บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การทบทวนเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ประกอบด้วย 9 ส่วน คือ

1. ประวัติความเป็นมาของว่านหางจระเข้
2. คุณสมบัติของว่านหางจระเข้ในทางการแพทย์
3. สารสกัดส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้
4. การนำว่านหางจระเข้มาใช้ในทางทันตกรรม
5. กระบวนการสร้างเนื้อฟัน
6. บทบาทของ DMP1ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเนื้อฟัน
7. กระบวนการตรวจสอบการเพิ่มจำนวนเซลล์
8. กระบวนการวิเคราะห์การเพิ่มจำนวนเซลล์และความเป็นพิษของสารที่ทดสอบด้วยการใช้สารเอ็ม ที ที
9. กระบวนการตรวจสอบการแสดงออกของอาร์เอ็นเอนำรหัสของยีนด้วยเทคนิคอาร์ ที – พี ซี อาร์

1. ประวัติความเป็นมาของว่านหางจระเข้

ว่านหางจระเข้มีถิ่นกำเนิดในแถบอาฟริกาแต่ปัจจุบันพืชชนิดนี้สามารถพบได้ทั่วโลก มนุษย์ได้เริ่มมีการนำว่านหางจระเข้มาใช้เมื่อ 3 000 ปีมาแล้ว ชาวอียิปต์และชาวกรีกใช้ว่านหางจระเข้ช่วยในการหายของบาดแผลและรักษาการติดเชื้อของผิวหนัง ในอเมริกามีการนำว่านหางจระเข้มาใช้ครั้งแรกเพื่อเป็นยาระบาย ว่านหางจระเข้มีมากกว่า 240 สายพันธุ์ แต่มีเพียงสี่สายพันธุ์ ที่มีองค์ประกอบที่มีคุณค่าและหนึ่งในนั้นคือว่านหางจระเข้ที่มีชื่อทางพฤกษศาสตร์ ว่า Aloe barbadensis Mill มีชื่อพ้องคือ Aloe vera Linn เป็นพืชล้มลุกในวงศ์ Liliacease ซึ่งส่วนใบประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโน เอนไซม์ แร่ธาตุ และ วิตามิน สารสกัดจากส่วนใบของว่านหางจระเข้ สามารถแบ่งได้เป็น 2 ส่วน (Reynold and Dweck, 1999) ได้แก่

1. สารสกัดจากส่วนยาง (Exudate compounds) เป็นส่วนของเหลวสีเหลือง มีการศึกษาองค์ประกอบที่ได้จากส่วนยางของว่านหางจระเข้ราว 300 สายพันธุ์ เมื่อทำการแยกองค์ประกอบโดยวิธีโครมาโตกราฟฟี (chromatography) พบว่าองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นสารพวกฟีนอล อย่างไรก็ดียังคงมีสารประกอบที่ยังไม่สามารถจำแนกได้แน่ชัดอีกประมาณ 80 ชนิด

2. สารสกัดจากส่วนวุ้น (Gel compounds) ประกอบด้วยส่วนที่เป็นของแข็งประมาณ ร้อยละ 0.5 และส่วนที่เป็นน้ำ ร้อยละ 99.5 มีค่าความเป็นกรด ด่าง (pH) 4-5 ส่วนที่เป็นของแข็งประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต และโปรตีน ดังนี้

2.1 คาร์โบไฮเดรต อยู่ในรูปของโพลีแซคคาไรด์ ประกอบด้วย

2.1.1 Glucomannan เป็นสารประกอบของโพลีแซคคาไรด์มีองค์ประกอบคือน้ำตาลแมนโนสและกลูโคส ซึ่งพบได้น้อยในพืชชนิดอื่น Glucomannan มีคุณสมบัติคล้ายกับของเหลวในร่างกายมนุษย์ (human body fluid)

2.1.2 Acetylated mannan หรือ acemannan เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของน้ำตาลแมนโนส มีคุณสมบัติในการต่อต้านเชื้อไวรัส (antiviral properties) ต่อต้านการเจริญของเซลล์มะเร็ง กระตุ้นการสร้างคอลลาเจน และช่วยในการหายของแผล

2.2. โปรตีน ส่วนใหญ่อยู่ในรูปของไกลโคโปรตีน ได้แก่ lectin, aloctin A และ aloctin B ซึ่งเป็นสารสำคัญในการออกฤทธิ์สมานแผลและลดการอักเสบ aloctin A ยังเป็นสารซึ่งสามารถยับยั้งการสังเคราะห์ prostaglandin E_2 จาก arachidonic acid อีกด้วย

นอกจากนี้ยังมีส่วนประกอบอื่นที่มีรายงานว่าพบในส่วนประกอบของว่านหางจระเข้ คือเกลือแร่ ได้แก่ อลูมิเนียม โบรอน แบเรียม แคลเซียม เหล็ก แมงกานีส แมกนีเซียม โซเดียม ฟอสฟอรัส ซิลิคอน และ สตรอนเทียม สารประกอบอินทรีย์ที่มีรายงานการพบคือ สเตอรอล ได้แก่ ß-sitosterol

