวะพร่องออกซิเจนนั้นทำให้เนื้อเยื่อในฟันแท้แสดงคุณสมบัติความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นส่วนสำคัญที่เกิดขึ้นในกระบวนการสร้างและซ่อมแซมเนื้อฟัน

การจำลองสภาวะพร่องออกซิเจนในห้องปฏิบัติการ

การจำลองสภาวะพ ร่องออกซิเจนในห้องปฏิบัติการนั้นสามารถทำได้ 2 วิธี คือทางกายภาพและการเติมสารเคมี โดยการจำลองสภาวะพร่องออกซิเจนทางกายภาพนั้นเป็นการลดระดับความเข้มข้นของออกซิเจนเพื่อสร้างสิ่งแวดล้อมรอบๆ เซลล์ให้เป็นสภาวะพร่องออกซิเจน แต่

วิธีการนี้ควบคุมได้ยาก เนื่องจากต้องใ ช้เครื่องควบคุมระดับออกซิเจน เพื่อคงสภาวะพร่องออกซิเจนให้มีความคงที่ และต้องมีเครื่องมือวิเคราะห์ระดับออกซิเจนต้องมีความแม่นยำในการควบคุมระดับออกซิเจน ซึ่งทำให้การจำลองสภาวะพร่องออกซิเจนทางกายภาพนั้นยากต่อการควบคุมและคงระดับออกซิเจนให้สม่ำเสมอ นอกจากนี้การ ใช้เครื่องควบคุมออกซิเจนที่มีขนาดเล็กหากต้องเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลานานจำเป็นต้องมีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ และในขั้นตอนดังกล่าวจะต้องมีการนำเซลล์ออกมาจากเครื่องควบคุมระดับออกซิเจนในช่วงระยะเวลาหนึ่ง ดังนั้นเซลล์จะมีการสัมผัสกับออกซิเจนภายนอกที่เพิ่ มขึ้น และอาจจะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมของเซลล์ ทำให้ผลการทดลองคลาดเคลื่อน การแก้ปัญหาดังกล่าวจำเป็นต้องใช้เครื่องควบคุมระดับออกซิเจนที่มีขนาดใหญ่และมีราคาสูง ดังนั้นการจำลองสภาวะพร่องออกซิเจนโดยการเติมสารเคมีจึงถือเป็นอีกทางเลือกหนึ่งเพื่อให้การเพาะ เลี้ยงเซลล์ในห้องปฏิบัติการทำได้ง่ายขึ้น ในการจำลองสภาวะพร่องออกซิเจนด้วยวิธีเติมสารเคมีนั้น พบว่ามีสารเคมีหลายชนิดที่สามารถจำลองสภาวะพร่องออกซิเจน (54-56) เช่น โคบอลต์คลอไรด์ (cobalt chloride) ดีฟีโรซามีน (deferoxamine) และไอรอน คีเลเทอร์ (iron chelator) อย่างไรก็ตามสารเคมีที่นิยมนำมาใช้มากที่สุดและมีการศึกษาอย่างแพร่หลายคือ โคบอลต์คลอไรด์



ภาพที่ 3 แสดงการคงสภาพ HIF-1α ผ่านทางโคบอลต์ (57)

โคบอลต์เป็นสารเคมีตัวหนึ่งที่สามารถจำลองสภาวะพร่องออกซิเจนได้ โดยคุณสมบัติของโคบอลต์เป็นธาตุโลหะหนัก มีประจุบวก ไม่เสถียร สามารถจำลองสภาวะพร่องออกซิเจนด้วยการคงสภาพการแสดงออกของ HIF-1α ไม่ให้ถูกทำลายด้วยออกซิเจน โดยจับกับเอนไซม์โพรลิวไฮดรอกซีเลส (58) หรือจับกับ HIF-1α เพื่อยับยั้งกระบวนการไฮดรอกซีเลชัน นอกจากนี้ยังสามารถจับกับ HIF-1α ที่ผ่านกระบวนการ ไฮดรอกซีเลชันมาแล้ว ทำให้โปรตีนฟอนฮิพเพิล-ลินเดาไม่สามารถจับ HIF-1α ไปทำลายได้ (57) (ดังแสดงในภาพที่ 3) อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีการศึกษาถึงผลของโคบอลต์คลอไรด์ในห้องปฏิบัติการเพื่อจำลองการเกิดสภาวะพร่องออกซิเจนที่ส่งผลต่อความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์จากเนื้อ เยื่อในฟันแท้ของมนุษย์ ดังนั้น การวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของ ความเข้มข้นของโคบอลต์คลอไรด์ต่อความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์จากเนื้อเยื่อในฟันแท้ของมนุษย์

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

<u>กลุ่มศึกษา</u>

เซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อในฟันแท้ที่ไม่มีรอยผุและไม่มีรอยโรคที่ปลายรากฟันของผู้ที่มารับการถอนฟันแท้ตามแผนการรักษาทางทันตกรรมที่แผนกศัลยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ ผสมกับสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ และ 50 ไมโครโมลาร์

<u>กลุ่มเปรียบเทียบ</u>

เซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อในฟันแท้ที่ไม่มีรอยผุและไม่มีรอยโรคที่ปลายรากฟันของผู้ที่มารับการถอนฟันแท้ตามแผนการรักษาทางทันตกรรมที่แผนกศัลยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์

<u>หมายเหตุ</u>

ฟันแท้ที่ใช้ในการวิจัยต้องได้ รับความยินยอมจากผู้ป่วยนำไปเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อในฟันเพื่อนำไปใช้ในการวิจัย โดยลงนามในเอกสารยินยอมโดยได้รับการบอกกล่าวและเต็มใจ (informed consent)

จำนวนตัวอย่าง

เซลล์ที่นำมาใช้ในการทดลองได้จากเนื้อเยื่อในฟันแท้ของผู้ที่มีสุขภาพแข็งแรง ไม่มีโรคประจำตัว จำนวน 3 คน อายุเฉลี่ย 18 ถึง 25 ปี โดยเก็บฟันตัวอย่างจำนวน 3 ซี่ เป็นฟันกรามแท้ซี่ที่สามที่ไม่มีรอยผุ ไม่มีรอยโรคปลายรากฟัน และมีข้อบ่งชี้ในการถอนเนื่องจากได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นฟันคุด

สถานที่ทำการวิจัย

หน่วยปฏิบัติการวิจัยเนื้อเยื่ออนินทรีย์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

- **<u>วัสดุ</u>**
  1. อาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็ม (Dulbecco's Modified Eagle Medium; DMEM, Gibco, USA) ชนิดที่มีฟีนอลเรด (Phenol red) และไม่มีฟีนอลเรด
  2. ซีรัมจากฟีตัสวัว (Fetal bovine serum; FBS, Gibco, USA)
  3. แอลกลูตามีน (L-glutamine, Invitrogen, USA)
  4. เพนนิซิลินจีโซเดียม (Penicillin G sodium, Invitrogen, USA)
  5. สเตรปโตมัยซินซัลเฟต (Streptomycin sulfate, Invitrogen, USA)
  6. แอมโฟเทอริซินบี (Amphotericin, Invitrogen, USA))
  7. เอนไซม์ทริพซินอีดีทีเอร้อยละ 0.25 (0.25% Trypsin-EDTA, Gibco, USA)
  8. เอนไซม์คอลลาจิเนส ชนิดที่ 1 (Type I collagenase, Gibco, USA)
  9. เบต้า-กลีเซอโรฟอสเฟต (β-glycerophosphate, Sigma, USA)
  10. กรดแอสคอร์บิค (Ascorbic acid, Sigma, USA)
  11. เดกซาเมทาโซน (Dexamethasone, Sigma, USA)
  12. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลายน์ที่ ปราศจากเชื้อ (Sterile Phosphate Buffer Saline; PBS)
  13. น้ำกลั่น
  14. สารละลายโคบอลต์คลอไรด์ (Santa Cruz Biotechnology,Inc. Santa Cruz, CA, USA)
  15. เอ็มทีที (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; MTT, Sigma, USA)
  16. ดีเอ็มเอสโอ (Dimethylsulfoxide; DMSO, MERCK, Germany)
  17. สารละลายไกลซีนบัฟเฟอร์ (glycine buffer)
  18. ทริสไฮโดรคลอไรด์ (Tris-Hydrochloride; Tris-HCl, USB, USA)
  19. แมกนีเซียมคลอไรด์ (Magnesiumchloride; $MgCl_2$, Sigma, USA)
  20. ไตรตอนเอ็กซ์-100 (Triton-X-100, USB, USA)
  21. พาราไนโตรฟีนิลฟอสเฟต (p-nitrophenyl phosphate, Invitrogen, USA)
  22. สารละลายบีซีเอ ™ ชนิดเอ และบี (BCA™ protein assay reagent A และ B, Pierce, USA)
  23. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide, MERCK, Germany)

24. สารละลายไตรซอล (TRIzol, Gibco, USA)
25. คลอโรฟอร์ม (chloroform, Roche Diagnostics, USA)
26. ไอโซโพรพานอล (isopropanol, Sigma, USA)
27. อะกาโรส (Agarose, Axygen Biosciences, USA)
28. ไพร์มเมอร์สำหรับยีน 18เอส (primers for 18S, Sigma, USA)
29. ไพร์มเมอร์สำหรับยีนออกเทเมอร์-4 (primers for Oct-4, Sigma, USA)
30. ไพร์มเมอร์สำหรับยีนซอค-2 (primers for Sox-2, Sigma, USA)
31. ไพร์มเมอร์สำหรับยีนนานอก (primers for Nanog, Sigma, USA)
32. ไพร์มเมอร์สำหรับยีนเร็กซ์-1 (primers for Rex-1, Sigma, USA)
33. น้ำปราศจากเอนไซม์นิวคลิเอส (nuclease free water) –เอนไซม์ที่ย่อยกรดนิวคลิอิก
34. ชุดสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอ (Promega, USA)
35. เอนไซม์แทคโพลีเมอเรส (Taq polymerase, Invitrogen, USA) –เอนไซม์สำหรับขยายสัญญาณใน PCR
36. ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไทรฟอสเฟต (deoxyribonucleotidetriphosphate; dNTP)
37. แอลกอฮอลบริสุทธิ์ (Absolute ethanol, Hayman, UK)
38. เอธานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 (70% ethanol, Hayman, UK)
39. 2-อมิโน-2-เมธิล-1-โพรพานอล (2-amino-2-methyl-1-propanol, Sigma, USA)
40. อลิซารินเรด (Alizarin red, Sigma, USA)
41. แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (Ammonium hydroxide, Sigma, USA)
42. ซิทิลไพริดิเนียม คลอไรด์ (Cetylpyridinium chloride, Sigms, USA)
43. โซเดียมฟอสเฟต (Sodium phosphate, Sigma, USA)
44. สารละลายแฟคส์ บัฟเฟอร์ (FACS buffer)
45. ไพรมารี แอนตีบอดีจากหนูเมาส์ที่จำเพาะต่อโปรตีนสโตร- 1 (Mouse primary antibody against STRO-1, Chemicon, USA)
46. เซคคันดารี แอนติบอดีจากห่านที่จำเพาะต่อไพรมารี แอนตีบอดีจากหนูเมาส์ และติดฉลากด้วยไบโอติน (Biotin conjugated goat secondary antibody against Mouse antibody, Chemicon, USA)

47. สเตรปตาวิดินที่จับอยู่กับสารเรืองแสงฟลูออเรสซีน ไอโซไธโอไซยาเนต (Streptavidin-FITC; Fluorescein isothiocyanate, Sigma, USA)
48. หลอดพลาสติกสำหรับเก็บฟันมีฝาเกลียวขนาด 5 มล.
49. หลอดเหวี่ยงขนาด 0.5 และ 1.5 มิลลิลิตร (microcentrifuge tube)
50. หลอดพีซีอาร์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร (PCR tube)
51. ทิปใช้ครั้งเดียวทิ้งสำหรับปิเปตขนาด 10 200 1000 ไมโครลิตร (disposable pipette tip)
52. ถุงมือยางใช้ครั้งเดียวทิ้ง (disposable latex glove)
53. จานเลี้ยงขนาด 35 และ 60 มิลลิเมตร (35, 60-mm culture dish)
54. จานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม (24-well plate)

