

การศึกษาความสามารถในการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง
ของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงพินน้านมของผู้ป่วย คาวาน์ ซินโดรม



นางสาว อรุณช เตชธรราทิพย์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาทันตกรรมสำหรับเด็ก ภาควิชาทันตกรรมสำหรับเด็ก

คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHARACTERIZATION OF OSTEOGENIC DIFFERENTIATION OF
DECIDUOUS DENTAL PULP CELLS FROM DOWN SYNDROME PATIENTS

Miss Oranuch Techatharatip



ศูนย์วิทยุทันตกรรม
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

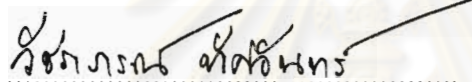
Chulalongkorn University

Academic Year 2010

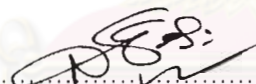
Copyright of Chulalongkorn University


หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาความสามารถในการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงพินน้านมของผู้ป่วย ดาวน์ซินโดรม
โดย	นางสาว อรุณช เตชธรราทิพย์
สาขาวิชา	ทันตกรรมสำหรับเด็ก
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร. ทิพวรรณ ธราภิวัฒน์นานนท์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร. ประสิทธิ์ ภาวสันต์

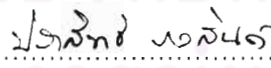
คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต



..... คณบดีคณะทันตแพทยศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง วิชากรรณ์ ทักษิณ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ สมหมาย ขอบอิสระ)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร. ทิพวรรณ ธราภิวัฒน์นานนท์)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร. ประสิทธิ์ ภาวสันต์)


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

อรนุช เตชาธราทิพย์ : การศึกษาความสามารถในการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรม.

(CHARACTERIZATION OF OSTEOGENIC DIFFERENTIATION OF DECIDUOUS DENTAL PULP CELLS FROM DOWN SYNDROME PATIENTS)

อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ. ทพ. ดร. ทิพวรรณ ธราภิวัฒน์นานนท์,อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : รศ. ทพ. ดร. ประสิทธิ์ ภาวสันต์, 81 หน้า.

ดาวน์ ซินโดรม เป็นโรคทางพันธุกรรมที่พบได้มากทั้งในประเทศไทยและทั่วโลก นอกจากความพิการทางสติปัญญาแล้ว ผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมยังมีความผิดปกติในพัฒนาการของฟันด้วย อย่างไรก็ตามก็ยังไม่มีการศึกษาถึงพฤติกรรมของเซลล์ในช่องปากของผู้ป่วยดาวน์ซินโดรมว่ามีการเปลี่ยนแปลงไปอย่างไร ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ และความสามารถในการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมกับเด็กปกติ โดยเฉพาะเลี้ยงเซลล์ในห้องปฏิบัติการเพื่อศึกษาอัตราการแบ่งตัวโดยใช้วิธีเอ็มทีที ศึกษาาระดับการแสดงออกของอาร์เอ็นเอเข้ารหัสคอลลาเจน ชนิดที่ 1 ออสติโอแคลซิน คอร์บายดิงแฟกเตอร์1 และอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส โดยใช้วิธีอาร์ที-พีซีอาร์ ศึกษาค่าการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส และศึกษาการเกิดตะกอนแคลเซียมด้วยการย้อมสีอะลิซารินเรด ผลการทดลองพบว่าเซลล์ของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมมีอัตราการแบ่งตัวช้ากว่า แต่สามารถแปรสภาพเป็นเซลล์คล้ายเซลล์สร้างกระดูกเร็วกว่าเซลล์จากเนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมของเด็กปกติโดยมีระดับการแสดงออกของยีนออสติโอแคลซิน คอร์บายดิงแฟกเตอร์1 อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและค่าการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสสูงกว่า รวมทั้งมีการสะสมตะกอนแคลเซียมได้เร็วและมากกว่าเซลล์ของผู้ป่วยเด็กปกติ จากการศึกษาชี้ให้เห็นว่าเซลล์ของเนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมมีอัตราการเจริญที่ช้า และมีความไวต่อการกระตุ้นการแปรสภาพเป็นเนื้อเยื่อแข็งได้มากกว่าเด็กปกติ ความรู้จะเป็นประโยชน์ในการศึกษาหาวิธีการป้องกันและรักษาฟันของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมต่อไป

ภาควิชา ทันตกรรมสำหรับเด็ก ลายมือชื่อนิสิต อรุณ เทพธราทิพย์
สาขาวิชา ทันตกรรมสำหรับเด็ก ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
ปีการศึกษา 2553 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ๒๕๖๓ ๖๖๖๖

5176143132 : MAJOR PEDIATRIC DENTISTRY

KEYWORDS : STEM CELL FROM DENTAL PULP TISSUE / DOWN SYNDROME / OSTEOGENIC DIFFERENTIATION

ORANUCH TECHATHARATIP : CHARACTERIZATION OF OSTEOGENIC DIFFERENTIATION OF DECIDUOUS DENTAL PULP CELLS FROM DOWN SYNDROME PATIENTS. THESIS ADVISOR : ASSOC.PROF.THIPAWAN THARAPIWATTANANON, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : ASSOC.PROF. PRASIT PAVASANT, Ph.D., 81 pp.

Down syndrome (DS) is the chromosomal disorder commonly found in Thailand and worldwide. Despite the mental retardation characteristics of the patients, it has been shown that these patients also have the dental abnormalities. The behavior of cells from oral cavity in DS is still unrevealed. The aim of this study is to examine the proliferation rate and the osteogenic differentiation potential of dental pulp cells obtained from deciduous teeth from DS compared to those normal patients. MTT assay was used to examine the proliferation rate, while the RT-PCR technique was used to evaluate the level of mRNA expression of type I collagen, osteocalcin, core binding factor1 and alkaline phosphatase. Osteogenic differentiation was examined by alkaline phosphatase assay and in vitro calcification was determined by alizarin red staining. The results indicated that dental pulp cells from DS patients had slow rate of proliferation compared to cells from normal patients. However, dental pulp cells from DS patients showed high level expression of osteocalcin, core binding factor1 and alkaline phosphatase. Moreover, increasing rate of alkaline phosphatase activity and in vitro calcification in cells from DS patients was observed. The results suggested that dental pulp cells from DS patients had slow rate of proliferation but high tendency for osteogenic differentiation compared to cells from normal patients, The knowledge may benefit the improvement of dental care and treatment for DS in the future.

Department :	Pediatric Dentistry.....	Student's Signature	Oranuch Techatharatip.....
Field of Study :	Pediatric Dentistry.....	Advisor's Signature	Thipawan Tharapiwattananon.....
Academic Year :	2010.....	Co-Advisor's Signature	Prasit Pavasant.....

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ สถาบันการศึกษาที่เป็นแหล่งประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ให้แก่ข้าพเจ้า และขอขอบพระคุณ รศ.ทญ.ดร. ทิพวรรณ ธราภิวฒนานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ รศ.ทพ.ดร ประสิทธิ์ ภวสันต์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะในการทำวิทยานิพนธ์ ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากเงินทุนกองทุนวิจัยจุฬาฯ 100 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบพระคุณรศ.ทพ. สมหมาย ชอบอิสระ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผศ.ทญ.ดร. นีรดา ธเนศวร และ อ.ทญ.ดร.วลีรัตน์ ศุภวรรณ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำแนะนำชี้แนะข้อบกพร่องและแนวทางในการปรับปรุงแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องมากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณอาจารย์สาขาวิชาทันตกรรมสำหรับเด็ก จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ได้ถ่ายทอดความรู้ และแนวทางในการหาความรู้ ตลอดจนคุณธรรมจริยธรรมให้แก่ข้าพเจ้า

ขอขอบพระคุณคลินิกทันตกรรมสำหรับเด็ก คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์สำหรับการเก็บตัวอย่างฟันน้ำนม

ขอขอบพระคุณฝ่ายทันตกรรม และ ศูนย์วิจัยพันธุศาสตร์การแพทย์ สถาบันราชานุกูล ที่ให้ความอนุเคราะห์สำหรับการเก็บตัวอย่างฟันน้ำนมและการตรวจวิเคราะห์ทางพันธุกรรมของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรม

ขอขอบพระคุณนางสาวนันทวรรณ เนาวโรจน์ และเจ้าหน้าที่หน่วยปฏิบัติการวิจัย เนื้อเยื่ออินทรีย์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือในการใช้เครื่องมือวิจัยในครั้งนี้เป็นอย่างดี

คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เป็นสถานที่ให้ความรู้ อบรมจริยธรรม และปลูกจิตสำนึกที่ดีแก่ข้าพเจ้า

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัวที่อบรมสั่งสอนและให้เลี้ยงดูข้าพเจ้ามาตั้งแต่กำเนิด รวมทั้งขอบคุณเพื่อนทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจมาโดยตลอด

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
แนวคิดและทฤษฎี.....	6
เนื้อพื้น.....	7
เนื้อเยื่อในโพรงฟัน.....	9
การซ่อมแซมเนื้อฟัน.....	11
คุณสมบัติในการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเนื้อเยื่อในโพรงฟัน.....	12
การแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง.....	13
การวัดปริมาณเซลล์.....	14
ดาวน์ ซินโดรม.....	16
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	19
ประชากรและตัวอย่าง.....	19
สถานที่ทำการวิจัย.....	20
เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	20
การเก็บรวบรวมข้อมูล.....	23
การวิเคราะห์ข้อมูล.....	27
บทที่ 4 ผลและการวิเคราะห์ข้อมูล.....	29
การศึกษาอัตราการแบ่งตัวของเซลล์.....	29
การศึกษาค่าการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส.....	30
การศึกษาปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอของยีนคอลลาเจน ชนิดที่ 1 และออกสติโอแคลซิน.....	31
การศึกษาปริมาณตะกอนแคลเซียมที่ย้อมด้วยสีอลิซารินเรด เอส.....	33
การศึกษาปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอของยีนคอร์บายด์ิงแฟกเตอร์1 และอัลคาไลน์	

ฟอสฟาเตส.....	35
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	36
สรุปผลการวิจัย.....	36
อภิปรายผล.....	36
ข้อเสนอแนะ.....	40
รายการอ้างอิง.....	42
ภาคผนวก.....	49
การศึกษาอัตราการแบ่งตัวของเซลล์.....	50
การศึกษาค่าการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส.....	55
การศึกษาปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอของยีนคอลลาเจน ชนิดที่ 1 และออกสติโอแคลซิน.....	59
การศึกษาปริมาณตะกอนแคลเซียมที่ย้อมด้วยสียอลิซารินเรด เอส.....	67
การศึกษาปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอของยีนคอร์บายดีนิงแฟกเตอร์1 และอัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส.....	78
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	81

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ส่วนประกอบที่พบในเนื้อฟันและเนื้อเยื่อในโพรงฟัน.....	16
ตารางที่ 2 ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเอ็มอาร์เอ็นเอยีนของคอลลาเจน ชนิดที่ 1 (Type I collagen) ยีนออสติโอแคลซิน (osteocalcin) ยีนคอร์บายดิงแฟกเตอร์ 1 (Core binding factor1) ยีนอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (ALP) และยีนกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส (GAPDH).....	26



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	กราฟแสดงปริมาณเซลล์ที่วัดด้วยเทคนิคเอ็มทีที (MTT assay) ของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงพินนํานมของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมและเด็กปกติโดยแกนตั้งแสดงปริมาณเซลล์ และแกนนอนแสดงระยะเวลาที่เพาะเลี้ยง (NM: กลุ่มเด็กปกติ DS: กลุ่มผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรม).....	29
ภาพที่ 2	กราฟแสดงอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ที่วัดด้วยเทคนิคเอ็มทีที (MTT assay) ของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงพินนํานมของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมเทียบกับเด็กปกติโดยแกนตั้งแสดงร้อยละค่าเฉลี่ยปริมาณเซลล์ซึ่งกำหนดให้ค่าเฉลี่ยปริมาณเซลล์ของกลุ่มเปรียบเทียบที่มีค่าน้อยที่สุดเป็นร้อยละ 100 และแกนนอนแสดงระยะเวลาที่เพาะเลี้ยง (NM: กลุ่มเด็กปกติ DS: กลุ่มผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรม *: $p < 0.05$).....	30
ภาพที่ 3	กราฟแสดงจำนวนเท่าของค่าเฉลี่ยการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงพินนํานมของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมเทียบกับเด็กปกติ โดยแกนตั้งแสดงค่าการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสซึ่งกำหนดให้ค่าเฉลี่ยการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของกลุ่มเปรียบเทียบที่มีค่าน้อยที่สุดเป็น 1 และแกนนอนแสดงระยะเวลาที่เพาะเลี้ยง (NM: กลุ่มเด็กปกติ DS: กลุ่มผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรม *: $p < 0.05$).....	31
ภาพที่ 4	การแสดงผลของยีนที่แสดงถึงความสามารถในการสร้างเนื้อเยื่อแข็งโดยการวิเคราะห์ด้วยวิธีอาร์ที-พีซีอาร์ (RT-PCR) (Normal: กลุ่มเด็กปกติ DS: กลุ่มดาวน์ ซินโดรม DMEM: กลุ่มที่เพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟินอลเรด OM: กลุ่มที่เพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง Col I: ยีนคอลลาเจน ชนิดที่ 1 OCN: ยีนออสติโอแคลซิน GAPDH: ยีนกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟตดีไฮโดร	32
ภาพที่ 5	จีเนส).....กราฟแสดงค่าเฉลี่ยความเข้มของยีนคอลลาเจน ชนิดที่ 1 (Col I) และออสติโอแคลซิน (OCN) โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธีอาร์ที-พีซีอาร์ (RT-PCR) เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟินอลเรด เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยแกนตั้งแสดงค่าเฉลี่ยความเข้มของยีนต่อค่าเฉลี่ยความเข้มของยีนกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส (GAPDH) และแกนนอนแสดงชนิด	

- ยีน (NM: กลุ่มเด็กปกติ DS: กลุ่มดาวน์ ซินโดรม)..... 32
- ภาพที่ 6 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยความเข้มของยีนคอลลาเจน ชนิดที่ 1 และออสติโอแคลซิน โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธีอาร์ที-พีซีอาร์ (RT-PCR) เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟีนอลเรดและอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง เป็นเวลา 5 วัน โดยแกนตั้งแสดงค่าเฉลี่ยความเข้มของยีนต่อค่าเฉลี่ยความเข้มของยีนกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส (GAPDH) และแกนนอนแสดงชนิดยีน (NM: กลุ่มเด็กปกติ DS: กลุ่มดาวน์ ซินโดรม DMEM: กลุ่มที่เพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟีนอลเรด OM:กลุ่มที่เพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง *: $p < 0.05$)..... 33
- ภาพที่ 7 การย้อมตะกอนแคลเซียมด้วยสีอลิซารินเรด เอส เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงพินนํ้านมของเด็กปกติและผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟีนอลเรดและอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง เป็นเวลา 7, 10 และ 14 วัน..... 34
- ภาพที่ 8 กราฟแสดงจำนวนเท่าของค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนแสงของปริมาณตะกอนแคลเซียมที่ย้อมด้วยสี อลิซารินเรด เอสโดยละลายตะกอนด้วยซิติลไพริดีเนียมคลอไรด์ ของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงพินนํ้านมของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมเทียบกับเด็กปกติ โดยแกนตั้งแสดงค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนแสงของปริมาณตะกอนแคลเซียมที่ย้อมด้วยสี อลิซารินเรด เอสซึ่งกำหนดให้ค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนแสงของกลุ่มเปรียบเทียบที่มีค่าน้อยที่สุดเป็น 1 และแกนนอนแสดงระยะเวลาที่เพาะเลี้ยง (NM: กลุ่มเด็กปกติ DS: กลุ่มดาวน์ ซินโดรม DMEM: กลุ่มที่เพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟีนอลเรด OM:กลุ่มที่เพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง *: $p < 0.05$)..... 34
- ภาพที่ 9 การแสดงออกของยีนคอร์บายดิงแฟกเตอร์ 1 (Cbfa1) และอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (ALP) และกราฟแสดงค่าเฉลี่ยความเข้มของยีนโดยการวิเคราะห์ด้วยวิธีอาร์ที-พีซีอาร์ (RT-PCR) เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟีนอลเรด เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยแกนตั้งแสดงค่าเฉลี่ยความเข้มของยีนต่อค่าเฉลี่ยความเข้มของยีนกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส (GAPDH) และแกนนอนแสดงชนิดยีน (NM: กลุ่มเด็กปกติ DS: กลุ่มดาวน์ ซินโดรม)..... 34

โดยมี *: $p < 0.05$)..... 36



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟัน (dental pulp cells) เป็นเซลล์ที่มีต้นกำเนิดจากนิวรัล ครีส (neural crest) ที่เคลื่อนเข้ามาอยู่ในแบรินเคียว อาร์ค ที่ 1 (first branchial arch) (1) ทำให้เซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันมีความแตกต่างจากเซลล์ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) อื่นๆ ที่พัฒนามาจากเซลล์เนื้อเยื่อชั้นกลาง (somatic mesoderm)

เซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันประกอบด้วยเซลล์สร้างเนื้อฟัน (odontoblasts) ซึ่งทำหน้าที่ในการสร้างเนื้อฟันทั้งเนื้อฟันปฐมภูมิและทุติยภูมิ เซลล์สร้างเส้นใย (fibroblast) เซลล์บุหลอดเลือด (vascular cells) เซลล์รอบหลอดเลือด (pericytes) เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน (Immunocompetence cells) และเซลล์ที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่ใดๆ (undifferentiated mesenchymal cells) นี้จัดเป็นเซลล์ส่วนใหญ่ของเนื้อเยื่อโพรงฟัน

หน้าที่สำคัญของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟัน คือ การรักษาสมดุลของเนื้อเยื่อและทำหน้าที่ซ่อมแซมเนื้อฟัน (2) โดยเมื่อฟันได้รับอันตรายจากการผุของฟัน หรือจากการบูรณะฟันจนทำให้เกิดการตายของเซลล์สร้างเนื้อฟัน เซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ใดๆ สามารถแปรสภาพไปเป็นเซลล์คล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟัน (odontoblast-like cells) และสร้างเนื้อเยื่อแข็งที่คล้ายเนื้อฟันมาซ่อมแซมบริเวณรอยต่อระหว่างเนื้อเยื่อในโพรงฟันและเนื้อฟันได้ (3-6) ซึ่งความสามารถในการแปรสภาพนี้ทำให้เป็นที่ยอมรับกันว่าเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันมีคุณสมบัติคล้ายเซลล์จำพวกเซลล์ต้นกำเนิด (progenitor cells)

เซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันแท้ (Dental pulp stem cells: DPSCs) มีคุณสมบัติในการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ (mesenchymal stem cell) คือมีการแสดงออกของโมเลกุลผิวเซลล์ที่แสดงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ เช่น ซีดี-44 (CD-44) ซีดี-106 (CD-106) ซีดี-146 (CD-146) และ สโตร-1 (STRO-1) เป็นต้น (3, 7) มีคุณสมบัติในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนสร้างเซลล์ขึ้นใหม่ได้อย่างต่อเนื่องโดยที่ไม่ได้แปรสภาพไปเป็นเซลล์ชนิดอื่นๆ (high proliferative potential for self-renewal) และมีความสามารถในการแปรสภาพเป็นเซลล์ได้หลายชนิด (multilineage differentiation) เช่น สามารถแปรสภาพเป็นเซลล์คล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟัน เซลล์กระดูก (osteoblast) (3) เซลล์ประสาท (neuron) เซลล์ไขมัน (Adipocyte) (8) เซลล์กระดูกอ่อน (chondrocyte) และ เซลล์กล้ามเนื้อเรียบ (myocyte) (9) รวมทั้งสามารถถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อแข็งในสัตว์ทดลองได้ (4, 8)

เซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนม (stem cells from human exfoliated deciduous teeth: SHED) มีคุณสมบัติในการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์เช่นเดียวกับเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันแท้ โดยพบว่ามี การแสดงออกของโปรตีนซีดี-146 และ สเตโร-1 สามารถแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อฟัน เซลล์ไขมัน เซลล์กล้ามเนื้อเรียบ เซลล์กระดูกอ่อน และเซลล์ประสาท (9, 10) และสามารถถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อแข็งทั้งในห้องทดลองและสัตว์ทดลอง แต่เซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้เร็วกว่า (10) และมีความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่มีระดับการแปรสภาพน้อยกว่า (immature) โดยเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมมีการแสดงออกของโปรตีนที่พบในเซลล์ต้นกำเนิดของตัวอ่อน เช่น ออกเทเมอร์-4 (POU transcription factor Octamer-4: Oct 4) นานอก (Nanog) เอสเอสอีเอ-3 (Stage-specific embryonic antigen-3: SSEA-3) เอสเอสอีเอ-4 (SSEA-4) ทีอาร์เอ-1-60 (Tumor recognition antigen-1-60: TRA-1-60) และ ทีอาร์เอ-1-81 (TRA-1-81) (11, 12)

ดาวน์ซินโดรม (Down syndrome) เป็นโรคกรรมพันธุ์ชนิดหนึ่งที่พบได้บ่อยที่สุด โดยมีอุบัติการณ์เท่ากับ 1:700 ของทารกแรกเกิด (13) พบในทุกเชื้อชาติ ผู้ป่วยจะมีโครโมโซมคู่ที่ 21 เกินมา 1 แท่ง (trisomy 21) ผู้ป่วยกลุ่มนี้จะมีลักษณะเฉพาะ คือ ใบหน้ามักกลม ศีรษะค่อนข้างเล็กและท้ายทอยแบน ตั้งจมูกแบน หางตาเฉียงขึ้นบน นิ้วมือและนิ้วเท้ามักจะสั้น กล้ามเนื้ออ่อนแรง มีพัฒนาการและการเจริญเติบโตช้า และมีความผิดปกติบริเวณช่องปากและขากรรไกรซึ่งพบได้ทั้งในระยะฟันน้ำนมและฟันแท้ ได้แก่ ความผิดปกติในการขึ้นของฟันโดยฟันจะขึ้นช้ากว่ากำหนด ความผิดปกติของรูปร่างและจำนวนฟัน (14) โดยพบว่าผู้ป่วย ดาวน์ซินโดรม จะพบความผิดปกติของรูปร่างและจำนวนฟันมากเป็น 5 เท่าของคนปกติ (15) ได้แก่ สภาพฟันเล็ก (microdontia) ภาวะโพรงในตัวของฟันยืดขยายสู่ปลายราก (taurodontism) ภาวะไร้ฟัน (anodontia) และ ภาวะเคลือบฟันเจริญพร่อง (enamel hypoplasia) (16-18) โดยตลอดการเจริญเติบโตของผู้ป่วยกลุ่มนี้ จะพบความผิดปกติของฟันอย่างน้อย 1 อย่าง (18) ซึ่งจากการศึกษาของ Kieser J. และคณะ (19) เชื่อว่าความผิดปกติของรูปร่างและจำนวนฟันของผู้ป่วยกลุ่มนี้เกิดจากภาวะบกพร่องทางการเจริญเติบโตส่งผลให้เซลล์เดนทัล ปาปิลา (dental papilla cell) มีอัตราการแบ่งตัวช้ากว่าปกติ และจากการศึกษาเซลล์ต้นกำเนิดในระยะตัวอ่อนของผู้ป่วยดาวน์ซินโดรม โดยนำเซลล์มาเพาะเลี้ยงเพื่อเหนี่ยวนำให้แปรสภาพเป็นเซลล์ประสาท พบว่าเซลล์ของดาวน์ซินโดรม มีอัตราการแบ่งตัวต่ำ แปรสภาพเป็นเซลล์ประสาทจำนวนน้อยกว่า ความยาวของเซลล์ประสาท (neurite length) สั้นกว่าของเซลล์ของคนปกติ (20) อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาใดที่แสดงหลักฐานอย่างชัดเจนถึงสาเหตุความผิดปกติของฟันในผู้ป่วยดาวน์ซินโดรมว่าเป็นผลโดยตรงของความผิดปกติของเซลล์หรือเป็นผลทางอ้อมจากปัจจัยแวดล้อมอื่นๆ รวมทั้งยังไม่มี

การศึกษาความสามารถของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมในการซ่อมแซมเนื้อฟัน ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอัตราการแบ่งตัวและความสามารถในการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรม เทียบกับเด็กปกติ

คำถามของการวิจัย

- ความสามารถในการซ่อมแซมเนื้อฟันของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมกับเด็กปกติ มีความแตกต่างกันหรือไม่

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- เพื่อศึกษาเปรียบเทียบอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ และ ความสามารถในการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง ของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมของผู้ป่วย ดาวน์ ซินโดรม กับเด็กปกติ

สมมติฐานของการวิจัย

- เซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมมีอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ และ ความสามารถในการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง แตกต่างจากเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมของเด็กปกติ

คำจำกัดความในการวิจัยและข้อตกลงเบื้องต้น

เซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนม หมายถึง เซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมที่ไม่มีรอยผุทะลุถึงโพรงประสาทฟันและรอยโรคที่ปลายรากฟัน

อัตราการแบ่งตัวของเซลล์ หมายถึง ปริมาณเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟินอลเรด ในช่วงเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง โดยวัดปริมาณเซลล์ด้วยเทคนิคเอ็มทีที (MTT assay)

การแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง (osteogenic differentiation) หมายถึง สภาวะที่เซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมสามารถแปรสภาพเป็นเซลล์คล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟัน หรือเซลล์คล้ายเซลล์สร้างกระดูก เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง (osteogenic media: OM) ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีการเติม เบต้า กลีเซอโรฟอสเฟต (β -glycerophosphate) ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ กรดแอสคอร์บิก (ascorbic

acid)ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ เดกซาเมทาโซน (dexamethasone) ความเข้มข้น 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเซลล์มีการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเนื้อเยื่อแข็ง และมีการสร้างตะกอนแคลเซียม โดยการศึกษาี้ศึกษาความสามารถในการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งโดยวิธี

- การหาปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ของยีนคอลลาเจน ชนิดที่ 1 ยีนออสติโอแคลซิน ยีนคอร์บายติงแฟกเตอร์ 1 และยีนอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ด้วยเทคนิคอาร์ที-พีซีอาร์ (reverse transcriptase polymerase chain reaction: RT-PCR)

- การวัดค่าการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส ด้วยวิธีอัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส แอคทิวิตี (Alkaline phosphatase activity assay)

- การหาปริมาณตะกอนแคลเซียมโดยการย้อมด้วยสีอลิซารินเรด เอส (alizarin red S) อาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็ม (Dulbecco's Modified Eagle medium: DMEM) เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีซีรัมจากฟิตัสวัว (fetal bovine serum) ร้อยละ 10 แอลกลูตามีน ร้อยละ 1 และยาปฏิชีวนะและยาต้านเชื้อรา ร้อยละ 1 ประกอบด้วย เพนนิซิลินจีโซเดียม (Penicillin G Sodium) สเตรมัยซินซัลเฟต (streptomycin sulfate) และแอมโฟเทอริซินบี (Amphotericin B)

คำสำคัญ

ดาวน์ ซินโดรม (Down syndrome)

เซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนม (Deciduous dental pulp cells)

การแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง (Osteogenic differentiation)

การสะสมแร่ธาตุ (Mineralization)

ชนิดของการศึกษา

การวิจัยเชิงทดลองในห้องปฏิบัติการ (Laboratory experimental research)

ข้อจำกัดของการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาในห้องทดลองผลการศึกษาอาจไม่แสดงถึงลักษณะที่แท้จริงในมนุษย์ ผลการศึกษาไม่สามารถนำไปสรุปผลต่อร่างกายได้โดยตรง เนื่องจากในร่างกายมีกลไกการทำงานที่เกิดจากการทำงานร่วมกันของเซลล์หลายชนิด

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การศึกษาอัตราการแบ่งตัวและความสามารถในการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงพินน้านมของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมสะท้อนให้เห็นถึงความสามารถในการซ่อมแซมตนเองของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงพินน้านม และเป็นพื้นฐานเพื่อการศึกษาในอนาคตที่อาจนำไปสู่ความรู้ความเข้าใจถึงสาเหตุความผิดปกติของพินที่เกิดขึ้นในผู้ป่วย รวมทั้งอาจนำไปสู่การพัฒนาวิธีการรักษาทางพันธุกรรมแก่ผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น

ข้อพิจารณาปัญหาทางจริยธรรม

- ผู้วิจัยได้เสนอรายละเอียดข้อมูลโครงการวิจัย เพื่อขอคำรับรองด้านจริยธรรมของโครงการวิจัยจากคณะกรรมการสิทธิมนุษยชนเกี่ยวกับการทดลองในมนุษย์ของคณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และสถาบันราชานุกูล
- ผู้ปกครองต้องได้รับการอธิบายและตอบข้อซักถามถึงรายละเอียดของวิธีการวิจัยโดยไม่ปิดบังซ่อนเร้น และยินยอมลงนามในเอกสารใบยินยอมด้วยความเต็มใจโดยมีสำเนาใบยินยอมเก็บไว้เป็นหลักฐาน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แนวคิดและทฤษฎี

เซลล์ของเนื้อเยื่อในโพรงฟัน เป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่สำคัญในการรักษาสมดุลของเนื้อเยื่อและซ่อมแซมเนื้อฟัน โดยเมื่อฟันได้รับอันตรายจากการผุของฟัน หรือจากการบูรณะฟันจนทำให้เกิดการตายของเซลล์สร้างเนื้อฟัน เซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ใดๆ สามารถแปรสภาพไปเป็นเซลล์คล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟัน (odontoblast-like cells) และสร้างเนื้อเยื่อแข็งที่คล้ายเนื้อฟันมาซ่อมแซมบริเวณรอยต่อระหว่างเนื้อเยื่อในโพรงฟันและเนื้อฟันได้ ซึ่งความสามารถในการแปรสภาพนี้ทำให้เป็นที่ยอมรับกันว่าเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันมีคุณสมบัติคล้ายเซลล์จำพวกเซลล์ต้นกำเนิด

ดาวน์ ซินโดรม (Down syndrome) เป็นโรคกรรมพันธุ์ชนิดหนึ่งที่เกิดได้บ่อยที่สุด โดยมีอุบัติการณ์เท่ากับ 1:700 ของทารกแรกเกิด โรคนี้สามารถพบในทุกเชื้อชาติ โดยผู้ป่วยจะมีโครโมโซมคู่ที่ 21 เกินมา 1 แท่ง (trisomy 21) และมีลักษณะเฉพาะ คือ ใบหน้ามีลักษณะกลม ศีรษะค่อนข้างเล็กและท้ายทอยแบน ตั้งจมูกแบน หางตาเฉียงขึ้นบน นิ้วมือและนิ้วเท้ามักจะสั้น กล้ามเนื้ออ่อนแรง มีความผิดปกติของระบบหัวใจและระบบเลือด มีการหายใจของแผลซ้ำ มีพัฒนาการและการเจริญเติบโตช้ากว่าปกติและมีภาวะปัญญาอ่อนระดับเล็กน้อยถึงปานกลางร่วมด้วย มีความผิดปกติบริเวณช่องปากและขากรรไกรด้วย โดยจะพบความผิดปกติได้ทั้งในระยะฟันน้ำนมและฟันแท้ รวมทั้งมีความผิดปกติของรูปร่างและจำนวนฟัน โดยพบว่าผู้ป่วยกลุ่มนี้จะพบความผิดปกติของฟันอย่างน้อย 1 อย่าง (21) และประมาณร้อยละ 50 ของผู้ป่วยจะพบมีความผิดปกติของฟัน อย่างน้อย 3 ชนิดขึ้นไป ความผิดปกติของรูปร่างและจำนวนฟันของผู้ป่วยกลุ่มนี้ นำเกิดจากภาวะบกพร่องทางการเจริญเติบโตของเซลล์ ส่งผลให้เซลล์เดนทัล ปาปิลา (dental papilla cell) ซึ่งเป็นกลุ่มเซลล์ที่จะพัฒนาไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อฟัน (odontoblast) และเซลล์ของเนื้อเยื่อในโพรงฟัน (dental pulp cells) มีอัตราการแบ่งตัวช้ากว่าปกติ อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาใดที่แสดงหลักฐานอย่างชัดเจนถึงสาเหตุความผิดปกติของฟันในผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมว่าเป็นผลโดยตรงของความผิดปกติของพฤติกรรมของเซลล์หรือเป็นผลทางอ้อมจากปัจจัยแวดล้อมอื่นๆ จากผลการศึกษาที่แสดงว่าเซลล์ของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรม มีอัตราการเจริญที่ช้ากว่าปกติ เกิดเป็นข้อสังเกตว่าเซลล์จากเนื้อเยื่อในโพรงฟันของผู้ป่วย ดาวน์ ซินโดรม จะมีคุณลักษณะที่แตกต่างจากเซลล์จากเซลล์ปกติอย่างไร โดยรายงานเกี่ยวกับพฤติกรรมของเซลล์จากผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมมีน้อยมากและยังไม่มีการศึกษาเซลล์จากเนื้อเยื่อในโพรงฟัน รวมทั้งยังไม่มี

การศึกษาความสามารถในการซ่อมแซมเนื้อฟันของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรม ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอัตราการแบ่งตัวและความสามารถในการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรม เทียบกับเด็กปกติ

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เนื้อฟัน

เนื้อฟันเป็นเนื้อเยื่อแข็งชนิดหนึ่งที่มีการสร้างและส่วนประกอบคล้ายกับกระดูก เมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix) ของเนื้อฟันประกอบด้วยแร่ธาตุประมาณร้อยละ 47 โปรตีนร้อยละ 32 และ น้ำร้อยละ 21 โดยปริมาตร (22) เซลล์ที่พบในเนื้อฟัน ได้แก่ เซลล์สร้างเนื้อฟัน ซึ่งเป็นเซลล์ที่เจริญมาจากนิวรัล ครีส เซลล์ (neural crest cell) (23) สามารถสร้างเมทริกซ์ (matrix) ของเนื้อฟัน โปรตีโอไกลแคน (proteoglycan) เส้นใยคอลลาเจน และโปรตีนในกลุ่มที่ไม่ใช่คอลลาเจน (non-collagenous proteins) ดังแสดงในตารางที่ 1 (24)

โปรตีนในเมทริกซ์นอกเซลล์ซึ่งสร้างจากเซลล์สร้างฟันและเซลล์สร้างกระดูก สามารถใช้เป็นตัวบ่งบอกถึงการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันไปเป็น เซลล์สร้างเนื้อฟัน หรือ เซลล์สร้างกระดูก และการสร้างเนื้อเยื่อแข็ง ได้แก่ คอลลาเจน ชนิดที่ 1 (Collagen type I: Col I) ออสติโอแคลซิน (osteocalcin: OCN) เอนไซม์อัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase: ALP) เดนทีน ไสอะโลฟอสโฟโปรตีน (Dentin sialophosphoprotein: DSPP) เดนทีน เมทริกซ์ อะซิติก ฟอสโฟโปรตีน-1 (Dentin matrix acidic phosphoprotein-1: DMP-1) โบน ไสอะโลโปรตีน (Bone sialoprotein: BSP) ออสติโอพอนติน (osteopontin: OPN) และ ออสติโอเนกติน (osteonectin) (3, 7)

เส้นใยคอลลาเจน เป็นส่วนประกอบหลักของเมทริกซ์นอกเซลล์ของเนื้อเยื่อยึดต่อ มีลักษณะโครงสร้างเป็นทริปปเปลเฮลิกซ์ (triple helix) ที่ประกอบด้วย 3 สายโพลีเปปไทด์ (polypeptide chains- α chains) ที่เชื่อมกันด้วยพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bonds) และ ปฏิกริยาไฮโดรโฟบิก (hydrophobic interactions) ส่วนประกอบทางเคมีประกอบด้วยกรดอะมิโน 3 ชนิด ได้แก่ ไกลซีน (glycine) โพรลีน (proline) และ ไฮดรอกซีโพรลีน (hydroxyproline) ทำหน้าที่ช่วยเสริมความแข็งแรง และเป็นโครงร่างให้เซลล์และโมเลกุลขนาดใหญ่ยึดเกาะโดยเส้นใยคอลลาเจนเป็นแกนกลางสำหรับการตกผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทท์ (hydroxyapatite crystal) (25) ในเนื้อฟันพบเส้นใยคอลลาเจนได้ประมาณร้อยละ 90 ของ เมทริกซ์นอกเซลล์ โดยเส้นใยที่

พบมากที่สุด คือ เส้นใยคอลลาเจน ชนิดที่ 1 โดยพบร้อยละ 98 ของเส้นใยคอลลาเจนในเนื้อฟัน (24)

โปรตีนแกมมา-คาร์บอกซีกลูตามิค-คอนเทนนิ่งโมเลกุล ออสติโอแคลซิน (Gamma-carboxyglutamic-containing molecule osteocalcin) ซึ่งทั้งเซลล์สร้างกระดูก และเซลล์สร้างเนื้อฟันสามารถสังเคราะห์ได้ เชื่อว่าเกี่ยวข้องกับกระบวนการสะสมแร่ธาตุเช่นกัน ถือเป็นตัวบ่งชี้ที่บ่งบอกถึงการเจริญเติบโตเต็มที่ของเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งและความสามารถในการสร้างเนื้อเยื่อแข็งของเซลล์ (26) รวมทั้งมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการสะสมแร่ธาตุโดยยับยั้งกระบวนการสะสมแร่ธาตุที่มากเกินไป พบว่าหนูที่ถูกยับยั้งการทำงานของออสติโอแคลซินมีการสร้างกระดูกเพิ่มมากขึ้น (27)

เอนไซม์อัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญ ในการสะสมแร่ธาตุของเนื้อเยื่อแข็งของร่างกาย โดยจะพบเอนไซม์นี้เป็นส่วนหนึ่งในเมทริกซ์ของเนื้อเยื่อที่กำลังสะสมแร่ธาตุ เอนไซม์นี้ในร่างกายมนุษย์พบมี 4 ชนิดตามตำแหน่งที่พบ ได้แก่ ลำไส้ (intestinal) รก (placenta) คล้ายรก (placenta-like) และชนิดที่พบได้ในเนื้อเยื่อทั่วๆ ไป (tissue-nonspecific) ซึ่งพบได้ใน กระดูก ตับ ไต และ เนื้อเยื่ออื่นๆ กลไกการทำงานของเอนไซม์ คือ ทำหน้าที่ตัดหมู่ฟอสเฟตออกจาก ออร์แกนิก ฟอสเฟต เอสเตอ์ (organic phosphate ester) ทำให้เกิดการตกตะกอนของฟอสเฟตไอออน จนเกิดความอึดตัวในส่วนที่เป็นของเหลวในเนื้อเยื่อนำไปสู่การตกตะกอนของเกลือแคลเซียมฟอสเฟต ในกระบวนการเกิดการสะสมแร่ธาตุในเนื้อเยื่อแข็ง (28)

Fisher และ Fedargo (10) ได้จัดกลุ่มฟอสโฟไรเลตเตดโปรตีน (phosphorylated protein) 4 โมเลกุล ซึ่งเชื่อว่าเป็นจุดเริ่มต้นในการสร้างเนื้อเยื่อแข็ง ได้แก่ เเดนทีน ไชอะโลฟอสโฟโปรตีน เเดนทีน เมทริกซ์ อะซิดิก ฟอสโฟโปรตีน-1 โบน ไชอะโลโปรตีน และออสติโอพอนติน เรียกว่า สมอลอินทีกรินบายดิงลิแกนเอ็นลิงคิงไลด์โคโปรตีน (Small Intergrin –Binding Ligand N-linked Glycoproteins: SIBLINGs) เเดนทีน ไชอะโลฟอสโฟโปรตีน เป็นกลุ่มโปรตีนที่พบในเนื้อฟันที่ไม่พบในเนื้อเยื่อโพรงฟันซึ่งจะแยกออกเป็น เเดนทีน ไชอะโลโปรตีน (dentin sialoprotein: DSP) และ เเดนทีน ฟอสโฟไฟริน (dentin phosphophoryn: DPP) (29) พบว่าเซลล์สร้างกระดูกสามารถสังเคราะห์เเดนทีน ไชอะโลโปรตีน และเเดนทีน ฟอสโฟไฟริน ได้เช่นเดียวกันแต่มีอัตราส่วนน้อยกว่าในเนื้อฟันถึง 400 เท่า (30) หน้าที่ของเเดนทีน ไชอะโลโปรตีนนั้นยังไม่แน่ชัด แต่หน้าที่ของเเดนทีน ฟอสโฟไฟริน เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างเส้นใยและการสะสมแร่ธาตุ โดยเซลล์สร้างเนื้อฟันหลังสวารนี้ผ่านทางโอดอนโตบลาสติกโพรเซส (odontoblastic process) ไปยังบริเวณที่มีการสร้างเนื้อเยื่อแข็งโดยตรง และโปรตีนนี้สามารถจับกับแคลเซียมไอออน และ ผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ (hydroxyapatite crystal) รวมถึงสามารถเชื่อมกับเส้นใยคอลลาเจนด้วยพันธะโควาเลนต์

(covalent bond) และพันธะอิเลคโตรสแตติก (electrostatic bond) (25, 31) เคนทีน เมทริกซ์ อะซิติก ฟอสโฟโปรตีน-1 เป็นโปรตีนที่พบได้ในกระดูกและฟัน เมื่อเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งเจริญเต็มที่ จะหลังเคนทีน เมทริกซ์ อะซิติก ฟอสโฟโปรตีน-1 ออกสู่เมทริกซ์นอกเซลล์ ซึ่งโปรตีนนี้ช่วยทำหน้าที่ในการจัดเรียงเมทริกซ์ที่เซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งสร้างขึ้น (32) ออสติโอพอนติน เป็นโปรตีนที่ช่วยยึดโมเลกุลในเมทริกซ์นอกเซลล์ของเนื้อเยื่อแข็งเข้าด้วยกัน โดยจะมีการสร้างมากในช่วงแรกของการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง (Initial stage of cytodifferentiation) (26, 33) ส่วนโบน ไชอะโลโปรตีน พบได้ทั้งในกระดูกและฟัน พบประมาณร้อยละ 8 ของโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจน หน้าที่ของโบน ไชอะโลโปรตีนในการสร้างเนื้อเยื่อแข็งยังไม่แน่ชัด เชื่อว่าโปรตีนนี้ทำหน้าที่เป็นนิวเคลียสในการสะสมแร่ธาตุในระยะเริ่มแรก และช่วยในการรักษาสมดุลของการสร้างเนื้อเยื่อแข็ง (34) ออสติโอเนกติน เป็นแคลเซียม บายดิง โกลโคโปรตีน (calcium binding protein) ที่มีบทบาทในกระบวนการสะสมแร่ธาตุ โดยทำหน้าที่ในการเชื่อมต่อระหว่างเซลล์และเมทริกซ์ และแคลเซียมในเนื้อเยื่อแข็ง (35)

เนื้อเยื่อในโพรงฟัน

เนื้อเยื่อในโพรงฟันเป็นเนื้อเยื่อยึดต่อชนิดหนึ่งซึ่งถูกล้อมรอบด้วยเนื้อฟัน ส่วนประกอบหลักของเนื้อเยื่อยึดต่อนั้นประกอบด้วย 3 ส่วน ได้แก่ สารเนื้อฟัน (ground substance) เมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix) และเซลล์ต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 1 (24)

สารเนื้อฟัน มีหน้าที่ช่วยในการกรองโดยเป็นสารที่ขัดขวางการสัมผัสระหว่างเลือดและพื้นผิวของเซลล์ และทำให้เกิดความยืดหยุ่นของเนื้อเยื่อยึดต่อ (viscoelasticity) ส่วนใหญ่จะประกอบด้วยโมเลกุลขนาดใหญ่ ที่เรียกว่า โปรตีโอไกลแคน (proteoglycan) (25)

เมทริกซ์นอกเซลล์ประกอบด้วย เส้นใยคอลลาเจนที่ช่วยเสริมความแข็งแรงของเนื้อเยื่อโปรตีนในกลุ่มที่ไม่ใช่คอลลาเจน และไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ทำหน้าที่ช่วยในการสื่อสารระหว่างเซลล์ ส่วนประกอบของเมทริกซ์นอกเซลล์ในเนื้อฟันและเนื้อเยื่อในโพรงฟันมีความแตกต่างกันทั้งในปริมาณและชนิดของเส้นใยคอลลาเจนและโปรตีนบางชนิด เส้นใยคอลลาเจนในเนื้อเยื่อในโพรงฟันส่วนใหญ่เป็นเส้นใยคอลลาเจน ชนิดที่ 1 และ 3 โดยพบประมาณร้อยละ 56 และ 41 ตามลำดับ ส่วนน้อยพบเป็นเส้นใยคอลลาเจน ชนิดที่ 2 และ 6 ส่วนเส้นใยคอลลาเจนในเนื้อฟันประกอบด้วยเส้นใยคอลลาเจน ชนิดที่ 1 ร้อยละ 98 และส่วนน้อยพบเป็นเส้นใยคอลลาเจน ชนิดที่ 3 และ 5 (ตารางที่ 1) เนื้อเยื่อในโพรงฟันไม่พบโมเลกุลในกลุ่มเคนทีน ไชอะโลฟอสโฟโปรตีน เคนทีน เมทริกซ์ อะซิติก ฟอสโฟโปรตีน-1 และ ออสติโอแคลซิน อาจเป็นเหตุผลที่ทำให้

เนื้อเยื่อในโพรงฟันไม่เกิดการสร้างเนื้อเยื่อแข็งเมื่ออยู่ในสภาวะปกติ แต่พบปริมาณของโปรตีนโอไกลแคนสูงซึ่งทำหน้าที่ในการยับยั้งการสร้างเนื้อเยื่อแข็ง (24)

เซลล์ที่พบในเนื้อเยื่อในโพรงฟัน ได้แก่ เซลล์สร้างเนื้อฟัน เซลล์สร้างเส้นใย เซลล์บุหลอดเลือด เซลล์รอบหลอดเลือด เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน และเซลล์ที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่ใดๆหน้าที่สำคัญของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟัน คือการรักษาสมดุลของเนื้อเยื่อ และทำหน้าที่ซ่อมแซมเนื้อฟัน (2, 23, 35)

