รายงานผลการวิจัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

เรื่อง

การตอบสนองของเซลล์เพาะเลี้ยงจาก เอ็นยึดปริทันต์ต่อเกล็ดไฮดรอกซีอาปาไทต์

โดย

ทัศนีย์ ดรงค์สุวรรณ

ประสิทธิ์ ภวสันต์

617.634
ท364ก๓

มกราคม 2542

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

การตอบสนองของเซลล์เพาะเลี้ยงจากเอ็นยึดปริทันต์ต่อเกล็ดไฮดรอกซีอาปาไทต์

โดย

ทัศนีย์ ตรงค์สุวรรณ และ ประสิทธิ์ ภาวสันต์

มกราคม 2542

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2 6 ก.ค. 2549

I 22245947

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ อาจารย์และบุคคลากรของภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อจากฟันของผู้ป่วย รวมทั้งขอขอบพระคุณ ผศ. ทพญ. ดร. วิสาขะ ลิ่มวงศ์ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ และความช่วยเหลืออย่างมากในระหว่างการทำวิจัยนำร่อง และ รศ. ทพญ. วัชรี จังศิริวัฒนชำรง ที่ให้ความช่วยเหลือในการจัดหาเกล็ดไฮดรอกซีอาปาไทต์ และสุดท้าย ขอขอบพระคุณคณะอนุกรรมการบริหารทุนวิจัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ที่กรุณาให้การสนับสนุนงานวิจัยครั้งนี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วท.ทพญ. ดร. พัชนีย์ ยงชัยสกุล
มอบให้หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
14 ก.พ. 49

ชื่อโครงการวิจัย : การตอบสนองของเซลล์เพาะเลี้ยงจากเอ็นยึดปริทันต์ต่อเกล็ดไฮดรอกซีอาปาไทต์

ชื่อผู้วิจัย : ทัศนีย์ ดรงค์สุวรรณ, ประสิทธิ์ ภวสันต์

เดือนปีที่ทำวิจัยเสร็จ : มกราคม 2542

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้แบ่งออกเป็นสองส่วน โดยในส่วนแรกเป็นการศึกษาการตอบสนองของเซลล์เพาะเลี้ยงจากเอ็นยึดปริทันต์ของคนต่อเกล็ดไฮดรอกซีอาปาไทต์ และส่วนที่สองเป็นการศึกษาต่อจากส่วนแรก โดยศึกษาถึงผลของการเปลี่ยนแปลงระดับของแคลเซียมไอออนที่มีผลต่อการสร้างโปรตีนของเซลล์ ผลจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเวสเทอร์นอนาไลซิสพบว่า เซลล์ที่เลี้ยงบนเกล็ดไฮดรอกซีอาปาไทต์ จะสร้างไฟโบรเนกตินและไฟโบรเนกตินรีเซพเตอร์เพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และเพื่อเป็นการตรวจสอบว่าการตอบสนองดังกล่าวต้องการการสัมผัสโดยตรงหรือไม่ เราได้เลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่แช่เกล็ดไฮดรอกซีอาปาไทต์ และพบว่าเซลล์มีการตอบสนองในลักษณะเดียวกับที่เลี้ยงบนเกล็ดไฮดรอกซีอาปาไทต์ นอกจากนี้ เพื่อเป็นการศึกษาถึงความเป็นไปได้ที่การตอบสนองดังกล่าวส่วนหนึ่งเป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงของระดับแคลเซียมไอออน เซลล์จากเอ็นยึดปริทันต์จึงถูกเลี้ยงในสภาวะที่มีการเพิ่มปริมาณแคลเซียมไอออน หรือมีการเติมสารละลายแคลเซียมไอโอโนฟอร์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ผลการทดลองแสดงว่า การเปลี่ยนแปลงปริมาณของแคลเซียมไอออนทั้งภายในและภายนอกเซลล์จะสามารถกระตุ้นให้เซลล์สร้างไฟโบรเนกตินและไฟโบรเนกตินรีเซพเตอร์เพิ่มขึ้น กล่าวโดยสรุปคือ ไฮดรอกซีอาปาไทต์มีผลกระตุ้นเซลล์เพาะเลี้ยงเอ็นยึดปริทันต์ให้เพิ่มการสร้างไฟโบรเนกตินและไฟโบรเนกตินรีเซพเตอร์ และผลการตอบสนองดังกล่าวอาจเกิดจากการเพิ่มขึ้นของระดับแคลเซียมไอออนภายนอกและ/หรือภายในเซลล์

Project Title : Response of periodontal ligament cells to hydroxyapatite crystal

Name of Investigators : Tussanee Darongsuwan, Prasit Pavasant

Year : January, 1999

Abstract

The first purpose of the studies is to investigate the response of human periodontal ligament cells to hydroxyapatite crystals. The second is to study the effect of calcium ion on protein synthesis, compared with the effect of hydroxyapatite. Western blot analysis showed that cells grown on hydroxyapatite increased fibronectin and fibronectin receptor synthesis. To investigate whether the cell response requires direct contact between the cells and crystals, cells were grown in the hydroxyapatite-preincubated medium. The results also showed the increase amount of fibronectin and its receptor. To test the possibility of calcium ion effects, cells were cultured in medium with addition of calcium ion or calcium ionophore. It appeared that changes of calcium ion concentration also affected the synthesis of fibronectin and its receptor in PDL cells. In summary, hydroxyapatite affects PDL cells by increasing fibronectin and its receptor. The results suggest that parts of this response may be from the effect of increased calcium ion, possibly extra- and/or intracellular calcium.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	iv
บทคัดย่อภาษาไทย	iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iv
สารบัญ	v
รายการภาพประกอบ	vi
บทนำ	1
วัสดุและวิธีการ	3
ผลการทดลอง	7
สรุปและวิจารณ์	9
บรรณานุกรม	13

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการภาพประกอบ

รูปที่	หน้า
1 เซลล์เพาะเลี้ยงจากเอ็นยึดปริทันต์ของคน	19
2 เวสเทอร์นอนาไลซิสแสดงปริมาณไฟโบรเนกตินและรีเซพเตอร์	20
3 ผลของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่แช่เกล็ดไฮดรอกซีอาปาไทต์	21
4 การเปลี่ยนแปลงของไฟโบรเนกตินจากการเพิ่มแคลเซียมไอออน	22
5 การเปลี่ยนแปลงของไฟโบรเนกตินรีเซพเตอร์จากการเพิ่มแคลเซียมไอออน	22

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

ปัญหาสำคัญประการหนึ่งในการรักษารอยโรคในช่องปากคือการรักษาโรคปริทันต์ ซึ่งเป็นโรคที่เกิดจากการอักเสบและการทำลายของเนื้อเยื่อที่รองรับรากฟัน ได้แก่เหงือก เอ็นยึดปริทันต์ (periodontal ligament) และกระดูกเบ้าฟัน (alveolar bone) ซึ่งผลของการทำลายเนื้อเยื่อเหล่านี้ จะทำให้เกิดการสูญเสียฟันในที่สุด

การทำศัลย์ปริทันต์ (perio-surgery) เป็นการรักษาวิธีหนึ่งในทางคลินิค เพื่อที่จะลดรอยโรคของกระดูกที่ถูกทำลาย และการรักษาด้วยวิธีนี้ มักจะมีการใช้วัสดุจำพวกไบโอแมททีเรียล (biomaterial) ซึ่งเป็นวัสดุจำพวกสารอนินทรีย์สังเคราะห์ ที่มีองค์ประกอบหลักเป็นแคลเซียม (calcium) และฟอสเฟต (phosphate) เช่นเดียวกับกระดูก[1-6] ร่วมด้วย โดยมีจุดมุ่งหมายเพื่อให้วัสดุดังกล่าวเป็นตัวกระตุ้นหรือเหนี่ยวนำให้เซลล์ของเนื้อเยื่อปริทันต์มีการเจริญ และมีการยึดเกาะกับวัสดุ เพื่อให้เกิดกระบวนการเสริมสร้างเนื้อเยื่อได้เร็วขึ้น[3-7]

วัสดุชนิดหนึ่งที่นิยมนำมาใช้เติมในบริเวณที่มีการทำลายของกระดูกคือ เกล็ดไฮดรอกซีอาปาไทต์ (hydroxyapatite) ซึ่งมีองค์ประกอบเช่นเดียวกับกระดูกและฟัน เพื่อหวังให้เป็นตัวกลางที่เติมเต็มบริเวณที่กระดูกเบ้าฟันถูกทำลาย และเพื่อช่วยให้เซลล์ใช้ในการยึดเกาะและสร้างกระดูกใหม่เชื่อมประสานกับกระดูกเบ้าฟัน[8-10] ผลของการรักษาโดยการใช้ไฮดรอกซีอาปาไทต์ในทางคลินิกนั้น แม้จะเป็นที่ยอมรับว่าสามารถช่วยลดรอยโรคและช่วยเสริมสร้างกระดูกส่วนที่บกพร่องได้ในระดับหนึ่ง แต่ในหลายๆกรณี ก็ไม่ประสบความสำเร็จในการช่วยซ่อมเสริมกระดูกเบ้าฟัน

การปรับปรุงวัสดุหรือวิธีการในการรักษาโรคปริทันต์ให้ได้ผลสูงสุด จะต้องอยู่บนความเข้าใจถึงกลไก หรือพฤติกรรมการตอบสนองของเซลล์ ต่อวัสดุไบโอแมททีเรียลอย่างชัดเจน ซึ่งในกรณีของไฮดรอกซีอาปาไทต์ มีงานวิจัยจำนวนมากได้ศึกษาถึงบทบาทของไฮดรอกซีอาปาไท์ในการช่วยเสริมสร้างกระดูกเบ้าฟันในสัตว์ทดลอง[11-12] โดยพบว่าไฮดรอกซีอาปาไทต์ ทำให้มีการสร้างเส้นใยคอลลาเจน (collagen) ในเนื้อเยื่อโดยรอบมากขึ้น เป็นผลให้มีการยึดเกาะของเนื้อเยื่อรอบ

รากฟันได้ดีขึ้น อย่างไรก็ดี กลไกการตอบสนองที่แท้จริงของเซลล์ในร่างกายต่อไฮดรอกซีอาปาไทต์ยังไม่เป็นที่เข้าใจแน่ชัด

เพื่อเป็นการศึกษากลไกการตอบสนองของเซลล์ มีผู้วิจัยอีกจำนวนหนึ่งใช้เซลล์เพาะเลี้ยงเป็นต้นแบบในงานวิจัย และพบว่าเซลล์จากเนื้อเยื่อปริทันต์ไม่ว่าจะเป็นเซลล์สร้างเส้นใยจากเหงือก จากเอ็นยึดปริทันต์ หรือเซลล์กระดูก ก็มีความสามารถในการเกาะบนไฮดรอกซีอาปาไทต์ได้ใกล้เคียงกัน[7,13] แต่ไม่เป็นที่แน่ชัดว่าการเกาะนี้เป็นการเกาะของเซลล์กับพื้นผิวของไฮดรอกซีอาปาไทต์โดยตรง หรือเป็นเพราะเซลล์สร้างเมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix) ขึ้นมาห่อหุ้มช่วยในการยึดเกาะ และไม่มีการวิจัยเปรียบเทียบถึงความแตกต่างของเมทริกซ์นอกเซลล์ที่ถูกสร้างขึ้นในสภาวะที่มีและไม่มีไฮดรอกซีอาปาไทต์

ด้วยเหตุผลดังกล่าว คณะผู้วิจัยได้ทำการวิจัยนำร่อง โดยมุ่งเน้นศึกษากับเซลล์สร้างเส้นใยจากเหงือก และเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ ผลการทดลอง พบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงจากเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ของคน นอกจากสามารถเกาะติดโดยสร้างเมทริกซ์นอกเซลล์มาเคลือบผิวไฮดรอกซีอาปาไทต์แล้ว ยังสร้างโปรตีนที่มีสัดส่วนของโปรตีนบางชนิด แตกต่างไปจากกลุ่มควบคุม[14]

งานวิจัยนี้ ทำขึ้นเพื่อศึกษาปฏิกริยาที่เกิดขึ้นระหว่างไฮดรอกซีอาปาไทต์ กับเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ในแง่ของการสร้างโปรตีนไฟโบรเนกติน (fibronectin) ไฟโบรเนกตินเป็นโปรตีนที่พบได้มากในเมทริกซ์นอกเซลล์ของเนื้อเยื่อหลายชนิดรวมทั้งเนื้อเยื่อปริทันต์[15-18] และสามารถจับกับเซลล์ผ่านทางไฟโบรเนกตินรีเซพเตอร์ รวมทั้งสามารถจับกับโปรตีนในเมทริกซ์นอกเซลล์ตัวอื่นๆได้หลายชนิด[17] ดังนั้น หน้าที่ประการหนึ่งของไฟโบรเนกตินจึงเกี่ยวข้องกับการยึดเกาะของเซลล์เข้ากับเมทริกซ์นอกเซลล์ และโปรตีนตัวนี้ ยังมีบทบาทอย่างมากในระหว่างพัฒนาการและระหว่างการหายของแผล[19-20] โดยไฟโบรเนกตินจะสามารถกระตุ้นการเจริญและการเคลื่อนที่ของเซลล์[21-22] รวมทั้งยังมีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนไปทำหน้าที่เฉพาะ (differentiation) ของเซลล์บางชนิดด้วย[23]

สำหรับงานวิจัยนี้ วัตถุประสงค์ที่ได้เสนอไว้คือ 1. ศึกษาว่าไฮดรอกซีอาปาไทต์สามารถกระตุ้นให้เซลล์สร้างไฟโบรเนกตินเพิ่มขึ้นหรือไม่ และสัดส่วนการเพิ่มขึ้นกับความหนาแน่นของเซลล์หรือไม่ 2. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของไฟโบรเนกตินรีเซพเตอร์ (fibronectin receptor, alpha5beta1) และ 3. ทดสอบว่าการตอบสนองที่เกิดขึ้นเกิดจากผลของแคลเซียมไอออนที่เพิ่มขึ้นในอาหารเลี้ยงเซลล์หรือไม่

วัสดุและวิธีการ

เซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์เพาะเลี้ยงจากเอ็นยึดปริทันต์ เตรียมขึ้นจากเนื้อเยื่อปริทันต์ของผู้ป่วยที่มีอายุ 18-25 ปี ซึ่งมาถอนฟันเนื่องจากการจัดฟันหรือถอนฟันคุด โดยที่ไม่มีการอักเสบของฟันและเหงือก เนื้อเยื่อที่ได้จะนำมาเพาะเลี้ยงตามวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Ragnarsson B. และคณะ[24] และ Adams และคณะ[25] วิธีการโดยย่อคือ นำฟันที่ได้มาล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลายด์ที่ปราศจากเชื้อ (sterile phosphate buffer saline) จากนั้นขูดเนื้อเยื่อของเอ็นยึดปริทันต์จากบริเวณตอนกลางของรากฟันด้วยมีดผ่าตัด นำเนื้อเยื่อที่ได้ไปวางบนจานเลี้ยงเซลล์ (tissue culture dish) จานละ 5-6 ชิ้น เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ (culture medium) ชนิด DMEM (Dulbecco Modified Eagle's Media) ที่ประกอบด้วยซีรัมร้อยละ 10 (10% fetal bovine serum [FBS]), กลูตามีน 2 มิลลิโมลาร์ (2mM L-glutamine) เพนนิซิลลิน 100 ยูนิต/มิลลิลิตร (100 IU/ml penicillin) สเตรปโตมัยซินซัลเฟต 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (100 µg/ml streptomycin sulfate) และ แอมโฟเทอริซินบี 0.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (0.25 µg/ml amphotericin B) เลี้ยงในตู้อบที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 37°C จนเซลล์คลานออกมาและเจริญเต็มภาชนะเลี้ยงเซลล์ ภายในเวลา 1-2 สัปดาห์ ภายหลังจากที่เซลล์เจริญเต็มภาชนะเลี้ยงเซลล์แล้ว ก็จะถูกนำไปหว่านใหม่ (subculture) และเริ่มนับเป็นเซลล์รุ่นที่ 1 เซลล์ที่ใช้ในการทดลองเป็นรุ่นที่ 3-8 ซึ่งเป็นเซลล์ที่แข็งแรง มีอัตราการตายจากการหว่านใหม่ต่ำ และมีอัตราการเจริญค่อนข้างคงที่

การเพาะเลี้ยงเซลล์บนไฮดรอกซีอาปาไทต์

ในการทดลองนี้ เราเลือกใช้ไฮดรอกซีอาปาไทต์ชนิดเกล็ด (Osteograf/D-700, Ceramed Corporation, Lakewood, USA) ขนาดเฉลี่ย 0.91x0.91x0.81 มิลลิเมตร เซลล์เอ็นยึดปริทันต์ จะถูกหว่านบนจานเลี้ยงเซลล์ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 35 มม. ที่มีและไม่มีเกล็ดไฮดรอกซีอาปาไทต์ โดยปริมาณไฮดรอกซีอาปาไทต์ที่ใช้คือ 0.15 กรัมต่อจาน เซลล์ถูกหว่านด้วยความหนาแน่น 5000, 10,000, 20,000 และ 40,000 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร และเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัม เพื่อลดผลของซีรัมซึ่งอาจจะมีอิทธิพลต่อการตอบสนองของเซลล์ เมื่อครบกำหนดเวลา เซลล์และเมทริกซ์นอกเซลล์จะถูกทำละลายด้วย โซเดียมโดดีซิลซัลเฟตที่มีความเข้มข้นร้อยละ 5 (5% sodium dodecyl sulfate; SDS) แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปใช้วิเคราะห์โปรตีน

การทดสอบผลของสารที่ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งเป็นผลจากเกล็ดไฮดรอกซีอาปาไทต์

เราแช่เกล็ดไฮดรอกซีอาปาไทต์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัมด้วยอัตราส่วน 0.15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แล้วทิ้งไว้ในตู้อบที่มีปริมาณ คาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 37^{0}เซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้แช่เกล็ดไฮดรอกซีอาปาไทต์ไปเลี้ยงเซลล์

ก่อนที่จะถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์ข้างต้นไปใช้ เซลล์เอ็นยึดปริทันต์จะถูกหว่านและเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมร้อยละ 10 ดังเช่นการทดลองขั้นต้น เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นชนิดไม่มีซีรัม เป็นเวลาอีก 6 ชั่วโมง แล้วจึงเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์อีกครั้งโดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่แช่เกล็ดไฮดรอกซีอาปาไทต์จากข้างต้น เซลล์จะถูกเลี้ยงต่อไปอีก 48 ชั่วโมง ก่อนที่เซลล์และเมทริกซ์นอกเซลล์จะถูกละลายด้วยโซเดียมโดดีซิลซัลเฟตร้อยละ 5 และนำไปวิเคราะห์โปรตีน ส่วนในกลุ่มควบคุมอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนเช่นเดียวกับกลุ่มทดลอง แต่จะใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัม และไม่ได้แช่เกล็ดไฮดรอกซีอาปาไทต์

หน่วยบริการ สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทดสอบการตอบสนองของเซลล์ต่อการเพิ่มปริมาณแคลเซียมไอออนในอาหารเลี้ยงเซลล์ และการเพิ่มปริมาณแคลเซียมไอออนภายในเซลล์

เซลล์ถูกหว่านเหมือนการทดลองขั้นต้น ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมร้อยละ 10 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัมอีก 6 ชั่วโมง ก่อนจะเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีการเติมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 0.5, 1, 2 และ 4 มิลลิโมลาร์ (0.5, 1, 2, 4 mM calcium chloride) เพื่อเพิ่มปริมาณแคลเซียมไอออนในอาหารเลี้ยงเซลล์ และเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ส่วนในกลุ่มควบคุมจะใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีสารละลายแคลเซียม

ในอีกการทดลองหนึ่ง เซลล์ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีและไม่มีส่วนผสมของแคลเซียมไอโอโนฟอร์ เอ 23187 (calcium ionophore A 23187, Sigma) ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้น เซลล์และเมทริกซ์นอกเซลล์ ถูกละลายด้วยโซเดียมโดดีซิลซัลเฟต เพื่อนำไปวิเคราะห์โปรตีน

การวัดปริมาณโปรตีนด้วยสเปคโตรโฟโตมิเตอร์

โปรตีนที่ถูกละลายในโซเดียมโดดีซิลซัลเฟตร้อยละ 5 จะถูกนำไปวิเคราะห์โดยใช้ชุดวิเคราะห์โปรตีน DC Protein Assay (Bio-Rad) โดยวัดด้วยวิธีตามคู่มือของบริษัทที่ดัดแปลงมาจาก Folin reaction และปฏิกริยาที่เกิดขึ้นจะทำให้เกิดสีที่สามารถนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วย สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ค่าความยาวคลื่นแสง 750 (OD_{750}) ค่าที่ได้สามารถนำมาคำนวณค่าของโปรตีนโดยเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ใช้เป็นมาตราฐาน (standard protein คือ bovine serum albumin; BSA)

การแยกและวิเคราะห์โปรตีน ด้วยเทคนิคอิเลคโตรโฟเรซิส (electrophoresis) และเวสเทิร์นอนาไลซิส (western analysis)

สารละลายโปรตีนข้างต้นภายหลังจากที่ทราบปริมาณโปรตีนแล้ว จะถูกนำไปวิเคราะห์โดยแยกโปรตีนด้วยไฟฟ้า ซึ่งจะสามารถแยกโปรตีนตามน้ำหนักของโมเลกุล (SDS-PAGE) โดยใช้ปริมาณอคริลามายด์ (acrylamide) 7.5% โปรตีนบนแผ่นอคริลามายด์จะถูกถ่ายลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose) ด้วยกำลังไฟฟ้า จากนั้นนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสไปย้อมด้วยแอนติบอดี (antibody) ต่อไฟโบรเนกติน (NCL-FIB, Novocastra) ความเข้มข้น 1:2000 เป็นเวลา 45 นาที, แล้วย้อมต่อด้วยแอนติบอดีตัวที่สอง (Biotinylated rabbit anti-mouse IgG I, Zymed, USA) ความเข้มข้น 1:4000 และสารละลายสเตรปตาวิดินที่ต่อกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (Peroxidase conjugated Streptavidin, KPL, USA) ที่ความเข้มข้น 1:500 เป็นเวลา 45 และ 30 นาทีตามลำดับ จากนั้นจึงย้อมครั้งสุดท้ายด้วยสารที่ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสและให้สีแดงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส คือเออีซี (AEC:3-amilno-9-ethyl-carbazole) และไดเม็ทธิลฟอร์มามายด์ (N,N dimethyl formamide) ใน 0.05 โมลาร์โซเดียมอะซีเตท (0.05 M Sodium acetate) หากมีไฟโบรเนกติน ก็จะปรากฏแถบสีแดงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส

สำหรับไฟโบรเนกตินรีเซพเตอร์ โปรตีนบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสถูกย้อมด้วยแอนติบอดีต่ออัลฟา5 เบตา1 ที่ความเข้มข้น 1:2000 (rabbit polyclonal antibody, Gibco, USA) เป็นเวลา 45 นาที แล้วย้อมด้วยแอนติบอดีตัวที่สองที่มีไบโอตินเกาะอยู่ (biotinylated secondary antibody against rabbit IgG, Zymed, USA) ความเข้มข้น 1:4000 เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นจึงย้อมด้วยเออีซีเช่นเดียวกับการย้อมไฟโบรเนกติน จะได้แถบสีของไฟโบรเนกตินรีเซพเตอร์ ความเข้มของแถบสี จะถูกนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องอ่านความเข้ม (densitometer) และวิเคราะห์ตามวิธีการที่ปรากฏในลมุนภัณฑ์ densitometer ของบริษัท Bio-Rad,USA

ผลการทดลอง

จากการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเฟสคอนทราสท์ (phase contrast) พบว่าเซลล์เอ็นยึดปริทันต์สามารถเกาะและเจริญบนเกล็ดไฮดรอกซีอาปาไทต์ได้ดี และไม่พบการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ในกลุ่มที่เจริญบนเกล็ดไฮดรอกซีอาปาไทต์ (รูป 1A) กับเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่เจริญบนจานเลี้ยงเซลล์ปกติ (รูป 1B)

เมื่อทำการวิเคราะห์โปรตีนที่สร้างขึ้นโดยเซลล์ทั้งสองกลุ่มข้างต้นเมื่อเลี้ยงไปเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปรากฏว่าเซลล์ที่เลี้ยงบนเกล็ดไฮดรอกซีอาปาไทต์จะมีการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรม โดยเพิ่มปริมาณการสร้างไฟโบรเนกติน เมื่อเทียบกับกลุ่มที่เลี้ยงบนจานเลี้ยงเซลล์ (กลุ่มควบคุม) ดังแสดงในรูปที่ 2

รูป 2A แสดงถึงปริมาณไฟโบรเนกตินที่เซลล์สร้างขึ้น โดยเปรียบเทียบต่อปริมาณโปรตีนที่เท่ากัน ในสภาวะที่มี (B, D, F, H)และไม่มี (A, C, E, G) เกล็ดไฮดรอกซีอาปาไทต์ โดยศึกษาจากกลุ่มเซลล์ต่างๆ ที่หว่านในความหนาแน่นไม่เท่ากัน คือ 5,000 (A,B), 10,000 (C,D), 20,000 (E,F) และ 40,000 (G,H) เซลล์ต่อตารางเซนติเมตรตามลำดับ และเมื่ออ่านความเข้มของแถบสีเหล่านี้ด้วยเครื่องอ่านความเข้ม พบว่าเซลล์ที่เลี้ยงบนเกล็ดไฮดรอกซีอาปาไทต์ จะสร้างไฟโบรเนกตินเพิ่มขึ้น ตั้งแต่ความหนาแน่น 10,000 เซลล์/ตารางเซนติเมตรขึ้นไป โดยจะเพิ่มขึ้นในช่วง 1.3-2.3 เท่า และเห็นผลได้ชัดเจนที่สุด ในกลุ่มเซลล์ที่หว่านในความหนาแน่น 40,000 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร ดังนั้น ในการทดลองส่วนที่เหลือทั้งหมด จะหว่านเซลล์ที่ความหนาแน่น 40,000 เซลล์/ตารางเซนติเมตร

สำหรับไฟโบรเนกตินรีเซพเตอร์ จะพบการเพิ่มขึ้นคล้ายการเพิ่มของไฟโบรเนกติน ดังแสดงในรูป 2B ซึ่งเป็นแถบสีของไฟโบรเนกตินรีเซพเตอร์ของเซลล์ชุดเดียวกับที่สร้างไฟโบรเนกตินในรูป 2A โดยจะเห็นว่าเซลล์ที่เลี้ยงบนเกล็ดไฮดรอกซีอาปาไทต์มีการเพิ่มของรีเซพเตอร์มากขึ้นเป็น 1.3-1.5 เท่า

เพื่อเป็นการตอบคำถามว่าการเพิ่มขึ้นของปริมาณไฟโบรเนกตินและรีเซพเตอร์ในรูป 2A และ 2B นั้นจำเป็นต้องมีการสัมผัสโดยตรงระหว่างเซลล์กับเกล็ดไฮดรอกซีอาปาไทต์หรือไม่ เราได้ทำการทดลองแช่เกล็ดไฮดรอกซีอาปาไทต์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ แล้วทิ้งไว้ในตู้อบคาร์บอนไดออกไซด์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนนำเอาอาหารเลี้ยงเซลล์นั้นมาใช้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลาอีก 48 ชั่วโมง แล้วจึงวิเคราะห์ปริมาณไฟโบรเนกตินและไฟโบรเนกตินรีเซพเตอร์ที่เซลล์สร้างขึ้น ดังแสดงผลในรูปที่ 3 ซึ่งพบว่าเมื่อเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่แช่เกล็ดไฮดรอกซีอาปาไทต์ (แถว B, D) เซลล์จะมีการตอบสนองต่อภาวะที่เปลี่ยนไปในอาหารเลี้ยงเซลล์อย่างเห็นได้ชัด โดยมีการสร้างไฟโบรเนกตินและไฟโบรเนกตินรีเซพเตอร์เพิ่มขึ้นเป็น 1.9 และ 2.7 เท่า ของปริมาณไฟโบรเนกตินและรีเซพเตอร์ที่สร้างขึ้นในกลุ่มควบคุมที่ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ (แถว A, C)

จากนั้น ได้ทำการทดลองเพิ่มปริมาณของแคลเซียมไอออนในอาหารเลี้ยงเซลล์ เพื่อศึกษาถึงการตอบสนองของเซลล์ ดังแสดงผลในรูปที่ 4 ปรากฏว่า การเพิ่มปริมาณแคลเซียมไอออน 0.5, 1, 2 และ 4 มิลลิโมลาร์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (B, C, D และ E) มีผลต่อเซลล์ โดยขึ้นกับระดับของแคลเซียมที่เหมาะสม ในการทดลองนี้เราเห็นการตอบสนองของเซลล์ได้ชัด ที่ระดับของแคลเซียมไอออน 2 มิลลิโมลาร์ (แถว D) โดยเซลล์สร้างไฟโบรเนกตินเพิ่มเป็น 2.1 เท่า

เพื่อเป็นการตรวจสอบว่าการตอบสนองของเซลล์ต่อการเปลี่ยนแปลงของแคลเซียมไอออนข้างต้น ส่วนหนึ่งเป็นผลจากการเพิ่มขึ้นของแคลเซียมไอออนภายในเซลล์ ที่เกิดเนื่องจากการแพร่ผ่านของแคลเซียมไอออนจากภายนอกเข้าสู่เซลล์ เราได้ทำการทดลองเพิ่มแคลเซียมไอออนภายในเซลล์ด้วยการใช้สารละลายแคลเซียมไอโอโนฟอร์ ปริมาณ 0.5 ไมโครโมลาร์ ผลการทดลองที่ได้แสดงในรูปที่ 4 ซึ่งจะเห็นว่าปริมาณของไฟโบรเนกตินที่เซลล์สร้างในภาวะที่มีไอโอโนฟอร์ (แถว G) จะสูงกว่าในสภาวะปกติ (F)

รูปที่ 5 แสดงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไฟโบรเนกตินรีเซพเตอร์ เมื่อเพิ่มสารละลายแคลเซียมในอาหารเลี้ยงเซลล์ 2 มิลลิโมลาร์ หรือแคลเซียมไอโอโนฟอร์ 0.5 ไมโครโมลาร์ ซึ่งเป็น

ความเข้มข้นที่กระตุ้นการสร้างไฟโบรเนกติน พบว่าไฟโบรเนกตินรีเซพเตอร์เพิ่มขึ้นเป็น 1.5 (B เทียบกับ A) และ 1.2 เท่าตามลำดับ (D เทียบกับ C)

สรุปและวิจารณ์

ผลจากงานวิจัยที่ได้ พบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงจากเอ็นยึดปริทันต์ของคน มีการตอบสนองต่อเกล็ดไฮดรอกซีอาปาไทต์ ด้วยการสร้างเมทริกซ์นอกเซลล์เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งไฟโบรเนกติน ซึ่งมีอิทธิพลต่อการยึดเกาะและการเจริญของเซลล์ นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์มีการสร้างไฟโบรเนกตินรีเซพเตอร์เพิ่มตามในอัตราส่วนที่ใกล้เคียงกัน

ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานในสัตว์ทดลองที่พบว่าไฮดรอกซีอาปาไทต์ ที่ฝังอยู่ระหว่างรากฟันและกระดูกเบ้าฟัน สามารถกระตุ้นให้เซลล์สร้างโปรตีนที่คล้ายโปรตีนของเคลือบรากฟัน[26] และสร้างเคลือบรากฟัน โดยเฉพาะบนพื้นผิวที่มีองค์ประกอบของไฮดรอกซีอาปาไทต์ ภายใน 6-8 อาทิตย์[27] อย่างไรก็ดี ผลการทดลองดังกล่าวไม่สามารถยืนยันว่าเซลล์ชนิดใดบ้างที่สามารถตอบสนองต่อไฮดรอกซีอาปาไทต์โดยตรง

ในการทดลองนี้ แสดงให้เห็นว่าเซลล์เพาะเลี้ยงจากเอ็นยึดปริทันต์ของคนสามารถตอบสนองต่อไฮดรอกซีอาปาไทต์ได้โดยตรง โดยการเพิ่มการสร้างไฟโบรเนกติน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานว่า ไฮดรอกซีอาปาไทต์สามารถกระตุ้นเซลล์เพาะเลี้ยงเอ็นยึดปริทันต์ของคน ให้สร้างโปรตีนเพิ่มขึ้น[28] การที่เซลล์สร้างไฟโบรเนกตินเพิ่มขึ้น น่าจะเป็นการตอบสนองในระยะแรกของเซลล์ต่อไฮดรอกซีอาปาไทต์ และผลการตอบสนองในแง่ของสร้างโปรตีนอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเสริมสร้างเนื้อเยื่อปริทันต์ เป็นสิ่งที่น่าจะมีการศึกษาต่อไป

กลไกของของการตอบสนองมีความเป็นไปได้ประการหนึ่ง เกิดจากการสัมผัสโดยตรงระหว่างเซลล์กับเกล็ดไฮดรอกซีอาปาไทต์ หลักฐานที่สนับสนุนมาจากรายงานของผู้วิจัยหลายกลุ่ม รวมทั้งของคณะผู้วิจัยเอง ที่แสดงว่าเซลล์ที่เลี้ยงบนเกล็ดไฮดรอกซีอาปาไทต์ สามารถกลืนกิน (phagocytose) ผลึกไฮดรอกซีอาปาไทต์ขนาดเล็กเข้าสู่เซลล์ได้[29-32] และเนื่องจากกลไกของการ

กลืนกินเกิดจากการสัมผัสโดยตรงระหว่างเซลล์กับไฮดรอกซีอาปาไทต์ ดังนั้น จึงมีความเป็นไปได้ที่การสัมผัสโดยตรงกับผิวเซลล์มีผลกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมของเซลล์ นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนแผ่นไฮดรอกซีอาปาไทต์ที่มีลักษณะของพื้นผิวที่แตกต่างกันจะมีรูปร่างของเซลล์ที่แตกต่างกัน[33-34] ซึ่งสนับสนุนกลไกการสัมผัสโดยตรงที่มีต่อพฤติกรรมของเซลล์

กลไกการส่งผ่านสัญญาณภายในเซลล์ภายหลังจากการสัมผัสกับไฮดรอกซีอาปาไทต์นั้นมีผู้สันนิษฐานว่า อาจเกิดจากการที่ส่วนของเกล็ดไฮดรอกซีอาปาไทต์ที่ถูกเซลล์กลืนกินเข้าไป ถูกละลายด้วยสภาวะความเป็นกรดในไลโซโซม (lysosome) และปลดปล่อยสารอนินทรีย์ (decalcified) โดยเฉพาะแคลเซียมไอออนออกมา ทำให้ปริมาณแคลเซียมไอออนภายในเซลล์สูงขึ้น และการเพิ่มขึ้นของแคลเซียมไอออนนี้เองที่เป็นตัวกระตุ้นการตอบสนองของเซลล์[29,35-36]

กลไกการตอบสนองที่เป็นไปได้อีกประการหนึ่ง อาจเกิดจากการที่เซลล์ตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของไอออนในอาหารเลี้ยงเซลล์ เนื่องจากการละลายของเกล็ดไฮดรอกซีอาปาไทต์ หลักฐานในส่วนนี้ มาจากรายงานที่แสดงว่าการละลายของไฮดรอกซีอาปาไทต์จะทำให้ปริมาณของไอออนโดยเฉพาะแคลเซียมไอออนในอาหารเลี้ยงเซลล์เพิ่มสูงขึ้น[37] และผลของการเพิ่มปริมาณของแคลเซียมไอออน อาจจะก่อให้เกิดเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมของเซลล์ โดยมีรายงานที่แสดงว่าการเพิ่มขึ้นของแคลเซียมไอออนนอกเซลล์จะมีอิทธิพลต่อการทำงานของเซลล์ ผ่านทางแคลเซียมเซนซิ่งรีเซพเตอร์ (calcium sensing receptor) บนผิวเซลล์ได้โดยตรง[38-39] และมีผลให้ระดับของแคลเซียมภายในเซลล์เพิ่มสูงขึ้น

คณะผู้วิจัยได้ทำการทดลองโดยการแช่เกล็ดไฮดรอกซีอาปาไทต์ในอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำเอาเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์นั้นมาใช้เลี้ยงเซลล์ และพบว่าเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่แช่เกล็ดไฮดรอกซีอาปาไทต์จะสร้างไฟโบรเนกตินเพิ่มมากขึ้นกว่าปกติ ผลของการเปลี่ยนแปลงที่พบนี้คล้ายกับที่พบเมื่อเลี้ยงเซลล์ลงบนเกล็ดไฮดรอกซีอาปาไทต์โดยตรง และยืนยันว่าการตอบสนองของเซลล์โดยการเพิ่มการสร้างไฟโบรเนกติน ไม่จำเป็นต้องอาศัยการสัมผัสโดยตรงระหว่างเซลล์กับเกล็ดไฮดรอกซีอาปาไทต์ แต่น่าที่จะเกิดจากการเปลี่ยนแปลงภายใน

อาหารเลี้ยงเซลล์ที่แช่เกล็ดไฮดรอกซีอาปาไทต์ แต่ก็ยังไม่มีหลักฐานยืนยันว่าการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวคืออะไร โดยความเป็นไปได้ที่คณะผู้วิจัยคำนึงถึงประการแรกคือการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไอออน โดยเฉพาะแคลเซียมและฟอสเฟตไอออน เนื่องจากโครงสร้างของเกล็ดไฮดรอกซีอาปาไทต์ประกอบด้วยผลึกแคลเซียมฟอสเฟตเป็นส่วนใหญ่

เนื่องจากแคลเซียมไอออน มีบทบาทสำคัญต่อการส่งผ่านสัญญาณภายในเซลล์และการเพิ่มขึ้นของระดับแคลเซียมภายในเซลล์สามารถกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมของเซลล์ได้[40-44] ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงได้เลือกทำการศึกษาถึงการตอบสนองของเซลล์เพาะเลี้ยงจากเอ็นยึดปริทันต์ต่อการเปลี่ยนแปลงของแคลเซียมไอออนในอาหารเลี้ยงเซลล์ และผลจากการทดลองเพิ่มปริมาณแคลเซียมไอออนในรูปของแคลเซียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ สามารถกระตุ้นการเพิ่มการสร้างไฟโบรเนกตินและรีเซพเตอร์ของไฟโบรเนกตินได้ คล้ายกับเมื่อเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่แช่เกล็ดไฮดรอกซีอาปาไทต์

จากผลการทดลองข้างต้น ทำให้คณะผู้วิจัยมีความรู้สึกว่า กลไกที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของไฟโบรเนกตินและรีเซพเตอร์เมื่อเลี้ยงเซลล์บนเกล็ดไฮดรอกซีอาปาไทต์ประการหนึ่ง อาจเกิดจากการละลายตัวของไฮดรอกซีอาปาไทต์และทำให้ระดับของแคลเซียมไอออนในอาหารเลี้ยงเซลล์เพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ดี การถ่ายทอดสัญญาณจากการเพิ่มของแคลเซียมไอออนภายนอกเซลล์นั้นยังไม่แน่ชัด และความเป็นไปได้ประการหนึ่งคือการเพิ่มขึ้นของแคลเซียมไอออนภายนอกเซลล์อาจจะกระตุ้นการทำงานของแคลเซียมเซนซิ่งรีเซพเตอร์ และทำให้ระดับของแคลเซียมไอออนภายในเซลล์เพิ่มสูงขึ้น คล้ายกับกลไกที่พบในเซลล์ของต่อมพาราไทรอยด์หรือเซลล์ไซโตโทรโฟบลาส (cytotophoblast) ในรก (placenta) เป็นต้น[38]

จะเห็นได้ว่า ในกลไกสองประการที่กล่าวถึงข้างต้น ไม่ว่าจะเป็นการสัมผัสและกลืนกิน หรือการเปลี่ยนแปลงของแคลเซียมไอออนในอาหารเลี้ยงเซลล์ กลไกสุดท้ายที่กระตุ้นการส่งผ่านสัญญาณภายในเซลล์คือการเพิ่มปริมาณของแคลเซียมไอออนภายในเซลล์ ไม่ว่าจะมาจากการละลายของไฮดรอกซีอาปาไทต์ในเซลล์หรือมาจากการกระตุ้นผ่านแคลเซียมเซนซิ่งรีเซพเตอร์[38-39]

และเพื่อเป็นการทดสอบว่าการเปลี่ยนแปลงของระดับแคลเซียมไอออนภายในเซลล์ เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการสร้างไฟโบรเนกตินเพิ่มมากขึ้น คณะผู้วิจัยได้ทำการทดลองเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารละลายไอโอโนฟอร์ ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่มีโครงสร้างคล้ายกับโปรตีนผิวเซลล์ที่ทำหน้าที่ควบคุมการผ่านเข้าออกของแคลเซียมไอออน (calcium channel) ไอโอโนฟอร์จะสามารถฝังตัวเข้าสู่ผนังเซลล์ และเปิดช่องให้แคลเซียมไอออนจากภายนอก ผ่านเข้าสู่เซลล์ ทำให้ปริมาณของแคลเซียมภายในเซลล์เพิ่มสูงขึ้น[40] และผลที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่มีไอโอโนฟอร์ ปรากฏว่าสามารถกระตุ้นให้เซลล์เอ็นยึดปริทันต์สร้างไฟโบรเนกตินและไฟโบรเนกตินรีเซพเตอร์เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน

มีรายงานว่า การเพิ่มแคลเซียมไอออนภายในเซลล์ช่วยกระตุ้นการสร้างไฟโบรเนกติน[45] และช่วยในการยึดเกาะของเซลล์กับเมทริกซ์นอกเซลล์ได้ดีขึ้น[46] ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในครั้งนี้ที่พบการเพิ่มปริมาณของไฟโบรเนกตินพร้อมๆกับการเพิ่มไฟโบรเนกตินรีเซพเตอร์ ไฟโบรเนกตินรีเซพเตอร์ เป็นโปรตีนผิวเซลล์ในกลุ่มอินทิกริน ซึ่งมีบทบาทในการยึดเกาะและรับสัญญาณจากสิ่งกระตุ้นภายนอกเซลล์[17] รวมทั้งมีหลักฐานว่าผลของการส่งสัญญาณผ่านไฟโบรเนกตินรีเซพเตอร์จะเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการสร้างเมทริกซ์ตัวอื่นๆ[47] ซึ่งในกรณีของเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ จะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

โดยสรุป คณะผู้วิจัยได้แสดงให้เห็นว่า เซลล์เพาะเลี้ยงจากเอ็นยึดปริทันต์ของคน สามารถตอบสนองโดยตรงต่อไฮดรอกซีอาปาไทต์ โดยสร้างไฟโบรเนกตินและไฟโบรเนกตินรีเซพเตอร์เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ดีเราไม่สามารถบอกได้ว่ากลไกการกระตุ้นเกิดได้อย่างไร แต่จากผลการวิจัย แสดงให้เห็นว่า กลไกที่เป็นไปได้ประการหนึ่ง น่าจะเกิดจากการเพิ่มขึ้นของแคลเซียมไอออนภายในเซลล์

เอกสารอ้างอิง

1. De Lange GL, De Putter C, De Wijs FLJA. Histological and ultrastructural appearance of the hydroxyapatite-bone interface. J Biomed Mater Res 1990;24:829-45.

2. Tracy BM, Doremus RH. Direct electron microscopy studies of the bone hydroxyapatite interface. J Biomed Mater Res 1984;18:719-26.

3. Shirota T, Ohno K, Michi KI, Tachikawa T. An experimental study of healing around hydroxyapatite implants installed with autogenous iliac bone grafts for jaw reconstruction. J Oral Maxillofac Surg 1991;49:1310-5.

4. Cook SD. Evaluation of a hydroxyapatite (HA)/ resorbable suture inplant for alveolar ridge augmentation. J Oral Implant 1994;XX:292-8.

5. Lee RR, Ogiso M, Watanabe A, Ishihara K. Examination of hydroxyapatite filled 4-META/MMA-TBB adhesive bone cement in *in vitro* and *in vivo* environment. J Biomed Mater Res 1997;38:11-6.

6. Holtgrave EA. Attachment of cementum on different hydroxyapatite ceremic (HAC) substrata *in vivo*. A light and electron microscopic study. J Periodont Res 1991;26:511-8.

7. Serre CM, Papillard M, Chavassieux P, Boivin G. *In vitro* induction of a calcifying matrix by biomaterials constituted of a collagen and/or hydroxyapatite: An ultrastructural comparison of three types of biomaterials. Biomaterials 1993;14:97-106.

8. Meffert RM, Thomas JR, Hamilton KM, Brownstein CV. Hydroxyapatite as an alloplastic graft in the treatment of human periodontal osseous defects. J Periodontal 1985;56:63-73.

9. Yoshitada H, Wang JT, Doppalapudi VA, Willis AA, Jasty M, Harris WH, Nagase M, Goldring SR. Differential effects of different forms of hydroxyapatite and

hydroxyapatite/tricalcium phosphate particulates on human monocyte/macrophage *in vitro*. J Biomed Mat Res 1996;31:19-26.

10. Yukna RA, Cassingham RJ, Caudill RF, Evans RF, Miller S, Mayer ET, Simon JF. Six months evaluation of Calcite (hydroxyapatite ceramic) in periodontal osseous defects. Int J Periodont Restorative Dent 1986;6(3):35-45.

11. Kamakura S, Sasano Y, Nakamura M, Susuki O, Ohki H, Kagayama M, Moteg K. Initiation of alveolar ridge augmentation in the rat mandible by subperiosteal implantation of octacalcium phosphate. Arch Oral Biol 1996;41:1029-38.

12. Ripamonti U, Yeates L, Heever B. Initiation of heterotopic osteogenesis in primates after chromatographic of osteogenin, a bone morphogenic protein, onto porous hydroxyapatite. Biochem Biophys Res Com 1993;193:509-17.

13. Labat B, hamson A, Frey J. Effects of gamma-alumina and hydroxyapatite coatings on the teeth and metabolism of human osteoblasts. 1995;29:1397-401.

14. Darongsuwan T, Pavasant P. *In vitro* effects of hydroxyapatite crystal on gingival and periodontal fibroblasts. CU Dent J 1997;20:183-93.

15. Baum BJ, Wright WE. Demonstration of fibronectin as a major extracellular protein of human gingival fibroblasts. J Dent Res 1980;59:631-7.

16. Teranova VP, Wikesjo UME. Extracellular matrix and polypeptide growth factors as mediators of functions of cells of the periodontium. J Periodontol 1987;58:371-80.

17. Yamada KM. Fibronectin and other cell interactive glycoproteins. In: Hay ED., editor. Cell biology of extracellular matrix. New York: Plenum Press, 1991:.111-24

18. Cho MI, Garant PR, Lee YL. Immunocytochemical *in vivo* localization of fibronectin-rich contact-sites on fibroblasts of normal periodontal ligament and inflamed gingiva. J Periodont Res 1988;23:230-8.

19. McCulloch CAG. Origins and functions of cells essential for periodontal repair : The role of fibroblasts in tissue homeostasis. Oral Dis 1995;1:271-78.

20. McCulloch CAG, Bodin S. Role of fibroblast subpopulations in periodontal physiology and pathology. J Periodont Res 1991;26:144-54.

21. Somerman MJ, Foster RA, Imm GM, Sauk JJ, Archer SY. Periodontal ligament cells and gingival fibroblasts respond differently to attachment factors *in vitro*. J Periodontol 1989;60:73-7.

22. Bartold PM. Turnover in periodontal connective tissues : Dynamic homeostasis of cells, collagen and ground substances. Oral Dis 1995;1:238-53.

23. Thesleff I, Vaahtokari A, Partanen AM. Regulation of organogenesis. Common molecular mechanisms regulating the development of teeth and other organs. Int J Dev Biol 1995;39:35-50.

24. Rangnarsson B, Carr G, Danial JC. Isolation and growth of human periodontal ligament cells *in vitro*. J Dent Res 1985;64:1026-30.

25. Adams AM, Soames JV, Searle RF. Cultural and morphological characteristics of human periodontal ligament cells *in vitro*. Arch Oral Biol 1993;38:657-62.

26. Takata T, Katauchi K, Miyauchi M, Ogawa I, Akagawa Y, Nikai H. Periodontal tissue regenaration on the surface of synthetic hydroxyapatite implanted into root surface. J periodontol 1995;66:125-30.

I22245947

27. Beertsen W, van der Boo T, Niehof A, Everts V. Formation of reparative acellular extrinsic fiber cementum in relation to implant materials installed in rat periodontium. Eur J Oral Sci 1998;106(suppl1):368-75.

28. Alliot-Licht B, De Lange GL, Gregoire M. Effects of hydroxyapatite particles on periodontal ligament fibroblast-like cell behavior. J Periodontol 1997;68:158-65.

29. Evans RW, Cheung HS, McCarty DJ. Cultured human monocytes and fibroblasts solubilize calcium phosphate crystals. Calcif Tissue Int 1984;36:645-650.

30. Owens JL, Cheung HS, McCarty DJ. Endocytosis precedes dissolution of basic calcium phosphate crystal by murine macrophages. Calcif Tissue Int 1986;38:170-4.

31. Gregoire M, Orly I, Kerebel LM, McCarty DJ. *In vitro* effects of calcium phosphate biomaterials on fibroblastic cell behavior. Biol Cell 1987;59:255-60.

32. Alliot-Licht B, Jean A, Gregoire M. Comparative effect of calcium hydroxide and hydroxyapatite on the cellular activity of human pulp fibroblasts *in vitro*. Arch Oral Biol 1994;39:481-9.

33. Malik MA, Puleo DA, Bizios R, Doremus RH. Osteoblasts on hydroxyapatite, alumina and bone surfaces in vitro: morphology during the first 2h of attachment. Biomaterials 1992;13:123-8.

34. Qu J, Chehroudi B, Brunette DM. The use of micromachined surfaces to investigate the cell behavioural factors essential to osseointegration. Oral Dis 1996;2:102-15.

35. Cheung HS, McCarty DJ. Mitogenesis induced by calcium-containing crystals: Role of intracellular dissolution. Exp Cell Res 1985;157:63-70.

36. Kwong CH, Bums WB, Cheung HS. Solubilisation of hydroxyapatite crystals by murin bone cells, macrophages and fibroblasts. Biomaterials 1989;10:579-83.

37. Orly I, Gregoire M, Menanteau J, Dard M. Effects of synthetic calcium phosphates on the ^{3}H-thymidine incorporation and alkaline phosphatase activity of human fibroblasts in culture. J Biomed Mater Res 1989;23:1433-40.

38. Brown EM, Pollak M, Seidman CE, Seidman JG, Chou YW, Riccardi D, Hebert SC. Calcium-ion –sensing cell-surface receptors. N Eng J Med 1995;333:234-40.

39. Ray K, Clapp P, Goldsmith PK, Spiegel AM. Identification of the sites of N-linked glycosylation on the human calcium receptor and assessment of their role in cell surface expression and signal transduction. J Biol Chem 1998;273:34558-67.

40. Rasmussen H. Barret PQ. Calcium messenger system: An integrated view. Physiol Rev 1984;64:938-83.

41. Palfrey HC, Nairn AC. Calcium-dependent regulation of protein synthesis. In: Means AR., editor. Calcium regulation of cellular function. New York: Raven Press, 1995:191-223.

42. Cheung HS, Van Wyk JJ, Russell WE, McCarty DJ. Mitogenic activity of hydroxyapatite requirement for somatomedin C. J Cell Physiol 1986;128:143-8.

43. Cheung HS, Story MT, McCarty DJ. Mitogenetic effect of hydroxyapatite and calcium pyrophosphate dihydrate crystals on cultured mammalian cells. Arthritis Rheum 1984;27:668-74.

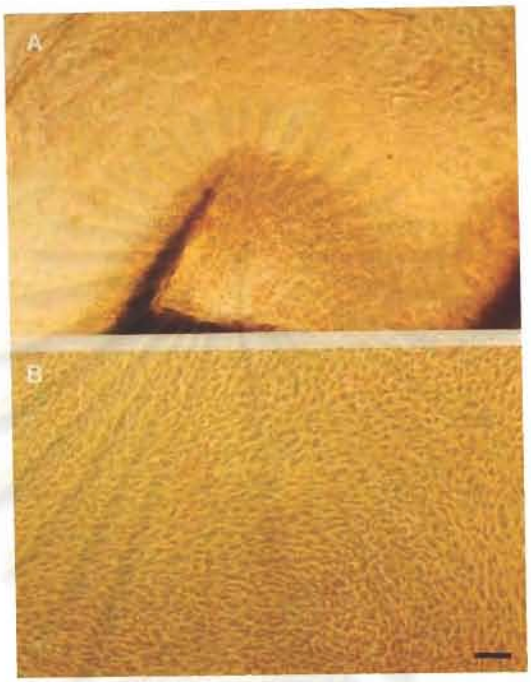
44. Bowen-Pope DF, Rubin H. Growth stimulatory precipitates of Ca^{+} and pyrophosphate. J Cell Physiol 1983; 117:51-61.

45. Rovin BH, Tan LC, Leonhart KL, Nahman NS Jr. Cyclic adenosine monophosphate and protein kinase C modulate fibronectin production in cultured human mesangial cells. J Lab Clin Med 1995;126:216-23.

46. Hartfield PJ, Greaves MW, Camp RD. Beta1 integrin mediated T cell adhesion is regulated by calcium ionophores and endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase inhibitors. Biochem Biophys Res Com 1993;196:1183-7.

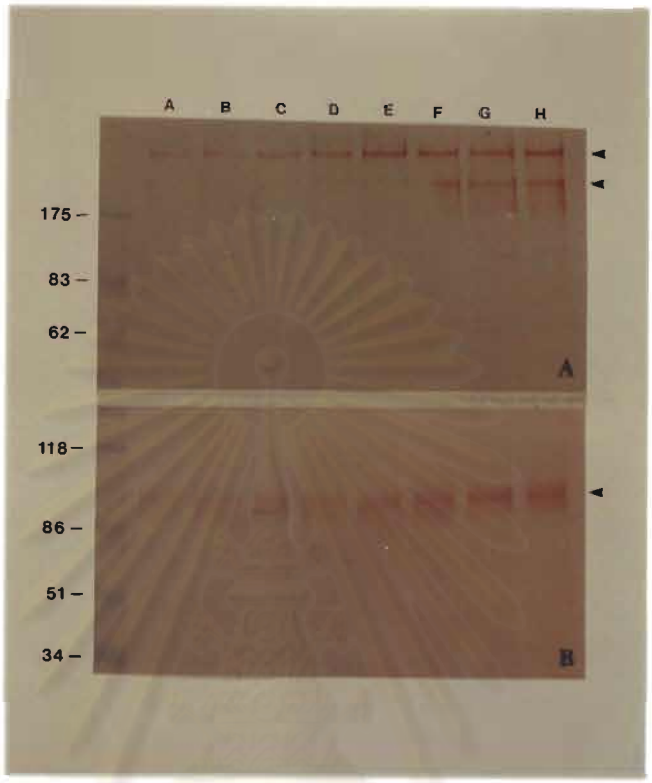
47. Pacifici R, Roman J, Kimble R, Civitelli R, Brownfield CM, Bizzarri C. Ligand binding to monocytes alpha 5 beta 1 integrin activates the alpha 2 beta 1 receptor via the alpha 5 subunit cytoplasmic domain and protein kinase C. J Immunol 1994;153:2222-33.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1 เซลล์เพาะเลี้ยงจากเอ็นยึดปริทันต์ของคน ที่เลี้ยงบนเกล็ดไฮดรอกซีอาปาไทต์ (A) และบนจานเลี้ยงเซลล์ (B) ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเฟสคอนทราสท์ เซลล์มีการเจริญดีและเกาะบนเกล็ดไฮดรอกซีอาปาไทต์ โดยไม่พบการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ (เส้นที่อยู่มุมขวาล่างยาวเท่ากับ 20 ไมโครเมตร)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

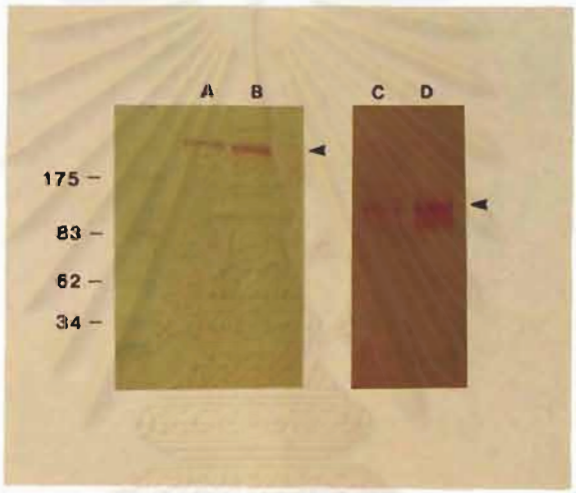


รูปที่ 2 เวสเทอร์นอนาไลซิสแสดงปริมาณของไฟโบรเนกติน (A) และไฟโบรเนกตินรีเซพเตอร์ (B) ที่เซลล์สร้าง ในภาวะที่มี และไม่มีเกล็ดไฮดรอกซีอาปาไทต์ โดยนำโปรตีนมาแยกด้วยกระแสไฟฟ้า แล้วถ่ายลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส จากนั้นนำมาย้อมด้วยแอนติบอดีต่อไฟโบรเนกติน หรือไฟโบรเนกตินรีเซพเตอร์ ตัวเลขทางซ้ายมือแสดงถึงตำแหน่งของโปรตีนที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล

รูป A แสดงให้เห็นว่าเซลล์สร้างไฟโบรเนกตินเพิ่มขึ้นในภาวะที่มีเกล็ดไฮดรอกซีอาปาไทต์ (B,D,F,H) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่เลี้ยงบนจานเลี้ยงเซลล์ปกติ (A,C,E,G) โดยเห็นได้จากเซลล์ที่หว่านที่ความหนาแน่นตั้งแต่ 10,000 เซลล์ขึ้นไป [A,B = 5,000, C,D = 10,000, E,F = 20,000 และ G,H = 40,000 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร]

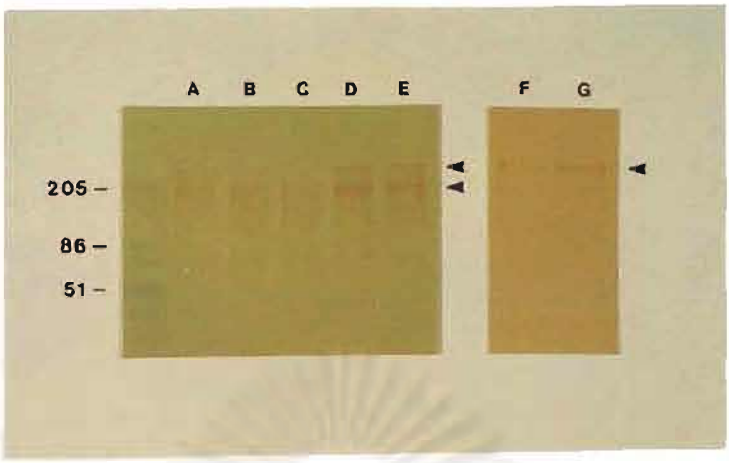
รูป B แสดงถึงปริมาณของไฟโบรเนกตินรีเซพเตอร์ที่เพิ่มขึ้นในภาวะเดียวกับรูป A

ทอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

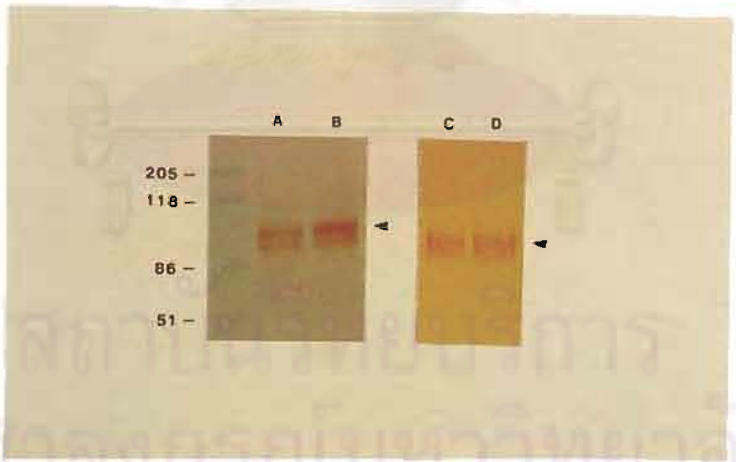


รูปที่ 3 ผลของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่แช่เกล็ดไฮดรอกซีอาปาไทต์ สามารถกระตุ้นการสร้างไฟโบรเนกติน (B) และไฟโบรเนกตินรีเซพเตอร์ (D) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ (A,C)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4 แสดงแถบสีของไฟโบรเนกติน ที่เซลล์สร้างในภาวะที่เพิ่มแคลเซียมไอออน 0.5, 1, 2 และ 4 มิลลิโมลาร์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (B-E) เปรียบเทียบกับภาวะที่ไม่มีแคลเซียมไอออน (A) ซึ่งเห็นการเพิ่มของไฟโบรเนกตินได้ชัดเจนที่ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ (D) และไอโอโนฟอร์ 0.5 ไมโครโมลาร์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ มีผลให้เซลล์เพิ่มการสร้างไฟโบรเนกติน (G เทียบกับ F)



รูปที่ 5 แสดงการเพิ่มของไฟโบรเนกตินรีเซพเตอร์ ในภาวะที่มีแคลเซียมไอออน 2 มิลลิโมลาร์ และไอโอโนฟอร์ 0.5 ไมโครโมลาร์ (B และ D ตามลำดับ) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (A และ C ตามลำดับ)