2. คุณสมบัติของว่านหางจระเข้ในทางการแพทย์

มีการศึกษาถึงคุณสมบัติของว่านหางจระเข้ในทางการแพทย์ในหลายแง่มุม โดยสามารถสรุปสาระสำคัญได้ดังนี้

2.1 คุณสมบัติช่วยในการหายของบาดแผล

ว่านหางจระเข้ช่วยในการหายของบาดแผลโดยมีผลต่อขบวนการซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่ได้รับบาดเจ็บ การศึกษาเริ่มแรกเกิดขึ้นในปี ค.ศ. 1930 โดยการเฝ้าสังเกตเกี่ยวกับการหายของแผลที่เกิดจากการไหม้บริเวณผิวหนังที่ได้รับการทาด้วยส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้ ในทางคลินิก แต่ไม่สามารถสรุปผลได้เนื่องจากขาดการควบคุมและความเกี่ยวพันของเหตุและผลไม่มีความแน่นอน (Grindlay and Reynolds, 1986) จากการศึกษาของ Rowet ในปี ค.ศ. 1940 พบว่าบาดแผลที่เกิดจากรังสีบริเวณส่วนหลังของหนูทดลองหายดีขึ้นเมื่อได้รับการทาด้วยส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้ (Rowet, 1940)

ขบวนการซ่อมแซมบาดแผลเป็นขบวนการที่ซับซ้อน แผลที่ผิวหนังจะผ่านชั้นของผิวหนัง 2 ชั้นคือ ชั้นผิวหนัง (epidermis) และชั้นใต้ผิวหนัง (dermis) การซ่อมแซมบาดแผลชั่วคราวเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นโดยการแข็งตัวของไฟบริน (fibrin clot) ซึ่งมีเซลล์หลายชนิดเข้ามามีบทบาทร่วมด้วย โดยเซลล์เหล่านี้จะทำให้เกิดการตอบสนองแบบการอักเสบ และนำไปสู่การซ่อมแซมแบบถาวร (Martin, 1997) ซึ่งการซ่อมแซมแบบถาวรที่ชั้นผิวหนังมี 3 ขั้นตอน ได้แก่ การเคลื่อนของเซลล์มายังบริเวณที่มีบาดแผล (migration of cells) การเพิ่มจำนวนเซลล์ (proliferation) และการเจริญเติบโตเต็มวัย (maturation) ในขณะที่การสร้างเนื้อเยื่อเกี่ยวพันใหม่พบในชั้นใต้ผิวหนัง (Davis et al., 1987)

จากการศึกษาโดยการทาส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้ลงไปบนแผลจากการผ่าตัดพบว่า ช่วยให้เกิดการหายของแผลเร็วขึ้น แต่จะไม่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะสุดท้ายของการหายของบาดแผล (Golf and Levenstein, 1964) ส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้ช่วยเร่งการสร้างคอลลาเจนให้สมบูรณ์ โดยเพิ่มการสร้างคอลลาเจนทดแทนส่วนที่ได้ถูกทำลายไป จากการศึกษาของ Davis และคณะในปี ค.ศ. 1989 พบว่าว่านหางจระเข้ให้ผลที่ดีในการสร้างคอลลาเจนทั้งจากการรับประทานและการใช้ทาเฉพาะที่ (Davis et al., 1989) นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ว่านหางจระเข้รักษาแผลในหนูทดลองที่เป็นโรคเบาหวาน

ซึ่งเป็นโรคที่มีการหายของแผลช้ากว่าปกติ พบว่าช่วยส่งเสริมขบวนการที่เกี่ยวข้องกับการหายของบาดแผล ได้แก่ ขบวนการอักเสบ การเพิ่มจำนวนของเส้นใย การสังเคราะห์คอลลาเจน และการหดตัวของบาดแผล ซึ่งขบวนการเหล่านี้มีความเกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมของเนื้อเยื่อในบริเวณที่บาดเจ็บ (Chithra et al., 1998b)

การศึกษาถึงผลของสารสกัดอย่างหยาบจากส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้ พบว่ามีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อเหงือก เซลล์สร้างเส้นใยจากเอ็นยึดปริทันต์ และเซลล์สร้างเส้นใยของเนื้อเยื่อในโพรงฟัน เมื่อตรวจวัดด้วยสารเอ็ม ที ที (พสุธา ธัญญะกิจไพศาล และคณะ, 2547) แต่ไม่มีผลต่อเซลล์ไลน์ที่สร้างเคอราติน ในขณะที่สารสกัดจากส่วนยางมีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ไลน์ที่สร้างเคอราติน (พสุธา ธัญญะกิจไพศาล และคณะ, 2545) จากการศึกษาเหล่านี้เสนอแนะว่าส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้ช่วยในการหายของบาดแผล อย่างน้อยโดยการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการหายของบาดแผล

2.2 คุณสมบัติในการยับยั้งขบวนการอักเสบ

การศึกษาที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบมีความต้องการศึกษาในสองรูปแบบ รูปแบบแรกเป็นการศึกษาเกี่ยวกับในเชิงวิเคราะห์ เกี่ยวกับคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพ ในรูปแบบที่สอง เป็นการศึกษาในทางคลินิก การศึกษาในหนูทดลองพบว่าการบวมจากการอักเสบที่เกิดจากการได้รับสารระคายเคืองลดลงเมื่อทาด้วยส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้ (Davis, Leitner and Russo, 1987) โดยพบว่าส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้ช่วยลดการบวมหลังจากการใช้มัสตาด (Mustard) ซึ่งเป็นสารระคายเคืองที่ทำให้เกิดการบวมบริเวณอุ้งเท้าหนูทดลอง ลดลงได้ร้อยละ 44.5 ถึง ร้อยละ 70 นอกจากนี้การอักเสบบริเวณหูของหนูทดลองที่ได้รับการทาด้วยน้ำมันโกสน (croton oil) ลดลงถึง ร้อยละ 67 ภายหลังจากได้รับการทาด้วยส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้ (Davis et al.,1987b) ในอีกหนึ่งการศึกษาถึงกลไกในการลดการอักเสบ โดยได้มีการทดสอบผลของส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้โดยวิธีการทาไปยังบริเวณที่มีการอักเสบที่เกิดจากสาเหตุต่างๆ เปรียบเทียบกับการฉีดไปยังบริเวณที่อักเสบ พบว่าส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้ช่วยบรรเทาผลจากการอักเสบโดยการส่งยับยั้งการสร้างสารพรอสตาแกลนดิน (prostaglandin) และลดการแทรกซึมของเม็ดเลือดขาว (Davis et al.,1989a)

การศึกษาโดยการฉีดอากาศเข้าใต้ผิวหนังของหนูทดลองและให้สารที่ก่อความระคายเคืองทำให้เกิดลักษณะคล้ายโรคข้ออักเสบในหนูทดลอง พบว่าส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้มีฤทธิ์ในการรักษาโดยการกระตุ้นเซลล์สร้างเส้นใยและยับยั้งขบวนการอักเสบและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Davis, Stewart and Bregman, 1992)

2.3 คุณสมบัติในการต่อต้านการเกิดมะเร็ง

มีการศึกษาเกี่ยวกับระบาดวิทยาของการเกิดโรคมะเร็งที่ปอดและการสูบบุหรี่ในประเทศญี่ปุ่นพบว่าการรับประทานน้ำที่สกัดมาจากส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้ช่วยป้องกันการเกิดมะเร็งที่ปอดและช่วยป้องกันมะเร็งในกระเพาะอาหารและลำไส้ใหญ่อีกด้วย (Sakai,1989) คุณสมบัตินี้มาจากองค์ประกอบที่สำคัญสองชนิดในใบของว่านหางจระเข้ ได้แก่ ไกลโคโปรทีน (glycoprotein) ชนิดเลคติน (lectin) และส่วนของโพลีแซคคาไรด์ โดยสารสกัดจากส่วนว่านหางจระเข้ที่มีคุณสมบัติคล้ายเลคตินนั้นช่วยส่งเสริมการตกตะกอนของเม็ดเลือด (haemoagglutinating) และสารสกัดจากส่วนใบที่เตรียมมาใหม่ๆ จะสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ปกติและช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ (Winters et al., 1981) ในส่วนของโพลีแซคคาไรด์ ส่งผลต่อเซลล์มะเร็งโดยตรงด้วยการลดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง การสร้างเส้นใยเกี่ยวพันล้อมรอบมะเร็งในลักษณะเป็นแคปซูล รวมถึงการทำให้เกิดการตายของมะเร็งในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Merriam et al.,1996) และยังส่งผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายโดยกระตุ้นการทำงานของแมคโครฟาจ (macrophage) ซึ่งจะตรวจสอบเซลล์แปลกปลอมและกำจัดเซลล์มะเร็ง (Zhang and Tizard, 1996)

นอกจากนี้ยังพบคุณสมบัติอื่นของว่านหางจระเข้ได้แก่ การรักษาความผิดปกติของการทำงาน และแผลของระบบทางเดินอาหาร การต่อต้านการเกิดเบาหวาน การต่อต้านเชื้อจุลชีพต่างๆได้แก่ เชื้อรา เชื้อแบคทีเรียและเชื้อไวรัส การรักษาในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV การนำมาใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารและเครื่องสำอาง การนำมาใช้เป็นยาระบาย เป็นต้น (Gottlieb, 1983; Reynold and Dweck, 1999)

3. สารสกัดส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้

สารสกัดส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้ ในส่วนที่มีผลทางชีวภาพที่ได้มีการรายงานไว้มาจากส่วนประกอบที่เป็นคาร์โบไฮเดรตในกลุ่มของโพลีแซคคาไรด์ จากการศึกษาของ Ni และคณะในปี ค.ศ. 2004 พบว่า องค์ประกอบที่สำคัญในส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้ เป็นของเหลวที่มี acemannan เป็นองค์ประกอบที่สำคัญ ซึ่งเป็นโพลีแซคคาไรด์ที่สามารถละลายน้ำได้และเป็นส่วนที่มีคุณสมบัติหนืดและยืดหยุ่น (viscoelastic property) โดยทั่วไป องค์ประกอบของส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้ประกอบด้วยส่วนที่เป็นน้ำ มากกว่าร้อยละ 98 เมื่อทำการตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 95 และ ทำให้แห้งจะสามารถแยกองค์ประกอบที่เป็นของแข็ง พบว่าองค์ประกอบที่เป็นของแข็งมีโพลีแซคคาไรด์ชนิด acemannan เป็นองค์ประกอบที่สำคัญมากกว่าร้อยละ 60 โดยเมื่อนำส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้มาผ่านกระบวนการตกตะกอนด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง (centrifuge) ความเร็วสูง ส่วนของเหลวใสที่ได้คือส่วนของเหลวที่เป็นองค์ประกอบของส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้ และเมื่อนำไปตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ จะสามารถแยกได้เป็นส่วนที่สามารถละลายได้ในแอลกอฮอล์ และส่วนที่ไม่สามารถละลายได้ในแอลกอฮอล์ ส่วนที่ไม่สามารถละลายได้ในแอลกอฮอล์จะถูกทำให้เป็นผงแห้งและละลายน้ำเพื่อทำให้เป็นสารละลายเพื่อใช้ประโยชน์ต่อไป (Ni, Yates and Tizard, 2004) วิธีการที่ใช้ในขบวนการสกัดสารจากส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้ต้องพยายามรักษาส่วนของโพลีแซคคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในส่วนวุ้นไว้ โดยทั่วไปโพลีแซคคาไรด์มักถูกทำให้เปลี่ยนรูปเมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม ได้แก่ สภาวะที่มีความร้อน สภาวะที่เป็นกรด และสภาวะที่มีเอนไซม์บางตัว เช่น cellulase, mannannase ในขบวนการสกัดสารที่เป็นองค์ประกอบของส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้มักจะต้องผ่านความร้อน เอนไซม์ และการกรอง ซึ่งนำไปสู่การทำลายองค์ประกอบที่เป็นสารโพลีแซคคาไรด์ออกไป กรรมวิธีการสกัดที่ได้รักษาส่วนโพลีแซคคาไรด์เอาไว้เป็นการรักษาคุณสมบัติทางชีวภาพที่เป็นประโยชน์ของส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้เอาไว้ได้ (Turner et al., 2004)

4. การนำว่านหางจระเข้มาใช้ในทางทันตกรรม

มีการศึกษาของ Brasher, Zimmermann และ Collings ในปี ค.ศ.1969 เปรียบเทียบส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้กับ prednisolone และ indomethacin ซึ่งเป็นสารที่

นำมาใช้รักษาแผลในช่องปาก พบว่าส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้มีความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงทางห้องปฏิบัติการน้อยกว่า prednisolone และ indomethacin (Brasher , Zimmermann และ Collings, 1969) ในแง่ของการนำมาใช้เพื่อรักษาแผลในช่องปาก พบว่าการใช้ส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้เป็นส่วนประกอบร่วมกับ silicon dioxide และ allatoin ให้ผลดีในการรักษาแผลร้อนใน (Aphthous ulcer) (Garnick, Singh and Winkey, 1998) และพบว่าสารจำพวกคาร์โบไฮเดรตชนิด acemannan ของว่านหางจระเข้ช่วยลดอุบัติการณ์การเกิดการอักเสบของกระดูกเบ้าฟัน (alveolar osteitis) ที่มีโอกาสเกิดขึ้นได้ภายหลังจากการถอนฟัน (Poor, Hall and Poor, 2002)

ในทางทันตกรรมประดิษฐ์ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับประสิทธิภาพของสาร acemannan ในแง่ของการนำมาใช้เป็นสารช่วยยึดและลดการระคายเคือง (Denture adhesive) ในผู้ป่วยที่ใส่ฟันปลอม พบว่ามีคุณสมบัติความไม่เป็นพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใยของเนื้อเยื่อเหงือก ทั้งยังเพิ่มแรงในการยึดเกาะ (Adhesive bond strength) และง่ายต่อการทำความสะอาด ทำให้ เป็นสารที่น่าสนใจที่จะนำมาใช้เพื่อพัฒนาเป็นสารช่วยยึด และลดการระคายเคืองในผู้ป่วยที่ใส่ฟันปลอม (DeVengencie et al., 1997; Tello, Ford and Iacopino, 1998)

5. กระบวนการสร้างเนื้อฟัน

กระบวนการสร้างเนื้อฟันเริ่มต้นมาจากเซลล์สร้างเนื้อฟัน ซึ่งเป็นเซลล์ที่พัฒนาการมาจากเอกโตเมสเซนไคมอลเซลล์ (ectomesenchymal cell) เซลล์สร้างเนื้อฟันที่มีพัฒนาการเต็มที่ มีรูปร่างสูงยาว 50-60 ไมโครเมตร และสามารถแบ่งได้เป็น 2 ส่วน ได้แก่ ส่วนของ odontoblast cell body และ odontoblastic process โดยเซลล์สร้างเนื้อฟันจะมีการเรียงตัวเป็นชั้นเดียว เมื่อมีการสร้างส่วนของเนื้อฟัน odontoblast cell body จะถอยร่นไปทางด้านในส่วนโพรงฟัน แต่ odontoblastic process จะยังคงฝังอยู่ในชั้นของเนื้อฟัน เซลล์สร้างเนื้อฟันจะมีการหลั่งสารที่มีบทบาททำให้เนื้อฟันมีความแข็ง (dentin matrix) เป็นสารอินทรีย์ประกอบด้วย คอลลาเจน (collagen) กลุ่มโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจน (noncollagenous protein) ฟอสโฟไลปิด (phospholipid) และโกรทแฟคเตอร์ (growth factor)

ฟอสโฟโปรตีน (Phosphoprotein) ในเนื้อฟันเป็นกลุ่มโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในกลุ่มโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจน โดยประกอบไปด้วยโปรตีนหลัก 3

ชนิดได้แก่ Dentin phosphophoryn, Dentin sialoprotein และ DMP1 ประจุฟอสเฟสที่พบในโปรตีนกลุ่มนี้สามารถจับกับประจุของแคลเซียม ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของขบวนการสร้างผลึก ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (hydroxyapatite) นอกจากนี้ยังมีการเชื่อมกันระหว่างกลุ่ม dentin phosphophoryn กับเส้นใยคอลลาเจนนำไปสู่การสะสมแร่ธาตุตามความยาวของเส้นใยคอลลาเจน ร่วมกับการตกตะกอนของแคลเซีย สารอินทรีย์และสารอนินทรีย์อื่นๆ นำไปสู่การสร้างผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ให้เกิด แข็งแรงในชั้นเนื้อฟัน (Garant PR, 2003) เนื้อฟันชั้นแรกที่มีการสร้างเรียกว่า แมนเดนทีน (mantle dentin) หรือเนื้อฟันปฐมภูมิ (primary dentin) เมื่อมีภย เกิดขึ้นเล็กน้อยเช่น การเกิดฟันผุตื้นๆ ฟันสึก เซลล์สร้างเนื้อฟันจะถูกกระตุ้นให้มีการทำหน้าที่จากสัญญาณที่ส่งมาจากเนื้อฟันในช่วงที่มีการถูกทำลาย สัญญาณเหล่านี้ได้แก่ Transfroming Growth factor –beta 1 (TGF-ß1), Bone Mprphogenic Protein -2 (BMP-2) เพื่อให้มีการสร้างเนื้อฟันชั้นทุติยภูมิ (secondary dentin) เพื่อปกป้องตนเอง แต่ในกรณีที่มีการทำลายของเนื้อฟันที่รุนแรงมากขึ้นเช่น ฟันที่ผุลึกๆ จะนำไปสู่การทำลายเซลล์สร้างเนื้อฟัน ในกรณีเช่นนี้จะมีเซลล์ชนิดอื่นของเนื้อเยื่อในโพรงฟันที่จะมีการเปลี่ยนแปลงเพื่อทำหน้าที่เป็นเซลล์ที่คล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟัน ในการสร้างเนื้อฟันตติยภูมิ (tertiary dentin) หรือเนื้อฟันซ่อมสร้าง (reparative dentin) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า เซลล์สร้างเส้นใยของเนื้อเยื่อในโพรงฟัน เป็นเซลล์อีกชนิดหนึ่งที่มีการเปลี่ยนแปลงเพื่อทำหน้าที่เป็นเซลล์ที่คล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟัน (Fitzerald , Chiego and Heys, 1990; Tziafas et al., 2000) เพื่อทำหน้าที่ในการสร้างส่วนของเนื้อฟันซ่อมสร้าง

6. บทบาทของ DMP1ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเนื้อฟัน

DMP1 เป็นฟอสโฟโปรตีน เช่นเดียวกับโปรตีน Dentin sialophosphoprotein, Osteopontin, Bone sialoprotein, Osteonectin, Osteocalcin ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีหน้าที่เกี่ยวกับการตกตะกอนแคลเซียม โดยควบคุมขนาดและรูปร่างของผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ จึงทำให้เชื่อว่า DMP1 มีหน้าที่ทางชีวโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเนื้อเยื่อแข็งของกระดูกและการพัฒนาของฟัน (George et al., 1994 ;Hao et al., 2002) จากการศึกษาของ Narayanan และคณะ ในปี ค.ศ. 2001 พบว่าการเพิ่มการแสดงออก (over expression) ของ DMP1 จะสามารถเหนี่ยวนำเซลล์ C3H10T1/2 MC3T3-E1 และ RPC-

C2A ซึ่งเปลี่ยนแปลงมาจากเมสเซนไคมอลเซลล์ (mesenchymal cell) ให้มีการเพิ่มการแสดงออกของยีน Dentin sialophosphoprotein ซึ่งเป็นยีนเฉพาะของเซลล์สร้างเนื้อฟันที่พบในขบวนการตกตะกอนของแคลเซียม ซึ่งแสดงถึงการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟันได้ (Narayanan et al., 2001) ในส่วนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเนื้อฟัน พบมีการแสดงออกของยีน DMP1ในช่วงท้ายของการสร้างหน่อฟัน (late bud stage) และระดับการแสดงออกของยีนจะเพิ่มมากขึ้น จนถึงช่วงที่เริ่มมีการสร้างผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ หลังจากนั้นระดับการแสดงออกของยีน DMP1 จะลดลงเมื่อมีการตกตะกอน ดังนั้น DMP1จึงน่าจะมีบทบาทสำคัญต่อเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์สร้างเนื้อฟันที่สมบูรณ์ (terminal differentiation) (D'Souza et al., 1997) ซึ่งจากการศึกษาในห้องปฏิบัติการของ He และคณะในปี ค.ศ.2003 พบว่า DMP1 มีบทบาทในการทำหน้าที่เป็นจุดศูนย์กลางเริ่มต้น (nucleator) สำหรับการตกตะกอนของผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ (He et al., 2003) ตำแหน่งของยีน DMP1ในมนุษย์พบอยู่ที่โครโมโซม 4q21 มีความยาว 2,640 คู่เบส ส่วนในหนูพบอยู่ที่โครโมโซม 5q21 (Aphin et al., 1995) DMP1เป็นโปรตีนที่พบเฉพาะในกระดูกและฟัน โดยพบอยู่ในตำแหน่งเดียวกันกับ Dentin sialophosphoprotein ซึ่งเป็นโปรตีนที่เฉพาะของเซลล์สร้างเนื้อฟัน (McDougall, 1998) จากการศึกษาของ Ball และคณะ ในปี ค.ศ.1982 Crosby และคณะ ในปี ค.ศ. 1995 MacDougall และคณะ ในปี ค.ศ.1999 และ Thoyakura และคณะ ในปี ค.ศ. 2000 พบว่ามีความผิดปกติของกลุ่มยีนที่อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 4 ในช่วงตำแหน่งที่ q12-21 ในผู้ป่วยที่เป็น Dentinogenesis Imperfecta (DI) โดยกลุ่มยีนที่อยู่ในช่วงดังกล่าวเป็นกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารนอกเซลล์ (extracellular matrix) เช่น Bone sialoprotein, Osteopontin และ DMP1 (Ball et al., 1982 cited in Thotakura, 2000; Crosby et al., 1995; MacDougall et al., 1999)

จากการที่เซลล์สร้างเส้นใยของเนื้อเยื่อในโพรงฟันเป็นเซลล์ที่สามารถเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์สร้างเนื้อฟันจึงถูกนำมาศึกษาถึงการเพิ่มจำนวนและการแสดงออกของยีน DMP1 ที่มีความเกี่ยวข้องกับเซลล์สร้างเนื้อฟัน รวมทั้งเพื่อเป็นตัวแทนเซลล์สร้างเนื้อฟันในการศึกษาทางห้องปฏิบัติการในครั้งนี้

7. กระบวนการตรวจสอบการเป็นพิษและการเพิ่มจำนวนเซลล์

การทดสอบคุณสมบัติของสารเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญต่อการนำสารไปใช้ในทางคลินิก การทดสอบที่เป็นส่วนสำคัญสำหรับการพิจารณาความเป็นไปได้ในการนำสารแต่ละชนิดไปใช้กับมนุษย์คือ การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) และความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatibility) ของสารนั้นๆกับเซลล์เนื้อเยื่อของมนุษย์ การทดสอบมีวิธีการหลายอย่างขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่กำลังศึกษา ลักษณะของการตอบสนองต่อสารนั้น และ ลักษณะเฉพาะของเซลล์ที่ทำการทดสอบ โดยทั่วไปสามารถแบ่งวิธีการทดสอบได้ 5 ลำดับขั้น ได้แก่ (Freshney, 2000)

7.1 การทดสอบความมีชีวิต (viability) เป็นการศึกษาการตอบสนองในช่วงเวลาสั้นๆ เช่น การเปลี่ยนแปลงของความสามารถในการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ เช่น การย้อมสีเซลล์ด้วนสีทริแพนบลู (trypan blue) การวัดการเรืองแสงบนเซลล์ที่ได้รับสาร diacetyl fluorescein

7.2 ความสามารถในการอยู่รอดได้ (survival) เป็นการศึกษาในระยะยาวถึงความสามารถในการรอดชีวิตและสามารถเกิดรุ่นใหม่ในช่วงระยะเวลา 5-10 รุ่นหรือมากกว่า เช่น การวิเคราะห์ด้วยวิธีโคลโนจินิก (clonogenic assay)

7.3 การเปลี่ยนแปลงกระบวนการสร้างและสลายในร่างกาย (metabolic) เป็นวิธีการศึกษาในช่วงระยะเวลาหนึ่งที่สามารถวัดผลการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการสร้างและสลายเพื่อให้เกิดพลังงานในร่างกาย ได้แก่ การวัดหาปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการหายใจระดับเซลล์ การสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ ดีเอ็นเอ และโปรตีน เช่น การวิเคราะห์ด้วยสารเอ็ม ที ที (MTT assay)

7.4 การแปลงรูปของเซลล์ (transformation) เป็นการดำรงชีวิตอยู่ต่อไปได้โดยมีการเปลี่ยนแปลงรูปไปจากเดิม เช่น ภาวะที่มีการผ่าเหล่าของยีนจนเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์มะเร็ง การวิเคราะห์ในขั้นนี้ได้แก่วิธีการซิสเทอร์โครมาติดเอ็กซเชนจ์ (sister chromatid exchanges, SCEs)

7.5 การตอบสนองต่อการระคายเคือง (irritancy) เป็นการศึกษาถึงการตอบสนองที่เกิดขึ้นจากการอักเสบ การแพ้ หรือสิ่งที่ก่อให้เกิดการระคายเคืองต่างๆที่เหมือนกับการตอบสนองที่เกิดในสัตว์ทดลอง แต่เป็นการศึกษาในห้องปฏิบัติการโดยจำลองสภาวะและควบคุมการหลั่งของไซโตไคน์ (cytokine) ของเนื้อเยื่ออวัยวะที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ เช่น การวิเคราะห์ด้วยวิธีการออกาโนไทพิค (organotypic assay)

ในกรณีการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ การใช้เซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อทดสอบในห้องปฏิบัติการ จัดเป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับและใช้กันอย่างแพร่หลาย โดยเซลล์จะถูกเลี้ยงในสภาวะที่มีสารทดสอบในห้องปฏิบัติการในระยะเวลาที่กำหนด จากนั้นทำการวัดผลโดยหาปริมาณเซลล์ที่ตายหรือเซลล์ที่มีชีวิตอยู่หลังจากเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีสารทดสอบ (กนกวรรณ จรูญภัทรพงษ์ และ เกษรา ปัทมพันธุ์, 2543) ในการศึกษาครั้งนี้ทำการวัดปริมาณเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่โดยการวัดหาปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการหายใจระดับเซลล์จากเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase enzyme) ของเซลล์ที่ยังมีชีวิตโดยการวิเคราะห์ด้วยสารเอ็ม ที ที

8. กระบวนการวิเคราะห์การเพิ่มจำนวนเซลล์และความเป็นพิษของสารที่ทดสอบด้วยการใช้สารเอ็ม ที ที (MTT assay)

วิธีวิเคราะห์นี้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Freshney (Freshney, 2000) เป็นการวัดจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตด้วยสารเอ็มที ที อาศัยหลักการตรวจวัดระดับของเอนไซม์ดีไฮโดรจิเนสที่พบอยู่ในไมโตรคอนเดรีย (mitochondria dehydrogenase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในขบวนการหายใจ โดยเอนไซม์นี้จะเปลี่ยนเกลือเตตระโซเลียม (tetrazolium salt) ในสารเอ็ม ที ที เป็นผลึกฟอร์มาแซน (formazan) สีม่วง ซึ่งเมื่อนำไปละลายด้วยสารละลายที่เหมาะสม เช่น สารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide, DMSO) ก็จะสามารถนำไปวัดหาปริมาณเซลล์ได้ ถ้าเซลล์มีจำนวนมาก สีม่วงของสารละลายผลึกฟอร์มาแซนก็จะมีความเข้มมากขึ้น และทำให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงมากขึ้น ซึ่งวิธีนี้สามารถนำไปใช้วัดในแง่การเพิ่มจำนวนเซลล์และการตรวจสอบวัดความเป็นพิษกับสารที่ใช้ทดลอง

9. กระบวนการตรวจสอบการแสดงออกของอาร์เอ็นเอนำรหัสของยีนด้วยเทคนิคอาร์ที – พีซีอาร์ (RT- PCR)

เทคนิคอาร์ ที - พี ซี อาร์ มีความไวในการตรวจหาการแสดงออกของอาร์เอ็นเอนำรหัสที่ค่อนข้างสูง สามารถตรวจอาร์เอ็นเอนำรหัสในปริมาณอาร์เอ็นเอทั้งหมดที่มีปริมาณน้อยๆ หลักการของเทคนิคนี้คือ การเปลี่ยนอาร์เอ็นเอนำรหัสไปเป็นคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอ หรือ ซีดีเอ็นเอ (complementary DNA, cDNA) โดยกระบวนการรีเวิร์สทรานสคริปชั่น หรือ อาร์ ที (Reverse transcription, RT) ด้วยเอ็นไซม์รีเวิร์สทรานสคริพเตส (Reverse Transcriptase) โดยใช้สายนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) สั้นๆ ที่เรียกว่า ไพร์มเมอร์ (primer) ที่เฉพาะสำหรับยีนที่ต้องการศึกษา หรือใช้โอลิโกดีที (Oligo dT) ซึ่งเป็นสายนิวคลีโอไทด์ยาวประมาณ 16-18 ตัวที่ประกอบด้วยเบสไธมิดีน (thymidine, T) อย่างเดียวในการเป็นตัวนำสำหรับเริ่มขบวนการทรานสคริพชั่นในทิศทางย้อนกลับ (reverse transcription) การใช้โอลิโกดีที มาจากหลักการที่ว่าอาร์เอ็นเอนำรหัสทุกตัวของเซลล์ยูคาริโอต์ (eukaryotic cells) จะมีปลายทางด้านท้ายเป็นโพลิเอเทล (poly A tail) คือประกอบด้วยเบสอะดินีน (adenine, A) เรียงต่อกันอยู่หลายตัว ซึ่งเป็นลักษณะที่พบเฉพาะสำหรับอาร์เอ็นเอนำรหัส ดังนั้นเมื่อใส่โอลิโกดีทีเข้าไปในปฏิกิริยาก็จะจับกับโพลิเอเทลของอาร์เอ็นเอนำรหัสทุกชนิด จึงทำให้เกิดการสร้างซีดีเอ็นเอที่มีต้นแบบมาจากอาร์เอ็นเอนำรหัสทุกชนิดที่มีการแสดงออกในขณะนั้น หลังจากนั้นก็ใช้หลักการของ โพลีเมอเรสเชนรีแอคชั่น (Polymerase chain reaction, PCR) หรือพี ซี อาร์ เข้ามาเพิ่มขยายจำนวนซีดีเอ็นเอ โดยใช้เอ็นไซม์แท็คดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (Taq DNA Polymerase) จนสามารถตรวจวัดแถบของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากขบวนการพีซีอาร์ (PCR product) บนวุ้นอะกาโรสด้วยการย้อมด้วยสีย้อมเอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide) หรือไซเบอร์กรีน (SYBRGreen) และรังสีอัลตร้าไวโอเลต (ultraviolet) เพื่อวัดการแสดงออกของยีนโดยการวัดที่ความเข้มของแถบ ดีเอ็นเอด้วยเครื่องเดนซิโตมิเตอร์ (Densitometer) (สุทธิชัย กฤษณะประกรกิจ, 2546) โดยทำการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนที่สนใจ กับยีน GAPDH (Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase) ซึ่งเป็นยีนที่ใช้เป็นตัวควบคุมภายใน

เนื่องจากในขบวนการ อาร์ ที- พี ซี อาร์ เริ่มด้วยปริมาณของสารในตัวอย่างแต่ละกลุ่มที่แตกต่างกัน ซึ่งอาจทำให้เกิดการแปลผลที่ได้จากขบวนการอาร์ ที- พี ซี อาร์ ที่ผิด

ไป ดังนั้นจึงต้องมียีน GAPDH เป็นตัวควบคุมภายใน โดยยีน GAPDH เป็นยีนของเอนไซม์ที่พบในขบวนการไกลโคไลซิส (glycolysis) ซึ่งเป็นขบวนการที่พบได้ทุกเซลล์ของสิ่งมีชีวิต นอกจากยีนGAPDH ที่ใช้เป็นตัวควบคุมภายในของขบวนการอาร์ ที- พี ซี อาร์ แล้ว ยังมีการใช้อาร์เอ็นเอนำรหัสของ ß-actin และ ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (rRNA)เป็นตัวควบคุมภายในได้อีกด้วย สำหรับ histone H-3 และcyclophilin ก็มีการใช้มาเป็นตัวควบคุมภายในแต่ไม่ได้มีการใช้อย่างแพร่หลาย ลักษณะของตัวควบคุมภายในที่ดีควรมีการแสดงออกในระดับคงที่ในเนื้อเยื่อทุกชนิด ทุกพัฒนาการ และไม่ได้รับการเปลี่ยนแปลงจากกระบวนการทดลองที่ทำ (Bustin, 2000)