ในระยะสุดท้ายของการพัฒนาการของฟันเซลล์เดนทัล ปาปิลา (dental papilla cell) จะเคลื่อนตัวมาสัมผัสกับเบสเมมเบรน (basement membrane) โดยเซลล์ที่อยู่ติดกับเบสเมมเบรนจะพัฒนาไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อฟันซึ่งทำหน้าที่ในการสร้างเนื้อฟันทั้งเนื้อฟันปฐมภูมิและทุติยภูมิ ส่วนเซลล์ที่เหลือที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงจะอยู่ในบริเวณแกนกลางของเนื้อเยื่อในโพรงฟัน การเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อฟันต้องอาศัยโปรตีนหลายชนิดในการส่งสัญญาณให้เซลล์เปลี่ยนเป็นเซลล์สร้างเนื้อฟัน เช่น โบน มอร์โฟเจเนติก โปรตีน (Bone morphogenetic proteins: BMPs) ทรานส์ฟอร์มมิงโกรทแฟกเตอร์ เบต้า (transforming growth factor- β : TGF- β s) ไฟโบรบลาสโตโกรทแฟกเตอร์ (fibroblast growth factors) อินซูลินไลค์โกรทแฟกเตอร์ (Insulin-like growth factors) (36)

เซลล์สร้างเส้นใยเป็นเซลล์ที่มีเป็นจำนวนมากที่สุดในเนื้อเยื่อในโพรงฟัน และมีความสามารถในการสร้างเมทริกซ์ของเนื้อเยื่อยึดต่อ เซลล์นี้จะอยู่ทั่วๆ ไปในเนื้อเยื่อโพรงฟันโดยพบเซลล์มากที่สุดที่บริเวณส่วนของเนื้อเยื่อในโพรงฟันส่วนตัวฟัน (coronal pulp tissue) (25) เซลล์สร้างเส้นใยที่พบในเนื้อเยื่อโพรงฟันจะมีลักษณะเซลล์ที่มีความหลากหลายของสายพันธุ์ (heterogeneous cell population) ดังตัวอย่างการศึกษาของ Tsukamoto และคณะ (37) ซึ่งนำเนื้อเยื่อในโพรงฟันมาเพาะเลี้ยงพบว่าสามารถแยกเซลล์สร้างเส้นใยได้ถึง 183 สายพันธุ์ แต่มีเพียง 6 สายพันธุ์ที่สามารถสร้างเนื้อเยื่อแข็งได้ หน้าที่หลักของเซลล์สร้างเส้นใยคือการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ 1 และชนิดที่ 3 รวมถึงการสร้างโปรตีนอื่นๆ ในเมทริกซ์นอกเซลล์ เช่น โปรตีนโอไกลแคน และไฟโบรเนกติน (fibronectin) นอกจากทำหน้าที่ในการสร้างแล้วเซลล์สร้างเส้นใยยังมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการสร้างเส้นใยให้สมดุลโดยสามารถหลั่งเอนไซม์ไลโซไซม์ (lysosomal enzyme) และเอนไซม์ในกลุ่มเอนไซม์เมทริกซ์ เมทอลโลโปรตีนเนส (Matrix metalloproteinases: MMP) จากภายในเซลล์มาย่อยสลายเมทริกซ์นอกเซลล์ที่มีการสร้างมากเกินไป (25)

เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่พบในเนื้อเยื่อโพรงฟันส่วนใหญ่ ได้แก่ เดนไดรติก เซลล์ (dendritic cells) ฮีสติโอไซต์ (histiocytes) และ แมคโครเฟส (macrophages) ส่วนน้อยพบลิมโฟไซต์ (lymphocytes) และ แมสท์เซลล์ (mast cells) โดยจะพบเซลล์เหล่านี้ที่บริเวณรอยต่อระหว่าง

เนื้อฟัน และเนื้อเยื่อในโพรงฟันซึ่งเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อรอยโรคฟันผุและภัยอันตรายต่อเนื้อเยื่อในโพรงฟัน (38)

เซลล์ที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ใดๆ จะอยู่ในบริเวณแกนกลางของเนื้อเยื่อในโพรงฟัน เซลล์จะมีรูปร่างเป็นรูปดาว (Stellate-shaped cells) อยู่รอบๆ หลอดเลือด อย่างไรก็ตาม เซลล์เหล่านี้มักจะแยกความแตกต่างกับเซลล์สร้างเส้นใยได้ยากเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เมื่อเซลล์เหล่านี้ได้รับการกระตุ้นที่เหมาะสมสามารถแปรสภาพเป็นเซลล์คล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟัน หรือเซลล์สร้างเส้นใยได้ เซลล์เหล่านี้จะมีจำนวนลดลงเมื่อเนื้อเยื่อในโพรงฟันมีอายุมากขึ้น ซึ่งทำห้ศักยภาพในการซ่อมแซมและการสร้างเนื้อฟันซ่อมเสริม (reparative dentin) ลดลงด้วย (39)

การซ่อมแซมเนื้อฟัน

ภายใต้สภาวะปกติภายหลังจากการสร้างรากฟันสมบูรณ์เซลล์สร้างเนื้อฟันจะมีการสร้างเนื้อฟันอย่างช้าๆ เรียกว่าเนื้อฟันทุติยภูมิ ซึ่งเป็นเนื้อฟันที่สร้างขึ้นรอบๆ เนื้อฟันปฐมภูมิ หรือเนื้อฟันรอบๆ โพรงฟัน เนื่องจากการสร้างจากเซลล์ตัวเดียวกัน ดังนั้นท่อเนื้อฟัน (dentinal tubule) จะมีความต่อเนื่องกัน เนื้อฟันทุติยภูมิสร้างเพิ่มขึ้นบริเวณหลังคาและพื้นของโพรงฟัน ทำให้โพรงฟันมีขนาดเล็กลงเมื่ออายุเพิ่มขึ้น (2) เมื่อเซลล์เหล่านี้ได้รับภัยอันตราย เช่น ฟันผุ การกรอเตรียมฟันเพื่อบูรณะฟัน เป็นต้น เซลล์อาจไม่ตายและสามารถกลับมาทำงานได้เหมือนเดิม หรือเซลล์อาจเกิดการตาย ขึ้นกับรูปแบบ ความรุนแรง และระยะเวลาที่เกิดภัยอันตรายนั้นๆ การตอบสนองต่อภัยอันตรายที่เกิดขึ้นอย่างช้าๆ และไม่รุนแรง เซลล์สร้างเนื้อฟันจะไม่ตายและสร้างเนื้อฟันเพื่อปกป้องฟัน โดยเนื้อฟันที่สร้างขึ้นใหม่นี้เรียกว่า เนื้อฟันตติยภูมิชนิดรีแอคชันนารี เดนทิน (reactionary dentin) โดยเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่จะมีการสร้างเมทริกซ์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเพื่อเพิ่มอัตราการสร้างเนื้อฟันเพื่อตอบสนองต่อภัยอันตรายนั้นๆ ลักษณะที่บ่งชี้ถึงการสร้างรีแอคชันนารี เดนทิน คือพบเป็นเส้นแบ่งระหว่าง เดนทิน เมทริกซ์ก่อนและหลังการได้รับภัยอันตราย (calico-traumatic line) แสดงถึงความผิดปกติในการหลังเมทริกซ์และการทำงานที่ผิดปกติของเซลล์สร้างเนื้อฟัน (24, 40, 41) ส่วนการตอบสนองต่ออันตรายที่รุนแรงจนทำให้เซลล์สร้างเนื้อฟันตาย ระหว่างที่ได้รับภัยอันตรายจะมีการหลั่งเมทริกซ์นอกเซลล์หลายชนิด ได้แก่ โบน มอร์โฟเจเนติก โปรตีน (Bone morphogenetic proteins: BMPs) ทรานส์ฟอร์มมิงโกรทแฟกเตอร์ เบต้า (transforming growth factor- β : TGF- β s) ไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ (fibroblast growth factors) อินซูลินไลค์โกรทแฟกเตอร์ (Insulin-like growth factors) ซึ่งเป็นโปรตีนที่เหนี่ยวนำให้เซลล์ที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ใดๆ ในเนื้อเยื่อในโพรงฟันแบ่งตัวและพัฒนาขึ้นมาทำหน้าที่ทดแทนเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่คล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟัน ซึ่งจะสร้างเนื้อฟันตติยภูมิชนิดเนื้อฟัน

ซ่อมเสริม (reparative dentin) มาซ่อมแซมบริเวณรอยต่อระหว่างเนื้อเยื่อในโพรงฟันและเนื้อฟัน (5, 6) ความสามารถในการแปรสภาพนี้ทำให้เป็นที่ยอมรับกันว่าเซลล์ของเนื้อเยื่อในโพรงฟัน มีคุณสมบัติคล้ายเซลล์จำพวกเซลล์ต้นกำเนิด (progenitor cells) และเป็นจุดเริ่มต้นในการนำเนื้อเยื่อในโพรงฟันมาเพาะเลี้ยงเพื่อศึกษาความสามารถของเนื้อเยื่อในโพรงฟันในการเป็นเซลล์ต้นกำเนิด

คุณสมบัติในการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเนื้อเยื่อในโพรงฟัน

เซลล์ต้นกำเนิด เป็นเซลล์ที่มีลักษณะเฉพาะ คือ เป็นเซลล์ที่มีความสามารถในการสร้างเซลล์ทดแทนตนเอง ความสามารถในการคงสภาพความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด และ ความสามารถในการแปรสภาพเป็นเซลล์จำเพาะชนิดต่างๆ ได้ในสภาวะที่เหมาะสม การแบ่งตัวของเซลล์ต้นกำเนิดนี้จะได้เซลล์ลูกที่มีความแตกต่างกัน 2 เซลล์ เซลล์หนึ่งจะมีคุณสมบัติเหมือนเซลล์แม่ คือ เซลล์ต้นกำเนิด และอีกเซลล์จะเป็นเซลล์ที่แปรสภาพไป คุณสมบัติในการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเนื้อเยื่อในโพรงฟันพบได้ทั้งในระยะฟันแท้และฟันน้ำนม

เซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันแท้ (Dental pulp stem cells: DPSCs) มีคุณสมบัติในการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ (mesenchymal stem cell) คือมีการแสดงออกของโมเลกุลผิวเซลล์ที่แสดงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ เช่น ซีดี-44 (CD-44) ซีดี-106 (CD-106) ซีดี-146 (CD-146) และ สโตร-1 (STRO-1) เป็นต้น (3, 7) มีคุณสมบัติในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนสร้างเซลล์ขึ้นใหม่ได้อย่างต่อเนื่องโดยที่ไม่ได้แปรสภาพไปเป็นเซลล์ชนิดอื่นๆ และมีความสามารถในการแปรสภาพเป็นเซลล์ได้หลายชนิด เช่น สามารถแปรสภาพเป็นเซลล์คล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟัน เซลล์กระดูก (3) เซลล์ไขมัน เซลล์ประสาท (8) เซลล์กล้ามเนื้อเรียบ และเซลล์กระดูกอ่อน (9) รวมทั้งสามารถถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อแข็งในสัตว์ทดลองได้ (3, 4)

เซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมมีคุณสมบัติในการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ (stem cells from human exfoliated deciduous teeth: SHED) เช่นเดียวกับเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันแท้ โดยพบว่ามี การแสดงออกของโปรตีนซีดี-146 และ สโตร-1 สามารถแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อฟัน เซลล์ไขมัน เซลล์กล้ามเนื้อเรียบ เซลล์กระดูกอ่อน และเซลล์ประสาท (9, 10) และสามารถถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อแข็งทั้งในช่องทดลองและสัตว์ทดลอง แต่เซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้เร็วกว่า มีความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่มีระดับการแปรสภาพน้อยกว่า (immature) โดยเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมมีการแสดงออกของโปรตีนที่พบในเซลล์ต้นกำเนิดของตัวอ่อน เช่น ออกเทเมอร์-4 (POU transcription factor Octamer-4: Oct 4) นานอก (Nanog) เอสเอสอีไอ-3 (Stage-specific embryonic antigen-3: SSEA-3) เอสเอสอีไอ-4 (SSEA-

4) ทีอาร์เอ-1-60 (Tumor recognition antigen-1-60: TRA-1-60) และ ทีอาร์เอ-1-81 (TRA-1-81) (11, 12) และมีความสามารถในการสร้างเนื้อเยื่อแข็งมากกว่า โดยมีค่าการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ ฟอสฟาเตสและระดับการแสดงออกของยีนออกสติโอแคลซินสูงกว่าเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันแท้ (9)

การแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง

เซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันสามารถแปรสภาพเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่คล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟันและสร้างเนื้อเยื่อแข็งที่คล้ายฟัน ดังแสดงในการศึกษาของ Tsukamoto และคณะ (37) นำเซลล์ของเนื้อเยื่อโพรงฟันน้ำนมและฟันเกินมาเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10-15 วัน ในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มพบว่าเซลล์เหล่านี้สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและสามารถแปรสภาพเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่คล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟันและสร้างเนื้อเยื่อแข็งที่คล้ายเนื้อฟัน โดยมีการแสดงออกของเอนไซม์อัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส และมีการสร้างคอลลาเจน ชนิดที่ 1 ไฟโบรเนกติน และ ออกสติโอเนกติน และในการศึกษาของ About และคณะ (42) เพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันกรามแท้ซึ่งที่ 3 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่เติมเบต้า กลีเซอโรฟอสเฟต (β -glycerophosphate) พบว่าเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันสามารถสร้างเนื้อเยื่อแข็งซึ่งประกอบด้วยแคลเซียมและฟอสฟอรัสเป็นจำนวนมาก และมีการแสดงออกของคอลลาเจน ชนิดที่ 1 ออกสติโอเนกติน เนสติน (nestin) และเดนทีนไฮอะโลฟอสโฟโปรตีนได้ (43)

อาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีการเติม เบต้า กลีเซอโรฟอสเฟต (β -glycerophosphate) กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) และ เดกซาเมทาโซน (dexamethasone) สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์แปรสภาพไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง และกระตุ้นให้มีการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเนื้อเยื่อแข็ง รวมทั้งส่งเสริมให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อแข็งเป็นจำนวนมาก แต่มีผลในการยับยั้งกระบวนการแบ่งตัวของเซลล์ ออร์แกนิกฟอสเฟตมีบทบาทสำคัญในการเป็นตัวเริ่มต้นสำหรับการสะสมแร่ธาตุ ส่วนกรดแอสคอร์บิกมีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์เนื้อเยื่อยึดต่อ โดยเป็นโคแฟกเตอร์ สำหรับโปรลีน ไฮดรอกซีเลส (proline hydroxylase) และ ไลซีน ไฮดรอกซีเลส (lysine hydroxylase) สำหรับการเติมหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxylation) ของคอลลาเจน ส่วนเดกซาเมทาโซนช่วยเหนี่ยวนำให้เซลล์แปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง (44, 45)

เกณฑ์ที่ใช้ในการประเมินว่าเซลล์มีคุณสมบัติในการเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ประการแรกสามารถผลิตสารที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกระดูก (bone associated products) เช่น สารที่อยู่ในเมทริกซ์ของกระดูก ได้แก่ ออกสติโอแคลซิน คอลลาเจน ชนิดที่ 1 และ เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ประการที่สองแสดงคุณลักษณะที่ตอบสนองต่อ

ฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกระดูก เช่น การตอบสนองต่อฮอร์โมนพาราไธรอยด์ โดยมีการสร้างเอเอ็มพี (AMP) เพิ่มขึ้น การตอบสนองต่อวิตามินดี (1,25 dihydroxyvitamin D3) โดยเพิ่มการสังเคราะห์ฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกระดูก ประการที่สามารถสร้างเนื้อเยื่อแข็งได้ เช่น เกิดการตกตะกอนเป็นก้อนโนดูลที่มีการสะสมของสารอนินทรีย์ (mineralized nodule) (46)

การวัดปริมาณเซลล์

วิธีการวัดปริมาณเซลล์ทำได้หลายวิธี ได้แก่

1. การนับจำนวนเซลล์ด้วยแผ่นสไลด์นับเซลล์ (Hemocytometer)
2. วิธีเอ็มทีที เป็นการทดสอบความมีชีวิตอยู่ของเซลล์ (cell viability) โดยพิจารณาการเปลี่ยนแปลงเมทาบอลิซึมภายในเซลล์ (metabolic activity) โดยวัดถึงความสามารถของเอนไซม์ซัคซินิล ดีไฮโดรจีเนส (enzyme succinyl dehydrogenase) ในการเปลี่ยนเกลือเตตราโซเลียม (tetrazolium salt: 3-(4,5-dimethyl-diazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide, MTT) ที่มีสีเหลืองไปเป็นผลิตภัณฑ์ฟอร์มาซาน (formazan) ที่มีสีม่วง ซึ่งจากระดับของสีจะสัมพันธ์กับจำนวนเซลล์ที่มีการหายใจ โดยปฏิกริยานี้จะเกิดที่ไมโทคอนเดรีย (mitochondria) จากนั้นละลายสีภายในเซลล์ด้วยไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulphoxide: DMSO) แล้ววัดระดับของฟอร์มาซานด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ วิธีการนี้เป็นที่นิยม เนื่องจากทำได้ง่าย ใช้ระยะเวลาในการทำน้อย มีประสิทธิภาพ และเป็นวิธีที่สามารถทำซ้ำได้และเชื่อถือได้ (47-49) ข้อควรคำนึงถึงของการใช้วิธีนี้คือค่าการดูดกลืนแสงที่อยู่ในช่วงที่เชื่อถือได้มีค่าไม่เกิน 1.0 และเทคนิคเอ็มทีทีนี้เป็นการบอกถึงการเปลี่ยนแปลงของเมทาบอลิซึมภายในเซลล์ ไม่ได้บ่งบอกถึงปริมาณเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ เนื่องจากเซลล์อาจอยู่ในสภาวะที่พักรอด จึงทำให้การอ่านค่าของเอ็มทีทีไม่สัมพันธ์กับปริมาณเซลล์ที่ยังมีชีวิต ระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาในเซลล์มนุษย์ควรใช้เวลาอย่างน้อย 4 วัน เนื่องจากระยะเวลาที่เซลล์จะแบ่งตัวเป็น 2 เท่าใช้เวลาตั้งแต่ 10 – 85 ชั่วโมง (49)
3. การย้อมสีทริปฟาน บลู (Trypan blue) หลักการคือเซลล์ที่มีชีวิตจะไม่ยอมให้สีซึมผ่านเข้าไปในเซลล์ ดังนั้นเมื่อผสมสารละลายที่มีเซลล์กับสีย้อมแล้วนำไปส่องกล้องจะพบเซลล์ที่ไม่มีชีวิตมีการติดสี ส่วนเซลล์ที่มีชีวิตจะไม่ติดสี ซึ่งวิธีการนี้มีข้อจำกัดคือ ค่าที่ได้จะไม่ตรงกับความจริงเมื่อทิ้งระยะเวลานาน เนื่องจากเซลล์ที่ตายมีเพิ่มมากขึ้น ทำให้ติดสีมากขึ้น (50)
4. วิธีการวัดการสร้างดีเอ็นเอ (DNA) ซึ่งเป็นตัวบ่งบอกถึงการแบ่งตัวของเซลล์ โดยใช้วิธีการเลเบล ด้วยดีเอ็นเอไพริเคอร์เซอร์ ([³H]-Thymidine or 5-bromo-2'-deoxyuridine: [BrdU]) ซึ่งสารนี้จะเข้าไปรวมกับดีเอ็นเอในระยะเอส (S phase) ของวงจรการแบ่งตัวของเซลล์ (cell

cycle) ซึ่งวิธีการนี้มีขั้นตอนยุ่งยากกว่าเทคนิคเอ็มทีทีที่ต้องเลือกระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลเบล เนื่องจากเซลล์อยู่ในระยะการแบ่งตัวของเซลล์ที่แตกต่างกัน (50)

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบที่พบในเนื้อฟันและเนื้อเยื่อในโพรงฟัน

Cells and Extracellular Matrix Components (ECM) Found in Dentin and Pulp		
	Dentin	Pulp
Cells	Odontoblast exclusively	Fibroblasts (pulpoblasts), vascular cells, pericytes, neural cells, histiocytes/ macrophages, dendritic cells, lymphocytes, mast cells and undifferentiated mesenchymal cells
Collagens	Types I and I trimer (98%) Types III (1-2%) and V (1%) (90% of the dentin ECM)	Type I (56%) Type III (41%) and V (2%); Type VI (0.5%) associated with microfibrillin
Non-collagenous Proteins	(10% of the dentin ECM) Phosphorylated matrix proteins (SIBLINGs): DSPP > DSP and DPP DMP-1, BSP, OPN, MEPE Non-phosphorylated matrix proteins: Matrix GLA protein, osteocalcin, osteonectin Proteoglycans (SLRPs) CS/DS PGs: decorin-biglycan (CS-4 81%, CS-6 14%, CS/DS 2%) KS PGs: lumican, fibromodulin, osteoadherin Amelogenin 5-7 kDa Growth factors: TGF- β , ILGF-I and -II, FGF-2, VEGF, PDGF Metalloproteinases: collagenase (MMP-1), gelatinases (MMP-2 and -9), stromelysin-1 (MMP-3), enamelysin (MMP-20), MTI-MMP, TIMP-1 and -3	None BSP, OPN Fibronectin Osteonectin (in tooth germs) Versicans CS-4 and -6, 60%; DS, 34%; KS, 2% Hyaluronic acid BMP-2 Type IA and II receptors for TGF- β , activins, and BMPs MMPs: collagenases, gelatinases, stromelysin-1 TIMPs

	Dentin	Pulp
Non-collagenous Proteins	Alkaline phosphatase Serum-derived proteins: α HS2-glycoprotein, albumin, lipoproteins Phospholipids: Membrane phospholipids (66%) Extracellular mineral-associated phospholipids (33%)	Fibronectin of serum origin Membrane and ECM Phospholipids

ดาวน์ ซินโดรม

ดาวน์ ซินโดรม (Down syndrome) เป็นโรคกรรมพันธุ์ชนิดหนึ่งที่พบได้บ่อยที่สุด โดยมีอุบัติการณ์เท่ากับ 1:700 ของทารกแรกเกิด (13) พบในทุกเชื้อชาติ ผู้ป่วยจะมีโครโมโซมคู่ที่ 21 เกินมา 1 แท่ง (trisomy 21) ลักษณะเฉพาะของดาวน์ ซินโดรม คือ ใบหน้ามักกลม ศีรษะค่อนข้างเล็กและท้ายทอยแบน ตั้งจมูกแบน หางตาเฉียงขึ้นบน นิ้วมือและนิ้วเท้าสั้น กล้ามเนื้ออ่อนแอ มักพบความผิดปกติของระบบหัวใจและระบบเลือด มีการหายใจของแผลซ้ำ มีพัฒนาการการเจริญเติบโตช้า มีภาวะปัญญาอ่อนระดับเล็กน้อยถึงปานกลางร่วมด้วย และมีความผิดปกติของใบหน้าและขากรรไกร (14) ได้แก่

1. การเจริญเติบโตบริเวณกึ่งกลางใบหน้าไม่สมบรูณ์ ส่งผลต่อความยาว ความสูงและความลึกของเพดานปาก รวมทั้งการเจริญของขากรรไกรบนที่น้อยกว่าปกติ (Maxillary hypoplasia) ส่งผลต่อการสบฟันมีแนวโน้มเป็นการสบฟันผิดปกติแบบที่ 3 (Class III malocclusion) อาจพบภาวะฟันหน้าสบเปิด (anterior openbite) หรือภาวะฟันหลังสบไขว้ (posterior Crossbite) และ ฟันซ้อนเกโดยมักพบที่ขากรรไกรบนมากกว่าขากรรไกรล่าง (51-53)
2. กล้ามเนื้อรอบๆ ริมฝีปากอ่อนแอ ได้แก่ กล้ามเนื้อออกบิคูลาริส (orbicularis) ไชโกมาติก (zygomatic) แมสเซเตอร์ (masseter) และเทมโพลาริส (temporalis) ส่งผลให้เกิดความผิดปกติของรูปร่างใบหน้า (54) ทำให้ริมฝีปากปิดไม่สนิทพร้อมกับลิ้นจุกปากเนื่องจากลิ้นมีขนาดใหญ่กว่าปกติ (macroglossia) ส่งผลให้ผู้ป่วยมักจะหายใจทางปากซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคปริทันต์และติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ (55) นอกจากนี้ยังพบลิ้นเป็นร่อง (fissured tongue) และลิ้นอักเสบบ้างที่ (geographic tongue) ได้บ่อยในผู้ป่วยกลุ่มนี้ (17, 56)

3. ฟันขึ้นช้า (delayed eruption) ประมาณร้อยละ 75 ของผู้ป่วยพบการขึ้นของฟันขึ้นทั้งในฟันน้ำนมและฟันแท้ และการขึ้นของฟันอาจไม่เรียงตามลำดับปกติ ในระยะฟันน้ำนม ฟันซี่แรกมักจะขึ้นเมื่ออายุ 12-14 เดือน แต่อาจจะช้าไปจนถึงอายุประมาณ 2 ปี โดยฟันจะขึ้นครบทุกซี่เมื่ออายุประมาณ 4-5 ปี บางครั้งรากฟันน้ำนมจะไม่มี การละลายตัว หรือ อาจมีการละลายช้าซึ่งทำให้ฟันน้ำนมยังคงอยู่จนกระทั่งโตเป็นผู้ใหญ่ ส่วนในฟันแท้ ฟันกรามแท้ซี่ที่ 1 ซึ่งปกติจะขึ้นเมื่ออายุประมาณ 6 ปี อาจจะขึ้นเมื่ออายุประมาณ 8-9 ปี (51)
4. ภาวะไร้ฟันหรือฟันหายแต่กำเนิด (congenitally missing teeth) ในคนปกติพบได้ประมาณ ร้อยละ 2 แต่ในผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมมีอุบัติการณ์ในการเกิดมากถึงร้อยละ 30-60 (56-58) พบในผู้ชายมากกว่าผู้หญิง ในขากรรไกรล่างมากกว่าขากรรไกรบน และด้านซ้ายมากกว่าด้านขวา โดยฟันแท้ที่มักไม่มีการสร้างฟันในผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมมีลักษณะคล้ายกับคนปกติ ได้แก่ ฟันหน้าซี่กลางล่าง ฟันตัดข้างบน ฟันกรามน้อยซี่ที่ 2 บนและล่าง การเกิดภาวะไร้ฟันในฟันเขี้ยวแท้ และ ฟันกรามแท้ซี่ที่ 2 พบได้ทั้งในขากรรไกรบนและล่าง ส่วนฟันกรามแท้ซี่ที่ 1 พบเฉพาะในขากรรไกรล่างเท่านั้น รูปแบบในการเกิดภาวะไร้ฟันนั้นสัมพันธ์กับ ระบบประสาทส่วนปลาย (peripheral nervous system) ซึ่งในผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรม จะมีแขนงของเส้นประสาทน้อยกว่า หรือ เส้นประสาทไม่เจริญเท่ากับคนปกติ รวมทั้งผู้ป่วยมีความผิดปกติของกระดูกอ่อน (58)
5. ฟันเกิน (Supernumerary teeth) ในผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมจะพบอุบัติการณ์ในการเกิดได้ร้อยละ 6 ซึ่งในคนปกติพบได้ประมาณ ร้อยละ 0.3 และในผู้ป่วยคนเดียวกันอาจพบทั้งฟันเกินและฟันหายแต่กำเนิดได้ (57)
6. ความผิดปกติของขนาดและรูปร่างของฟันและรากฟัน (Morphological crown & root abnormality) พบว่าตลอดการเจริญเติบโตของผู้ป่วยกลุ่มนี้จะพบความผิดปกติของฟันอย่างน้อย 1 อย่าง (21) และประมาณร้อยละ 50 ของผู้ป่วยจะพบมีความผิดปกติของฟันอย่างน้อย 3 ซินด์ขึ้นไป (17) ได้แก่
 - 6.1 ภาวะเคลือบฟันเจริญพร่อง พบได้บ่อยในผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรม โดยพบได้ตั้งแต่เป็นอินครีเมนทัล ลายน์ (incremental line) สีของฟันที่ผิดปกติ และฟันที่มีผิวเรียบไปจนถึงผิวไม่เรียบ ซึ่งความผิดปกตินี้ อาจมีสาเหตุจากการเจ็บป่วย หรือการมีไข้เป็นระยะเวลานานในช่วงที่มีการสร้างฟัน (51)
 - 6.2 ภาวะโพรงในตัวของฟันยืดขยายสู่ปลายราก เกิดขึ้นได้บ่อยในผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมมากกว่าผู้ป่วยปกติ โดยความชุกในการเกิดประมาณร้อยละ 0.54-5.6 (59) มักพบบ่อยใน

ฟันกรามล่างแท้ซี่ที่ 2 สาเหตุเกิดจากความล้มเหลวในการเคลื่อนตัวเข้าด้านในของชั้นเยื่อ
บุผิวร่วมกับมีอัตราในการแบ่งตัวของเซลล์น้อย (19, 59)

6.3 สภาพฟันเล็ก พบได้ร้อยละ 35-50 ของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมโดยพบได้ทั้งในฟันน้ำนม
และฟันแท้ (19, 52) ส่วนของตัวฟันจะมีรูปร่างเป็นรูปกรวย และสั้นกว่าปกติ และพบว่าใน
ฟันตัด และ ฟันกรามน้อยมักมีรูเปิดปลายรากที่แตกแขนง (apical ramification) ร้อยละ
10 ของ ผู้ป่วยจะพบฟันรูปหมุดที่ฟันตัดบนซี่ข้าง (Peg-shaped maxillary lateral
incisor) และอาจพบฟันกรามน้อยล่างมีขนาดเล็กลงแต่รูปร่างของฟันปกติ (60) ฟันที่มี
ขนาดเล็กทำให้พบช่องว่างระหว่างฟันได้บ่อยในผู้ป่วยกลุ่มนี้ (55)

6.4 รูปร่างฟันผิดปกติ (crown variants) เช่น ฟันตัดหน้าบนด้านลิ้นมีรูปร่างคล้ายพลั่ว
(shovel-shaped maxillary incisor) ฟันเขี้ยวล่างมีการเปลี่ยนแปลงบริเวณพื้นเอียงด้าน
ปุ่มฟัน (cuspal incline plane) ฟันกรามบนไม่พบปุ่มด้านลิ้นไกลกลาง (distolingual
cusp) และในฟันกรามล่างมีการเปลี่ยนตำแหน่งของปุ่มด้านไกลกลาง (distal cusp) ฟัน
กรามน้อยล่างมีพื้นเอียงด้านไกลกลาง (distal inclined plane) ที่กว้างมากกว่าฟันปกติ
(61, 62)

ลักษณะความผิดปกติของขนาดและรูปร่างของฟันของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรม เชื่อว่าเกิด
จากการแบ่งตัวที่ลดลงของเซลล์เดนทัล ปาปิลาในระหว่างการสร้างตัวอ่อน (embryogenesis) ที่เป็น
ผลจากภาวะบกพร่องทางการเจริญเติบโตของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมส่งผลให้เซลล์มีอัตราการ
แบ่งตัวช้ากว่าปกติ (19, 61) และจากการศึกษาเซลล์ต้นกำเนิดในระยะตัวอ่อนของผู้ป่วย
ดาวน์ ซินโดรม โดยนำเซลล์มาเพาะเลี้ยงเพื่อเหนี่ยวนำให้แปรสภาพเป็นเซลล์ประสาท พบว่าเซลล์
ของดาวน์ ซินโดรม มีอัตราการแบ่งตัวต่ำกว่า สามารถแปรสภาพเป็นเซลล์ประสาทจำนวนน้อย
กว่าและมีความยาวของเซลล์ประสาท (neurite length) สั้นกว่าของเซลล์ของคนปกติ (20)
อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาใดที่แสดงหลักฐานอย่างชัดเจนถึงสาเหตุความผิดปกติของฟันของ
ผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมว่าเป็นผลโดยตรงของความผิดปกติของเซลล์หรือเป็นผลทางอ้อมจากปัจจัย
แวดล้อมอื่นๆ รวมทั้งยังไม่มีการศึกษาความสามารถในการซ่อมแซมเนื้อฟันของเซลล์เนื้อเยื่อใน
โพรงฟันของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรม ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบ
อัตราการแบ่งตัวและความสามารถในการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งของเซลล์เนื้อเยื่อ
ในโพรงฟันน้ำนมของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรม เทียบกับเด็กปกติ เพื่อสะท้อนให้เห็นถึงความสามารถ
ในการซ่อมแซมตนเองของเนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนม และเป็นพื้นฐานเพื่อการศึกษาในอนาคตที่
อาจนำไปสู่ความรู้ความเข้าใจถึงสาเหตุความผิดปกติของฟันที่เกิดขึ้นในผู้ป่วย รวมทั้งอาจนำไปสู่
การพัฒนาวิธีการรักษาทางทันตกรรมแก่ผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

■ ประชากรเป้าหมาย

เซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อในโพรงพินนํานมที่ไม่มีรอยผุทะลุถึงโพรงประสาทฟัน และรอยโรคที่ปลายรากฟันของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมและเด็กปกติที่มีสุขภาพแข็งแรง ไม่มีโรคประจำตัว

■ ประชากรตัวอย่าง

กลุ่มศึกษา

เซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อในโพรงพินนํานมที่ไม่มีรอยผุทะลุถึงโพรงประสาทฟัน และรอยโรคที่ปลายรากฟันของผู้ที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นดาวน์ ซินโดรม ที่มารับการถอนพินนํานมตามแผนการรักษาทางทันตกรรมที่สถาบันราชานุกูล และคลินิกทันตกรรมเด็ก คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กลุ่มเปรียบเทียบ

เซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อในโพรงพินนํานมที่ไม่มีรอยผุทะลุถึงโพรงประสาทฟัน และรอยโรคที่ปลายรากฟันของผู้ป่วยเด็กปกติ ที่มารับการถอนพินนํานมตามแผนการรักษาทางทันตกรรมที่คลินิกทันตกรรมเด็ก คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หมายเหตุ

พินนํานมที่ใช้ในการวิจัยต้องได้รับความยินยอมจากผู้ปกครองให้นำไปเพาะเลี้ยง เซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันเพื่อนำไปใช้ในการวิจัย โดยลงนามในเอกสารยินยอมโดยได้รับการบอกกล่าวและเต็มใจ (Informed consent)

จำนวนตัวอย่าง

เซลล์ที่นำมาใช้ในการทดลองได้จากเนื้อเยื่อในโพรงพินนํานมของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรม (กลุ่มศึกษา) และเด็กปกติ (กลุ่มเปรียบเทียบ) กลุ่มละ 3 ซี่จากตัวอย่างที่ไม่ใช่บุคคลเดียวกัน โดยในแต่ละการทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง

สถานที่ทำการวิจัย

หน่วยปฏิบัติการวิจัยเนื้อเยื่ออินทรีย์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

■ วัสดุ

1. อาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็ม (Dulbecco's Modified Eagle Medium: DMEM, Gibco, USA) ชนิดที่มีฟีนอลเรด (Phenol red) และไม่มีฟีนอลเรด
2. ซีรัมจากฟิโตสวัว (Fetal bovine serum; FBS, Gibco, USA)
3. แอลกลูตามีน (L-glutamine, Invitrogen, USA)
4. เพนนิซิลินจีโซเดียม (Penicillin G sodium, Invitrogen, USA)
5. สเตรปโตมัยซินซัลเฟต (Streptomycin sulfate, Invitrogen, USA)
6. แอมโฟเทอริซินบี (Amphotericin, Invitrogen, USA)
7. เอนไซม์ทริปซินอีดีทีเอไร้อยู่ละ 0.25 (0.25% Trypsin-EDTA, Gibco, USA)
8. เอนไซม์คอลลาจีเนส ชนิดที่ 1 (Type I collagenase, Gibco, USA)
9. เบต้า กลีเซอโรฟอสเฟต (β -glycerophosphate)
10. กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid)
11. เดกซาเมทาโซน (Dexamethasone)
12. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลาเยนที่ปราศจากเชื้อ (Sterile Phosphate Buffer Saline: PBS)
13. น้ำกลั่น
14. เอ็มทีที (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide: MTT, Sigma, USA)
15. ดีเอ็มเอสโอ (Dimethylsulfoxide: DMSO)
16. ทริสไฮโดรคลอไรด์ (Tris-Hydrochloride: Tris-HCl)
17. แมกนีเซียมคลอไรด์ (Magnesiumchloride: MgCl₂)
18. ไตรตอนเอ็กซ์-100 (Triton-X-100)
19. พาราไนโตรฟีนิลฟอสเฟต (p-nitrophenyl phosphate)
20. ชุดวัดปริมาณโปรตีนบีซีเอ™ ประกอบด้วยสารละลายบีซีเอ™ ชนิดเอ และบี (BCA™ protein assay reagent A และ B, Pierce, USA)
21. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide)

22. สารละลายไตรซอล (TRIzol, Gibco, USA)
23. คลอโรฟอร์ม (Chloroform)
24. ไอโซโพรพานอล (Isopropanol)
25. อะกาโรส (Agarose)
26. ไพรมเมอร์สำหรับกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส (Primers for glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase, GAPDH)
27. ไพรมเมอร์สำหรับยีนคอลลาเจน ชนิดที่ 1 ยีนฮิสติโอแคลซิน ยีนคอร์บายติงแฟกเตอร์ 1 และยีนอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส
28. น้ำปราศจากเอนไซม์นิวคลีเอส (Nuclease free water) –เอนไซม์ที่ย่อยกรดนิวคลีอิก
29. ชุดสังเคราะห์ดีเอ็นเอ
30. เอนไซม์แทคโพลีเมอเรส (Taq polymerase) –เอนไซม์สำหรับขยายสัญญาณใน PCR
31. ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (Deoxyribonucleotidetriphosphate, dNTP)
32. แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (Absolute ethanol)
33. เมทานอล (Methanol)
34. อลิซารินเรด (Alizarin red)
35. แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (Ammonium hydroxide)
36. ซีทิลไพริดีเนียม คลอไรด์ (Cetylpyridinium chloride)
37. โซเดียมฟอสเฟต (Sodium phosphate)
38. 2-อะมิโน-2-เมทิล-1-โพรพานอล (2-amino-2-methyl-1-propanol)
39. หลอดพลาสติกสำหรับเก็บพื้นมีฝาเกลียวขนาด 5 มล.
40. หลอดเหวี่ยงขนาด 0.5 และ 1.5 มิลลิลิตร (microcentrifuge tube)
41. หลอดพีซีอาร์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร (PCR tube)
42. ทิปใช้ครั้งเดียวทิ้งสำหรับปิเปตอัตโนมัติขนาด 10 200 1000 ไมโครลิตร (Disposable pipette tip)
43. ถุงมือยางใช้ครั้งเดียวทิ้ง (Disposable latex glove)
44. จานเลี้ยงขนาด 35 และ 60 มิลลิเมตร (35, 60-mm culture dish)
45. จานเลี้ยงเซลล์แบบ 6 12 และ 24 หลุม (6, 12 and 24-well plate)

▪ อุปกรณ์

1. ตู้บเพาะเลี้ยงเซลล์ (CO₂ incubator)
2. ตู้ปฏิบัติการปลอดเชื้อ (Laminar flow Hood)
3. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV/Visible spectrophotometer)
4. เครื่องสั่นไฟฟ้า (Vortex; Genie2; Scientific Industries, USA)
5. เครื่องเหวี่ยง (Centrifuge; Sigma, 101; Western Germany)
6. เครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง (High speed centrifuge; Sorvall, Super T 21; Dupont Company, USA)
7. เครื่องเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge; Hero lab, Microcen 13; Hero lab GmbH, Germany)
8. เครื่องหมุนความเร็วต่ำ (Low speed rotor)
9. เครื่องเขย่าสาร (Orbital shaker; KS130, IKA®, USA)
10. แผ่นสไลด์นับจำนวนเซลล์ (Hemocytometer)
11. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
12. เครื่องนำความร้อนชนิดหลุม (Heating block, Major science, USA)
13. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Polymerase chain reaction, PCR: PCR system Tpersonal, Biometra, Germany)
14. เครื่องแยกอาร์เอ็นเอด้วยไฟฟ้าชนิดแนวนอน (Horizontal electrophoresis apparatus, Biorad, USA)
15. เครื่องชั่งไฟฟ้า (analytical balance)
16. ปิเปตอัตโนมัติ (automatic pipet)
17. คิวเวทชนิดควอซ (quartz cuvette; Optiglass Ltd., Russia)
18. คิวเวท (disposable cuvette)
19. กรรไกรชนิดสแตนเลสตัดเนื้อเยื่อ
20. ปากคีบสแตนเลสชนิดปลายแหลม
21. กล้องจุลทรรศน์ (Phase contrast light microscope)
22. กล้องถ่ายภาพฟูจิฟิล์ม (Fujifilm)

การเก็บรวบรวมข้อมูล

■ การเก็บพันตัวอย่างก่อนการเพาะเลี้ยงเซลล์

ภายหลังจากถอนพันเก็บพันตัวอย่างใส่ลงในหลอดพลาสติกที่มีฝาเกลียวปิดสนิท ภายในบรรจุอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟินอลเรด โดยเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและนำมาเพาะเลี้ยงเซลล์ภายใน 24 ชั่วโมง

■ การเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell culture)

ทำความสะอาดพันด้วย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์โซลยอนที่ปราศจากเชื้อ เพื่อกำจัดเลือดและสิ่งสกปรกออกจากตัวพัน จากนั้นดึงเนื้อเยื่อออกจากโพรงพัน นำมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 1x1 มิลลิเมตร นำไปย่อยด้วยเอนไซม์คอลลาจีเนส ชนิดที่ 1 ที่ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยวางบนเครื่องหมุนความเร็วต่ำ จากนั้นนำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 2000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และนำส่วนตกตะกอนไปเพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงขนาด 35 มิลลิเมตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟินอลเรด โดยเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์วันเว้นวัน จนกระทั่งเซลล์เติบโตเต็มจานเลี้ยง เซลล์จะถูกถ่ายลงจานใหม่ โดยการย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน-อีดีทีเอ ซึ่งจะย่อยเซลล์ให้หลุดออกจากพื้นผิวของจานเลี้ยง นับจำนวนเซลล์ด้วยแผ่นสไลด์นับเซลล์ (Hemocytometer) จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปเพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงขนาด 60 มิลลิเมตรที่ความหนาแน่นประมาณ 5×10^4 เซลล์/ตารางเซนติเมตร เมื่อเซลล์มีจำนวนมากขึ้นและมีการเรียงตัวหนาแน่นในจานเพาะเลี้ยง จึงทำการหว่านเซลล์ใหม่ทุก 5-7 วัน เซลล์ที่ใช้สำหรับการทดลองเป็นเซลล์รุ่นที่ 3-10

■ การวัดปริมาณเซลล์ด้วยเทคนิคเอ็มทีที (MTT assay)

เซลล์เนื้อเยื่อในโพรงพันนำมถูกหว่านลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ปริมาณ 3×10^4 เซลล์ต่อหลุม จำนวน 18 หลุม โดยแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 6 หลุม ตามระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเซลล์ ได้แก่ 24 48 และ 72 ชั่วโมง โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟินอลเรด และเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์วันเว้นวัน เมื่อครบตามกำหนดเวลา คือ 24 48 และ 72 ชั่วโมง อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนเป็นดีเอ็มอีเอ็มชนิดที่ไม่มีฟินอลเรด และเติมสารละลายเอ็มทีทีที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกแล้วเติมดีเอ็มเอสไอปริมาณ 900

ไมโครลิตรและสารละลายไกลซีนบัฟเฟอร์ปริมาณ 125 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลอดของจานเลี้ยง เซลล์เพื่อละลายผลิตภัณฑ์ฟอร์มาซาน (formazan) ที่เซลล์สร้างขึ้นจากสารละลายเอ็มที่ที่ เขย่าให้สีของ สารละลายเข้ากัน และนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาว คลื่นแสง 570 นาโนเมตร จากนั้นแปลงค่าการดูดกลืนแสงเป็นจำนวนเซลล์ตามกราฟมาตรฐานที่ สร้างขึ้นจากการวัดความสามารถในการเปลี่ยนเอ็มที่ที่เป็นผลิตภัณฑ์ฟอร์มาซานของเซลล์ที่ทราบ จำนวน และปรับเป็นจำนวนเซลล์

■ การวัดค่าการทำงานของเอนไซม์ อัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส

เซลล์เนื้อเยื่อในโพรงพินน้ำนมถูกหว่านลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ปริมาณ 5×10^4 เซลล์ต่อหลุม จำนวน 12 หลุม เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟีนอลเรด เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อ แข็ง แบ่งเซลล์ออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 6 หลุมตามระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเซลล์ ได้แก่ 72 และ 96 ชั่วโมง โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์วันเว้นวัน เมื่อครบกำหนดเวลาทำละลายเซลล์ในจาน เลี้ยงเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์สกัดปริมาณ 120 ไมโครลิตร (extraction buffer: ทริสไฮโดรคลอไรด์ (Tris-HCl) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ แมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl₂) ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ไตร ตอนเอ็กซ์-100 (Triton-X-100) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และมีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 10) นำ สารละลายเซลล์มาวัดปริมาณเอนไซม์อัลคาไลน์ ฟอสฟาเตสและปริมาณโปรตีนทั้งหมด

การวัดปริมาณเอนไซม์อัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส ทำโดยผสมสารละลายเซลล์ปริมาณ 100 ไมโครลิตร กับสารละลายของพาราไนโตรฟีนิลฟอสเฟตปริมาณ 110 ไมโครลิตร (p-nitrophenyl phosphate: 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของพาราไนโตรฟีนิลฟอสเฟต 0.1 โมลาร์ของ 2-อมีโน-2-เมธิล-1-โพรพานอล (2-amino-2-methyl-1-propanol) 2 มิลลิโมลาร์ของแมกนีเซียมคลอไรด์ และ มีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 10.5) โดยพาราไนโตรฟีนิลฟอสเฟตจะเป็นซับสเตรท (substrate) ของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส นำส่วนผสมนี้ไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเปลี่ยนพาราไนโตรฟีนิลฟอสเฟตให้เป็นพาราไนโตร ฟีนอล (p-nitrophenol) ที่เป็นสารที่มีสี ปฏิกริยาถูกหยุดโดยการเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาณ 900 ไมโครลิตร แล้วนำสารละลายไป อ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่นแสง 410 นาโนเมตร นำ ค่าที่ได้ไปคำนวณเป็นปริมาณเอนไซม์ (ไมโครกรัม) โดยเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของ สารละลายพาราไนโตรฟีนอลที่ใช้เป็นมาตรฐาน

วัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดโดยใช้ชุดวัดโปรตีนบีซีเอ™ (BCA protein assay) โดยนำ สารละลายเซลล์จำนวน 20 ไมโครลิตรผสมกับสารละลายบีซีเอ ชนิดเอ จำนวน 1 มิลลิลิตร และ ชนิดบี จำนวน 20 ไมโครลิตร นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำ สารละลายไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่นแสง 562 นาโนเมตร ค่าที่ได้ถูกนำไปคำนวณปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัม) โดยเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนอัลบูมินที่ใช้เป็นโปรตีนมาตรฐาน ค่าการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส คำนวณเป็นสัดส่วนของปริมาณเอนไซม์อัลคาไลน์ ฟอสฟาเตสต่อปริมาณโปรตีน

■ การวิเคราะห์ปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ของยีนคอลลาเจน ชนิดที่ 1 ยีน ออสติโอแคลซิน ยีนคอร์บายติงแฟกเตอร์ และยีนอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสด้วยวิธีอาร์ที-พีซีอาร์ (RT-PCR)

การเตรียมเซลล์สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอตั้งต้น

เซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันถูกหว่านลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 6 หลุม ปริมาณ 2×10^5 เซลล์ ต่อหลุม จำนวน 1 หลุม เพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟีนอลเรด เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟีนอลเรดวันเว้นวัน

การเตรียมเซลล์สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง

เซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันถูกหว่านลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 6 หลุม ปริมาณ 2×10^5 เซลล์ ต่อหลุม จำนวน 2 หลุม เพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟีนอลเรด เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง 1 หลุม ส่วนอีกหลุมเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟีนอลเรด เพาะเลี้ยงในตู้บเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 5 วัน และเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์วันเว้นวัน

การวิเคราะห์ปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอด้วยวิธีอาร์ที-พีซีอาร์

เมื่อครบตามกำหนดเวลาดังกล่าว เซลล์ถูกทำลายด้วยสารละลายไตรซอล (TRIzol) เพื่อเก็บอาร์เอ็นเอจากเซลล์ตามวิธีการบริษัทแนะนำ จากนั้นวัดปริมาณอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ด้วย เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร อาร์เอ็นเอจำนวน 1 ไมโครกรัม จากแต่ละกลุ่มทดลองถูกนำไปผ่านกระบวนการรีเวิร์ส ทรานสคริปเตส (reverse transcriptase: RT) เพื่อสร้างคอมพลีเมนต์อาร์เอ็นเอ (complementary DNA: cDNA) แล้วขยายสัญญาณด้วย เทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction: PCR) โดยใช้เอนไซม์แทคโพลีเมอเรส (Taq polymerase) และไพรเมอร์ (primer) ที่จำเพาะต่อเอ็มอาร์เอ็นเอของยีนคอลลาเจน ชนิดที่ 1 ยีน

ออสติโอแคลซิน ยีนคอร์บายดิ้งแฟกเตอร์ 1 (Cbfa1) และยีนอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสโดยมีลำดับของเบสดังแสดงในตารางที่ 2 ใช้ยีนกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส (GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) เป็นตัวควบคุมภายในของการทดลอง (internal control) สำหรับการตรวจสอบว่าปริมาณของอาร์เอ็นเอตั้งต้นที่ใช้มีปริมาณเท่ากัน สัญญาณที่ได้จากพีซีอาร์ถูกวิเคราะห์โดยการแยกด้วยไฟฟ้าในอกาโรสเจล (agarose gel) และบันทึกภาพด้วยกล้องดิจิทัลเพื่อนำไปอ่านค่าความเข้มด้วยโปรแกรมไซออน อิมเมจ (Scion Image-Release alpha 4.0.3.2)

ตารางที่ 2 ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเอ็มอาร์เอ็นเอของคอลลาเจน ชนิดที่ 1 (Type I collagen) ยีนออสติโอแคลซิน (osteocalcin) ยีนคอร์บายดิ้งแฟกเตอร์ 1 (Core binding factor1) ยีนอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (ALP) และยีนกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส (GAPDH)

Primer	Primer sequence	Basepair/ Cycle
Type I Collagen (Col I)	Forward: 5' CTGGCAAAGAAGGCGGCAAA 3' Reverse: 5' CTCACCACGATCACCCTCT 3'	502/ 24
Osteocalcin (OCN)	Forward: 5' ATGAGAGCCCTCACACTCCTC 3' Reverse: 5' GCCGTAGAAGCGCCGATAGGC 3'	293/ 35
Core binding factor1 (Cbfa1)	Forward: 5' CCCCACGACAACCGCACCAT 3' Reverse: 5' CACTCCGGCCCAAAATC 3'	288/ 28
Alkaline phosphatase (ALP)	Forward: 5' CGAGATACAAGCACTCCCCTTC 3' Reverse: 5' CTGTTTCAGCTCGTACTGCATGTC 3'	120/ 35
GAPDH	Forward: 5' TGAAGGTCGGAGTCAACGGAT 3' Reverse: 5' TCACACCCATGACGAACATGG 3'	395/ 22

■ **การหาปริมาณตะกอนแคลเซียมด้วยสีอิลิซารินเรด เอส (Alizarin red S)**

เซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันถูกหว่านลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 12 หลุม ปริมาณ 10^5 เซลล์ต่อหลุม จำนวน 6 หลุม เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟีนอลเรด เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แบ่งเซลล์ออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 2 หลุมตามระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเซลล์ ได้แก่ 7 10 และ 14 วัน โดยในแต่ละกลุ่มเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง 1 หลุม ส่วนอีกหลุมเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟีนอลเรด เพาะเลี้ยงในตู้บเพาะเลี้ยงเซลล์โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์วันเว้นวัน เมื่อครบกำหนดเวลาตรึงเซลล์ด้วยแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (absolute ethanol) เป็นเวลา 15 นาที และย้อมด้วยสารละลายยอิลิซารินเรด โดยใช้ยอิลิซารินเรดร้อยละ 1 ละลายในแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 0.1 ที่มีค่าความเป็นกรดต่าง 6.5 (0.1% NH_4OH , pH6.5) ย้อมเซลล์เป็นเวลา 5 นาที และล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น จะปรากฏสีแดงติดบนตะกอนแคลเซียมฟอสเฟต เต็ม 1 มิลลิเมตรของซีทิลไพริดีเนียม คลอไรด์ ร้อยละ 10 (Cetylpyridinium chloride) ใน 10 มิลลิโมลาร์ไซเดียมฟอสเฟตลงในแต่ละหลุมของจานเลี้ยงเซลล์เพื่อละลายผลิตภัณฑ์ที่ติดสีอิลิซารินเรด จากนั้นจึงนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่นแสง 570 นาโนเมตร

การวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการทดลองแสดงข้อมูลแบบสถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistics) ดังนี้

- อัตราการแบ่งตัวของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง แสดงเป็นค่าเฉลี่ยของปริมาณเซลล์ \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ในแต่ละระยะเวลาที่เพาะเลี้ยง
- ค่าการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส แสดงเป็นค่าเฉลี่ยการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ในแต่ละระยะเวลาที่เพาะเลี้ยง
- ปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอของยีนคอลลาเจน ชนิดที่ 1 ยีนออสติโอแคลซิน ยีนคอร์บายอิงแฟกเตอร์ 1 และยีนอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส แสดงเป็นสัดส่วนค่าเฉลี่ยความเข้มของ PCR product ของยีนทั้ง 4 ยีน normalized ต่อความเข้มของ PCR product ของยีนกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของแต่ละกลุ่ม
- ปริมาณตะกอนแคลเซียมที่ย้อมด้วยสีอิลิซารินเรด เอส แสดงเป็นค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนแสง \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของแต่ละกลุ่ม

สถิติใช้วิธีทดสอบทีชนิดตัวอย่างอิสระ (Independence sample t-test) หรือวิธีทดสอบของแมน-วิทนี ยู (Mann-Whitney U test) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ขึ้นกับการกระจายของ

ข้อมูล โดยทดสอบการกระจายของข้อมูลด้วยวิธีโคลโมโกรอฟ-สเมอร်นอฟ (One-sample Kolmogorov-Smirnov test) โดยใช้โปรแกรมสถิติเอสพีเอสเอส 13.0 (SPSS 13.0) เพื่อ

- เปรียบเทียบอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ระหว่างกลุ่มศึกษาและกลุ่มเปรียบเทียบ ทำโดยนำค่าเฉลี่ยปริมาณเซลล์ที่ได้ในกลุ่มศึกษา (เซลล์เนื้อเยื่อในโพรงพินนํานมของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรม: DS) มาเปรียบเทียบกับร้อยละของกลุ่มเปรียบเทียบ (เซลล์เนื้อเยื่อในโพรงพินนํานมของเด็กปกติ: NM) โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยปริมาณเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงพินนํานมของเด็กปกติที่มีค่าน้อยที่สุดเป็นร้อยละ 100
- เปรียบเทียบค่าการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส และปริมาณตะกอนแคลเซียมระหว่างกลุ่มศึกษาและกลุ่มเปรียบเทียบ ทำโดยนำค่าเฉลี่ยการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนแสงของปริมาณตะกอนแคลเซียม ที่ได้ในกลุ่มศึกษามาเปรียบเทียบกับกลุ่มเปรียบเทียบ โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและค่าเฉลี่ยค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงพินนํานมของเด็กปกติที่มีค่าน้อยที่สุดเป็น 1
- เปรียบเทียบสัดส่วนค่าเฉลี่ยความเข้มของ PCR product ของยีนคอลลาเจน ชนิดที่ 1 ยีนออสติโอแคลซิน ยีนคอร์บายอิงแฟกเตอร์ 1 และยีนอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส normalized ต่อความเข้มของ PCR product ของยีนกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส ระหว่างกลุ่มศึกษา และกลุ่มเปรียบเทียบ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

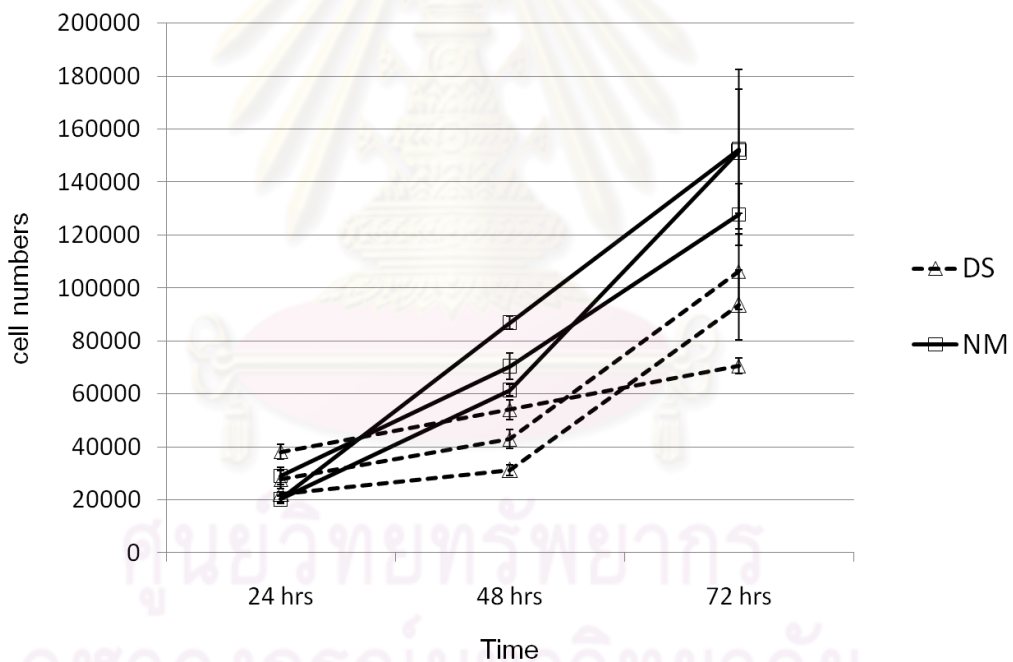
ผลการวิเคราะห์

(รายละเอียดการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแสดงไว้ในภาคผนวก)

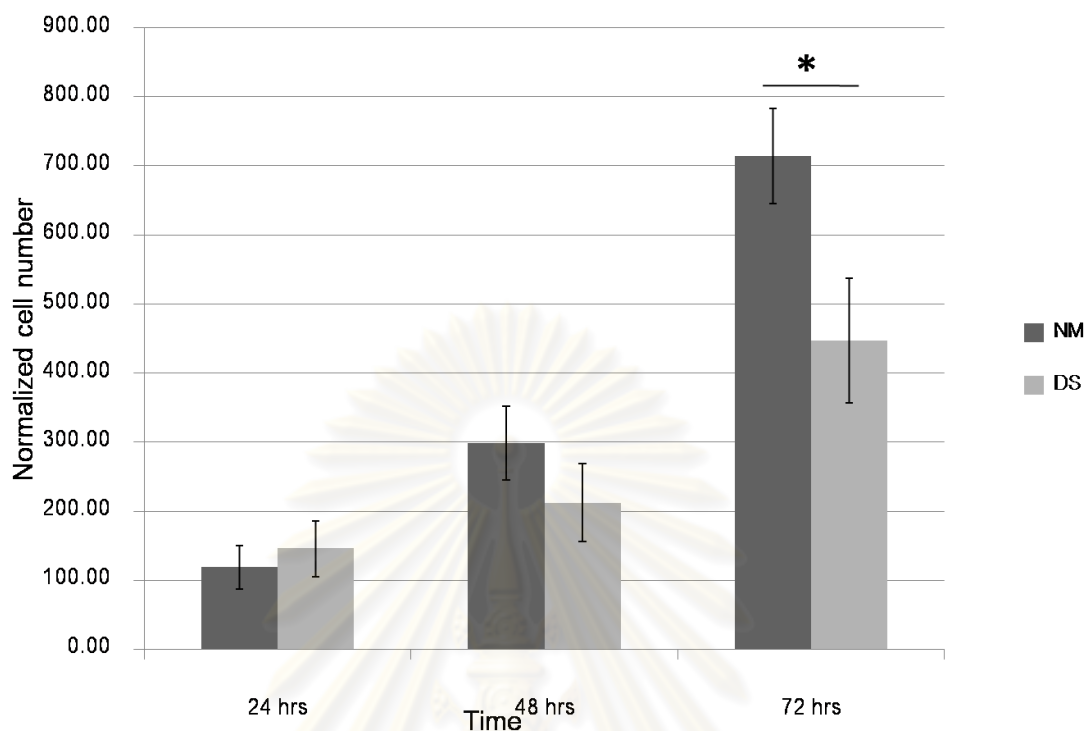
ผลการเปรียบเทียบ

1. การศึกษาอัตราการแบ่งตัวของเซลล์

ผลการศึกษาอัตราการเจริญของเซลล์ พบว่าเซลล์ทั้ง 2 กลุ่ม สามารถเพิ่มจำนวนมากขึ้นตามระยะเวลาที่เลี้ยงจาก 24 ถึง 72 ชั่วโมง (ภาพที่ 1) อย่างไรก็ตามเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงพินน้านมของผู้ป่วย ดาวน์ ซินโดรมที่เพาะเลี้ยงในระยะเวลา 72 ชั่วโมง มีอัตราการแบ่งตัวที่ช้ากว่าในกลุ่มเด็กปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ภาพที่ 2)



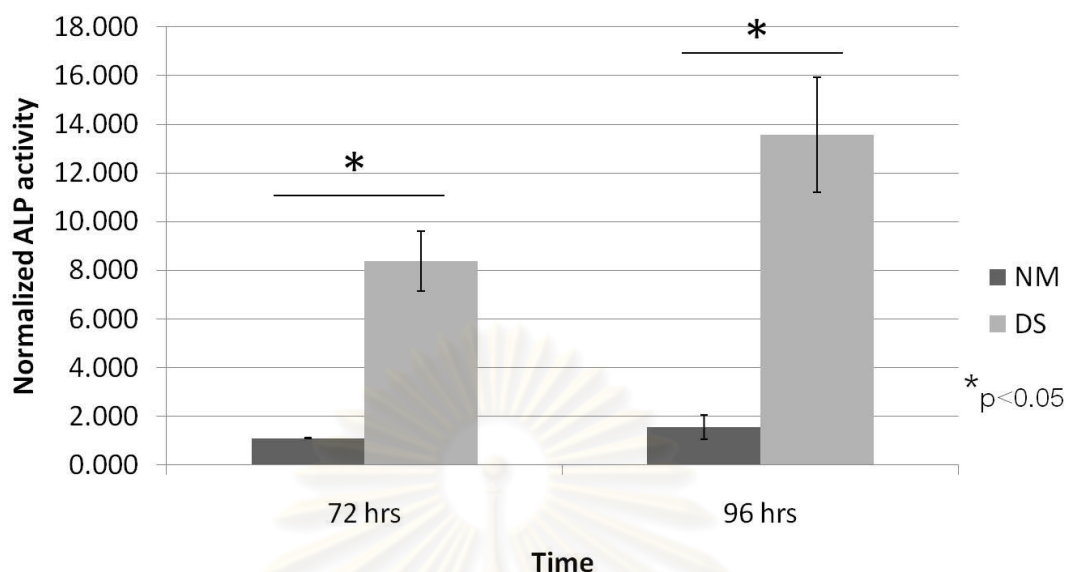
ภาพที่ 1 กราฟแสดงปริมาณเซลล์ที่วัดด้วยเทคนิคเอ็มทีที (MTT assay) ของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงพินน้านมของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมและเด็กปกติ โดยแกนตั้งแสดงปริมาณเซลล์ และแกนนอนแสดงระยะเวลาที่เพาะเลี้ยง (DS: กลุ่มผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรม NM: กลุ่มเด็กปกติ)



ภาพที่ 2 กราฟแสดงอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ที่วัดด้วยเทคนิคเอ็มทีที (MTT assay) ของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงพินนํ้านมของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมเทียบกับเด็กปกติ โดยแกนตั้งแสดงร้อยละ ค่าเฉลี่ยปริมาณเซลล์ซึ่งกำหนดให้ค่าเฉลี่ยปริมาณเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงพินนํ้านมของเด็กปกติที่มีค่าน้อยที่สุดเป็น 100 และแกนอนแสดงระยะเวลาที่เพาะเลี้ยง (NM: กลุ่มเด็กปกติ DS: กลุ่มผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรม *: $p < 0.05$)

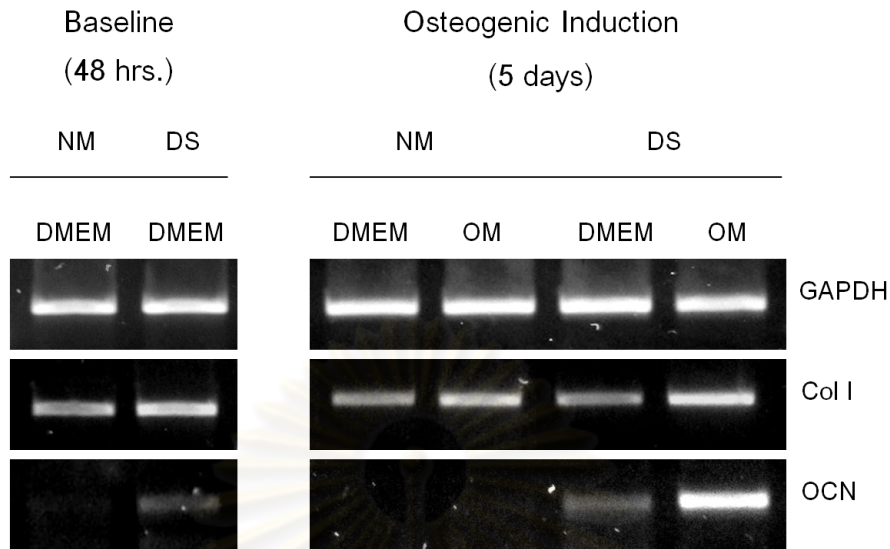
2. การศึกษาค่าการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส

เมื่อนำเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงพินนํ้านมมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง เป็นเวลา 72 และ 96 ชั่วโมง แล้วนำสารละลายเซลล์มาหาค่าการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส พบว่า เซลล์เนื้อเยื่อในโพรงพินนํ้านมของผู้ป่วย ดาวน์ ซินโดรมมีค่าเฉลี่ยการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสที่ระยะเวลา 72 และ 96 ชั่วโมงมากกว่ากลุ่มเด็กปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยคิดเป็น 8.395 ± 1.229 และ 13.568 ± 2.36 เท่าของกลุ่มเด็กปกติ (ภาพที่ 3)

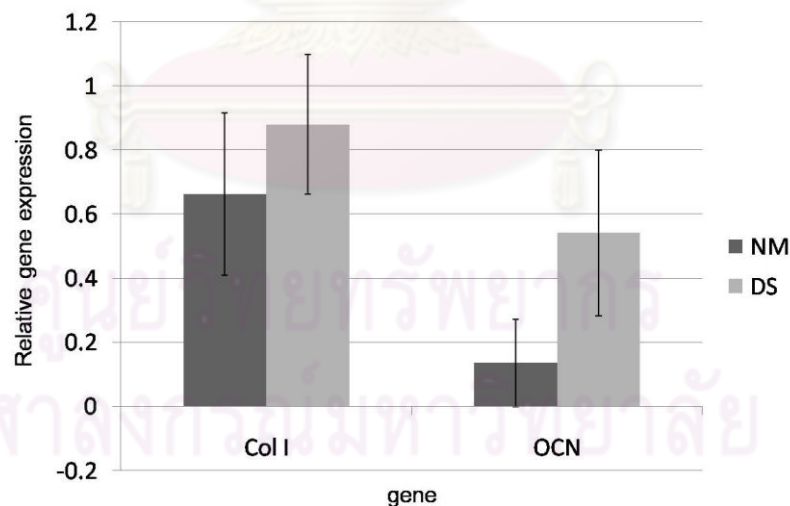


ภาพที่ 3 กราฟแสดงจำนวนเท่าของค่าเฉลี่ยการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงพินน้ำนมของผู้ป่วยดาวน์ซินโดรมเทียบกับเด็กปกติ โดยแกนตั้งแสดงค่าการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสซึ่งกำหนดให้ค่าเฉลี่ยการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงพินน้ำนมของเด็กปกติที่มีค่าน้อยที่สุดเป็น 1 และแกนนอนแสดงระยะเวลาที่เพาะเลี้ยง (NM: กลุ่มเด็กปกติ DS: กลุ่มผู้ป่วยดาวน์ซินโดรม *: $p < 0.05$)

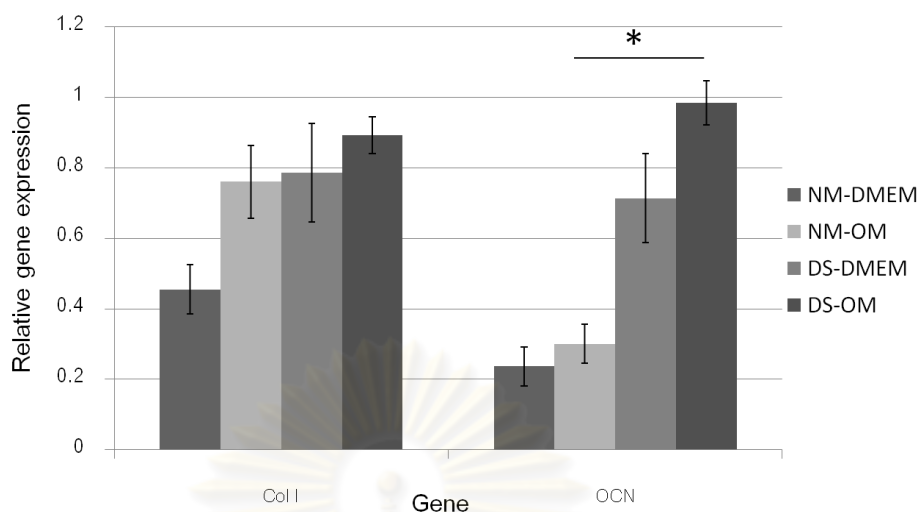
- การศึกษาปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอของยีนคอลลาเจน ชนิดที่ 1 และยีนออสติโอแคลซิน เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟินอลเรดเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนตั้งต้นพบว่าเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงพินน้ำนมของผู้ป่วยดาวน์ซินโดรมมีการแสดงออกของยีนคอลลาเจนชนิดที่ 1 และยีนออสติโอแคลซินไม่แตกต่างจากเซลล์ของเด็กปกติ ($p < 0.05$) (ภาพที่ 4 และ 5) อย่างไรก็ตามเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง เป็นเวลา 5 วัน เซลล์เนื้อเยื่อในโพรงพินน้ำนมของผู้ป่วยดาวน์ซินโดรมมีรูปแบบการแสดงออกของยีนคอลลาเจนชนิดที่ 1 ไม่แตกต่างจากเซลล์ของเด็กปกติ แต่มีรูปแบบการแสดงออกของยีนออสติโอแคลซินในระดับที่สูงกว่าเซลล์ของเด็กปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ภาพที่ 4 และ 6)



ภาพที่ 4 การแสดงออกของยีนที่แสดงถึงความสามารถในการสร้างเนื้อเยื่อแข็งโดยการวิเคราะห์ด้วยวิธีอาร์ที-พีซีอาร์ (RT-PCR) (NM: กลุ่มเด็กปกติ DS: กลุ่มดาวน์ซินโดรม DMEM: กลุ่มที่เพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟินอลเรด OM: กลุ่มที่เพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง Col I: ยีนคอลลาเจนชนิดที่ 1 OCN: ยีนออสติโอแคลซิน GAPDH: ยีนกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส)



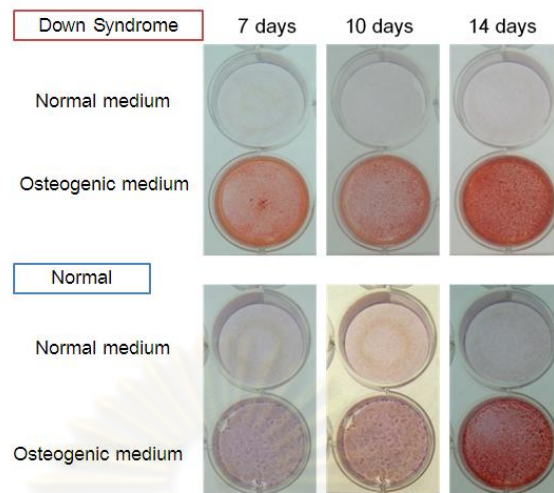
ภาพที่ 5 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยความเข้มของยีนคอลลาเจน ชนิดที่ 1 (Col I) และออสติโอแคลซิน (OCN) โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธีอาร์ที-พีซีอาร์ (RT-PCR) เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟินอลเรด เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยแกนนั่งแสดงค่าเฉลี่ยความเข้มของยีนต่อค่าเฉลี่ยความเข้มของยีนกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส (GAPDH) และแกนนอนแสดงชนิดยีน (NM: กลุ่มเด็กปกติ DS: กลุ่มดาวน์ซินโดรม)



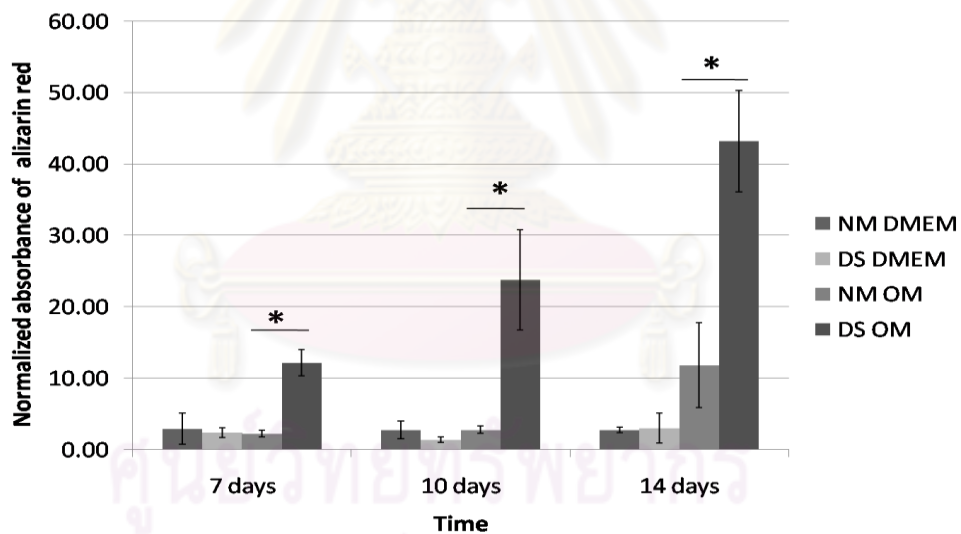
ภาพที่ 6 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยความเข้มของยีนคอลลาเจน ชนิดที่ 1 และออสติโอแคลซินโดยการวิเคราะห์ด้วยวิธีอาร์ที-พีซีอาร์ (RT-PCR) เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟีนอลเรดและอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง เป็นเวลา 5 วัน โดยแกนตั้งแสดงค่าเฉลี่ยความเข้มของยีนต่อค่าเฉลี่ยความเข้มของยีนกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส (GAPDH) และแกนนอนแสดงชนิดยีน (NM: กลุ่มเด็กปกติ DS: กลุ่มดาวน์ซินโดรม DMEM: กลุ่มที่เพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟีนอลเรด OM: กลุ่มที่เพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง *: $p < 0.05$)

4. การศึกษาปริมาณตะกอนแคลเซียมที่ย้อมด้วยสียอลิซารินเรด เอส

เมื่อนำเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงพินน่านมมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟีนอลเรดและอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง เป็นเวลา 7, 10 และ 14 วัน พบว่า เซลล์เนื้อเยื่อในโพรงพินน่านมของผู้ป่วยดาวน์ซินโดรมสามารถแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง และสร้างเนื้อเยื่อแข็งได้เร็วกว่ากลุ่มเด็กปกติ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง ดังจะเห็นได้จากการย้อมตะกอนแคลเซียมด้วยสียอลิซารินเรด เอส ในกลุ่มของดาวน์ซินโดรมสร้างตะกอนแคลเซียมตั้งแต่ในช่วงสัปดาห์แรก ส่วนกลุ่มเด็กปกติสร้างตะกอนแคลเซียมในช่วงสัปดาห์ที่ 2 (ภาพที่ 6) เมื่อละลายผลิตภัณฑ์ติดสียอลิซารินเรดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง ช่วงเวลา 7, 10 และ 14 วัน พบว่าในกลุ่มของดาวน์ซินโดรมมีค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงสูงกว่าในกลุ่มเด็กปกติ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) คิดเป็น 12.15 ± 1.85 23.77 ± 7.023 และ 43.18 ± 7.131 เท่าของเด็กปกติ (ภาพที่ 7)



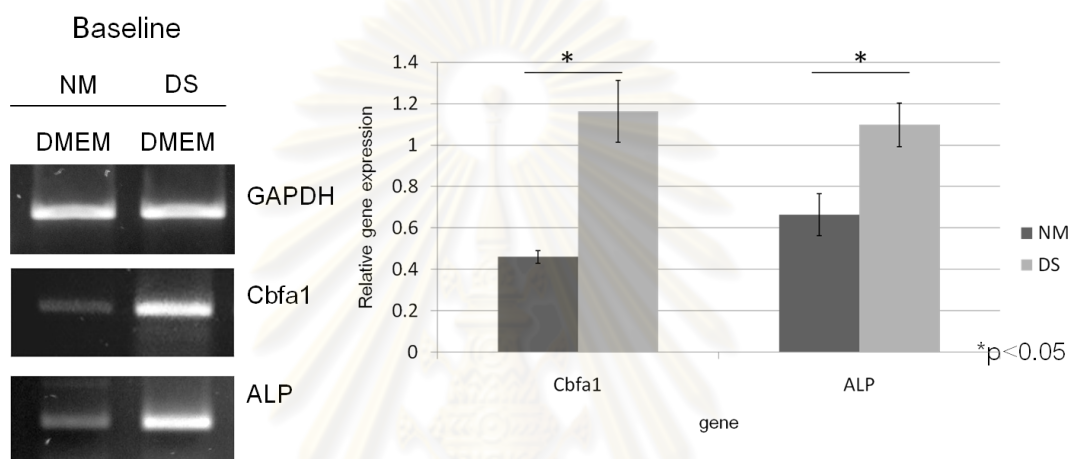
ภาพที่ 7 การย้อมตะกอนแคลเซียมด้วยสีอลิซารินเรด เอส เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟัน น้ำนมของเด็กปกติและผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟอสฟอรัสและอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง เป็นเวลา 7, 10 และ 14 วัน



ภาพที่ 8 กราฟแสดงจำนวนเท่าของค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนแสงของปริมาณตะกอนแคลเซียมที่ย้อมด้วยสี อลิซารินเรด เอส โดยละลายผลึกด้วยซิติลไพริดีเนียม คลอไรด์ ของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟัน น้ำนมของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมเทียบกับเด็กปกติ โดยแกนตั้งแสดงค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนแสงของปริมาณตะกอนแคลเซียมที่ย้อมด้วยสี อลิซารินเรด เอส ซึ่งกำหนดให้ค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนแสงของกลุ่มเปรียบเทียบที่มีค่าน้อยที่สุดเป็น 1 และแกนนอนแสดงระยะเวลาที่เพาะเลี้ยง (NM: กลุ่มเด็กปกติ DS: กลุ่มดาวน์ ซินโดรม DMEM: กลุ่มที่เพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟอสฟอรัส OM: กลุ่มที่เพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง *: $p < 0.05$)

5. การศึกษาปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอของยีนคอร์บายดีนิงแฟกเตอร์ 1 (Cbfa1) และอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (ALP)

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟินอลเรดเป็นเวลา 48 ชั่วโมงเพื่อเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนตั้งต้นพบว่าเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมของผู้ป่วยดาวน์ซินโดรมมีระดับการแสดงออกของยีนคอร์บายดีนิงแฟกเตอร์ 1 และอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสสูงกว่าเซลล์ของเด็กปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 การแสดงออกของยีนคอร์บายดีนิงแฟกเตอร์ 1 (Cbfa1) และอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (ALP) และกราฟแสดงค่าเฉลี่ยความเข้มของยีนโดยการวิเคราะห์ด้วยวิธีอาร์ที-พีซีอาร์ (RT-PCR) เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟินอลเรด เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยแกนนตั้งแสดงค่าเฉลี่ยความเข้มของยีนต่อค่าเฉลี่ยความเข้มของยีนกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส (GAPDH) และแกนนอนแสดงชนิดยีน (NM: กลุ่มเด็กปกติ DS: กลุ่มดาวน์ซินโดรม *: $p < 0.05$)

ศูนย์เวชทันตกรรม
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

เซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรม มีความสามารถในการเจริญเติบโตต่ำกว่าเด็กปกติ แต่มีความไวต่อการกระตุ้นการแปรสภาพเป็นเนื้อเยื่อแข็งได้มากกว่าเด็กปกติ โดยเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมมีค่าเฉลี่ยการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและมีระดับการแสดงออกของยีนออกสติโอแคลซิน คอร์บายด์ิงแฟกเตอร์ 1 และอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสสูงกว่าเด็กปกติ รวมทั้งมีการสะสมของตะกอนแคลเซียมได้เร็วและมากกว่าเด็กปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การแบ่งตัวที่ต่ำกว่าปกติและมีความไวต่อการกระตุ้นการแปรสภาพเป็นเนื้อเยื่อแข็งของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรม น่าจะส่งผลต่อความสามารถในการซ่อมแซมเนื้อเยื่อโพรงฟัน

อภิปรายผลการวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ และความสามารถในการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมกับเด็กปกติ เพื่อนำไปสู่การตอบคำถามของงานวิจัยในการศึกษาครั้งนี้คือ ความสามารถในการซ่อมแซมเนื้อฟันของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมกับเด็กปกติ มีความแตกต่างกันหรือไม่

การซ่อมแซมเนื้อฟันโดยการสร้างเนื้อฟันตติยภูมิชนิดรีแอคชันนารี เดนติน (reactionary dentin) เกิดเมื่อมีอันตรายที่ไม่รุนแรงไม่ทำให้เกิดการตายของเซลล์สร้างเนื้อฟันและเซลล์สร้างเนื้อฟันนั้นสร้างเนื้อฟันเพิ่มขึ้นเพื่อมาปกป้องฟัน โดยเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่จะมีการสร้างเมทริกซ์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเพื่อเพิ่มอัตราการสร้างเนื้อฟันเพื่อตอบสนองต่อภัยอันตรายนั้นๆ ส่วนการสร้างเนื้อฟันตติยภูมิชนิดเนื้อฟันซ่อมเสริม (reparative dentin) เป็นกระบวนการที่ซับซ้อนเกี่ยวข้องกับกระบวนการตอบสนองต่อการอักเสบของเซลล์ โดยเมื่อมีอันตรายที่รุนแรงจนทำให้เซลล์สร้างเนื้อฟันตาย หนว่งที่ได้รับภัยอันตรายจะมีการหลั่งเมทริกซ์นอกเซลล์หลายชนิด เช่น โบน มอร์โฟเจเนติก โปรตีน (Bone morphogenetic proteins: BMPs) ทรานส์ฟอร์มมิงโกรทแฟกเตอร์ เบต้า (transforming growth factor- β : TGF- β s) ไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ (fibroblast growth factors) อินซูลินไลค์โกรทแฟกเตอร์ (Insulin-like growth factors) ซึ่งเป็นโปรตีนที่เหนี่ยวนำให้เซลล์ที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ใดๆ ในเนื้อเยื่อโพรงฟันแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเคลื่อนตัว

มายังบริเวณที่ได้รับอันตราย เปลี่ยนแปลงและพัฒนาขึ้นมาทำหน้าที่ทดแทนเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่คล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟันและสร้างเนื้อฟันบริเวณรอยต่อระหว่างเนื้อฟันและเนื้อเยื่อในโพรงฟันที่ได้รับอันตราย (63)

ผลการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมมีอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ที่ช้ากว่ากลุ่มเด็กปกติซึ่งเห็นได้ชัดเจนในช่วงเวลา 72 ชั่วโมงซึ่งในกลุ่มเด็กปกติมีปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นประมาณ 6.03 เท่าและในกลุ่มผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมเพิ่มขึ้นประมาณ 3.07 เท่าเมื่อเทียบกับปริมาณเซลล์ในระยะเวลา 24 ชั่วโมงของเซลล์ของเด็กปกติซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากผิวหนังของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรม (Human skin down syndrome fibroblast cell lines) และคนปกติ (human skin normal fibroblast cell lines) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมงพบว่าในกลุ่มคนปกติมีปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้น 3.2 เท่าส่วนในกลุ่มดาวน์ ซินโดรมเพิ่มขึ้น 2.2 เท่า (64) และในการศึกษาของ Paton GR. และคณะที่ศึกษาเปรียบเทียบเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากผิวหนังของเด็กทารกที่เป็นดาวน์ ซินโดรมและเด็กปกติพบว่าเซลล์ในกลุ่มดาวน์ ซินโดรมมีอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ช้ากว่ากลุ่มเด็กปกติ เนื่องจากมีระยะ G_2 ของวงจรการแบ่งตัวนานกว่ากลุ่มเด็กปกติประมาณ 3 ชั่วโมง (65) รวมทั้งอาจสนับสนุนความเชื่อของ Kieser J. และคณะที่เชื่อว่าลักษณะความผิดปกติของขนาดและรูปร่างของฟันของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรม เกิดจากการแบ่งตัวที่ลดลงของเซลล์เดนทัล ปาปิลาในระหว่างการสร้างตัวอ่อน (embryogenesis) ที่เป็นผลมาจากภาวะบกพร่องทางการเจริญเติบโตของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมส่งผลให้เซลล์มีอัตราการแบ่งตัวช้ากว่าปกติ (16) ดังนั้นการที่เซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมมีอัตราการแบ่งตัวที่ช้ากว่าอาจเป็นผลมาจากภาวะบกพร่องทางการเจริญเติบโตของผู้ป่วยร่วมกับการใช้เวลาในวงจรการแบ่งตัวของเซลล์นานกว่าเซลล์ของเด็กปกติ

ผลการศึกษายังแสดงให้เห็นว่าเซลล์ในกลุ่มดาวน์ ซินโดรมมีความไวต่อการถูกกระตุ้นให้เกิดการแปรสภาพเป็นเนื้อเยื่อแข็งได้มากกว่าเด็กปกติ โดยมีการสร้างตะกอนแคลเซียมตั้งแต่วินาทีแรกและมีการสร้างตะกอนแคลเซียมมากกว่ากลุ่มเด็กปกติ ซึ่งสอดคล้องกับค่าการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในช่วงระยะเวลา 72 และ 96 ชั่วโมงของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมซึ่งมีแนวโน้มสูงขึ้นตามระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงและมีค่าสูงกว่ากลุ่มเด็กปกติ โดยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเป็นตัวบ่งชี้ถึงการแปรสภาพไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง (28) รวมทั้งมีระดับการแสดงออกของยีนออกสติโอแคลซินในระดับที่สูงกว่ากลุ่มเด็กปกติเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งเป็นเวลา 5 วัน เป็นที่ยอมรับกันว่าการเพิ่มขึ้นของออกสติโอแคลซินบ่งบอกถึงการเจริญเติบโตเต็มที่

ของเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งและความสามารถในการสร้างเนื้อเยื่อแข็งของเซลล์ (26) ส่วนระดับการแสดงออกของยีนคอลลาเจน ชนิดที่ 1 เซลล์ทั้ง 2 กลุ่มมีระดับการแสดงออกที่ใกล้เคียงกัน นอกจากนี้เมื่อพิจารณาระดับการแสดงออกของยีนตั้งต้นซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมงพบว่า เซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมมีระดับการแสดงออกของยีนคอลลาเจน ชนิดที่ 1 และยีนออสติโอแคลซินไม่แตกต่างจากเด็กปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแต่มีแนวโน้มสูงกว่าของเด็กปกติ และมีระดับการแสดงออกของยีนคอร์บายด์ิงแฟกเตอร์ 1 และอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสสูงกว่าเด็กปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้เซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมมีแนวโน้มการแสดงออกของยีนออสติโอแคลซินสูงกว่าของเด็กปกติเมื่อได้รับการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง มีรายงานว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมมีการแสดงออกของยีนคอร์บายด์ิงแฟกเตอร์ 1 ในระดับสูง (66) ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการสร้างกระดูกและการแปรสภาพของเซลล์สร้างกระดูก รวมทั้งพบว่าเมทริกซ์นอกเซลล์หลายชนิด เช่น ออสติโอแคลซิน ออสติโอพอนติน คอลลาเจน ชนิดที่ 1 เป็นต้น มี binding site สำหรับยีนคอร์บายด์ิงแฟกเตอร์ 1 (67, 68) โดยในหนูที่ไม่มียีนคอร์บายด์ิงแฟกเตอร์ 1 (Cbfa1- deficient mice) พบว่าไม่มีการสร้างกระดูกเกิดขึ้น ส่วนหนูที่มีการดัดแปลงยีนคอร์บายด์ิงแฟกเตอร์ 1 (Cbfa1- mutant mice) จะมีคอลลาเจน ชนิดที่ 1 และออสติโอพอนตินในระดับต่ำ และไม่พบออสติโอแคลซินในโครงสร้างกระดูกของหนู (69) จากผลการศึกษาในเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมที่มีระดับการแสดงออกของยีนคอร์บายด์ิงแฟกเตอร์ 1 อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส และออสติโอแคลซินสูงกว่าเด็กปกติ ส่งผลให้เซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมอาจมีแนวโน้มเป็นเซลล์ที่มีการแปรสภาพไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งได้ดีกว่าเซลล์ของเด็กปกติ แต่จากการศึกษาเซลล์ต้นกำเนิดในระยะตัวอ่อนของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรม โดยนำเซลล์มาเพาะเลี้ยงเพื่อเหนี่ยวนำให้แปรสภาพเป็นเซลล์ประสาทพบว่าเซลล์ต้นกำเนิดของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมมีอัตราการแบ่งตัวต่ำ สามารถแปรสภาพเป็นเซลล์ประสาทจำนวนน้อยกว่าและมีความยาวของเซลล์สั้นกว่าเซลล์ของเด็กปกติ (20) ซึ่งคุณสมบัติในการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดควรมีความสามารถในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและแปรสภาพเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ได้อย่างจำเพาะเจาะจงเมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้จะลดลงเมื่อเซลล์มีอายุมากขึ้น การที่เซลล์ของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมมีคุณสมบัติของการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดดังกล่าวต่ำกว่าของเด็กปกติอาจแสดงถึงว่าเซลล์ของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมมีความแก่กว่าเซลล์ของเด็กปกติ อาจหมายถึงว่าเซลล์ของเนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมหน้าจะเป็นเซลล์ที่ถูกกำหนดแล้วว่าจะทำหน้าที่เป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง ส่วนเซลล์ของเด็กปกติจะอยู่ในระยะที่เป็นเซลล์ที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ใดๆ แสดงว่าคุณสมบัติของการ

เป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมต่ำกว่าเด็กปกติ

เมื่อพิจารณาถึงความสามารถในการซ่อมแซมเนื้อฟันของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรม เมื่อได้รับ ภัยอันตรายที่รุนแรง จนทำให้เกิดการตายของเซลล์สร้างเนื้อฟัน และมีการหลั่งเมทริกซ์นอกเซลล์ เหนี่ยวนำให้เซลล์ที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ใดๆ มีอัตราการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน แต่จาก ผลการศึกษาเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมมีอัตราการแบ่งตัวต่ำกว่าเด็ก ปกติและมีความไวต่อการกระตุ้นการแปรสภาพเป็นเนื้อเยื่อแข็ง ส่งผลให้เซลล์ที่ยังไม่มีการ เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ใดๆ มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้น้อยกว่าของเด็กปกติ และเคลื่อนตัว มายังบริเวณที่ได้รับภัยอันตราย เมื่อเซลล์เหล่านั้นอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมสามารถแปร สภาพเป็นเซลล์คล้ายเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง และสร้างเมทริกซ์นอกเซลล์รวมทั้งสะสมแร่ธาตุได้ รวดเร็วกว่าและมากกว่าเด็กปกติ ดังนั้นความสามารถในการซ่อมแซมเนื้อฟันของเซลล์เนื้อเยื่อใน โพรงฟันน้ำนมของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมน่าจะแตกต่างจากเด็กปกติ อย่างไรก็ตามยังไม่มี การศึกษาทางคลินิกที่แสดงถึงความแตกต่างของความสำเร็จของการรักษาในผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมและเด็กปกติภายหลังจากการได้รับอุบัติเหตุ หรือภัยอันตรายที่รุนแรงที่กระทำต่อฟันน้ำนม เช่น ในฟันน้ำนมที่ผุลึกใกล้โพรงประสาทฟันมาก (deep caries approaching the pulp) ซึ่งให้ การรักษาด้วยวิธีการปิดทับเนื้อเยื่อในโดยอ้อม (indirect pulp treatment) หรือในฟันที่ได้รับ อุบัติเหตุหักทะลุโพรงประสาทฟัน ซึ่งให้การรักษาด้วยวิธีพัลโพโตมีบางส่วน (partial pulpotomy) เป็นต้น จากผลการศึกษาสามารถสรุปได้เป็น 2 สมมติฐาน ดังนี้

สมมติฐานที่ 1 เซลล์ของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรม มีความผิดปกติของกระบวนการแบ่งตัว โดยปกติ แล้วเซลล์จะแปรสภาพไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งภายหลังจากกระบวนการแบ่งตัวสิ้นสุดลง การที่เซลล์ของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมมีอัตราการแบ่งตัวน้อย ส่งผลให้เซลล์เกิดการแปรสภาพไป เป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง (premature osteogenic differentiation) ดังนั้นถ้าเราสามารถแก้ไข กระบวนการแบ่งตัวของวงจรแบ่งเซลล์

สมมติฐานที่ 2 เซลล์ของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมมีความผิดปกติทั้ง 2 ส่วน ทั้งในกระบวนการแบ่งตัว และกระบวนการแปรสภาพไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง เนื่องจากเซลล์ของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรม มีระดับการแสดงออกของยีนอัลคาไลน์ ฟอสฟาเตสและคอร์บายดิงแฟกเตอร์ 1 สูง เป็นไปได้ว่า เซลล์ของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมอาจจะเป็นเซลล์ที่ถูกกำหนดแล้วว่าจะทำหน้าที่เป็นเซลล์สร้าง เนื้อเยื่อแข็ง

การศึกษาในครั้งนี้เป็นเพียงจุดเริ่มต้นในการศึกษาเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมของ ผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรม ส่วนกลไกที่ทำให้เซลล์ของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมมีความแตกต่างจากเด็กปกติ ทั้งในด้านอัตราการแบ่งตัวและความสามารถในการสร้างเนื้อเยื่อแข็งนั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ซึ่ง

ควรที่จะศึกษาเพิ่มเติมถึงโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการแบ่งตัวของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนม ได้แก่ ทรานส์ฟอร์มมิงโกรทแฟกเตอร์ เบต้า-2 (transforming growth factor- β : TGF- β 2) คอนเนกทีฟ ทิสซุ โกรทแฟกเตอร์ (connective tissue growth factor: CTGF) เนฟโกรทแฟกเตอร์ (Nerve growth factor: NGF) ไฟโบรบลาสโกรทแฟกเตอร์-2 (fibroblast growth factors-2) ซึ่งโปรตีนเหล่านี้มีบทบาทในการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์หลายชนิดและควบคุมการสร้างเมทริกซ์นอกเซลล์ในเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนม (70)

นอกจากนี้ควรศึกษาเพิ่มเติมถึงความสามารถในการสร้างเนื้อเยื่อแข็งของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมมีความสัมพันธ์กับการมีจำนวนโครโมโซมคู่ที่ 21 เกินมา 1 แท่งหรือไม่ การที่ผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมมีโครโมโซมคู่ที่ 21 เกินมา 1 แท่งส่งผลให้มีการแสดงออกของยีนที่มากเกินไปซึ่งส่งผลให้เกิดเป็นลักษณะความผิดปกติของผู้ป่วย ดาวน์ ซินโดรม (71) มีหลายการศึกษาเชื่อมโยงลักษณะความผิดปกติของผู้ป่วยกับตำแหน่งยีนบนโครโมโซมคู่ที่ 21 เช่น การมียีน COL6A1 แสดงออกมากเกินไปส่งผลให้เกิดความผิดปกติของหัวใจ (72) ยีน DYRK1A ที่มีการแสดงออกมากเกินไปส่งผลให้เกิดภาวะปัญญาอ่อน (73) และยีน ETS2 ที่มีการแสดงออกมากเกินไปส่งผลให้เกิดความผิดปกติของโครงกระดูก (skeletal abnormalities) (74, 75) เป็นต้น โดยยีน ETS2 มีบทบาทในการควบคุมอัตราการแบ่งตัวของเซลล์และการแปรสภาพของเซลล์ การศึกษาเซลล์กระดูกของหนู (Mouse osteoblastic cell: MC3T3-E1) พบว่าในช่วงที่มีการแปรสภาพไปเป็นเซลล์กระดูก (osteoblast differentiation) และช่วงที่มีการสร้างเมทริกซ์ (matrix formation) รวมทั้งเซลล์กระดูกที่เจริญเต็มที่ (Post-mitotic mature osteoblast) จะมีการแสดงออกของยีน ETS2 สูง นอกจากนี้พบว่าเมทริกซ์นอกเซลล์หลายชนิด ได้แก่ โบน ไชอะโลโปรตีน ออสติโอเนกติน ออสติโอแคลซิน และ ออสติโอพอนติน มี binding site สำหรับยีน ETS2 (75) ดังนั้นควรศึกษาเพิ่มเติมถึงการแสดงออกของยีน ETS2 ในเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมเพื่อทราบถึงความสามารถในการสร้างเนื้อเยื่อแข็งของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมได้ชัดเจนมากขึ้น

ข้อเสนอแนะ

1. ศึกษาเพิ่มเติมถึงยีนและโปรตีนที่มีบทบาทต่อกระบวนการแบ่งตัวของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนม โดยศึกษาเปรียบเทียบผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมกับเด็กปกติ เพื่อทราบและเข้าใจถึงสาเหตุที่ทำให้เซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมของผู้ป่วยดาวน์ ซินโดรมมีอัตราการแบ่งตัวที่ต่ำกว่าเด็กปกติ

2. ศึกษาเพิ่มเติมถึงความสามารถในการสร้างเนื้อเยื่อแข็งของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงพิน
น้ำนมของผู้ป่วยดาวน์ซินโดรมมีความสัมพันธ์กับการมีจำนวนโครโมโซมคู่ที่ 21 เกิน
มา 1 แท่งหรือไม่



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

- (1) Chai, Y., et al. Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. Development 127(8) (Apr 2000): 1671-9.
- (2) Hargreaves, K. M., and Goodis, H. E., editors. Seltzer and Bender's Dental pulp. Chicago: Quintessence Publishing Co, Inc; 2002.
- (3) 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 (2000): 13625-30.
- (4) Batouli, S., et al. Comparison of Stem-cell-mediated Osteogenesis and Dentinogenesis. J Dent Res 82 (2003): 976-81.
- (5) Fitzgerald, M. Autoradiographic analysis of odontoblast replacement following pulp exposure in primate teeth. Arch Oral Biol 35(9) (1990): 707-15.
- (6) Smith, A., et al. *In vivo* morphogenesis activity of dentin matrix proteins. J Biol Buccale 18 (1990): 123-9.
- (7) Shi, S., et al. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. Orthod Craniofac Res 8(3) (Aug 2005): 191-9.
- (8) Gronthos, S., et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. J dent research 81(8) (2002): 531-5.
- (9) Koyama, 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.
- (10) Miura, M., et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. Proc Natl Acad Sci U S A 100(10) (2003): 5807-12.
- (11) 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.
- (12) Kerkis, I., et al. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. Cells Tissues Organs 184(3-4) (2006): 105-16.
- (13) Reeves, R. Recounting a genetic story. Nature 405 (2000): 283-4.

- (14) Fischer-Brandies, H., Schmid, R. G., and Fischer-Brandies, E. Craniofacial development in patients with Down's syndrome from birth to 14 years of age. Eur J Orthod 8(1) (Feb 1986): 35-42.
- (15) Kumasaka, S., Miyagi, A., Sakai, N., Shindo, J., and Kashima, I. Oligodontia: a radiographic comparison of subjects with Down syndrome and normal subjects. Spec Care Dentist 17(4) (Jul-Aug 1997): 137-41.
- (16) Kieser, J., Townsend, G., and Quick, A. The Down syndrome patient in dental practice, part I: Pathogenesis and general and dental features. N Z Dent J 99(1) (Mar 2003): 5-9.
- (17) Desai, S., and Fayetteville. Down syndrome A review of the literature. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology 84(3) (1997): 279-85.
- (18) de Moraes, M. E., de Moraes, L. C., Dotto, G. N., Dotto, P. P., and dos Santos, L. R. Dental anomalies in patients with Down syndrome. Braz Dent J 18(4) (2007): 346-50.
- (19) Kieser, J., Townsend, G., and Quick, A. The Down Syndrome Patient in Dental Practice, Part I: Pathogenesis and general and dental features New Zealand Dental Journal 99(1) (2003): 5-9.
- (20) Bahn, S., et al. Neuronal target genes of the neuron-restrictive silencer factor in neurospheres derived from fetuses with Down's syndrome: a gene expression study. The Lancet 359(9303) (2002): 310-5.
- (21) Moraes, M. E. L. d., Moraes, L. C. d., Dotto, G. N., Dotto, P. P., and Santos, L. R. d. A. d. Dental anomalies in patients with down syndrome. Brazillian Dental Journal 18(4) (2007).
- (22) Berkovitz, B., Boyde, A., and Frank, R., editors. Teeth. New York: Springer-Verlag; 1989.
- (23) Chai, Y., Jiang, X., Ito, Y., and al, e. Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. Development 127 (2000): 1671-9.

- (24) Goldberg, M., and Smith, A. J. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: A biological basis for repair and tissue engineering. Crit Rev Oral Biol Med 15(1) (2004): 13-27.
- (25) Hargreaves, K. M., and Goodis, H. E., editors. Seltzer and Bender's Dental pulp. Chicago: Quintessence Publishing Co, Inc; 2002.
- (26) Papagerakis, P., et al. Investigation of osteocalcin, osteonectin, and dentin sialophosphoprotein in developing human teeth. Bone 30(2) (2002): 377-85.
- (27) Ducy, P., et al. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. Nature 382(6590) (Aug 1 1996): 448-52.
- (28) Weiss, M. J., et al. Structure of the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene. J Biol Chem 263(24) (Aug 25 1988): 12002-10.
- (29) MacDougall, M., et al. Dentin phosphoprotein and dentin sialoprotein are cleaved products expressed from a single transcript coded by a gene on human chromosome 4. J Biol Chem 272 (1997): 835-42.
- (30) Qin, C., et al. The expression of dentin sialophosphoprotein gene in bone. J Dent Res 81(6) (Jun 2002): 392-4.
- (31) Magne, D., et al. Development of an odontoblast in vitro model to study dentin mineralization. Connect Tissue Res 45(2) (2004): 101-8.
- (32) Feng, J. Q., et al. The Dentin Matrix Protein 1 (Dmp1) is Specifically Expressed in Mineralized, but not Soft, Tissues during Development. Journal of Dental Research 82(10) (October 1, 2003 2003): 776-80.
- (33) Denhardt, D. T., Noda, M., O'Regan, A. W., Pavlin, D., and Berman, J. S. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. J Clin Invest 107(9) (2001): 1055-61.
- (34) Hunter, G., and Goldberg, H. Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: role of glutamic acid-rich sequences in the nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. Biochem J 302 (1994): 175-9.
- (35) Lane, T., and Sage, E. The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interactions. FASEB J 8(2) (February 1, 1994 1994): 163-73.

- (36) Ruch, J., Lesot, H., and Begue-Kirn, C. Odontoblast differentiation. Int J Dev Biol 39 (1995): 51-68.
- (37) Tsukamoto, Y., et al. Mineralized nodule formation by cultures of human dental pulp-derived fibroblast. Arch Oral Biol 37 (1992): 1045-55.
- (38) Jontell, M., Okiji, T., Dahlgren, U., and Bergenholtz, G. Immune defense mechanisms of the dental pulp. Crit Rev Oral Biol Med 9 (1998): 179-200.
- (39) Shiba, H., et al. Proliferative ability and alkaline phosphatase activity with in vivo cellular aging in human pulp cells. J Endodon 29(1) (2003): 9-11.
- (40) Smith, A., et al. Reactionary dentinogenesis. Int J Dev Biol 39 (1995): 273-80.
- (41) Tziafas, D. The future role of a molecular approach to pulp-dentinal regeneration. Caries Res 38(3) (2004): 314-20.
- (42) About, I., et al. Human dentin production in vitro. Exp Cell Res 258(1) (Jul 10 2000): 33-41.
- (43) About, I., et al. Human dentin production in vitro. Exp Cell Res 258 (2001): 33-41.
- (44) Schecroun, N., and Delloye, C. Bone-like nodules formed by human bone marrow stromal cells: comparative study and characterization. Bone 32 (2003): 252-60.
- (45) Coelho, M., and Fernandes, M. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, β -glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation. Biomaterials 21(11) (2000): 1095-102.
- (46) Areco, N., Sauk, J. J., Moehring, J., Foster, R. A., and Martha, J. Human Periodontal Cells Initiate Mineral-Like Nodules In Vitro. J Periodontol 62 (2003): 449-503.
- (47) Telli, C., Serper, A., Dogan, A., and Guc, D. Evaluation of the cytotoxicity of calcium phosphate root canal sealers by MTT assay. J Endod 25(12) (1999): 811-3.
- (48) Osorio, R., Hefti, A., Vertucci, F., and Shawley, A. Cytotoxicity of endodontic materials. J Endod 24(2) (1998): 91-6.
- (49) Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D., and Mitchell, J. B. Evaluation of a Tetrazolium-based Semiautomated Colorimetric Assay: Assessment of Chemosensitivity Testing. Cancer Research 47 (1987): 936-42.

- (50) Rode, H.-J., Eisel, D., and Frost, I., editors. Apoptosis, Cell Death, and Cell Proliferation.: Roche Applied Science.
- (51) Lott, I., and McCoy, E., editors. Oral and dental considerations in Down syndrome. New York: Wiley-Liss; 1992.
- (52) Rynders, J., editor. Dentistry: Down syndrome advances in biomedicine and behavioral sciences. Cambridge: MA; 1982.
- (53) Limbrock, G. J., Fischer-Brandies, H., and Avalle, C. Castillo-Morales' orofacial therapy: treatment of 67 children with Down syndrome. Dev Med Child Neurol 33(4) (Apr 1991): 296-303.
- (54) Limbrock, G., Fischer-Brandies, H., and Avalle, C. Castillo-Morales' orofacial therapy: treatment of 67 children with Down syndrome. Dev Med Child Neurol 33 (1991): 296-303.
- (55) Wilson, M. Special considerations ... for the dental professional for patients with Down's syndrome.. ODA J 184 (1994): 24-5.
- (56) Cohen, M., and Winer, R. Dental and facial characteristics in Down's syndrome (Mongolism). J Dent Res 44(supple) (1965): 197-208.
- (57) Acerbi, A. G., Freitas, C., and Magalhaes, M. H. C. G. Prevalence of numeric anomalies in the permanent dentition of patients with Down syndrome. Special Care in Dentistry 21(2) (2001): 75-8.
- (58) Russell, B., and Kjaer, I. Tooth agenesis in Down syndrome. Am J Med Genet 55 (1995): 466-71.
- (59) Jaspers, M. Taurodontism in the Down syndrome. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 51 (1981): 632-6.
- (60) Scully, C. Down syndrome: aspects of dental care. J dent research 4 (1976): 167-74.
- (61) Townsend, G. Dental crown variants in children and young adults with Down syndrome. Acta Odontol Pediat Doc 7 (1986): 35-9.
- (62) Cohen, M., Blitzer, F., Arvystas, M., and Bonneau, R. Abnormalities of the permanent dentition in trisomy G. J Dent Res 49(6) (1970): 1386-93.

- (63) Tziafas, D., Smith, A. J., and Lesot, H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. J Dent 28(2) (Feb 2000): 77-92.
- (64) Iwamoto, T., et al. Influences of interferon-gamma on cell proliferation and interleukin-6 production in Down syndrome derived fibroblasts. Arch Oral Biol 54(10) (Oct 2009): 963-9.
- (65) Paton, G. R., Silver, M. F., and Allison, A. C. Comparison of cell cycle time in normal and trisomic cells. Humangenetik 23(3) (1974): 173-82.
- (66) Cairney, C. J., et al. A systems biology approach to Down syndrome: identification of Notch/Wnt dysregulation in a model of stem cells aging. Biochim Biophys Acta 1792(4) (Apr 2009): 353-63.
- (67) Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A. L., and Karsenty, G. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. Cell 89(5) (May 30 1997): 747-54.
- (68) Komori, T. Cbfa1, a transcription factor for osteoblast differentiation and bone formation. Journal of Bone and Mineral Metabolism 16(1) (1998): 1-4.
- (69) Komori, T., et al. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. Cell 89(5) (May 30 1997): 755-64.
- (70) Nakamura, S., et al. 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.
- (71) Antonarakis, S. E., Lyle, R., Dermitzakis, E. T., Reymond, A., and Deutsch, S. Chromosome 21 and down syndrome: from genomics to pathophysiology. Nat Rev Genet 5(10) (Oct 2004): 725-38.
- (72) Davies, G. E., et al. Genetic variation in the COL6A1 region is associated with congenital heart defects in trisomy 21 (Down's syndrome). Ann Hum Genet 59(Pt 3) (Jul 1995): 253-69.
- (73) Liu, F., et al. Overexpression of Dyrk1A contributes to neurofibrillary degeneration in Down syndrome. FASEB J 22(9) (Sep 2008): 3224-33.

- (74) Sumarsono, S. H., et al. Down's syndrome-like skeletal abnormalities in Ets2 transgenic mice. Nature 379(6565) (Feb 8 1996): 534-7.
- (75) Raouf, A., and Seth, A. Ets transcription factors and targets in osteogenesis. Oncogene 19(55) (Dec 18 2000): 6455-63.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายละเอียดการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

1. การศึกษาอัตราการแบ่งตัวของเซลล์

- a. ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยปริมาณเซลล์ \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง

cell count	NM 1	NM 2	NM 3
	20140.73	20162.63	29006.86
24 hrs	± 1381.78	± 1519.92	± 3303.57
	86800.86	61340.85	70404.00
48 hrs	± 2546.18	± 2222.88	± 5027.81
	152322.62	151512.63	127738.28
72 hrs	± 30009.69	± 23437.01	± 11695.83
cell count	DS 1	DS 2	DS 3
	22220.44	27649.58	38135.68
24 hrs	± 794.28	± 3470.97	± 2716.97
	31239.81	42908.07	54007.14
48 hrs	± 1957.81	± 3638.81	± 3843.34
	93631.06	106240.66	70447.78
72 hrs	± 13243.16	± 14251.42	± 2930.80

- b. ข้อมูลแสดงร้อยละของค่าเฉลี่ยปริมาณเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมงของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงพินน่านมของผู้ป่วยดาวนซินโดรมเทียบกับเด็กปกติ โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยปริมาณเซลล์ของกลุ่มเปรียบเทียบที่มีค่าน้อยที่สุดเป็นร้อยละ 100

% cell count	NM 1	NM 2	NM 3	DS 1	DS 2	DS 3
24 hrs.	100	100.1087	155.11	110.3259	137.2819	189.3461
48 hrs.	242.715	304.5612	349.56	155.1076	213.0412	268.1488
72 hrs.	756.2913	752.2697	634.23	464.8841	527.4915	349.7776

c. แสดงข้อมูลสถิติเชิงพรรณนาร้อยละของค่าเฉลี่ยปริมาณเซลล์

group	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
NM 24 hrs.	3	118.4067	31.7861	18.3517
DS 24 hrs.	3	145.6533	40.1699	23.1921
NM 48 hrs.	3	298.9467	53.6407	30.9695
DS 48 hrs.	3	212.1000	56.5259	32.6352
NM 72 hrs.	3	714.2633	69.3400	40.0335
DS 72 hrs.	3	447.3833	90.1377	52.0410

d. แสดงการวิเคราะห์การกระจายตัวของข้อมูล

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

subgroup		Cellcount
NM24hrs	N	3
	Normal	
	Mean	118.4067
	Parameters(a,b)	
	Std. Deviation	31.78607
	Most Extreme	
	Absolute	.384
	Differences	
	Positive	.384
	Negative	-.281
	Kolmogorov-Smirnov Z	.666
	Asymp. Sig. (2-tailed)	.768

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

Continue...

subgroup		Cellcount	
NM48hrs	N	3	
	Normal	Mean	298.9467
	Parameters(a,b)	Std. Deviation	53.64074
	Most Extreme Differences	Absolute	.208
		Positive	.186
		Negative	-.208
	Kolmogorov-Smirnov Z		.361
	Asymp. Sig. (2-tailed)		.999
	NM72hrs	N	3
		Normal	Mean
Parameters(a,b)		Std. Deviation	69.34004
Most Extreme Differences		Absolute	.375
		Positive	.272
		Negative	-.375
Kolmogorov-Smirnov Z			.649
Asymp. Sig. (2-tailed)		.793	

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

Continue...

subgroup		Cellcount
DS24hrs	N	3
	Normal	Mean
	Parameters(a,b)	145.6533
		Std. Deviation
	Most Extreme	Absolute
	Differences	.249
		Positive
		Negative
		Kolmogorov-Smirnov Z
		Asymp. Sig. (2-tailed)
DS48hrs	N	3
	Normal	Mean
	Parameters(a,b)	212.1000
		Std. Deviation
	Most Extreme	Absolute
	Differences	.177
		Positive
		Negative
		Kolmogorov-Smirnov Z
		Asymp. Sig. (2-tailed)

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

Continue...

subgroup		Cellcount
DS72hrs	N	3
	Normal	Mean
	Parameters(a,b)	447.3833
		Std. Deviation
		90.13773
	Most Extreme	Absolute
	Differences	.244
		Positive
		.194
		Negative
		-.244
	Kolmogorov-Smirnov Z	.422
	Asymp. Sig. (2-tailed)	.994

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

e. แสดงการวิเคราะห์อัตราการแข่งขันของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง ด้วยวิธีทดสอบที่ชนิดตัวอย่างอิสระ

การวิเคราะห์อัตราการแข่งขันของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
cellcount	Equal variances assumed	.144	.724	-.921	4	.409	-27.24667	29.57464	-109.3590	54.8657
	Equal variances not assumed			-.921	3.80	.412	-27.24667	29.57464	-111.0994	56.6061

การวิเคราะห์อัตราการแข่งขันของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
cellcount	Equal variances assumed	.000	.984	1.93	4	.126	86.84667	44.99075	-38.0677	211.761
	Equal variances not assumed			1.93	3.99	.126	86.84667	44.99075	-38.2028	211.896

การวิเคราะห์อัตราการแข่งขันของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
cellcount	Equal variances assumed	.178	.695	4.06	4	.015	266.88000	65.65783	84.5846	449.175
	Equal variances not assumed			4.06	3.75	.017	266.88000	65.65783	79.7573	454.003

2. การศึกษาค่าการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส

- ข้อมูลสถิติเชิงพรรณนาของค่าเฉลี่ยการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ที่เพาะเลี้ยงในระยะเวลา 72 และ 96 ชั่วโมง

ALP/prot	NM 1	NM 2	NM 3
72 hrs.	0.345±0.039	0.35±0.108	0.360±0.078
96 hrs.	0.316±0.091	0.533±0.063	0.632±0.066
ALP/prot	DS 1	DS 2	DS 3
72 hrs.	3.104±1.579	2.431±1.044	2.430±0.360
96 hrs.	4.740±2.156	4.705±0.987	3.430±0.651

- b. จำนวนเท่าของค่าเฉลี่ยการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงพินนํ้านมของผู้ป่วยดาวน์ซินโดรมเทียบกับเด็กปกติ

fold	NM 1	NM 2	NM 3
72 hrs	1.090	1.107	1.139
96 hrs	1.000	1.685	1.998
fold	DS 1	DS 2	DS 3
72 hrs	9.815	7.687	7.684
96 hrs	14.985	14.875	10.843

- c. แสดงข้อมูลสถิติเชิงพรรณนาค่าเฉลี่ยการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส

Descriptive Statistics

Subgroup		N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
NM72hrs	ALP	3	1.11200	.024880	1.090	1.139
NM96hrs	ALP	3	1.56100	.510424	1.000	1.998
DS72hrs	ALP	3	8.39533	1.229468	7.684	9.815
DS96hrs	ALP	3	13.56767	2.360271	10.843	14.985

d. แสดงการวิเคราะห์การกระจายตัวของข้อมูล

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

Subgroup		ALP	
NM72hrs	N	3	
	Normal Parameters(a,b)	Mean 1.11200	
		Std. Deviation .024880	
	Most Extreme Differences	Absolute	.246
		Positive	.246
		Negative	-.194
	Kolmogorov-Smirnov Z	.427	
	Asymp. Sig. (2-tailed)	.993	
	NM96hrs	N	3
		Normal Parameters(a,b)	Mean 1.56100
		Std. Deviation .510424	
Most Extreme Differences		Absolute	.263
		Positive	.197
		Negative	-.263
Kolmogorov-Smirnov Z		.455	
Asymp. Sig. (2-tailed)		.986	

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

Continue...

Subgroup		ALP
DS96hrs	N	3
	Normal	
	Mean	13.56767
	Parameters(a,b)	
	Std. Deviation	2.360271
	Most Extreme	
	Absolute	.377
	Differences	
	Positive	.274
	Negative	-.377
	Kolmogorov-Smirnov Z	.653
	Asymp. Sig. (2-tailed)	.788

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

- e. แสดงการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 72 และ 96 ชั่วโมง ด้วยวิธีทดสอบที่ชนิดตัวอย่างอิสระ

การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances	t-test for Equality of Means								
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
ALP	Equal variances assumed	15.38	.017	-10.26	4	.001	-7.283333	.709979	-9.254552	-5.31212
	Equal variances not assumed			-10.26	2.00	.009	-7.283333	.709979	-10.33573	-4.23093

การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances	t-test for Equality of Means								
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
ALP	Equal variances assumed	9.28	.038	-8.612	4	.001	-12.00667	1.394204	-15.87760	-8.13574
	Equal variances not assumed			-8.612	2.19	.010	-12.00667	1.394204	-17.54049	-6.47285

3. การศึกษาปริมาณเอนไซม์อาร์เอ็นเอของยีนคอลลาเจน ชนิดที่ 1 และยีนออกสติโอแคลซิน
- a. ข้อมูลปริมาณเอนไซม์อาร์เอ็นเอตั้งต้นแสดงเป็นสัดส่วนค่าเฉลี่ยความเข้ม \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน(SD)ของยีนทั้ง 2

gene	NM 1	NM 2	NM 3	DS 1	DS 2	DS 3
Col I	0.954 ± 0.0372	0.541 ± 0.0006	0.491 ± 0.0236	0.805 ± 0.0085	1.126 ± 0.0031	0.711 ± 0.0475
OCN	0.284 ± 0.0036	0.0130 ± 0.0010	0.109 ± 0.0035	0.753 ± 0.0147	0.253 ± 0.0015	0.617 ± 0.0513

- b. ข้อมูลสถิติเชิงพรรณนาปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอตั้งต้นแสดงเป็นสัดส่วนค่าเฉลี่ยความเข้มของยีนทั้ง 2

Gene	group	N	Mean	Std. deviation	Std. Error Mean
Col I	NM	3	0.66263	0.253693	0.146470
	DS	3	0.13533	0.137406	0.125637
OCN	NM	3	0.88033	0.217610	0.079331
	DS	3	0.54067	0.259076	0.149578

- c. ข้อมูลปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 5 วันแสดงเป็นสัดส่วนค่าเฉลี่ยความเข้ม \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน(SD)ของยีนทั้ง 2

Gene -media	NM 1	NM 2	NM 3	DS 1	DS 2	DS 3
Col I -DMEM	0.550 ± 0.0195	0.180 ± 0.0083	0.634 ± 0.0078	1.29033 ± 0.1227	0.737 ± 0.0325	0.333 ± 0.0021
Col I -OM	0.859 ± 0.0145	1.061 ± 0.0133	0.36000 ± 0.0053	0.872 ± 0.0811	1.07500 ± 0.0147	0.732 ± 0.0047
Gene -media	NM 1	NM 2	NM 3	DS 1	DS 2	DS 3
OCN -DMEM	0.446 ± 0.0125	0.194 ± 0.0020	0.070 ± 0.0143	1.16667 ± 0.0691	0.677 ± 0.0174	0.299 ± 0.0125
OCN -OM	0.49567 ± 0.0006	0.29233 ± 0.0090	0.11333 ± 0.0124	0.987 ± 0.0654	1.19433 ± 0.0099	0.773 ± 0.0164

- d. ข้อมูลสถิติเชิงพรรณนาปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 5 วันแสดงเป็นสัดส่วนค่าเฉลี่ยความเข้มของยีน

Gene	group	N	Mean	Std. deviation	Std. Error Mean
Col I	NM-DMEM	3	0.45467	0.241548	0.139458
	NM-OM	3	0.76000	0.360834	0.208327
	DS-DMEM	3	0.78667	0.480429	0.277376
	DS-OM	3	0.89300	0.172462	0.099571
OCN	NM-DMEM	3	0.23667	0.191597	0.110618
	NM-OM	3	0.30033	0.191636	0.110641
	DS-DMEM	3	0.71433	0.435203	0.251264
	DS-OM	3	0.98467	0.210510	0.121538

- e. แสดงการวิเคราะห์การกระจายตัวของข้อมูลปริมาณอาร์เอ็นเอตั้งต้น

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

Group		Col	OCN	
NM	N	3	3	
	Normal	Mean		
	Parameters(a,b)	.66263	.13533	
		Std. Deviation	.253693	.137406
	Most Extreme	Absolute	.348	.243
	Differences	Positive	.348	.243
		Negative	-.249	-.194
		Kolmogorov-Smirnov Z	.602	.420
		Asymp. Sig. (2-tailed)	.861	.994

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

Group		Col	OCN
DS	N	3	3
	Normal Parameters(a,b)	Mean	.88033
		Std. Deviation	.54067
	Most Extreme Differences	Absolute	.217610
		Positive	.283
		Negative	.302
	Kolmogorov-Smirnov Z		.206
	Asymp. Sig. (2-tailed)		-.283
			.523
			.489
			.947
			.970

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

- f. แสดงการวิเคราะห์การกระจายตัวข้อมูลปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 5 วัน

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

Group		Col	OCN
NM-DMEM	N	3	3
	Normal Parameters(a,b)	Mean	.45467
		Std. Deviation	.23667
	Most Extreme Differences	Absolute	.241548
		Positive	.19159
		Negative	.320
	Kolmogorov-Smirnov Z		.255
	Asymp. Sig. (2-tailed)		.229
			.255
			-.320
			.554
			.441
			.918
			.990

Group		Col	OCN	
NM-OM	N	3	3	
	Normal	Mean		
	Parameters(a,b)	.76000	.23667	
		Std. Deviation	.360834	
			.19159	
			7	
	Most Extreme	Absolute	.275	.255
	Differences			
		Positive	.202	.255
		Negative	-.275	-.196
	Kolmogorov-Smirnov Z	.476	.319	
	Asymp. Sig. (2-tailed)	.977	1.000	
DS-DMEM	N	3	3	
	Normal	Mean		
	Parameters(a,b)	.78667	.30033	
		Std. Deviation	.480429	.19163
				6
	Most Extreme	Absolute	.208	.184
	Differences			
		Positive	.208	.184
		Negative	-.186	-.180
		Kolmogorov-Smirnov Z	.360	.348
	Asymp. Sig. (2-tailed)	.999	1.000	

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

Continue...

Group		Col	OCN
DS-OM	N	3	3
	Normal	Mean	
	Parameters(a,b)	.89300	.71433
		Std. Deviation	
		.172462	.43520
			3
	Most Extreme	Absolute	
	Differences		
		.215	.201
		Positive	
		.215	.201
		Negative	
		-.188	-.184
	Kolmogorov-Smirnov Z	.373	.305
	Asymp. Sig. (2-tailed)	.999	1.000

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

g. แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลปริมาณอาร์เอ็นเอตั้งต้นด้วยวิธีทดสอบที่ชนิดตัวอย่างอิสระ
ยื่นคอลลาเจน ชนิดที่ 1

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances	t-test for Equality of Means								
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Differenc e	Std. Error Differenc e	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Col	Equal variances assumed	.189	.686	-1.128	4	.322	-.217700	.192972	-.75347	.31807
	Equal variances not assumed			-1.128	3.91	.324	-.217700	.192972	-.75841	.32301

ยื่นขอสถิติโอแคลซิน

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
OCN	Equal variances assumed	1.66	.267	-2.394	4	.075	-.405333	.169313	-.87542	.06475
	Equal variances not assumed			-2.394	3.04	.095	-.405333	.169313	-.93991	.12925

- h. แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลปริมาณอาร์เอ็นเอเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 5 วัน ด้วยวิธีทดสอบทีชนิดตัวอย่างอิสระ
เปรียบเทียบยีนคอลลาเจนชนิดที่ 1 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟีนอลเวด

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Col	Equal variances assumed	.996	.375	-1.069	4	.345	-.332000	.310461	-1.19398	.52998
	Equal variances not assumed			-1.069	2.95	.364	-.332000	.310461	-1.32949	.66549

เปรียบเทียบยีนคอลลาเจนชนิดที่ 1 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances	t-test for Equality of Means								
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Col	Equal variances assumed	2.03	.227	-.576	4	.595	-.133000	.230900	-.77408	.50808
	Equal variances not assumed			-.576	2.87	.607	-.133000	.230900	-.88727	.62127

เปรียบเทียบยีนออกสติโอแคลซินในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟีนอลเรด

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances	t-test for Equality of Means								
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
OCN	Equal variances assumed	1.31	.316	-1.740	4	.157	-.477667	.274536	-1.23990	.28457
	Equal variances not assumed			-1.740	2.75	.189	-.477667	.274536	-1.39866	.44332

เปรียบเทียบยีนออกสติโอแคลซินในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means							
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference		
								Lower	Upper	
OCN	Equal variances assumed	.013	.914	-4.164	4	.014	-.684333	.164356	-1.14066	-.22801
	Equal variances not assumed			-4.164	3.97	.014	-.684333	.164356	-1.14224	-.22642

4. การศึกษาปริมาณตะกอนแคลเซียมที่ย้อมด้วยสีอลิซารินเรด เจส

- a. แสดงข้อมูลค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนแสง \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของปริมาณตะกอนแคลเซียมที่ย้อมด้วยสีอลิซารินเรด

DMEM	NM 1	NM 2	NM 3	DS 1	DS 2	DS 3
7 days	0.057 ± 0.0085	0.142 ± 0.0057	0.299 ± 0.0297	0.089 ± 0.0042	0.158 ± 0.24	0.157 ± 0.0028
10 days	0.094 ± 0.269	0.14 ± 0.0396	0.235 ± 0.0198	0.058 ± 0.0156	0.071 ± 0.0042	0.101 ± 0.0042
14 days	0.151 ± 0.0099	0.141 ± 0.0028	0.183 ± 0.0099	0.077 ± 0.0071	0.303 ± 0.0028	0.131 ± 0.0198
OM	NM 1	NM 2	NM 3	DS 1	DS 2	DS 3
7 days	0.097 ± 0.0141	0.135 ± 0.0014	0.146 ± 0.0113	0.603 ± 0.0021	1.331 ± 0.1499	1.618 ± 0.0382
10 days	0.131 ± 0.0071	0.15 ± 0.0071	0.189 ± 0.0156	0.893 ± 0.0042	3.205 ± 0.1315	1.57 ± 0.2263
14 days	0.304 ± 0.0113	0.97 ± -0.0141	0.745 ± 0.1216	2.292 ± 0.1612	5.85 ± 0.792	2.167 ± 0.0919

- b. แสดงข้อมูลสถิติเชิงพรรณนาโดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนแสงของปริมาณตะกอนแคลเซียม โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มเปรียบเทียบที่มีค่าน้อยที่สุดเป็น 1

subgroup	N	Mean	Std. deviation	Std. Error Mean
NM-DMEM 7 days	3	2.9133	2.1564	1.2450
NM-OM 7 days	3	2.2167	0.4554	0.2630
DS-DMEM 7 days	3	2.3600	0.6929	0.4000
DS-OM 7 days	3	12.1500	1.8503	1.0683
NM-DMEM 10 days	3	2.7433	1.2591	0.7270
NM-OM 10 days	3	2.7467	0.5150	0.2973
DS-DMEM 10 days	3	1.3467	0.3842	0.2218
DS-OM 10 days	3	23.7733	7.0235	4.0550
NM-DMEM 14 days	3	2.7767	0.3859	0.2228
NM-OM 14 days	3	11.8033	5.9455	3.4326
DS-DMEM 14 days	3	2.9900	2.0730	1.1968
DS-OM 14 days	3	43.1833	7.1311	4.1172

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

c. แสดงการวิเคราะห์การกระจายตัวของข้อมูล

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

Subgroup		Alizarin	
NMDMEM 7 days	N	3	
	Normal	Mean	
	Parameters(a,b)	2.91333	
		Std. Deviation	2.156394
	Most Extreme	Absolute	
	Differences		.244
		Positive	.244
		Negative	-.194
		Kolmogorov-Smirnov Z	.423
		Asymp. Sig. (2-tailed)	.994
NMOM 7 days	N	3	
	Normal	Mean	
	Parameters(a,b)	2.21667	
		Std. Deviation	.455448
	Most Extreme	Absolute	
	Differences		.315
		Positive	.225
		Negative	-.315
		Kolmogorov-Smirnov Z	.545
		Asymp. Sig. (2-tailed)	.927

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

Subgroup		Alizarin	
NMDMEM 10 days	N	3	
	Normal	Mean	
	Parameters(a,b)	2.74333	
		Std. Deviation	1.259140
	Most Extreme	Absolute	
	Differences		.256
		Positive	.256
		Negative	-.196
		Kolmogorov-Smirnov Z	.443
		Asymp. Sig. (2-tailed)	.990
NMOM 10 days	N	3	
	Normal	Mean	
	Parameters(a,b)	2.74667	
		Std. Deviation	.515008
	Most Extreme	Absolute	
	Differences		.256
		Positive	.256
		Negative	-.196
		Kolmogorov-Smirnov Z	.444
		Asymp. Sig. (2-tailed)	.989

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

Continue...

Subgroup		Alizarin	
NMDMEM 14 days	N	3	
	Normal	Mean	2.77667
	Parameters(a,b)	Std. Deviation	.385919
	Most Extreme	Absolute	.295
	Differences	Positive	.295
		Negative	-.213
	Kolmogorov-Smirnov Z		.511
	Asymp. Sig. (2-tailed)		.956
	NMOM 14 days	N	3
		Normal	Mean
Parameters(a,b)		Std. Deviation	5.945455
Most Extreme		Absolute	.250
Differences		Positive	.195
		Negative	-.250
Kolmogorov-Smirnov Z			.434
Asymp. Sig. (2-tailed)			.992

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

Continue...

Subgroup		Alizarin
DSDMEM 7 days	N	3
	Normal	Mean
	Parameters(a,b)	2.36000
		Std. Deviation
		.692892
	Most Extreme	Absolute
	Differences	.380
		Positive
		.277
		Negative
	-.380	
	Kolmogorov-Smirnov Z	
	.658	
	Asymp. Sig. (2-tailed)	
	.780	
DSOM 7 days	N	3
	Normal	Mean
	Parameters(a,b)	12.15000
		Std. Deviation
		1.850324
	Most Extreme	Absolute
	Differences	.267
		Positive
		.267
		Negative
	-.198	
	Kolmogorov-Smirnov Z	
	.462	
	Asymp. Sig. (2-tailed)	
	.983	

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

Continue...

Subgroup		Alizarin
DSDMEM 10 days	N	3
	Normal	Mean
	Parameters(a,b)	1.34667
		Std. Deviation
		.384231
	Most Extreme	Absolute
	Differences	.266
		Positive
		.266
		Negative
	-.198	
	Kolmogorov-Smirnov Z	
	.461	
	Asymp. Sig. (2-tailed)	
	.984	
DSOM 10 days	N	3
	Normal	Mean
	Parameters(a,b)	23.77333
		Std. Deviation
		7.023477
	Most Extreme	Absolute
	Differences	.371
		Positive
		.268
		Negative
	-.371	
	Kolmogorov-Smirnov Z	
	.642	
	Asymp. Sig. (2-tailed)	
	.804	

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

Continue...

Subgroup		Alizarin	
DSDMEM 14 days	N	3	
	Normal Parameters(a,b)	Mean 2.99000	
		Std. Deviation 2.072993	
	Most Extreme Differences	Absolute	.297
		Positive	.297
		Negative	-.214
	Kolmogorov-Smirnov Z	.514	
	Asymp. Sig. (2-tailed)	.954	
	DSOM 14 days	N	3
		Normal Parameters(a,b)	Mean 43.18333
		Std. Deviation 7.131131	
Most Extreme Differences		Absolute	.328
		Positive	.328
		Negative	-.235
Kolmogorov-Smirnov Z		.569	
Asymp. Sig. (2-tailed)		.903	

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

- d. แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบปริมาณตะกอนแคลเซียมด้วยวิธีทดสอบทีชนิด
ตัวอย่างอิสระ

เปรียบเทียบปริมาณตะกอนแคลเซียมเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มี
ฟีนอลเรดเป็นเวลา 7 วัน

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances	t-test for Equality of Means								
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Differenc e	Std. Error Differenc e	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
ALizarin	Equal variances assumed	2.96	.160	.423	4	.694	.553333	1.307687	-3.07739	4.18405
	Equal variances not assumed			.423	2.41	.707	.553333	1.307687	-4.25054	5.35721

เปรียบเทียบปริมาณตะกอนแคลเซียมเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มี
ฟีนอลเรดเป็นเวลา 10 วัน

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances	t-test for Equality of Means								
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Differenc e	Std. Error Differenc e	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
ALizarin	Equal variances assumed	3.46	.136	1.84	4	.140	1.396667	.760058	-7.13594	3.50693
	Equal variances not assumed			1.84	2.37	.187	1.396667	.760058	-1.43060	4.22393

เปรียบเทียบปริมาณตะกอนแคลเซียมเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มี
ฟีนอลเรดเป็นเวลา 14 วัน

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances	t-test for Equality of Means								
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Differenc e	Std. Error Differenc e	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
ALizarin	Equal variances assumed	6.83	.059	-.175	4	.869	-.213333	1.217406	-3.59339	3.16673
	Equal variances not assumed			-.175	2.14	.876	-.213333	1.217406	-5.13945	4.71278

เปรียบเทียบปริมาณตะกอนแคลเซียมเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการ
แปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งเป็นเวลา 7 วัน

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances	t-test for Equality of Means								
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Differenc e	Std. Error Differenc e	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
ALizarin	Equal variances assumed	4.56	.100	-9.029	4	.001	-9.933333	1.100172	-12.98790	-6.87877
	Equal variances not assumed			-9.029	2.24	.008	-9.933333	1.100172	-14.21039	-5.65628

เปรียบเทียบปริมาณตะกอนแคลเซียมเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการ
แปรรูปเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งเป็นเวลา 10 วัน

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances	t-test for Equality of Means								
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Differenc e	Std. Error Differenc e	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
ALizarin	Equal variances assumed	13.52	.021	-5.171	4	.007	-21.02667	4.065893	-32.31540	-9.73794
	Equal variances not assumed			-5.171	2.02	.035	-21.02667	4.065893	-38.34364	-3.70969

เปรียบเทียบปริมาณตะกอนแคลเซียมเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการ
แปรรูปเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งเป็นเวลา 14 วัน

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances	t-test for Equality of Means								
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Differenc e	Std. Error Differenc e	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
ALizarin	Equal variances assumed	.261	.636	-5.854	4	.004	-31.38000	5.360394	-46.26284	-16.49716
	Equal variances not assumed			-5.854	3.87	.005	-31.38000	5.360394	-46.45466	-16.30534

5. การศึกษาปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอของยีนคอร์บายดีนแฟกเตอร์ 1 (Cbfa1) และอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (ALP)

- a. ข้อมูลปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอตั้งต้นแสดงเป็นสัดส่วนค่าเฉลี่ยความเข้ม \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของยีนทั้ง 2

gene	NM 1	NM 2	NM 3	DS 1	DS 2	DS 3
Cbfa1	0.425 ± 0.0039	0.474 ± 0.0004	0.480 ± 0.0191	1.013 ± 0.0111	1.311 ± 0.0084	1.167 ± 0.099
ALP	0.556 ± 0.0067	0.707 ± 0.0092	0.680 ± 0.0337	0.988 ± 0.0133	1.108 ± 0.0122	1.198 ± 0.086

- b. ข้อมูลสถิติเชิงพรรณนาปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอตั้งต้นแสดงเป็นสัดส่วนค่าเฉลี่ยความเข้มของยีนทั้ง 2

Group	Gene	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
NM	Cbfa1	3	0.45967	0.030172	0.425	0.480
	ALP	3	0.66433	0.101412	0.556	0.757
DS	Cbfa1	3	1.16367	0.149028	1.013	1.311
	ALP	3	1.09800	0.105357	0.988	1.198

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

c. แสดงการวิเคราะห์การกระจายตัวของข้อมูล

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

Group			Cbfa1	ALP	
NM	N		3	3	
	Normal Parameters(a,b)	Mean	.45967	.66433	
		Std. Deviation	.030172	.101412	
	Most Extreme Differences	Absolute	.349	.228	
		Positive	.250	.191	
		Negative	-.349	-.228	
	Kolmogorov-Smirnov Z		.605	.395	
	Asymp. Sig. (2-tailed)		.858	.998	
	DS	N		3	3
		Normal Parameters(a,b)	Mean	1.16367	1.09800
Std. Deviation			.149028	.105357	
Most Extreme Differences		Absolute	.177	.204	
		Positive	.177	.185	
		Negative	-.176	-.204	
Kolmogorov-Smirnov Z			.307	.354	
Asymp. Sig. (2-tailed)		1.000	1.000		

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

d. แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลปริมาณอาร์เอ็นเอตั้งต้นด้วยวิธีทดสอบทีชนิดตัวอย่างอิสระ
 ยีนคอร์บายดีงแพกเตอร์ 1

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Differenc e	Std. Error Differenc e	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Cbfa1	Equal variances assumed	2.50	.189	-8.019	4	.001	-.704000	.087787	-.947736	-.46026
	Equal variances not assumed			-8.019	2.16	.012	-.704000	.087787	-1.05561	-.35239

ยีนอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (ALP)

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Differenc e	Std. Error Differenc e	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
ALP	Equal variances assumed	.001	.981	-5.137	4	.007	-.433667	.084428	-.66808	-.19926
	Equal variances not assumed			-5.137	3.99	.007	-.433667	.084428	-.66821	-.19912

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ทันตแพทย์หญิงอรนุช เตชาราทิพย์ เกิดที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร ในวันที่ 2 มีนาคม พ.ศ.2525 จบการศึกษาระดับประถมศึกษาและมัธยมศึกษาที่โรงเรียนเซนต์ฟรังซิสเซเวียร์ คอนเวนต์ในปี พ.ศ.2543 และเข้าศึกษาต่อในคณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีเดียวกัน โดยจบการศึกษาทันตแพทยศาสตรบัณฑิตในปี พ.ศ. 2549

หลังจบการศึกษาเป็นทันตแพทย์ ได้เข้ารับราชการเป็นทันตแพทย์ระดับ 4 ที่โรงพยาบาลชุมแพ จังหวัดขอนแก่น ในปี พ.ศ.2549 ถึง 2551 และลาออกจากราชการเพื่อกลับเข้าศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา ในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาทันตกรรมสำหรับเด็ก ภาควิชาทันตกรรมสำหรับเด็ก จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี พ.ศ.2551



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย