ผลของเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ต่อคุณสมบัติการเพิ่มจำนวนและการแสดงออกของยีนเร็กซ์-1 ของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันน้ำนมของมนุษย์ที่เพาะเลี้ยงระยะยาว

นางสาวปิยะรัตน์ เกิดผล

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 BASIC FIBROBLAST GROWTH FACTOR ON SELF-RENEWAL PROPERTIES AND REX-1 EXPRESSION OF HUMAN DECIDUOUS PULP CELLS IN LONG TERM CULTURE

Miss Piyarat Kerdpon

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	ผลของเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ต่อคุณสมบัติการเพิ่มจำนวนและการแสดงออกของยีนเร็กซ์ -1 ของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันน้ำนมของมนุษย์ที่เพาะเลี้ยงระยะยาว
โดย	นางสาวปิยะรัตน์ เกิดผล
สาขาวิชา	ทันตกรรมสำหรับเด็ก
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.วลีรัตน์ ศุกรวรรณ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร.ธนภูมิ โอสถานนท์

คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

……..……ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ สมหมาย ชอบอิสระ)

……..อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.วลีรัตน์ ศุกรวรรณ)

……..อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร.ธนภูมิ โอสถานนท์)

……กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.บุษยรัตน์ สันติวงศ์)

……..…..กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.อรุณวรรณ หล่ำอุบล)

ปิยะรัตน์ เกิดผล : ผลของเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ต่อคุณสมบัติการเพิ่มจำนวนและการแสดงออกของยีนเร็กซ์ -1ของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันน้ำนมของมนุษย์ที่เพาะเลี้ยงระยะยาว. (EFFECT OF BASIC FIBROBLAST GROWTH FACTOR ON SELF-RENEWAL PROPERTIES AND REX-1 EXPRESSION OF HUMAN DECIDUOUS PULP CELLS IN LONG TERM CULTURE) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : อ.ทญ.ดร.วลีรัตน์ ศุกรวรรณ , อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ผศ.ทพ.ดร.ธนภูมิ โอสถานนท์, 63 หน้า.

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาบทบาทของเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ต่อเซลล์เนื้อเยื่อในฟันน้ำนม ในแง่ของการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและการแสดงออกของ อาร์เอ็นเอนำรหัสของตัวบ่งชี้พลูริโพเทน (เร็กซ์-1) เมื่อเพาะเลี้ยงในระยะยาว **วัสดุและวิธีการ** ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อในฟันน้ำนมมนุษย์ และปลูกถ่ายลงในจานเลี้ยงใหม่เป็นรุ่นต่อไปเมื่อถึงความหนาแน่นที่ต้องการ เซลล์ในกลุ่มศึกษาจะถูกเติมเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ เซลล์ในรุ่นที่ 5 และ 10 จะถูกวิเคราะห์การแบ่งตัวของเซลล์ การสร้างหน่วยโคโลนี และการแสดงออกของอาร์เอ็นเอนำรหัสของยีนเร็กซ์-1 วิเคราะห์ข้อมูลด้วยสถิติทดสอบทีชนิดตัวอย่างอิสระ ($p<0.05$) **ผลการศึกษา** ผลการทดลองพบว่าเซลล์กลุ่มที่เติมเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ สามารถสร้างหน่วยโคโลนีได้มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ทั้งในรุ่นที่ 5 และรุ่นที่ 10 การแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและการแสดงออกของระดับของอาร์เอ็นเอนำรหัสของยีนเร็กซ์-1 ในเซลล์กลุ่มที่เติมเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ มีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่มควบคุม ทั้งในรุ่นที่ 5 และรุ่นที่ 10 อย่างไรก็ตามพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) **สรุป** เซลล์เนื้อเยื่อในฟันน้ำนมมีแนวโน้มของการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน การสร้างหน่วยโคโลนี และการแสดงออกของอาร์เอ็นเอนำรหัสของยีนเร็กซ์-1ลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลานานขึ้น อย่างไรก็ดีการ เติมเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ สามารถช่วยเพิ่มการแบ่งตัวของเซลล์และการแสดงออกของอาร์เอ็นเอนำรหัสของยีนเร็กซ์-1ได้ในรุ่นของการเพาะเลี้ยงที่มากขึ้น ดังนั้นเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์จึงอาจสามารถช่วยคงคุณสมบัติความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันน้ำนมในระยะยาวได้

ภาควิชา ทันตกรรมสำหรับเด็ก ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา ทันตกรรมสำหรับเด็ก ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ปีการศึกษา 2555 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5376121532 : MAJOR PEDIATRIC DENTISTRY
KEYWORDS : DECIDUOUS DENTAL PULP CELLS / STEM CELL / BASIC FIBROBLAST GROWTH FACTOR / LONG TERM CULTURE / STEMNESS

PIYARAT KERDPON : EFFECT OF BASIC FIBROBLAST GROWTH FACTOR ON SELF-RENEWAL PROPERTIES AND REX-1 EXPRESSION OF HUMAN DECIDUOUS PULP CELLS IN LONG TERM CULTURE. ADVISOR : WALEERAT SUKARAWAN, Ph.D., CO-ADVISOR : ASSOC.PROF. THANAPHUM OSATHANON, Ph.D., 63 pp.

Objective The main purpose of this study was to evaluate the effect of basic fibroblast growth factor (bFGF) on cell proliferation and Rex-1 expression of human deciduous pulp cells in long term culture. **Materials and methods** Human deciduous pulp cells were cultured and continued passage upon confluence. The study group was added bFGF in culture medium. At passage (P) 5 and 10, cell proliferation, colony forming unit efficacy and the mRNA expression of pluripotent marker (Rex-1) were determined. The data were analyzed by Student *t*-test for two-group comparison. ($p<0.05$). **Results** The results showed that colony forming unit was statistically higher in bFGF treated group compared to control in both cells from passage 5 and 10 ($P<0.05$). Cell proliferation and Rex-1 mRNA levels were also increased in bFGF treated group compared to control in cells from passage 5 and 10. However, statistical difference was not observed ($P>0.05$). **Conclusion** Cell proliferation, colony forming unit capacity, and Rex-1 mRNA expression were decreased in prolong deciduous pulp cells culture. However, bFGF supplementation can enhance both cell proliferation and Rex-1 mRNA expression in older passage. Therefore, bFGF supplementation might be useful in maintaining stemness properties of deciduous pulp cells in long term culture.

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

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณสถาบันและผู้มีส่วนร่วมให้วิทยานิพนธ์นี้เสร็จสมบูรณ์ดังรายนามต่อไปนี้

อ.ทพญ.ดร.วลีรัตน์ ศุกรวรรณ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และ ผศ.ทพ.ดร. ธนภูมิ โอสถานนท์ อ าจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะในการทำวิทยานิพนธ์

ศ.ทพ.ดร.ประสิทธิ์ ภวสันต์ ที่ช่วยกรุณาแนะนำและให้คำปรึกษาที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย

คณะกรรมการสอบโครงร่างวิทยานิพนธ์ และสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ทุกท่านที่ให้คำแนะนำ ชี้แนะข้อบกพร่องและแนวทางปรับปรุงแก้ไขวิทยาพนธ์

อาจารย์สาขาวิชาทันตกรรมสำหรับเด็ก ภาควิชาทันตกรรมสำหรับเด็ก จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ได้ถ่ายทอดความรู้ ความใฝ่รู้ ตลอดจนจริยธรรมให้แก่ข้าพเจ้า

เจ้าหน้าที่หน่วยปฏิบัติการวิจัยเนื้อเยื่ออนินทรีย์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่ให้คำแนะนำในการใช้เครื่องมือวิจัยในครั้งนี้เป็นอย่างดี

คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เป็นสถานที่ให้ความรู้ อบรมจริยธรรม และปลูกจิตสำนึกที่ดีแก่ข้าพเจ้า

เพื่อน พี่ น้อง ทันตแพทย์ที่ทำงาน และที่คณะทันตแพทยศาสตร์ ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจมาโดยตลอด

อาสาสมัครทุกท่านที่ยินยอมบริจาคฟันน้ำนมที่ถอนออกมาร่วมการวิจัยครั้งนี้

บิดา มารดา และครอบครัว ตลอดจนผู้มีพระคุณทุกท่านที่ไม่ได้กล่าวถึง ประโยชน์ใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้ทำวิทยานิพนธ์ขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน ซึ่งมีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์สำเร็จลงด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฌ

สารบัญภาพ..... ฎ

บทที่ 1 บทนำ..... 1

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย..... 1

คำถามการวิจัย..... 3

วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 4

สมมติฐานการวิจัย..... 4

คำจำกัดความในการวิจัยและข้อตกลงเบื้องต้น..... 4

คำสำคัญ..... 7

รูปแบบการวิจัย..... 7

ข้อจำกัดของการวิจัย..... 7

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 7

ข้อพิจารณาด้านจริยธรรม..... 8

บทที่ 2 เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 9

เซลล์ต้นกำเนิด..... 9

เซลล์ต้นกำเนิดจากฟัน..... 11

เนื้อเยื่อในฟัน..... 12

เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในฟันน้ำนม..... 13

เร็กซ์-1..... 13

การเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิด..... 14

เบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์..... 14

หน้า

บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย..... 16
ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง..... 16
เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย..... 17
ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย..... 19
การวิเคราะห์ข้อมูล..... 22
งบประมาณ..... 24
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล..... 26
การศึกษาอัตราการแบ่งตัวของเซลล์โดยการวัดหน่วยการสร้างโคโลนี..... 26
การศึกษาอัตราการแบ่งตัวของเซลล์โดยการวัดปริมาณเซลล์ด้วยเทคนิคเอ็มทีที.. 28
การศึกษาปริมาณอาร์เอ็นเอนำรหัสของยีนเร็กซ์-1..... 29
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ..... 32
อภิปรายผลการวิจัย..... 32
สรุปผลการวิจัย..... 35
ข้อเสนอแนะ..... 35
รายการอ้างอิง..... 36
ภาคผนวก..... 45
ภาคผนวก ก เอกสารพิจารณาจริยธรรม คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย..... 46
ภาคผนวก ข เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้ปกครองของอาสาสมัครเด็ก..... 47
ภาคผนวก ค เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับอาสาสมัครเด็กอายุ 7-12 ปี..... 51
ภาคผนวก ง เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมการวิจัยสำหรับผู้ปกครองของ อาสาสมัครเด็ก..... 53
ภาคผนวก จ เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมการวิจัยสำหรับอาสาสมัครเด็ก อายุ 7-12 ปี..... 55
ภาคผนวก ฉ เอกสารยกเลิกการยินยอมเข้าร่วมวิจัย..... 57
ภาคผนวก ช รายละเอียดการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ..... 58
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 63

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ลำดับเบสของไพร์มเมอร์ที่จำเพาะต่ออาร์เอ็นเอนำรหัสของยีนเร็กซ์-1และยีนกลีเซอราดีไฮด์-3-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส.....	22
ตารางที่ 2	การบริหารงานวิจัย.....	23
ตารางที่ 3	ค่าเฉลี่ยปริมาณหน่วยการสร้างโคโลนีในกลุ่มควบคุมเปรียบเทียบกับกลุ่มที่เติมเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ ในการเพาะเลี้ยงเซลล์รุ่นที่ 5 และรุ่นที่ 10…….	26
ตารางที่ 4	ปริมาณเซลล์ที่วัดด้วยเทคนิคเอ็มทีทีของเซลล์ในกลุ่มควบคุมเปรียบเทียบกับกลุ่มที่เติมเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ ในการเพาะเลี้ยงเซลล์รุ่นที่ 5 และรุ่นที่ 10……..	28
ตารางที่ 5	ค่าเฉลี่ยการแสดงออกของยีนเร็กซ์-1 โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธีอาร์ที-พีซีอาร์..	30
ตารางที่ 6	การวิเคราะห์เปรียบเทียบการสร้างโคโลนีระหว่างรุ่นที่ 5 และรุ่นที่ 10 ของกลุ่มเซลล์ที่เติมเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ และกลุ่มควบคุมด้วยสถิติ Independence sample t-test…….	58
ตารางที่ 7	การวิเคราะห์เปรียบเทียบการสร้างโคโลนี ระหว่างกลุ่มเซลล์ที่เติมเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์และกลุ่มควบคุมในรุ่นที่ 5 และรุ่นที่ 10 ด้วยสถิติ Independence sample t-test ……....	59
ตารางที่ 8	การวิเคราะห์เปรียบเทียบการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ระหว่างรุ่นที่ 5 และรุ่นที่ 10 ของกลุ่มเซลล์ที่เติมเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์และกลุ่มควบคุม ด้วยสถิติ Independence sample t-test…….	60

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 9 การวิเคราะห์เปรียบเทียบ การแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ ระหว่างกลุ่มเซลล์ที่เติมเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ และกลุ่มควบคุม ในรุ่นที่ 5 และรุ่นที่ 10 ด้วยสถิติ Independence sample t-test..... 61

ตารางที่ 10 การวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของอาร์เอ็นเอนำรหัส ของยีนเร็กซ์-1 ระหว่างรุ่นที่ 5 และรุ่นที่ 10 ของกลุ่มเซลล์ที่เติมเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์และกลุ่มควบคุมด้วยสถิติ Independence sample t-test... 62

ตารางที่ 11 การวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของอาร์เอ็นเอนำรหัส ของยีนเร็กซ์-1 ระหว่างกลุ่มเซลล์ที่เติมเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ และกลุ่มควบคุมในรุ่นที่ 5 และรุ่นที่ 10 ด้วยสถิติ Independence sample t-test..... 62

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 การแสดงออกของตัวรับของเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ บนผิวเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในฟันน้ำนม..... 3

ภาพที่ 2 กรอบแนวคิดการวิจัย..... 6

ภาพที่ 3 แผนภูมิแสดงปริมาณหน่วยการสร้างโคโลนีของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันน้ำนมกลุ่มควบคุมเปรียบเทียบกับกลุ่มที่เติมเบสิกไฟโบรบลาสโกรทแฟกเตอร์..... 27

ภาพที่ 4 ภาพแสดงปริมาณโคโลนีของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันน้ำนมในการเพาะเลี้ยงเซลล์รุ่นที่ 5 และรุ่นที่10 เมื่อย้อมด้วยเมทธิลีนบลู …….…….. 27

ภาพที่ 5 แผนภูมิแสดงปริมาณเซลล์ที่วัดด้วยเทคนิคเอ็มทีทีของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันน้ำนมกลุ่มควบคุมเปรียบเทียบกับกลุ่มที่เติมเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์……. 29

ภาพที่ 6 ภาพการแสดงออกของยีนเร็กซ์-1 โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธีอาร์ที-พีซีอาร์……..... 30

ภาพที่ 7 แผนภูมิแสดงระดับการแสดงออกของยีนเร็กซ์-1 โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธีอาร์ทีพีซีอาร์..... 31

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

เซลล์ต้นกำเนิด (stem cell) เป็นเซลล์ที่มีความสามารถในการแบ่งตัวและสร้างตัวเองขึ้นมาใหม่ (self-renewal) ได้อย่างไม่มีขีดจำกัด และเซลล์เหล่านี้สามารถถูกเหนี่ยวนำให้แปรสภาพ (differentiation) ไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่เฉพาะได้หลายชนิด เมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม เซลล์ต้นกำเนิดมีบทบาทสำคัญในการเพิ่มจำนวนและพัฒนาไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ต่างๆ เพื่อรักษาการทำงานของอวัยวะในร่างกายให้เป็นปกติ จึงมีการศึกษาและพัฒนาเซลล์ต้นกำเนิดเพื่อนำไปใช้ในการรักษาโรคและซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่มีความผิดปกติต่างๆ ตลอดจนการสร้างอวัยวะทดแทนขึ้นมาใหม่ เช่น โรคมะเร็งเม็ดเลือด โรคพาร์คินสัน (Parkinson's disease) โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) โรคเบาหวาน และโรคที่เกี่ยวข้องกับกระดูกและฟัน เป็นต้น (1)

เซลล์ต้นกำเนิดสามารถแบ่งออกได้เป็นสองชนิดใหญ่ๆ ได้แก่ เซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อน (embryonic stem cell) และ เซลล์ต้นกำเนิดในผู้ใหญ่ (adult stem cell) เซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อนเป็นเซลล์ที่มีศักยภาพสูงกว่าเซลล์ต้นกำเนิดในผู้ใหญ่ คือมีความสามารถในการแบ่งตัวและแปรสภาพไปเป็นเซลล์ได้ทุกชนิดของร่างกาย อย่างไรก็ดี การศึกษาและเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อน ยังมีปัญหาทางด้านจริยธรรม เนื่องจากเซลล์เหล่านี้ต้องเก็บจากตัวอ่อน ในระยะบลาสโตซิสต์ (blastocyst) ดังนั้นการศึกษาวิจัยในปัจจุบัน จึงมุ่งเน้นที่เซลล์ต้นกำเนิดในผู้ใหญ่ซึ่งแม้จะมีความสามารถในการแปรสภาพได้น้อยกว่า แต่พบปัญหาทางจริยธรรมน้อยกว่าเช่นกัน โดยเซลล์ต้นกำเนิดที่พบได้ในผู้ใหญ่ สามารถเก็บได้จากเนื้อเยื่อหลายชนิด ได้แก่ ไขกระดูก เนื้อเยื่อไขมัน ผิวหนัง กล้ามเนื้อ สมอง สายสะดือ รวมทั้งเนื้อเยื่อในฟัน (dental pulp) และเนื้อเยื่อเอ็นยึดปริทันต์ (periodontal ligament tissue) ทั้งจาก ฟันแท้ ฟันน้ำนม ฟันเกิน (supernumerary teeth) และฟันงอกก่อนเกิด (natal teeth) เป็นต้น (2-9)

เซลล์เนื้อเยื่อในฟันมีหน้าที่รักษาสมดุลและซ่อมแซมเนื้อฟัน เมื่อฟันได้รับภยันตรายทำให้เซลล์สร้างเนื้อฟันเดิมที่มีอยู่ถูกทำลายไป จากสาเหตุต่างๆ ได้แก่ การผุของฟัน การบาดเจ็บ ตลอดจนกระบวนการบูรณะฟัน จะกระตุ้นให้เซลล์ในเนื้อเยื่อในฟันที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่ใดๆ ที่อยู่ในฟันแปรสภาพไปเป็นเซลล์คล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟัน (odontoblast-like cells) และสร้างเนื้อเยื่อแข็งที่คล้ายเนื้อฟันมาซ่อมแซมบริเวณรอยต่อระหว่างเนื้อเยื่อในฟันและเนื้อฟันได้ ซึ่งความสามารถในการแปรสภาพนี้ทำให้เป็นที่ยอมรับกันว่าเซลล์เนื้อเยื่อในฟันมีคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดหรือโปรเจนนิเตอร์เซลล์ (progenitor cells) (10-11)

เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในฟันแท้ (dental pulp stem cells: DPSCs) และเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในฟันน้ำนม (stem cell from human exfoliated tooth: SHED) จัดเป็นเซลล์ต้นกำเนิดในกลุ่มเซลล์ต้นกำเนิดเมเซนไคม์ (mesenchymal stem cell) เซลล์ในกลุ่มนี้ มีการแสดงออกของโมเลกุลผิวเซลล์ที่เป็นลักษณะเฉพาะ เช่น ซีดี 105 (CD105) ซีดี73 (CD73) ซีดี90 (CD90) ซีดี44 (CD44) ซีดี146 (CD146) และ สโตร -1 (STRO-1) เป็นต้น (12-15) นอกจากนี้ เมื่อถูกเหนี่ยวนำในสภาวะที่เหมาะสม เซลล์กลุ่มนี้ สามารถแปรสภาพไปเป็นเซลล์ต่างๆ ได้หลายชนิด ได้แก่ เซลล์สร้างกระดูก (osteoblast) เซลล์ไขมัน (adipocyte) เซลล์กระดูกอ่อน (chondrocyte) เซลล์ประสาท (neuron) เซลล์กล้ามเนื้อเรียบ (myocyte) และเซลล์คล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟัน (5,16-20) เป็นต้น

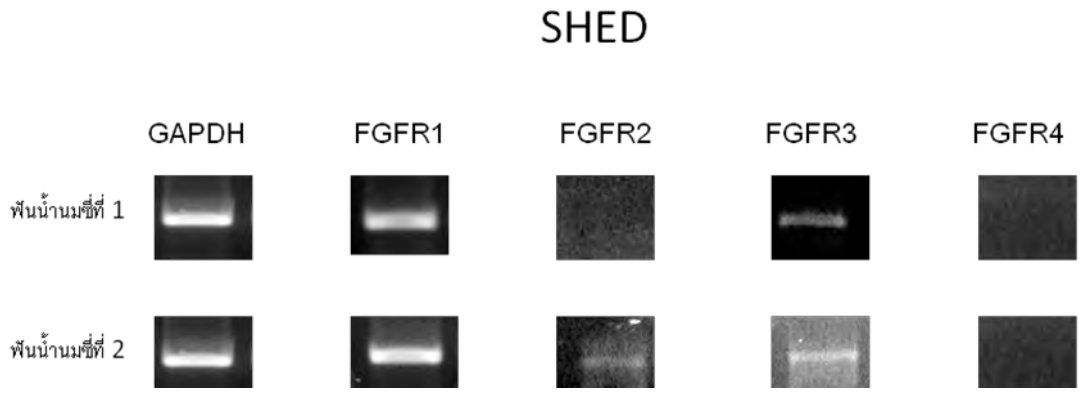
แม้ว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในฟันแท้ และจากเนื้อเยื่อในฟันน้ำนมมีคุณสมบัติที่แสดงถึงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดเมเซนไคม์เช่นเดียวกัน แต่ผลการศึกษาบ่งชี้ว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในฟันน้ำนม มีคุณลักษณะใกล้เคียงกับเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทน (pluripotent stem cell) มากกว่า กล่าวคือ มีระดับของการแปรสภาพใกล้เคียงกับเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อนมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในฟันแท้ เช่น มีรูปร่างลักษณะกลมมนกว่า (14) มีอัตราการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน (proliferation) สูงกว่า (15) ตลอดจนมีระดับการแสดงออกของโปรตีนที่พบในเซลล์ต้นกำเนิดของตัวอ่อน เช่น ออกเทเมอร์ -4 (POU transcription factor Octamer-4: Oct-4) ซ็อค-2 (SOX-2) นานอก (Nanog) และ เร็กซ์ -1 (reduced expression protein-1:REX-1) มากกว่า (13)

ถึงแม้ว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในฟันน้ำนมจะถูกนำมาเพาะเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายเพื่อใช้ในการศึกษาคุณสมบัติการเป็นเซลล์ต้นกำเนิด ผลการตอบสนองของเนื้อเยื่อในฟันต่อสิ่งกระตุ้น รวมถึงงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (21) แต่ปัญหาประการหนึ่งของความพยายามในการนำเซลล์ต้นกำเนิดมาใช้งานคือ การเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ ในการศึกษาวิจัยส่วนใหญ่ใช้เซลล์รุ่นแรกๆ (early passage) เพื่อคงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดไว้ให้มากที่สุด (22) อย่างไรก็ดี ยังไม่มีความชัดเจนว่า เซลล์ต้นกำเนิดสามารถเพาะเลี้ยงได้กี่รุ่น โดยที่คุณสมบัติความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดไม่มีการเปลี่ยนแปลง

เบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ (basic fibroblast growth factor, bFGF) หรือไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์-2 (fibroblast growth factor – 2) เป็นโกรทแฟกเตอร์ชนิดหนึ่งที่มีบทบาทในกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) (23) นิยมนำมาใช้เป็นส่วนประกอบเสริมใน

อาหารเลี้ยงเซลล์ เพื่อช่วยดำรงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดและกระตุ้นการแปรสภาพของเซลล์ได้ (24-28)

ผลการศึกษาเบื้องต้น พบว่า เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในฟันน้ำนม มีการแสดงออกของตัวรับของไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์บนผิวเซลล์ (fibroblast growth factor receptor/FGFR) ชนิดที่ 1-3 (รูปที่ 1) (29) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ที่เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในฟันน้ำนมอาจตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ แต่ยังไม่มีการศึกษาที่แน่ชัดเกี่ยวกับบทบาทของเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ ต่อเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในฟันน้ำนม



ภาพที่ 1 การแสดงออกของตัวรับของเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์บนผิวเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในฟันน้ำนม

วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้ คือศึกษาบทบาทของเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ ที่มีต่อเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในฟันน้ำนม ในแง่ของการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน และการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอนำรหัส (mRNA) ของโมเลกุลที่พบในเซลล์ต้นกำเนิดของตัวอ่อน โดยเฉพาะโปรตีนเร็กซ์-1 โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบผลทั้งระยะสั้นและระยะยาว

คำถามการวิจัย

เบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ มีผลต่ออัตราการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและการแสดงออกของยีนเร็กซ์-1ของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันน้ำนมที่เพาะเลี้ยงในระยะยาวหรือไม่

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบอัตราการแบ่งตัวของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันน้ำนม เมื่อเพาะเลี้ยงระยะยาว ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ และไม่มีเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์
2. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบสัดส่วนการแสดงออกของยีนเร็กซ์-1ของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันน้ำนม เมื่อเพาะเลี้ยงระยะยาว ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีเบสิกไฟโบรบลาสต์โก รทแฟกเตอร์และไม่มีเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์

สมมติฐานการวิจัย

1. การเติมเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ สามารถรักษาอัตราการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันน้ำนม เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์จนถึงรุ่นที่ 10 เมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ได้เติมเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์
2. การเติมเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ สามารถรักษาสัดส่วนการแสดงออกของยีนเร็กซ์-1ในเซลล์เนื้อเยื่อในฟันน้ำนม เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์จนถึงรุ่นที่ 10 เมื่อเปรียบเทียบกับ การเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ได้เติมเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์

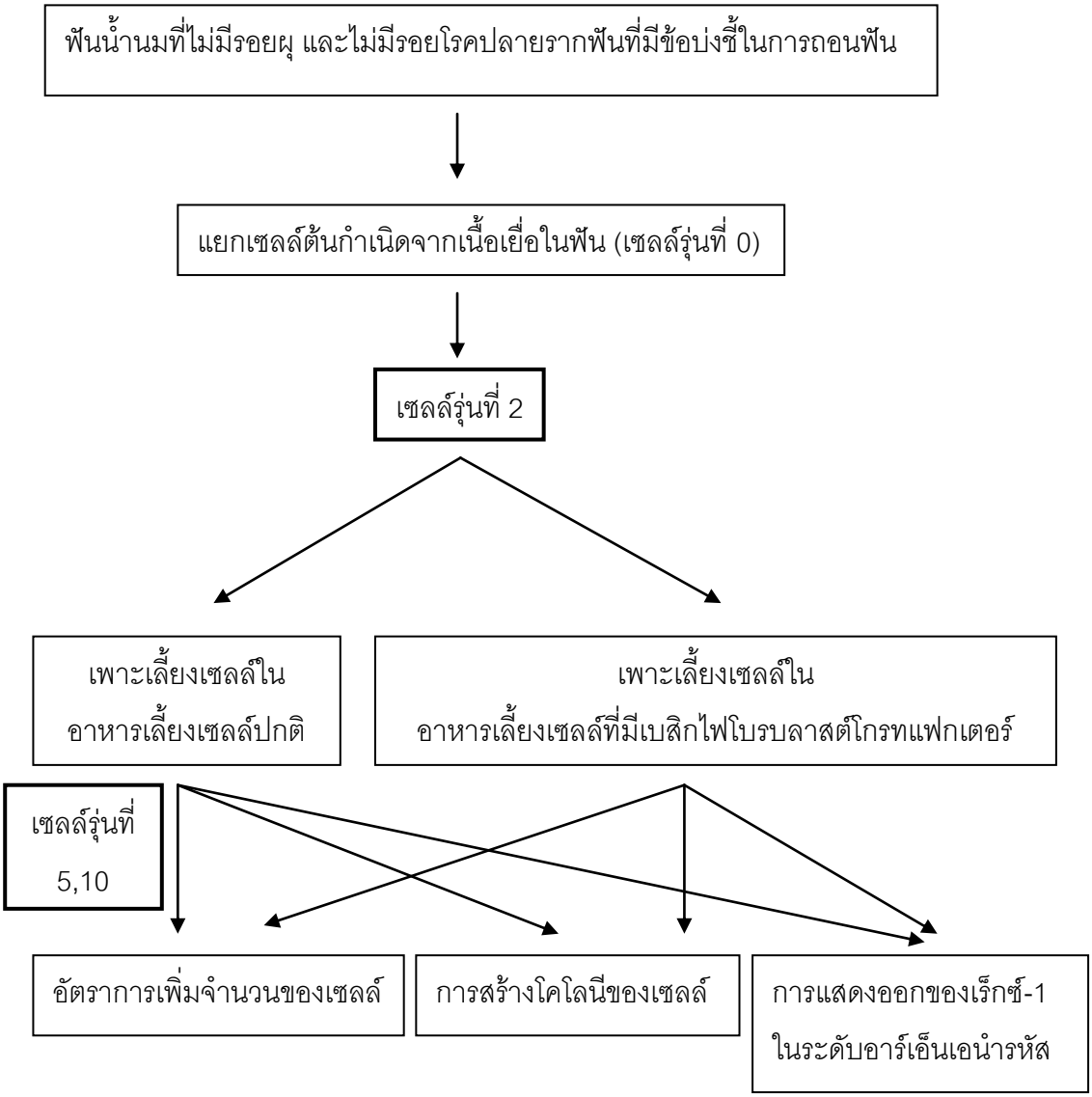
คำจำกัดความในการวิจัยและข้อตกลงเบื้องต้น

1. เซลล์เนื้อเยื่อในฟันน้ำนม หมายถึง เซลล์ที่เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อในฟันน้ำนมที่ไม่มีรอยผุและไม่มีรอยโรคที่ปลายรากฟัน
2. คุณสมบัติการเป็นเซลล์ต้นกำเนิด หมายถึงเซลล์ที่มีความสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้อย่างต่อเนื่องไม่จำกัดและมีการแสดงออกของอาร์เอ็นเอนำรหัสที่กำหนดการสร้างโปรตีนเร็กซ์-1 ซึ่งวัดด้วยวิธีการต่อไปนี้
    2.1 อัตราการแบ่งตัวของเซลล์ หมายถึง ปริมาณเซลล์เนื้อเยื่อในฟันน้ำนมที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟีนอลเรด ในช่วงเวลา 1 3 และ 7 วัน โดยวัดปริมาณเซลล์ด้วยเทคนิคเอ็มทีที (MTT assay)
    2.2 หน่วยการสร้างโคโลนี (colony forming unit/ CFU) เป็นหน่วยที่ได้จาก วิธีตรวจนับปริมาณเซลล์ ซึ่งเจริญและแบ่งตัวจนเป็นกลุ่ม โดยแต่ละโคโลนีได้มาจากการเจริญและการแบ่งตัวของเซลล์หนึ่งเซลล์ โดย 1 โคโลนีจะประกอบด้วยเซลล์อย่างน้อย 50 เซลล์ ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 14 วัน

2.3 การหาระดับการแสดงออกของยีนเร็กซ์-1 ด้วยเทคนิคอาร์ที -พีซีอาร์ (reverse transcriptase polymerase chain reaction: RT-PCR)

3. รุ่นของการเพาะเลี้ยง (passage) หมายถึงจำนวนครั้งที่เซลล์ผ่านการเพาะเลี้ยงบนจานเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 60 มิลลิเมตร และถูกเก็บที่ความหนาแน่นที่ร้อยละ 90 ก่อนนำมาทำการทดลองในแต่ละครั้งของการเลี้ยง
4. การเพาะเลี้ยงในระยะยาว (long term culture) หมายถึง การเพาะเลี้ยงเซลล์บนจานเลี้ยงเซลล์ตั้งแต่รุ่นที่ 1-10 โดยทำการเปลี่ยนถ่ายเซลล์ในแต่ละรุ่น เมื่อเซลล์มีความหนาแน่นที่ร้อยละ 90 ของจานเพาะเลี้ยง

กรอบแนวคิดการวิจัย



ภาพที่ 2 กรอบแนวคิดการวิจัย

คำสำคัญ

1. เซลล์เนื้อเยื่อในฟันน้ำนม (deciduous dental pulp cells)
2. เซลล์ต้นกำเนิด (stem cell)
3. เบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ (basic fibroblast growth factor)
4. การเพาะเลี้ยงในระยะยาว (long-term culture)
5. ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด (stemness)

รูปแบบการวิจัย

การวิจัยเชิงทดลองในห้องปฏิบัติการ (Laboratory experimental research)

ข้อจำกัดของการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาในห้องปฏิบัติการ โดยกำหนดให้เลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟีนอลเรดที่ผสมซีรัมจากฟีตัสวัวร้อยละ 10 (Fetal bovine serum; FBS, Gibco, USA) แอลกลูตามีนร้อยละ 1 (L-glutamine, Invitrogen, USA) และยาปฏิชีวนะร้อยละ 1 ประกอบด้วย เพนนิซิลินจีโซเดียม (Penicillin G sodium, Invitrogen, USA) สเตรปโตมัยซินซัลเฟต (Streptomycin sulfate, Invitrogen, USA) และ แอมโฟเทอริซินบี (Amphotericin B, Invitrogen, USA) เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเซลล์ข้างต้น เพิ่มด้วยเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ ผลการศึกษานี้ อาจไม่สามารถนำไปสรุปใช้กับเซลล์เนื้อเยื่อในฟันน้ำนมที่เลี้ยงในสภาวะอื่นๆ ซึ่งอาจมีกลไกการทำงานและการเจริญเติบโตของเซลล์ที่แตกต่างกันออกไป

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เข้าใจบทบาทของ เบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ ในการคงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันน้ำนม เมื่อเพาะเลี้ยงในระยะยาว ซึ่งเป็นพื้นฐานสำหรับการพัฒนาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิด ที่สามารถคงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดไว้ให้ได้นานที่สุด

ข้อพิจารณาด้านจริยธรรม

1. รายละเอียดข้อมูลโครงการวิจัย ต้องผ่านการพิจารณาและได้รับคำรับรองด้านจริยธรรมของโครงการวิจัยจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย ของคณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. ผู้ปกครองและอาสาสมัครเด็กต้องได้รับการอธิบายและตอบข้อซักถามถึงรายละเอียดของวิธีการวิจัยโดยไม่ปิดบังซ่อนเร้น และยินยอมลงนามในเอกสารใบยินยอมด้วยความเต็มใจโดยมีสำเนาใบยินยอมเก็บไว้เป็นหลักฐาน

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เซลล์ต้นกำเนิด

เซลล์ต้นกำเนิดเป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติเฉพาะที่แตกต่างจากเซลล์อื่นในร่างกาย กล่าวคือ สามารถแบ่งตัวและสร้างตัวเองขึ้นมาใหม่ ได้อย่างไม่มีขีดจำกัด เซลล์ต้นกำเนิดจะอยู่ในสภาพที่ไม่เฉพาะเจาะจง (unspecialized) และสามารถถูกเปลี่ยนไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่เฉพาะ เมื่ออยู่ในสภาวะเหมาะสม (30-31) การแบ่งตัวของเซลล์ต้นกำเนิด จะได้เซลล์ลูกที่มีลักษณะต่างกัน คือ เซลล์ที่มีคุณลักษณะของเซลล์ต้นกำเนิดหนึ่งเซลล์ และเซลล์อีกหนึ่งเซลล์ที่ไม่มีคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิด ซึ่งถูกกำหนดให้พัฒนาไปเป็นเซลล์อื่นๆที่ทำหน้าที่เฉพาะ (32)

เซลล์ต้นกำเนิดมีบทบาทสำคัญในการเพิ่มจำนวนและพัฒนาไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ต่างๆ ในร่างกาย ได้แก่ เซลล์เม็ดเลือด เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ เซลล์ผิวหนัง เซลล์สมอง เป็นต้น แต่เนื่องจากเซลล์ที่พัฒนาไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่เฉพาะแล้ว จะไม่สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้อีก หากเซลล์เหล่านั้นถูกทำลาย จากการบาดเจ็บ หรือโรคต่างๆ จะทำให้เกิดการสูญเสียการทำหน้าที่ของอวัยวะนั้น หรือเกิดความผิดปกติขึ้นภายในร่างกาย ดังนั้น ภายในเนื้อเยื่อต่างๆ จึงยังคงมีเซลล์ต้นกำเนิดอาศัยอยู่ เพื่อช่วยเพิ่มจำนวนเซลล์และซ่อมแซมเนื้อเยื่อ โดยเซลล์ต้นกำเนิดเหล่านี้จะอาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสม ในการรักษาสภาวะของความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด (stem cell niche) (33)

การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับเซลล์ต้นกำเนิด เป็นศาสตร์ที่อยู่ในความสนใจทางการแพทย์เป็นอย่างมากในปัจจุบัน ทั้งนี้ โดยมีวัตถุประสงค์ เพื่อจะนำเซลล์ต้นกำเนิดมาพัฒนาไปใช้ในการรักษาโรค ตลอดจนทดแทนเนื้อเยื่อ หรืออวัยวะที่มีความผิดปกติต่างๆ เช่น โรคมะเร็งเม็ดเลือด (hematopoietic cancers) โรคทางเมตาบอลิก (metabolic disorders) โรคพาร์คินสัน (Parkinson's disease) โรคเบาหวาน โรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด และอาการบาดเจ็บของสมองและไขสันหลัง เป็นต้น

การแบ่งประเภทของเซลล์ต้นกำเนิด (30-31)

เซลล์ต้นกำเนิดสามารถแบ่งได้ตามลำดับขั้นของพัฒนาการ (potency) ได้เป็น 3 ชนิด คือ

1. เซลล์ต้นกำเนิดโททิโพเทน (totipotent stem cells) เป็นเซลล์ต้นกำเนิดระยะแรกสุดพบได้ในตัวอ่อนของมนุษย์ระยะไซโกต (zygote) สามารถเปลี่ยนเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่เฉพาะได้ทุกชนิดในร่างกาย

2. เซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทน (pluripotent stem cells) เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่เปลี่ยนมาจากเซลล์ต้นกำเนิดโททิโพเทนพบได้ในตัวอ่อน ทารกในครรภ์ หรือสิ่งมีชีวิตที่กำลังอยู่ในระยะพัฒนาสามารถพัฒนาเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ชนิดต่างๆ ของร่างกายได้ทุกชนิด ยกเว้นเซลล์เนื้อเยื่อของรก

3. เซลล์ต้นกำเนิดมัลติโพเทน (multipotent stem cells) เซลล์ต้นกำเนิดที่อยู่ในเนื้อเยื่อเฉพาะอย่าง อวัยวะใดอวัยวะหนึ่งหรือระบบใดระบบหนึ่ง สามารถเจริญไปเป็นเซลล์ในระยะโตเต็มที่ได้หลายชนิด เช่น เซลล์ต้นกำเนิดของเม็ดเลือด (hematopoietic stem cell) แต่มีข้อจำกัดเมื่อเทียบกับเซลล์ต้นกำเนิดโททิโพเทนและเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทน เนื่องจากไม่สามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์ทุกชนิดของร่างกายได้

โปรเจนนิเตอร์เซลล์เป็นเซลล์ที่พัฒนาต่อจากเซลล์ต้นกำเนิดข้างต้นมีคุณลักษณะอยู่ในระยะกึ่งกลางระหว่างเซลล์ต้นกำเนิดและเซลล์ที่มีการแปรสภาพแล้ว มีความสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ต่างๆ ได้ เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารที่เหมาะสม พบได้ตามอวัยวะต่างๆ ของร่างกาย เมื่อมีบาดแผลหรืออันตรายต่อเนื้อเยื่อโปรเจนนิเตอร์เซลล์จะแปรสภาพไปเป็นเซลล์เฉพาะของเนื้อเยื่อนั้นๆ เพื่อทำการซ่อมแซม โดยมีข้อจำกัดในการแปรสภาพ และไม่สามารถแบ่งตัว เพื่อให้เซลล์ลูกที่มีคุณสมบัติเดิมเหมือนเซลล์แม่ได้ อาจมีบางกรณีที่มีการแบ่งตัวได้เซลล์ลูกที่เหมือนกับเซลล์แม่แต่ความสามารถในการแบ่งตัวแบบนี้จะมีขีดจำกัด (34)

นอกจากนี้เซลล์ต้นกำเนิดยังแบ่งตามแหล่งที่มาได้ 2 ชนิด เป็น

1. เซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อน เป็นเซลล์ซึ่งได้มาจากอินเนอร์เซลล์แมส (inner cell mass) ของ บลาสโตซิสต์ จากตัวอ่อน หรือเนื้อเยื่อของทารกในครรภ์ จัดเป็นเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทน

2. เซลล์ต้นกำเนิดในผู้ใหญ่ เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่พบกระจายอยู่ตามเนื้อเยื่อ และอวัยวะต่างๆ ในสิ่งมีชีวิตที่พัฒนาไปเกินกว่าระยะตัวอ่อนแล้ว แต่ยังคงลักษณะความเป็นเซลล์ที่ไม่พัฒนาไปเป็นเซลล์จำเพาะชนิดใดชนิดหนึ่ง เซลล์เหล่านี้มีศักยภาพในการแบ่งตัวไปได้เรื่อยๆ เป็นเวลานานหรือตลอดชีวิต และพัฒนาไปเป็นเซลล์ที่จำเพาะทดแทนเซลล์ที่ตายและถูกทำลาย ของอวัยวะนั้นๆ ได้

ในปัจจุบันมีการนำเซลล์ต้นกำเนิดในผู้ใหญ่มาใช้ประโยชน์กันอย่างแพร่หลาย ได้แก่ เซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดในไขกระดูก และเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดจากสายสะดือทารก โดยใช้ในการปลูกถ่ายไขกระดูกเพื่อรักษาโรคเลือด เช่น โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว ภาวะซีด โรคที่เกิดจากภูมิคุ้มกันต่อต้านตนเองหรือภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง เป็นต้น (31) นอกจากนี้ยังมีเซลล์อื่นๆ ที่ได้รับความสนใจ ได้แก่ เซลล์ต้นกำเนิดจากฟัน เซลล์ต้นกำเนิดที่ผิวหนัง เซลล์ต้นกำเนิดที่กระจกตา

แต่มีข้อจำกัดหลายประการในการนำเซลล์ต้นกำเนิดมาใช้ในทางคลินิก คือ การเก็บเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อผู้ใหญ่ยังทำได้ยากในทางปฏิบัติ เช่น จำนวนเซลล์ต้นกำเนิดที่จำกัด วิธีการเก็บที่ทำได้ยากอาจเกิดอันตรายต่อมนุษย์ผู้ที่บริจาคหากยังมีชีวิตอยู่ คุณภาพของเซลล์ต้นกำเนิดที่เสื่อมลงตามวัย (3 5) และปัญหาจากปฏิกิริยาภูมิคุ้มกันต่อเซลล์แปลกปลอมของร่างกาย เมื่อจะนำไปปลูกถ่าย

เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในฟันเป็นแหล่งของเซลล์ต้นกำเนิดอีกทางเลือกหนึ่ง ซึ่งได้รับความสนใจในปัจจุบัน โดยเฉพาะเนื้อเยื่อในฟันน้ำนม (1) เนื่องจากสามารถเก็บได้ง่าย สะดวก และก่อให้เกิดการบาดเจ็บได้น้อยกว่าการเก็บเซลล์ต้นกำเนิดจากแหล่งอื่นๆ

เซลล์ต้นกำเนิดจากฟัน (dental stem cell)

มีการศึกษาเซลล์ต้นกำเนิดในผู้ใหญ่หลายชนิดที่แยกได้จากฟัน ได้แก่ เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในฟันแท้ (16) เซลล์ต้นกำเนิดจากเอ็นยึดปริทันต์ (periodontal ligament stem cells) (36) เซลล์ต้นกำเนิดจากปุ่มกำเนิดฟันปลายราก (stem cells from apical papilla) (37) ที่ได้จากบริเวณเนื้อเยื่ออ่อน ที่อยู่บริเวณปลายรากของฟันแท้ที่กำลังมีการเจริญและ เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในฟันน้ำนม (7) ซึ่งเป็นเซลล์ต้นกำเนิดในผู้ใหญ่ชนิดเดียวที่ได้จากฟันน้ำนม

เซลล์ต้นกำเนิดจากฟันทั้ง 4 ชนิด มีคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดมัลติโพเทน เนื่องจากมีการแสดงออกของโปรตีนที่แสดงถึงเซลล์ต้นกำเนิดเมเซนไคม์ ได้แก่ ซีดี 13 (CD13) ซีดี29 (CD29) ซีดี44 ซีดี73 ซีดี90 ซีดี105 และสามารถแปรสภาพไปเป็นเซลล์อื่นๆได้หลายชนิด (38)

เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในฟันแท้สามารถแปรสภาพไป เป็นเซลล์คล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟัน เซลล์สร้างกระดูก เซลล์ไขมัน เซลล์ประสาท เซลล์กล้ามเนื้อ เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ และเซลล์กระดูกอ่อน นอกจากนี้เมื่อทดลองปลูกถ่ายเซลล์เนื้อเยื่อในฟัน ร่วมกับไฮดร็อกซีอะพาไทต์ / ไตรแคลเซียมฟอสเฟต (hydroxyapatite/tricalcium phosphate) ในสัตว์ทดลองสามารถแปรสภาพไปเป็นเนื้อเยื่อที่มีโครงสร้างคล้ายเนื้อฟันและเนื้อเยื่อในฟัน (dentine pulp-like tissue) (16,39) เซลล์ต้นกำเนิดจากเอ็นยึดปริทันต์สามารถแปรสภาพไปเป็นเซลล์สร้างเคลือบรากฟัน (cementoblast) (40) เซลล์สร้างกระดูกเซลล์กระดูกอ่อน เซลล์ไขมัน และเซลล์ประสาทได้ (6,38,41) เซลล์ต้นกำเนิดจากปุ่มกำเนิดฟันปลายรากมีความสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างปลายรากต่อได้ในฟันที่เกิดการติดเชื้อ และปลายรากยังไม่ปิด (38) และสามารถแปรสภาพไปเป็นเซลล์กระดูก เนื้อฟัน เซลล์ไขมัน เซลล์สร้างกระดูกอ่อน และเซลล์ประสาทได้ (42)

เนื้อเยื่อในฟัน

เนื้อเยื่อในฟันมีต้นกำเนิดจากเซลล์นิวรัลเครส (neural crest cell) (43) เป็นเนื้อเยื่อยึดต่ออยู่บริเวณแกนกลาง ล้อมรอบด้วยเนื้อฟัน เคลือบฟันและเคลือบรากฟัน ทำหน้าที่สร้างเนื้อฟัน เป็นแหล่งของสารอาหารให้กับเนื้อฟัน รับส่งสัญญาณความรู้สึก เพื่อป้องกันอันตรายต่อฟัน และสามารถซ่อมแซมเนื้อฟันเดิมที่ถูกทำลายไป ประกอบด้วยส่วนหลัก 2 ส่วน ได้แก่ ส่วนประกอบนอกเซลล์ (extracellular compartment) และเซลล์ต่างๆ

1. ส่วนประกอบนอกเซลล์หรือเมทริกซ์ (matrix) ประกอบด้วยเส้นใยคอลลาเจน (collagen fibers) และสารเนื้อพื้น (ground substance) เส้นใยคอลลาเจนส่วนใหญ่เป็นชนิดที่ 1 และชนิดที่ 3 ในปริมาณร้อยละ 56 และ 41 ตามลำดับ (44) มีความหนาแน่นที่บริเวณปลายราก (apical) มากที่สุด ทำหน้าที่ค้ำจุนเซลล์ เส้นใยคอลลาเจนจะมีปริมาณมากขึ้นตามอายุของฟันที่มากขึ้น สารเนื้อพื้นประกอบด้วย ไกลโคสอะมิโนไกลแคน (glycosaminoglycans) โปรตีโอไกลแคน (proteoglycan) และน้ำ ทำหน้าที่เป็นสื่อกลางในการขนส่งสารต่างๆ ระหว่างหลอดเลือดกับเซลล์

2. ส่วนประกอบที่เป็นเซลล์ต่างๆ ได้แก่ เซลล์สร้างเนื้อฟัน (odontoblast) เซลล์สร้างเส้นใย (fibroblast) เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน (immunocompetent cells) เช่น แมกโครแฟจ (macrophages) ลิมโฟไซต์ (lymphocytes) เซลล์ใยประสาทนำเข้า (dendritic cells) เซลล์ที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่ใดๆ (undifferentiated mesenchymal cells) นอกจากนี้ในเนื้อเยื่อโพรงฟัน ยังประกอบด้วย หลอดเลือด และเส้นประสาท ซึ่งผ่านเข้ามาทางรูเปิดปลายราก (apical foramen)

เซลล์สร้างเส้นใยเป็นเซลล์ที่มีจำนวนมากที่สุดในเนื้อเยื่อในโพรงฟัน พบมากบริเวณส่วนตัวฟัน ทำหน้าที่สร้างและรักษาสมดุลส่วนของนอกเซลล์หรือเมทริกซ์คือ เส้นใยคอลลาเจน และสารเนื้อพื้น

เซลล์ที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่ใดๆ เป็นแหล่งของเซลล์ในการซ่อมแซมเนื้อฟัน โดยเซลล์ที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่ใดๆ ที่อยู่ในโพรงฟันจะสามารถแปรสภาพไปเป็นเซลล์คล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟัน และสร้างเนื้อเยื่อแข็งที่คล้ายเนื้อฟันมาซ่อมแซมบริเวณรอยต่อระหว่างเนื้อเยื่อในโพรงฟันและเนื้อฟัน หรือสามารถแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเส้นใยได้ ขึ้นอยู่กับสิ่งกระตุ้น มักพบบริเวณที่มีเซลล์มาก (cell-rich area) และแกนเนื้อเยื่อใน (pulp core) ซึ่งสัมพันธ์กับบริเวณที่มีหลอดเลือดอยู่ เซลล์ที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่ใดๆ เหล่านี้ จะมีจำนวนลดลง เมื่อฟันมีอายุมากขึ้น ดังนั้นทำให้ความสามารถในการซ่อมแซมหรือสร้างใหม่ของเนื้อเยื่อในฟันลดลงด้วย (45)

เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในฟันน้ำนม

เนื้อเยื่อในฟันของฟันน้ำนมที่กำลังจะหลุดเป็นแหล่งของเซลล์ต้นกำเนิดอีกแหล่งหนึ่งที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในฟันแท้ โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์จากเนื้อเยื่อในฟันน้ำนมแต่ละซี่ให้เซลล์จำนวน 12-20 เซลล์ ที่สามารถสร้างโคโลนี (colony) ได้ (7) มีอัตราการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้อย่างต่อเนื่อง และสามารถถูกเหนี่ยวนำให้แปรสภาพไปเป็นเซลล์ต่างๆได้หลายชนิด เช่น เซลล์สร้างกระดูก เซลล์สร้างเนื้อฟัน เซลล์กระดูกอ่อน เซลล์ไขมัน เซลล์กล้ามเนื้อ เซลล์ประสาท เซลล์เนื้อเยื่อบุหลอดเลือด (vascular endothelial cell) (20) และเซลล์ตับ (46) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการแสดงออกของโปรตีนหลายชนิด เช่น ซีดี 13 ซีดี29 ซีดี44 ซีดี73 ซีดี90 ซีดี105 ซีดี146 และ ซีดี166 (CD-166)

เมื่อปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในฟันน้ำนมในหนู พบว่าสามารถแปรสภาพไปเป็น เซลล์กระดูก และ เซลล์ประสาทได้ โดยเซลล์สามารถมีชีวิตอยู่ในเดนเตทไจรัส (dentate gyrus) ในฮิปโปแคมปัส (hippocampus) ของหนูได้มากกว่า 10 วัน โดยมีการแสดงออกของโปรตีน นิวรัลมาร์กเกอร์ (neural marker) เช่น เอ็นเอฟเอ็ม (NFM) (7)

เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในฟันน้ำนม มีคุณสมบัติการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่มีระดับการแปรสภาพน้อยกว่า (immature) หรือมีความใกล้เคียงกับเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทน (pluripotent stem cell) มากกว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในฟันแท้ เช่น มีรูปร่างลักษณะกลมมนกว่า (14) มีอัตราการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนสูงกว่า (15) ตลอดจนมีการแสดงออกของโปรตีนที่พบในเซลล์ต้นกำเนิดของตัวอ่อนหรือเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทน เช่น ออกเทเมอร์ -4 ซ็อค-2 นาน็อก และ เร็กซ์ -1 มากกว่าเซลล์จากเนื้อเยื่อในฟันแท้ (13)

เร็กซ์-1

เร็กซ์-1หรือ ซิงค์ฟิงเกอร์โปรตีน 42 (ZFP42) เป็นอะซิดิกซิงค์ฟิงเกอร์โปรตีน (acidic zinc finger protein) ทำหน้าที่เป็น ทรานสคริปชันแฟกเตอร์ (transcription factor) หรือโปรตีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนอื่นๆ พบครั้งแรกในสายพันธุ์ของเซลล์เอฟ 9เทราโตคาซิโนมา (F9 teratocarcinoma cell line)

ต่อมาพบการแสดงออกในเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อน ที่อินเนอร์เซลล์แมส หลังจากตัวอ่อนฝังตัวแล้ว การแสดงออกของเร็กซ์-1 จะลดลง หน้าที่ของยีนเร็กซ์ -1ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่สิ่งที่น่าสังเกตคือ การแสดงออกของยีนนี้จะลดลง เมื่อกระตุ้นเซลล์ให้เซลล์แปรสภาพด้วยเรติโนอิกแอซิด (retinoic acid) (47) ดังนั้น ยีนนี้จึงได้ชื่อว่า Rex ซึ่งย่อมาจาก reduced expression

เร็กซ์ -1สามารถพบได้ในเซลล์ผู้ใหญ่ โดยทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุม การแบ่งตัวเพิ่มจำนวน และการแปรสภาพของเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากเลือดของสายสะดือในมนุษย์ (human blood-derived MSCs) หากกดการแสดงออกของเร็กซ์-1 ในเซลล์ จะทำให้อัตราการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนลดลง รวมทั้งลดการเกิดการแปรสภาพไปเป็นเซลล์กระดูก ดังนั้นเร็กซ์ -1จึงมีบทบาทสนับสนุนการเจริญของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดเมเซนไคม์ (48) แม้ว่าการกดการแสดงออกของเร็กซ์-1 มีผลลดความสามารถของเซลล์ในการแปรสภาพ แต่ผลการทดลองในหนูที่ไม่มีการแสดงออกของเร็กซ์-1พบว่า ทั้งเพศผู้และเพศเมีย มีพัฒนาการและสามารถสืบพันธุ์ได้ตามปกติ ดังนั้นอาจมียีนอื่นที่ทำหน้าที่ทดแทนเร็กซ์-1ได้ (49)

นอกจากนี้เร็กซ์ -1 ถูกใช้เป็นมาร์กเกอร์ชนิดหนึ่ง ที่บ่งชี้คุณลักษณะของความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทน แสดงออกในเซลล์ต้นกำเนิดที่ยังไม่มีการแปรสภาพ พบได้ในเซลล์ตัวอ่อน เซลล์สืบพันธุ์ (germ cell) (50) เนื้องอกของเซลล์สืบพันธุ์ (germ cell neoplasms) (51) เซลล์น้ำคร่ำ (human amniotic fluid cell) (52) เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในฟันแท้ และฟันน้ำนม (13) เป็นต้น

การเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิด

การศึกษาเซลล์ต้นกำเนิดในผู้ใหญ่ต้องเพิ่มจำนวนเซลล์ในห้องปฏิบัติการ เนื่องจากจำนวนเซลล์ที่ได้จากเนื้อเยื่อไม่เพียงพอต่อการนำมาใช้ จากการศึกษาเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันของหนู พบว่าอัตราการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์จะมีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในระยะยาว โดยอัตราการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์จะลดลงจากรุ่นที่ 1 ถึงรุ่นที่ 7 จากนั้นค่อยๆ เพิ่มขึ้นจนถึงรุ่นที่ 20 (53) ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในฟันน้ำนมจนถึงรุ่นที่ 19 มีอัตราการแบ่งตัวช้ากว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในโพรงฟันแท้ (14) ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาอื่นๆ ที่มักแสดงว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในฟันน้ำนมมีอัตราการแบ่งตัวที่สูงกว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในฟันแท้ นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในฟันน้ำนมจนถึงรุ่นที่ 19 ไม่พบการแปรสภาพไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่เฉพาะเจาะจงใดๆ (spontaneous differentiation) การเปลี่ยนแปลงนี้ส่วนหนึ่งน่าจะเกิดจากสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์นั้น ไม่เหมาะสมหรือไม่สามารถคงสภาพความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดให้เซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้

เบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์

เบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ หรือไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์2 เป็นโกรทแฟกเตอร์ชนิดหนึ่งที่อยู่ในตระกูลของไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ ซึ่งได้ในเซลล์และเนื้อเยื่อต่างๆ ได้แก่

เนื้อเยื่อบุโพรงหลอดเลือดฝอย (endothelial capillary) เซลล์ประสาท เซลล์เรตินา เซลล์กระจกตา เลนส์ตา รก และแมกโครแฟจ เป็นต้น (54) มีบทบาทในการสร้างหลอดเลือดใหม่ และซ่อมแซมเนื้อเยื่อของบาดแผล (55) นอกจากนี้อาจมีความเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของตัวอ่อน เนื่องจากพบการแสดงออกของเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ที่สมองในตัวอ่อนของไก่ จากนั้นการแสดงออกจะลดลงเมื่อตัวอ่อนมีการพัฒนามากขึ้น (56)

การทำงานของเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ เกิดผ่านวิถีการส่งสัญญาณ (signaling pathway) เข้าสู่นิวเคลียสของเซลล์ โดยเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์จับกับตัวรับที่ผิวเซลล์ ซึ่งมี 4 ชนิด ได้แก่ เอฟจีเอฟอาร์ 1 (FGFR1) เอฟจีเอฟอาร์2 (FGFR2) เอฟจีเอฟอาร์ 3 (FGFR3)และ เอฟจีเอฟอาร์4 (FGFR4) มีผลเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต การแปรสภาพของเซลล์ และการตอบสนองของเซลล์ต่อสภาวะการเพาะเลี้ยง (57)

เบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ถูกนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดหลายชนิด ได้แก่ เซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด (hematopoietic stem cell) เซลล์ต้นกำเนิดประสาท (neural stem cell) และเซลล์ต้นกำเนิดของตัวอ่อน (embryonic stem cell) เพื่อคงความสามารถในการแบ่งตัวและสร้างตัวเองขึ้นมาใหม่ ได้อย่างไม่มีขีดจำกัด (58) ซึ่งเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อนสามารถคงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด โดยไม่มีการแปรสภาพไปเป็นเซลล์อื่นๆ ที่ทำหน้าที่เฉพาะเจาะจง เมื่อเพาะเลี้ยงในระยะยาวด้วย เบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ โดยปราศจากโกรทแฟกเตอร์ชนิดอื่นๆ (59)

ผลของเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ ต่อเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในฟันแท้ คือทำให้มีการแสดงออกของมาร์กเกอร์ของเซลล์ต้นกำเนิด ได้แก่ ออกเทเมอร์-4 เร็กซ์ –1 และนาน็อกเพิ่มมากขึ้น ในสภาวะที่ถูกเหนี่ยวนำให้แปรสภาพไปเป็นเซลล์ประสาท นอกจากนี้ เบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ สามารถกระตุ้นให้เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในฟันแท้ การแปรสภาพไปเป็นเซลล์ประสาทได้มากขึ้น แต่ยับยั้งการสะสมแร่ธาตุ (mineralization) ในสภาวะที่ถูกเหนี่ยวนำให้เซลล์แปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง (29)

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อในฟันน้ำนมร่วมกับเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ที่ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีการแสดงออกของซีดี 31 (CD31) ซึ่งเป็นมาร์กเกอร์ที่เกี่ยวข้องกับเซลล์เนื้อเยื่อบุโพรง (endothelial cell marker) (60) และส่งเสริมให้เกิดเส้นใยคอลลา เจน บริเวณเนื้อเยื่อของบาดแผลมากกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ (61) แสดงให้เห็นว่าเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ อาจมีความสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เนื้อเยื่อในฟันน้ำนมแปรสภาพไปเป็นเซลล์หลอดเลือด และส่งเสริมให้มีการหายของบาดแผลได้

บทที่ 3
ระเบียบวิธีการวิจัย

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ประชากรเป้าหมาย

เซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อในฟันน้ำนมที่ไม่มีรอยผุและรอยโรคปลายรากฟันของเด็กปกติ ที่ไม่มีโรคประจำตัว

ประชากรตัวอย่าง

<u>กลุ่มศึกษา</u>

เซลล์จากเนื้อเยื่อในฟันน้ำนมที่ไม่มีรอยผุและรอยโรคปลายรากฟัน ของเด็กปกติ ไม่มีโรคประจำตัว เพศชายและหญิง อายุระหว่าง 6 -12 ปี ที่มารับการถอนฟันน้ำนมตามแผนการรักษาทางทันตกรรมได้แก่ การถอนเพื่อการจัดฟันและฟันน้ำนมหลุดช้า (prolonged retention) ที่คลินิกทันตกรรมสำหรับเด็ก คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟีนอลเรดที่ เติมเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์

<u>กลุ่มควบคุม</u>

เซลล์จากเนื้อเยื่อในฟันน้ำนมที่ไม่มีรอยผุและรอยโรคปลายรากฟัน ของเด็กปกติ ไม่มีโรคประจำตัว เพศชายและหญิง อายุระหว่าง 6 -12 ปี ที่มารับการถอนฟันน้ำนมตามแผนการรักษาทางทันตกรรมได้แก่ การถอนเพื่อการจัดฟันและฟันน้ำนมหลุดช้า (prolonged retention) ที่คลินิกทันตกรรมสำหรับเด็ก คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟีนอลเรด

<u>หมายเหตุ</u>

ขั้นตอนกระบวนการขอความยินยอมจากผู้ปกครองของอาสาสมัครเด็ก กระทำที่ที่คลินิกภาควิชาทันตกรรมสำหรับเด็ก จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยผู้วิจัยเป็นผู้อธิบายให้ข้อมูล ความเสี่ยงและประโยชน์ แก่ผู้ปกครองและอาสาสมัครเด็ก ตลอดจนตอบข้อซักถาม หลังจากนั้นให้เวลาผู้ปกครองและอาสาสมัครเด็กตัดสินใจโดยอิสระ ก่อนลงนามให้ความยินยอมด้วยความเต็มใจ

จำนวนตัวอย่าง

เซลล์ที่นำมาใช้ในการทดลองได้จากเนื้อเยื่อในฟันน้ำนมของเด็กปกติ อย่างน้อย 3 ซี่จากตัวอย่างที่ไม่ใช่บุคคลเดียวกัน โดยในแต่ละการทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง ในแต่ละกลุ่มการทดลอง คือ เซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟีนอลเรดที่เติมเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ (กลุ่มศึกษา) และเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟีนอลเรด (กลุ่มควบคุม)

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 B, Invitrogen, USA)
  7. เบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ (Basic fibroblast growth factor, Invitrogen, USA)
  8. เอนไซม์ทริพซินอีดีทีเอร้อยละ 0.25(0.25% Trypsin-EDTA, Gibco, USA)
  9. เอนไซม์คอลลาจิเนส ชนิดที่ 1 (Type I collagenase, Gibco, USA)
  10. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลายน์ที่ปราศจากเชื้อ (Sterile Phosphate Buffer Saline: PBS)
  11. น้ำกลั่น
  12. สารละลายบัฟเฟอร์ฟอร์มาลินร้อยละ 10 (10% buffered formalin, MERCK, germany)
  13. เมทธิลินบลู (methyline blue, Sigma, USA)
  14. เอ็มทีที (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide: MTT, Sigma, USA)

15. ดีเอ็มเอสโอ (Dimethylsulfoxide: DMSO)
16. สารละลายไตรซอล (TRIzol, Gibco, USA)
17. คลอโรฟอร์ม (Chloroform)
18. ไอโซโพรพานอล (Isopropanol)
19. อะกาโรส (Agarose)
20. ไพร์มเมอร์สำหรับ18เอส (Primers for 18S)
21. ไพร์มเมอร์สำหรับยีนเร็กซ์-1(Primers for REX-1)
22. น้ำปราศจากเอนไซม์นิวคลีเอส (Nuclease free water) เอนไซม์ที่ย่อยกรดนิวคลิอิก
23. ชุดสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอ
24. เอนไซม์แทคโพลีเมอเรส (Taq polymerase) เอนไซม์สำหรับขยายสัญญาณใน PCR
25. ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไทรฟอสเฟต (Deoxyribonucleotidetriphosphate, dNTP)
26. หลอดพลาสติกสำหรับเก็บฟันมีฝาเกลียวขนาด 5 มล.
27. หลอดเหวี่ยงขนาด 0.5 และ1.5 มิลลิลิตร (microcentrifuge tube)
28. หลอดพีซีอาร์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร (PCR tube)
29. ทิปใช้ครั้งเดียวทิ้งสำหรับปิเปตอัตโนมัติขนาด 10 200 1000 ไมโครลิตร (Disposable pipette tip)
30. ถุงมือยางใช้ครั้งเดียวทิ้ง (Disposable latex glove)
31. จานเลี้ยงเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 35, 60และ 100 มิลลิเมตร (35, 60, 100 mm culture dish)
32. จานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม (24-well plate)

- **<u>อุปกรณ์</u>**
  1. ตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ (CO_2 incubator)
  2. ตู้ปฏิบัติการปลอดเชื้อ (Laminar flow Hood)
  3. เครื่องอ่านค่าบนไมโครเพลท (microplate reader; ELx800; BIO-TEK®)
  4. เครื่องวิเคราะห์โปรตีนและสารพันธุกรรม 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. กล้องถ่ายภาพฟูจิฟิล์ม(Fujifilm)

ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

1. **การเก็บฟันตัวอย่างก่อนการเพาะเลี้ยงเซลล์**

ภายหลังถอนฟันเก็บฟันตัวอย่าง ใส่ลงในหลอดพลาสติกที่มีฝาเกลียวปิดสนิท ภายในบรรจุอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟีนอลเรด โดยเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและนำมาเพาะเลี้ยงเซลล์ภายใน 24 ชั่วโมง

2. **การเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell culture)**

2.1 ทำความสะอาดฟันด้วย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลายน์ที่ปราศจากเชื้อ เพื่อกำจัดเลือดและสิ่งสกปรกออกจากตัวฟัน จากนั้นดึงเนื้อเยื่อออกจากฟัน นำมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 1x1 มิลลิเมตรนำไปย่อยด้วยเอนไซม์คอลลาจีเนส ชนิดที่ 1 ที่ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1

ชั่วโมง โดยวางบนเครื่องหมุนความเร็วต่ำ จากนั้นนำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 2000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และนำส่วนตกตะกอนไปเพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงขนาด 35 มิลลิเมตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟีนอลเรด โดยเลี้ยงในตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์วันเว้นวัน

2.2 เมื่อเซลล์เติบโตเต็มจานเลี้ยง เซลล์จะถูกเปลี่ยนถ่ายลงจานใหม่ โดยการย่อยด้วยเอนไซม์ทริพซิน-อีดีทีเอ ซึ่งจะย่อยเซลล์ให้หลุดออกจากพื้นผิวของจานเลี้ยง นับจำนวนเซลล์ด้วยแผ่นสไลด์นับเซลล์ (hemacytometer) จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปเพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงชุดใหม่ที่ความหนาแน่นประมาณ $5x10^4$ เซลล์ /ตารางเซนติเมตร เมื่อเซลล์มีจำนวนมากขึ้น และมีการเรียงตัวหนาแน่นในจานเพาะเลี้ยง จึงทำการหว่านเซลล์ใหม่ทุก 5-7 วัน

2.3 เมื่อเพาะเลี้ยงจนถึงเซลล์ในรุ่นที่ 2 เซลล์จะถูกเปลี่ยนถ่ายลงจานเลี้ยงขนาด 60 มิลลิเมตร เซลล์จะถูกแบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่ม ควบคุมเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟีนอลเรด กลุ่มศึกษาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟีนอลเรด ผสมกับเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เซลล์ที่ใช้สำหรับการทดลองเป็นเซลล์รุ่นที่ 5 และ10

3. **การวัดปริมาณเซลล์ด้วยเทคนิคเอ็มทีที**

3.1 เซลล์เนื้อเยื่อในฟันน้ำนมถูกหว่านลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบหลุม ปริมาณ $1.25x10^4$ เซลล์ต่อหลุม จำนวน 24 หลุม โดยแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ทั้งในกลุ่มศึกษาและกลุ่มควบคุม ตามระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเซลล์ ได้แก่ 1 3 และ 7 วัน กลุ่มละ 3 หลุม โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์วันเว้นวัน เมื่อครบตามกำหนดเวลาดังกล่าวเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งสองกลุ่ม เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มชนิดที่ไม่มีฟีนอลเรด และมีเอ็มทีทีที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.2 นำไปเพาะเลี้ยงในตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกแล้วเติมดีเอ็มเอสโอปริมาณ 900 ไมโครลิตรและสารละลายไกลซีนบัฟเฟอร์ปริมาณ 125 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมของจานเลี้ยงเซลล์เพื่อละลายผลึกฟอร์มาซาน (formazan) ที่เซลล์สร้างขึ้นจากสารละลายเอ็มทีที เขย่าให้สีของสารละลายเข้ากัน

3.3 นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านค่าบนไมโครเพลท ที่ความยาวคลื่นแสง 570 นาโนเมตร จากนั้นแปลงค่าการดูดกลืนแสงเป็นจำนวนเซลล์ตามกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้น จากการวัดความสามารถในการเปลี่ยนเอ็มทีทีเป็นผลึกฟอร์มาซานของเซลล์ที่ทราบจำนวน และปรับเป็นจำนวนเซลล์

4. **การวัดหน่วยการสร้างโคโลนี** (colony-forming unit assay)

เซลล์เนื้อเยื่อในฟันน้ำนมถูกหว่านในจานเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 60 มิลลิเมตร ปริมาณ 500 เซลล์ จำนวน 3 กลุ่ม ทั้งในกลุ่มศึกษาและกลุ่มเปรียบเทียบ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์วันเว้นวัน เมื่อครบกำหนด เติมด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ฟอร์มาลินร้อยละ 10 เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลายน์ 2 ครั้ง และย้อมสีด้วยเมทธิลีนบลู นำมานับจำนวนโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดย 1 โคโลนี ประกอบด้วยเซลล์มากกว่าหรือเท่ากับ 50 เซลล์

5. **การวิเคราะห์ปริมาณอาร์เอ็นเอนำรหัสของยีนเร็กซ์-1ด้วยวิธีอาร์ที-พีซีอาร์**
การเตรียมเซลล์สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณอาร์เอ็นเอนำรหัสตั้งต้น

เซลล์เนื้อเยื่อในฟันน้ำนม ถูกหว่านลงในจานเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 100 มิลลิเมตร ปริมาณ $1x10^6$ เซลล์ จานแรกเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟีนอลเรด และจานที่สองเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟีนอลเรดร่วมกับเบสิกไฟโบรบลาส ต์โกรทแฟกเตอร์ เป็นเวลา 7 วัน โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์วันเว้นวัน

6. **การวิเคราะห์ปริมาณอาร์เอ็นเอนำรหัสด้วยวิธีอาร์ที-พีซีอาร์**

เมื่อครบตามกำหนดเวลา 7 วัน เซลล์ถูกทำละลายด้วยสารละลายไตรซอล เพื่อเก็บอาร์เอ็นเอจากเซลล์ตามวิธีการบริษัทแนะนำ จากนั้นวัดปริมาณอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่องวิเคราะห์โปรตีนและสารพันธุกรรมนาโนดรอป ที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร อาร์เอ็นเอจำนวน 1 ไมโครกรัมจากแต่ละกลุ่มทดลองถูกนำไปผ่านกระบวนการรีเวอร์สทรานสคริปเตส (reverse transcriptase: RT) เพื่อสร้างคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอ (complementary DNA: cDNA) แล้วขยายสัญญาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้เอนไซม์แทคโพลีเมอเรส และไพร์มเมอร์ ที่จำเพาะต่ออาร์เอ็นเอนำรหัสของยีน เร็กซ์ -1โดยมีลำดับของเบสดังแสดงในตารางที่ 1 ใช้ยีนกลีเซอราดีไฮด์-3-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส (GAPDH) เป็นตัวควบคุมภายในของการทดลอง (internal control) สำหรับการตรวจสอบว่าปริมาณของ

อาร์เอ็นเอตั้งต้นที่ใช้มีปริมาณเท่ากัน สัญญาณที่ได้จากพีซีอาร์ถูกวิเคราะห์โดยการแยกด้วยไฟฟ้าในอะกาโรส และบันทึกภาพด้วยกล้องดิจิตอล นำไปอ่านค่าความเข้มด้วยโปรแกรมไซออน อิมเมจ (Scion Image-Release alpha 4.0.3.2)

ตารางที่ 1 ลำดับเบสของไพร์มเมอร์ที่จำเพาะต่ออาร์เอ็นเอ นำรหัสของ ยีนเร็กซ์-1 และยีนกลีเซอราดีไฮด์-3-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส (GAPDH)

Primer	Primer sequence	Basepair/ Cycle	Sequence ID
Rex-1	Forward: 5' AGAATTCGCTTGAGTATTCTGA3' Reverse: 5' GGCTTTCAGGTTATTTGACTGA3'	344/40	NM_174900.3
GAPDH	Forward: 5' TGAAGGTCGGAGTCAACGGAT3' Reverse: 5' TCACACCCATGACGAACATGG3'	396/22	NM_002046.3

การวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการทดลองแสดงข้อมูลแบบสถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistics) ดังนี้

1. อัตราการแบ่งตัวของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 1 3 และ 7 วัน แสดงเป็นค่าเฉลี่ยของปริมาณเซลล์ $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ในแต่ละระยะเวลาที่เพาะเลี้ยง ของแต่ละกลุ่ม
2. อัตราการแบ่งตัวของเซลล์วัดจากหน่วยการสร้างโคโลนี เป็นระยะเวลา 14 วัน แสดงเป็นค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนี $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของแต่ละกลุ่ม
3. ปริมาณอาร์เอ็นเอ นำรหัสของยีน แสดงเป็นสัดส่วนค่าเฉลี่ยความเข้มของยีนเร็กซ์-1 ต่อค่าเฉลี่ยความเข้มของ ยีนกลีเซอราดีไฮด์-3-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของแต่ละกลุ่ม
4. การเปรียบเทียบอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ หน่วยการสร้างโคโลนี และปริมาณ อาร์เอ็นเอนำรหัสของเร็กซ์-1 ระหว่างกลุ่มศึกษา (เซลล์เนื้อเยื่อในฟันน้ำนมที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟีนอลเรด ที่เติมเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์) และกลุ่มเปรียบเทียบ (เซลล์เนื้อเยื่อในฟันน้ำนมที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟีนอลเรด) ใช้วิธีทดสอบทีชนิดตัวอย่างอิสระ (Independence sample t-test) หรือวิธีทดสอบของแมน-วิทนี ยู (Mann-Whitney U test) ที่ระดับความ

เชื่อมั่นร้อยละ 95 ขึ้นกับการกระจายของข้อมูล โดยทดสอบการกระจายของข้อมูลด้วยวิธีโคลโมโกรอฟ-สเมอร์นอฟ (One-sample Kolmogorov-Smirnov test) โดยใช้โปรแกรมสถิติเอสพีเอสเอส16.0 (SPSS 16.0)

ตารางที่ 2 การบริหารงานวิจัย

ใช้ระยะเวลาการศึกษาตั้งแต่เริ่มต้นจนเสร็จสิ้น ใช้เวลาประมาณ 15 เดือน

	ระยะเวลาดำเนินการ									
	พ.ศ.2554					**พ.ศ**.2555				
	มี.ค.-เม.ย.	พ.ค.-มิ.ย.	ก.ค.-ส.ค.	ก.ย.-ต.ค.	พ.ย.-ธ.ค.	ม.ค.	ก.พ.	มี.ค.	เม.ย.	พ.ค.
1.ขั้นเตรียมการ										
-ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	←	—	—	—	→					
-ขอรับคำรับรองจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาฯ						←	—	→		
-เขียนโครงร่างวิทยานิพนธ์		←	—	—	→					
2.เสนอโครงร่างวิทยานิพนธ์					↔					
3.ขั้นปฏิบัติงาน										
-ทดลอง									↔	↔
-วิเคราะห์ข้อมูล									↔	↔
4. เขียนรายงาน									↔	↔
5.นำเสนอผลวิทยานิพนธ์										↔

งบประมาณ

1. งบประมาณสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์

1.1 อาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟีนอลเรด	3,500 บาท
1.2 อาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่ไม่มีฟีนอลเรด	850 บาท
1.3 ฟีทอลโบวีนซีรัม	1,300 บาท
1.4 ยาปฏิชีวนะและยาต้านเชื้อรา	1,800 บาท
1.5 ดีเอ็มเอสโอ	1,300 บาท
1.6 เบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์	10,000 บาท
1.7 จานเลี้ยง	
1.7.1 ขนาด 35 มิลลิเมตร อันละ 9 บาท	270 บาท
1.7.2 ขนาด 60 มิลลิเมตร อันละ10 บาท	2,000 บาท
1.8 จานเลี้ยงเซลล์แบบหลุม	
1.8.1 ขนาด 24 หลุม อันละ 45 บาท	1,800 บาท
1.9 ทิปใช้ครั้งเดียวทิ้งสำหรับปิเปตอัตโนมัติ	
1.9.1 ขนาด 10 ไมโครลิตร อันละ 0.6 บาท	600 บาท
1.9.2 ขนาด 200 ไมโครลิตรอันละ 0.5 บาท	500 บาท
1.9.3 ขนาด 1000 ไมโครลิตร อันละ 0.6 บาท	600 บาท

2. งบประมาณสำหรับค่าสารเคมีต่างๆ

2.1 เอ็มทีที	2,800 บาท

3. งบประมาณสำหรับการทำอาร์ที-พีซีอาร์

3.1 สารละลายไตรซอล	9,060 บาท
3.2 คลอโรฟอร์ม	2,800 บาท
3.3 ไอโซโพรพานอล	3,300 บาท
3.4 ชุดสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอ	24,100 บาท
3.5 เอนไซม์แทคโพลีเมอเรส	2,500 บาท
3.6 ไพร์มเมอร์	
3.6.1 เร็กซ์-1	1,000 บาท
3.6.2 กลีเซอราดีไฮด์-3-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส	1,000 บาท
3.7 อะกาโรส	2,100 บาท

3.8 หลอดเหวี่ยง

3.8.1 ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 1.3 บาท		1,300 บาท
3.8.2 ขนาด 0.6 มิลลิลิตร หลอดละ 0.9 บาท		900 บาท
3.8.3 หลอดพีซีอาร์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร หลอดละ1.5 บาท		1,500 บาท
4. งบประมาณสำหรับการจัดทำเอกสาร		2,000 บาท
รวม	78,880	**บาท**

บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการเปรียบเทียบ

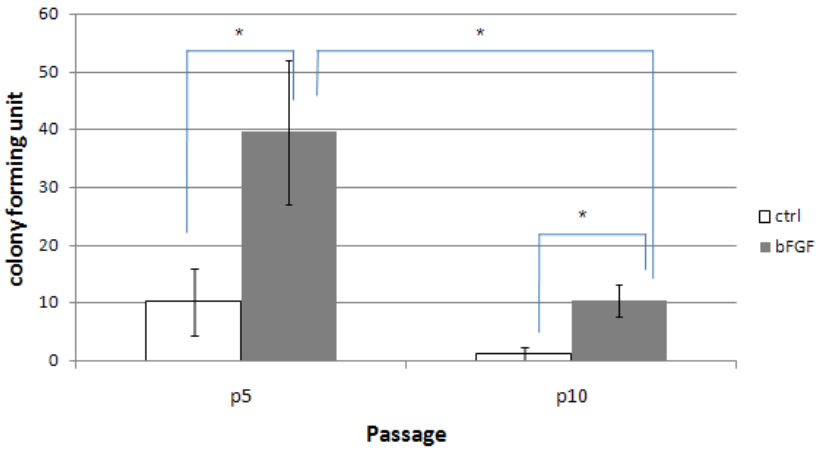
1. การศึกษาอัตราการแบ่งตัวของเซลล์โดยการวัดหน่วยการสร้างโคโลนี

ผลการศึกษาอัตราการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันน้ำนม โดยการวัดหน่วยการสร้างโคโลนี ที่ระยะเวลา 14 วัน พบว่าเซลล์ในกลุ่มควบคุม (กลุ่มเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็ม) รุ่นที่ 10 มีการสร้างจำนวนโคโลนีที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์จากรุ่นที่ 5 โดยสร้างได้ จำนวน 10.22±5.83 และ 1.33±1.20 โคโลนี ในรุ่นที่ 5 และรุ่นที่ 10 ตามลำดับ แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่เติมเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์พบว่า เซลล์กลุ่มที่เติมเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ สามารถสร้างจำนวนโคโลนีได้จำนวน 39.56±12.4 และ 10.44±2.80 ในรุ่นที่ 5 และรุ่นที่ 10 ตามลำดับ โดยในรุ่นที่ 10 มีการสร้างโคโลนีที่ลดลงกว่ารุ่นที่ 5 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

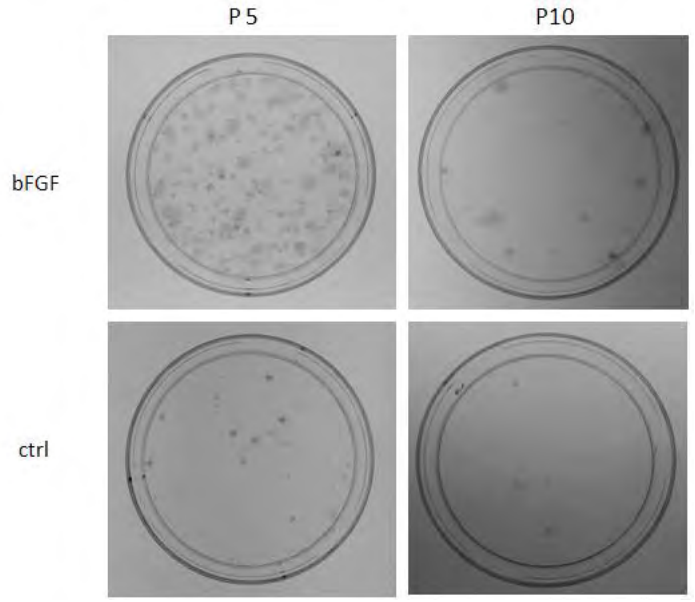
เมื่อนับจำนวนโคโลนีของเซลล์ในรุ่นเดียวกัน ใน กลุ่มควบคุมเปรียบเทียบกับกลุ่มที่เติมเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ พบว่าจำนวนโคโลนีในรุ่นที่ 5 เท่ากับ 10.22±5.83 และ 39.56±12.4 ตามลำดับ และเซลล์ในรุ่นที่ 10 มีการสร้างโคโลนีเป็นจำนวน 1.33±1.20 และ 10.44±2.80 ตามลำดับ โดยเซลล์ ในกลุ่มที่เติมเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ มีการสร้างโคโลนีที่มากกว่ากลุ่มควบคุมทั้งในรุ่นที่ 5 และรุ่นที่ 10 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่3 ภาพที่ 3 และ 4)

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ย ปริมาณหน่วยการสร้างโคโลนีในกลุ่มควบคุม เปรียบเทียบกับ กลุ่ม ที่เติมเบสิกไฟโบรบลาส ต์โกรทแฟกเตอร์ ในกา รเพาะเลี้ยงเซลล์รุ่นที่ 5 และรุ่นที่ 10 (*: $p < 0.05$)

จำนวนรุ่นของการเพาะเลี้ยง	จำนวนการสร้างโคโลนี (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)		
	กลุ่มควบคุม	กลุ่มเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์	p
รุ่นที่ 5	10.2 ± 5.85	39.33 ± 12.22	0.02*
รุ่นที่ 10	1.33 ± 1.21	10 ± 2.65	0.007*



ภาพที่ 3 แผนภูมิ แสดงปริมาณหน่วยการสร้างโคโลนีของเซลล์ ในกลุ่มควบคุมเปรียบเทียบกับกลุ่มที่เติมเบสิกไฟโบรบลาส ต์โกรทแฟกเตอร์ ในการเพาะเลี้ยงเซลล์รุ่นที่ 5 และรุ่นที่ 10 (Ctrl: กลุ่มเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็ม , bFGF: กลุ่มเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่เติมเบสิกไฟโบรบลาส ต์โกรทแฟกเตอร์, P: รุ่นของเซลล์, *: $p < 0.05$)



ภาพที่ 4 ภาพแสดงปริมาณโคโลนีของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันน้ำนมในการเพาะเลี้ยงเซลล์รุ่นที่ 5 และรุ่นที่10 เมื่อย้อมด้วย เมทธิลีนบลู (Ctrl: กลุ่มเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็ม, bFGF: กลุ่มเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่เติมเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์, P: รุ่นของเซลล์, *: $p < 0.05$)

2. การศึกษาอัตราการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์โดยการวัดปริมาณเซลล์ด้วยเทคนิคเอ็มทีที

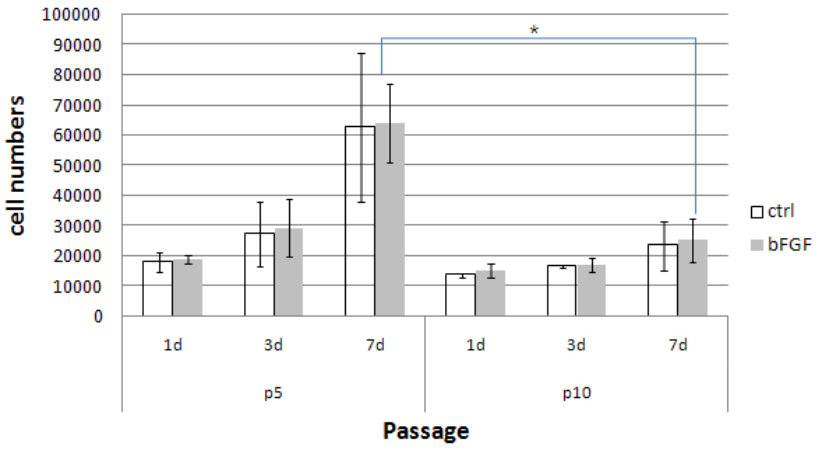
ผลการศึกษาอัตราการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ด้วยเทคนิคเอ็มทีที พบว่าเซลล์ เนื้อเยื่อในฟันน้ำนมจากรุ่นที่ 5 และรุ่นที่ 10 ทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เติมเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ สามารถเพิ่มจำนวนมากขึ้นตามระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงจาก 1 ถึง 7 วัน อย่างไรก็ดีเมื่อเปรียบเทียบอัตราการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ระหว่างรุ่นที่ 5 และ 10 ในกลุ่มควบคุมพบว่า มีแนวโน้มลดลงในทุกช่วงเวลาที่ทำการศึกษาแต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

เซลล์ ในกลุ่มที่เติมเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์มีอัตราการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่มีแนวโน้มลดลงเช่นเดียวกัน โดยเซลล์ในรุ่นที่ 10 มีอัตราการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนที่น้อยกว่าเซลล์ในรุ่นที่ 5 โดยไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในวันที่ 1และวันที่ 3 อย่างไรก็ดีในวันที่ 7 เซลล์ใน กลุ่มที่เติมเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์รุ่นที่ 10 มีอัตราการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนลดลงจากรุ่นที่ 5 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบอัตราการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เติมเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ พบว่ากลุ่มที่เติมเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์มีแนวโน้มของอัตราการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่มควบคุมทั้งในรุ่นที่ 5 และรุ่นที่ 10 ในทุกช่วงเวลาที่ศึกษา แต่ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 4 และภาพที่ 5)

ตารางที่ 4 ปริมาณเซลล์ที่วัดด้วยเทคนิคเอ็มทีทีของเซลล์ในกลุ่มควบคุม เปรียบเทียบกับกลุ่มที่เติมเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ในการเพาะเลี้ยงเซลล์รุ่นที่ 5 และรุ่นที่ 10

จำนวนวันที่เพาะเลี้ยง (วัน)	จำนวนเซลล์ (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)					
	รุ่นที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง			รุ่นที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง		
	กลุ่มควบคุม	กลุ่มเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์	p	กลุ่มควบคุม	กลุ่มเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์	p
1	18161 ± 3454	19106 ± 1568.13	0.689	13821 ± 744.89	15314 ± 2231.72	0.333
3	27398 ± 10601.5	29377 ± 9520.24	0.822	16670 ± 573.01	17263 ± 2212.67	0.176
7	62683 ± 24781.1	64279 ± 12934.02	0.926	23575 ± 8141.37	50179 ± 7196.76	0.773

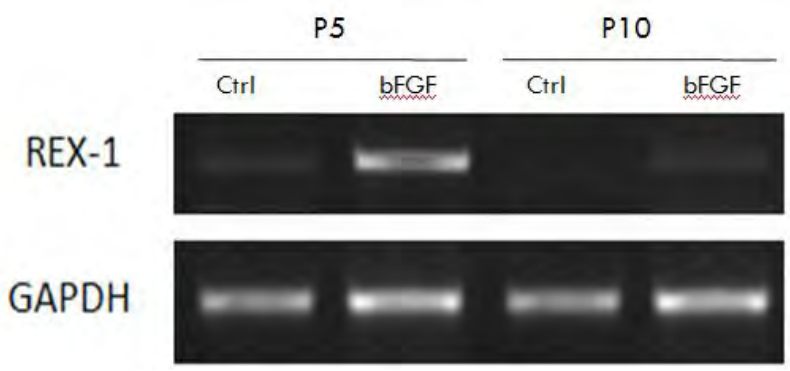


ภาพที่ 5 แผนภูมิแสดงปริมาณเซลล์ที่วัดด้วยเทคนิคเอ็มทีที (MTT assay) ของเซลล์ในกลุ่มควบคุมเปรียบเทียบกับ กลุ่ม ที่เติมเบสิกไฟโบรบลาส ต์โกรทแฟกเตอร์ในการเพาะเลี้ยง เซลล์รุ่นที่ 5 และรุ่นที่10 โดยแกนตั้งแสดงปริมาณเซลล์และแกนนอนแสดงระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงและรุ่นของเซลล์ (bFGF: กลุ่มเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่เติมเบสิกไฟโบรบลาส ต์โกรทแฟกเตอร์ , Ctrl: กลุ่มเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็ม , d: จำนวนวันที่เลี้ยง, P: รุ่นของเซลล์, *: $p < 0.05$)

3. การศึกษาปริมาณอาร์เอ็นเอนำรหัสของยีนเร็กซ์-1

เมื่อเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนเร็กซ์-1 ภายหลังการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7 วัน พบว่าเซลล์ ในกลุ่มควบคุมและเซลล์กลุ่มที่เติมเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ มีการแสดงออกของยีนเร็กซ์-1 ลดลงในรุ่นที่ 10 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในรุ่นที่ 5 แต่ไม่พบนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ทั้งสองกลุ่ม

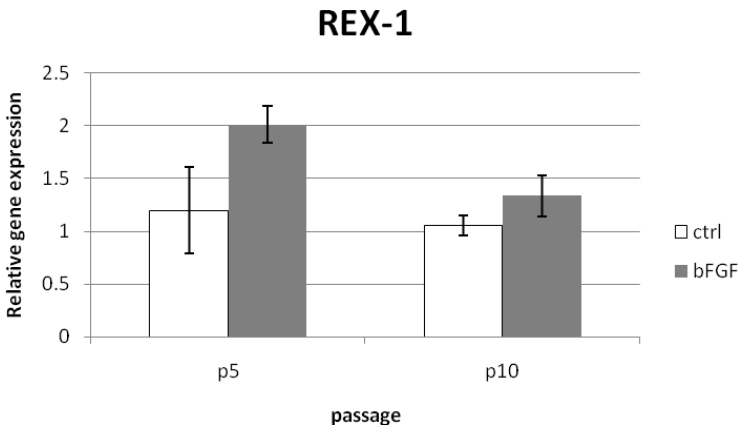
เมื่อเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนเร็กซ์-1 ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เติมเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์พบว่า กลุ่มที่เติมเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์มี การแสดงออกของยีนเร็กซ์-1 มากกว่ากลุ่มควบคุมทั้งในรุ่นที่ 5 และรุ่นที่ 10 แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ทั้งสองรุ่นของการเพาะเลี้ยง (ตารางที่ 5 ภาพที่ 6 และ 7)



ภาพที่ 6 ภาพการแสดงออกของยีนเร็กซ์ -1 โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธีอาร์ที -พีซีอาร์ (Ctrl: กลุ่มเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็ม , bFGF: กลุ่มเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่ เติมเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์, P: รุ่นของเซลล์)

ตารางที่ 5 ค่าเฉลี่ยการแสดงออกของยีนเร็กซ์ -1โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธีอาร์ที -พีซีอาร์ (Control: กลุ่มเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็ม , bFGF: กลุ่มเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่ เติมเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ , P: รุ่นของเซลล์)

ยีน	รุ่นของการเพาะเลี้ยง	สัดส่วนการแสดงออกของยีน (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)		
		กลุ่มควบคุม	กลุ่มเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์	*P*
เร็กซ์-1	รุ่นที่ 5	1	1.88 ± 0.92	0.172
	รุ่นที่ 10	0.97 ± 0.44	1.26 ± .064	0.566



ภาพที่ 7 แผนภูมิ แสดงระดับการแสดงออกของยีนเร็กซ์-1โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธีอาร์ที-พีซีอาร์ (RT-PCR) เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 7 วัน โดยแกนตั้งแสดงค่าเฉลี่ยความเข้มของยีนเร็กซ์-1ต่อค่าเฉลี่ยความเข้มของยีนกลีเซอราลดีไฮด์ -3-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส (GAPDH) และแกนนอนแสดงรุ่นของเซลล์ (Ctrl: กลุ่มเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ย งเซลล์ดีเอ็มอีเอ็ม , bFGF: กลุ่มเซลล์ที่เลี้ยงใน อาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่เติมเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์, P: รุ่นของเซลล์, *: $p < 0.05$)

บทที่ 5
อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

อภิปรายผลการวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอัตราการแบ่งตัว และ ความสามารถในการแสดงออกของยีนเร็กซ์-1 ของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันน้ำนมในรุ่นที่ 5 และ 10 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่เติมเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่ไม่ได้เติมเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ เพื่อนำไปสู่การตอบคำถามของงานวิจัยในการศึกษาครั้งนี้ว่าเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ มีผลต่ออัตราการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและการแสดงออกของเร็กซ์-1ของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันน้ำนมที่เพาะเลี้ยงในระยะยาวหรือไม่

เซลล์เนื้อเยื่อในฟันน้ำนมเป็นแหล่งของเซลล์ต้นกำเนิดอีกแหล่งหนึ่ง ที่สามารถเก็บได้สะดวก และมีแนวโน้มที่อาจถูกพัฒนาเพื่อนำไปใช้ในการรักษาได้ในอนาคต (7) ข้อจำกัดหนึ่งของการใช้เซลล์เนื้อเยื่อในฟันน้ำนมคือเนื้อเยื่อมีปริมาณน้อย ภายหลังจากการเก็บเนื้อเยื่อแล้วต้องผ่านกระบวนการเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวน เพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์ที่เพียงพอต่อการนำไปศึกษาและใช้งาน โดยอาจจำเป็นต้องเพาะเลี้ยงเป็นเวลานานและเซลล์จะมีจำนวนรุ่นที่มากขึ้น ซึ่งการเพาะเลี้ยงเซลล์ในระยะยาวอาจส่งผลต่อคุณสมบัติการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันน้ำนมได้ (62) ดังนั้นเป้าหมายที่สำคัญในการเพิ่มจำนวนเซลล์คือให้ได้ปริมาณเซลล์ที่เพียงพอต่อการนำไปใช้ แต่ยังคงคุณสมบัติของความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดไว้ให้ได้มากที่สุด

เบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์เป็นโกรทแฟกเตอร์ ที่มีบทบาทในกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ (63) และทำหน้าที่สำคัญในการกระตุ้นเซลล์เนื้อเยื่อในฟันต่อการตอบสนองเมื่อมีอันตรายเกิดขึ้น (64) สามารถพบได้ในเดนทีนแมทริกซ์ (dentine matrix) (65) นอกจากนี้ยังสามารถผลิตได้จากไฟโบรบลาสต์และเซลล์หลอดเลือด (65) เบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ถูกหลั่งออกมาในกระบวนการอักเสบ การซ่อมแซมโครงสร้างของเนื้อฟันและเนื้อเยื่อใน (dentine-pulp complex) โดยสามารถกระตุ้นเซลล์เนื้อเยื่อในฟันแท้ให้เกิดการเคลื่อนตัวของเซลล์มายังบริเวณที่ถูกทำลาย และมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้น (66) นอกจากนี้เบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ ยังนิยมนำมาใช้เป็นส่วนประกอบเสริมในอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อช่วยดำรงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดและส่งเสริมการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ (24)

ผลการศึกษาอัตราการแบ่งตัวพบว่าเซลล์เนื้อเยื่อในฟันน้ำนมในรุ่นที่ 10 มีแนวโน้มของอัตราการแบ่งตัวลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับรุ่นที่ 5 ทั้งในกลุ่มที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่

ไม่ได้เติมและเติมเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด เมื่อถูกเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานานมากขึ้น อย่างไรก็ตามเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ น่าจะส่งผลในการเพิ่มการแบ่งตัวของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันน้ำนม เนื่องจากเซลล์มีอัตราการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนสูงขึ้น เมื่อได้รับเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ ทั้งในเซลล์จากรุ่นที่ 5 และรุ่นที่ 10 ถึงแม้ว่าจะไม่พบนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาที่ผ่านมา (29,67) ที่แสดงให้เห็นว่าเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์มีผลในการเพิ่มการแบ่งตัวของเซลล์ต้นกำเนิดหลายชนิด

เป็นที่น่าสังเกตว่าผลของเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ ในการเพิ่มการแบ่งตัวของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันน้ำนมเห็นได้อย่างเด่นชัด เมื่อทำการวัดด้วยวิธีนับหน่วยการสร้างโคโลนี ทั้งนี้อาจเป็นผลจากความหนาแน่นของเซลล์ (cell density) บนจานเพาะเลี้ยง ซึ่งการวัดผลด้วยวิธีการนับหน่วยการสร้างโคโลนี มีปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่ถูกหว่านลงในจานเลี้ยง ความหนาแน่นเท่ากับ 25 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร (500 เซลล์ต่อจานเลี้ยงขนาด 60 มิลลิเมตร) ซึ่งน้อยกว่า ปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่ถูกหว่านลงในจานเลี้ยงด้วยวิธีการวัดผลด้วยเทคนิคเอ็มทีที ที่มีความหนาแน่นเท่ากับ 6,544 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร (12,500 เซลล์ต่อ1หลุมในจานเลี้ยงแบบ 24 หลุม)

ซึ่งผลการศึกษาในครั้งนี้ใกล้เคียงกับผลการศึกษาของ Tsutsumi และคณะ(68) ที่ศึกษาเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก พบว่าการตอบสนองของเซลล์ต่อเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ขึ้นกับความหนาแน่นของเซลล์ (cell density dependent) โดยเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์มีผลต่อเซลล์ที่มีความหนาแน่นต่ำมากกว่าเซลล์ที่มีความหนาแน่นสูง โดยมีการศึกษาที่แสดงว่าความหนาแน่นของเซลล์เป็นกลไกหนึ่งที่เซลล์ใช้รับรู้ต่อสิ่งแวดล้อมภายนอกเซลล์ รวมถึงควบคุมการตอบสนองต่อโกรทแฟกเตอร์ต่างๆ (69) เมื่อเซลล์แบ่งตัวและมีความหนาแน่นเพิ่มขึ้น การจับกันระหว่างตัวรับ และโกรทแฟกเตอร์จะลดลง ซึ่งกลไกที่ควบคุมยังไม่ทราบแน่ชัดแต่น่าจะเป็นผลมาจากความชอบจับกัน (binding affinity) ระหว่างตัวรับและโกรทแฟกเตอร์ที่น้อยลง ในขณะที่จำนวนของตัวรับไม่การเปลี่ยนแปลง และมิได้มาจากปริมาณโกรทแฟกเตอร์ที่ไม่เพียงพอ (70) ส่วนการศึกษาในเซลล์เคราติโนไซด์ (keratinocyte) ของ Nakamizo และคณะ(71)พบว่าเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์กระตุ้นการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ดี โดยเฉพาะในการเลี้ยงเซลล์ที่มีความหนาแน่นต่ำเช่นเดียวกัน แต่พบว่าระดับการแสดงออกของ ตัวรับของเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์จะเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเลี้ยงที่ความหนาแน่นที่ต่ำกว่า นอกจากนี้อาจเป็นผลจากไซโตไคน์ (cytokine) ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ที่อยู่ใกล้เคียง ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ที่อยู่ติดกันได้ (contact inhibition) (72)

เร็กซ์-1เป็นยีนตัวหนึ่ง นิยมใช้เป็นมาร์กเกอร์ที่บ่งชี้คุณลักษณะของความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทน ถึงแม้ว่าหน้าที่ของยีนเร็กซ์-1ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่เชื่อกันว่าการแสดงออกของยีนเร็กซ์-1 แสดงถึงความสามารถในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์และป้องกันไม่ให้เซลล์มีการแปรสภาพไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่เฉพาะเจาะจง เนื่องจากเร็กซ์-1 ยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณพี 38 ไมโทเจน-แอคทิเวเตดโปรตีนไคเนส (p38 MAPK signaling) ผ่านการกดเอ็มเคเค3 (MKK3) โดยเมื่อยับยั้งยีนเร็กซ์-1พบว่าเซลล์มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนลดลง และ มีการเพิ่มขึ้นของกระบวนการฟอสโฟรีเล ชัน (Phosphorylation) ของพี 38 ไมโทเจน-แอคทิเวเตดโปรตีนไคเนส และมีการแสดงออกของยีนเอ็มเคเค3 ที่เพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งเอ็มเคเค3เป็นยีนที่ควบคุมการแสดงออกของพี 38 ไมโทเจน-แอคทิเวเตดโปรตีนไคเนส ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวข้องในการแปรสภาพไปเป็นเซลล์ที่มีหน้าที่เฉพาะเจาะจง (48) เซลล์ที่มีการแสดงออกของยีนเร็กซ์ -1 อย่างเด่นชัด ได้แก่ เซลล์ต้นกำเนิดจากสายสะดือ (umbilical cord blood MSC) และเซลล์ต้นกำเนิดจากไขมัน (adipose MSC) (48) เป็นต้น ซึ่งเซลล์เนื้อเยื่อในฟันน้ำนมสามารถตรวจพบการแสดงออกของยีนเร็กซ์-1 ได้เช่นกัน โดยพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อในฟันน้ำนมในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็ม เซลล์รุ่นที่ 10 มีแนวโน้มการแสดงออกของยีนเร็กซ์-1 ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับรุ่นที่ 5 และการเติมเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์สามารถช่วยเพิ่มการแสดงออกของยีนเร็กซ์-1 ได้แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งรุ่นที่ 5 และรุ่นที่ 10 แสดงถึงข้อจำกัดของเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ ที่ไม่สามารถส่งเสริมให้เซลล์เนื้อเยื่อในฟันน้ำนมคงการแสดงออกของยีนเร็กซ์-1ได้ในระยะยาว และอาจบ่งชี้ว่าการคงสภาพความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดนั้นอาจต้องอาศัยโกรทแฟกเตอร์ชนิดอื่นๆ ร่วมด้วย ซึ่งควรมีการทดลองเพิ่มเติมต่อไป

ผลจากการศึกษาในครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าเซลล์เนื้อเยื่อในฟันน้ำนม สามารถเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนได้ในห้องปฏิบัติการ โดยจำนวนรุ่นของการเพาะเลี้ยงที่มากขึ้นมีผลต่อการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและอาจกระทบต่อการคงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่ยังไม่แปรสภาพของเซลล์ การเพาะเลี้ยงเซลล์ในระยะยาว เพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์ที่เพียงพอต่อการใช้ จึงควรคำนึงถึงคุณสมบัติของความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่อาจเปลี่ยนแปลงไปด้วย ผลการทดลองทั้งในส่วนของการเพิ่มจำนวนเซลล์ และการแสดงออกของยีนส์เร็กซ์-1 สอดคล้องไปในทิศทางเดียวกันว่าเบสิกไฟโบรลาสต์โกรทแฟกเตอร์ มีแนวโน้มช่วยเพิ่มการแบ่งตัว และคงสภาพความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์จากเนื้อเยื่อในฟันน้ำนมได้ ถึงแม้ว่าจะไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในหลายการทดลอง ซึ่งอาจเป็นผลมาจาก การตอบสนองของเซลล์ต่อเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์

ซึ่งถูกควบคุมด้วยปัจจัยหลายประการ เช่น ความเข้มข้นของเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ ความหนาแน่นของเซลล์ และตัวรับที่ผิวเซลล์ (70) ที่แตกต่างกันไปตามชนิดของเซลล์ นอกจากนี้ เซลล์ที่ใช้ในการทดลองยังเป็นเซลล์จากมนุษย์ที่มาจากต่างแหล่งกัน ทำให้ควบคุมตัวแปรที่เป็นผลมาจากพันธุกรรมได้ยาก อย่างไรก็ดีการใช้เซลล์ที่มีจำนวนรุ่นน้อยๆ ในการศึกษาทดลองและนำไปใช้ยังคงเป็นสิ่งที่ต้องคำนึงถึงเป็นหลัก เนื่องจากการนำเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ไปใช้ยังต้องอาศัยการศึกษาทดลองอีกมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลของการคงความ เป็นพลูริโพเทนซีของเซลล์ซึ่งถือเป็นคุณสมบัติที่สำคัญยิ่งของเซลล์ต้นกำเนิด และอาจนำไปสู่การใช้ประโยชน์ในเชิงวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เช่น การสร้างเนื้อฟันและเนื้อเยื่อใน โดยอาศัยการเพาะเลี้ยงเซลล์ในระยะยาว โดยที่เซลล์เนื้อเยื่อในฟันน้ำนมนั้นยังคงสภาพความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดอยู่

สรุปผลการวิจัย

เซลล์เนื้อเยื่อในฟันน้ำนมมีแนวโน้มแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและมีการแสดงออกของยีนเร็กซ์-1 ลดลง เมื่อจำนวนรุ่นของการเพาะเลี้ยงเพิ่มมากขึ้น และเซลล์เนื้อเยื่อในฟันน้ำนมที่ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่เติมเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ มี แนวโน้มของการสร้างหน่วยโคโลนี อัตราการแบ่งตัวของเซลล์และการแสดงออกของยีนเร็กซ์-1สูงกว่าเซลล์เนื้อเยื่อในฟันน้ำนมที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่ไม่ได้เติมเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ ดังนั้น เบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ จึงอาจมีบทบาท ช่วยในการคงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันน้ำนมได้

ข้อเสนอแนะ

1. ศึกษาเพิ่มเติมโดยการเปรียบเทียบความเข้มข้นต่างๆของเบสิกไฟโบรบลาสต์ที่มีความเหมาะสมในการคงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดให้ได้นานที่สุด
2. ศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับผลของเบสิกไฟโบรบลาสต์ต่อการคงความเป็นพลูริโพเทนซีของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันน้ำนมในแง่ของการแปรสภาพไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่เฉพาะเจาะจงเมื่อเพาะเลี้ยงในระยะยาว

รายการอ้างอิง

(1) Arora, V., Arora, P., and Munshi, A. K. Banking Stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED): Saving for the future. J Clin Pediatr Dent 33(4) (2009): 289-94.

(2) Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Uqarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Mol Biol Cell 13(12) (Dec 2002): 4279–95.

(3) Young, H. E., Steele, T. A., Bray, R. A., Hudson, J., Floyd, J. A., Hawkins, K., et al. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. Anat Rec 264(1) (Sep 2001): 51–62.

(4) Romanov, Y. A., Svintsitskaya, V. A., and Smirnov, V. N. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. Stem Cells 21(1) (2003): 105–10.

(5) Gronthos, S., Mankani, M., Brahim, J., Robey, P. G., and Shi, S. Postnatal human dental pulp stem cell(DPSCs) in vitro and in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 97(5) (Dec 2000): 13625-30.

(6) Gay, I. C., Chen, S., and Macdougall, M. Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. Orthod Craniofac Res 10(3) (Aug 2007): 149-60.

(7) 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 U S A 100(10) (May 2003): 5807-12.

(8) Huang, A. H., Chen, Y. K., Lin, L. M., Shieh, T. Y., and Chan, A. W. Isolation and characterization of dental pulp stem cells from a supernumerary tooth. J Oral Pathol Med 37(9) (Oct 2008): 571-4.

(9) Karaoz, E., Dogan, B. M., Aksoy, A., Gacar, G., Akyuz, S., Ayhan, S., et al. Isolation and in vitro characterisation of dental pulp stem cell from natal teeth. Histochem Cell Biol 133(1) (Jan 2010): 95-112.

(10) Fitzgerald, M. Autoradiographic analysis of odontoblast replacement following pulp exposure in primate teeth. Arch Oral Biol 35(9) (1990): 707-15.

(11) Tecles, O., Laurent, P., Zygouritsas, S., Burger, A. S., Camps, J., Dejou, J., et al. Activation of human dental pulp progenitor/stem cells in response to odontoblast injury. Arch Oral Biol 50(2) (2005): 103-8.

(12) Wei, X., Ling, J., Wu, L., Liu, L., and Xiao, Y. Expression of mineralization markers in dental pulp cells. J Endod 33(6) (Jun 2007): 703-8.

(13) 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(9) (Sep 2010): 1504-15.

(14) Suchanek, J., Visek, B., Soukup, T., El-Din Mohamed, S. K., Ivancakova, R., Mokry, J., et al. Stem cells of human exfoliated deciduous teeth - isolation, long term cultivation and phenotypical analysis. Acta Medica. 53(2) (2010): 93–9.

(15) Nakamura, S., Yamada, Y., Katakiri, W., Sugito, T., Ito, K., and Ueda, M. Stem cell proliferation pathways comparison between human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells by gene expression profile from promising dental pulp. J Endod. 35(11) (Nov 2009): 1536-42.

(16) Gronthos, S., Brahim, J., Fisher, L. W., Cherman, M., Boyde, A., Denbesten, P., et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. J dent research. 81(8) (Aug 2002): 531-5.

(17) Arthur, A., Rychkov, G., Shi, S., Koblar, S. A., and Gronthos, S. Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons

under appropriate environmental cues. Stem Cell. 26(7) (Jul 2008): 1787-95.

(18) Oyama, N., Okubo, Y., Nakao, K., and Bessho, K. Evaluation of pluripotency in human dental pulp cells. J Oral Maxillofac Surg 67(3) (Mar 2009): 501-6.

(19) Huang, G.T., Shagramanova, K., and Chan, S. W. Formation of odontoblast- like cells from cultured human dental pulp cells on dentin in vitro. J Endod 32(11) (Nov 2006): 1066-73.

(20) Sakai, V. T., Zhang, Z., Dong, Z., Neiva, K. G., Machado, M. A., Shi, S., et al. SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium. J Dent Res 89(8) (Aug 2010): 791-96.

(21) Cordeiro, M. M., Dong, Z., Kaneko, T., Zhang Z., Miyazawa, M., Shi, S.,et al. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. J Endod 34(8) (Aug 2008): 962-69.

(22) Min, J. H., Ko, S. Y., Cho, Y. B., Ryu, C. J., and Jang, Y. J. Dentinogenic potential of human adult dental pulp cells during the extended primary culture. Hum Cell 24(1) (Mar 2011): 43–50.

(23) Kanda, S., Miyata, Y., and Kanetake, H. Fibroblast growth factor-2-mediated capillary morphogenesis of endothelial cells requires signals via Flt-1/vascular endothelial growth factor receptor-1: possible involvement of c-Akt. J Biol Chem 279(6) (Feb 2004): 4007-16.

(24) Xu, C., Rosler, E., Jiang, J., Lebkowski, J. S., Gold, J. D., O'Sullivan, C., et al. Basic fibroblast growth factor supports undifferentiated human embryonic stem cell growth without conditioned medium. Stem cells 23(3) (Mar 2005): 315-23.

(25) Diecke, S., Quiroga-Negreira, A., Redmer, T., and Besser, D. FGF2 signaling in mouse embryonic fibroblasts is crucial for self-renewal of embryonic stem cells. Cells Tissues Organs 188(1-2) (2008): 52-61.

(26) Rogelj, S., Klagsbrun, M., Atzmon, R., Kurokawa, M., Haimovitz, A., Fuks, Z., et al. Basic fibroblast growth factor is an extracellular matrix component

required for supporting the proliferation of vascular endothelial cells and the differentiation of PC12 cells. J Cell Biol 109(2) (Aug 1989):823-31.

(27) Morito, A., Kida, Y., Suzuki, K., Inoue, K., Kuroda, N., Gomi, K., et al. Effects of basic fibroblast growth factor on the development of the stem cell properties of human dental pulp cells. Arch Histol Cytol 72(1) (Mar 2009): 51-64.

(28) Hanada, K., Dennis, J. E., and Caplan, A. I. Stimulatory effects of basic fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein-2 on osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. J Bone Miner Res 12(10) (Oct 1997): 1606-14.

(29) Osathanon, T., Nowwarote, N., and Pavasant, P. Basic fibroblast growth factor inhibits mineralization but induces neuronal differentiation by human dental pulp stem cells through a FGFR and PLC signaling pathway. Journal of Cellular Biochemistry 112(7) (Jul 2011): 1807–16.

(30) ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. เซลล์ชีววิทยาทางการแพทย์ 2 กลไกการทำงานของเซลล์และเนื้อเยื่อ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2549.

(31) Kiatpongsan, S., Tannirandorn, Y., and Virutamasen, P. Introduction to stem cell medicine. J Med Assoc Thai 89(1) (Jan 2006): 111-7.

(32) Cooper, G. M., and Hausman, R. E., The cell ; a molecular approach. 5th ed. Massachusetts : Sinauer Associates , 2009.

(33) Scadden, D. T. The stem-cell niche as an entity of action. Nature 441(7097) (Jun 2006): 1075-9.

(34) Seaberg, R. M., and van der Kooy, D. Stem and progenitor cells: the premature desertion of rigorous definitions. Trends Neurosci 26(3) (Mar 2003): 125-31.

(35) D'Ippolito, G., Schiller, P. C., Ricordi, C.,Roos, B. A., and Howard G. A. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. J Bone Miner Res 14(7) (Jul 1999): 1115-22.

(36) Seo, B. M., Miura, M. Gronthos, S., Bartold, P.M., Batouli, S., Brahim, J., et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. Lancet 364(9429) (2004): 149-55.

(37) Sonoyama, W., Liu, Y., Yamaza, T., Tuan, R. S., Wang, S., Shi, S., et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. J Endod 34(2) (Feb 2008): 166-71.

(38) Huang, G. T., Gronthos, S., and Shi, S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. J Dent Res 88(9) (Sep 2009): 792-806.

(39) Batouli, S., Miura, M., Brahim, J., Tsutsui, T. W., Fisher, L. W., Gronthos, S., et al. Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. J Dent Res 82(12) (Dec 2003): 976-81.

(40) Isaka, J., Ohazama, A., Kobayashi, M., Nagashima, C., Takiguchi, T., Kawasaki, H., et al. Participation of periodontal ligament cells with regeneration of alveolar bone. J Periodontol 72(3) (Mar 2001): 314-23.

(41) Lindroos, B., Maenpaa, K., Ylikomi, T., Oja, H., Suuronen, R., and Miettinen, S., et al. Characterisation of human dental stem cells and buccal mucosa fibroblasts. Biochem Biophys Res Commun 368(2) (Apr 2008): 329-35.

(42) Abe, S., Yamaguchi, S., and Amagasa T. Multilineage cells from apical pulp of human tooth with immature apex. Oral Science International 4(1) (2007): 45-58.

(43) Chai, Y., Jiang, X., Ito, Y., Bringas, P., Han, J., Rowitch, D. H., et al. Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. Development 127(8) (Apr 2000): 1671-9.

(44) Goldberg, M., and Smith, A. J. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: abiological basis for repair and tissue engineering. Crit Rev Oral Biol Med 15(1) (Jan 2004): 13-27.

(45) Nanci, A. Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure, and Function, 7th ed. St. Louis, 2008, Mosby Elsevier.

(46) Ishkitiev, N., Yaegaki, K., Calenic, B., Nakahara, T., Ishikawa, H., Mitiev, V., et al. Deciduous and permanent dental pulp mesenchymal cells acquire hepatic morphologic and functional features in vitro. J Endod 36(3) (Mar 2010): 469-74.

(47) Hosler, B. A., LaRosa, G. J., Grippo, J. F., and Gudas, L. J. Expression of REX-1, a gene containing zinc finger motifs, is rapidly reduced by retinoic acid in F9 teratocarcinoma cells. Mol Cell Biol 9(12) (Dec 1989): 5623-9.

(48) Bhandari, D. R., Seo, K. W., Roh, K. H., Jung, J. W., Kang, S. K., and Kang, K. S. REX-1 expression and p38 MAPK activation status can determine proliferation/differentiation fates in human mesenchymal stem cells. PLoS One 5(5) (May 2010): e10493.

(49) Masui, S., Ohtsuka, S., Yagi, R., Takahashi, K., Ko, M. S. H., and Niwa, H. Rex1/Zfp42 is dispensable for pluripotency in mouse ES cells. BMC Dev Biol 8 (Apr 2008): 45.

(50) Rogers, M. B., Hosler, B. A., and Gudas, L. J. Specific expression of a retinoic acid-regulated, zinc-finger gene, Rex-1, in preimplantation embryos, trophoblast and spermatocytes. Development 113(3) (Nov 1991): 815-24.

(51) Kristensen, D. M., Nielsen, J. E., Skakkebaek, N. E., Graem, N., Jaconsen, G. k., Rajpert-De Meyts, E., et al. Presumed pluripotency markers UTF-1 and REX-1 are expressed in human adult testes and germ cell neoplasms. Hum Reprod 23(4) (Apr 2008): 775-82.

(52) Bossolasco, P., Montemurro, T., Cova, L., Zangrossi, S., Calzarossa, C., Buiatiotis, S., et al. Molecular and phenotypic characterization of human amniotic fluid and their differentiation potential. Cell Research 16(4) (Apr 2006): 329-36.

(53) Patel, M., Smith, A. J., Sloan, A. J., Smith, G., and Cooper, P. R. Phenotype and behavior of dental pulp cells during expansion culture. Arch Oral Biol 54(10) (2009): 898-908.

(54) Schweigere, L. Basic fibroblast growth factor and its relation to angiogenesis in normal and neoplastic tissue. Klin Wochenschr 66(8) (Apr1988): 340-5.

(55) McNeil, P. L., Muthukrishnan, L., Warder, E., and D'Amore, P. A. Growth factors are released by mechanically wounded endothelial cells. J Cell Biol 109(2) (Aug 1989): 811-22.

(56) Risau, W. Developing brain produces an angiogenesis factor. Proc Natl Acad Sci U S A 83(11) (Jun 1986): 3855-9.

(57) Dvorak, P., and Hampl, A. Basic fibroblast growth factor and its receptors in human embryonic stem cells. Folia Histochem Cytobiol 43(4) (2005): 203-8.

(58) Yeoh, J. S., and de Haan, G. Fibroblast growth factors as regulators of stem cell self-renewal and aging. Mech Ageing Dev 128(1) (Jan 2007): 17-24.

(59) Xu, C., Rosler, E., jiang, J., Lebkowski, J. S., Gold, J. D., O'Sullivan, C., et al. Basic fibroblast growth factor supports undifferentiated human embryonic stem cell growth without conditioned medium. Stem cells 23(3) (Mar 2005): 315-23.

(60) Hasegawa, T., Chosa, N., Asakawa, T., Yoshimura, Y., Asegawa, A., Ishisaki, A., et al. Effect of fibroblast growth factor-2 on dental pulp cells derived from human deciduous teeth in vitro. Experimental and Therapeutic Medicine 1(3) (2010): 477-80.

(61) Nishino, Y., Ebisawa, K., Yamada, Y., Okabe, K., Kamei, Y., and Ueda, M. Human deciduous teeth dental pulp cells with basic fibroblast growth factor enhance wound healing of skin defect. J Craniofac Surg 22(2) (Mar 2011): 438-42.

(62) Lizier, N. F., Kerkis, A., Gomes, C. M., Hebling, J., Oliveira, C. F., Caplan, A. I., et al. Scaling-up of dental pulp stem cells isolated from multiple niches. PLoS ONE 7(6) (2012): e39885.

(63) Tran-Hung, L., Laurent, P., Camps, J., About, I., Quantification of angiogenic growth factors released by human dental cells after injury. Arch Oral Biol 53(1) (Jan 2008): 9-13.

(64) Smith, A. J. Pulpal responses to caries and dental repair. Caries Res 36(4) (2002): 223-32.

(65) Roberts-clark, D. J., and Smith, A. J. Angiogenesis growth factors in human dentine matrix. Arch Oral Biol 45(11) (Nov 2000): 1013-6.

(66) Shimabukuro,Y., Ueda, M., Ozasa, M., Anzai, J., Takedachi, M., Yanagita, M., et al. Fibroblast growth factor-2 regulates the cell function of human dental pulp cells. J Endod 35(11) (Nov 2009): 1529-35.

(67) Wu, J., Huang, G. T., He, W., Wang, P.,Tong, Z., Jia, Q., et al. Basic fibroblast growth factor enhances stemness of human stem cells from apical papilla. J Endod 38(5) (May 2012): 614-22.

(68) Tsutsumi, S., Shimazu, A., Miyazaki, K., Pan, H., Koike, C., Yoshida, E., et al. Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF. Biochem Biophys Res Commun 288(2) (Oct 2001): 413-9.

(69) Tamaki, M., McDonald, W., and Del Maestro, R. F. The importance of cell density in the interpretation of growth factor effects on collagenase IV activity release and extracellular matrix production from C6 astrocytoma cells. J Neurooncol 39(3) (Sep 1998): 205-16.

(70) Richardson, T. P., Trinkaus-Randall, V., and Nugent, M. A. Regulation of basic fibroblast growth factor binding and activity by cell density and heparan sulfate. J Biol Chem 274(19) (May 1999): 13534-40.

(71) Nakamizo, S., Egawa, G., Doi, H., Natsuaki, Y., Miyachi, Y., and Kabashima, K. Topical treatment with basic fibroblast growth factor promotes wound

healing and barrier recovery induced by skin abrasion. Skin Pharmacol Physiol 26(1) (Oct 2012): 22-9.

(72) McClatchey, A. I., and Yap, A. S. Contact inhibition (of proliferation) redux. Curr Opin Cell Biol 24(5) (Oct 2012): 685-94.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
เอกสารพิจารณาจริยธรรม คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

No. 013/2012

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 basic fibroblast growth factor on self-renewaj properties and rex-1 expression of human deciduous pulp cells in long term culture
Study Code	: HREC-DCU **2012-009**
Study Center	: Chulalongkorn University
Principle Investigator	: Miss Piyarat. Kerdpon
Protocol Date	: March 26, 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
เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้ปกครองของอาสาสมัครเด็ก
(Patient/Participant Information Sheet)

1. โครงการเรื่อง ผลของเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ต่อคุณสมบัติการเพิ่มจำนวนและการแสดงออกของยีนเร็กซ์-1 ของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันน้ำนมของมนุษย์ที่เพาะเลี้ยงระยะยาว

2. ชื่อผู้วิจัยหลัก ทันตแพทย์หญิง ปิยะรัตน์ เกิดผล
   สถาบันที่สังกัด คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
   แหล่งทุนวิจัย คาดว่าจะเป็นบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. วัตถุประสงค์ของโครงการ
   เพื่อศึกษาเปรียบเทียบอัตราการแบ่งตัวและสัดส่วนการแสดงออกของเร็กซ์-1 ของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันน้ำนม เมื่อเพาะเลี้ยงระยะยาว ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ และไม่มีเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ เพื่อเป็นพื้นฐานสำหรับการพัฒนาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิด ที่สามารถคงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดไว้ให้ได้นานที่สุด

4. สถานที่ดำเนินการวิจัย หน่วยปฏิบัติการวิจัยเนื้อเยื่ออนินทรีย์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. วิธีการที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย
   การศึกษานี้มี 2 กลุ่มการศึกษา กลุ่มละ 3 คน ผู้วิจัยจะขอฟันน้ำนมจากบุตรหลานของท่านคนละ 1 ซี่ นำฟันไปแยกเนื้อเยื่อ ทำการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเซลล์ เพื่อใช้ในการทดลอง

6. เหตุผลที่เชิญเข้าร่วมเป็นอาสาสมัครในโครงการ
   เนื่องจากการศึกษานี้จะใช้ฟันน้ำนมที่ไม่มีรอยผุ และไม่มีรอยโรคที่ปลายรากฟันซึ่งจำเป็นต้องถอน ด้วยเหตุผลทางการรักษามาทดลอง โดยฟันที่ได้ต้องมาจากอาสาสมัครที่มีสุขภาพแข็งแรง ไม่มีโรคประจำตัว

7. ความรับผิดชอบของอาสาสมัคร ระยะเวลาที่อาสาสมัครจะอยู่ในโครงการ

อาสาสมัครจะได้รับการถอนฟันตามแผนการรักษาปกติ โดยอาสาสมัครจะได้รับทราบข้อมูลของงานวิจัยเพื่อตัดสินใจว่าจะบริจาคฟันซี่ที่ถอนไปนั้นเพื่อนำไปใช้ในงานวิจัยหรือไม่ ดังนั้นอาสาสมัครจึงไม่ต้องมีความรับผิดชอบใดๆ และไม่มีระยะเวลาที่อาสาสมัครเข้าร่วมในโครงการ เนื่องจากอาสาสมัครจะต้องได้รับการถอนฟันตามแผนการรักษาตามปกติอยู่แล้ว

8. ประโยชน์ของการวิจัยที่อาสาสมัครและ/หรือผู้อื่นที่อาจได้รับ (ในกรณีที่การวิจัยนี้ไม่ได้ประโยชน์แต่ประการใดทั้งสิ้นแก่อาสาสมัคร ก็สมควรที่จะต้องแจ้งให้อาสาสมัครรับทราบด้วยเช่นกัน)

การวิจัยนี้อาจไม่เกิดผลประโยชน์โดยตรงต่ออาสาสมัคร แต่ผลที่ได้จะสะท้อนให้เห็นถึงบทบาทของ เบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ ในการคงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันน้ำนมเมื่อเพาะเลี้ยงในระยะยาว ซึ่งเป็นพื้นฐานสำหรับการพัฒนาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิด ที่สามารถคงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดไว้ให้ได้นานที่สุด

9. ความเสี่ยงหรือความไม่สะดวกที่อาจจะเกิดขึ้นแก่อาสาสมัครและในบางกรณีแก่ทารกในครรภ์หรือทารกที่ดื่มนมมารดา

การแยกเนื้อเยื่อ นำไปเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเซลล์และทำการทดลอง จะไม่มีผลกระทบต่อบุตรหลานของท่าน และไม่มีความเสี่ยงเพิ่มขึ้น

10. ค่าใช้จ่ายที่อาสาสมัครจะต้องจ่าย หรืออาจจะต้องจ่าย สำหรับการเข้าร่วมในการวิจัย

การเข้าร่วมในการวิจัยครั้งนี้ไม่มีค่าใช้จ่ายใดๆทั้งสิ้น

11. การชดเชยใดๆ และการรักษาที่จะจัดให้แก่อาสาสมัครในกรณีที่ได้รับอันตรายซึ่งเกี่ยวข้องกับการวิจัย

การวิจัยนี้ใช้เนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงจากฟันน้ำนมของอาสาสมัครที่ถอนตามแผนการรักษา โดยที่อาสาสมัครจะไม่ได้รับอันตรายใดๆ ที่เกี่ยวข้องกับการวิจัยนี้

12. การจ่ายค่าเดินทาง ค่าเสียเวลา ซึ่งต้องกำหนดไว้เป็นรายครั้ง แก่อาสาสมัครที่เข้าร่วมในการวิจัย (ทั้งนี้ต้องไม่มีข้อแม้หรือเงื่อนไขใดๆ ทั้งสิ้นในการจ่ายเงิน)
ไม่มีการจ่ายค่าเดินทาง หรือค่าเสียเวลา

13. เหตุการณ์ที่อาจจะเกิดขึ้น หรือเหตุผลซึ่งผู้วิจัยจะต้องยกเลิกการเข้าร่วมในโครงการวิจัยของอาสาสมัคร
ในกรณีที่ผู้ปกครองหรือบุตรหลานของท่านปฏิเสธไม่ให้ชิ้นส่วนของฟันตั้งแต่ยังไม่เริ่มทำหรือหลังจากทำไปแล้ว ผู้วิจัยจะหยุดทำการวิจัยทันที

14. การกำกับดูแลและควบคุมการดำเนินโครงการ
ผู้กำกับดูแลการวิจัย ผู้ตรวจสอบ คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรม และคณะกรรมการที่เกี่ยวข้องสามารถเข้าไปตรวจสอบการดำเนินโครงการ รวมทั้งตรวจสอบบันทึกข้อมูลของอาสาสมัคร เพื่อเป็นการยืนยันถึงขั้นตอนในการวิจัยทางคลินิกและข้อมูลอื่นๆ โดยไม่ล่วงละเมิดเอกสิทธิ์ในการปิดบังข้อมูลของอาสาสมัคร ตามกรอบที่กฎหมายและกฎระเบียบได้อนุญาตไว้ นอกจากนี้โดยการลงนามให้ความยินยอม อาสาสมัครหรือผู้แทนตามกฎหมายจะมีสิทธิตรวจสอบและมีสิทธิที่จะได้รับข้อมูลด้วยเช่นกัน

15. จริยธรรมการวิจัย
การดำเนินการโครงการวิจัยนี้ ผู้วิจัยคำนึงถึงหลักจริยธรรมการวิจัย ดังนี้
1. หลักความเคารพในบุคคล (Respect for person) โดยการให้ข้อมูลจนอาสาสมัครเข้าใจเป็นอย่างดีและตัดสินใจอย่างอิสระ ในการให้ความยินยอมเข้าร่วมในการวิจัย รวมทั้งการเก็บรักษาความลับของอาสาสมัคร
2. หลักการให้ประโยชน์ไม่ก่อให้เกิดอันตราย (Beneficence/Non-Maleficence) โดยระบุในข้อ 8 และ 9 ว่าจะมีประโยชน์หรือความเสี่ยงกับอาสาสมัครหรือไม่
3. หลักความยุติธรรม (Justice) คือ มีเกณฑ์คัดเข้าและคัดออกชัดเจน มีการกระจายความเสี่ยงและผลประโยชน์อย่างเท่าเทียมกัน โดยวิธีสุ่มเข้ากลุ่มศึกษา

16. ข้อมูลที่อาจนำไปสู่การเปิดเผยตัวของอาสาสมัครจะได้รับการปกปิด ยกเว้นว่าได้รับคำยินยอมไว้โดยกฎระเบียบและกฎหมายที่เกี่ยวข้องเท่านั้น จึงจะเปิดเผยข้อมูลแก่สาธารณชน

ได้ ในกรณีที่ผลการวิจัยได้รับการตีพิมพ์ ชื่อและที่อยู่ของอาสาสมัคร จะต้องได้รับการปกปิดอยู่เสมอ และอาสาสมัครหรือผู้แทนตามกฎหมายจะได้รับแจ้งโดยทันท่วงที ในกรณีที่มีข้อมูลใหม่ ซึ่งอาจใช้ประกอบการตัดสินใจของอาสาสมัคร ว่าจะยังคงเข้าร่วมในโครงการวิจัยต่อไปได้หรือไม่

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

18. หากท่านต้องการยกเลิกการเข้าร่วมเป็นอาสาสมัครในโครงการนี้ ให้ท่านกรอกและส่งเอกสารขอยกเลิกมาที่ ผู้วิจัย ทันตแพทย์หญิง ปิยะรัตน์ เกิดผล
บ้านเลขที่ 70 ถ.พระราม 1 รองเมือง ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

19. อาสาสมัครสามารถติดต่อผู้วิจัยได้ตลอด 24 ชั่วโมง ที่:
ผู้วิจัย ทันตแพทย์หญิง ปิยะรัตน์ เกิดผล เบอร์โทรศัพท์ 081-944-7775
อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.วลีรัตน์ ศุกรวรรณ
เบอร์โทรศัพท์ 02-218-8906
ภาควิชาทันตกรรมสำหรับเด็ก คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

.....
(ทันตแพทย์หญิง ปิยะรัตน์ เกิดผล)
ผู้วิจัยหลัก
วันที่...../...../.....

ภาคผนวก ค

เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับอาสาสมัครเด็กอายุ 7-12 ปี

(Patient/Participant Information Sheet)

1. โครงการเรื่อง ผลของเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ต่อคุณสมบัติการเพิ่มจำนวนและการแสดงออกของยีนเร็กซ์-1ของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันน้ำนมของมนุษย์ที่เพาะเลี้ยงระยะยาว
2. ชื่อผู้วิจัยหลัก ทันตแพทย์หญิง ปิยะรัตน์ เกิดผล
   สถาบันที่สังกัด คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
3. วัตถุประสงค์ของโครงการ ซึ่งเป็นโครงการที่ศึกษาเกี่ยวกับสารชนิดหนึ่ง ชื่อว่า เบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ ต่อคุณสมบัติของการแบ่งตัวและและสัดส่วนการแสดงออกของยีนชนิดหนึ่งคือเร็กซ์-1 ของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนม โดยเนื้อเยื่อในฟันน้ำนมที่ได้จะถูกนำไปเพาะเลี้ยงขยายจำนวนเซลล์และทดลองในห้องทดลอง
4. สถานที่ดำเนินการวิจัย หน่วยปฏิบัติการวิจัยเนื้อเยื่ออนินทรีย์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
5. วิธีการที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย
   การศึกษาใช้อาสาสมัคร 3 คน ผู้วิจัยจะขอฟันน้ำนมจากอาสาสมัครคนละ 1 ซี่ นำฟันไปแยกเนื้อเยื่อ ทำการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเซลล์ เพื่อใช้ในการทดลอง
6. เหตุผลที่เชิญเข้าร่วมเป็นอาสาสมัครในโครงการ
   เนื่องจากอาสาสมัครมีสุขภาพแข็งแรง ไม่มีโรคประจำตัว และมีฟันน้ำนมที่ต้องถอนตามแผนการรักษาอยู่แล้ว ผู้วิจัยจึงขอเชิญให้เข้าร่วมโครงการวิจัยนี้
7. ความรับผิดชอบของอาสาสมัคร ระยะเวลาที่อาสาสมัครจะอยู่ในโครงการ
   อาสาสมัครจะได้รับการถอนฟันตามแผนการรักษาปกติ และไม่มีระยะเวลาที่ต้องเข้าร่วมในโครงการเนื่องจากต้องได้รับการถอนฟันตามแผนการรักษาตามปกติอยู่แล้ว
8. ประโยชน์ของการวิจัยที่อาสาสมัครและ/หรือผู้อื่นที่อาจได้รับ
   การวิจัยนี้อาจไม่เกิดผลประโยชน์โดยตรงต่ออาสาสมัคร แต่ผลที่ได้จะเป็นความรู้ที่จะสามารถนำไปใช้ได้ในอนาคต
9. ความเสี่ยงหรือความไม่สะดวกที่อาจจะเกิดขึ้นแก่อาสาสมัคร
   การทดลองนี้จะไม่มีผลกระทบต่อตัวอาสาสมัครและไม่มีอันตรายใดๆ
10. การเข้าร่วมในการวิจัยครั้งนี้ไม่มีค่าใช้จ่ายใดๆทั้งสิ้น

11. กรณีที่ผู้ปกครองหรือตัวอาสาสมัครเอง ปฏิเสธไม่ให้ชิ้นส่วนของฟันตั้งแต่ยังไม่เริ่มทำ หรือหลังจากทำไปแล้ว ผู้วิจัยจะหยุดการวิจัยทันที
12. ผู้วิจัยจะเก็บข้อมูลเฉพาะเกี่ยวกับอาสาสมัครเป็นความลับ และจะเปิดเผยได้เฉพาะในรูปที่เป็นสรุปผลการวิจัย
13. หากท่านมีข้อสงสัย หรือผู้วิจัยไม่ปฏิบัติตามที่เขียนไว้ในเอกสารข้อมูล คำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในการวิจัย ท่านสามารถติดต่อหรือร้องเรียนได้ที่ ฝ่ายวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตึกสมเด็จย่า 93 ชั้น 10 หรือที่หมายเลขโทรศัพท์ 0-2218-8816 ในเวลาราชการ
14. ท่านสามารถยกเลิกการเข้าร่วมเป็นอาสาสมัครในโครงการนี้เมื่อใดก็ได้ โดยให้คุณพ่อคุณแม่ หรือผู้ปกครองของอาสาสมัครและส่งเอกสารขอยกเลิกมาที่
    ผู้วิจัย ทันตแพทย์หญิง ปิยะรัตน์ เกิดผล
    บ้านเลขที่ 70 ถ.พระราม 1 รองเมือง ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
15. อาสาสมัครสามารถติดต่อผู้วิจัยได้ตลอด 24 ชั่วโมง ที่:
    ผู้วิจัย ทันตแพทย์หญิง ปิยะรัตน์ เกิดผล เบอร์โทรศัพท์ 081-944-7775
    อาจารย์ที่ปรึกษา อ.ทพญ.ดร.วลีรัตน์ ศุกรวรรณ เบอร์โทรศัพท์ 02-218-8906

ภาควิชาทันตกรรมสำหรับเด็ก คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

.....

(ทันตแพทย์หญิง ปิยะรัตน์ เกิดผล)

ผู้วิจัยหลัก

วันที่...../...../.....

ภาคผนวก ง

เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมการวิจัยสำหรับผู้ปกครองของอาสาสมัครเด็ก

(Consent Form)

การวิจัยเรื่อง ผลของเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ต่อคุณสมบัติการเพิ่มจำนวนและการแสดงออกของยีนเร็กซ์-1 ของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันน้ำนมของมนุษย์ที่เพาะเลี้ยงระยะยาว

ข้าพเจ้า(นาย, นาง, นางสาว)…….....

มีความสัมพันธ์เป็น.....ของ(เด็กชาย ,เด็กหญิง).....

อยู่บ้านเลขที่.....ถนน.....ตำบล/แขวง..... .....

อำเภอ/เขต.....จังหวัด.....

รหัสไปรษณีย์.....

ก่อนที่จะลงนามในใบยินยอมให้ทำการวิจัยนี้ ข้าพเจ้าได้รับเอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับอาสาสมัครที่เข้าร่วมในการวิจัยแล้ว 1 ฉบับ รวมทั้งได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการทำวิจัย อันตรายหรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการทำวิจัยหรือจากยาที่ใช้ รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด และมีความเข้าใจดีแล้ว

ผู้วิจัยรับรองว่าจะตอบคำถามต่าง ๆ ที่ข้าพเจ้าสงสัยด้วยความเต็มใจไม่ปิดบังซ่อนเร้นจนข้าพเจ้าพอใจ

บุตรหลานของข้าพเจ้าเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้โดยสมัครใจ ข้าพเจ้าและบุตรหลานของข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะบอกเลิกการเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้เมื่อใดก็ได้และการบอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัยนี้จะไม่มีผลต่อการรักษาโรคที่บุตรหลานของข้าพเจ้าจะพึงได้รับต่อไป

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลเฉพาะเกี่ยวกับตัวบุตรหลานของข้าพเจ้าเป็นความลับ และจะเปิดเผยได้เฉพาะในรูปที่เป็นสรุปผลการวิจัย การเปิดเผยข้อมูลเกี่ยวกับตัวข้าพเจ้าต่อหน่วยงานต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกระทำได้เฉพาะกรณีจำเป็น ด้วยเหตุผลทางวิชาการเท่านั้น และผู้วิจัยรับรองว่าหากเกิดอันตรายใด ๆ จากการวิจัยดังกล่าว บุตรหลานของข้าพเจ้าจะได้รับการรักษาพยาบาลโดยไม่คิดมูลค่า

ข้าพเจ้าได้อ่านเอกสารและข้อความข้างต้นแล้ว มีความเข้าใจดีทุกประการ ข้าพเจ้ายินยอมให้บุตรหลานของข้าพเจ้าเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ และได้ลงนามในใบยินยอมนี้ด้วยความเต็มใจ

ข้าพเจ้าได้รับสำเนาเอกสารใบยินยอมที่ข้าพเจ้าลงนามและลงวันที่ และเอกสารยกเลิกการเข้าร่วมวิจัย อย่างละ 1 ฉบับ เป็นที่เรียบร้อยแล้ว

ลงนาม..... ผู้ยินยอม

(.....)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ลงนาม..... ..... พยาน

(.....)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ลงนาม..... ผู้วิจัยหลัก

(.....ทันตแพทย์หญิง..ปิยะรัตน์ เกิดผล.....)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้าไม่สามารถอ่านหนังสือได้ แต่ผู้วิจัยได้อ่านข้อความในใบยินยอมนี้ให้แก่ข้าพเจ้าฟังจนเข้าใจดีแล้ว ข้าพเจ้าจึงลงนาม หรือประทับลายนิ้วหัวแม่มือขวาของข้าพเจ้าในใบยินยอมนี้ด้วยความเต็มใจ

ลงนาม.....ผู้ยินยอม

(.....)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ลงนาม.....พยาน

(..... .)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ลงนาม.....ผู้วิจัยหลัก

(.....ทันตแพทย์หญิง..ปิยะรัตน์ เกิดผล.....)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ภาคผนวก จ

เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมการวิจัยสำหรับอาสาสมัครเด็กอายุ 7-12 ปี

(Assent Form)

ข้าพเจ้าชื่อ (เด็กหญิง, เด็กชาย).....

อยู่บ้านเลขที่.....ถนน.....ตำบล/แขวง.....

อำเภอ/เขต.....จังหวัด.....รหัสไปรษณีย์..... .

ข้าพเจ้าได้รับเชิญให้เข้าร่วมโครงการ วิจัยเรื่อง " ผลของเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ต่อคุณสมบัติการเพิ่มจำนวนและการแสดงออกของยีนเร็กซ์-1 ของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันน้ำนมของมนุษย์ที่เพาะเลี้ยงระยะยาว"

ซึ่งเป็นโครงการที่ศึกษาเกี่ยวกับสารชนิดหนึ่ง ชื่อว่า เบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ ต่อคุณสมบัติของเซลล์ของเนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนม โดยเนื้อเยื่อในฟันน้ำนมที่ได้จะถูกนำไปเพาะเลี้ยงขยายจำนวนเซลล์และทดลองในห้องทดลอง เนื่องจากข้าพเจ้ามีฟันน้ำนมที่ต้องถอนตามแผนการรักษาอยู่แล้ว ผู้วิจัยจึงขอเชิญให้ข้าพเจ้า เข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ สิ่งที่ผู้วิจัยจะทำกับข้าพเจ้าคือ ใส่ยาชา และถอนฟันตามปกติ และเก็บฟันน้ำนมไปทดลอง โครงการนี้ไม่มีผลกระทบต่อข้าพเจ้า และไม่ทำให้เกิดความเสี่ยงหรืออันตรายเพิ่มขึ้น

ผู้วิจัยได้ให้ข้าพเจ้าอ่านข้อมูลนี้อย่างละเอียดหรืออ่านข้อมูลนี้ให้ข้าพเจ้าฟัง พร้อมกับได้ให้โอกาสข้าพเจ้าได้ทบทวนข้อมูลเหล่านี้กับคุณพ่อคุณแม่หรือผู้ปกครองและซักถามจนได้ข้อมูลครบถ้วนแล้ว

ข้าพเจ้ามีสิทธิ์ที่จะเข้าร่วมโครงการ หรือจะปฏิเสธไม่เข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ก็ได้ โดยไม่มีใครบังคับ แม้ว่าผู้ปกครองหรือพ่อแม่จะให้เข้าร่วมโครงการนี้ก็ตาม และหาก ข้าพเจ้าเข้าร่วมโครงการนี้แล้วข้าพเจ้าก็มีสิทธิ์ที่จะบอกเลิกการเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้เมื่อใดก็ได้ ซึ่งการบอกเลิกการเข้าร่วมวิจัยนี้จะไม่มีผลต่อการศึกษาหรือการรักษาพยาบาลที่ข้าพเจ้าจะได้รับต่อไป ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลเฉพาะเกี่ยวกับตัวข้าพเจ้าเป็นความลับ และจะเปิดเผยได้เฉพาะในรูปที่เป็นสรุปผลการวิจัย

หากเกิดอันตรายใด ๆ หรือผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์จากการวิจัยขึ้นกับข้าพเจ้า ข้าพเจ้าจะได้รับการรักษาพยาบาลโดยไม่คิดค่าการรักษาพยาบาลใด ๆ

ข้าพเจ้าได้อ่านหรือฟังจนเข้าใจดีแล้ว และ ข้าพเจ้าเต็มใจเข้าร่วมโครงการนี้

(หมายเหตุ เอกสารชิ้นนี้จะไม่มีผลใดๆ หากบิดา มารดา หรือผู้ปกครองของเด็กไม่ลงนามยินยอมในเอกสารยินยอมให้เด็กเข้าร่วมโครงการวิจัย ต่างหากอีก 1 ฉบับ)

ลงนาม..... ผู้ยินยอม

(.....)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ลงนาม..... พยาน

(.....)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ลงนาม..... ผู้วิจัยหลัก

(.....ทันตแพทย์หญิง..ปิยะรัตน์ เกิดผล.....)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้าไม่สามารถอ่านหนังสือและเขียนได้ แต่ผู้วิจัยได้อ่านข้อความในใบยินยอมนี้ให้แก่ข้าพเจ้าฟังจนเข้าใจดีแล้ว ข้าพเจ้าจึงลงนาม หรือประทับลายนิ้วหัวแม่มือขวาของข้าพเจ้าในใบยินยอมนี้ด้วยความเต็มใจ

ลงนาม.....ผู้ยินยอม

(.....)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ลงนาม.....พยาน

(..... .)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ลงนาม.....ผู้วิจัยหลัก

(.....ทันตแพทย์หญิง..ปิยะรัตน์ เกิดผล.....)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ภาคผนวก ฉ

เอกสารยกเลิกการเข้าร่วมวิจัย (Withdrawal Form)

การวิจัยผลของเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ต่อคุณสมบัติการเพิ่มจำนวนและการแสดงออกของยีนเร็กซ์-1 ของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันน้ำนมของมนุษย์ที่เพาะเลี้ยงระยะยาว

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..ปิยะรัตน์ เกิดผล.....)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ. ....

ที่อยู่สำหรับส่งเอกสาร ชื่อ ....น.ส. ปิยะรัตน์ เกิดผล ....บ้านเลขที่.. 70.....ถนน... พระราม 1.. ตำบล/แขวง....รองเมือง….อำเภอ/เขต...ปทุมวัน.... จังหวัด... กรุงเทพฯ... รหัสไปรษณีย์... 10330..

หมายเหตุ - สำเนาเอกสารยกเลิกการเข้าร่วมวิจัย1 ชุด แล้วมอบให้อาสาสมัครแต่ละคน

ภาคผนวก ช
รายละเอียดการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ตารางที่ 6 การวิเคราะห์เปรียบเทียบการสร้างโคโลนีระหว่างรุ่นที่ 5 และรุ่นที่ 10 ของกลุ่มเซลล์ที่เติมเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ และกลุ่มควบคุม ด้วยสถิติ Independence sample t-test

Group Statistics

	Pgroup	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
CFUcontrol	Passage5	3	10.2000	5.85064	3.37787
	passage10	3	1.3333	1.20509	.69576
CFUbFGF	Passage5	3	39.3333	12.22020	7.05534
	passage10	3	10.0000	2.64575	1.52753

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
CFUcontrol	Equal variances assumed	2.460	.192	2.571	4	.062	8.86667	3.44878	-.70868	18.44201
	Equal variances not assumed			2.571	2.169	.114	8.86667	3.44878	-4.91534	22.64867
CFUbFGF	Equal variances assumed	4.475	.102	4.063	4	.015	29.33333	7.21880	9.29072	49.37594
	Equal variances not assumed			4.063	2.187	.048	29.33333	7.21880	.68555	57.98112

ตารางที่ 7 การวิเคราะห์เปรียบเทียบการสร้างโคโลนีระหว่างกลุ่มเซลล์ที่เติมเบสิก ไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ และกลุ่มควบคุม ในรุ่นที่ 5 และรุ่นที่ 10 ด้วยสถิติ Independence sample t-test

Group Statistics

	CtrlvsbFGFGroups	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
cfuP5	control	3	10.2000	5.85064	3.37787
	bFGF	3	39.3333	12.22020	7.05534
cfuP10	control	3	1.3333	1.20509	.69576
	bFGF	3	10.0000	2.64575	1.52753

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
cfuP5	Equal variances assumed	1.761	.255	-3.724	4	.020	-29.13333	7.82226	-50.85141	-7.41525
	Equal variances not assumed			-3.724	2.871	.036	-29.13333	7.82226	-54.67160	-3.59507
cfuP10	Equal variances assumed	2.925	.162	-5.163	4	.007	-8.66667	1.67851	-13.32697	-4.00636
	Equal variances not assumed			-5.163	2.796	.017	-8.66667	1.67851	-14.23634	-3.09700

ตารางที่ 8 การวิเคราะห์เปรียบเทียบ การแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ระหว่างรุ่นที่ 5 และรุ่นที่ 10 ของกลุ่มเซลล์ที่เติมเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ และกลุ่มควบคุม ด้วยสถิติ Independence sample t-test

Group Statistics

	Pgroup	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
MTT1daycontrol	Passage5	3	1.8161E4	3453.99831	1994.16685
	passage10	3	1.3821E4	744.88679	430.06059
MTT3dayscontrol	Passage5	3	2.7398E4	10601.46859	6120.76075
	passage10	3	1.6670E4	573.00465	330.82439
MTT7dayscontrol	Passage5	3	6.2683E4	24781.08111	14307.36385
	passage10	3	2.3575E4	8141.36944	4700.42184
MTT1daybFGF	Passage5	3	1.9106E4	1568.13020	905.36039
	passage10	3	1.5314E4	2231.72362	1288.48623
MTT3daysbFGF	Passage5	3	2.9377E4	9520.24438	5496.51565
	passage10	3	1.6670E4	573.00465	330.82439
MTT7daysbFGF	Passage5	3	6.4279E4	12934.01573	7467.45747
	passage10	3	2.5507E4	7196.76434	4155.05383

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
MTT1daycontrol	Equal variances assumed	2.620	.181	2.127	4	.100	4340.00000	2040.01313	-1323.98446	10003.98446
	Equal variances not assumed			2.127	2.186	.156	4340.00000	2040.01313	-3760.37590	12440.37590
MTT3dayscontrol	Equal variances assumed	10.953	.030	1.750	4	.155	10728.66667	6129.69468	-6290.09413	27747.42746
	Equal variances not assumed			1.750	2.012	.221	10728.66667	6129.69468	-15499.01431	36956.34764
MTT7dayscontrol	Equal variances assumed	4.249	.108	2.597	4	.060	39108.33333	15059.70205	-2704.10270	80920.76937
	Equal variances not assumed			2.597	2.427	.100	39108.33333	15059.70205	-15905.28841	94121.95508
MTT1daybFGF	Equal variances assumed	.374	.574	2.408	4	.074	3791.33333	1574.76164	-580.90591	8163.57258
	Equal variances not assumed			2.408	3.588	.081	3791.33333	1574.76164	-786.29797	8368.96464
MTT3daysbFGF	Equal variances assumed	5.023	.088	2.308	4	.082	12707.33333	5506.46249	-2581.05748	27995.72415
	Equal variances not assumed			2.308	2.014	.146	12707.33333	5506.46249	-10822.49835	36237.16502
MTT7daysbFGF	Equal variances assumed	.841	.411	4.537	4	.011	38772.00000	8545.60667	15045.59219	62498.40781
	Equal variances not assumed			4.537	3.130	.018	38772.00000	8545.60667	12204.46681	65339.53319

ตารางที่ 9 การวิเคราะห์เปรียบเทียบ การแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ ระหว่างกลุ่มเซลล์ที่เติมเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ และกลุ่มควบคุม ในรุ่นที่ 5 และรุ่นที่ 10 ด้วยสถิติ Independence sample t-test

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
mtt1dayP5	Equal variances assumed	1.017	.370	-.431	4	.689	-944.333	2190.064	-7024.925	5136.258
	Equal variances not assumed			-.431	2.791	.697	-944.333	2190.064	-8219.059	6330.392
mtt3daysP5	Equal variances assumed	.136	.731	-.241	4	.822	-1978.667	8226.506	-24819.108	20861.775
	Equal variances not assumed			-.241	3.955	.822	-1978.667	8226.506	-24922.918	20965.585
mtt7daysP5	Equal variances assumed	1.888	.241	-.099	4	.926	-1596.000	1.614E4	-46404.726	43212.726
	Equal variances not assumed			-.099	3.014	.927	-1596.000	1.614E4	-52818.864	49626.864
mtt1dayP10	Equal variances assumed	2.866	.166	-1.099	4	.333	-1493.000	1358.363	-5264.419	2278.419
	Equal variances not assumed			-1.099	2.440	.368	-1493.000	1358.363	-6434.952	3448.952
mtt3daysP10	Equal variances assumed	7.651	.051	-1.641	4	.176	-2165.000	1319.628	-5828.875	1498.875
	Equal variances not assumed			-1.641	2.267	.228	-2165.000	1319.628	-7247.753	2917.753
mtt7daysP10	Equal variances assumed	.124	.742	-.308	4	.773	-1932.333	6273.630	-19350.724	15486.057
	Equal variances not assumed			-.308	3.941	.774	-1932.333	6273.630	-19454.644	15589.977

ตารางที่ 10 การวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของอาร์เอ็นเอนำรหัส ของยีนเร็กซ์-1ระหว่างรุ่นที่ 5 และรุ่นที่ 10 ของกลุ่มเซลล์ที่เติมเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ และกลุ่มทดลองด้วยสถิติ Independence sample t-test

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
rex1contrl	Equal variances assumed	15.933	.016	.107	4	.920	.026969559	.251714943	-.671903162	.725842281
	Equal variances not assumed			.107	2.000	.924	.026969559	.251714943	-1.056072427	1.110011546
rex1bFGF	Equal variances assumed	.926	.390	.968	4	.388	.629406392	.650158119	-1.175721936	2.434534720
	Equal variances not assumed			.968	3.590	.394	.629406392	.650158119	-1.259975799	2.518788582

ตารางที่ 11 การวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของอาร์เอ็นเอนำรหัส ของยีนเร็กซ์-1 ระหว่างกลุ่มเซลล์ที่เติมเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ และกลุ่มควบคุม ในรุ่นที่ 5 และรุ่นที่ 10 ด้วยสถิติ Independence sample t-test

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
rex1passage5	Equal variances assumed	15.744	.017	-1.663	4	.172	-.884500719	.531757087	-2.360895080	.591893642
	Equal variances not assumed			-1.663	2.000	.238	-.884500719	.531757087	-3.172466800	1.403465363
rex1passage10	Equal variances assumed	1.148	.344	-.626	4	.566	-.282063886	.450888449	-1.533930913	.969803140
	Equal variances not assumed			-.626	3.503	.570	-.282063886	.450888449	-1.607193371	1.043065598

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวปิยะรัตน์ เกิดผล เกิดเมื่อวันที่ 10 ตุลาคม พ.ศ. 2525 ที่จังหวัดราชบุรี สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาทันตแพทยศาสตรบัณฑิต จากคณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อเดือนมีนาคม พ.ศ. 2549 ได้เข้ารับราชการตำแหน่งทันตแพทย์ ที่โรงพยาบาลเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดบุรีรัมย์ ตั้งแต่ปีพ.ศ. 2549-2551 จากนั้น เข้ารับราชการตำแหน่งทันตแพทย์ที่โรงพยาบาลห้วยพลู จังหวัดนครปฐม ตั้งแต่ปีพ.ศ. 2551-2555

ปัจจุบันศึกษาต่อในหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาทันตกรรมสำหรับเด็ก คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย