บทที่ 4

อภิปรายผลการทดลอง ข้อเสนอแนะ และสรุปผลการทดลอง

อภิปรายผลการทดลอง

ในปัจจุบันการศึกษาถึงผลของฟลูออไรด์ที่มีต่อเซลล์โพรงฟันยังคงไม่มีความชัดเจน เนื่องจากมีรายงานจำนวนไม่มากนักที่ศึกษาถึงการตอบสนองของเซลล์โพรงฟันต่อฟลูออไรด์ และแสดงให้เห็นว่าผลของฟลูออไรด์ที่มีต่อเซลล์โพรงฟันจะแปรผันตามความเข้มข้นของฟลูออไรด์ที่ใช้กระตุ้นเซลล์ (Veron et al.,1993; Nakade et al.,1999; Chang and Chou, 2001) งานวิจัยครั้งนี้มุ่งศึกษาผลของฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้นต่ำที่มีต่อเซลล์โพรงฟันของมนุษย์ ผลการทดลองพบว่าฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้นต่ำ (1 และ 10 ppm) สามารถเพิ่มอัตราการเจริญได้ในเซลล์โพรงฟันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งคล้ายคลึงกับผลการทดลองของ Nakade et al.,1999 ที่พบว่าฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 2 พีพีเอ็มมีผลในการกระตุ้นการเจริญและเพิ่มระดับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของเซลล์โพรงฟัน ความสามารถของฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้นต่ำดังกล่าวนี้สะท้อนให้เห็นว่าฟลูออไรด์น่าจะมีส่วนส่งเสริมในกระบวนการหายของแผล

สำหรับการศึกษาในครั้งนี้นอกจากจะศึกษาระดับของฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้นต่ำว่ามีผลต่ออัตราการเจริญของเซลล์โพรงฟันแล้ว ยังได้ทดสอบหาระดับของฟลูออไรด์ที่เริ่มมีพิษต่อเซลล์ด้วย โดยวัดปริมาณเซลล์ด้วยเทคนิกการย้อมสีเมทิลีนบลูที่เสนอโดย Oliver et al.,1989 ซึ่งมีวัตถุประสงค์ครั้งแรกสำหรับการวัดอัตราการเจริญของเซลล์ สำหรับวิธีวัดอัตราการเจริญของเซลล์ที่ค่อนข้างเป็นที่ยอมรับกัน คือการวัดอัตราการสร้างสารพันธุกรรม (DNA) (Freshney,1994) ซึ่งเป็นวิธีที่ค่อนข้างยุ่งยากและมีค่าใช้จ่ายสูง เนื่องจากต้องใช้สารรังสีต่อเข้ากับกรดนิวคลีอิก (nucleic acid) และวัดอัตราการใช้กรดนิวคลีอิกของเซลล์ในการสร้างสารพันธุกรรม ดังนั้นการใช้วิธีการย้อมสีที่ย้อมติดเยื่อหุ้มเซลล์และวัดความเข้มของสีที่ย้อมติด ก็สามารถสะท้อนถึงปริมาณของเซลล์ที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงได้เช่นกัน (Oliver et al.,1989) จากเหตุผลดังกล่าว ผู้วิจัยจึงได้ทดลองนำวิธีนี้มาทดสอบใช้ในการวัดระดับความเป็นพิษและอัตราการเจริญของเซลล์

การย้อมสีด้วยสีเมทิสีนบลู จะเป็นการย้อมโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตบนผิวเซลล์ เนื่องจากคุณสมบัติของสีเมทิสีนบลูที่มีประจุบวก ทำให้สามารถย้อมติดสีด่าง (basic dye) และสามารถจับกับองค์ประกอบที่มีประจุลบ ซึ่งก็คือโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตบนผิวเซลล์บนผิวเซลล์ได้ (Oliver et al.,1989) และเมื่อละลายสีด้วยสารละลายกรด ก็จะสามารถนำสารละลายสีที่ได้ไป

อ่านค่าการดูดกลืนแสงเพื่อคำนวณหาปริมาณเซลล์ได้ การย้อมเซลล์ด้วยสีเมทิลีนบลูนี้มีข้อดีหลายประการ เนื่องจากเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว ค่าใช้จ่ายน้อย และยังสามารถนำมาใช้ในการเปรียบเทียบอิทธิพลของสารหรือยาแต่ละชนิดที่มีต่อการเจริญของเซลล์ได้ อย่างไรก็ตามอาจมีข้อจำกัดบางประการในแง่ของปริมาณเซลล์ที่ใช้ในการวัด โดยพบว่าการย้อมสีด้วยสีเมทิลีนบลูจะให้ผลแสดงปริมาณเซลล์ที่มีอยู่ในปริมาณน้อยได้ไม่ชัดเจน นอกจากนี้ข้อเสียอีกประการหนึ่งของสีเมทิสีนบลูคือการย้อมติดโมเลกุลที่มีประจุลบ ดังนั้นสีอาจย้อมติดเซลล์ที่ได้รับอันตรายจากสารที่ทดสอบ แต่ยังไม่สูญเสียคุณสมบัติในการยึดเกาะกับจานเพาะเลี้ยงเซลล์ หรืออาจย้อมติดโปรตีนบางชนิดที่เซลล์สร้างขึ้น ทำให้การแปลผลคลาดเคลื่อนได้

สำหรับการทดลองเพื่อหาระดับความเป็นพิษของฟลูออไรด์ที่มีต่อเซลล์โพรงฟัน ภายหลังการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆกันตั้งแต่ 10 ถึง 100 พีพีเอ็มในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรั่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 25 พีพีเอ็มขึ้นไปจะมีพิษต่อเซลล์โพรงฟัน ซึ่งผลการทดสอบความเป็นพิษของฟลูออไรด์ที่ได้นี้อยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกับการศึกษาของ Veron et al.,1993 ซึ่งพบว่าฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้น 25 พีพีเอ็มมีผลในการยับยั้งการสร้างเส้นใยคอลลาเจน, ลดระดับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและลดอัตราการเจริญของเซลล์ลง และในการทดลองของ Chang and Chou, 2001 ก็พบว่าฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้น 38 พีพีเอ็มขึ้นไปมีพิษต่อเซลล์โพรงฟันโดยจะสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์, การแบ่งตัวของเซลล์, การทำงานของไมโตคอนเดรียรวมถึงการสร้างโปรตีนด้วย

การศึกษาในแง่ของอัตราการเจริญของเซลล์ โดยวัดปริมาณของเซลล์ภายหลังการกระตุ้นโดยวิธีย้อมสีเซลล์ด้วยสีเมทิลีนบลู โดยจะแสดงผลในเชิงปริมาณของเซลล์ที่ย้อมติดสีเมทิลีนบลู พบว่าผลของฟลูออไรด์ที่เริ่มกระตุ้นให้มีการเจริญของเซลล์แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอยู่ที่ระดับ 1 และ 10 พีพีเอ็ม โดยทำการวัดผลหลังจากที่กระตุ้นไปได้ 48 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมเนื่องจากเซลล์จะผ่านพ้นระยะการแบ่งตัวแบบไมโตซิส (mitosis) ได้พอดี แต่อย่างไรก็ตามอัตราการเจริญของเซลล์ในการกระตุ้นด้วยฟลูออไรด์ทั้ง 2 ความเข้มข้นก็ยังน้อยกว่าการเลี้ยงเซลล์โพรงฟันในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีปริมาณของซีรั่มที่ร้อยละ 10 เนื่องจากในซีรั่มมีสารอาหารจำพวกโปรตีนที่สำคัญชนิดต่างๆที่ช่วยส่งเสริมให้เซลล์มีการเจริญเพิ่มมากขึ้นอยู่เป็นจำนวนมาก เช่น โกร๊ทแฟคเตอร์ และฮอร์โมน (hormone) ชนิดต่างๆ

สำหรับกลไกการกระตุ้นของฟลูออไรด์ที่มีต่ออัตราการเจริญของเซลล์นั้นยังไม่ทราบ แต่จากการศึกษาในเซลล์กระดูกพบว่าฟลูออโรอลูมิเนตสามารถกระตุ้นผ่านจี-โปรตีน (G-protein) ซึ่งมีโครงสร้างประกอบด้วยโปรตีน 3 หน่วยย่อยที่ต่างกัน (heterotrimeric subunit) โดยฟลูออโรอลูมิเนตจะผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปจับกับ inactive G alpha protein subunit โดยจับอยู่ในตำแหน่งถัดจาก GDP เกิดเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า G alpha-GDP-AlF4 complex และสามารถส่งผ่าน

I 20445180

สัญญาณเข้าสู่เซลล์ได้ ในเซลล์สร้างกระดูก (osteoblasts) ฟลูออโรอลูมิเนตจะกระตุ้น G alpha i proteins นำไปสู่การลดระดับของ cAMP และการกระตุ้นโปรตีนไคเนส 3 ชนิด คือ MAP kinase (mitogen activated protein kinase), Erks (extracellular signal-regulated kinases) และ p70 S6 kinase ซึ่งการกระตุ้นผ่าน MAP kinase ทำให้เซลล์มีการเพิ่มอัตราการแบ่งตัวสูงขึ้น (Susa,1998; Lau and Baylink,1998) แต่ในกรณีของเซลล์โพรงฟัน คงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปในอนาคต

งานวิจัยนี้ยังแสดงเป็นครั้งแรกถึงผลของฟลูออไรด์ที่มีต่อการสร้างโปรตีนไฟโบรเนกติน ไฟโบรเนกตินเป็นไกลโคโปรตีนตัวหนึ่งที่มีความสำคัญต่อเซลล์ตั้งแต่ในระยะที่มีการพัฒนาการ โดยจะทำหน้าที่ช่วยในการยึดเกาะระหว่างเซลล์กับสารที่อยู่ระหว่างเซลล์ชนิดอื่นๆ รวมถึงการควบคุมการเคลื่อนที่และการเจริญของเซลล์ นอกจากนี้ยังช่วยกระตุ้นให้เซลล์มีพัฒนาการในกระบวนการก่อรูปร่าง (morphogenesis), กระบวนการดิฟเฟอเรนชิเอชั่น รวมถึงการทำหน้าที่ในการสังเคราะห์สาร และยังมีรายงานว่าไฟโบรเนกตินมีบทบาทสำคัญในกระบวนการหายของแผลและการซ่อมแซมเนื้อเยื่อได้อีกด้วย (Greiling and Clark,1997) เนื่องจากโมเลกุลของไฟโบรเนกตินนั้นประกอบด้วยส่วนที่สามารถจับกับโมเลกุลอื่นได้หลายชนิด ทำให้ไฟโบรเนกตินมีคุณสมบัติในการยึดเกาะกับโมเลกุลอื่นๆได้ เช่น ไฟบริโนเจน (fibrinogen), โปรทีโอไกลแคน (proteoglycan) รวมถึงโปรตีนอินทิกริน (integrin) ที่ผิวเซลล์ด้วย (Yamada,1983; Milam et al.,1991; Uitto and Larjava,1991) สำหรับผลต่อการสร้างโปรตีนไฟโบรเนกตินก็ได้ทำการเก็บผลที่ 48 ชั่วโมงเช่นเดียวกัน โดยพบว่าฟลูออไรด์ทั้ง 3 ความเข้มข้นคือ 0.1, 1 และ 10 พีพีเอ็ม สามารถกระตุ้นให้เซลล์มีการสร้างไฟโบรเนกตินได้เพิ่มขึ้นแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และพบว่าฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้น 1 พีพีเอ็มสามารถกระตุ้นการสร้างไฟโบรเนกตินได้สูงกว่าฟลูออไรด์ในความเข้มข้นอื่น สำหรับกลไกการกระตุ้นการสร้างไฟโบรเนกตินของฟลูออไรด์นั้นยังไม่ทราบว่าผ่านทางขบวนการใด

ในขบวนการซ่อมแซมเนื้อเยื่อ นอกจากจะต้องมีการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ให้มากขึ้นแล้วยังต้องการปัจจัยอื่นที่จำเป็นอีก เช่น ไฟโบรเนกติน, คอลลาเจน, โกร๊ทแฟคเตอร์, ไซโตไคน์ (cytokines) รวมไปถึงเมทริกซ์นอกเซลล์อื่นๆอีกหลายชนิด ทำให้เกิดการติดต่อกันระหว่างเซลล์และเมทริกซ์นอกเซลล์ (cell-matrix interactions) ซึ่งมีบทบาทต่อการกระตุ้นให้มีการแบ่งตัวของเซลล์, การเคลื่อนตัวของเซลล์ (cell migration) และการดิฟเฟอเรนชิเอชั่นของเซลล์ด้วย จึงเห็นได้ว่าทั้งการแบ่งตัวของเซลล์และไฟโบรเนกตินต่างก็มีบทบาทที่สำคัญต่อการซ่อมแซมเนื้อเยื่อทั้งคู่ ดังนั้นจึงเชื่อว่าการวัดผลการทดลองโดยดูผลต่ออัตราการเจริญของเซลล์และการสร้างไฟโบรเนกตินน่าจะนำมาใช้อ้างอิงกับขบวนการซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่เกิดขึ้นในเนื้อเยื่อโพรงฟันได้

จากบทบาทของฟลูออไรด์ที่มีผลในการกระตุ้นอัตราการแบ่งตัวของเซลล์และการสร้างไฟโบรเนกติน ซึ่งบทบาทเช่นนี้คล้ายกับผลของเซลล์เมื่อถูกกระตุ้นด้วยโกร๊ทแฟคเตอร์ ทำให้ตั้งสมมติฐานได้ว่าในสภาวะที่มีฟลูออไรด์และโกร๊ทแฟคเตอร์ร่วมกันน่าจะมีบทบาทในการกระตุ้นอัตราการแบ่งตัวของเซลล์และการสร้างไฟโบรเนกตินแตกต่างจากการกระตุ้นด้วยฟลูออไรด์เพียงอย่างเดียว จากการทดลองพบว่าผลของฟลูออไรด์ที่มีต่ออัตราการเจริญของเซลล์สามารถเพิ่มสูงขึ้นได้เมื่อกระตุ้นร่วมกับโกร๊ทแฟคเตอร์อีก 2 ชนิดที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ เบสิค-เอฟจีเอฟ และพีดีจีเอฟ ซึ่งพบว่าจำนวนเซลล์ภายหลังการกระตุ้นด้วยฟลูออไรด์ร่วมกับโกร๊ทแฟคเตอร์จะมากกว่าการกระตุ้นด้วยฟลูออไรด์หรือโกร๊ทแฟคเตอร์ตัวใดตัวหนึ่งเพียงอย่างเดียว โดยฟลูออไรด์จะเลือกใช้ที่ความเข้มข้น 1 พีพีเอ็มซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถกระตุ้นให้เซลล์โพรงฟันเพิ่มอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ได้ ผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงผลร่วมกันระหว่างฟลูออไรด์และโกร๊ทแฟคเตอร์ทั้ง 2 ชนิดในการกระตุ้นให้เกิดการแบ่งตัวของเซลล์ในลักษณะที่เสริมกัน จึงมีความเป็นไปได้ที่ฟลูออไรด์และโกร๊ทแฟคเตอร์น่าจะมีกลไกในการกระตุ้นในเส้นทางที่แตกต่างกัน จากการศึกษาพบว่าฟลูออไรด์จะสามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์และมีกลไกการกระตุ้นผ่านทางจี-โปรตีน (G-protein) ก่อให้เกิดการส่งผ่านสัญญาณเข้าสู่เซลล์ดังที่กล่าวมาในตอนต้น (Caverzasio et al.,1997; Susa,1998; Jeschke et al.,1998; Lau and Baylink,1998) ในขณะที่โกร๊ทแฟคเตอร์จะกระตุ้นผ่านทางรีเซพเตอร์ไทโรซีนไคเนส (receptor tyrosine kinase) ที่มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์หรือมีความเกี่ยวเนื่องกับเอนไซม์ (enzyme-linked receptor) โดยปกติแล้วรีเซพเตอร์ชนิดนี้จะอยู่ในรูปที่ไม่ทำงาน (inactive form) จนกระทั่งเมื่อเกิดการจับกันระหว่างโกร๊ทแฟคเตอร์กันรีเซพเตอร์จะทำให้เกิดขบวนการไดเมอไรเซชั่น (dimerization) ซึ่งจะมีการจับคู่กันของรีเซพเตอร์เกิดเป็นไดเมอร์ (dimer) ทำให้เกิดการเติมฟอสเฟต (phosphate) ขึ้นที่ไทโรซีนและไปกระตุ้นแรสโปรตีน (Ras protein) จากนั้นจะเกิดขบวนการเติมฟอสเฟตอีกหลายขั้นตอนจนถึงเอนไซม์แมพไคเนส (MAP kinase) และไปกระตุ้น c-fos ทำให้เกิดการแบ่งตัวของเซลล์ตามมา (Hurley et al.,1996; Bornfeldt et al.,1995)

นอกจากนี้ผลต่อการสร้างไฟโบรเนกตินเมื่อเซลล์โพรงฟันถูกกระตุ้นด้วยฟลูออไรด์สามารถเปลี่ยนแปลงได้เมื่อให้ฟลูออไรด์ร่วมกับโกร๊ทแฟคเตอร์ทั้ง 2 ชนิด โดยพบว่าเมื่อให้เบสิค-เอฟจีเอฟที่ความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตรร่วมกับฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้น 1 พีพีเอ็มจะไปลดการสร้างไฟโบรเนกตินลงจากการกระตุ้นด้วยฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้น 1 พีพีเอ็มเพียงอย่างเดียว ในขณะที่การกระตุ้นด้วยให้เบสิค-เอฟจีเอฟที่ความเข้มข้น 0.1 และ 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตรร่วมกับฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้น 1 พีพีเอ็มไม่ได้ให้ผลที่แตกต่างจากการกระตุ้นด้วยฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้น 1 พีพีเอ็มเพียงอย่างเดียว และเมื่อทดลองให้มีการกระตุ้นเฉพาะเบสิค-เอฟจีเอฟที่ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตรเพียงอย่างเดียวก็พบว่าเบสิค-เอฟจีเอฟที่ความเข้มข้น 10 นาโน

กรัม/มิลลิลิตรเท่านั้นที่ไปลดการสร้างไฟโบรเนกตินลง จึงมีความเป็นไปได้ที่การลดระดับการสร้างไฟโบรเนกตินของเซลล์โพรงฟันจำเป็นจะต้องมีความเข้มข้นของเบสิค-เอฟจีเอฟที่สูงพอที่จะไปกระตุ้นให้เซลล์ลดการสร้างไฟโบรเนกตินลง จากการศึกษาถึงผลของเบสิค-เอฟจีเอฟที่มีต่อการสร้างไฟโบรเนกตินในเซลล์ชนิดอื่นพบว่าเบสิค-เอฟจีเอฟสามารถเพิ่มการสร้างไฟโบรเนกตินในเซลล์แอสโตรไซท์ (astrocyte) ได้ (Mahler et al.,1997) แต่รายงานดังกล่าวก็ไม่ได้ระบุไว้ว่ากลไกการกระตุ้นนั้นผ่านทางขบวนการใด แต่จากการศึกษาในโกร๊ทแฟคเตอร์ชนิดอื่น เช่น ในทีจีเอฟ-เบต้า พบว่าสามารถยับยั้งการสร้างไฟโบรเนกตินในเซลล์เมสแซนเจียล (mesangial cells) โดยทีจีเอฟ-เบต้าจะไปลดการสร้างสายเอ็ม-อาร์เอนเอของไฟโบรเนกตินลง (Pawluczyk and Harris,2001) จึงเป็นไปได้ว่ากลไกการยับยั้งการสร้างไฟโบรเนกตินน่าจะเกิดขึ้นก็ต่อเมื่อมีปริมาณของรีเซพเตอร์ที่จับอยู่กับเบสิค-เอฟจีเอฟที่มากพอที่จะให้สัญญาณผ่านเข้าสู่เซลล์ไปมีผลต่อโปรตีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างสายเอ็ม-อาร์เอนเอของการสังเคราะห์ไฟโบรเนกตินได้ โดยอาจไปกระตุ้นให้มีการสร้างสายเอ็ม-อาร์เอนเอของไฟโบรเนกตินลดลง และทำให้ปริมาณไฟโบรเนกตินที่เซลล์สร้างได้นั้นน้อยลง และยังมีผลลดการสร้างสายเอ็ม-อาร์เอนเอของไฟโบรเนกตินที่ถูกกระตุ้นด้วยฟลูออไรด์ลงอีกด้วย จากผลการทดลองนี้ยังแสดงให้เห็นว่าการกระตุ้นการสร้างไฟโบรเนกตินของฟลูออไรด์และเบสิค-เอฟจีเอฟที่มีต่อเซลล์โพรงฟันมาจากการส่งผ่านสัญญาณภายในเซลล์ที่แตกต่างกันเนื่องจากฟลูออไรด์กระตุ้นให้เซลล์สร้างไฟโบรเนกตินเพิ่มสูงขึ้นในขณะที่เบสิค-เอฟจีเอฟลดการสร้างไฟโบรเนกติน นอกจากนี้ระยะเวลาที่ใช้ในการส่งผ่านสัญญาณเข้าสู่เซลล์ของฟลูออไรด์กับเบสิค-เอฟจีเอฟก็น่าจะแตกต่างกันด้วยเช่นกันแต่ยังไม่สามารถบอกได้ว่าสัญญาณจากรีเซพเตอร์ตัวใดที่เกิดขึ้นก่อน

ในขณะที่พีดีจีเอฟกลับกระตุ้นให้เซลล์มีการสร้างไฟโบรเนกตินเพิ่มสูงขึ้น โดยพบว่าเมื่อให้พีดีจีเอฟที่ความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตรร่วมกับฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้น 1 พีพีเอ็มก็ให้ผลในการกระตุ้นการสร้างไฟโบรเนกตินสูงกว่ากลุ่มที่กระตุ้นด้วยฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้น 1 พีพีเอ็มเพียงอย่างเดียว เช่นเดียวกับเบสิค-เอฟจีเอฟ การกระตุ้นด้วยให้พีดีจีเอฟที่ความเข้มข้น 0.1 และ 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตรร่วมกับฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้น 1 พีพีเอ็มไม่ได้ให้ผลที่แตกต่างจากการกระตุ้นด้วยฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้น 1 พีพีเอ็มเพียงอย่างเดียว และเมื่อทดลองให้มีการกระตุ้นเฉพาะพีดีจีเอฟที่ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตรเพียงอย่างเดียวก็พบว่าพีดีจีเอฟที่ความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตรเท่านั้นที่ไปกระตุ้นการสร้างไฟโบรเนกตินให้เพิ่มขึ้น จากการศึกษาถึงผลของพีดีจีเอฟที่มีต่อการสร้างไฟโบรเนกตินในเซลล์ชนิดอื่นพบว่าพีดีจีเอฟสามารถเพิ่มการสร้างสายเอ็ม-อาร์เอนเอของไฟโบรเนกตินในเซลล์โกลเมอรูล่าเมสแซนเจียล (glomerular mesangial cells) (Hansch et al.,1995) รวมถึงในเซลล์สร้างเส้นใยด้วย (Sarkissian and Lafyatis,1998) กลไกในการกระตุ้นให้เซลล์มีการสร้างไฟโบรเนกตินเพิ่มสูงขึ้นน่าจะอธิบายได้เช่นเดียวกับที่กล่าว

มาแล้วก่อนหน้านี้ และจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ามีการกระตุ้นการสร้างไฟโบรเนกตินในลักษณะที่เสริมฤทธิ์กันเมื่อให้ฟลูออไรด์ร่วมกับพีดีจีเอฟ จึงเป็นไปได้ที่กลไกการกระตุ้นนั้นมาจาก 2 ทิศทาง เนื่องจากทั้งพีดีจีเอฟและฟลูออไรด์ต่างก็กระตุ้นให้เซลล์มีการสร้างไฟโบรเนกตินเพิ่มสูงขึ้นทั้งคู่ และเมื่อให้ร่วมกันจึงอาจทำให้เซลล์ถูกกระตุ้นจากสัญญาณทั้ง 2 ทิศทางจึงไปมีผลทำให้โปรตีนที่ทำหน้าที่ควมคุมการสร้างสายเอ็ม-อาร์เอนเอของการสังเคราะห์ไฟโบรเนกตินเพิ่มสูงขึ้น เกิดการสร้างสายเอ็ม-อาร์เอนเอของไฟโบรเนกตินเพิ่มขึ้นทำให้มีการสร้างไฟโบรเนกตินเพิ่มขึ้น

งานวิจัยในครั้งนี้ได้เลือกใช้ปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบปฐมภูมิ เซลล์ดังกล่าวนำมาเพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อโพรงฟันโดยตรงและน่าจะมีความเป็น heterogenous สูงกว่าเซลล์ไลน์ (cell lines) เนื่องจากในเนื้อเยื่อโพรงฟันประกอบไปด้วยเซลล์หลายๆชนิด เช่น เซลล์สร้างเส้นใย (fibroblasts), เซลล์บุผนังหลอดเลือด (endothelial cells), เซลล์ที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน (immune cells) เป็นต้น จึงน่าที่จะยังคงมีการตอบสนองคล้ายกันกับที่เมื่ออยู่ในโพรงฟัน นอกจากนี้ความแตกต่างของแหล่งที่มาของเนื้อเยื่อโพรงฟันของผู้ป่วยแต่ละคนรวมถึงเซลล์ในแต่ละรุ่นที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ก็มีผลต่อการกระตุ้นด้วยฟลูออไรด์ด้วยเช่นกัน เนื่องจากเซลล์ที่นำมาใช้จะมีระดับของการดิฟเฟอเรนชิเอชั่น (level of differentiation) ที่แตกต่างกัน ทำให้ค่าที่ได้จากการทดลองแตกต่างกันไปด้วย แต่อย่างไรก็ดีผลการทดลองที่ได้จากเซลล์ที่ต่างกันก็ให้ผลในทิศทางที่สอดคล้องกัน

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยในครั้งนี้ศึกษาผลร่วมของฟลูออไรด์กับเบสิค-เอฟจีเอฟและพีดีจีเอฟที่มีต่อเซลล์โพรงฟันของมนุษย์ในปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์ภายในเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้น 1 และ 10 พีพีเอ็มเพิ่มอัตราการเจริญของเซลล์ และเมื่อให้ร่วมกับโกร๊ทแฟคเตอร์ทั้ง 2 ชนิดที่ความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตรจะเพิ่มอัตราการแบ่งตัวของเซลล์มากกว่าการกระตุ้นด้วยฟลูออไรด์เพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ฟลูออไรด์ยังกระตุ้นให้เซลล์มีการสร้างไฟโบรเนกตินเพิ่มขึ้นด้วยซึ่งจะสูงเพิ่มขึ้นอีกเมื่อให้ร่วมกับพีดีจีเอฟที่ความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร แต่เบสิค-เอฟจีเอฟที่ความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตรกลับไปลดการสร้างไฟโบรเนกตินของเซลล์ลง สรุปได้ว่าฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้นต่ำสามารถทำงานร่วมกับโกร๊ทแฟคเตอร์ทั้ง 2 ชนิดได้ และอาจนำไปใช้ประโยชน์ในการรักษาโดยการกระตุ้นให้เกิดการแบ่งตัวของเซลล์และกระตุ้นให้เกิดการสร้างเมทริกซ์นอกเซลล์ในเซลล์โพรงฟันได้มากยิ่งขึ้น

ข้อเสนอแนะ

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) โดยจะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่เซลล์แผ่เป็นชั้นเดียว (monolayer) ในจานเลี้ยงเซลล์ เซลล์ได้รับการควบคุมให้อยู่ในสภาวะแวดล้อมที่จัดไว้ให้ซึ่งมีประโยชน์ในการเปรียบเทียบกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองให้อยู่ในสภาวะเดียวกันได้ แต่การทดลองในลักษณะนี้ก็มีข้อจำกัดเนื่องจากผลการทดลองยังไม่สามารถนำไปอธิบายกับสิ่งที่เกิดขึ้นจริงใน *in vivo* ได้โดยตรง อีกทั้งในสภาวะ *in vivo* เองก็ยังมีปัจจัยอื่นๆ อีกมากที่มีอิทธิพลต่อพฤติกรรมการแสดงออกของเซลล์ แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาในระดับ *in vitro* ก็เป็นที่ยอมรับว่ามีความสำคัญ ทำได้สะดวกกว่า สามารถที่จะเลี้ยงเซลล์ได้เป็นจำนวนมาก สามารถทำการทดลองซ้ำได้หลายครั้ง มีค่าใช้จ่ายไม่สูง และเพียงพอต่อการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในด้านพฤติกรรมและการแสดงออกของเซลล์ได้

โกร๊ทแฟคเตอร์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มี 2 ชนิดด้วยกัน คือ เบสิค-เอฟจีเอฟและพีดีจีเอฟ สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ได้เลือกใช้โกร๊ทแฟคเตอร์ 2 ชนิดนี้เนื่องจากมีรายงานเป็นจำนวนมากที่กล่าวถึงบทบาทในขบวนการซ่อมแซมเนื้อเยื่อและการหายของแผลมากกว่าโกร๊ทแฟคเตอร์ชนิดอื่น แต่อย่างไรก็ดีโกร๊ทแฟคเตอร์อีกหลายชนิดที่ไม่ได้นำมาทดสอบในการศึกษาครั้งนี้ต่างก็มีความสำคัญและอาจนำมาใช้ในการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปได้ สำหรับโกร๊ทแฟคเตอร์ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการทดสอบร่วมกับฟลูออไรด์เพื่อศึกษาถึงอิทธิพลของโกร๊ทแฟคเตอร์ที่มีต่อการทำหน้าที่ของฟลูออไรด์เท่านั้น ไม่ได้ศึกษาถึงผลของการให้โกร๊ทแฟคเตอร์ทั้ง 2 ชนิดร่วมกัน การศึกษาในอนาคตอาจจะศึกษาถึงบทบาทร่วมกันของโกร๊ทแฟคเตอร์หลายๆชนิดที่มีผลต่อพฤติกรรมต่างๆ ของเซลล์โพรงฟันต่อไปได้

จากการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงผลของฟลูออไรด์และโกร๊ทแฟคเตอร์ทั้ง 2 ชนิดที่มีต่อเซลล์โพรงฟัน โดยในแง่ของการวัดผลอัตราการเจริญของเซลล์ได้เลือกใช้วิธีวัดอัตราการเจริญของเซลล์ด้วยเทคนิกการย้อมสีด้วยสีเมทิลีนบลู ซึ่งเทคนิกนี้ก็ยังมีข้อจำกัดบางอย่างอยู่ เนื่องการเทคนิกนี้เป็นการย้อมติดสีโปรตีนที่ผิวเซลล์จึงมีความเป็นไปได้ที่จะมีโอกาสย้อมติดโปรตีนเมทริกซ์ที่เซลล์สร้างและหลั่งออกมานอกเซลล์ได้ ทำให้ผลที่เราต้องการเฉพาะจำนวนเซลล์ที่ย้อมติดสีมีความคลาดเคลื่อนได้ แต่อย่างไรก็ดีเทคนิกนี้ก็สามารถนำมาใช้ทดสอบอัตราการเจริญของเซลล์ได้ในระดับหนึ่ง นอกจากเทคนิกนี้แล้วยังมีอีกหลายวิธีที่สามารถนำมาใช้ในการวัดอัตราการเจริญของเซลล์ได้ เช่น การใช้สารละลายเอ็มทีที (MTT) ย้อมหาจำนวนเซลล์ หรือใช้เทคนิกการเข้าจับกับสารกัมมันตภาพรังสีเพื่อหาปริมาณของรังสีที่เซลล์ใช้ในขบวนการแบ่งเซลล์

อีกประเด็นหนึ่งที่น่าสนใจในการศึกษาครั้งนี้คือระยะเวลาที่เซลล์ใช้ในการส่งผ่านสัญญาณจนกระทั่งเกิดการแบ่งตัวหรือเกิดการสร้างไฟโบรเนกตินขึ้น ซึ่งหากต้องการให้ผลการทดลองชัดเจนยิ่งขึ้นว่าช่วงเวลาของการกระตุ้นด้วยฟลูออไรด์กับเบสิค-เอฟจีเอฟและพีดีจีเอฟแตกต่างกันหรือไม่ อาจจะต้องทดสอบแล้วเก็บผลในช่วงระยะเวลาที่ต่างๆกันเพื่อหาเวลาที่เหมาะสมกับการกระตุ้นด้วยสารแต่ละชนิด ซึ่งจะทำให้สามารถบอกได้ว่าเซลล์จะถูกกระตุ้นด้วยสัญญาณจากตัวกระตุ้นชนิดใดที่เวลาเท่าไรได้