- **อุปกรณ์**
  1. ตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ (CO_2 incubator)
  2. ตู้ปฏิบัติการปลอดเชื้อ (laminar flow Hood)
  3. เครื่องอ่านค่าบนไมโครเพลท (Microplate reader; ELxx800; BOI-TEK®)
  4. เครื่องวิเคราะห์สารโปรตีนและพันธุกรรม นาโนดรอป (NanoDrop™)
  5. เครื่องสั่นไฟฟ้า (Vortex; Genie2; Scientific Industries, USA)
  6. เครื่องเหวี่ยง (Centrifuge; Sigma, 101; Western Germany)
  7. เครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง (High speed centrifuge; Sorvall, Super T 21; Dupont Company, USA)
  8. เครื่องเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge; Hero lab, Microcen 13; Hero lab GmbH, Germany)
  9. เครื่องหมุนความเร็วต่ำ (low speed rotor)
  10. เครื่องเขย่า (Shake 'n' stack hybridization oven; Hybaid, HBOVCST220; Hybaid Limited, UK)
  11. เครื่องนับจำนวนเซลล์ (haemocytometer)
  12. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
  13. เครื่องนำความร้อนชนิดหลุม (heating block)
  14. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ (polymerase chain reaction, PCR; PCR system Tpersonal, Biometra)

15. เครื่องแยกอาร์เอ็นเอด้วยไฟฟ้าชนิดแนวนอน (horizontal electrophoresis apparatus)
16. เครื่องชั่งไฟฟ้า (analytical balance)
17. กรรไกรชนิดสแตนเลสตัดเนื้อเยื่อ
18. ปากคีบสแตนเลสชนิดปลายแหลม
19. กล้องจุลทรรศน์ (phase contrast light microscope)
20. กล้องถ่ายภาพฟูจิฟิลม์ (Fujifilm)
21. เครื่องโฟลว ไซโตเมทรี (flow cytometry; Beckman Coulter, USA)

ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

การเก็บฟันตัวอย่างก่อนการเพาะเลี้ยงเซลล์

ภายหลังถอนฟันเก็บฟันตัวอย่างใส่ลงในหลอดพลาสติกที่มีฝาเกลียวปิดสนิท ภายในบรรจุอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและนำมาเพาะเลี้ยงเซลล์ภายใน 24 ชั่วโมง

การเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell culture)

ทำความสะอาดฟันด้วย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลายน์ที่ปราศจากเชื้อ เพื่อกำจัดเลือดและสิ่งสกปรกออกจากตัวฟัน จากนั้นดึงเนื้อเยื่อออกจากโพรงฟัน นำมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 1x1 มิลลิเมตร นำไปย่อยด้วยเอนไซม์คอลลาจิเนสชนิดที่ 1 ที่ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยวางบนเครื่องหมุนความเร็วต่ำ จากนั้นนำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 2000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และนำส่วนตกตะกอนไปเพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงขนาด 35 มิลลิเมตรในอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยเลี้ยงในตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์วันเว้นวัน จนกระทั่งเซลล์เติบโตเต็มจานเลี้ยง เซลล์จะถูกถ่ายลงจานใหม่โดยการย่อยด้วยเอนไซม์ทริพซิน -อีดีทีเอ ซึ่งจะย่ อยเซลล์ให้หลุดออกจากพื้นผิวของจานเลี้ยง นับจำนวนเซลล์ด้วยแผ่นสไลด์นับเซลล์ จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปเพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงชุดใหม่ที่ความหนาแน่นประมาณ $5x10^4$ เซลล์/ตารางเซนติเมตร เมื่อเซลล์มีจำนวนมากขึ้นและมีการเรียงตัวหนาแน่นในจานเพาะเลี้ยง จึงทำการหว่านเซลล์ใหม่ทุก 5-7 วัน เซลล์ที่ใช้สำหรับการทดลองเป็นเซลล์รุ่นที่ 3-8

การวัดปริมาณเซลล์ด้วยเทคนิคเอ็มทีที (MTT assay)

เซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันแท้ถูกหว่านลงในจานเลี้ยงเซ ลล์แบบหลุมขนาด 24 หลุม จำนวน 3 จานเลี้ยง จานเลี้ยงละ 9 หลุม ด้วยปริมาณเซลล์หลุมละ $1x10^4$ เซลล์ เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น ในแต่ละจานเลี้ยงจะแบ่งเซลล์ออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 3 หลุม เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ผสมสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0 ไมโครโมลาร์ 25 ไมโครโมลาร์และ 50 ไมโครโมลาร์ ใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเซลล์ 1 วัน 3 วันและ 6 วัน โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์วันเว้นวัน เมื่อครบตามกำหนดเวลา คือ 1 วัน 3 วันและ 6 วัน อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนเป็นดีเอ็มอีเอ็มชนิดที่ไม่มีฟีนอลเรด และเติมสารละลายเอ็มทีที ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยงในตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกแล้วเติมดีเอ็มเอสโอปริม าณ 900 ไมโครลิตรและสารละลายไกลซีนบัฟเฟอร์ปริมาณ 125 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมของจานเลี้ยงเซลล์เพื่อละลายผลึกฟอร์มาซาน (formazan) ที่เซลล์สร้างขึ้นจากสารละลายเอ็มทีที เขย่าให้สีของสารละลายเข้ากัน และนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านค่าบนไมโครเพลทที่ คว ามยาวคลื่นแสง 570 นาโนเมตร จากนั้นแปลงค่าการดูดกลืนแสงเป็นจำนวนเซลล์ตามกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นจากการวัดความสามารถในการเปลี่ยนเอ็มทีทีเป็นผลึกฟอร์มาซานของเซลล์ที่ทราบจำนวน โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยปริมาณเซลล์เนื้อเยื่อในฟันแท้ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่ระยะเวลา 1 วัน มีค่าเป็น 1

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนสโตร -1 โดยการวิเคราะห์ด้วย เทคนิคโฟลวไซโตเมทรี (flow cytometry)

เซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันแท้ถูกหว่านลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบหลุมขนาด 60 มิลลิเมตร ด้วยปริมาณเซลล์หลุมละ $2x10^5$ เซลล์เป็นจำนวน 2 จานเลี้ยง นำมาเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ จำนวน 1 จานเลี้ยง และเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ผสมสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ จำนวน 1 จานเลี้ยง เป็นเวลา 6 วัน โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์วันเว้นวัน เมื่อครบตามกำหนดเวลาดังกล่าว เซลล์จะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทริพซิน -อีดีทีเอ เพื่อถ่ายเซลล์ลงหลอดเหวี่ยงขนาด 1.5 มิลลิเมตร นำเซลล์ไปย้อมด้วยไพรมารี แอนติบอดีจากหนูเมาส์ (Mouse primary antibody) ที่จำเพาะต่อโปรตีนสโตร- 1 จากนั้นนำเซลล์ไปย้อมด้วย เซคคันดารี แอนติบอดีจากห่าน (Goat secondary antibody) ซึ่งจำเพาะต่อไพรมารี แอนติบอดีจากหนูเมาส์ และติดฉลากด้วยไบโอติน (Biotin) ทำการย้อมเซลล์ด้วย สเตรปตาวิดินที่จั บอยู่กับสารเรืองแสงฟลูออเรสซีน ไอโซไธ

โอไซยาเนต (Streptavidin-FITC; Fluorescein isothiocyanate) ในระหว่างทุกขั้น ตอนจะล้างเซลล์ด้วยสารสะลายแฟคส์ บัฟเฟอร์ (FACS buffer) และทำการย้อมเซลล์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีในทุกขั้นตอน จากนั้นนำเซลล์ที่ ย้อมไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโฟลว ไซโตเมทรี โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยการแสดงออกของโปรตีนสโตร-1 ในเซลล์เนื้อเยื่อในฟันแท้ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่ระยะเวลา 6 วัน มีค่าเป็น 1

การวิเคราะห์ปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ของยีนเร็กซ์-1 อ็อกท์-4 นาน็อก และซ็อกซ์-2 ด้วยวิธีอาร์ที-พีซีอาร์ (RT-PCR)

การเตรียมเซลล์สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอตั้งต้น

เซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันแท้ถูกหว่านลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบหลุมขนาด 60 มิลลิเมตร ด้วยปริมาณเซลล์หลุมละ $3x10^5$ เซลล์เป็นจำนวน 3 จานเลี้ยง นำมาเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นในจานเลี้ยงที่ 1 นำมาเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ จานเลี้ยงที่ 2 เพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ ผสมสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ และจานเลี้ยงที่ 3 เพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ ผสมสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

การวิเคราะห์ปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอด้วยวิธีอาร์ที-พีซีอาร์

เมื่อครบตามกำหนดเวลาดังกล่าว เซลล์ถูกทำละลายด้วยสารละลายไตรซอล เพื่อเก็บอาร์เอ็นเอจากเซลล์ตามวิธีการบริษัทแนะนำ จากนั้นวัดปริมาณอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่อง วิเคราะห์สารโปรตีนและพันธุกรรมนาโนดรอปที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร อาร์เอ็นเอจำนวน 1 ไมโครกรัมจากแต่ละกลุ่มทดลองถูกนำไปผ่านกระบวนการรีเวอร์ส ทรานสคริปเตส เพื่อสร้างคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอ (complementary DNA; cDNA) แล้วขยายสัญญาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้เอนไซม์แทคโพลีเมอเรสและไพร์มเมอร์ที่จำเพาะต่อเอ็มอาร์เอ็นเอของยีนเร็กซ์- 1 อ็อกท์-4 นาน็อก และซ็อกซ์- 2 โดยมีลำดับของเบสดังแสดงในตารางที่ 1 ใช้ยีน 18เอส เป็นตัวควบคุมภายในของการทดลอง (internal control) สำหรับการตรวจสอบว่าปริมาณของอาร์เอ็นเอตั้งต้นที่ใช้มีปริมาณเท่ากัน สัญญาณที่ได้จากพีซีอาร์ถูกวิเคราะห์โดยการแยกด้วยไฟฟ้าในอกาโรสเจล (agarose gel) และบันทึกภาพด้วยกล้องดิจิตอลนำ ไปอ่านค่าความเข้มด้วยโปรแกรมไซออน อิมเมจ (Scion Image-Release alpha 4.0.3.2) โดยกำหนดให้ ค่าเฉลี่ยสัดส่วนของความเข้มของแถบสัญญาณของยีนต่างๆ เปรียบเทียบกับยีน 18เอส มีค่าเป็น 1

ตารางที่ 1 ลำดับเบสของไพร์มเมอร์ที่จำเพาะต่อเอ็มอาร์เอ็นเอของยีนเร็กซ์-1 อ็อกท์-4 นาน็อก ซ็อกซ์-2 และ 18เอส

	Primer sequence	cycles	PCR products (base pairs)
Rex-1 (NM_174900.3)	Forward: 5' AGAATTCGCTTGAGTATTCTGA 3' Reverse: 5' GGCTTTCAGGTTATTTGACTGA 3'	40	448
Oct-4 (NM_1173531.1)	Forward: 5' AGACCCAGCAGCCTCAAAATC 3' Reverse: 5' GCAACCTGGAGAATTTGTTCCT 3'	30	181
Nanog NM_024865.2	Forward: 5' TCTCTCCTCTTCCTTCCTCCA 3' Reverse: 5' GGAAGAGTAGAGGCTGGGGT 3'	40	398
Sox-2 (NM_003106.3)	Forward: 5'ACCAGCTCGCAGACCTACAT 3' Reverse: 5'ATGTGTGAGAGGGGCAGTGT 3'	40	219
18S (NR_3286.2)	Forward: 5' GTGATGCCCTTAGATGTCC 3' Reverse: 5' CCATCCAATCGGTAGTAGC 3'	22	232

การวัดค่าการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส

เซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันแท้ ถูกหว่านลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบหลุมขนาด 24 หลุม จำนวน 2 จานเลี้ยง จานเลี้ยงละ 12 หลุม ด้วยปริมาณเซลล์หลุมละ 1.25 x10^4 เซลล์ เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นในแต่ละจานเลี้ยงจะแบ่งเซลล์ออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 3 หลุม กลุ่มที่ 1 เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ กลุ่มที่ 2 เพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง กลุ่มที่ 3 เพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งผสมสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ กลุ่มที่ 4 เพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งผสมสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 7 วันและ 14 วัน โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์วันเว้นวัน

เมื่อครบกำหนดเวลาทำละลายเซลล์ในจานเลี้ยงเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์สกัดปริมาณ 120 ไมโครลิตร (extraction buffer: ทริสไฮโดรคลอไรด์ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ แมกนีเซียม

คลอไรด์ ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ไตรตอนเอ๊กซ์-100 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และมีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 10) นำสารละลายเซลล์มาวัดปริมาณเอนไซม์อัลคาไลน์ ฟอสฟาเตสและปริมาณโปรตีน

การวัดปริมาณเอนไซม์อัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส ทำโดยผสมสารละลายเซลล์ปริมาณ 100 ไมโครลิตร กับสารละลายของพาราไนโตรฟีนิลฟอสเฟตปริมาณ 110 ไมโครลิตร (p-nitrophenyl phosphate: 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของพาราไนโตรฟีนิลฟอสเฟต 0.1 โมลาร์ของ 2-อมิโน-2-เมธิล-1-โพรพานอล 2 มิลลิโมลาร์ของแมกนีเซียมคลอไรด์ และมีความเป็นกรด -ด่างเท่ากับ 10.5) โดยพารา ไนโตรฟีนิลฟอสเฟตจะเป็นซับสเตรท (substrate) ของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส นำส่วนผสมนี้ไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เอนไซม์ อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเปลี่ยนพาราไนโตรฟีนิลฟอสเฟตให้เป็นพาราไนโตรฟีนอล (p-nitrophenol) ที่เป็นสารที่มีสี ปฏิกิริยาถูกหยุดโดยการเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาณ 900 ไมโครลิตร แล้วนำสารละลายไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านค่าบนไมโครเพลทที่ความยาวคลื่นแสง 410 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปคำนวณเป็นปริมาณเอนไซม์ (ไมโครกรัม) โดยเปรี ยบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายพาราไนโตรฟีนอลที่ใช้เป็นมาตรฐาน

วัดปริมาณโปรตีนโดยใช้ชุดวัดโปรตีนบีซีเอ ™ โดยนำสารละลายเซลล์จำนวน 20 ไมโครลิตรผสมกับสารละลายบีซีเอ ชนิดเอ จำนวน 1 มิลลิลิตร และชนิดบี จำนวน 20 ไมโครลิตร นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำสารละลายไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านค่าบนไมโครเพลทที่ความยาวคลื่นแสง 562 นาโนเมตร ค่าที่ได้ถูกนำไปคำนวณปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัม) โดยเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนอัลบูมินที่ใช้เป็นโปรตีนมาตรฐาน ค่าการทำง านของเอนไซม์อัลคาไลน์ ฟอสฟาเตสคำนวณเป็นสั ดส่วนของปริมาณเอนไซม์อัลคาไลน์ ฟอสฟาเตสต่อปริมาณ โปรตีน โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันแท้ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ มีค่าเป็น1

การหาปริมาณตะกอนแคลเซียมด้วยสีอลิซารินเรด เอส (Alizarin red S)

เซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันแท้หว่านลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบหลุมขนาด 24 หลุม จำนวน 1 จานเลี้ยง จานเลี้ยงละ 12 หลุม ด้วยปริมาณเซลล์หลุมละ 1.25×10^4 เซลล์ เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น แบ่งเซลล์ออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 3 หลุม กลุ่มที่ 1 เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ กลุ่มที่ 2 เพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการ

แปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง กลุ่มที่ 3 เพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแ ข็งผสมสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ กลุ่มที่ 4 เพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งผสมสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 28 วัน โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์วันเว้นวัน เมื่อครบกำหนดเวลาตรึงเซลล์ ด้วยแอลกอฮอลบริสุทธิ์ (absolute ethanol) เป็นเวลา 15 นาที และย้อมด้วยสารละลายอลิซารินเรด โดยใช้อลิซารินเรดร้อยละ 1 ละลายในแอมโมเนียม ไฮดรอกไซด์ร้อยละ 0.1 ที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 6.5 (0.1% NH_4OH, pH6.5) ย้อมเซลล์เป็นเวลา 5 นาที และล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น จะปรากฏสีแดงติดบนตะกอนแคลเซียมฟอสเฟต เติม 1 มิลลิลิตรของซิทิลไพริดิเนียม คลอไรด์ร้อยละ 10 (Cetylpyridinium chloride) ใน 10 มิลลิโมลาร์โซเดียมฟอสเฟตลงในแต่ละหลุมของจานเลี้ยงเซลล์เพื่อละลายผลึกที่ติดสีอลิซารินเรด จากนั้นจึงนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านค่าบนไมโครเพลทที่ความยาวคลื่นแสง 570 นาโนเมตร โดยกำหนดให้ ค่าดูดกลืนแสง ของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันแท้ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ มีค่าเป็น 1

การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิจัยครั้งนี้ใช้โปรแกรมสำเร็จรูปเอสพีเอสเอส เวอร์ชัน 16.0 (SPSS version 16.0, SPSS Inc., USA) ในการประมวลผลข้อมูลที่ได้จากการศึกษา ดังนี้

1. สถิติเชิงพรรณนา ได้แก่ การวัดแนวโน้มเข้าสู่ส่วนกลาง (ค่าเฉลี่ย) การวัดการกระจาย (ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)
2. สถิติเชิงวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างของอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ ปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอของยีนอ็อกท์- 4 ซ็อกซ์-2 และนาน็อก การทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ปริมาณตะกอนแคลเซียมด้วยสีอลิซารินเรด เอส ระหว่างกลุ่มศึกษา (เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในฟันแท้ของมนุ ษย์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ ผสมกับสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ที่มีความเข้มข้นต่างๆ) และกลุ่มเปรียบเทียบ (เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในฟันแท้ของมนุษย์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์) ด้วยวิธีการทดสอบการแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05
3. วิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณโปรตีนสโตร -1 ของเซลล์ ระหว่างกลุ่มศึกษาและกลุ่มเปรียบเทียบด้วยวิธีทดสอบทีชนิดตัวอย่างอิสระ (Independence sample t-test) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

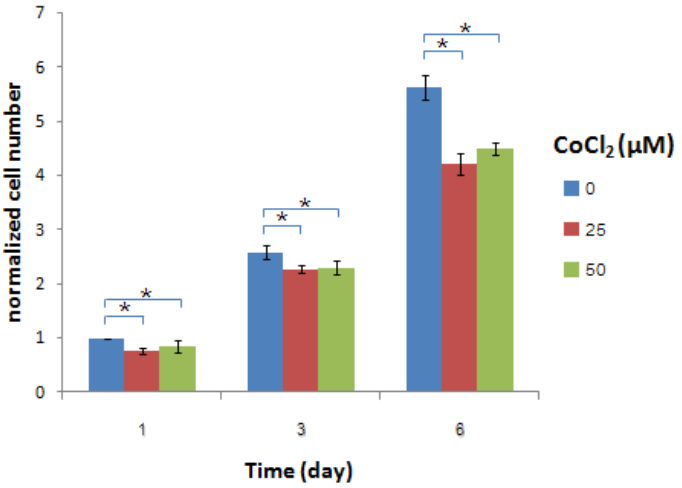
บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการวิเคราะห์

(รายละเอียดการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแสดงไว้ในภาคผนวก)

1. การศึกษาการเพิ่มจำนวนของเซลล์

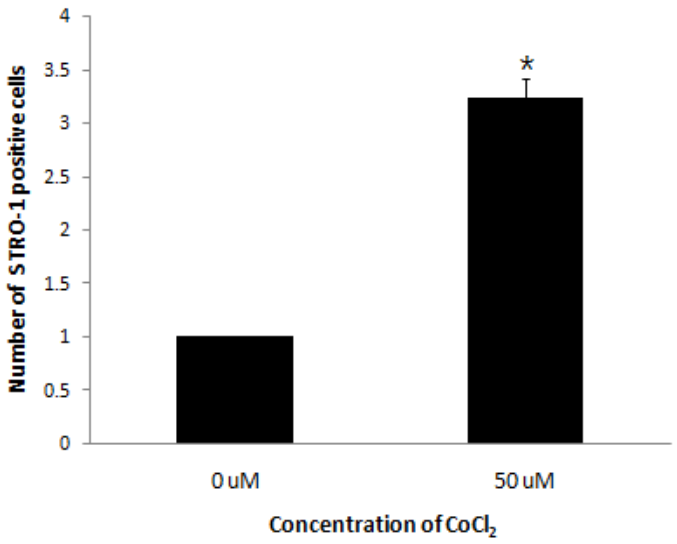
ผลการศึกษาการเพิ่มจำนวนของเซลล์ พบว่าเซลล์ทั้ง 3 กลุ่ม สามารถเพิ่มจำนวนมากขึ้นตามระยะเวลาที่เลี้ยงจาก 1 ถึง 6 วัน และเซลล์เนื้อเยื่อในฟันแท้ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ผสมกับสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 25 และ 50 ไมโครโมลาร์ที่ระยะเวลา 1 วัน 3 วัน และ 6 วัน มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์น้อยกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 กราฟแสดงการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่วัดด้วยเทคนิคเอ็มทีที ของเซลล์ จากเนื้อเยื่อในฟันแท้มนุษย์ (*: $p < 0.05$)

2. การศึกษาปริมาณโปรตีนสโตร-1

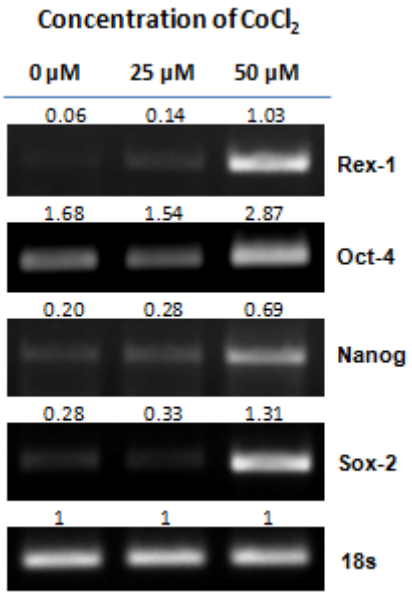
จากผลการศึกษาการเพิ่มจำนวนของเซลล์ด้วยเทคนิคเอ็มทีทีพบการลดลงของการเพิ่มจำนวนเซลล์เนื้อเยื่อในฟันแท้เมื่อเพาะเลี้ยง ในอาหารเลี้ยงเซลล์ผสมกับสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ แต่อย่างไรก็ตามเนื่องจากเซลล์เนื้อเยื่อในฟันแท้ประกอบไปด้วยเซลล์หลายชนิด ผู้วิจัยจึงทำการศึ กษา เพิ่มเติมถึง การแสดงออกของโปรตีน จำเพาะ ที่แสดงถึงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด ได้แก่ โปรตีนสโตร-1 (36) เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 6 วัน พบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ผสมกับสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ มีการแสดงออกของโปรตีนสโตร- 1 มากกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยคิดเป็น 3.235 ± 0.178 เท่าของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันแท้ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ระยะเวลา 6 วัน (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 การแสดงออกของโปรตีนสโตร- 1 โดยการวิเคราะห์ด้วย เทคนิคโฟลวไซโตเมทรี เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 6 วัน (*: $p < 0.05$)

3. **การศึกษาปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอของยีนเร็กซ์-1 อ็อกท์-4 นาน็อก และซ็อกซ์-2**

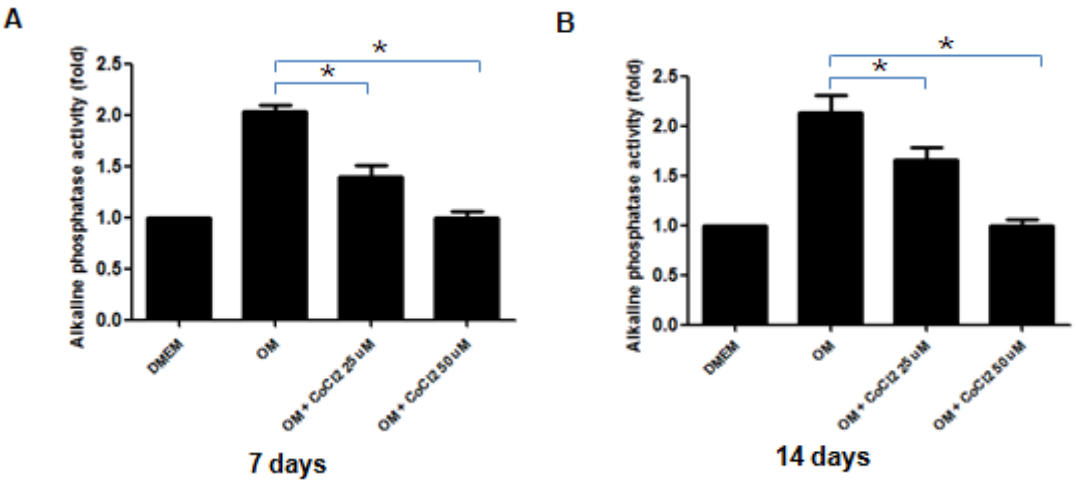
การศึกษาเปรียบเทียบผลของโคบอลต์คลอไรด์ต่อระดับการแสดงออกของยีนที่แสดงสภาวะการเป็นเซลล์ต้นกำเนิด ได้แก่ เร็กซ์-1 อ็อกท์-4 นาน็อก และซ็อกซ์-2 เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 3 วัน พบว่า เซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ผสมกับสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์มีการแสดงออกของ ยีนในกลุ่มนี้ไม่แตกต่างกับ เซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ เพียงอย่างเดียว แต่ เซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ผสมกับสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ มีการแสดงออกของยีน ในกลุ่มนี้มากกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์เพียงอย่างเดียว (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 การแสดงออกของยีนที่แสดงสภาวะของการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดโดยการวิเคราะห์ด้วยวิธีอาร์ที-พีซีอาร์ เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 3 วัน

4. **การศึกษาค่าการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส**

การศึกษาผลของโคบอลต์คลอไรด์ต่อการแปรสภาพของเนื้อเยื่อในฟันแท้ไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อในฟันแท้ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง ที่ผสมกับสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ที่มีความเข้มข้น ต่างๆ เป็นเวลา 7 และ 14 วัน แล้วนำสารละลายเซลล์มาหาค่าการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส พบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งมีค่าเฉลี่ยการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสมากกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ อย่างมีนัยสำ คัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และเมื่อนำเซลล์เนื้อเยื่อในฟันแท้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งที่ผสมกับสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 25 และ 50 ไมโครโมลาร์ พบว่ามีค่าเฉลี่ยการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสน้อยกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ตามลำดับ (ภาพที่ 7A, 7B)



ภาพที่ 7 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส

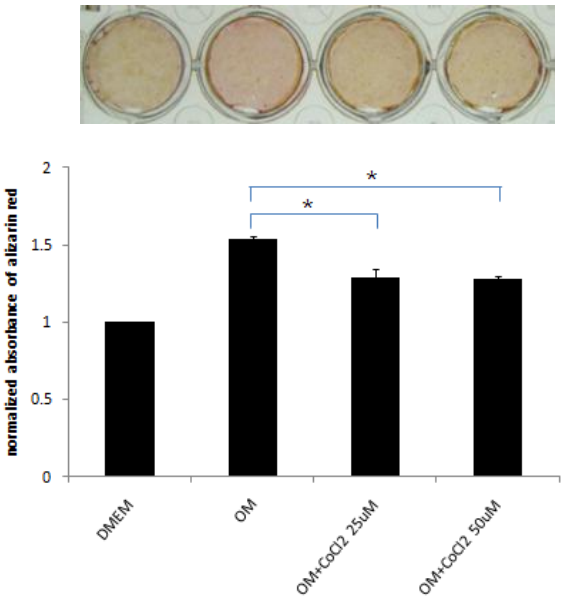
ภาพที่ 7A กราฟแสดงค่าเฉลี่ยการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อในฟันแท้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดต่างๆ เป็นระยะเวลา 7 วัน (*: $p < 0.05$)

ภาพที่ 7B กราฟแสดงค่าเฉลี่ยการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อในฟันแท้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดต่างๆ เป็นระยะเวลา 14 วัน (*: $p < 0.05$)

(DMEM: เซลล์เนื้อเยื่อในฟันแท้ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ OM: เซลล์เนื้อเยื่อในฟันแท้ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการแปรสภาพเป็นเซลล์ สร้างเนื้อเยื่อแข็ง OM+$CoCl_2$ 25 μM: เซลล์เนื้อเยื่อในฟันแท้ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งผสมกับสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ OM+$CoCl_2$ 50 μM: เซลล์เนื้อเยื่อในฟันแท้ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการแปร สภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งผสมกับสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์)

5. การศึกษาปริมาณตะกอนแคลเซียมที่ย้อมด้วยสีอลิซารินเรด เอส

เมื่อนำเซลล์เนื้อเยื่อในฟันแท้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์และอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการแปรสภาพเ ป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง ที่ผสมกับสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ที่มีความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 28 วัน พบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง สามารถแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งได้มากกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ และมากกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งผสมกับสารละลาย โคบอลต์คลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 25 และ 50 ไมโครโมลาร์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 แสดงการย้อมตะกอนแคลเซียม และกราฟค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนแสงของปริมาณตะกอนแคลเซียมที่ย้อมด้วยสีอลิซารินเรด เอส เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อในฟันแท้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดต่างๆ เป็นระยะเวลา 28 วัน (DMEM: เซลล์เนื้อเยื่อในฟันแท้ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ OM: เซลล์เนื้อเยื่อในฟันแท้ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง OM+$CoCl_2$ 25 μM: เซลล์เนื้อเยื่อในฟันแท้ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการแปรสภ าพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งผสมกับสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ OM+$CoCl_2$ 50 μM: เซลล์เนื้อเยื่อในฟันแท้ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งผสมกับสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ *: $p < 0.05$)

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

อภิปรายผลการวิจัย

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของโคบอลต์คลอไรด์ต่อการเพิ่มจำนวน การส่งเสริมความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด และการยับยั้งการแปรสภาพของเซลล์จากเนื้อเยื่อในฟันแท้ของมนุษย์เพื่อนำไปสู่การตอบคำถามของงานวิจัยในการศึกษาครั้งนี้คือ โคบอลต์คลอไรด์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันมีผลต่อความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์จากเนื้อเยื่อในฟันแท้ของมนุษย์หรือไม่ อย่างไร

ในการศึกษาครั้งนี้ ได้เลือกศึกษา ใช้สารละลายโคบอลต์คลอไรด์ เนื่องจากกลไก การทำงาน ของโคบอลต์คลอไรด์มีความคล้ายคลึงกับสภาวะพร่องออกซิเจน ที่เชื่อว่าเป็นสภาวะแวดล้อมที่ใกล้เคียงกับสภาวะแวดล้อมของเซลล์ต้นกำเนิดที่อยู่ภายในร่างกาย และมีรายงาน ว่าสภาวะพร่องออกซิเจนมีผลต่อการเพิ่มจำนวน ของเซลล์ การแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด และการแปรสภาพไปเป็นเนื้อเยื่อแข็งของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคมอล (44, 59, 60) ในการใช้สารละลายโคบอลต์คลอไรด์เพื่อจำลองสภาวะพร่องออกซิเจนในห้องปฏิบัติการนั้น ได้มีรายงานถึงผลของโคบอลต์คลอไรด์ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดในเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคมอล (61) แต่ยังไม่มีการศึกษาใดที่แสดงถึงการใช้โคบอลต์คลอไรด์ในการเพาะเลี้ยงเซลล์จากเนื้อเยื่อในฟันแท้มนุษย์ ส่วนการเลือกใช้ความเข้มข้นของโคบอลต์คลอไรด์นั้นพบว่า ในแต่ละการศึกษาที่แสดงถึงผลของโคบอลต์คลอไรด์ในเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้มาจากแหล่งต่างๆ กำหนดความเข้มข้นของโคบอลต์คลอไรด์ที่แตกต่างกันไป โดยความเข้มข้นของโคบอลต์คลอไรด์ที่นิยมนำมา ใช้คือ 100 ไมโครโมลาร์ (26, 62) แต่จากผลการศึกษานำร่อง (pilot study) พบว่าเมื่อนำเซลล์จากเนื้อเยื่อในฟันแท้ของมนุษย์มาเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ผสมกับสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ทำให้เซลล์จากเนื้อเยื่อในฟันแท้ของมนุษย์ แสดงผลลดอัตราการเพิ่มจำนวนของ เซลล์ลง ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยจึงได้เลือกใช้สารละลายโคบอลต์คลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 25 และ 50 ไมโครโมลาร์

จากคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดที่สามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างไม่มีขีดจำกัดและสามารถแปรสภาพไปเป็นเซลล์ต่างๆได้ ดังนั้นวิธีการที่ใช้ทดสอบความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดนั้น มักเป็นการทดสอบพฤติกรรมของเซลล์ เช่น ความสามารถในการเพิ่มจำนวนอย่างไม่มีขีดจำกัดและความสามารถแปรสภาพไปเป็นเซลล์ชนิดต่างๆ

จากผลการศึกษา การทดสอบการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่วัดด้วยเทคนิคเอ็มทีที พบว่าการจำลองสภาวะพร่องออกซิเจนในห้องปฏิบัติการโดยการเติมสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเซลล์มีผลลดการแบ่งตัวของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันแท้ของมนุษย์ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่พบว่าโคบอลต์คลอไรด์มีผลยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคมอลที่นำมาจากสายสะดือ เนื่องมาจากการที่โคบ อลต์คลอไรด์ทำให้วงจรชีวิตของเซลล์เปลี่ยนแปลงไป โดยจะทำให้เซลล์ไปหยุดในช่วงระยะพักเพิ่มมากขึ้น (G0/G1 phase) และยังพบว่ามีการลดลงของจำนวนเซลล์ที่อยู่ในระยะแบ่งตัว (G2/S/M phase) ด้วย นอกจากนี้ยังพบว่า โคบอลต์คลอไรด์ทำให้รูปร่างของเซลล์เปลี่ยนแปลงไปโดยทำให้เซ ลล์มีรูปร่าง ยาวขึ้น มี ช่องว่างระหว่างเซลล์มากขึ้นส่งผลให้การส่งสัญญาณระหว่างเซลล์ลดลง ทำให้เกิดการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ (61) นอกจากนี้เซลล์ที่อยู่ภายในเนื้อเยื่อในฟันแท้ของมนุษย์ ที่ประกอบไปด้วยเซลล์หลากหลายชนิด แต่มีจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับจำนวนเซลล์ทั้งหมดที่มีอยู่ในเซลล์เนื้อเยื่อในฟัน (63) ดังนั้นเมื่อศึกษาถึงผลของโคบอลต์คลอไรด์ต่อจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนสโตร -1 ซึ่งเป็นโปรตีนบนผิวเซลล์ที่แสดงถึงเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคมอลระยะแรกที่นิยมนำม าใช้ในการระบุความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันแท้ (13, 36) พบว่าเซลล์มีการแสดงออกของสโตร -1 เพิ่มมากขึ้น แสดงว่ามีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ต้นกำเนิดมากขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาของ Iida และคณะ และ Sukdee และคณะที่ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์จากเนื้อเยื่อในฟันแท้ของมนุษย์ ภายใต้สภาวะพร่องออกซิเจน และพบ การแสดงอออกของโปรตีนสโตร -1 เพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่ามีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดที่อยู่ภายในเซลล์เนื้อเยื่อในฟันแท้ของมนุษย์ (28, 29)

นอกจากนี้ การแสดงออกของยีนที่แสดงถึงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดนั้นก็เป็นอีกวิธีการหนึ่งในการบ่งบอกถึงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด ซึ่งเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้มาจากแหล่งกำเนิดที่แตกต่างกันจะมีการแสดงออกของยีนที่แต กต่างกันด้วย ในการบ่งชี้ถึงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์จากเนื้อเยื่อในฟันยังไม่มีการ ระบุอย่างแน่ชัด ในการศึกษานี้เลือกการแสดงออกของยีนเร็กซ์-1 อ็อกท์-4 นาน็อก และซ็อกซ์-2 (30, 38) ซึ่งยีนในกลุ่มนี้เป็นยีนที่แสดงถึงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อน จากการศึกษาในอดีตพบว่าสภาวะพร่องออกซิเจนส่งผลต่อการเพิ่มการแสดงออกของยีนเร็กซ์- 1 อ็อกท์-4 นาน็อก และซ็อกซ์-2 ในเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคมอลที่ได้จากไขกระดูกและเนื้อเยื่อไขมัน (44, 59, 60) ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าโคบ อลต์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์มีการแสดงออกของยีนไม่แตกต่างกับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์เพียงอย่างเดียว ในขณะที่ เซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ผสมกับสารละลายโคบอลต์

คลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ สามารถเพิ่มการแสดงออกของยีนในกลุ่มนี้ได้ ซึ่งอาจสรุปได้ว่าโคบอลต์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ สามารถส่งเสริมความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์จากเนื้อเยื่อในฟันแท้ของมนุษย์โดยการเพิ่มการแสดงออกของยีนเร็กซ์- 1 อ็อกท์-4 นาน็อก และซ็อกซ์-2 ได้ดีกว่าโคบอลต์คลอไรด์ที่มีความเข้มข้นต่ำกว่า

เนื่องจากเซลล์ต้นกำเนิดมีคุณสมบัติในการแปรสภาพไปเป็นเซลล์เนื้อเยื่อแข็งได้ ผู้วิจัยจึงนำเซลล์เนื้อเยื่อในฟันแท้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง พบว่าค่าเฉลี่ยการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟ าเตสและการสะสมของปริมาณตะกอนแคลเซียมที่ย้อมด้วยสีอลิซารินเรด เอส ลดลงตามระดับโคบอลต์คลอไรด์ที่เพิ่มขึ้น (dose dependent) แสดงให้เห็นว่าสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ส่งผลยับยั้งการแปรสภาพไปเป็นเ ซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งของ เซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมา ที่พบว่า เมื่อนำเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคมอลจากไขกระดูกมาเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการแปรสภาพไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งภายใต้สภาวะพร่องออกซิเจน มีผลในการลดความสามารถในการแปรสภาพไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง (44, 45, 64) ซึ่งอาจจะกล่าวได้ว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่มีระดับออกซิเจนต่ำนั้นจะเป็นการป้องกันเซลล์ต้นกำเนิดไม่ให้มีการแปรสภาพไปเป็นโพรเจนนิเตอร์เซลล์จำเพาะ (specific progenitor cell) ซึ่งเป็นการรักษาคุณสมบัติความเป็นภาวะที่ยังไม่มีการแปรสภาพ (undifferentiated stage) ของเซลล์ต้นกำเนิดเอาไว้

ในการนำเซลล์ต้ นกำเนิดที่อยู่ภายในเนื้อเยื่อต่างๆของร่างกายมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการนั้น เป็นการเปลี่ยนแปลงสภาพแลดล้อมที่เซลล์ต้นกำเนิดอาศัยอยู่ ดังนั้นในการคงสภาพความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดในห้องปฏิบัติการก่อนที่จะนำเซลล์ต้นกำเนิดไปใช้จึงเป็นกระบวนการที่มีความสำคัญ ในการ ศึกษานี้จึงเป็นการจำลองสภาวะพร่องออกซิเจนในห้องปฏิบัติการโดยใช้สารละลายโคบอลต์คลอไรด์ที่ความเข้นข้นที่แตกต่างกัน เพื่อให้เซลล์อยู่ในสภาวะที่มีความคล้ายกับสภาพแวดล้อมที่อยู่ภายในเนื้อเยื่อ จากผลการศึกษานี้พบว่าโคบอลต์คลอไรด์ทำให้เซลล์จากเนื้อเยื่อในฟันแท้มนุ ษย์มีพฤติกรรมที่เปลี่ยนแปลงไปจากการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ โดยส่งผลให้เซลล์เนื้อเยื่อในฟันมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิด เพิ่มการแสดงออกของโปรตีนที่แสดงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด และยับยั้งการแปรสภาพเซลล์ไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง โดยโคบอลต์ค ลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์แสดงผลการส่งเสริมความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดได้ดีกว่าโคบอลต์คลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ แสดงให้เห็นว่าโคบอลต์คลอไรด์ทำให้เซลล์เนื้อเยื่อในฟันแท้มนุษย์มีความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมากขึ้น โดยความสัมพันธ์ดังกล่าวเป็นไปตา มความเข้มข้นของโคบอลต์คลอไรด์ที่ เพิ่มขึ้น จากผล

การศึกษานี้ทำให้สามารถนำความรู้ที่ได้ไปพัฒนาต่อยอดเพื่อ ค้นหาปัจจัยหรือ สภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิด อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในทางการแพทย์ เพื่อนำไปใช้ในการรักษาผู้ป่วยต่อไป

สรุปผลการวิจัย

สารละลายโคบอลต์คลอไรด์ มีผลเพิ่ม ความเป็นเซลล์ต้นกำนิด โดยเพิ่ม สัดส่วน การแสดงออกของ โปรตีนสโตร-1 และการแสดงออกของ ยีนเร็กซ์-1 อ็อกท์-4 นาน็อก และซ็อกซ์-2 ในขณะที่ยับยั้งการแปรสภาพเซลล์ไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง โดยแสดง ผลลดการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและการสะสมของตะกอนแคลเซียม เมื่อเปรียบเทียบกับ เซลล์เนื้อเยื่อในฟันแท้มนุษย์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ ปกติ โดยเซลล์เนื้อเยื่อในฟันแท้มนุษย์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ผสมกับสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์แสดงผลการส่งเสริมความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดได้ดีกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ผสมกับสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ ผลการทดลองดังกล่าวอาจสรุปได้ว่าโคบอลต์คลอไรด์มีผลเพิ่มความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันแ ท้ของมนุษย์ตามความเข้มข้นของโคบอลต์คลอไรด์ที่เพิ่มขึ้น

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาผลของโคบอลต์คลอไรด์ที่ส่งผลต่อพฤติกรรมของเซลล์จากเนื้อเยื่อในฟันมาก่อน ในการศึกษานี้จึ งต้องศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องของความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายโคบอลต์คลอไรด์กับระดับของออกซิเจน รวมถึงกลไกของโคบอลต์คลอไรด์ที่ส่งผลต่อจำนวนและการยับยั้งการแปรสภาพของเซลล์ต้นกำเนิด

รายการอ้างอิง

(1) Kiatpongsan, S., Tannirandorn, Y.,and Virutamasen, P. Introduction to Stem Cell Medicine. J Med Assoc Thai 89 (2006) : 111-117.

(2) Ashfaq, K., Yahaya, I., Hyde, C., Andronis, L., Barton, P., Bayliss, S., et al. Clinical effectiveness and cost-effectiveness of stem cell transplantation in the management of acute leukaemia: a systematic review. Health Technol Assess 14 (December 2010) : iii-iv, ix-xi, 1-141.

(3) Angelucci, E. Hematopoietic stem cell transplantation in thalassemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2010 (2010) : 456-462.

(4) Wakeman, D.R., Dodiya, H.B.,and Kordower, J.H. Cell transplantation and gene therapy in Parkinson's disease. Mt Sinai J Med 78 (January-February 2011) : 126-158.

(5) Wu, J., Li, J., Zhang, N.,and Zhang, C. Stem cell-based therapies in ischemic heart diseases: a focus on aspects of microcirculation and inflammation. Basic Res Cardiol 106 (May 2011) : 317-324.

(6) Godfrey, K.J., Mathew, B., Bulman, J.C., Shah, O., Clement, S.,and Gallicano, G.I. Stem cell-based treatments for Type 1 diabetes mellitus: bone marrow, embryonic, hepatic, pancreatic and induced pluripotent stem cells. Diabet Med 29 (January 2012) : 14-23.

(7) Kucia, M., Reca, R., Jala, V.R., Dawn, B., Ratajczak, J.,and Ratajczak, M.Z. Bone marrow as a home of heterogenous populations of nonhematopoietic stem cells. Leukemia 19 (July 2005) : 1118-1127.

(8) Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J., et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue Eng 7 (April 2001) : 211-228.

(9) Toma, J.G., Akhavan, M., Fernandes, K.J., Barnabe-Heider, F., Sadikot, A., Kaplan, D.R., et al. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. Nat Cell Biol 3 (September 2001) : 778-784.

(10) Jackson, K.A., Mi, T.,and Goodell, M.A.. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. Proc Natl Acad Sci USA 96 (December 1999) : 14482-14486.

(11) Gage, F.H. Mammalian neural stem cells. Science 287 (February 2000) : 1433-1438.

(12) Gronthos, S., Mankani, M., Brahim, J., Robey, P.G.,and Shi, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. Proc Natl Acad Sci USA 97 (December 2000) : 13625-13630.

(13) Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L.W., Robey, P.G., et al. SHED : stem cells from human exfoliated deciduous teeth. Proc Natl Acad Sci USA 100 (May 2003) : 5807-5812.

(14) Gronthos, S., Brahim, J., Li, W., Fisher, L.W., Cherman, N., Boyde, A., et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. J Dent Res 81 (August 2002) : 531-535.

(15) Koyama, N., Okubo, Y., Nakao, K.,and Bessho, K. Evaluation of pluripotency in human dental pulp cells. J Oral Maxillofac Surg 67 (March 2009) : 501-506.

(16) ณยา วงษ์พูน. สเต็มเซลล์: ความก้าวหน้าทางแนวคิดและการประยุกต์ใช้ Stem cell: Advances in Concept and Applications. ไทยเภสัชศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ 5 (2553) : 350-362.

(17) Scotland, K.B., Chen, S., Sylvester, R.,and Gudas, L.J. Analysis of Rex1 (zfp42) function in embryonic stem cell differentiation. Dev Dyn 238 (August 2009) : 1863-1877.

(18) Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. Cell 95 (October 1998) : 379-391.

(19) Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. Cell 113 (May 2003) : 643-655.

(20) Avilion, A.A., Nicolis, S.K., Pevny, L.H., Perez, L., Vivian, N.,and Lovell-Badge, R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. Genes Dev 17 (January 2003) : 126-140.

(21) Whalen, W.J., Ganfield, R.,and Nair, P. Effects of breathing O_2 or O_2 +CO_2 and of the injection of neurohumors on the pO_2 of cat cerebral cortex. Stroke 1 (May-June 1970) :194-200.

(22) Chow, D.C., Wenning, L.A., Miller, W.M.,and Papoutsakis, E.T. Modeling pO_2 distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. II. Modified Kroghian models. Biophys J 81 (August 2001) : 685-696.

(23) Yu, C.Y., Boyd, N.M., Cringle, S.J., Alder, V.A.,and Yu, D.Y. Oxygen distribution and consumption in rat lower incisor pulp. Arch Oral Biol 47 (July 2002) : 529-536.

(24) Kozam, G. Oxygen tension of rabbit incisor pulp. J Dent Res 46 (March-April 1967) : 352-358.

(25) Guzy, R.D.,and Schumacker, P.T. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. Exp Physiol 91 (September 2006) : 807-819.

(26) Wang, G., Hazra, T.K., Mitra, S., Lee, H.M.,and Englander, E.W. Mitochondrial DNA damage and a hypoxic response are induced by $CoCl_2$ in rat neuronal PC12 cells. Nucleic Acids Res 28 (May 2000) : 2135-2140.

(27) Mohyeldin, A., Garzon-Muvdi, T.,and Quinones-Hinojosa, A. Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. Cell Stem Cell 7 (August 2010) : 150-161.

(28) Iida, K., Takeda-Kawaguchi, T., Tezuka, Y., Kunisada, T., Shibata, T.,and Tezuka, K. Hypoxia enhances colony formation and proliferation but inhibits differentiation of human dental pulp cells. Arch Oral Biol 55 (September 2010) : 648-654.

(29) Sakdee, J.B., White, R.R., Pagonis, T.C.,and Hauschka, P.V. Hypoxia-amplified proliferation of human dental pulp cells. J Endod 35 (June 2009) : 818-823.

(30) Szablowska-Gadomska, I., Zayat, V.,and Buzanska, L. Influence of low oxygen tensions on expression of pluripotency genes in stem cells. Acta Neurobiol Exp (Wars) 71 (2011) : 86-93.

(31) Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 282 (November 1998) : 1145-1147.

(32) Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 284 (April 1999) : 143-147.

(33) Grinnell, K.L., Yang, B., Eckert, R.L.,and Bickenbach, J.R. De-differentiation of mouse interfollicular keratinocytes by the embryonic transcription factor Oct-4. J Invest Dermatol 127 (February 2007) : 372-380.

(34) Shi, W., Wang, H., Pan, G., Geng, Y., Guo, Y.,and Pei, D. Regulation of the pluripotency marker Rex-1 by Nanog and Sox2. J Biol Chem 281 (August 2006) : 23319-23325.

(35) Hargreaves, K. M., and Goodis, H. E., editors. Seltzer and Bender's Dental pulp. Chicago: Quintessence Publishing Co, Inc, 2002.

(36) Shi, S., Bartold, P.M., Miura, M., Seo, B.M., Robey, P.G.,and Gronthos, S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. Orthod Craniofac Res 8 (August 2005) : 191-199.

(37) Kerkis, I., Kerkis, A., Dozortsev, D., Stukart-Parsons, G.C., Gomes Massironi, S.M, Pereira, L.V., et al. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. Cells Tissues Organs 184 (2006) : 105-116.

(38) Govindasamy, V., Abdullah, A.N., Ronald, V.S., Musa, S., Ab Aziz, Z.A., Zain, R.B, et al. Inherent differential propensity of dental pulp stem cells derived from human deciduous and permanent teeth. J Endod 36 (September 2010) : 1504-1515.

(39) Brahimi-Horn, M.C.,and Pouyssegur, J. Oxygen, a source of life and stress. FEBS Lett 581 (July 2007) : 3582-3591.

(40) Iyer, N.V., Kotch, L.E., Agani, F., Leung, S.W., Laughner, E., Wenger, R.H., et al. Cellular and developmental control of O_2 homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. Genes Dev 12 (January 1998) : 149-162.

(41) Fischer, B.,and Bavister, B.D. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. J Reprod Fertil 99 (November 1993) : 673-679.

(42) Braun, R.D., Lanzen, J.L., Snyder, S.A,,and Dewhirst, M.W. Comparison of tumor and normal tissue oxygen tension measurements using OxyLite or microelectrodes in rodents. Am J Physiol Heart Circ Physiol 280 (June 2001) : H2533-2544.

(43) Hall, P.A.,and Watt, F.M. Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. Development 106 (August 1989) : 619-633.

(44) D'Ippolito, G., Diabira, S., Howard, G.A., Roos, B.A.,and Schiller, P.C. Low oxygen tension inhibits osteogenic differentiation and enhances stemness of human MIAMI cells. Bone 39 (September 2006) : 513-522.

(45) Fehrer, C., Brunauer, R., Laschober, G., Unterluggauer, H., Reitinger, S., Kloss, F., et al. Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. Aging Cell 6 (December 2007) : 745-757.

(46) Malladi, P., Xu, Y., Chiou, M., Giaccia, A.J.,and Longaker, M.T. Effect of reduced oxygen tension on chondrogenesis and osteogenesis in adipose-derived mesenchymal cells. Am J Physiol Cell Physiol 290 (April 2006) : C1139-1146.

(47) Ke, Q,,and Costa, M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). Mol Pharmacol 70 (November 2006) : 1469-1480.

(48) Jelkmann, W. Erythropoietin: structure, control of production, and function. Physiol Rev 72 (April 1992) : 449-489.

(49) Goldberg, M.A.,and Schneider, T.J. Similarities between the oxygen-sensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin. J Biol Chem 269 (February 1994) : 4355-4359.

(50) Yuan, H.T., Yang, S.P.,and Woolf, A.S. Hypoxia up-regulates angiopoietin-2, a Tie-2 ligand, in mouse mesangial cells. Kidney Int 58 (Novenber 2000) : 1912-1919.

(51) Kim, S., Edwall, L., Trowbridge, H.,and Chien, S. Effects of local anesthetics on pulpal blood flow in dogs. J Dent Res 63 (May 1984) : 650-652.

(52) Vanderkooi, J.M., Erecinska, M.,and Silver, I.A. Oxygen in mammalian tissue: methods of measurement and affinities of various reactions. Am J Physiol 260 (June 1991) : C1131-1150.

(53) Gong, Q.M., Quan, J.J., Jiang, H.W.,and Ling, J.Q. Regulation of the stromal cell-derived factor-1alpha-CXCR4 axis in human dental pulp cells. J Endod 36 (September 2010) : 1499-1503.

(54) Abudara, V., Jiang, R.G.,and Eyzaguirre, C. Behavior of junction channels between rat glomus cells during normoxia and hypoxia. J Neurophysiol 88 (August 2002) : 639-649.

(55) Baek, J.H., Reiter, C.E., Manalo, D.J., Buehler, P.W., Hider, R.C.,and Alayash, A.I. Induction of hypoxia inducible factor (HIF-1alpha) in rat kidneys by iron chelation with the hydroxypyridinone, CP94. Biochim Biophys Acta 1809 (April-June 2011) : 262-268.

(56) Brusevold, I.J., Husvik, C., Schreurs, O., Schenck, K., Bryne, M.,and Soland, T.M. Induction of invasion in an organotypic oral cancer model by $CoCl_2$, a hypoxia mimetic. Eur J Oral Sci 118 (April 2010) : 168-176.

(57) Yuan, Y., Hilliard, G., Ferguson, T.,and Millhorn, D.E. Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor-alpha and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor-alpha. J Biol Chem 278 (May 2003) : 15911-15916.

(58) Epstein, A.C., Gleadle, J.M., McNeill, L.A., Hewitson, K.S., O'Rourke, J., Mole, D.R., et al. C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. Cell 107 (October 2001) : 43-54.

(59) Hung, S.P., Ho, J.H., Shih, Y.R., Lo, T.,and Lee, O.K. Hypoxia promotes proliferation and osteogenic differentiation potentials of human mesenchymal stem cells. J Orthop Res 30 (February 2012) : 260-266.

(60) Ranera, B., Remacha, A.R., Alvarez-Arguedas, S., Romero, A., Vazquez, F.J., Zaragoza, P., et al. Effect of hypoxia on equine mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. BMC Vet Res 8 (2012) : 142.

(61) Zeng, H.L., Zhong, Q., Qin, Y.L., Bu, Q.Q., Han, X.A., Jia, H.T., et al. Hypoxia-mimetic agents inhibit proliferation and alter the morphology of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. BMC Cell Biol 12 (2011) : 32.

(62) Pacary, E., Tixier, E., Coulet, F., Roussel, S., Petit, E.,and Bernaudin, M. Crosstalk between HIF-1 and ROCK pathways in neuronal differentiation of mesenchymal stem cells, neurospheres and in PC12 neurite outgrowth. Mol Cell Neurosci 35 (July 2007) : 409-423.

(63) Sloan, A.J.,and Waddington, R.J. Dental pulp stem cells: what, where, how? Int J Paediatr Dent 19 (January 2009) : 61-70.

(64) Holzwarth, C., Vaegler, M., Gieseke, F., Pfister, S.M., Handgretinger, R., Kerst, G, et al. Low physiologic oxygen tensions reduce proliferation and differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells. BMC Cell Biol 11 (2010) : 11.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
เอกสารพิจารณาจริยธรรม คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

No. 014/2012

Study Protocol and Consent Form Approval

The Human Research Ethics Committee of the Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand has approved the following study to be carried out according to the protocol and patient/participant information sheet dated and/or amended as follows in compliance with the **ICH/GCP.**

Study Title	: Effect of cobalt chloride on stemness in human dental pulp cells
Study Code	: HREC-DCU **2012-008**
Study Center	: Chulalongkorn University
Principle Investigator	: Miss Kantaporn Laksana
Protocol Date	: March 21, 2012
Date of Approval	: March 30, 2012
Date of Expiration	: March 29, 2014

S. Amatyakul.

(Associate Professor Dr. Supathra Amatyakul)
Chairman of Ethics Committee

(Assistant Professor Dr. Suchit Poolthong)
Associate Dean for Research and International Affairs

*A list of the Ethics Committee members (names and positions) present at the Ethics Committee meeting on the date of approval of this study has been attached (upon requested). This Study Protocol Approval Form will be forwarded to the Principal Investigator.

Approval is granted subject to the following conditions: (see back of the approval)

ภาคผนวก ข

เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับอาสาสมัครที่เข้าร่วมในการวิจัย

(Patient/Participant Information Sheet)"

1. โครงการเรื่อง ผลของโคบอลต์คลอไรด์ต่อความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันแท้ของมนุษย์

2. ชื่อผู้วิจัยหลัก ทันตแพทย์หญิงกัณฒพร ลักษณา
   สถาบันที่สังกัด ภาควิชาทันตกรรมสำหรับเด็ก คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
   แหล่งทุนวิจัย ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจาก "ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย" กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช (THE 90th ANNIVERSARY OF CHULALONGKORN UNIVERSITY FUND)

3. วัตถุประสงค์ของโครงการ เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของโคบอลต์คลอไรด์ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ การส่งเสริมความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด และการยับยั้งการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งของเซลล์จากเนื้อเยื่อในฟันแท้ของมนุษย์

4. สถานที่ดำเนินการวิจัย หน่วยปฏิบัติการวิจัยเนื้อเยื่ออนินทรีย์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. วิธีการที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย

   การวิจัยครั้งนี้เป็นการทำการทดลองในห้องปฏิบัติการ โดยใช้เซลล์เนื้อเยื่อในฟันที่ได้จากฟันแท้ที่ไม่มีรอยผุและรอยโรคที่ปลายรากฟันของของผู้ที่มีสุขภาพแข็งแรง ไม่มีโรคประจำตัว ที่มารับการถอนฟันแท้ตามแผนการรักษาทางทันตกรรมที่ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อย่างน้อย 3 ซี่ จากตัวอย่างที่ไม่ใช่บุคคลเดียวกัน โดยกระบวนการต่างๆที่ใช้ในการทดลองไม่ก่อให้เกิดอันตรายใดๆทั้งสิ้นต่ออาสาสมัคร

6. เหตุผลที่เชิญเข้าร่วมเป็นอาสาสมัครในโครงการ

   เนื่องจากการศึกษานี้จะใช้ฟันแท้ที่ไม่มีรอยผุและไม่มีรอยโรคที่ปลายรากฟัน ซึ่งจำเป็นต้องถอนด้วยเหตุผลทางการรักษามาทำการทดลอง โดยฟันที่ได้ต้องมาจากอาสาสมัครที่มีสุขภาพแข็งแรง ไม่มีโรคประจำตัว

7. ความรับผิดชอบของอาสาสมัคร และ ระยะเวลาที่อาสาสมัครจะอยู่ในโครงการ

อาสาสมัครจะได้รับการถอนฟันตามแผนการรักษาปกติ หลังจากถอนฟันแล้ว อาสาสมัครจะได้รับทราบข้อมูลของงานวิจัยเพื่อตัดสินใจว่าจะบริจาคฟันซี่ที่ถอนไปนั้นเพื่อนำไปใช้ในงานวิจัยหรือไม่ ดังนั้นอาสาสมั ครจึงไม่ต้องมีความรับผิดชอบใดๆ และไม่มีระยะเวลาที่อาสาสมัครเข้าร่วมในโครงการ เนื่องจากอาสาสมัครจะต้องได้รับการถอนฟันตามแผนการรักษาตามปกติอยู่แล้ว

8. ประโยชน์ของการวิจัยที่อาสาสมัครและ/หรือผู้อื่นที่อาจได้รับ

ท่านจะไม่ได้รับประโยชน์ใด ๆ ในการร่วมการวิจัย ครั้งนี้ แต่ผลการวิจัยที่ได้จะแสดงให้เห็นถึงผลของโคบอลต์คลอไรด์ต่อความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์จากเนื้อเยื่อในฟันแท้ของมนุษย์จึงเป็นการค้นหาสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์ ซึ่งอาจนำไปสู่การพัฒนาอาหารเลี้ยงเซลล์ นอกจากนี้ยังเป็นการสร้างองค์ความ รู้ใหม่ในทางทันตกรรมที่เป็นประโยชน์สำหรับการพัฒนางานวิจัยในอนาคต โดยองค์ความรู้ที่ได้จะเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการออกแบบการศึกษาวิจัยในขั้นต่อไป รวมทั้งจะเป็นข้อมูลสำหรับการวางแผนการวิจัยทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อในอนาคต

9. ความเสี่ยงหรือความไม่สะดวกที่อาจจะเกิดขึ้นแก่อาสาสมัคร และในบางกรณีแก่ทารกในครรภ์หรือทารกที่ดื่มนมมารดา

การทำวิจัยนี้ไม่ก่อให้เกิดความเสี่ยงใดๆ

10. ค่าใช้จ่ายที่อาสาสมัครจะต้องจ่าย หรืออาจจะต้องจ่าย

การเข้าร่วมในการวิจัยครั้งนี้ไม่มีค่าใช้จ่ายใดๆทั้งสิ้น

11. การชดเชยใดๆ และการรักษาที่ จะจัดให้แก่อาสาสมัครในกรณีที่ได้รับอันตรายซึ่งเกี่ยวข้องกับการวิจัย

การวิจัยนี้ใช้เนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงจากฟันของอาสาสมัครที่ถอนตามแผนการรักษา โดยที่อาสาสมัครจะไม่ได้รับอันตรายใดๆ ที่เกี่ยวข้องกับการวิจัยนี้เลย

12. การจ่ายค่าเดินทาง ค่าเสียเวลา (ถ้ามี) ซึ่งต้องกำหนดไว้เป็นรายครั้ง แก่อาสาสมัครที่เข้าร่วมในการวิจัย (ทั้งนี้ต้องไม่มีข้อแม้หรือเงื่อนไขใดๆ ทั้งสิ้นในการจ่ายเงิน)

ไม่มีการจ่ายค่าเดินทาง หรือค่าเสียเวลา เนื่องจากเป็นการรักษาตามแผนการรักษาของอาสาสมัครเอง

13. เหตุการณ์ที่อาจจะเกิดขึ้น หรือเหตุผลซึ่งผู้วิจัยจะต้องยกเลิกการเข้าร่วมในโครงการวิจัยของอาสาสมัคร

ไม่มีเหตุการณ์ใดที่จะเกิดขึ้นกับอาสาสมัครเลย ยกเว้นการได้รับการรักษาตามแผนการรักษาของอาสาสมัครเอง

14. การกำกับดูแลและควบคุมการดำเนินโครงการ

ผู้กำกับดูแลการวิจัย ผู้ตรวจสอบ คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรม และคณะกรรมการที่เกี่ยวข้อง สามารถเข้าไปตรวจสอบการดำเนินโครงการ รวมทั้ง ตรวจสอบบันทึกข้อมูลของอาสาสมัคร เพื่อเป็นการยืนยันถึงขั้นตอนในการวิจัยทางคลินิกและข้อมูลอื่นๆ โดยไม่ล่วงละเมิดเอกสิทธิ์ในการปิดบังข้อมูลของอาสาสมัครตามกรอบที่กฎหมายและก ฎระเบียบได้อนุญาตไว้ นอกจากนี้ โดยการลงนามให้ความยินยอมอาสาสมัครหรือ ผู้แทนตามกฎหมายจะมีสิทธิตรวจสอบและมีสิทธิที่จะได้รับข้อมูลด้วยเช่นกัน

15. จริยธรรมการวิจัย

การดำเนินการโครงการวิจัยนี้ ผู้วิจัยคำนึงถึงหลักจริยธรรมการวิจัย ดังนี้

1. หลักความเคารพในบุคคล (Respect for person) โดยการให้ข้อมูลจนอาสาสมัครเข้าใจเป็นอย่างดีและตัดสินใจอย่างอิสระในการให้ความยินยอมเข้าร่วมในการวิจัย รวมทั้งการเก็บรักษาความลับของอาสาสมัคร

2. หลักการให้ประโยชน์ไม่ก่อให้เกิดอันตราย (Beneficence/Non-Maleficence) โดยระบุในข้อ 8 และ 9 ว่าจะมีประโยชน์หรือความเสี่ยงกับอาสาสมัครหรือไม่

3. หลักความยุติธรรม (Justice) คือมีเกณฑ์คัดเข้าและคัดออกชัดเจน มีการกระจายความเสี่ยงและผลประโยชน์อย่างเท่าเทียมกัน โดยวิธีสุ่มเข้ากลุ่มศึกษา

16. ข้อมูลที่อาจนำไปสู่การเปิดเผยตัวของอาสา สมัครจะได้รับการปกปิด ยกเว้นว่าได้รับคำยินยอมไว้โดยกฎระเบียบและกฎหมายที่เกี่ยวข้องเท่านั้น จึงจะเปิดเผยข้อมูลแก่สาธารณชนได้ ในกรณีที่ผลการวิจัยได้รับการตีพิมพ์ ชื่อและที่อยู่ของอาสาสมัครจะต้องได้รับการปกปิดอยู่เสมอ และอาสาสมัครหรือผู้แทนตามกฎหมายจะได้รับแจ้งโดยทันท่วงที ในกรณีที่มีข้อมูลใหม่ซึ่งอาจใช้ประกอบการตัดสินใจของอาสาสมัครว่าจะยังคงเข้าร่วมในโครงการวิจัยต่อไปได้หรือไม่

17. หากท่านมีข้อสงสัยต้องการสอบถามเกี่ยวกับสิทธิของท่านหรือผู้วิจัยไม่ปฏิบัติตามที่เขียนไว้ในเอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในก ารวิจัย ท่านสามารถติดต่อหรือร้องเรียนได้ที่ ฝ่ายวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตึกสมเด็จย่า 93 ชั้น 10 หรือที่หมายเลขโทรศัพท์ 0-2218-8816 ในเวลาราชการ

18. หากท่านต้องการยกเลิกการเข้าร่วมเป็นอาสาสมัครในโครงการนี้ ให้ท่านกรอกและส่งเอกสารขอยกเลิกมาที่

ผู้วิจัยหลัก ทันตแพทย์หญิงกัณฒพร ลักษณา

ที่อยู่ บ้านเลขที่ 169 ลาดพร้าว 94 วังทองหลาง กรุงเทพฯ 10310

19. อาสาสมัครสามารถติดต่อผู้วิจัยได้ตลอด 24 ชั่วโมง ที่:

ผู้วิจัยหลัก ทันตแพทย์หญิงกัณฒพร ลักษณา เบอร์โทรศัพท์ 081-710-9166

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร. วรรณธิดา ศรีอาจ

เบอร์โทรศัพท์ 02-218-8906

ที่ทำงาน ภาควิชาทันตกรรมสำหรับเด็ก คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

.....

(ทันตแพทย์หญิงกัณฒพร ลักษณา)

ผู้วิจัยหลัก

วันที่...../...../.....

ภาคผนวก ค
เอกสารยินยอมเข้าร่วมการวิจัย (Consent Form)

การวิจัยเรื่อง ผลของโคบอลต์คลอไรด์ต่อความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันแท้ของมนุษย์

“ข้าพเจ้า (นาย, นาง, นางสาว, เด็กชาย, เด็กหญิง)..... .....
บ้านเลขที่.....ถนน.....ตำบล/แขวง.....
อำเภอ/เขต..... จังหวัด ....
รหัสไปรษณีย์.....

ก่อนที่จะลงนามในใบยินยอมให้ทำการวิจัยนี้ ข้าพเจ้าได้รับเอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับอาสาสมัครที่เข้าร่วมในการวิจัยแล้ว 1 ฉบับ รวมทั้งได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการทำวิจัย อั นตรายหรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการทำวิจัยหรือจากยาที่ใช้ รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด และมีความเข้าใจดีแล้ว

ผู้วิจัยรับรองว่าจะตอบคำถามต่างๆ ที่ข้าพเจ้าสงสัยด้วยความเต็มใจไม่ปิดบังซ่อนเร้นจนข้าพเจ้าพอใจ

ข้าพเจ้าเข้าร่วมโครงการวิ จัยนี้โดยสมัครใจ ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะบอกเลิกการเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้เมื่อใดก็ได้และการบอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัยนี้จะไม่มีผลต่อการรักษาโรคที่ข้าพเจ้าจะพึงได้รับต่อไป

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลเฉพาะเกี่ยวกับตัวข้าพเจ้าเป็นความลับ และจะเปิดเผยได้เฉพาะในรูปที่เป็นสรุปผลการวิจัย การเปิดเผยข้อมูลเกี่ยวกับตัวข้าพเจ้าต่อหน่วยงานต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกระทำได้เฉพาะกรณีจำเป็น ด้วยเหตุผลทางวิชาการเท่านั้น และผู้วิจัยรับรองว่าหากเกิดอันตรายใดๆ จากการวิจัยดังกล่าว ข้าพเจ้าจะได้รับการรักษาพยาบาลโดยไม่คิดมูลค่า

ข้าพเจ้าได้อ่านเอกสารและข้อความข้างต้นแล้ว มีความเข้าใจดีทุกประการ และได้ลงนามในใบยินยอมนี้ด้วยความเต็มใจ

ข้าพเจ้าได้รับสำเนาเอกสารใบยินยอมที่ข้าพเจ้าลงนามและลงวันที่ และเอกสารยกเลิกการเข้าร่วมวิจัย อย่างละ 1 ฉบับ เป็นที่เรียบร้อยแล้ว

ลงนาม..... ผู้ยินยอม

(.....)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ลงนาม..... พยาน

(.....)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ลงนาม..... ผู้วิจัยหลัก

(.....ทันตแพทย์หญิง...กัณฒพร...ลักษณา.....)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้าไม่สามารถอ่านหนังสือได้ แต่ผู้วิจัยได้อ่านข้อความในใบยินยอมนี้ให้แก่ข้าพเจ้า ฟังจนเข้าใจดีแล้ว ข้าพเจ้าจึงลงนาม หรือประทับลายนิ้วหัวแม่มือขวาของข้าพเจ้าในใบยินยอมนี้ด้วยความเต็มใจ

ลงนาม..... ผู้ยินยอม

(.....)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ลงนาม..... . พยาน

(.....)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ลงนาม..... ผู้วิจัยหลัก

(.....ทันตแพทย์หญิง...กัณฒพร...ลักษณา.....)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ภาคผนวก ง

เอกสารยกเลิกการเข้าร่วมวิจัย (Withdrawal Form)

การวิจัยเรื่อง ผลของโคบอลต์คลอไรด์ต่อความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันแท้ของมนุษย์

"ข้าพเจ้า (นาย, นาง, นางสาว, เด็กชาย, เด็กหญิง).....
อยู่บ้านเลขที่.....ถนน.....ตำบล/แขวง.....
อำเภอ/เขต.....จังหวัด.....
รหัสไปรษณีย์.....

ขอยกเลิกการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ โดยมีเหตุผลในการยกเลิกการเข้าร่วมวิจัยคือ

- ❑ ย้ายภูมิลำเนา
- ❑ ไม่สะดวกในการเดินทาง
- ❑ เหตุผลอื่น.....

ลงนาม.....ผู้ยกเลิก
(.....)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

ลงนาม..... พยาน
(.....)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

ลงนาม..... ผู้วิจัยหลัก
(.....ทันตแพทย์หญิง...กัณฒพร...ลักษณา.....)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

ที่อยู่สำหรับส่งเอกสาร ชื่อ..ทันตแพทย์หญิงกัณฒพร...ลักษณา บ้านเลขที่...169... ถนน...ลาดพร้าว 94... ตำบล/แขวง...พลับพลา....อำเภอ/เขต...วังทองหลาง.....จังหวัด.... กรุงเทพมหานคร.....รหัสไปรษณีย์.....10310.....

หมายเหตุ- สำเนาเอกสารยกเลิกการเข้าร่วมวิจัย 1 ชุด แล้วมอบให้อาสาสมัครแต่ละคน

ภาคผนวก จ
รายละเอียดการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

1. การศึกษาอัตราการแบ่งตัวของเซลล์

a. แสดงข้อมูลสถิติเชิงพรรณนาโดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 1 วัน 3 วัน และ 6 วัน ซึ่งกำหนดให้ค่าเฉลี่ยปริมาณเซลล์เนื้อเยื่อในฟันแท้ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์อย่างเดียวที่ระยะเวลา 1 วัน มีค่าเป็น 100

Group	N	Mean	Std. Deviation
0 μM day 1	3	1	0
25 μM day 1	3	0.766	0.050534
50 μM day 1	3	0.839	0.120516
0 μM day 3	3	2.582	0.120516
25 μM day 3	3	2.269	0.065646
50 μM day 3	3	2.298	0.126335
0 μM day 6	3	5.617	0.227403
25 μM day 6	3	4.216	0.19449
50 μM day 3	3	4.501	0.115788

b. แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 1 วัน 3 วัน และ 6 วัน ด้วยวิธีทดสอบการแปรปรวนทางเดียว

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
MTT1d	Between Groups	856.847	2	428.423	7.551	.023
	Within Groups	340.433	6	56.739		
	Total	1197.280	8			
MTT3d	Between Groups	1795.796	2	897.898	7.765	.022
	Within Groups	693.807	6	115.634		
	Total	2489.602	8			
MTT6d	Between Groups	32900.362	2	16450.181	47.971	.000
	Within Groups	2057.513	6	342.919		
	Total	34957.876	8			

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) groupMTT	(J) groupMTT	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
MTT1d	0uM	25uM	23.366667*	6.150279	.009	8.31748	38.41586
		50uM	16.033333*	6.150279	.040	.98414	31.08252
	25uM	0uM	-23.366667*	6.150279	.009	-38.41586	-8.31748
		50uM	-7.333333	6.150279	.278	-22.38252	7.71586
	50uM	0uM	-16.033333*	6.150279	.040	-31.08252	-.98414
		25uM	7.333333	6.150279	.278	-7.71586	22.38252
MTT3d	0uM	25uM	31.266667*	8.780070	.012	9.78261	52.75072
		50uM	28.466667*	8.780070	.018	6.98261	49.95072
	25uM	0uM	-31.266667*	8.780070	.012	-52.75072	-9.78261
		50uM	-2.800000	8.780070	.761	-24.28406	18.68406
	50uM	0uM	-28.466667*	8.780070	.018	-49.95072	-6.98261
		25uM	2.800000	8.780070	.761	-18.68406	24.28406
MTT6d	0uM	25uM	140.100000*	1.5119E1	.000	103.10284	177.09716
		50uM	111.633333*	1.5119E1	.000	74.63617	148.63049
	25uM	0uM	-140.100000*	1.5119E1	.000	-177.09716	-103.10284
		50uM	-28.466667	1.5119E1	.109	-65.46383	8.53049
	50uM	0uM	-111.633333*	1.5119E1	.000	-148.63049	-74.63617
		25uM	28.466667	1.5119E1	.109	-8.53049	65.46383

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

2. การศึกษาปริมาณโปรตีนสโตร-1

a. แสดงข้อมูลสถิติเชิงพรรณนา โดยเปรียบเทียบ ค่าเฉลี่ยการแสดง ออกของโปรตีนสโตร -1 ที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 วัน ซึ่งกำหนดให้ค่าเฉลี่ยการแสดงออกของโปรตีนสโตร- 1 ในเซลล์เนื้อเยื่อในฟันแท้ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์อย่างเดียวที่ระยะเวลา 1 วัน มีค่าเป็น 1

Group	N	Mean	Std. Deviation
0 µM	3	1	0
50 µM	3	3.234693	0.178027

b. แสดงการวิเคราะห์ข้อมูล เปรียบเทียบ การแสดงออกของโปรตีนสโตร -1 ของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 วัน ด้วยวิธีทดสอบทีชนิดตัวอย่างอิสระ

T-Test

Group Statistics

	grou pst...	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
STRO1	1	3	1.00000	.000000	.000000
	2	3	5.20433	3.413312	1.970676

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	T	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
STRO1	Equal variances assumed	2.046E16	.000	-17.738	2	.003	-2.235000	.126000	-2.777134	-1.692866
	Equal variances not assumed			-17.738	1.000	.036	-2.235000	.126000	-3.835982	-.634018

3. **การศึกษาค่าการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส**

a. แสดงข้อมูลสถิติเชิงพรรณนา โดยเปรียบเทียบ ค่าเฉลี่ยการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 7 วัน ซึ่งกำหนดให้ค่าเฉลี่ยการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของเนื้อเยื่อในฟันแท้ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่ระยะเวลา 7 วัน มีค่าเป็น 1

Group	N	Mean	Std. Deviation
DMEM	3	1.000	0
OM	3	2.058	0.063210
OM+CoCl2 25 μM	3	1.412	0.119921
OM+CoCl2 50 μM	3	1.013	0.057591

b. แสดงการวิเคราะห์ข้อมูล เปรียบเทียบ การทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 7 วัน ด้วยวิธีทดสอบการแปรปรวนทางเดียว

ANOVA

ALP7d

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.167	3	.722	133.670	.000
Within Groups	.043	8	.005		
Total	2.210	11			

Post Hoc

Multiple Comparisons

ALP7d
LSD

(I) group ALP7d	(J) group ALP7d	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
DMEM7d	OM7d	-1.037667*	.060017	.000	-1.17607	-.89927
	OM25uM7d	-.391000*	.060017	.000	-.52940	-.25260
	OM50uM7d	.004000	.060017	.948	-.13440	.14240
OM7d	DMEM7d	1.037667*	.060017	.000	.89927	1.17607
	OM25uM7d	.646667*	.060017	.000	.50827	.78507
	OM50uM7d	1.041667*	.060017	.000	.90327	1.18007
OM25uM7d	DMEM7d	.391000*	.060017	.000	.25260	.52940
	OM7d	-.646667*	.060017	.000	-.78507	-.50827
	OM50uM7d	.395000*	.060017	.000	.25660	.53340
OM50uM7d	DMEM7d	-.004000	.060017	.948	-.14240	.13440
	OM7d	-1.041667*	.060017	.000	-1.18007	-.90327
	OM25uM7d	-.395000*	.060017	.000	-.53340	-.25660

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

c. แสดงข้อมูลสถิติเชิงพรรณนา โดยเปรียบเทียบ ค่าเฉลี่ยการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 14 วัน ซึ่งกำหนดให้ค่าเฉลี่ยการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของเนื้อเยื่อในฟันแท้ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่ระยะเวลา 14 วัน มีค่าเป็น 1

Group	N	Mean	Std. Deviation
DMEM	3	1	0
OM	3	2.135	0.179878
OM+CoCl2 25 μM	3	1.653	0.130257
OM+CoCl2 50 μM	3	0.991	0.074432

d. แสดงการวิเคราะห์ข้อมูล เปรียบเทียบ การทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 14 วัน ด้วยวิธีทดสอบการแปรปรวนทางเดียว

ANOVA

ALP14d

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.849	3	.616	44.927	.002
Within Groups	.055	4	.014		
Total	1.904	7			

Post Hoc

Multiple Comparisons

ALP14d
LSD

(I) group ALP14d	(J) group ALP14d	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
DMEM14d	OM14d	-1.136000*	.117136	.001	-1.46122	-.81078
	OM25uM14d	-.653500*	.117136	.005	-.97872	-.32828
	OM50uM14d	.008500	.117136	.946	-.31672	.33372
OM14d	DMEM14d	1.136000*	.117136	.001	.81078	1.46122
	OM25uM14d	.482500*	.117136	.015	.15728	.80772
	OM50uM14d	1.144500*	.117136	.001	.81928	1.46972
OM25uM14d	DMEM14d	.653500*	.117136	.005	.32828	.97872
	OM14d	-.482500*	.117136	.015	-.80772	-.15728
	OM50uM14d	.662000*	.117136	.005	.33678	.98722
OM50uM14d	DMEM14d	-.008500	.117136	.946	-.33372	.31672
	OM14d	-1.144500*	.117136	.001	-1.46972	-.81928
	OM25uM14d	-.662000*	.117136	.005	-.98722	-.33678

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

4. **การศึกษาปริมาณตะกอนแคลเซียมที่ย้อมด้วยสีอลิซารินเรด เอส**

a. แสดง ข้อมูลสถิติเชิงพรรณนา โดย เปรียบเทียบ ค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนแสงของปริมาณตะกอนแคลเซียมที่ย้อมด้วยสี อลิซารินเรด เอสที่ระยะเวลา 28 วัน ซึ่งกำหนดให้ค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนแสงของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันแท้ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ระยะเวลา 28 วัน มีค่าเป็น 1

Group	N	Mean	Std. Deviation
DMEM	3	1	0
OM	3	1.536	0.021266
OM+CoCl2 25 μM	3	1.292	0.052616
OM+CoCl2 50 μM	3	1.281	0.014577

b. แสดงการวิเคราะห์ข้อมูล เปรียบเทียบ ค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนแสงของปริมาณตะกอนแคลเซียมที่ย้อมด้วยสี อลิซารินเรด เอสที่ระยะเวลา 28 วัน ด้วยวิธีทดสอบการแปรปรวนทางเดียว

ANOVA

Ali28d

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.288	3	.096	110.953	.000
Within Groups	.003	4	.001		
Total	.292	7			

Post Hoc

Multiple Comparisons

Ali28d
LSD

(I) groupAli	(J) groupAli	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
DMEM28d	OM28d	-.536000*	.029422	.000	-.61769	-.45431
	OM25uM28d	-.292500*	.029422	.001	-.37419	-.21081
	OM50uM28d	-.281000*	.029422	.001	-.36269	-.19931
OM28d	DMEM28d	.536000*	.029422	.000	.45431	.61769
	OM25uM28d	.243500*	.029422	.001	.16181	.32519
	OM50uM28d	.255000*	.029422	.001	.17331	.33669
OM25uM28d	DMEM28d	.292500*	.029422	.001	.21081	.37419
	OM28d	-.243500*	.029422	.001	-.32519	-.16181
	OM50uM28d	.011500	.029422	.716	-.07019	.09319
OM50uM28d	DMEM28d	.281000*	.029422	.001	.19931	.36269
	OM28d	-.255000*	.029422	.001	-.33669	-.17331
	OM25uM28d	-.011500	.029422	.716	-.09319	.07019

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ทันตแพทย์หญิงกัณฒพร ลักษณา เกิด วันที่ 18 กันยายน พ .ศ.2524 ที่จังหวัดนครศรีธรรมราช สำเร็จการศึกษาระดับประถมศึกษาที่โรงเรียนอุดมศึกษาลาดพร้าว และระดับมัธยมศึกษาที่โรงเรียนบดินทรเดชา (สิงห์ สิงหเสนี) ในปี พ.ศ.2543 เข้าศึกษาต่อในคณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬ าลงกรณ์มหาวิทยาลัย และสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาทันตแพทยศาสตรบัณฑิตในปี พ.ศ. 2549

หลังจบการศึกษาเป็นทันตแพทย์ ได้เข้ารับราชการเป็นทันตแพทย์ระดับ 4 ที่โรงพยาบาลสระโบสถ์ จังหวัดลพบุรี ในปี พ .ศ.2549 ถึง 2552 จากนั้นย้ายมารับราชการต่อที่โรงพยาบาลลาดหลุมแก้ว จังหวัดปทุมธานี ตั้งแต่ปี 2552 จนถึงปัจจุบัน

ปัจจุบันลาศึกษาต่อในหลักสู ตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตและการฝึกอบรมทันตแพทย์ประจำบ้าน สาขาทันตกรรมสำหรับเด็ก ภาควิชาทันตกรรมสำหรับเด็ก คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย