

ผลของสารอะซีแมนแนนต่อการสร้างเนื้อฟันในหนู

นางสาว นวภรณ์ จิตตภิรมย์ศักดิ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาทันตชีววัสดุศาสตร์ (สหสาขาวิชา)

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



4 7 8 9 6 6 4 2 2 0

EFFECTS OF ACEMANNAN ON DENTIN FORMATION IN RAT

Miss Nawaporn Jittapiromsak

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Dental Biomaterials Science

(Interdisciplinary Program)

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic year 2008

Copyright of Chulalongkorn University

นวภรณ์ จิตตภิรมย์ศักดิ์ : ผลของสารอะซีแมนแนนต่อการสร้างเนื้อฟันในหนู. (EFFECTS OF ACEMANNAN ON DENTIN FORMATION) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ.ทพ.ดร. พสุธา รัญญะกิจไพศาล, 96 หน้า.

“สารอะซีแมนแนน” เป็นสารสกัดจากส่วนหัวว่านหางจระเข้ ที่มีผลทางชีวภาพที่ดีกับเซลล์ แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาผลของสารอะซีแมนแนนต่อการสร้างเนื้อฟันยังไม่มีการศึกษามาก่อน ในการศึกษาครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อ ศึกษาผลของ สารอะซีแมนแนนต่อการสร้างเนื้อฟันในระดับห้องปฏิบัติการและสัตว์ทดลอง นำเซลล์โพรงฟันมนุษย์ทดสอบด้วยสารอะซีแมน- แนนด้วยวิธีเอ็มทีที อีไลซา วิธีทางชีวเคมี และการย้อมสีอะลิซาริน เรด เพื่อตรวจสอบความเป็นพิษ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ระดับการหลังโปรตีนโบนมอร์โฟเจเนติก-2 การทำงานของเอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส และการตกตะกอนเกลือแร่ ตามลำดับ จากนั้นทดสอบผลต่อการสร้างเนื้อฟันซ่อมเสริมในฟันกรามหนูแรทที่โพรงฟันถูกทำให้ทะลุ เมื่อครบกำหนดระยะเวลา 7 และ 28 วัน หนูจะถูกทำการุณฆาตและนำฟันมาศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาและให้คะแนนเกี่ยวกับการตอบสนองของเนื้อเยื่อโพรงฟัน ได้แก่ การอักเสบ การสร้างเดนตินบริดจ์ และการจัดเรียงตัวของเนื้อเยื่ออ่อน วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวสำหรับข้อมูลที่อยู่ในสเกลอัตราส่วน และทดสอบด้วยวิธีครัสคัล วาลิส เอส สำหรับข้อมูลที่อยู่ในสเกลอันดับ ผลการศึกษา พบสารอะซีแมนแนนกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์เมื่อทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง กระตุ้นการหลังโปรตีนโบนมอร์- โฟเจเนติก-2 ที่ระยะเวลา 3 9 และ 12 วัน เพิ่มการทำงานของเอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ที่ระยะเวลา 3 วัน และกระตุ้นการ ตกตะกอนเกลือแร่ที่ระยะเวลา 15 วัน ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (p<0.05) จากการศึกษาใน สัตว์ทดลองพบว่า ที่ระยะเวลา 7 วัน กลุ่มอะซี-แมนแนน (5 ใน 7 ซี่ หรือร้อยละ 71.4) และกลุ่มหลอก (ฟูจิโลนิงแอลซี 4 ใน 6 ซี่ หรือร้อยละ 66.7) โดยมากพบการอักเสบเฉียบพลันอย่างอ่อน ในขณะที่กลุ่มควบคุม (ไดแคล) โดยมากพบการอักเสบระดับ ปานกลาง (4 ใน 8 ซี่ หรือร้อยละ 50) แต่อย่างไรก็ตาม การอักเสบของทั้ง 3 กลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทาง สถิติ (p>0.05) กลุ่มอะซีแมนแนนพบเซลล์โพรงฟันในระยะกัมมันต์และพบเส้นใยคอลลาเจนในบริเวณเนื้อเยื่อโพรงฟันที่ทะลุ สำหรับที่ระยะเวลา 28 วัน กลุ่มอะซีแมนแนนพบการสร้างเดนตินบริดจ์ปิดสมบูรณ์ชนิดเนื้อเยื่อแข็งที่มีลักษณะเป็นเนื้อ เดียวกัน (5 ใน 8 ซี่ หรือร้อยละ 62.5) และการจัดเรียงตัวของเนื้อเยื่อโพรงฟันแบบปกติ (4 ใน 8 ซี่หรือร้อยละ 50) อย่างมี นัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ไม่พบในกลุ่มควบคุม (0 ใน 8 ซี่) และกลุ่มหลอก (0 ใน 7 ซี่) (p<0.05) ในกลุ่มอะซีแมนแนน โดยมากไม่พบการอักเสบ (5 ใน 8 ซี่หรือร้อยละ 62.5) ส่วนกลุ่มควบคุมพบการอักเสบส่วนใหญ่แบบเรื้อรังความรุนแรงปาน กลาง (5 ใน 8 ซี่ หรือร้อยละ 62.5) และกลุ่มหลอกพบการอักเสบส่วนใหญ่เป็นแบบเรื้อรังที่มีความรุนแรงปานกลางถึงรุนแรง มาก (4 ใน 7 ซี่ หรือร้อยละ 57.1) อย่างไรก็ตาม การอักเสบของทั้ง 3 กลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05)

จากผลการทดลองเสนอแนะว่า สารอะซีแมนแนนสามารถกระตุ้นการสร้างเนื้อฟัน โดยผ่านกลไกการเพิ่มจำนวน เซลล์ การเปลี่ยนสภาพเซลล์ การสร้างสารเมทริกซ์นอกเซลล์ และการตกตะกอนเกลือแร่ นอกจากนี้ สารอะซีแมนแนนสามารถ เร่งการสร้างเนื้อฟันปิดแบบสมบูรณ์ และส่งเสริมการจัดเรียงตัวของเนื้อเยื่ออ่อนให้กลับสู่สภาพปกติ

สาขาวิชา.....ทันตชีววัสดุศาสตร์.....
ปีการศึกษา.... 2551.....

ลายมือชื่อนิติ..... พจนน จิตตภิรมย์ศักดิ์
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก..... รศ.ทพ.ดร. พสุธา รัญญะกิจไพศาล

4789664220 : MAJOR DENTAL BIOMATERIALS SCIENCE

KEYWORDS: ACEMANNAN / ALOE VERA / DENTAL PULP / DENTIN FORMATION / RAT

NAWAPORN JITTAPIROMSAK : EFFECTS OF ACEMANNAN ON DENTIN FORMATION IN RAT. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. PASUTHA THUNYAKITPISAL, Ph.D., 96pp.

"Acemannan", Aloe vera gel polysaccharide, has been reported the cytocompatibility properties. However, the study about its inductive effect on dentin formation has not been investigated. Primary human dental pulp cells were used in this study. The cytotoxicity, level of BMP-2 expression, ALPase activity and mineralization nodule formation were determined by MTT, ELISA, biochemical assay and Alizarin red staining, respectively. After that, the rat first molars were intentionally exposed and applied with acemannan. After 7 and 28 days of experiment, these animals were sacrificed. The tooth were sectioned, examined by histopathological technique and scored their responses according to inflammation, dentin bridge formation and soft tissue organization. Data were statistically analyzed with either one-way analysis of variance for ratio scale data or Kruskal-Wallis S test for ordinal scale data. The results revealed that acemannan significantly increased cell proliferation for 24 hours of incubation and significantly stimulated the level of BMP-2 expression at day 3, 9 and 12 days as compared to control group (p<0.05). Acemannan also significantly enhanced ALPase activity at day 3 and increased nodule mineralization at day 15 as compared to control group (p<0.05). From animal study, at day 7, the mild chronic inflammation was mostly detected in both acemannan-treated group (5 of 7 teeth or 71.4%) and sham group (Fuji Lining LC, 4 of 6 teeth or 66.7%) while the moderate inflammation was mostly detected in control group (Dycal, 4 of 8 teeth or 50%). However, the inflammatory responses among these 3 groups are not statistically significance (p>0.05). In acemannan-treated group, the active dental pulp cells and collagen fibers were observed around the exposure area of pulp tissue. At day 28, the complete homogenous, hard dentin bridge formation (5 of 8 teeth or 62.5%) and normal pulp tissue organization (4 of 8 teeth or 50%) were significantly detected in acemannan-treated group, while neither control group (0 of 8 teeth) nor sham group (0 of 6 teeth) was detected (p<0.05). In acemannan-treated group, no or a few inflammatory cells were detected in the exposure area (5 of 8 teeth or 62.5%). While control group (5 of 8 teeth or 62.5%), moderate chronic inflammatory cell lesion was detected in the exposure area. The sham group contained mostly moderate and severe chronic inflammation (4 of 7 teeth or 57.1%). However, the inflammatory responses among these 3 groups are not statistically significance (p>0.05).

Taken together, our data suggested acemannan induces dentin formation by stimulating cell proliferation, differentiation, extracellular matrix formation and mineralization. Acemannan has capacity to stimulate dentin bridge formation and soft tissue reorganization.

Field of Study :.....Dental Biomaterials Science ... Student's Signature... *Nawaporn Jittapiromsak* ...
Academic Year : ..2008..... Advisor's Signature... *P.A.*

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณเงินทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุนงบประมาณแผ่นดิน และทุนวิจัย รัชดาภิเษกสมโภช คณะกรรมการทุกท่านที่ให้คำแนะนำในการทำวิจัย ขอบพระคุณภาควิชาทันต พยาธิวิทยา ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ ภาควิชาเภสัชวิทยา ศูนย์วิจัยชีววิทยาช่องปาก ศูนย์ทันตชีว วัสดุศาสตร์ หน่วยวิจัยอิมมูโนวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อำนวยความสะดวก สะดวกในด้านอุปกรณ์ และสถานที่ทำงานวิจัย ขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.พสุธา ธีรญาญะ กิจไพศาล ที่ให้คำแนะนำในการทำวิจัย ขอบพระคุณ ผศ.ทญ.ดร.วิสาขะ ลิ้มวงศ์ ที่ให้ความกรุณา อนุญาตให้ลาเรียน ขอบพระคุณ รศ.ภญ.ดร.สุนันท์ พงษ์สามารถ ที่ให้ความช่วยเหลือในการสกัดว่าน หางจระเข้ ขอบพระคุณ รศ.ดร.พลกฤษณ์ แสงวงนิช และ ดร.พรพิมล ทิพย์ธารา ที่ให้ความช่วยเหลือ ด้านการพิสูจน์เอกลักษณ์ของอะซีแมนแนน ขอบพระคุณ อ.ทพ.ชัยวัฒน์ ปิ่นน้อย ที่ให้ความช่วยเหลือ ด้านเนื้อเยื่อโพรงฟันมนุษย์ ขอบพระคุณ อ.ดร.วันเพ็ญ เตชะบุญเกียรติ ที่ให้คำแนะนำด้านการใช้ เครื่องเอ็กซเรย์และ การวิเคราะห์งานอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี ขอบพระคุณ อ. ดร. ดุจฤทัย พงษ์เก่า คณะวิชาที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับการวิเคราะห์การเลี้ยงเบนรังสีเอกซ์ในการตรวจตะกอนแร่ธาตุ ขอบพระคุณ รศ.นสพ.ดร.วิจิตร บรรณารักษ์ ที่เสียสละเวลาในด้านการอ่านผลเนื้อเยื่อ ขอบพระคุณ รศ.ทญ.ดร.สมพร สวัสดิธรรม ที่ให้ความช่วยเหลือในกระบวนการตัด และย้อมสีชิ้นเนื้อ ขอบพระคุณ อ.ทญ.ดร.งามพิศ ชิกข์ ที่ให้คำแนะนำด้านการทำการทดลองในหนูแรท ขอบพระคุณ ผศ.ทญ.ดร.ชุตี มา ระติสุนทร และ อ.ทพ.ดร. ดำรงค์ ดำรงค์ศรี ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับการย้อมสีอะลิซาริน เรด ขอบพระคุณหน่วยบูรณะช่องปากและใบหน้าและบริษัทแอคทีออน ประเทศไทย ที่ให้ความช่วยเหลือ ด้านเครื่องตัดเหงือกไฟฟ้า ขอบคุณ ทญ.นงลักษณ์ ธีรญาญะกิจไพศาลที่ให้ความช่วยเหลือด้านแว่น ขยายสำหรับผ่าตัด ขอบคุณ ทญ.สุวิมล เจตนาเชี่ยวชาญกิจ น.ส. ศนิ บุญญกุล น.ส. ศุภราภรณ์ กันทาสุวรรณ น.ส.ดุสิตา สหาวัตร น.พ.ปกฤษณ์ จิตตภิรมย์ศักดิ์ และคุณลุงอมร หงษา ที่ให้ความ ช่วยเหลือในการทำการทดลองในหนู ขอบคุณ ทญ.สุธาดา ศรีอรุณทัย และทญ. สิริโสม สาตราหะ ที่ ให้ความอนุเคราะห์ด้านลวดจัดฟัน ขอบคุณ คุณสุชาติ กาลวสุกุล คุณสมชาย ยอดสง่า และคุณมาลี ตั้งพิสิฐโยธิน ที่ให้คำแนะนำด้านการตัดชิ้นเนื้อ ขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยชีววิทยาช่องปากทุกท่านที่ มีความรวดเร็วในการให้บริการ ขอบคุณ น.ส.ผกาวัลย์ มุสิกพงษ์ ขอบคุณ น.ส.ลัดดาวัลย์ สัมพันธ์ศิริ กุล และคุณสมพงษ์ วงษาที่ให้คำแนะนำในการแก้ไขปัญหาในการทำงาน สุดท้ายนี้ขอบพระคุณ คุณ พ่อ คุณแม่ ที่ให้กำลังใจมาโดยตลอด และชอบใจน้องสาว น.ส. วัลสา เมื่อกเงิน ที่ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในทุกด้าน

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ต
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย.....	1
สมมติฐานงานวิจัย.....	3
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
ข้อจำกัดของงานวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
วิธีดำเนินการวิจัย.....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
เหตุการณ์ที่เกิดขึ้นเมื่อโพรงฟันทะลุ.....	5
วัสดุสำหรับปิดโพรงฟันที่ใช้กันโดยทั่วไปในทางทันตกรรม.....	6
อะซีแมนแนน.....	7
โปรตีนโบนมอร์โฟเจเนติก-2 และการสร้างเนื้อฟัน.....	8
เอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส และการสร้างเนื้อฟัน.....	9
กระบวนการตกตะกอนเกลือแร่ในเนื้อฟัน.....	10
การศึกษาการสร้างเนื้อฟันของหนูแรท.....	12
การศึกษาเกี่ยวกับการสร้างเนื้อฟันในระดับจุลพยาธิวิทยา ของหนูแรท.....	12

บทที่ 3	วิธีดำเนินการวิจัย.....	15
	การสกัดอะซีแมนแนนและการพิสูจน์เอกลักษณ์.....	15
	การแยกและการเพาะเลี้ยงเซลล์จากเนื้อเยื่อโพรงฟัน.....	18
	การเตรียมอะซีแมนแนนสำหรับทดสอบกับเซลล์.....	19
	การวัดการเพิ่มจำนวนเซลล์ด้วยวิธีเอ็มทีที.....	20
	การวัดระดับการหลังโปรตีนโบนโมริโฟเจเนติก-2 ด้วยวิธี อีไลซา.....	20
	การวัดอัตราการทำงานของเอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส.....	21
	การศึกษาการตกตะกอนเกลือแร่.....	22
	การเตรียมอะซีแมนแนนสำหรับทดสอบกับโพรงฟันของ หนูแรท.....	23
	การศึกษาลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของการหายภายใน โพรงฟันของหนูแรท.....	23
	การวิเคราะห์ข้อมูล.....	26
บทที่ 4	ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	28
	ส่วนที่ 1 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารสกัดอะซีแมนแนน.....	28
	ส่วนที่ 2 ผลการทดสอบอะซีแมนแนนกับเซลล์โพรงฟันใน ห้องปฏิบัติการ.....	31
	1. อะซีแมนแนนกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ โพรงฟัน.....	31
	2. อะซีแมนแนนเพิ่มระดับการหลังโปรตีนโบน- มอริโฟเจเนติก-2 ในเซลล์โพรงฟัน.....	32
	3. อะซีแมนแนนเพิ่มอัตราการทำงานของเอ็นไซม์ อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในเซลล์โพรงฟัน.....	33
	4. อะซีแมนแนนเพิ่มการตกตะกอนเกลือแร่.....	34
	ส่วนที่ 3 การศึกษาวัสดุปิดโพรงฟันในฟันกรามของหนูแรท.....	37

	อะซีแมนแนนส่งเสริมการสร้างเดททินบริดจ์และเร่งการ จัดเรียงตัวของเนื้อเยื่ออ่อนให้กลับสู่สภาพปกติ.....	37
บทที่ 5	สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	47
	สรุปผลการวิจัย.....	47
	อภิปรายผลผลการวิจัย.....	47
	ข้อเสนอแนะ.....	52
	รายการอ้างอิง.....	53
	ภาคผนวก.....	64
	ภาคผนวก ก.....	65
	ภาคผนวก ข.....	71
	ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	96

สารบัญญัตินำ

ตาราง

หน้า

1	ส่วนประกอบของแคลเซียมไฮดรอกไซด์ซีเมนต์.....	7
2	ชนิดของวัสดุปิดโพรงฟัน ระยะเวลาทดลอง และจำนวนซี่ฟันที่ใช้ในการศึกษา.....	24
3	องค์ประกอบ (ร้อยละโดยโมล) ของแฟรกชันที่ละลายน้ำได้ของสารสกัด.....	28
4	การวิเคราะห์สเปกตรัมของรังสีอินฟราเรดของหมู่ทำหน้าที่ (functional group) ในสารสกัดของคณะผู้วิจัย.....	30
5	ลักษณะจุลพยาธิวิทยาของโพรงฟันทะลุที่ปิดด้วยอะซีแมนแนน ไดแคล และฟูจิไลนิงแอลซี ที่ระยะเวลา 7 วันและ 28 วัน.....	46
1 ก	องค์ประกอบ (ร้อยละโดยโมล) ของแฟรกชันที่ละลายน้ำได้ของสารสกัดจากคณะผู้วิจัย และของอะซีแมนแนนจากห้องปฏิบัติการคารริงตัน.....	65
2 ก	การวิเคราะห์อินฟราเรดสเปกตรัมของหมู่ทำหน้าที่ในสารสกัดจากคณะผู้วิจัย และอะซีแมนแนนจากห้องปฏิบัติการคารริงตัน.....	65
3 ก	ข้อมูลดิบของร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในเซลล์โพรงฟันที่ทดสอบกับอะซีแมนแนนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อใช้วิธีเอ็มทีที.....	66
4 ก	ข้อมูลดิบของระดับการหลังโปรตีนโบนมอร์โฟเจเนติก-2 ในเซลล์โพรงฟันที่ทดสอบกับอะซีแมนแนน ณ จุดเวลาต่าง ๆ เมื่อใช้เทคนิคอีไลซา.....	66
5 ก	ข้อมูลดิบของ ร้อยละของอัตราการทำงานของเอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในเซลล์โพรงฟัน ที่ทดสอบกับอะซีแมนแนนเป็นเวลา 3 วัน เมื่อใช้วิธีทางชีวเคมี.....	67
6 ก	ข้อมูลดิบของ ร้อยละของการตกตะกอนเกลือแร่ ในเซลล์โพรงฟันที่ทดสอบกับอะซีแมนแนนเป็นเวลา 15 วัน เมื่อย้อมด้วยอะลิซาริน เรด.....	67
7 ข	การวิเคราะห์การแจกแจงของร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเซลล์โพรงฟันที่ทดสอบกับอะซีแมนแนนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยวิธีทดสอบโคโมโกรอฟ สไมร์นอฟ.....	77
8 ข	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของร้อยละของจำนวนเซลล์โพรงฟันที่ทดสอบกับอะซีแมนแนนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยวิธีทดสอบสตีวิน.....	78
9 ข	การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย ของร้อยละของจำนวนเซลล์โพรงฟันที่ทดสอบกับอะซีแมนแนนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้การทดสอบแบบเอฟ.....	78

10 ข	การเปรียบเทียบเชิงซ้อนของค่าเฉลี่ยของร้อยละของจำนวนเซลล์ โพรงฟัน ที่ทดสอบกับอะซีแมนแนนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยวิธี ทดสอบเชิงซ้อนเซฟเฟ.....	79
11 ข	การทดสอบการแตกแฉงของระดับการหลังโปรตีนโบนมอร์โฟเจเน- ติก-2 ในเซลล์ โพรงฟันที่ทดสอบกับอะซีแมนแนน ณ 3 วัน ด้วยวิธี ทดสอบโคโมโกรอฟ สไมร์นอฟ.....	79
12 ข	การทดสอบการแตกแฉงของระดับการหลังโปรตีนโบนมอร์โฟเจเน- ติก-2 ในเซลล์ โพรงฟันที่ทดสอบกับอะซีแมนแนน ณ 9 วัน ด้วยวิธี ทดสอบโคโมโกรอฟ สไมร์นอฟ.....	81
13 ข	การทดสอบการแตกแฉงของระดับการหลังโปรตีนโบนมอร์โฟเจเน- ติก-2 ในเซลล์ โพรงฟันที่ทดสอบกับอะซีแมนแนน ณ 12 วัน ด้วยวิธี ทดสอบโคโมโกรอฟ สไมร์นอฟ.....	81
14 ข	การทดสอบทางสถิติของความแปรปรวนของระดับการหลังโปรตีน โบนมอร์โฟเจเนติก-2 ในเซลล์โพรงฟันที่ทดสอบกับอะซีแมนแนน ณ จุดเวลาต่าง ๆ ด้วยวิธีทดสอบลีวิน.....	82
15 ข	การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของระดับการหลังโปรตีนโบนมอร์โฟเจเน- ติก-2 ในเซลล์โพรงฟันที่ทดสอบกับอะซีแมนแนน ณ จุดเวลาต่าง ๆ ด้วยวิธีทดสอบเอฟ.....	83
16 ข	การเปรียบเทียบเชิงซ้อนของค่าเฉลี่ยของระดับการหลังโปรตีนโบน- มอร์โฟเจเนติก-2 ในเซลล์โพรงฟันที่ทดสอบกับอะซีแมนแนน ณ จุด เวลาต่าง ๆ ใช้การทดสอบเชิงซ้อนแบบเซฟเฟ หรือตันเนตต์ ทีทรี.....	83
17 ข	การทดสอบการแตกแฉง ของร้อยละของเอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส เป็นเวลา 3 วัน ด้วยวิธีทดสอบโคโมโกรอฟ สไมร์นอฟ.....	86
18 ข	การวิเคราะห์ทางสถิติของความแปรปรวนของร้อยละของอัตราการทำ งานของเอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเวลา 3 วัน ด้วยวิธีทดสอบลีวิน.....	87
19 ข	การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของอัตราการทำงานของเอ็นไซม์อัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส เป็นเวลา 3 วัน ใช้การทดสอบแบบเอฟ.....	87

20 ข	การเปรียบเทียบเชิงซ้อนของค่าเฉลี่ยของร้อยละของอัตราการทำงาน ของเอ็นไซม์ อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเป็นเวลา 3 วัน ใช้การทดสอบเชิง ซ้อนแบบเซฟเฟ.....	88
21 ข	การทดสอบการแจกแจงของปริมาณการตกตะกอนเกลือแร่ในเซลล์ โพรงพื้นที่ทดสอบกับอะซีแมนแนนเป็นเวลา 15 วัน ด้วยวิธีทดสอบ โคโมโกรอฟ สไมร์นอฟ.....	89
22 ข	การวิเคราะห์ทางสถิติของความแปรปรวนของปริมาณการตกตะกอน เกลือแร่ในเซลล์โพรงพื้นที่ทดสอบกับอะซีแมนแนนเป็นเวลา 15 วัน ด้วยวิธีทดสอบสตีวิน.....	90
23 ข	การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณการตกตะกอนเกลือแร่ในเซลล์ โพรงพื้นที่ทดสอบกับอะซีแมนแนนเป็นเวลา 15 วัน ด้วยวิธีทดสอบเอฟ.....	90
24 ข	การเปรียบเทียบเชิงซ้อนของค่าเฉลี่ยของปริมาณการตกตะกอนเกลือ- แร่ในเซลล์โพรงพื้นที่ทดสอบกับอะซีแมนแนนเป็นเวลา 15 วัน ด้วยการ ทดสอบเชิงซ้อนต้นเนตต์ ทีทีรี.....	91
25 ข	การเปรียบเทียบค่ากลางของการอักเสบหลังจากปิดโพรงพื้นที่ด้วยวัสดุ ต่าง ๆ ณ 7 วัน ด้วยวิธีทดสอบครัสคัล วาลิส เอส.....	92
26 ข	การเปรียบเทียบค่ากลางเฉลี่ยของการอักเสบ หลังจากปิดโพรงพื้นที่ด้วย วัสดุต่าง ๆ ณ 28 วัน ด้วยวิธีทดสอบครัสคัล วาลิส เอส.....	92
27 ข	การเปรียบเทียบค่ากลางของการสร้างเดนทินบริดจ์ หลังจากปิดโพรง- พื้นที่ด้วยวัสดุต่าง ๆ ในฟันกรามหนูแรท ณ 7 วัน ด้วยวิธีทดสอบครัสคัล วาลิส เอส.....	93
28 ข	การเปรียบเทียบค่ากลางของการสร้างเดนทินบริดจ์หลังจากปิดโพรง- พื้นที่ด้วยวัสดุต่าง ๆ ในฟันกรามหนูแรท ณ 28 วัน ด้วยวิธีทดสอบ ครัสคัล วาลิส เอส.....	94
29 ข	การเปรียบเทียบเชิงซ้อนของค่ากลางของการสร้างเดนทินบริดจ์ หลังจากปิด โพรงพื้นที่ด้วยวัสดุต่าง ๆ ในฟันกรามหนูแรท ณ 28 วัน ด้วยวิธีทดสอบบอนเฟอรรอนนี่.....	94

ตาราง

หน้า

30 ข	การเปรียบเทียบค่ากลางของการตอบสนองของเนื้อเยื่ออ่อนหลัง จากปิดโพรงฟันด้วยวัสดุต่าง ๆ ในฟันกรามหนูแรท ณ 7 วัน ด้วย วิธีทดสอบครีส์คัล วาลิส เอส.....	95
31 ข	การเปรียบเทียบค่ากลางของการตอบสนองของเนื้อเยื่ออ่อนหลัง จากปิดโพรงฟันด้วยวัสดุต่าง ๆ ในฟันกรามหนูแรท ณ 28 วัน ด้วย วิธีทดสอบครีส์คัล วาลิส เอส.....	95
32 ข	การเปรียบเทียบเชิงซ้อนของการตอบสนองของเนื้อเยื่ออ่อนหลัง จากปิดโพรงฟัน ด้วยวัสดุต่าง ๆ ในฟันกรามหนูแรท ณ 28 วัน ด้วย วิธีบนเฟอร์รอนนี่.....	95

สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
1	โครงสร้างที่คาดว่าเป็นโมเลกุลของสารอะซีแมนแนน..... 9
2	กลไกการลำเลียงไอออนของแคลเซียมในการสร้างเนื้อฟัน..... 11
3	การตกตะกอนเกลือแร่ในห้องปฏิบัติการ..... 11
4	ฟันกรามของหนูแรท..... 12
5	ประเภทของการอักเสบเมื่อแบ่งตามระดับของความรุนแรง..... 14
6	เซลล์ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อโพรงฟันมีความสามารถในการ ตกตะกอนเกลือแร่..... 19
7	สเปกตรัมของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของสารสกัด จากการวิเคราะห์ ด้วยเทคนิคคาร์บอนเทอร์ทีนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปก- โทรสโกปี..... 29
8	น้ำหนักโมเลกุลของพอลิแซ็กคาไรด์ที่วิเคราะห์จากเทคนิคโครมาโท- กราฟีเชิงตัดตอนขนาด..... 29
9	สเปกตรัมของหมู่ทำหน้าที่ของสารสกัดของคณะผู้วิจัย จากการ วิเคราะห์ด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี..... 30
10	ผลของสารอะซีแมนแนนต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์โพรงฟันเมื่อใช้วิธี เอ็มทีที..... 31
11	ผลของสารอะซีแมนแนนต่อการเพิ่มระดับการหลังโปรตีนโบนมอร์- โฟเจเนติก-2 จากเซลล์โพรงฟันเมื่อใช้วิธีอิลไลซา..... 32
12	ผลของอะซีแมนแนนต่อการเพิ่มร้อยละของอัตราการทำหน้าที่ของ เอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสต่อปริมาณโปรตีนรวมในเซลล์โพรงฟัน เมื่อใช้วิธีทางชีวเคมี..... 33
13	ตะกอนแคลเซียมที่ย้อมติดสีอะลิซาริน เรด ของเซลล์โพรงฟันที่ ทดสอบกับอะซีแมนแนน ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ..... 34
14	ตะกอนแคลเซียมที่ย้อมติดสีอะลิซาริน เรด ของเซลล์ที่ทดสอบกับ อะซีแมนแนนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อสังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์ ชนิดส่องกลับภายใต้เลนส์วัตถุที่มีกำลังขยาย 4 เท่า..... 35

รูปที่	หน้า
15 ตะกอนแคลเซียมที่ถูกทำลายด้วยเซซิลไพริดีนีเยมคลอไรด์ ของเซลล์โพรงฟัน.....	36
16 ภาพจุลพยาธิวิทยาของโพรงฟันที่ใส่สารอะซีแมนแนนเป็นเวลา 7 วัน.....	40
17 ภาพจุลพยาธิวิทยาของโพรงฟันที่ปิดด้วยไดแคลเป็นเวลา 7 วัน.....	41
18 ภาพจุลพยาธิวิทยาของโพรงฟันที่ปิดด้วยฟูล์โลนิงแอลซีเป็นเวลา 7 วัน.....	42
19 ภาพจุลพยาธิวิทยาของโพรงฟันที่ใส่สารอะซีแมนแนนเป็นเวลา 28 วัน.....	43
20 ภาพจุลพยาธิวิทยาของโพรงฟันที่ปิดด้วยไดแคลเป็นเวลา 28 วัน.....	44
21 ภาพจุลพยาธิวิทยาของโพรงฟันที่ปิดด้วยฟูล์โลนิงแอลซีเป็นเวลา 28 วัน.....	45
1 ก สเปกตรัมของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวจากการวิเคราะห์ด้วยคาร์บอน เทอร์ทีน นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์.....	68
2 ก สเปกตรัมของหมู่ทำหน้าที่จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี.....	69
3 ก น้ำหนักของหนูหลังจากการกรอพื้นทะเลโพรงฟัน.....	70

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โรคฟันผุเป็นปัญหาสำคัญทางทันตสาธารณสุข ในฟันที่ผุเล็กน้อยถึงปานกลาง ทันตแพทย์จะกำจัดเนื้อฟันที่ผุออก ร่องฟันฟันด้วยวัสดุรองพื้นและอุดด้วยวัสดุอุดฟัน ตามลำดับ ในกรณีที่ฟันผุเข้าใกล้โพรงฟัน หลังจากทันตแพทย์กำจัดส่วนที่ผุออกหมดแล้วมีเนื้อฟันเหลือบางมาก บางครั้งมีรอยทะลุโพรงฟันขนาดเท่าปลายเข็มหมุด (pin-point exposure) การปิดโพรงฟันด้วยวัสดุปิดโพรงฟันตามด้วยการอุดฟัน จะเป็นการรักษาเชิงอนุรักษ์เพื่อรักษาชีวิตของฟันเอาไว้ แทนการรักษาคลองรากฟัน หรือการถอนฟัน การปิดโพรงฟันมีวัตถุประสงค์เพื่อกระตุ้นให้โพรงฟันเกิดกระบวนการหายด้วยตัวเอง และสร้างเนื้อฟันซ่อมเสริม (reparative dentin) ซึ่งเริ่มด้วยการเพิ่มจำนวนเซลล์ การสร้างสารเมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix) และการพัฒนาเป็นเนื้อเยื่อที่มีโครงสร้างคล้ายเนื้อฟัน (dentinoid structure) เชื่อมปิดรอยทะลุ หรือที่เรียกกันว่า “เดนตินบริดจ์” (dentin bridge) (Sayegh และ Rochester, 1969) ในปัจจุบันวัสดุปิดโพรงฟันที่ใช้ในทางทันตกรรม คือ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ (calcium hydroxide) เป็นวัสดุที่มีความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อโพรงฟัน แต่อย่างไรก็ตาม ผลในการสร้างเดนตินบริดจ์ยังไม่มีความแน่นอน (Sayegh และ Rochester, 1969) และพบเศษวัสดุตกค้างปะปนอยู่ในเดนตินบริดจ์ ทำให้เกิดเป็นจุดบกพร่องของเนื้อฟันซ่อมเสริม (Cox และคณะ, 1996) นอกจากนี้ยังมีรายงานในระดับห้องปฏิบัติการ ว่าวัสดุนี้เป็นพิษต่อเซลล์โพรงฟัน (pulp cells) และลดการสร้างโปรตีนโบนมอร์โฟเจเนติก-2 (bone morphogenetic protein-2; BMP-2) (Yasuda และคณะ, 2008) ด้วยเหตุนี้ นักวิทยาศาสตร์จึงมีแนวความคิดที่จะพัฒนา โดยนำโมเลกุลที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive molecules) มากระตุ้นการสร้างเดนตินบริดจ์ เช่น โปรตีนโบนมอร์โฟเจเนติก-2 (Saito และคณะ, 2004; Ihora และคณะ, 2004) โปรตีนโบนมอร์โฟเจเนติก-4 (bone morphogenetic protein-4; BMP-4) (Nakashima, 1994) โปรตีนโบนมอร์โฟเจเนติก-7 (bone morphogenetic protein-7; BMP-7) (Rutherford และคณะ, 1993) โบนไซอะโลโปรตีน (bone sialoprotein; BSP) (Decup และคณะ, 2000) ทรานส์ฟอร์มิงโกรทแฟกเตอร์-บีตา1 (transforming growth factor- β 1; TGF- β 1) (Hu และคณะ, 1998) อีนาเมลเมทริกซ์ (enamel matrix) (Nakamura และคณะ, 2001)

อะมีโลบลาสติน (ameloblastin) (Nakamura และคณะ, 2006) เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตาม สารเหล่านี้มีราคาแพง ผลิตจากแบคทีเรียหรือเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะดีเอ็นเอ (DNA; deoxyribonucleic acid) ที่อาจมีปัญหาในด้านความปลอดภัย ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะใช้สารจากธรรมชาติ เช่น พอลิแซ็กคาไรด์จากพืชสมุนไพรมาเป็นสารออกฤทธิ์หลักในการเหนี่ยวนำกระบวนการสร้างเดนทินบริดจ์

อะซีแมนแนน (acemannan) เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ ที่มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลแมนโนส ซึ่งสกัดได้จากส่วนหัวของว่านหางจระเข้ สามารถเร่งการหายของบาดแผล (Robert และ Travis, 1995) ต้านมะเร็ง (Harris และคณะ, 1991; King และคณะ, 1995) และมีความปลอดภัยต่อร่างกาย (Fogleman, Chapdelaine, และคณะ, 1992; Fogleman, Shellenberger, และคณะ, 1992; Thomas และคณะ, 1998; Poor, Hall, และ Poor, 2002) มีการทดลองนำอะซีแมนแนนมาใช้รักษาผู้ป่วยที่เพ็งถอนฟัน ด้วยการใส่สารในรูปแบบพรีซดรายเจล (freeze-dried gel; SaliCept™ Oral Patch) ใส่ลงในกระดูกเบ้าฟัน พบอะซีแมนแนนช่วยลดอุบัติการณ์ของกระดูกเบ้าฟันอักเสบ (alveolar osteitis) (Poor, Hall, และ Poor, 2002) นอกจากนี้มีการนำอะซีแมนแนนให้กับผู้ป่วยที่มีบาดแผลกดทับ (pressure ulcer) อีกด้วย (Thomas และคณะ, 1998) จากการศึกษาของคณะผู้วิจัยพบ อะซีแมนแนนสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์สร้างเส้นใยจากเนื้อเยื่อโพรงฟัน (pulpal fibroblasts) (พีชนิการ์ หล้าดวงดี, 2549) และโปรตีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสร้างเนื้อฟัน ได้แก่ คอลลาเจนชนิดที่ 1 (type I collagen) เดนทินเมทริกซ์โปรตีน-1 (dentin matrix protein-1) เดนทินไซฮาโล-ฟอสโฟโปรตีน (dentin sialophosphoprotein) และโปรตีนโบนมอร์โฟเจเนติก-2 และเพิ่มจำนวนเซลล์สร้างเส้นใยจากเนื้อเยื่อเหงือก (gingival fibroblasts) และเซลล์เอ็นยัดปริทันต์ (periodontal ligament cells) (Jittapiromsak และคณะ, 2005) รวมถึงสามารถเพิ่มระดับการแสดงออกของอาร์เอ็นเอเข้ารหัส (mRNA; messenger ribonucleic acid) ของเดนทินเมทริกซ์-1 (พีชนิการ์ หล้าดวงดี, 2549) และอาร์เอ็นเอเข้ารหัสของโปรตีนโบนมอร์โฟเจเนติก-2 (Jittapiromsak และคณะ, 2007) ซึ่งเป็นโปรตีนสำคัญที่มีส่วนเกี่ยวข้องในกระบวนการสร้างเนื้อฟัน (Nakashima, 1994; Heikinheimo, 1994; Hao และคณะ, 2004; Baba และคณะ 2004; Saito และคณะ, 2004) ดังนั้น อะซีแมนแนนจึงเป็นสารธรรมชาติที่อาจนำมาพัฒนาเป็นสารเร่งการสร้างเนื้อฟันเพื่อปิดโพรงฟันทะลุ

ดังนั้นในการศึกษานี้ ผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อ ทำการทดสอบประสิทธิภาพของอะซีแมนแนนต่อเซลล์โพรงฟันในแง่การเพิ่มจำนวนเซลล์ การแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเนื้อฟัน และการตกตะกอนแคลเซียมในระดับห้องปฏิบัติการ รวมถึงการศึกษาในสัตว์ทดลอง

ที่พื้ogramถูกทำให้โพรงฟันทะลุด้วยเครื่องมือเอ็กซ์พลอเรอร์ (explorer) ที่ปลอดภัย โดยความรู้ที่ได้จากการศึกษานี้จะนำไปสู่การสร้างองค์ความรู้และการพัฒนาสารอะซีแมนแนนและวัสดุปิดโพรงฟันที่มีสารอะซีแมนแนนเป็นสารออกฤทธิ์หลักในการสร้างเนื้อฟัน

สมมติฐานงานวิจัย

อะซีแมนแนนสามารถเร่งกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเนื้อฟันซ่อมเสริมในห้องปฏิบัติการ และในสัตว์ทดลอง

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. การศึกษาถึงผลทางชีวภาพของสารอะซีแมนแนนต่อเซลล์เนื้อเยื่อโพรงฟันในห้องปฏิบัติการ ใน
 - 1.1 การศึกษาการเพิ่มจำนวนเซลล์โพรงฟัน
 - 1.2 การศึกษาผลต่อการแสดงออกของ โปรตีนโบนมอร์โฟเจเนติก-2
 - 1.3 การศึกษาผลต่อการทำงานของ เอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส
 - 1.4 การศึกษาผลต่อการตกตะกอนเกลือแร่
2. การศึกษาผลของสารอะซีแมนแนนต่อการสร้างเนื้อฟันซ่อมเสริมในพื้ogramที่ถูกทำให้โพรงฟันทะลุในหนูแรท

ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยในห้องปฏิบัติการและในสัตว์ทดลอง

ข้อจำกัดของงานวิจัย

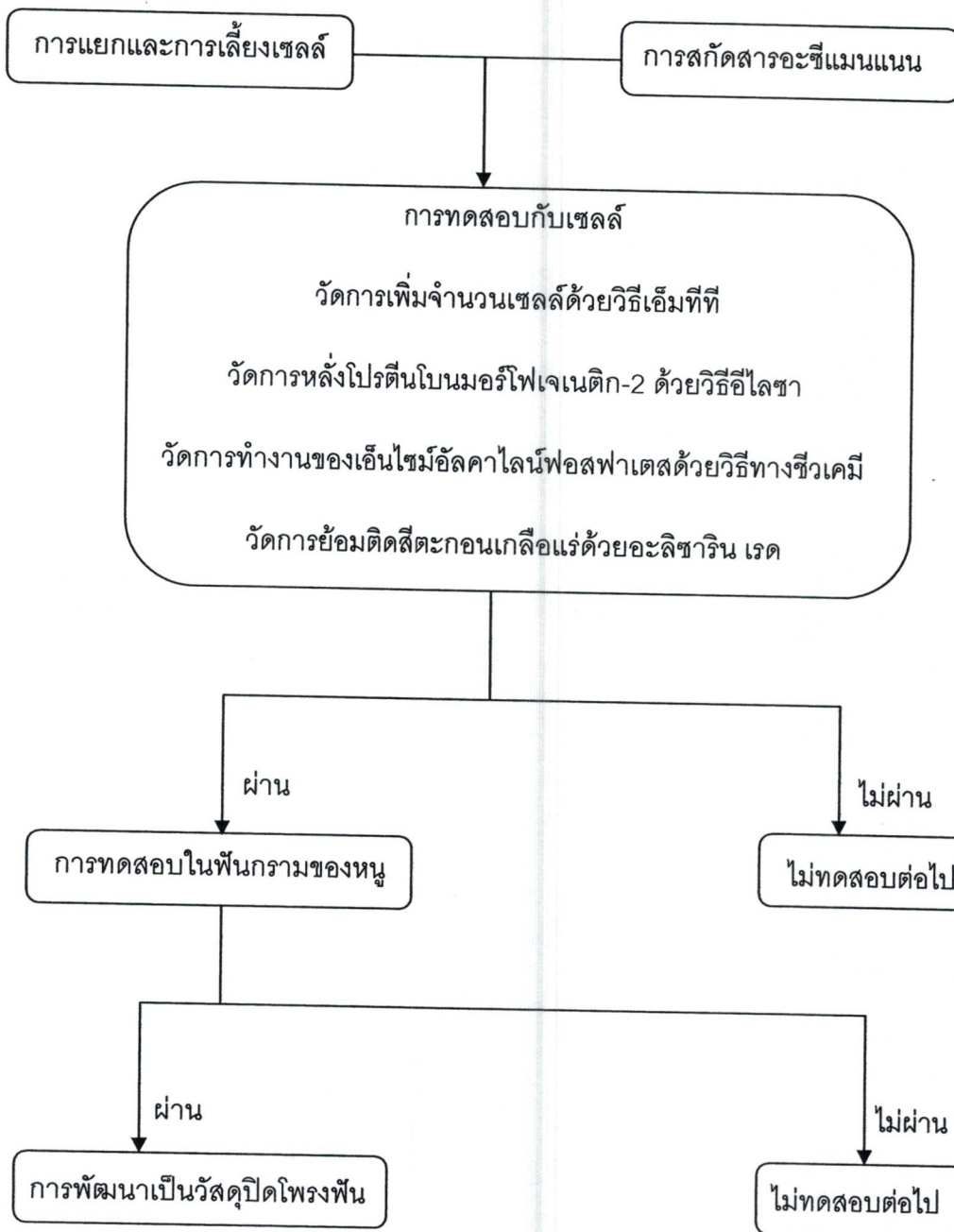
ผลการวิจัยนี้ยังไม่สามารถนำไปใช้จริงในมนุษย์ ยังต้องอาศัยการวิจัยในระดับคลินิกต่อไป

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. องค์ความรู้เบื้องต้นในระดับห้องปฏิบัติการ และสัตว์ทดลอง ในการประเมินความเป็นไปได้สำหรับการพัฒนาสารอะซีแมนแนนเพื่อเป็นสารในการเร่งการสร้างเนื้อฟันซ่อมเสริม
2. การเพิ่มคุณค่าของว่านหางจระเข้เพื่อเป็นสารออกฤทธิ์หลักในการสร้างเนื้อฟันซ่อมเสริม

- 3. การจดสิทธิบัตร
- 4. บทความวิชาการระดับนานาชาติ

วิธีดำเนินการวิจัย



เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เหตุการณ์ที่เกิดขึ้นเมื่อโพรงฟันทะลุ

เมื่อโพรงฟันทะลุจากการกรอฟัน เซลล์สร้างเนื้อฟัน (odontoblasts) ในบริเวณที่มีการทะลุจะถูกทำลาย ร่างกายจะตอบสนองด้วยกลไก 2 ประการ ได้แก่ การอักเสบ และการซ่อมแซม สำหรับการอักเสบ ประกอบด้วย การขยายหลอดเลือด (vasodilation) การปลดปล่อยสารเคมี และเซลล์เม็ดเลือดขาว เพื่อเข้าทำลายสิ่งแปลกปลอมที่อาจปะปนเข้ามาในระหว่างกรอฟัน การกำจัดเศษเซลล์ตาย (necrotic debris) และในขณะเดียวกันจะเริ่มพบการซ่อมแซม สำหรับการซ่อมแซม ประกอบด้วย 1) การเรียกเซลล์ ให้เคลื่อนย้ายมายังบริเวณที่ได้รับอันตราย 2) การเพิ่มจำนวนเซลล์ 3) การเปลี่ยนสภาพ (differentiation) 4) การสร้างเดนตินเมทริกซ์ (dentin matrix) และ 5) การตกตะกอนเกลือแร่ (Ruch, Lesot, และ Begue-Kirn, 1995; Smith, Selzer, และ Bender, 2002)

เมื่อเซลล์สร้างเนื้อฟันตายไปในบริเวณที่ถูกกรอทะลุ เซลล์สร้างเนื้อฟันที่เหลืออยู่ในบริเวณข้างเคียงจะไม่มี การแบ่งตัวเพิ่ม เพราะเซลล์ชนิดนี้เป็นเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเต็มที่แล้ว (highly differentiated post-mitotic cells) ดังนั้น ร่างกายจะใช้กลไกในการเรียกเซลล์โพรงฟันให้เคลื่อนย้ายเข้ามาในบริเวณที่บาดเจ็บ ด้วยการปลดปล่อยโกรทแฟกเตอร์ (growth factors) จากเนื้อเยื่อที่ได้รับอันตราย โกรทแฟกเตอร์เหล่านั้น ได้แก่ ทรานสเฟอร์มิงโกรท-แฟกเตอร์-ปีต้า 1 อินซูลินไลค์โกรทแฟกเตอร์ (Insulin-like Growth Factor) และโปรตีนโบนมอร์ฟोजেনติก เป็นต้น (Ruch, Lesot, และ Begue-Kirn, 1995; Smith, Selzer, และ Bender, 2002) เพื่อเหนี่ยวนำเซลล์โพรงฟัน ได้แก่ เซลล์สร้างเส้นใย (fibroblasts) เซลล์เอนโดธิลเลียล (endothelial cells) เซลล์รอบหลอดเลือด (perivascular cells/pericytes) และเซลล์มีเซนไคม์ที่ยังไม่มีการเปลี่ยนสภาพ (undifferentiated mesenchymal cells) ให้เปลี่ยนสภาพไปเป็นเซลล์คล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟัน (odontoblast-like cells) (Sayegh, 1967; Feit, Metelova และ Sindelka, 1970; Fitzgerald, 1979; Yamamura, 1985; Fitzgerald, Cheigo, และ Heys, 1990) เซลล์เหล่านี้จะทำหน้าที่สร้างเดนตินเมทริกซ์ (dentin matrix) หรือเนื้อเยื่อคล้ายเนื้อฟันปกปิดโพรงฟันทะลุ หลังจากนั้นจะมีการตกตะกอนเกลือแร่เป็นเนื้อฟันเป็นลำดับถัดไป (Schroder และ Granath, 1971) กระบวนการเหล่านี้ ใช้ระยะเวลาประมาณ 97 วันในลิง (Murray และคณะ,

2002) และ 15-30 วันในหนู (Turner, Marfurt, และ Sattelberg, 1989; Six, Lasfargues, และ Goldberg, 2000) เเดนหินบริดจ์หรือโครงสร้างคล้ายเนื้อฟัน (dentinoid structure) ครอบคลุมรอยทะเล มักถูกใช้เป็นเกณฑ์ทางจุลพยาธิวิทยาที่สำคัญ เพื่อบ่งบอกถึงความสำเร็จในการหายภายในเนื้อเยื่อโพรงฟัน (Sayegh และ Rochester, 1969; Mjör, 2002)

วัสดุสำหรับปิดโพรงฟันที่ใช้กันโดยทั่วไปในทางทันตกรรม

วัสดุสำหรับปิดโพรงฟันที่ยอมรับในทางทันตกรรม คือแคลเซียมไฮดรอกไซด์ วัสดุนี้มีการพัฒนามาตั้งแต่ปี 1920 (Dammachke, 2008) มีคุณสมบัติเด่น คือ สามารถเหนียวนำไปมีการสร้างเดนหินบริดจ์ได้ประมาณร้อยละ 64 (Sayegh และ Rochester, 1969) แต่อย่างไรก็ตามกลไกการสร้างยังคงไม่ชัดเจน จากการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่า เมื่อเนื้อเยื่อโพรงฟันสัมผัสโดยตรงกับแคลเซียมไฮดรอกไซด์ จะเกิดลักษณะชั้นเซลล์ตาย (necrotic zone) (Stanley และ Lundy, 1972; Cvek, 1978; Schroder, 1978; Cox, Bergenholtz, และ Fitzgerald 1982; Hanks, Bergenholtz, และ Kim, 1983; Schroder, 1985) Schroder (1985) ได้ตั้งสมมติฐานว่า ไฮดรอกซิลไอออน (hydroxyl ion) แยกตัวออกมาสู่เนื้อเยื่อที่สัมผัสจึงทำให้เซลล์ในบริเวณนั้นตาย ส่งผลทำให้ภายในโพรงฟันเกิดสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม และเหนียวนำไปมีการสร้างเนื้อฟันขึ้น มีรายงานว่าแคลเซียมไฮดรอกไซด์ซีเมนต์ยี่ห้อไดแคล (Dycal) ทำให้เกิดชั้นเซลล์ตายขนาด 0.3-0.7 มิลลิเมตร (Stanley และ Lundy, 1972) แคลเซียมไฮดรอกไซด์มีความเป็นด่างสูง เช่น ยี่ห้อไดแคล (Dycal) และ โปรแคล (Procal) มีความเป็นกรด-เบส (pH) 11.5 ยี่ห้อไฮเดร็กซ์ (Hydrex) มีความเป็นกรด-เบส 10 (Prosser และคณะ, 1982) ส่วนประกอบแสดงในตารางที่ 1 นอกจากนี้ ยังมีรายงานถึงความเป็นพิษของไดแคลต่อเซลล์โพรงฟัน (Murray และคณะ 2000) แคลเซียมไฮดรอกไซด์ละลายน้ำได้ง่าย (Barnes และ Kidd, 1979; Prosser และคณะ, 1982) ละลายเมื่ออยู่ในสภาวะกรด (Hwas และ Sandrik, 1984) จึงเพิ่มโอกาสการรั่วซึมและเนื้อเยื่อโพรงฟันติดเชื้อ นอกจากนี้วัสดุไม่มีสมบัติยึดติด (non adhesive properties) กับเนื้อฟันเนื่องจากยึดเกาะกับเนื้อฟันได้ด้วยแรงวันเดอร์วาลส์ซึ่งเป็นพันธะระดับอ่อน (Kenneth และ Harold, 2002) มีความทนแรงอัดต่ำ (low compressive strength) และถูกกัดกร่อนได้ด้วยไพรเมอร์ (primer) ของวัสดุอุดฟันที่มีอะซิโตน (acetone) หรือแอลกอฮอล์ (alcohol) (El-Araby และ Al-Jabab, 2005) เป็นส่วนประกอบ นอกจากนี้ยังพบการแตกหักของวัสดุเข้าไปในโพรงฟัน (Kitasako, Shibata, และ Tagami, 2006) และมีรายงานของการเกิดจุดบกพร่องปะปนอยู่ในเดนหินบริดจ์ (Cox และคณะ, 1996)

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของแคลเซียมไฮดรอกไซด์ซีเมนต์ คัดลอกมาจาก Prosser และคณะ (1982)

ยี่ห้อ	Acid paste		Basic paste	
	Organic components	Inorganic fillers	Inorganic component	Plasticizer
Dycal	1-methyl trimethylene	titanium dioxide	calcium hydroxide	N-ethyl toluene
	disalicylate (methyl	calcium sulfate	zinc oxide	sulfonamide (ortho
	salicylate)	calcium tungstate		and para)
Procal	Isobutyl salicylate	barium sulfate	calcium hydroxide	paraffin oil
	(abietic acid derivatives)		barium sulfate	
	(alkyl salicylate)			
Hydrex	Isobutyl salicylate	none	calcium hydroxide	paraffin oil
	(abietic acid derivatives)		barium sulfate	
	(methyl salicylate)			
	(salicylate acid)			

อะซีแมนแนน

อะซีแมนแนน เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากส่วนวุ้นใสของวุ้นหางจระเข้ มีส่วนประกอบของน้ำตาลแมนโนสเป็นหลัก รองลงมาเป็นกลูโคสหรือกาแลกโตส (Fermentia และคณะ, 2003; Talmadge และคณะ, 2004; Ni และคณะ, 2004; Tai-Nin และคณะ, 2005) มีโครงสร้างโมเลกุลเป็นพอลิแซ็กคาไรด์สายตรง อาจมีน้ำตาลกาแลกโตส (galactose) มาเกาะเป็นหมู่ข้างเคียง (side chain) (Tai-Nin และคณะ, 2005; Tai-Nin และคณะ, 2007; Turner และคณะ, 2004) ดังรูปที่ 1

อะซีแมนแนนสามารถกระตุ้นการทำงานของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน ได้แก่ มาโครฟาจ (Karaca, Sharma, และ Nordgren, 1995; Zhang และ Tizard, 1996; Stuart และคณะ, 1997; Djeraba และคณะ, 2000) ลิมโฟไซต์ (lymphocytes) (Womble และ Helderman, 1988, 1992) และกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์เดนดริติก (dendritic cells) ให้สมบูรณ์ (Lee และคณะ, 2001) สามารถต้านเซลล์มะเร็งในสัตว์ทดลอง (Harris และคณะ, 1991; King และคณะ, 1995) มีความปลอดภัยเมื่อให้สัตว์ทดลองกินหรือฉีด (Fogleman และคณะ, 1992) และมีการนำสารอะซีแมนแนนมาเป็นสารออกฤทธิ์หลักในผ้าปิดแผล ใช้กับผู้ป่วยที่มีบาดแผลกดทับ (Thomas และคณะ, 1998) นอกจากนี้ ยังใช้ในงานทันตกรรม เช่น เป็นสารออกฤทธิ์หลักของแผ่น

ปิดแผลในช่องปากซาลิเซ็ปต์ ออรัลแพทช์ (SaliCept™ Oral Patch) สำหรับใส่ลงในกระดุกเข้าฟัน เพื่อลดอัตราการเกิดกระดุกเข้าฟันอักเสบ (Poor, Hall, และ Poor, 2002)

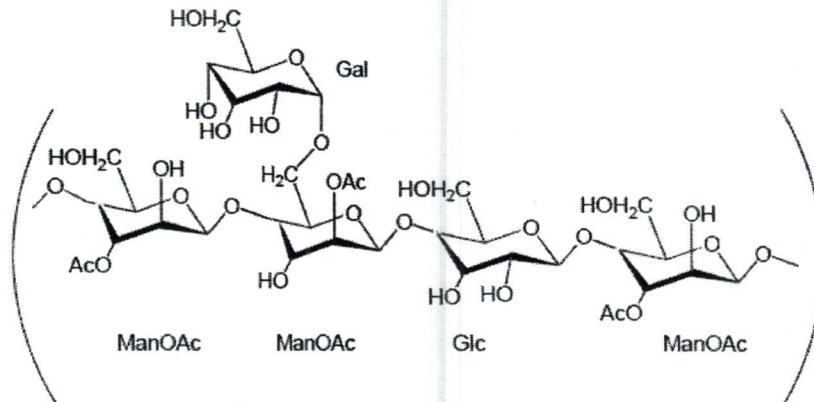
ในปัจจุบันยังไม่มีคำอธิบายสารสกัดอะซีแมนแนนบริสุทธิ์ มีการจำหน่ายเพียงผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ หรือผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ โดยใช้สารสกัดอะซีแมนแนนบริสุทธิ์ ซึ่งผลิตจาก ห้องปฏิบัติการคาร์ริงตัน (Carrington Laboratories, Tx, US) มาใช้เป็นส่วนประกอบ ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงทำการสกัดสารอะซีแมนแนนขึ้นเอง และทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ โดยอาศัยความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ชั้นตอนต่าง ๆ ได้เคยมีการอธิบายไว้ในการศึกษาที่ผ่านมาของคณะผู้วิจัย (Jittapiromsak และคณะ, 2007)

เมื่อนำสารสกัดอะซีแมนแนน มาศึกษาเบื้องต้นในด้านผลทางชีวภาพในห้องปฏิบัติการ พบว่า สารดังกล่าวมีความสามารถในการเพิ่มจำนวนเซลล์สร้างเส้นใยจากเหงือก (Jittapiromsak และคณะ, 2005) จากเซลล์โพรงฟัน (พีชณิการ์ หล้าดวงดี, 2549) และเซลล์เอ็นอีดีปริทันต์ (Jittapiromsak และคณะ, 2005) โดยสามารถกระตุ้นการแสดงออกของอาร์เอ็นเอเข้ารหัสของโปรตีนเดนตินเมทริกซ์-1 (พีชณิการ์ หล้าดวงดี, 2549) และ โปรตีนโบนมอร์โฟเจเนติก-2 (Jittapiromsak และคณะ, 2007) ในเซลล์โพรงฟัน และสามารถเพิ่มการสังเคราะห์คอลลาเจนชนิดที่ 1 ในเซลล์สร้างเส้นใยจากเนื้อเยื่อเหงือกและเซลล์เอ็นอีดีปริทันต์ (Jittapiromsak และคณะ, 2005) ดังนั้นจึงคาดว่าสารอะซีแมนแนนที่คณะผู้วิจัยสกัดได้ อาจมีผลในการกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและหน้าที่ของเซลล์จากเนื้อเยื่อโพรงฟันไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อฟัน และสร้างเนื้อฟัน

โปรตีนโบนมอร์โฟเจเนติก-2 และการสร้างเนื้อฟัน

โปรตีนโบนมอร์โฟเจเนติก-2 เป็นโปรตีนจำพวกโกรทแฟกเตอร์ในกลุ่มของ ทรานสเฟอร์มีน-โกรทแฟกเตอร์ มีบทบาทเกี่ยวกับการสร้างกระดูกอ่อน และกระดูก (Takiguchi และคณะ, 1998) และมีบทบาทสำคัญในระยะเวลาการสร้างเอ็มบริโอ (embryogenesis) และการกำเนิดสัณฐาน (morphogenesis) ของเนื้อเยื่อหลายชนิด (Ghosh-Choudhury และคณะ, 2003; Zoricic และคณะ, 2003; Fux และคณะ, 2004) นอกจากนี้ โปรตีนโบนมอร์โฟเจเนติก-2 ยังมีบทบาทสำคัญในกระบวนการสร้างฟัน (tooth morphogenesis) (Heikinheimo, 1994; Thesleff, 2003) สามารถเหนี่ยวนำการเปลี่ยนสภาพของเซลล์โพรงฟันไปเป็นเซลล์คล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟัน (Begue-Kirn และคณะ, 1992; Saito และคณะ, 2004) พบอยู่ในเดนตินเมทริกซ์ (Conover และ

Urist, 1979; Takeda และคณะ, 1994; Gu, Smoke, Rutherford, 1996) และสามารถ
 เหนี่ยวหน้าการทำงานของเอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ซึ่งเป็นการชี้วัดความสามารถในการ
 ตกตะกอนเกลือแร่ของเซลล์สร้างเนื้อฟันและเซลล์สร้างกระดูก (Saito และคณะ, 2004) ยังมี
 การศึกษาพบว่า โปรตีนโบนโมริโฟเจเนติก-2 กระตุ้นการสร้างเนื้อฟันในสัตว์ที่ถูกทำให้โพรงฟัน
 ทะลุได้ (Nakashima, 1994; Ihora และคณะ, 2004; Ihora และคณะ, 2006)



รูปที่ 1 โครงสร้างที่คาดว่า เป็นโมเลกุลของสารอะซีแมนแนน แกนหลักประกอบด้วยน้ำตาลแมนโนส
 (mannose; Man) หลายหน่วยต่อกัน โดยที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 และ 4 และอาจถูกแทรกด้วยน้ำตาลกลูโคส
 (glucose; Glc) ณ คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 หรือ 3 หรือ 6 มักถูกอะเซทิลเลต (acetylated; OAc) นอกจากนี้
 คาร์บอนตำแหน่งที่ 6 อาจมีน้ำตาลกาแลคโตส (galactose; Gal) จับเป็นหมู่ข้างเคียง (side chain) คัดลอกมา
 จาก Tai-Nin และคณะ (2007)

เอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส และการสร้างเนื้อฟัน

เอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส เป็นไกลโคโปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane-bound glycoprotein) มีบทบาทในการไฮโดรไลซ์ (hydrolysed) ไพโรฟอสเฟต (pyrophosphate; PPi) ให้กลายเป็นฟอสเฟตอิสระ (Pi) ซึ่งสามารถจับกับแคลเซียมไอออนเพื่อสร้างตะกอนเกลือแร่แคลเซียมฟอสเฟต (Garimella และคณะ, 2006) และมีความเกี่ยวข้องกับการขนส่งแคลเซียมฟอสเฟต และสารอาหารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (Nagata, Komoda, และ Sakagishi, 1989) และทำให้เกิดการตกตะกอนเกลือแร่ (Genge และคณะ, 1988; Beertsen และ van den Bos, 1992)

เอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ตรวจพบได้ในเนื้อเยื่อโพรงฟัน กระดูก ไต และตับ (Goseki และคณะ, 1990; Goseki และคณะ, 1995) นอกจากนี้ ยังพบในเซลล์สร้างเนื้อฟัน และเซลล์ที่อยู่ติดต่อเซลล์สร้างเนื้อฟัน (Goseki และคณะ, 1990) เอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเป็นเอ็นไซม์ที่

มีความสำคัญเพราะ ในผู้ป่วยที่มีเอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในระดับต่ำกว่าปกติ พบการสร้างเนื้อฟันผิดปกติและความหนาแน่นของกระดูกขากรรไกรลดลง นอกจากนี้ การทำงานของเอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ใช้เป็นตัวบ่งชี้สำคัญของการเปลี่ยนสภาพของเซลล์สร้างเนื้อฟันในระยะแรก (early differentiation protein marker) (Yokose และคณะ, 2000)

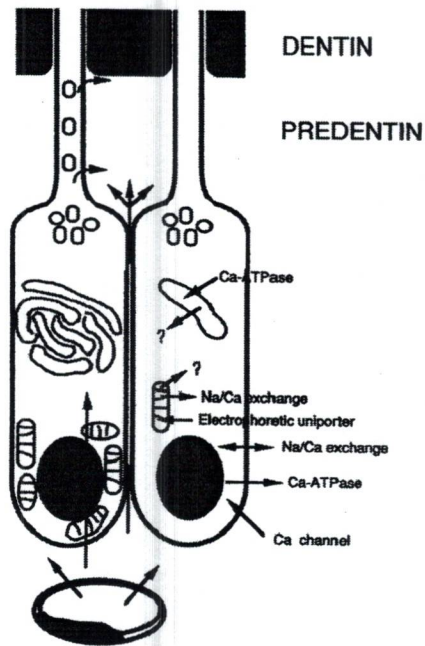
กระบวนการตกตะกอนเกลือแร่ในเนื้อฟัน

เซลล์สร้างเนื้อฟันเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่สร้างเดนตินเมทริกซ์ ซึ่งบริเวณเดนตินเมทริกซ์ที่ยังไม่มีการตกตะกอนเกลือแร่เรียกว่า ปริเดนติน (predentin) ประกอบด้วย เส้นใยคอลลาเจนเป็นองค์ประกอบหลัก และเมทริกซ์โปรตีนที่ไม่ใช่เส้นใยคอลลาเจน (non-collagenous protein matrix) ได้แก่ เดนตินฟอสโฟโปรตีน (dentin phosphoprotein) โบนาไซอะโลโปรตีน ออสตีโอพอน-ติน (osteopontin) ออสตีโอเนกติน (osteonectin) โปรตีโอไกลแคน (proteoglycan) โปรตีนแกมมาคาร์บอกซีกลูตาเมต (gamma-carboxyglutamate protein; Gla protein) ฟอสโฟไลปิด (phospholipid) และโกรทแฟกเตอร์ต่าง ๆ เป็นต้น ซึ่งเชื่อว่าทำหน้าที่เป็นโครง (framework) และสามารถกำกับการตกตะกอนเกลือแร่ นอกจากนี้ เซลล์สร้างเนื้อฟันทำหน้าที่ในการควบคุมการจัดเรียงตัวของและความหนาแน่นของเส้นใยคอลลาเจนก่อนที่จะเกิดการตกตะกอนเกลือแร่

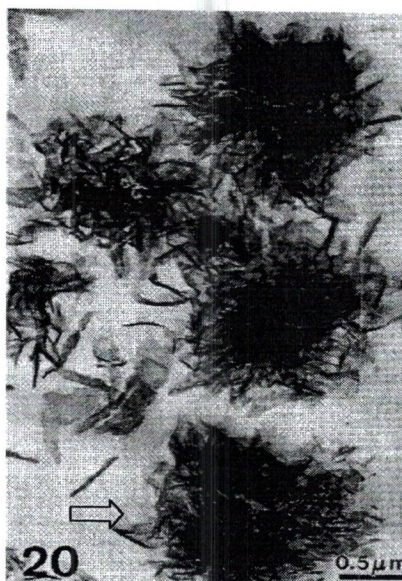
จุดเริ่มต้นของกระบวนการตกตะกอนเกลือแร่ เชื่อว่าเกิดจากเซลล์สร้างเนื้อฟันเหนี่ยวนำให้เกิดนิวเคลียสผลึกของไอออน (ion nucleation) ภายในปริเดนติน ด้วยกลไกที่เป็นไปได้ 3 แบบ ได้แก่ 1) การลำเลียงผ่านเซลล์ 2) การลำเลียงผ่านระหว่างเซลล์ 3) การลำเลียงผ่านเซลล์ผ่านระหว่างเซลล์ ซึ่ง Lungren และ Linde (1992) ได้พิสูจน์พบการลำเลียงผ่านเซลล์ เป็นกลไกหลักในการสร้างเนื้อฟัน สำหรับการลำเลียงผ่านเซลล์ เป็นการลำเลียงไอออนของแคลเซียมจากระบบเลือดผ่านเข้าสู่เซลล์ทางเยื่อหุ้มเซลล์ทางช่องแคลเซียม (calcium channel) และสะสมภายในเซลล์ด้วยการจับกับโปรตีนภายในเซลล์ ได้แก่ แคลโมดูลิน (calmodulin) แคลไบดิน (calbidin) พาร์ฟัลบูมิน (parvalbumin) และแอนเนกซิน (annexin) แล้วลำเลียงออกจากเซลล์ทางเยื่อหุ้มเซลล์ผ่านแคลเซียม-เอทีพีเอส (Ca-ATPase) และการแลกเปลี่ยนโซเดียม (sodium exchanger) ส่งไปยังปริเดนติน หรือส่วนยื่น (process) ของเซลล์เพื่อใช้ในการตกตะกอนเกลือแร่ (Linde และ Goldberg, 1993) (รูปที่ 2)

ในทางคลินิกของการตกตะกอนเกลือแร่ ตะกอนเกลือแร่จะตกสะสม (deposit) ลงระหว่างเส้นใยคอลลาเจนที่มีการจัดเรียงตัวอย่างเป็นรูปแบบซึ่งกำกับโดยเซลล์สร้างเนื้อฟัน ส่วน

การศึกษาในห้องปฏิบัติการ จะพบลักษณะการตกตะกอนเกลือแร่เกาะกลุ่มกันเป็นปุ่มเล็ก (nodule) ดังรูปที่ 3 (Linde และ Goldberg, 1993) และสามารถยับยั้งได้ด้วยสีย้อมอะริซาริน เรด



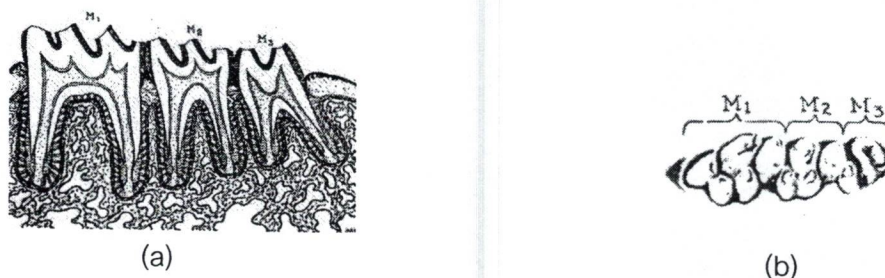
รูปที่ 2 กลไกการลำเลียงไอออนของแคลเซียมในการสร้างเนื้อฟัน คัดลอกมาจาก Lungren และ Linde (1992)



รูปที่ 3 การตกตะกอนเกลือแร่ในห้องปฏิบัติการ พบตะกอนเกลือแร่เกาะกลุ่มกันเป็นปุ่มเล็ก (ลูกศร) คัดลอกมาจาก Linde และ Goldberg (1993)

การศึกษาการสร้างเนื้อฟันของหนูแรท

หนูแรทเป็นสัตว์ทดลองที่มีการติดตามควบคุมสายพันธุ์ ง่ายต่อการดูแลและการทดลอง มีการสร้างเนื้อฟันที่รวดเร็ว และฟันกรามของหนูเป็นฟันที่มีลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา สรีระ และการทำงานที่คล้ายกับฟันกรามของมนุษย์ (Schour และ Massler, 1949) มีฟันกรามบนซี่ที่ 1 เป็นฟันกรามที่มีขนาดใหญ่ที่สุด (รูปที่ 4) โดยบริเวณด้านใกล้กลาง (mesial) เป็นตำแหน่งที่เข้าทำงานได้สะดวกที่สุด และตรงกับส่วนกลางของโพรงฟัน หลีกเลียงผลรบกวนจากการสร้างเนื้อฟันซ่อมเสริมบริเวณยอดปุ่มฟัน (cusp) ที่มักสร้างตอบสนองต่อการสึกจากการบดเคี้ยว (Six, Lasfargues, และ Goldberg, 2000)



รูปที่ 4 ฟันกรามของหนูแรท (a) ด้านข้าง (b) ด้านบดเคี้ยว คัดลอกมาจากหนังสือ The rat in laboratory investigation (Schour และ Massler, 1949)

การศึกษาเกี่ยวกับการสร้างเนื้อฟันในระดับจุลพยาธิวิทยาของหนูแรท

การศึกษาเกี่ยวกับการสร้างเนื้อฟันในระดับจุลพยาธิวิทยาของหนูแรทได้กล่าวไว้โดย Heyeraas, Sveen และ Mjör (2001) กระบวนการที่เกิดขึ้นในระดับจุลพยาธิวิทยาเมื่อโพรงฟันทะลุ ได้แก่ การอักเสบ และการซ่อมแซม สำหรับการอักเสบ เป็นปฏิกิริยาของร่างกายต่อสิ่งแปลกปลอม เพื่อป้องกันการรุกรานของสิ่งแปลกปลอมต่าง ๆ ต่อเนื้อเยื่อ มีขั้นตอนคือ การขยายหลอดเลือด (vasodilation) ตามด้วยการปลดปล่อยสารเคมีและเซลล์เม็ดเลือดขาวเพื่อเข้าทำลายสิ่งแปลกปลอม หลังจากนั้นเป็นการกำจัดเศษเซลล์ตาย (necrotic debris) ในขณะเดียวกันจะพบการเคลื่อนย้ายเซลล์ต่าง ๆ มาในบริเวณที่ได้รับอันตราย ได้แก่ เซลล์สร้างเส้นใย และ เซลล์ที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลง เพื่อเตรียมพร้อมสำหรับการซ่อมแซม

เมื่อแบ่งประเภทของการอักเสบตามระยะเวลา การอักเสบแบ่งเป็น 2 ระยะ ได้แก่ การอักเสบเฉียบพลัน (acute inflammation) และการอักเสบเรื้อรัง (chronic inflammation) สำหรับการอักเสบเฉียบพลัน ภายใน 6 ชั่วโมงจะพบการขยายตัวของหลอดเลือด พบการรั่วซึมออกนอก

หลอดเลือดของสารเคมีและเม็ดเลือดขาว สารเคมี เช่น ฮิสตามีน (histamine) แบริคติน (bradykinin) ลิวโคไตรอิน (leukotriene) และสารสื่อไซโตไคน์ (cytokine mediators) สำหรับเซลล์เม็ดเลือดขาว โดยมากพบเม็ดเลือดขาวชนิดที่มีหลายนิวเคลียส (polymorphonuclear leukocytes; PMNs) เช่น นิวโทรฟิล (neutrophils) และพบเม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดียว (mononuclear leukocytes) จำนวนเล็กน้อย ได้แก่ โมโนไซต์ (monocytes) และมาโครฟาจ ด้วยเหตุนี้จึงเกิดความดันในโพรงฟัน และพบโพรงฟันบวม (pulpal edema) ซึ่งร่างกายจะมีปฏิกิริยาตอบกลับด้วยการระบายออกทางระบบน้ำเหลือง

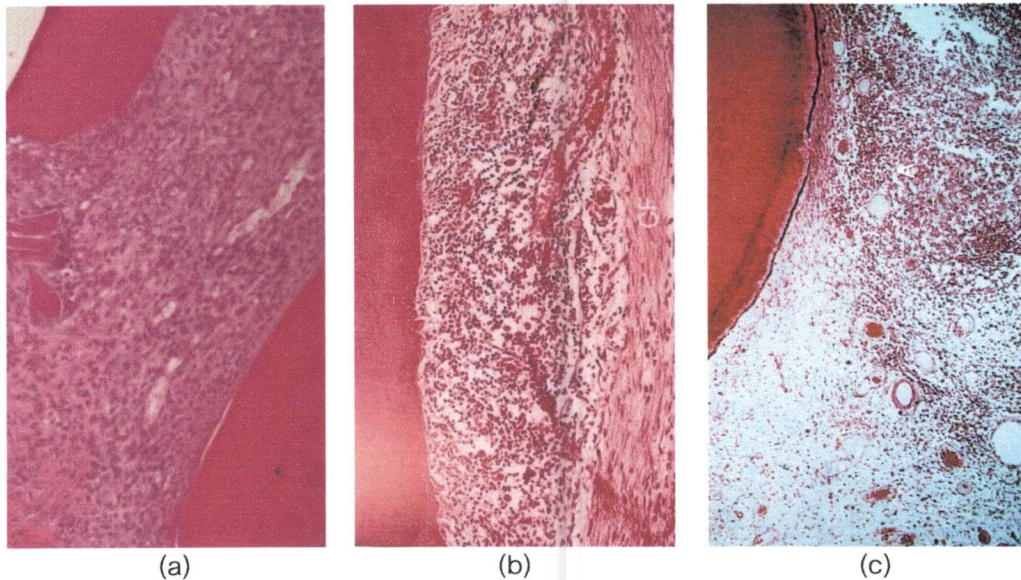
เม็ดเลือดขาวทำหน้าที่ จับ จดจำ กิน (engulf) แล้วทำให้สิ่งแปลกปลอมแตกสลาย (degradation) ผลที่ได้รับหลังเกิดการอักเสบเฉียบพลันมี 3 แบบ ได้แก่ 1) การทุเลาอักเสบ (resolution) 2) การเกิดถุงหนอง (abscess) และ 3) การดำเนินเป็นการอักเสบเรื้อรังเมื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมไม่หมด สำหรับการอักเสบเรื้อรังจะพบการแทรกเข้าของเม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดียว เช่น มาโครฟาจ ลิมโฟไซต์ และพลาสมาเซลล์ (plasma cells) หากกำจัดสิ่งแปลกปลอมได้หมด จะเกิดการทุเลาการอักเสบ แต่หากการอักเสบคงอยู่นานจะส่งผลให้มีการทำลายเนื้อเยื่อ (tissue destruction)

เมื่อแบ่งประเภทของการอักเสบตามระดับความรุนแรง อาจแบ่งได้เป็น ระดับอ่อน (slight) ระดับปานกลาง (moderate) และระดับรุนแรง (severe) (รูปที่ 5) สำหรับระดับอ่อน พบเซลล์อักเสบเพียงเล็กน้อย มีจำนวนหลอดเลือดเพิ่มขึ้น ลักษณะเหล่านี้พบเฉพาะที่ สำหรับระดับปานกลาง จะพบเซลล์อักเสบจำนวนมากขึ้นไม่ว่าชนิดเฉียบพลันหรือเรื้อรัง มีจำนวนหลอดเลือดเพิ่มขึ้น สำหรับระดับรุนแรง จะพบเซลล์อักเสบจำนวนมากอย่างชัดเจนไม่ว่าชนิดเฉียบพลันหรือเรื้อรัง รวมไปถึงการพบถุงหนอง ซึ่งพบได้เป็นบริเวณกว้างขวาง

สำหรับการซ่อมแซม พบเซลล์ที่มีรูปร่างคล้ายเซลล์สร้างเส้นใย และเซลล์ที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงเป็นจำนวนมากในโพรงฟัน ต่อมาเซลล์เหล่านี้จะเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นรูปร่างสี่เหลี่ยมผืนผ้า กลายเป็นเซลล์คล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟัน เหตุการณ์นี้เป็นเหตุการณ์ที่ทับซ้อน (overlap) กับการอักเสบ สามารถพบได้ตั้งแต่เริ่มมีการอักเสบ หากการอักเสบเฉียบพลันทุเลาลงและมีการซ่อมแซม จะพบการสร้างเส้นใยคอลลาเจนที่ 48 ชั่วโมงเป็นต้นไป

หลังจากนั้น (3-8 วัน) การสร้างเส้นใยคอลลาเจนจะชัดเจนขึ้น พบการตกตะกอนเกลือแร่และการซ่อมแซมด้วยเนื้อเยื่อคล้ายเนื้อฟันเพื่อปิดรอยทะลุเรียกว่า เดนตินบริดจ์ ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของเดนตินบริดจ์มี 4 ประเภทเมื่อแบ่งตามความสมบูรณ์ในการปกปิดรอยทะลุ

(Kitasako, Ikeda, and Tagami, 2006) ได้แก่ ปิดแบบสมบูรณ์ ปิดเกือบสมบูรณ์ ปิดบางส่วน และไม่ปิด



รูปที่ 5 ประเภทของการอักเสบเมื่อแบ่งตามระดับความรุนแรง (a) แบบอ่อน (b) แบบปานกลาง (c) แบบรุนแรง พบถุงหนองด้านบน [รูป (b) และ (c) คัดลอกมาจากหนังสือ Seltzer and Bender's Dental Pulp (Kenneth และ Harold, 2002)]

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

การสกัดสารอะซีแมนแนนและการพิสูจน์เอกลักษณ์

การสกัดอะซีแมนแนน

สำหรับขั้นตอนต่าง ๆ ในการสกัดสารอะซีแมนแนน ได้มีการอธิบายไว้ในการศึกษาที่ผ่านมาของคณะผู้วิจัย (Jittapiromsak และคณะ, 2007) กล่าวโดยย่อคือ นำใบว่านหางจระเข้สายพันธุ์ *Aloe barbadensis* Mill. ซึ่งผ่านการพิสูจน์แล้วจาก รศ.ดร.ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลือกใบที่โตเต็มที่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่โคนประมาณ 3 นิ้ว นำมาปอกเปลือก และนำเอาส่วนวุ้นใต้อ่างเพื่อกำจัดส่วนยางออก ต่อมานำส่วนวุ้นมาบดละเอียด (homogenization) และปั่นตกตะกอนแยกส่วนกากออกด้วยเครื่องตกตะกอนความเร็วสูง 5,000xg นำส่วนของเหลวใสที่ได้มาตกตะกอนด้วยเอธิลแอลกอฮอล์เข้มข้นสัมบูรณ์ (absolute ethyl alcohol) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกตะกอนสีขาวออกด้วยเครื่องตกตะกอนความเร็วสูง 9,500xg นำตะกอนสีขาวที่ได้มาทำให้แห้ง และบดละเอียด ผงที่บดได้จะมีสีขาว หลังจากนั้นเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

การพิสูจน์เอกลักษณ์

สำหรับการพิสูจน์เอกลักษณ์ ประกอบด้วยการวิเคราะห์ส่วนประกอบของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว การวิเคราะห์รูปแบบสเปกตรัมของคาร์บอนเทอร์ทียนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (^{13}C nuclear magnetic resonance; ^{13}C NMR) การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของพอลิแซ็กคาไรด์ และการวิเคราะห์สเปกตรัมของรังสีอินฟราเรด

องค์ประกอบของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์

ในการวิเคราะห์ส่วนประกอบของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวอาศัยเทคนิคกาซโครมาโตกราฟี-แมส สเปกโทรสโกปี (Gas Chromatography – Mass Spectroscopy; GC-MS) ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย วิธีการทดลองดัดแปลงจากที่อธิบายไว้โดย Blakeney และคณะ (1983) มีขั้นตอน

โดยย่อ คือ การนำผงพอลิแซ็กคาไรด์ (ประมาณ 5 มิลลิกรัม) ไฮโดรไลซ์ด้วยกรดไตรฟลูออโรอะซิติก (trifluoroacetic acid) เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นทำการระเหยให้แห้ง ส่วนที่เหลือจากการระเหยจะถูกรีดิวซ์ด้วยโซเดียมเตตราไฮโดรโบเรต (sodium tetrahydridoborate) เมื่อได้อัลดิทอล อะซีเตต (alditol acetate) จึงตัดหมู่อะเซทิล (deacetylated) และนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำตาลด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโทรสโกปี (Hewlett-Packard 5970 MSD instrument) โดยใช้คอลัมน์ดีบี-1 (DB-1, J&W Scientific) และเครื่องตรวจหาระบบเปลวไอออไนเซชัน (flame ionization detector)

สเปกตรัมของคาร์บอนเทอร์ทีนินิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์

สำหรับการวิเคราะห์สเปกตรัมของคาร์บอนเทอร์ทีนินิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ อาศัยเทคนิคคาร์บอนเทอร์ทีนินิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.พลกฤษณ์ แสงวงนิช ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย วิธีการทดลองดัดแปลงจาก Tai-Nin และคณะ (2005) มีขั้นตอนโดยย่อ คือ เตรียมพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีความเข้มข้น 3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในน้ำ ตัดหมู่อะเซทิลด้วยการทำปฏิกิริยากับโซเดียมไฮดรอกไซด์ เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นปรับความเป็นกรด-เบสเป็น 4.5 ด้วยกรดกลีเซอริก (glacial acetic acid) และไฮโดรไลซ์ด้วยสารละลายเอ็นโดหนึ่งสี่ปีตาดีแมนนาเนส (endo-(1->4)- β -D-mannanase) ในแอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต เป็นเวลานาน 1 วัน ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ต่อมาหยุดปฏิกิริยาด้วยความร้อน (100 องศาเซลเซียส) เป็นเวลานาน 5 นาที กรองผ่านตัวกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วทำให้แห้งด้วยการฟรีซดราย ต่อมาทำละลายด้วยน้ำ (3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ไฮโดรไลซ์ด้วยสารละลายอัลฟาดีกาแลคโตซิเดส (α -D-galactosidase) เป็นเวลานาน 1 วัน ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส หยุดปฏิกิริยาด้วยความร้อน (100 องศาเซลเซียส) เป็นเวลานาน 5 นาที กรองผ่านตัวกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วทำให้แห้งด้วยการฟรีซดราย และต่อมาทำละลายด้วยน้ำ (3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ไฮโดรไลซ์ด้วยสารละลายเอ็นโดหนึ่งสี่ปีตาดีกลูแคนเนส (endo-(1->4)- β -D-glucanase) เป็นเวลานาน 1 วัน ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส หยุดปฏิกิริยาด้วยความร้อน (100 องศาเซลเซียส) เป็นเวลานาน 5 นาที กรองผ่านตัวกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วทำให้แห้งด้วยการฟรีซดราย หลังจากนั้น ทำละลาย (1 มิลลิกรัม) และฟรีซดราย จำนวน 3 ครั้งด้วยดิวทีเรียมออกไซด์ (deuterium oxide; D_2O) (0.5 มิลลิลิตร) และระเหยให้แห้งด้วยฟอสฟอรัสเพนทอกไซด์ (phosphorus pentoxide; P_2O_5) ภายใต้สูญญากาศ ต่อมานำผงที่ได้ทั้งหมด มาละลายด้วยดิวทีเรียมออกไซด์ ที่มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 99.96 (0.7 มิลลิลิตร) แล้ว

นำไปวิเคราะห์สเปกตรัมด้วยเครื่องสเปกโตรมิเตอร์ (Spectrometer, Varian Mercury 400 Plus) ที่มีความถี่ในการทำงาน 400 เฮิร์ตซ์ สเปกตรัมที่ได้จะนำไปเปรียบเทียบกับสเปกตรัมของอะซีแมนแนนจากห้องปฏิบัติการคาริงตัน ที่รายงานไว้โดย Tai-Nin และคณะ (2005)

น้ำหนักโมเลกุลของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์

การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีเชิงตัดตอนขนาด (size exclusion chromatography; SEC) และเครื่องตรวจหาชนิดดัชนีหักเห (refractive index detector; RI) (Turner และคณะ, 2004) อาศัยเครื่องเอชพีแอลซี (HPLC; high performance liquid chromatography, Shimadzu, Japan) มีขั้นตอนโดยย่อ คือ เตรียมสารละลายของสารสกัดในน้ำบริสุทธิ์ที่มีความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร กรองด้วยตัวกรองแบบกระบอกชนิดชนิดเซลลูโลสอะซีเตต (cellulose acetate syringe filter, GE) ขนาด 0.45 ไมโครเมตร หลังจากนั้นฉีดเข้าคอลัมน์สำหรับแยกพอลิแซ็กคาไรด์ (Shodex sugar KS 804 column, Japan) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ น้ำบริสุทธิ์ ที่อัตราการไหล (flow rate) 0.6 มิลลิลิตร/นาที และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ในขณะเดียวกันใช้พอลิแซ็กคาไรด์มาตรฐาน พูลูลูแลน (pullulan standard no. p-400, standard P-82, Shodex, Japan) น้ำหนักโมเลกุล 400 กิโลดาลตัน และกลูโคสน้ำหนักโมเลกุล 180 ดาลตัน เป็นน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐาน

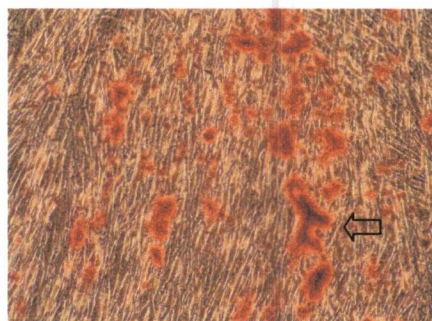
หมู่ทำหน้าที่ของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์

การวิเคราะห์หมู่ทำหน้าที่ใช้เทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (infrared spectroscopy; IR spectroscopy) อาศัยเครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ (Fourier transform infrared spectrometer; FTIR, PerkinElmer, Spectrum One, US) โดยกรรมวิธีในการเตรียมชิ้นงานและการควบคุมเครื่องมือวิเคราะห์ ทำโดยผู้เชี่ยวชาญของศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับการวิเคราะห์สเปกตรัมและหมู่ทำหน้าที่ของสาร ได้รับความอนุเคราะห์จาก อ.ดร.วันเพ็ญ เตชะบุญเกียรติ ภาควิชาวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มีขั้นตอนโดยย่อคือ นำผงสารสกัดประมาณ 1 มิลลิกรัม ผสมให้เข้ากันกับผงโปดัสเซียมโบรไมด์ประมาณ 10 มิลลิกรัม หลังจากนั้นอัดเป็นเม็ด (pellet) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 7 มิลลิเมตร และนำไปยิงด้วยรังสีอินฟราเรดในช่วงความยาวคลื่น 450-4000 เซ็นติเมตร⁻¹ สเปกตรัมที่ได้จะนำไปเปรียบเทียบกับสเปกตรัมของอะซีแมนแนนจากห้องปฏิบัติการคาริงตัน ที่รายงานไว้โดย McAnalley (1993)

การแยกและการเพาะเลี้ยงเซลล์จากเนื้อเยื่อโพรงฟัน

ในการศึกษาครั้งนี้จะใช้เซลล์โพรงฟัน เป็นเซลล์ต้นแบบในการศึกษาเนื่องจาก เป็นเซลล์ที่สามารถเปลี่ยนแปลงรูปร่างและหน้าที่ ไปเป็นเซลล์คล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟันได้ ในขั้นตอนนี้ได้รับการรับรองจากกรมการจริยธรรมจากคณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (เลขที่ 16/2007) โดยเซลล์โพรงฟันได้มาจากฟันกรามซี่ที่ 3 ของผู้ป่วยที่มีอายุระหว่าง 15-30 ปี ที่ได้รับการถอนหรือผ่าตัดเนื่องจากเป็นฟันคุด หรือฟันที่ไม่มีคู่สบ ที่มารับการรักษาที่คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ฟันที่เลือกต้องมีสุขภาพดี ไม่มีรอยผุ

ฟันที่ได้จะนำมาล้างด้วยน้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อ ทำการตอกฟันด้วยสิ่วและค้อน และนำเนื้อเยื่อโพรงฟันมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาด $1 \times 1 \times 1$ มิลลิเมตร³ วางเนื้อเยื่อในจานเพาะเลี้ยงที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 35 มิลลิเมตร (35 mm diameter tissue culture plate) จำนวนจานละ 3 ชิ้น ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อการเติบโต (growth medium) ชนิดดีเอ็มอีเอ็ม (DMEM; Dulbecco's modified eagle medium, Sigma-Aldric, US) ซึ่งประกอบด้วย ฟีตัลโบวายนีซีรัม (foetal bovine serum, Hyclone, US) ความเข้มข้นร้อยละ 10 แอล-กลูตามีน (L-glutamine, Hyclone, US) ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ เพนิซิลลิน จี (Penicillin G) ความเข้มข้น 100 ยูนิต/มิลลิลิตร และแอมโฟเทอริซิน บี (amphotericin B, Gibco, Invitrogen, US) ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เลี้ยงเนื้อเยื่อในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ (carbondioxide incubator) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เมื่อเซลล์เจริญออกจากเนื้อเยื่อและเจริญเติบโตจนเต็มจานเพาะเลี้ยงแล้ว นำเซลล์ไปหว่านอีกครั้งในจานเพาะเลี้ยงขนาด 60 มิลลิเมตร และนับเซลล์ที่หว่านนี้เป็นเซลล์รุ่นที่ 1 สำหรับเซลล์ที่ใช้ในการทดลองจะเป็นเซลล์รุ่นที่ 3-7 เซลล์ที่จะนำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ จะถูกพิสูจน์ความสามารถในการตกตะกอนเกลื้อแร่ ด้วยการย้อมสีอะลิซาริน เรด โดยพบว่าเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยงได้ มีความสามารถในการตกตะกอนเกลื้อแร่ แสดงผลดังรูปที่ 6



รูปที่ 6 เซลล์ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อโพรงฟันมีความสามารถในการตกตะกอนเกลื้อแร่ เมื่อย้อมด้วยสีอะลิซาริน เรด และสังเกตตะกอนเกลื้อแร่จากกล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกลับภายใต้เลนส์วัตถุที่มีกำลังขยาย 4 เท่า (ลูกศร แสดงก้อนตะกอนเกลื้อแร่ที่เป็นปุ่มเล็ก)

ในกรณีที่ต้องการศึกษาผลของสารอะซีแมนแนนต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ จะทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็ม ชนิดปราศจากฟีตัลโบวายนีซีรัม ในกรณีที่ต้องการศึกษาการทำงานของเซลล์ในการหลั่งโปรตีนโบนโมริโฟเจเนติก-2 การทำงานของเอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส และการตกตะกอนเกลื้อแร่ ซึ่งจัดว่าเป็นระยะเปลี่ยนสภาพของเซลล์ จะทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ส่งเสริมการตกตะกอนเกลื้อแร่ (mineralizing medium) ซึ่งประกอบด้วยดีเอ็มอีเอ็มชนิดที่มีฟีตัลโบวายนีซีรัมเข้มข้นร้อยละ 5 เบต้ากลีเซอโร-ฟอสเฟต (betaglycerophosphate) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเด็กซาเมทาโซน (dexamethasone) ความเข้มข้น 0.01 ไมโครโมลาร์ (Zhang และคณะ, 2007)

การเตรียมอะซีแมนแนนสำหรับทดสอบกับเซลล์

เตรียมสารละลายอะซีแมนแนนในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 0.5 1 2 4 และ 8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยทำละลายสารอะซีแมนแนนในน้ำให้มีความเข้มข้นเป็นสองเท่าของที่กำหนด (1 2 4 8 และ 16 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) แล้วผ่านกรรมวิธีไร้เชื้อด้วยการนึ่งไอน้ำภายใต้ความดัน (autoclave) หลังจากนั้น เติมนลงในอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อการเติบโต หรืออาหารเลี้ยงเซลล์ที่ส่งเสริมการตกตะกอนเกลื้อแร่ ที่มีความเข้มข้นสองเท่า ในปริมาตรที่เท่ากัน ก็จะได้สารละลายอะซีแมนแนนในอาหารเลี้ยงเซลล์ตามความเข้มข้นที่กำหนด

การวัดการเพิ่มจำนวนเซลล์ด้วยวิธีเอ็มทีที (MTT; dimethylthiazol diphenyltetrazolium bromide)

วิธีการตัดแปลงจาก Freshney (2005) กล่าวโดยย่อคือ หว่านเซลล์ 60,000 เซลล์/หลุม ลงในจานเพาะเลี้ยงแบบ 24 หลุม (24-well plate) จากนั้นบ่มเซลล์ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 2 วัน ต่อมาเติมสารละลายอะซีแมนแนนในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เอ็มเอ็มชนิดปราศจากฟีตัลโบวายนีซีรัม ที่มีความเข้มข้น 0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (กลุ่มควบคุม) และ 0.5 1 2 4 และ 8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร/หลุม บ่มเซลล์ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 1 วัน เมื่อครบเวลาที่กำหนด ดูดสารละลายอะซีแมนแนนในอาหารเลี้ยงเซลล์ออก เติมสารละลายเอ็มทีทีที่ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากฟีตัลโบวายนีซีรัม ที่มีความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 400 ไมโครลิตร/หลุม จากนั้นบ่มเซลล์ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 20 นาที เมื่อเกิดผลึกสีม่วง หรือผลึกฟอร์มาซาน (formazan crystal) ที่ก้นหลุม ดูดสารละลายเอ็มทีทีออก แล้วทำละลายผลึกฟอร์มาซานด้วย ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide) ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ได้เป็นสารละลายสีม่วง นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer, Ultrospec 3000) ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ความเข้มข้นของสีจะบ่งบอกถึงการเกิดเมแทบอลิซึมของเซลล์ ซึ่งสัมพันธ์กับการมีชีวิตของเซลล์ รายงานผลเป็นอัตราร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

การวัดระดับการหลั่งโปรตีนโบนโมรโฟเจเนติก-2 ด้วยวิธีอีไลซ่า (ELISA; Enzyme linked immunosorbent assay)

หว่านเซลล์ 80,000 เซลล์/หลุม ลงในจานเพาะเลี้ยงแบบ 24 หลุม จากนั้นบ่มเซลล์ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 2 วัน ต่อมาเติมสารละลายอะซีแมนแนนในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ส่งเสริมการตกตะกอนเกล็ดแร่ ที่มีความเข้มข้น 0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (กลุ่มควบคุม) และ 0.5 1 2 4 และ 8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 600 ไมโครลิตร บ่มเซลล์ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 3 9 และ 12 วัน ดูดเก็บตัวอย่างและเปลี่ยนสารละลายอะซีแมนแนนในอาหารเลี้ยงเซลล์ในปริมาณ 1/3 ของปริมาณทั้งหมดทุก 3 วัน หลังจากนั้น ตรวจหาระดับโปรตีนโบนโมรโฟเจเนติก-2 ด้วยชุดตรวจอีไลซ่า (Quantikine® BMP-2 Immunoassay, Cat. No. DBP200, R&D system, US) ที่มีระดับความไว (sensitivity) ต่อโปรตีนโบนโมรโฟเจเนติก-2 เป็น 4.3-29 พิโค-

กรัม/มิลลิลิตร ทำการทดลองตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต โดยอาศัยหลักการของอิมมูโนและการติสลาไกเอ็นไซม์ กล่าวคือ เติมตัวอย่างลงไปในกลุ่มของชุดตรวจ โปรตีนโบนมอร์โฟเจเนติก-2 ที่มีอยู่ในตัวอย่าง จะเข้าจับกับแอนติบอดีของโปรตีนโบนมอร์โฟเจเนติก-2 ที่เคลือบอยู่ที่ก้นหลุม ต่อมาล้างส่วนที่ไม่จับซึ่งกันและกันออก และเติมแอนติบอดีของโปรตีนโบนมอร์โฟเจเนติก-2 ที่ติดฉลากเอ็นไซม์ ต่อมาล้างส่วนที่ไม่จับซึ่งกันและกันออก หลังจากนั้นเติมซับสเตรต (substrate) หรือสารที่ทำปฏิกิริยากับเอ็นไซม์แล้วทำให้เกิดสี ความเข้มข้นของสีที่เกิดขึ้นจะแปรตามปริมาณโปรตีนโบนมอร์โฟเจเนติก-2 ที่มีอยู่ในตัวอย่าง ต่อมาหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมกรดซัลฟูริก (sulfuric acid) ค่าที่อ่านได้จะนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน และคำนวณเป็นความเข้มข้นของโปรตีนในหน่วยของพิโคกรัม/มิลลิลิตร หลังจากนั้นวิเคราะห์ระดับการหลังโปรตีนโบนมอร์โฟเจเนติก-2 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

การวัดอัตราการทำงานของเอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส

หว่านเซลล์ 80,000 เซลล์/หลุม ลงในจานเพาะเลี้ยงแบบ 24 หลุม จากนั้นบ่มเซลล์ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 2 วัน ต่อมาเติมสารละลายอะซีแมนแนนในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ส่งเสริมการตกตะกอนเกลือแร่ ที่ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (กลุ่มควบคุม) และ 0.5 1 2 4 และ 8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 600 ไมโครลิตร บ่มเซลล์ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 3 วัน เมื่อครบกำหนดเวลา วัดการทำงานของ เอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส โดยดัดแปลงจากวิธีของ Mutsui และคณะ (2007) กล่าวโดยย่อ คือ ล้างเซลล์ด้วยโปรโตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2 ครั้ง ต่อมาเติมสารพาราไนโตรเฟ-นิลฟอสเฟต (*p*-nitrophenylphosphate; Sigma, US) ที่มีความเข้มข้น 0.08 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่ละลายอยู่ในบัฟเฟอร์สำหรับย่อยเซลล์ (lysis extract buffer; 100 mM glycine, 2 mM magnesium chloride, 8 μ M *p*-nitrophenylphosphate) ที่มีความเป็นกรด-เบส 10.5 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในจานทดสอบ ทิ้งไว้ให้เซลล์ถูกย่อยและเกิดปฏิกิริยาเคมีเป็นเวลานาน 50 นาที หลักการในการเกิดปฏิกิริยา คือ เอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ที่ปลดปล่อยออกมาจากเซลล์ที่ถูกย่อย จะไฮโดรไลซ์สารพาราไนโตรเฟนิลฟอสเฟต ให้กลายเป็นสารพาราไนโตรเฟนิล (*p*-nitrophenol) ซึ่งมีสีเหลือง เมื่อครบกำหนดเวลา หยุดปฏิกิริยาเคมีด้วยการเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร หลังจากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร หลังจากนั้นคำนวณเป็นความเข้มข้นของสารพาราไนโตรเฟนิล ด้วยการเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานระหว่างค่าความเข้มข้นของสารพาราไนโตรเฟนิลและค่าการดูดกลืนแสง ในขณะเดียวกันปริมาณโปรตีนรวมที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากเซลล์ที่ถูกย่อยจะถูกวัดด้วยวิธีที่

ดัดแปลงจาก Lowry และคณะ (1951) อาศัยชุดวัดโปรตีน (DC protein assay, Bio-Rad, US) ผลการทดลองจะแสดงเป็นอัตราการทำหน้าที่ของเอ็นไซม์ ต่อหนึ่งหน่วยโปรตีนรวม ใน 1 นาที เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

การศึกษาการตกตะกอนเกลือแร่

ปัจจุบันมีวิธีทั่วไป ที่ง่ายและรวดเร็วเพื่อสังเกตการตกตะกอนเกลือแร่ คือ เทคนิคย้อมด้วย สีอะลิซาริน เรด (Wang และคณะ, 2006) ซึ่งใช้หลักการของการจับกันระหว่างไอออนแคลเซียมใน ตะกอนเกลือแร่และสีอะลิซาริน เรด ซึ่งเป็นสารกลุ่มแอนทราควิโนน (anthraquinone) มีขั้นตอน คือ หวานเซลล์ 80,000 เซลล์/หลุม ลงในงานเพาะเลี้ยงแบบ 24 หลุม จากนั้นบ่มเซลล์ในตู้บ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 2 วัน ต่อมาเติม สารละลายอะซีแมนแนนในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ส่งเสริมการตกตะกอนเกลือแร่ ที่ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (กลุ่มควบคุมลบ) และ 0.5 1 2 4 และ 8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และโบนมอร์โฟ- เจเนติก-2 สังเคราะห์ของมนุษย์ (recombinant human bone morphogenetic protein-2; rhBMP-2) ที่มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัม/มิลลิลิตร (กลุ่มควบคุมบวก) บ่มเซลล์ในตู้บ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 15 วัน เมื่อครบกำหนดเวลา ล้างเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์โพสเฟต (potassium phosphate buffer) จำนวน 2 ครั้ง ตรึง เซลล์ด้วยเอธานอลเข้มข้นร้อยละ 70 เป็นเวลานาน 15 นาที ล้างออก และทิ้งให้แห้ง ย้อมด้วย สีอะลิซาริน เรด (Wako, Japan) เข้มข้นร้อยละ 2 ทิ้งไว้เป็นเวลานาน 15 นาที เมื่อครบ กำหนดเวลา ล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น และทิ้งให้แห้ง เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า บริเวณที่มีการ ตกตะกอนเกลือแร่จะมีสีแดง เมื่อสังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกลับ จะเห็นรายละเอียดและ ความเข้มข้นของสีของก้อนปุ่มเล็ก รายงานผลเป็นความเข้มและความหนาแน่นของการ ตกตะกอนเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกลับ เปรียบเทียบกับกลุ่ม ควบคุมลบและกลุ่มควบคุมบวก หลังจากนั้นทำละลายสีด้วยเซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์ (cetylpyridiniumchloride, Wako, Japan) แล้วอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ค่าที่ได้ จะเปลี่ยนเป็นเป็นความเข้มของสีอะลิซาริน เรด เมื่อคำนวณจากกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการ ดูดกลืนแสงและความเข้มของอะลิซาริน เรดมาตรฐาน หลังจากนั้นนำค่ามาเปรียบเทียบกับ กลุ่มควบคุมลบและกลุ่มควบคุมบวก

การเตรียมอะซีแมนแนนสำหรับทดสอบกับโพรงฟันของหนูแรท

เตรียมสารละลายอะซีแมนแนนในน้ำ (เลือกใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์และการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ และเป็นความเข้มข้นที่สามารถขึ้นรูปได้) แล้วผ่านกรรมวิธีไว้เพื่อด้วยการอบด้วยความร้อนภายใต้ความดัน หลังจากนั้นนำไปขึ้นรูปด้วยการพรีซดราย

การศึกษาลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของการหายภายในโพรงฟันของหนูแรท

ในขั้นตอนนี้ได้รับการรับรองจากกรมการจริยธรรมจากคณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (เลขที่ 302/2007) ในการทดลองใช้หนูแรทพันธุ์สปราก เดอร์เลย์ (Sprague-Dawley) เพศผู้ อายุ 7-8 สัปดาห์ น้ำหนักเฉลี่ย 350 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล จำนวน 24 ตัว

หนูทุกตัวจะถูกทำให้โพรงฟันทะลุและปิดโพรงฟันด้วยวัสดุกลุ่มต่าง ๆ โดยดัดแปลงวิธีการทดลองจาก Six และคณะ (Six, Lasfargues, และ Goldberg, 2000) เริ่มด้วยการทำให้หนูสลบและผ่อนคลายด้วยการฉีดยาสลบโซเลทิล (Zoletil) ซึ่งภายในประกอบด้วยตัวยาคลอโรลไฮเดรทไคเลตามีน (chloral hydrate tiletamine) และคลอโรลไฮเดรทโซลาซีแปม (chloral hydrate zolazepam) เข้าช่องท้อง ในขนาด 80 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว (D'Arcangelo และคณะ, 2007) เมื่อหนูสลบแล้ว จะทำการทดลองโดยวางหนูลงบนถาดสเตนเลส ที่มีการทำความสะอาดฆ่าเชื้อทั้งก่อนและหลังทำการทดลองด้วยแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 70 ทำการฉีดยาชาสำหรับทางทันตกรรมสแกนโดเนส 2% สเปนเซียล (Scandonest® 2% Special) ที่มีส่วนผสมของตัวยาเมพิวาเคน ไฮโดรคลอไรด์ (mepivacaine hydrochloride) ตรงบริเวณเหงือกและฟันที่จะทำการทดลอง เพื่อป้องกันความเจ็บปวดที่อาจเกิดขึ้นในระหว่างการทดลอง ต่อมาตัดเหงือกด้านใกล้กลาง (mesial) ของฟันกรามบนซี่ที่ 1 ด้วยเครื่องตัดเหงือกไฟฟ้า (Satelec, US) เพื่อให้ตำแหน่งที่ถูกกรออยู่ในระดับเดียวกับส่วนกลางของโพรงฟัน

ในการกรอฟันจะเลือกใช้ฟันกรามบนซี่ที่ 1 ของหนูจำนวน 48 ซี่ หลักเกณฑ์การเลือกระยะเวลาในการศึกษาเกี่ยวกับการสร้างเนื้อฟันซ่อมแซมในครั้งนี้ อ้างอิงตามข้อมูลจากการศึกษาของ Six, Lasfargues, และ Goldberg (2000) ซึ่งพบว่า เนื้อเยื่อโพรงฟันกลับมาจะมีสภาวะปกติและมีการสร้างเนื้อฟันปกปิดรอยทะลุในวันที่ 30 ดังนั้นการศึกษการสร้างเนื้อฟันปกปิดรอยทะลุในครั้งนี้จึงกำหนดไว้ที่ 7 และ 28 วัน ใช้หนู 4 ตัว ต่อหนึ่งจุดเวลา โดยแบ่งฟันออกเป็น 3 กลุ่ม ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ชนิดของวัสดุปิดโพรงฟัน ระยะเวลาทดลอง และจำนวนซี่ฟันที่ใช้ในการศึกษา

กลุ่มที่	วัสดุปิดโพรงฟันและวัสดุบูรณะ	ระยะเวลาที่ทำการทดลอง	จำนวนหนู	จำนวนซี่
1	ไดแคลและฟลูออไรด์	7 วัน	4	8
		28 วัน	4	8
2	อะซีแมนแนนและฟลูออไรด์	7 วัน	4	8
		28 วัน	4	8
3	ฟลูออไรด์ (กลุ่มหลอก)	7 วัน	4	8
		28 วัน	4	8

ทำการกรอฟันภายใต้แว่นขยายสำหรับผ่าตัด (surgical loupes, Surgitel) กำลังขยาย 5.5 เท่า ด้วยหัวกรอเพชร ขนาด 0.67 มิลลิเมตร ด้วยความเร็ว 5,000 รอบ/นาที พร้อมฉีดน้ำเกลือปราศจากเชื้อตลอดเวลาเพื่อระบายความร้อนที่อาจเกิดขึ้นในขณะกรอฟัน จนกระทั่งเกือบทะลุโพรงฟัน หรือลึกประมาณ 3 ใน 4 ของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของหัวกรอ หลังจากนั้นทำโพรงฟันให้ทะลุด้วยเครื่องมือปลายแหลม ห้ามเลือดโดยใช้สำลีปราศจากเชื้อ โดยกดบริเวณที่ทะลุเป็นเวลานานประมาณ 30 วินาที ฉีดล้างโพรงฟันด้วยน้ำเกลือปราศจากเชื้อ ซับให้แห้งด้วยสำลีปราศจากเชื้อ ต่อมาทำการปิดโพรงฟันด้วยวัสดุต่าง ๆ ตามที่กล่าวไว้ข้างต้น หลังจากนั้น อุดฟันด้วยฟลูออไรด์ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต ในการทดลองครั้งนี้ กำหนดให้กลุ่มที่อุดด้วยฟลูออไรด์เพียงอย่างเดียวเป็นกลุ่มหลอก (sham group)

ประเมินผลที่ 7 และ 28 วัน โดยทำการการุญฆาตด้วยการฉีดยาสลบเพนโตบาร์บิทอลโซเดียม (pentobarbital sodium) เกินขนาด (overdose) ทำการตัดศีรษะและแยกซากกรูโรบนแซในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอร์มาลิน (formalin buffer) ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 10 เป็นเวลานาน 3 วัน เพื่อคงสภาพเนื้อเยื่อ ทำการกำจัดเกลือแร่ (demineralization) ภายในเนื้อเยื่อด้วยสารละลายกรดไนตริกเข้มข้นร้อยละ 4 โดยเปลี่ยนสารละลายทุกวัน เป็นเวลานาน 5 วัน เมื่อครบเวลาที่กำหนด ล้างกรดออกจากเนื้อเยื่อด้วยการแช่ชิ้นเนื้อในน้ำกลั่นเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง กำจัดน้ำจากเนื้อเยื่อด้วย เอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) ไกลีน (xylene) และอะซีโตน ตามลำดับ ผึ่งเนื้อเยื่อลงในพาราฟิน (paraffin) หลังจากนั้น ตัดในแนวระนาบแบ่งซ้ายขวา (sagittal plane) เป็นแผ่นหนา 7 ไมโครเมตร โดยแผ่นที่ตัดผ่านรอยทะลุของฟัน มีจำนวน 7 แผ่นต่อฟัน 1 ซี่ หลังจากนั้น สุ่มเลือกแผ่นที่ 3 และ 4 เพื่อย้อมสีฮีมาทอกซีลินและอีโอซิน (hematoxylin & eosin; H&E) และมาสซงส์ ไตรโครม (masson's trichrome) ตามลำดับ เพื่อสังเกตลักษณะการตอบสนองของการ

อักเสบ (inflammatory response) การสร้างเดนทินบริดจ์ และการจัดเรียงตัวของเนื้อเยื่ออ่อน (soft tissue organization)

เมื่อโพรงฟันได้รับอันตราย หรือสัมผัสกับสิ่งแปลกปลอม ทำให้มีการตอบสนองของเซลล์และเนื้อเยื่อ ได้แก่ เซลล์สูญเสียการจัดเรียงตัว เซลล์ตาย หรือหลอดเลือดขาด ร่างกายจะมีการตอบสนองเพื่อให้เนื้อเยื่อกลับสู่สภาพปกติ โดยเหนี่ยวนำให้เซลล์ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับกระบวนการอักเสบ ได้แก่ มาโครฟาจ หรือนิวโทรฟิล เข้ามาเพื่อทำให้เกิดการหาย และมีการจัดเรียงตัวของเนื้อเยื่อกลับสู่สภาพปกติ (reversible pulpitis) อย่างไรก็ตาม หากมีการตอบสนองจากเซลล์อักเสบอย่างรุนแรง อาจทำให้จำนวนเซลล์ในโพรงฟันลดลง ซึ่งนำไปสู่การตายของโพรงฟันได้ (irreversible pulpitis) (Bergenholtz, 1990; Bergenholtz, 1991) จากนั้นทำการอ่านผลทางจุลพยาธิวิทยา โดยมีเกณฑ์การให้คะแนนดังนี้

การประเมินผลของการอักเสบ (ดัดแปลงจาก Tarim, Hafez, และ Cox, 1998)

- 1 ไม่มี หรือมีการกระจายของเซลล์อักเสบเพียงเล็กน้อย (น้อยกว่า 10 เซลล์) ในบริเวณใต้ต่อรอยทะลุ หรือบริเวณเดนทินบริดจ์
- 2(a) มีการอักเสบแบบเฉียบพลันอย่างอ่อน สังเกตจากการแทรกเข้าของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดหลายนิวเคลียส (10-50 เซลล์) ในบริเวณใต้ต่อรอยทะลุ หรือบริเวณเดนทินบริดจ์
- 2(c) มีการอักเสบแบบเรื้อรังอย่างอ่อน สังเกตเห็นการแทรกเข้าของเซลล์เม็ดเลือดขาว ชนิดนิวเคลียสเดี่ยว (10-50 เซลล์) ในบริเวณใต้ต่อรอยทะลุ หรือบริเวณเดนทินบริดจ์
- 3 มีการอักเสบปานกลาง มีการแทรกเข้าของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดหลายนิวเคลียสหรือนิวเคลียสเดี่ยว (มากกว่า 50 เซลล์) ในบริเวณใต้ต่อรอยทะลุ หรือบริเวณเดนทินบริดจ์
- 4 มีการอักเสบปรากฏเป็นถุงหนองขนาดเล็ก การแทรกเข้าของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดหลายนิวเคลียสหรือนิวเคลียสเดี่ยว อย่างหนาแน่นในบริเวณใต้ต่อรอยทะลุ หรือบริเวณเดนทินบริดจ์
- 5 มีการอักเสบปรากฏเป็นถุงหนองขนาดใหญ่ การแทรกเข้าของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดหลายนิวเคลียสหรือนิวเคลียสเดี่ยว อย่างหนาแน่น ครอบคลุมเป็นพื้นที่มากกว่าบริเวณรอยทะลุ

หมายเหตุ : สำหรับการนับจำนวนเซลล์อีกเสบ ใช้การนับเซลล์ภายใต้เลนส์วัตถุที่มีกำลังขยาย 40 เท่า (40x objective lens) ต่อ 1 ลานกำลังขยายสูง (high power field; HPF)

การสร้างเดนทินบริดจ์ (ดัดแปลงจาก Kitasako, Ikeda, และ Tagami, 2006)

- 1 ปิครอยทะเลสมบูรณ์
- 2 ปิครอยทะเลเกือบสมบูรณ์
- 3 ปิครอยทะเลบางส่วน
- 4 ไม่ปิครอยทะเล

การจัดเรียงตัวของเนื้อเยื่ออ่อน (ดัดแปลงจาก Tarim, Hafez, และ Cox, 1998)

- 1 การจัดเรียงตัวของเนื้อเยื่ออ่อนยังเป็นปกติหรือเกือบปกติ เซลล์และเนื้อเยื่อที่อยู่ใต้ต่อวัสดุ และ/หรือใต้เดนทินบริดจ์มีลักษณะปกติ หรือเกือบปกติ พบเซลล์คล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟันที่สร้างใหม่จำนวนมาก พบเส้นใยคอลลาเจนที่สร้างใหม่เรียงตัวเป็นปกติ เซลล์และเนื้อเยื่อโพรงฟันในส่วนลึกมีลักษณะจัดเรียงตัวเป็นปกติ
- 2 การจัดเรียงตัวของเนื้อเยื่ออ่อนยังไม่เป็นปกติ ใต้ต่อวัสดุและ/หรือใต้เดนทินบริดจ์ พบเซลล์คล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟันที่สร้างใหม่จำนวนเล็กน้อย พบเส้นใยคอลลาเจนที่เพิ่งสร้างใหม่ที่เรียงตัวไม่เป็นปกติ เซลล์และเนื้อเยื่อโพรงฟันในส่วนลึกอยู่ยังคงมีลักษณะจัดเรียงตัวเป็นปกติ
- 3 สูญเสียการจัดเรียงตัวของเนื้อเยื่ออ่อน พบการสูญเสียลักษณะโดยทั่วไปของการจัดเรียงตัวของเซลล์และเนื้อเยื่อภายในโพรงฟัน พบเส้นใยคอลลาเจนจำนวนเล็กน้อย พบบริเวณช่องว่างที่ปราศจากเซลล์และเนื้อเยื่อ

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. ในขั้นตอนการวิเคราะห์ข้อมูลของร้อยละของจำนวนเซลล์ ระดับการหลังโปรตีนโบนมอร์โฟเจเนติก-2 ร้อยละของอัตราการทำงานของเอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส และ การตกตะกอนเกลือแร่ในเซลล์โพรงฟัน ซึ่งเป็นข้อมูลในระดับสเกลอัตราส่วน (ratio scale) ใช้การวิเคราะห์แบบใช้พารามตริก (parametric) คือ การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way analysis of variance: One-way ANOVA) ด้วยการทดสอบแบบเอฟ (F test) และเปรียบเทียบ

เชิงซ้อน (multiple comparisons) ด้วยวิธีเชฟเฟ (Scheffe) หรือดันทเน็ตต์ ทีทีรี (Dunnett T3) โดยในเบื้องต้นต้องมีการทดสอบเงื่อนไขเกี่ยวกับการแจกแจง และความแปรปรวนของข้อมูล ด้วยการทดสอบแบบโคโมโกรอฟ สไมร์นอฟ (Komogorov-Smirnov) และลิวีน (Levene) ตามลำดับ อาศัยโปรแกรมทางสถิติเอสพีเอสเอส (Statistical Package for the Social Science: SPSS) รุ่น 11.5

2. ในขั้นตอนการวิเคราะห์ข้อมูลของการให้คะแนนการปิดโพรงฟันในฟันกรามของหนู แรท ได้แก่ การอักเสบ การสร้างเดนทินบริดจ์ และการตกตะกอนเกลือแร่ ซึ่งเป็นข้อมูลสเกลอันดับ (ordinal scale) ใช้การวิเคราะห์ข้อมูลแบบไม่ใช้พารามิเตอร์ (non-parametric) คือ ครัสคัล วาลิส เอช (Kruskal-Wallis H) และเปรียบเทียบเชิงซ้อนด้วยวิธีบอนเฟอรรอนนี (Bonferroni) ที่มีการปรับค่าระดับนัยสำคัญ (α adjustment) (Theodorsson-Norheim, 1986) อาศัยโปรแกรมทางสถิติเอสพีเอสเอส รุ่น 11.5

ดูรายละเอียดของการทดสอบสมมติฐานเพื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติได้ในภาคผนวก ข

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ส่วนที่ 1 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารสกัดอะซีแมนแนน

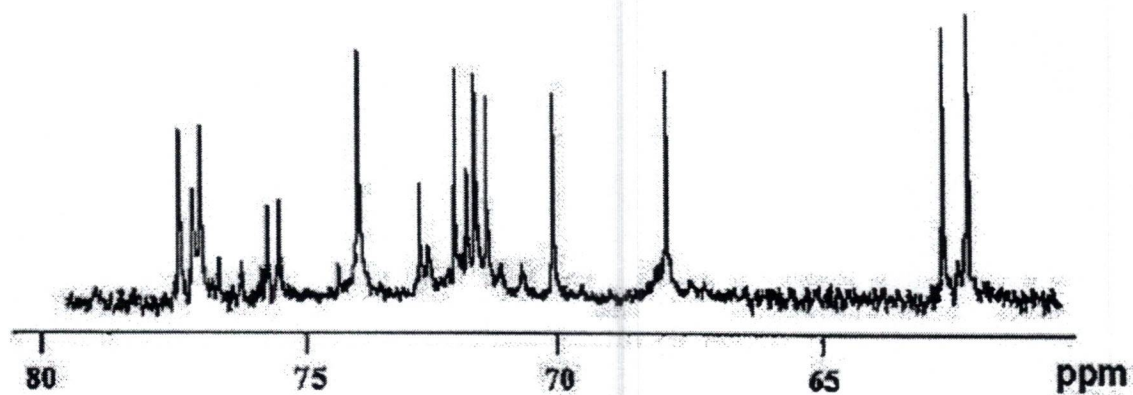
สำหรับการพิสูจน์เอกลักษณ์ ประกอบด้วยการวิเคราะห์ส่วนประกอบของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว การวิเคราะห์รูปแบบสเปกตรัมของคาร์บอนเทอร์ทีนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของพอลิแซ็กคาไรด์ และการวิเคราะห์สเปกตรัมของรังสีอินฟราเรด

การวิเคราะห์ส่วนประกอบของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและการวิเคราะห์รูปแบบสเปกตรัมอาศัยเทคนิคกาซโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโทรสโกปี พบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นหลักของสารสกัดจากคณะผู้วิจัย คือ น้ำตาลแมนโนส กลูโคส และกาแลกโตส (ตารางที่ 3) สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคคาร์บอนเทอร์ทีนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ พบสเปกตรัมของคาร์บอนเทอร์ทีนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ของสารสกัดจากคณะผู้วิจัยแสดงดังรูปที่ 7 ส่วนการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโคร- มาโทกราฟีเชิงตัดตอนขนาด พบน้ำหนักโมเลกุลมีขนาดมากกว่า 400 กิโลดาลตัน (รูปที่ 8) และในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี พบหมู่ทำหน้าที่ของสารสกัดแสดงดังตารางที่ 4 และรูปที่ 9

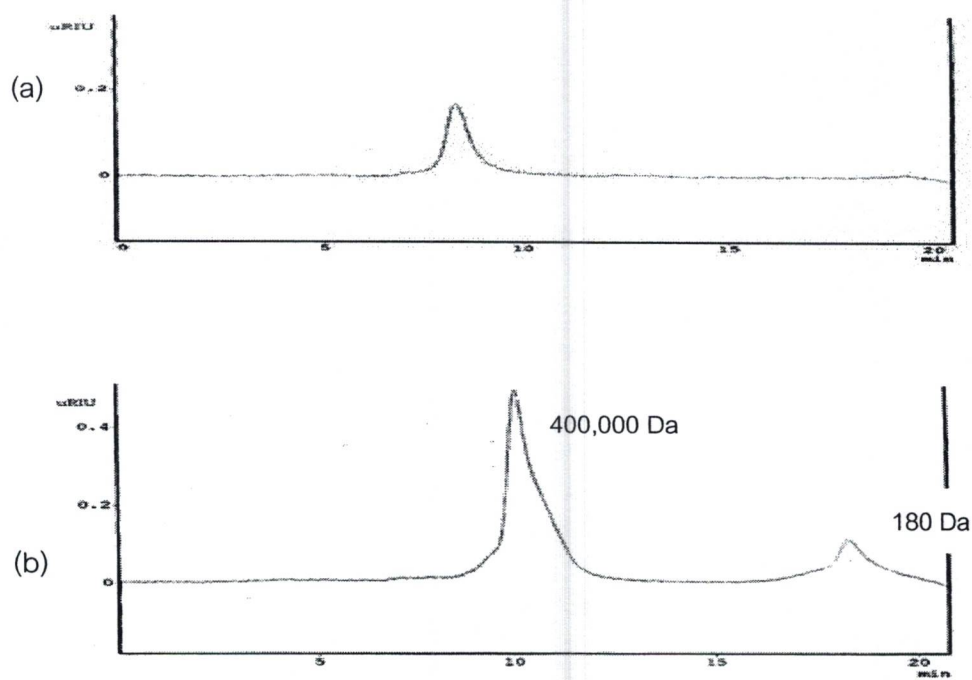
ตารางที่ 3 องค์ประกอบ (ร้อยละโดยโมล) ของแฟรกชันที่ละลายน้ำได้ของสารสกัด หลังจากผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วยกรดไตรฟลูออโรอะซิติก จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคกาซโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโทรสโกปี

ชนิดของน้ำตาล	อะราบินอส (Arabinose)	รัมโนส (Rhamnose)	ฟรุกโตส (Fructose)	ไซโลส (Xylose)	แมนโนส (Mannose)	กลูโคส (Glucose)	กาแลกโตส (Galactose)	กรดกาแล- ตูโรนิก (Galacturonic acid)	กรดกลูคูโร- นิก (Glucuronic acid)
	0.7	0.2	0.34	0.7	77.16	15.3	4.9	0.7	ND ¹

¹ ND หมายถึง ไม่สามารถตรวจพบ



รูปที่ 7 สเปกตรัมของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของสารสกัด จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคคาร์บอนเทอร์ทีนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี



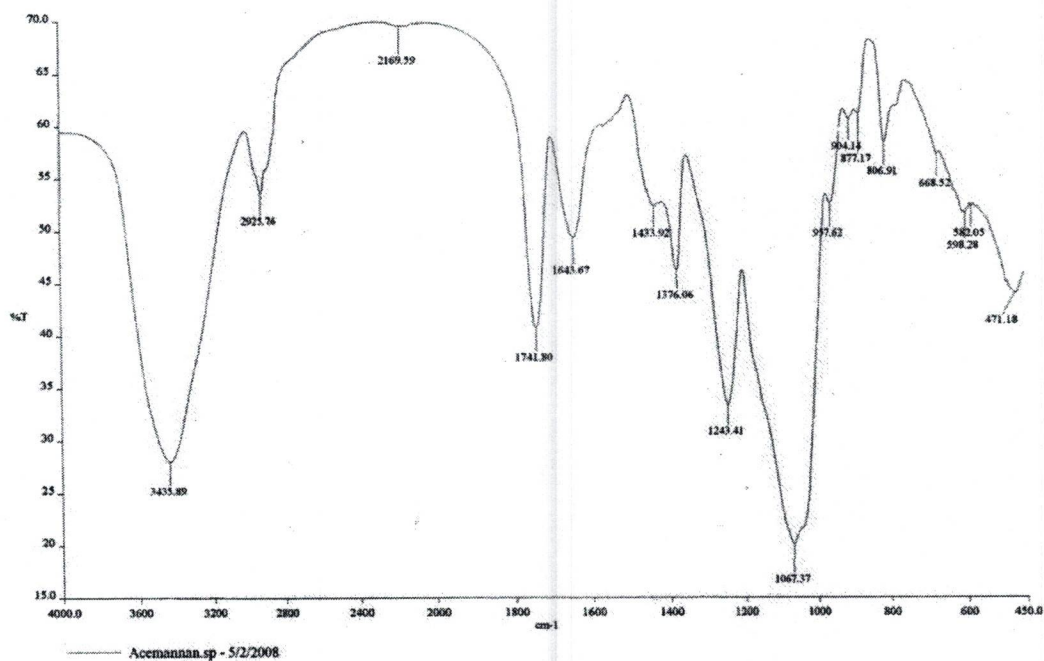
รูปที่ 8 น้ำหนักโมเลกุลของพอลิแซ็กคาไรด์ที่วิเคราะห์จากเทคนิคโครมาโทกราฟีเชิงตัดตอนขนาด (a) พอลิแซ็กคาไรด์ที่คณะผู้วิจัยสกัด (b) น้ำหนักโมเลกุลของพอลิแซ็กคาไรด์มาตรฐาน

ตารางที่ 4 การวิเคราะห์สเปกตรัมของรังสีอินฟราเรดของหมู่ทำหน้าที (functional group) ในสารสกัดของคณะผู้วิจัย

หมู่ทำหน้าที	เลขที่คลื่น (ซ.ม. ⁻¹)
O-H stretch	3435.89
C-H stretch (CH ₂ asymmetric)	2925.76
C=O stretch (acetyl)	1741.81
C=O stretch (amide I)	1643.67
N-H deformation (amide II)	1433.92
C-H bending	1376.06
C-O-C stretch (acetyl)	1243.41
C-O stretch (pyranose ring)	1067.37

Scientific and Technological Research Equipment Centre
Chulalongkorn University

Fourier Transform Infrared Spectrometer, PerkinElmer (Spectrum One)

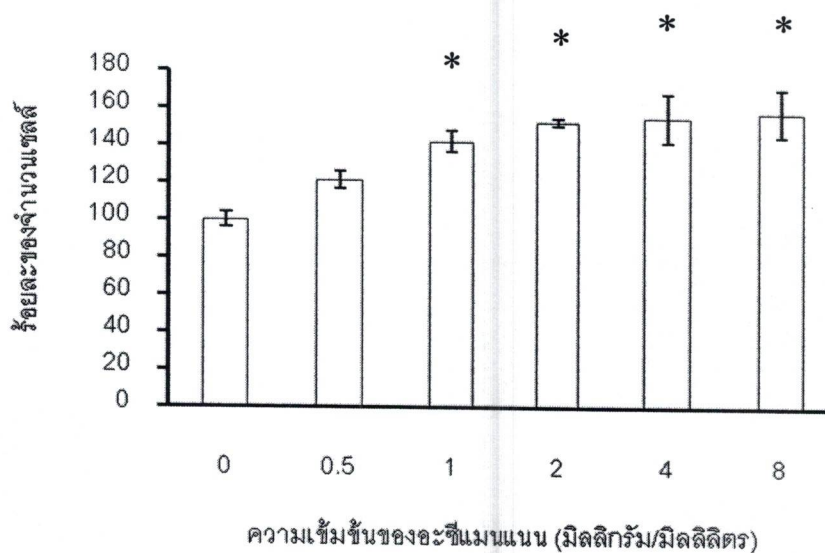


รูปที่ 9 สเปกตรัมของหมู่ทำหน้าทีของสารสกัดของคณะผู้วิจัย จากการศึกษาด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี

ส่วนที่ 2 ผลการทดสอบอะซีแมนแนนกับเซลล์โพรงฟันในระดับห้องปฏิบัติการ

อะซีแมนแนนกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์โพรงฟัน

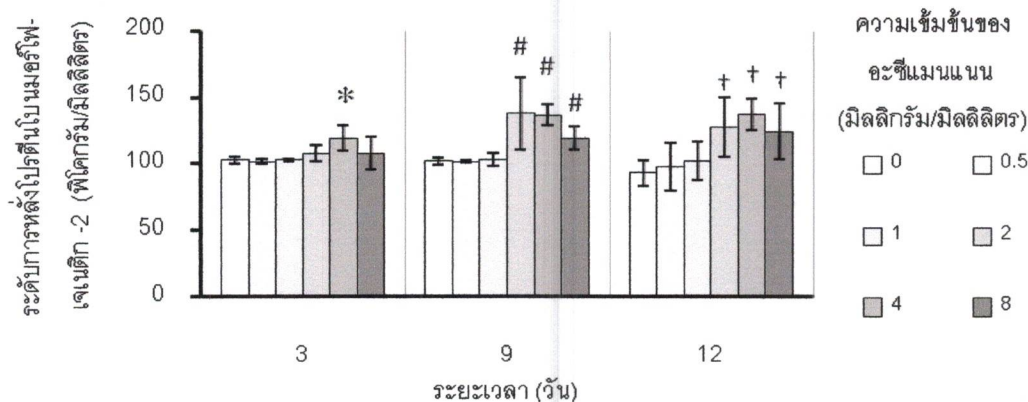
เมื่อทดสอบด้วยวิธีเอ็มทีที เซลล์โพรงฟันมีการตอบสนองต่ออะซีแมนแนน ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 0.5 1 2 4 และ 8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 10 พบการเพิ่มร้อยละของจำนวนเซลล์ในกลุ่มทดลองที่มีระดับความเข้มข้นของอะซีแมนแนน 1 2 4 และ 8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ร้อยละ 42 52 55 และ 58 ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของร้อยละของจำนวนเซลล์ อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p > 0.05$)



รูปที่ 10 ผลของสารอะซีแมนแนนต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์โพรงฟันเมื่อใช้วิธีเอ็มทีที ทำการทดลองเซลล์กับอะซีแมนแนนที่ความเข้มข้น 0.5 1 2 4 และ 8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ข้อมูลดิบแสดงในภาคผนวก ก ตารางที่ 3 ก (* หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวและทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วยวิธีเชฟเฟ (n=3))

อะซีแมนแนนเพิ่มระดับการหลังโปรตีนโบนมอร์โฟเจเนติก-2 ในเซลล์โพรงฟัน

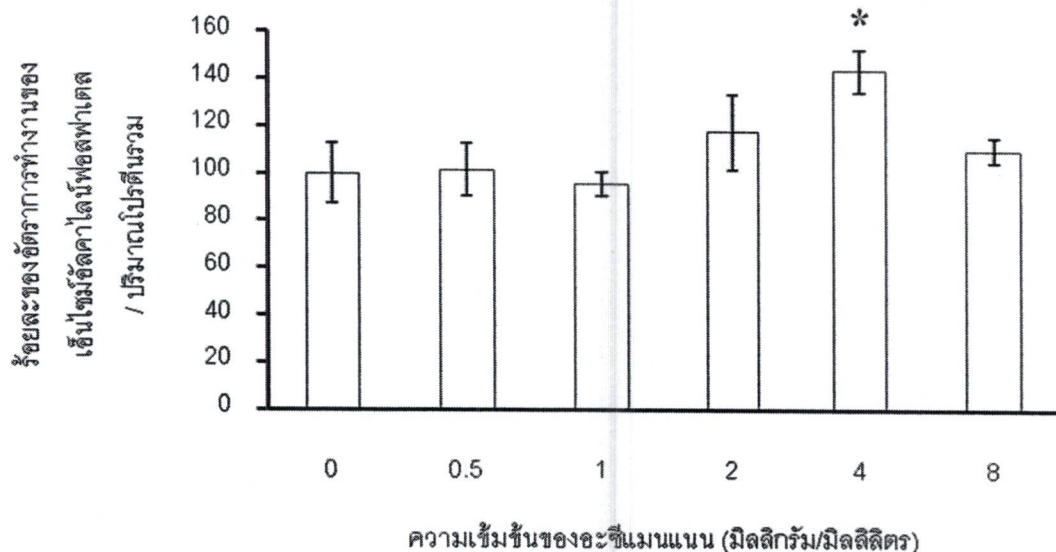
เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคอีไลซา เซลล์โพรงฟันมีการตอบสนองต่ออะซีแมนแนน ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 0.5 1 2 4 และ 8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่เวลา 3 9 และ 12 วัน ดังแสดงในรูปที่ 11 ที่ระยะเวลา 3 วัน พบการเพิ่มระดับการหลังโปรตีนโบนมอร์โฟเจเนติก-2 ในกลุ่มทดลองที่มีระดับความเข้มข้นของอะซีแมนแนน 2 4 และ 8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (108 119 และ 108 พิโคกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ) ที่ระยะเวลา 9 วัน พบการเพิ่มระดับการหลังโปรตีนโบนมอร์โฟเจเนติก-2 ในกลุ่มทดลองที่มีระดับความเข้มข้นของอะซีแมนแนน 2 4 และ 8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (138 137 และ 119 พิโคกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ) และที่ระยะเวลา 12 วัน พบการเพิ่มระดับการหลังโปรตีนโบนมอร์โฟเจเนติก-2 ในกลุ่มทดลองที่มีระดับความเข้มข้นของอะซีแมนแนน 2 4 และ 8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (128 137 และ 124 พิโคกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (103 102 และ 93 พิโคกรัม/มิลลิลิตร ที่ 3 9 และ 12 วันตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (3 9 และ 12 วัน) ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของระดับการหลังโปรตีนโบนมอร์โฟเจเนติก-2 อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p > 0.05$)



รูปที่ 11 ผลของสารอะซีแมนแนนต่อการเพิ่มระดับการหลังโปรตีนโบนมอร์โฟเจเนติก-2 จากเซลล์โพรงฟันเมื่อใช้วิธี อีไลซา ทำการทดลองเซลล์กับอะซีแมนแนน ที่ความเข้มข้น 0.5 1 2 4 และ 8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 9 และ 12 วัน ผลการทดลองแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ข้อมูลดิบแสดงในภาคผนวก ก ตารางที่ 4 ก (* # และ + หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่อยู่ในจุดเวลาเดียวกัน โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวและทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วยวิธีเชฟเฟ (3 และ 12 วัน) และดันเนตต์ ทีทรี (9 วัน) ($n=4$)

อะซีแมนแนนเพิ่มอัตราการทำงานของเอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในเซลล์ โพรงฟัน

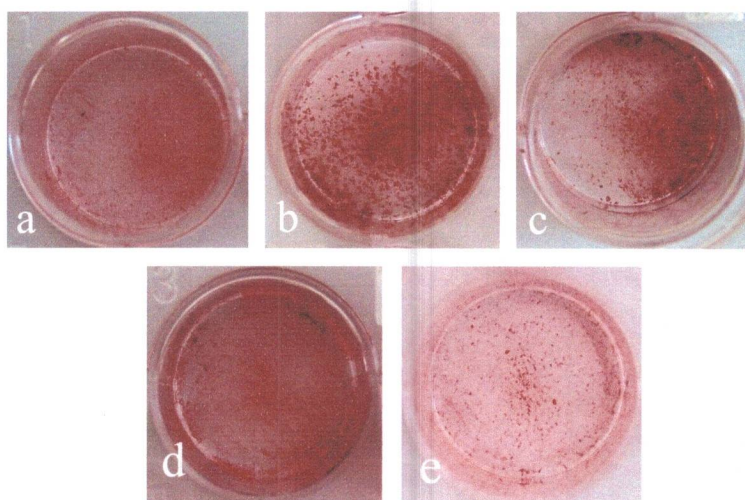
เมื่อทดสอบด้วยวิธีทางชีวเคมี เซลล์โพรงฟันมีการตอบสนองต่ออะซีแมนแนน ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 0.5 1 2 4 และ 8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่เวลา 3 วัน ดังแสดงในรูปที่ 12 พบการเพิ่มอัตราการทำงานของเอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส/ปริมาณโปรตีนรวม ของเซลล์ในกลุ่มทดลองที่มีระดับความเข้มข้นของอะซีแมนแนน 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ร้อยละ 43) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่ความเข้มข้น 0.5 1 2 และ 8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ ($p > 0.05$)



รูปที่ 12 ผลของอะซีแมนแนนต่อการเพิ่มร้อยละของอัตราการทำหน้าที่ของเอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสต่อปริมาณโปรตีนรวมในเซลล์โพรงฟัน เมื่อใช้วิธีทางชีวเคมี ทำการทดลองเซลล์กับอะซีแมนแนน ที่ความเข้มข้น 0.5 1 2 4 และ 8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 วัน ผลการทดลองแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของร้อยละของการทำหน้าที่ของเอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส/ปริมาณโปรตีนรวม ข้อมูลดิบแสดงในภาคผนวก ก ตารางที่ 5 ก (* หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวและทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วยวิธีเชฟเฟ (n=4))

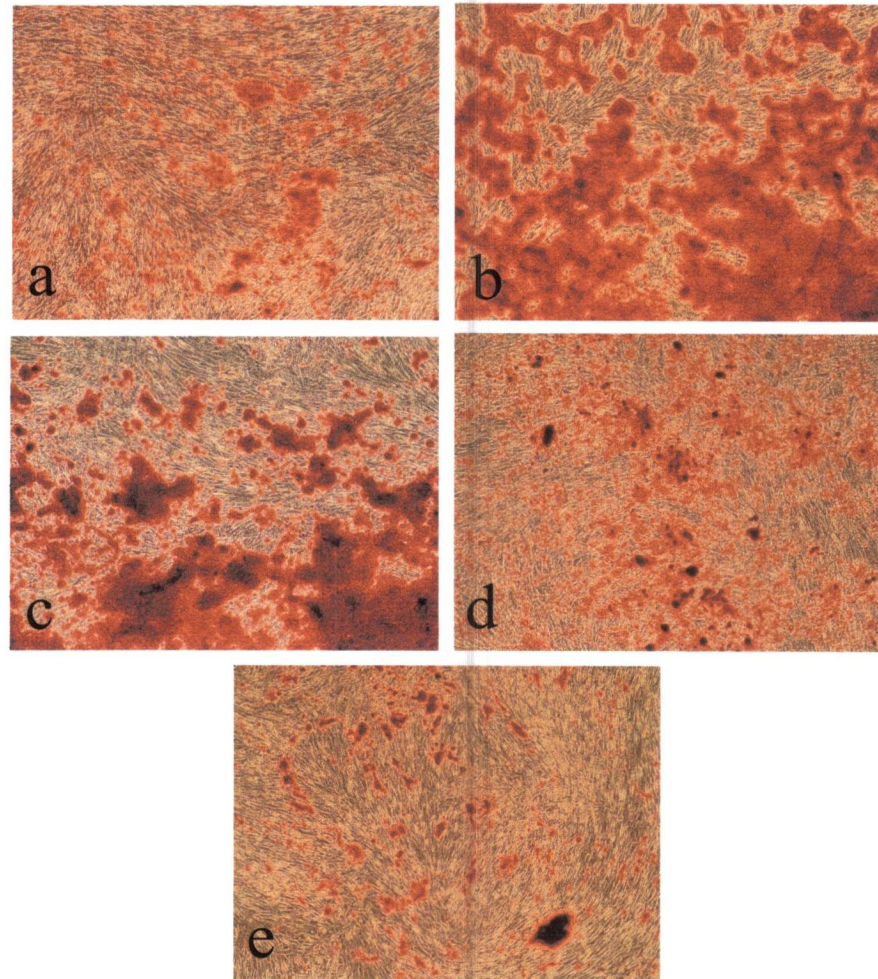
อะซีแมนแนนเพิ่มการตกตะกอนเกลือแร่

เมื่อย้อมตะกอนแคลเซียมด้วยสีอะลิซาริน เรด เซลล์โพรงฟันมีการตอบสนองต่ออะซีแมนแนน ที่ระดับความเข้มข้น 2.4 และ 8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่เวลา 15 วันดังนี้ เมื่อมองด้วยตาเปล่า พบการเพิ่มการติดสีเข้มและเป็นบริเวณกว้างในกลุ่มทดลองที่มีระดับความเข้มข้นของอะซีแมนแนน 2.4 และ 8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ และกลุ่มควบคุมบวก (รูปที่ 13)



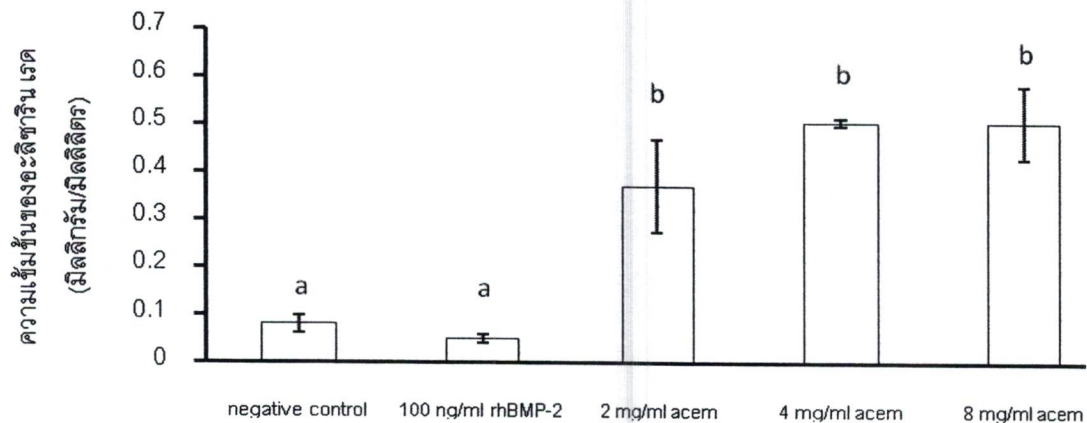
รูปที่ 13 ตะกอนแคลเซียมที่ย้อมติดสีอะลิซาริน เรด ของเซลล์โพรงฟันที่ทดสอบกับอะซีแมนแนน ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 15 วัน คือ (a) 0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (กลุ่มควบคุมลบ) (b) 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (c) 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (d) 8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ (e) โปรตีนโบนโมริโฟเจเนติกสังเคราะห์ของมนุษย์ที่มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัม/มิลลิลิตร (กลุ่มควบคุมบวก) (n=3)

เมื่อสังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกลับภายใต้เลนส์วัตถุที่มีกำลังขยาย 4 เท่า กลุ่มที่ทดสอบด้วยอะซีแมนแนน 2.4 และ 8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พบกลุ่มก้อนของปุ่มเล็กติดสีแดงเข้มที่บวมและมีจำนวนมากกว่ากลุ่มควบคุมลบ และกลุ่มควบคุมบวก นอกจากนี้ ลักษณะของปุ่มเล็กมีขนาดใหญ่และอัดตัวอยู่อย่างหนาแน่นกว่ากลุ่มควบคุมลบและกลุ่มควบคุมบวก พบกลุ่มควบคุมลบและกลุ่มควบคุมบวกต่างมีลักษณะของปุ่มเล็กที่กระจัดกระจาย แต่อย่างไรก็ตาม ลักษณะปุ่มเล็กในกลุ่มควบคุมบวกมีความเข้มมากกว่ากลุ่มควบคุมลบ (รูปที่ 14)



รูปที่ 14 ตะกอนแคลเซียมที่ย้อมติดสีอะลิซาริน เรด ของเซลล์ที่ทดสอบกับอะซีแมนแนนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อสังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกลับภายใต้เลนส์วัตถุที่มีกำลังขยาย 4 เท่า ที่ระยะเวลา 15 วัน ได้แก่ (a) 0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (กลุ่มควบคุมลบ) (b) 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (c) 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (d) 8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ (e) โปรตีนโบนมอร์ฟोजเนติกสังเคราะห์เข้มข้น 100 นาโนกรัม/มิลลิลิตร (กลุ่มควบคุมบวก) (n=3)

เมื่อทำละลายด้วยเซริลไพรดิเนียมคลอไรด์ พบการเพิ่มความเข้มข้นของสี่อะลิซาริน เรด ในกลุ่มทดลองที่มีระดับความเข้มข้นของอะซีแมนแนน 2 4 และ 8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ และกลุ่มควบคุมบวก อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนความเข้มข้นของสี่อะลิซาริน เรด ในกลุ่มควบคุมลบ และกลุ่มควบคุมบวกไม่มีความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) (รูปที่ 15)



รูปที่ 15 ตะกอนแคลเซียมที่ถูกทำละลายด้วยเซริลไพรดิเนียมคลอไรด์ของเซลล์โพรงฟัน ที่ทดสอบกับอะซีแมนแนนที่ความเข้มข้น 2 4 และ 8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และเซลล์ที่ทดสอบกับโปรตีนโบนมอร์โฟเจนติกสังเคราะห์ที่มีความเข้มข้น 100 นาโน-กรัม/มิลลิลิตร (กลุ่มควบคุมบวก) ที่ระยะเวลา 15 วัน ผลการทดลองแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ข้อมูลดิบแสดงในภาคผนวก ก ตารางที่ 6 ก กลุ่มกราฟแท่งที่กำกับด้วยตัวอักษรเดียวกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) และกลุ่มกราฟแท่งที่กำกับด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวและทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วยวิธีดีนเนตต์ ทีทีรี ($n=3$) (negative control หมายถึง กลุ่มควบคุมลบ 100 ng/ml rhBMP-2 หมายถึง โปรตีนโบนมอร์โฟเจนติกสังเคราะห์ของมนุษย์ที่มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัม/มิลลิลิตร 2 mg/ml acem 4 mg/ml acem และ 8 mg/ml acem หมายถึง อะซีแมนแนนเข้มข้น 2 4 และ 8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ)

ส่วนที่ 3 การศึกษาการปิดโพรงฟันในฟันกรามของหนูแรท

อะซีแมนแนนส่งเสริมการสร้างเดนตินบริดจ์และเร่งการจัดเรียงตัวของเนื้อเยื่ออ่อนให้กลับสู่สภาพเป็นปกติ

หนูทุกตัวที่ได้รับการทดลองครั้งนี้ มีสุขภาพแข็งแรง หลังจากการกรอฟันทะลุโพรงฟัน หนูมีน้ำหนักลดลงไม่เกินร้อยละ 5 และจะคืนสู่ระดับปกติภายใน 7 วัน (ภาคผนวก ก รูปที่ 3 ก) การให้คะแนนการตอบสนองของเนื้อเยื่อโพรงฟันแสดงไว้ดังตารางที่ 6 สำหรับโพรงฟันที่มีรูทะลุใหญ่เกิน 0.9 มิลลิเมตรจะถูกคัดออกจากการวิเคราะห์

ผลการตอบสนองของเนื้อเยื่อโพรงฟันที่ 7 วัน

ผลการตอบสนองของเนื้อเยื่อโพรงฟันที่ใส่อะซีแมนแนนแสดงไว้ดังรูปที่ 16 ในบริเวณใต้ต่อรอยทะลุโดยมากพบการอักเสบแบบเรื้อรังอย่างอ่อน กล่าวคือ พบการอักเสบแบบเรื้อรังอย่างอ่อนจำนวน 5 ใน 7 ซี่ (ร้อยละ 71.4) พบการอักเสบโดยมีถุงหนองขนาดเล็กจำนวน 2 ใน 7 ซี่ (ร้อยละ 28.6) โดยมากยังไม่พบเดนตินบริดจ์ (6 ใน 7 ซี่หรือร้อยละ 85.7) และมีจำนวน 1 ใน 7 ซี่ (ร้อยละ 14.2) ที่เริ่มปรากฏเดนตินบริดจ์ ภายในโพรงฟันมีการจัดเรียงตัวของเนื้อเยื่ออ่อนไม่เป็นปกติ (6 ใน 7 ซี่หรือร้อยละ 85.7) กล่าวคือ พบเซลล์โพรงฟันในระยะกัมมันต์ (active) ที่มีนิวเคลียสกลม ขนาดใหญ่เป็นจำนวนมาก พบเส้นใยคอลลาเจนจำนวนมากเรียงตัวหนาแน่น และพบหลอดเลือดแทรกตัว พบเศษเนื้อฟันในเนื้อเยื่อโพรงฟัน มีฟันจำนวน 1 ซี่ ที่ถูกตัดออกจากการวิเคราะห์เนื่องจากมีรอยทะลุที่ใหญ่เกินไป

ผลการตอบสนองของเนื้อเยื่อโพรงฟันที่ปิดด้วยไดแคล (กลุ่มควบคุม) แสดงไว้ดังรูปที่ 17 ใต้ต่อรอยทะลุพบเศษไดแคล ใต้ต่อไดแคลมากพบการอักเสบเรื้อรังปานกลางจำนวน 4 ใน 8 ซี่ (ร้อยละ 50) พบการอักเสบแบบมีถุงหนองขนาดเล็ก 2 ใน 8 ซี่ (ร้อยละ 25) และพบการอักเสบแบบเรื้อรังอย่างอ่อนจำนวน 2 ใน 8 ซี่ (ร้อยละ 25) นอกจากนี้ฟันทุกซี่ยังไม่พบเดนตินบริดจ์ (ร้อยละ 100) ภายในโพรงฟันมีการจัดเรียงตัวของเนื้อเยื่อไม่เป็นปกติ (ร้อยละ 87.5) กล่าวคือ พบเซลล์โพรงฟันที่มีนิวเคลียสกลมและใหญ่เป็นจำนวนมาก พบเส้นใยคอลลาเจนสานเป็นร่างแห พบเศษเนื้อฟัน

ผลการตอบสนองของเนื้อเยื่อโพรงฟันที่ปิดด้วยฟูจิไลนิงแอลซี (กลุ่มหลอก) แสดงไว้ดังรูปที่ 18 ใต้ต่อรอยทะลุโดยมากพบการอักเสบอย่างอ่อนจำนวน 4 ใน 6 ซี่ (ร้อยละ 66.7) พบ

การอักเสบน้อยมากจำนวน 1 ใน 6 ซี่ (ร้อยละ 16.7) และพบการอักเสบปานกลางจำนวน 1 ใน 6 ซี่ (ร้อยละ 16.7) และพบเศษเนื้อฟัน โดยทุกซี่ยังไม่พบเดนทินบริดจ์ (ร้อยละ 100) สำหรับการจัดเรียงตัวของเนื้อเยื่ออ่อนยังไม่เป็นปกติ (ร้อยละ 100) มีฟันจำนวน 2 ซี่ ที่ถูกตัดออกจากการวิเคราะห์เนื่องจาก มีรอยทะเลที่ใหญเกินไป (1 ซี่) และผู้วิจัยไม่สามารถตัดผ่านรอยทะเล (1 ซี่)

อย่างไรก็ตาม เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติเปรียบเทียบคะแนนของการอักเสบ การสร้างเดนทินบริดจ์ และการตอบสนองของเนื้อเยื่ออ่อน พบไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้ง 3 กลุ่ม ($p>0.05$)

ผลการตอบสนองของเนื้อเยื่อโพรงฟันที่ 28 วัน

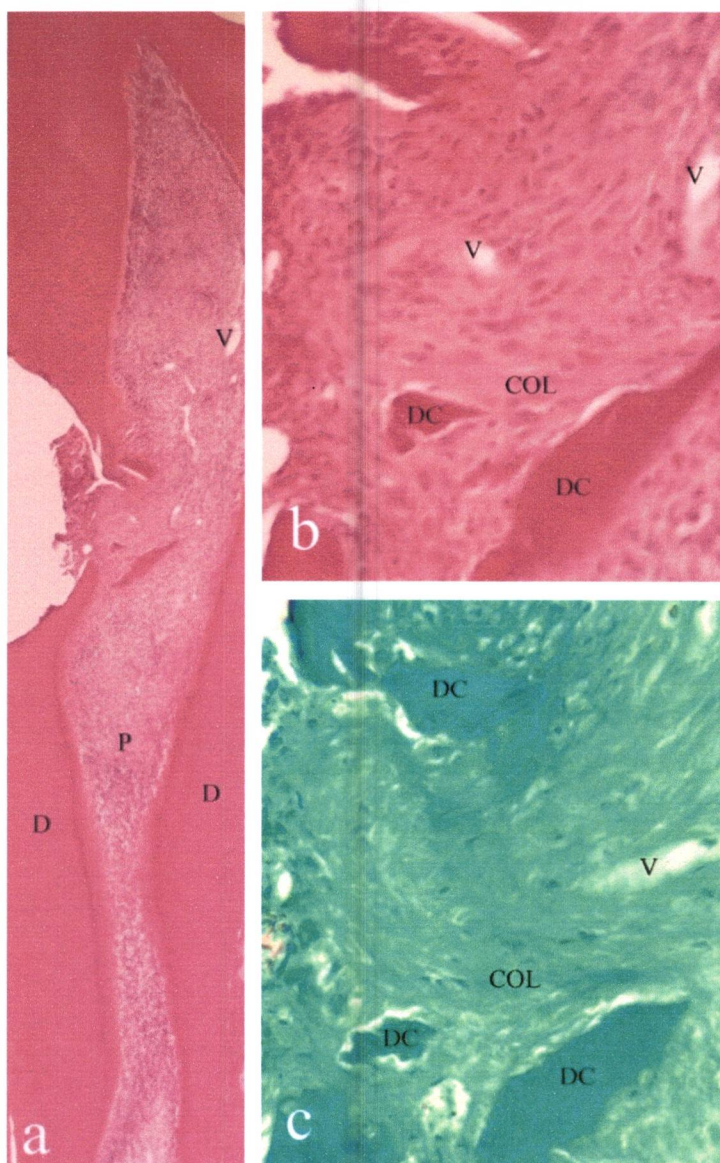
ผลการตอบสนองของเนื้อเยื่อโพรงฟันที่ใส่อะซีแมนแนนแสดงไว้ดังรูปที่ 19 เห็นรอยทะเลพบกลุ่มเส้นใยคอลลาเจนหนาแน่นปะปนกับเซลล์ ได้ต่อรอยทะเลพบเนื้อเยื่อแข็งคล้ายเนื้อฟัน ซ่อมเสริมปิดรอยทะเลหรือเดนทินบริดจ์ และหลุดเลือด โดยมากไม่พบการอักเสบ (5 ใน 8 ซี่ หรือร้อยละ 62.5) พบการอักเสบปานกลางจำนวน 1 ใน 8 ซี่ (ร้อยละ 12.5) และพบถุงหนองขนาดเล็กจำนวน 1 ใน 8 ซี่ (ร้อยละ 12.5) โดยส่วนใหญ่พบเดนทินบริดจ์ปิดสมบูรณ์ (5 ใน 8 ซี่ หรือร้อยละ 62.5) พบฟันจำนวน 3 ซี่ (ร้อยละ 37.5) ที่มีการสร้างเดนทินบริดจ์เกือบสมบูรณ์ เซลล์และเนื้อเยื่ออ่อนมีการจัดเรียงตัวเป็นปกติ (4 ใน 8 ซี่ หรือร้อยละ 50)

ผลการตอบสนองของเนื้อเยื่อโพรงฟันที่ปิดด้วยไดแคล (กลุ่มควบคุม) แสดงไว้ดังรูปที่ 20 ได้ต่อรอยทะเลพบเศษไดแคล ภายในโพรงฟันโดยมากพบการอักเสบปานกลางจำนวน 5 ใน 8 ซี่ (ร้อยละ 62.5) พบถุงหนองขนาดเล็กจำนวน 1 ใน 8 ซี่ (ร้อยละ 12.5) และมีถุงหนองขนาดใหญ่จำนวน 2 ซี่ (ร้อยละ 25) เดนทินบริดจ์มีลักษณะหนา เนื้อไม่กลมกลืน เป็นเนื้อผสมของเศษเซลล์ตาย เศษเนื้อฟัน และเศษไดแคล ไม่มีซี่ใดที่พบเดนทินบริดจ์ปิดสมบูรณ์ พบเดนทินบริดจ์ปิดเกือบสมบูรณ์จำนวน 5 ใน 8 ซี่ (ร้อยละ 62.5) และพบเดนทินบริดจ์ปิดบางส่วนจำนวน 3 ใน 8 ซี่ (ร้อยละ 37.5) โดยมากการจัดเรียงตัวของเซลล์และเนื้อเยื่ออ่อนยังไม่เป็นปกติ (7 ใน 8 ซี่ หรือร้อยละ 87.5)

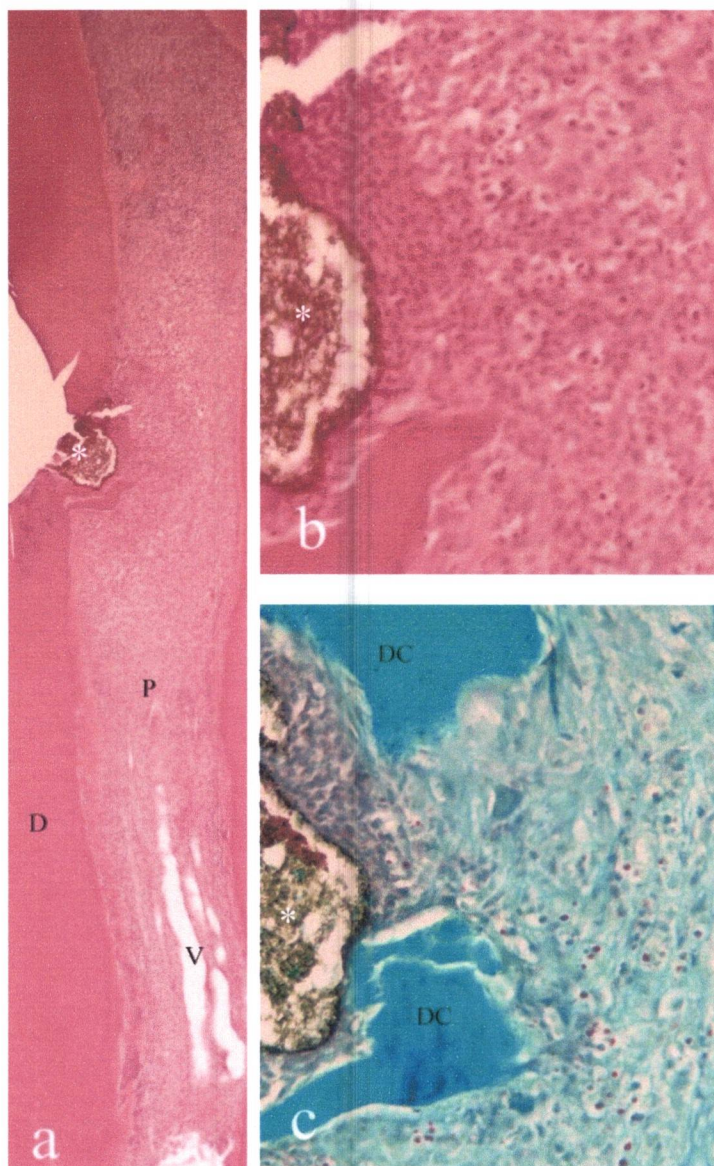
ผลการตอบสนองของเนื้อเยื่อโพรงฟันที่ปิดด้วยฟูลิไลนิงแอลซี (กลุ่มหลอก) แสดงไว้ดังรูปที่ 21 ได้ต่อรอยทะเล พบการอักเสบหลากหลาย เป็นการอักเสบน้อยมากจำนวน 2 ใน 7 ซี่ (ร้อยละ 28.6) อักเสบปานกลางจำนวน 2 ใน 7 ซี่ (ร้อยละ 28.6) การอักเสบเรื้อรังอย่างอ่อน

จำนวน 1 ซี่ (ร้อยละ 14.3) พบการอักเสบแบบมีถุงหนองขนาดเล็กจำนวน 1 ใน 7 ซี่ (ร้อยละ 14.3) และขนาดใหญ่จำนวน 1 ใน 7 ซี่ (ร้อยละ 14.3) ไม่พบเดนทินบริดจ์ปิดสมบูรณ์ พบเดนทินบริดจ์ปิดเกือบสมบูรณ์จำนวน 5 ใน 7 ซี่ (ร้อยละ 71.4) เดนทินบริดจ์ปิดบางส่วนจำนวนจำนวน 2 ใน 7 ซี่ (ร้อยละ 28.6) พบ 4 ใน 7 ซี่ (ร้อยละ 57.1) ที่ภายในเดนทินบริดจ์พบเส้นใยคอลลาเจนที่ปะปนกันเซลล์ ซึ่งไม่มีลักษณะของการตกตะกอนเกลือแร่ โดยมากการจัดเรียงตัวของเนื้อเยื่ออ่อนยังไม่เป็นปกติ (6 ใน 7 ซี่หรือร้อยละ 85.7) มีฟัน 1 ซี่ ที่ถูกตัดออกจากการวิเคราะห์เนื่องจากมีรอยทะลุที่ใหญ่เกินไป

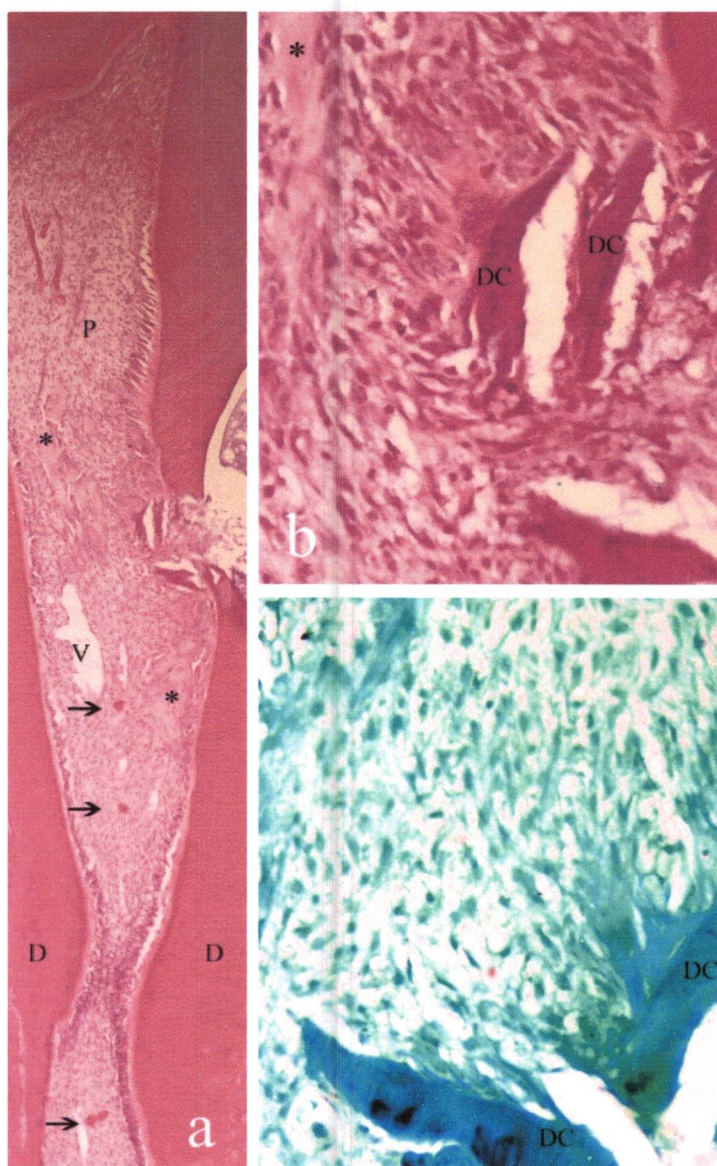
เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติเปรียบเทียบคะแนนของการสร้างเดนทินบริดจ์ และการตอบสนองของเนื้อเยื่ออ่อน พบโพรงฟันที่ใส่อะซีแมนแนนสร้างเดนทินบริดจ์ปิดรอยทะลุสมบูรณ์ และการจัดเรียงตัวของเนื้อเยื่ออ่อนเป็นปกติมากกว่ากลุ่มไดแคลและฟูจิไลนิงแอลซีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนโพรงฟันที่ปิดด้วยไดแคลและฟูจิไลนิงแอลซีพบคะแนนของการสร้างเดนทินบริดจ์ และการตอบสนองของเนื้อเยื่ออ่อนไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติเปรียบเทียบคะแนนของการอักเสบของทั้ง 3 กลุ่ม พบไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)



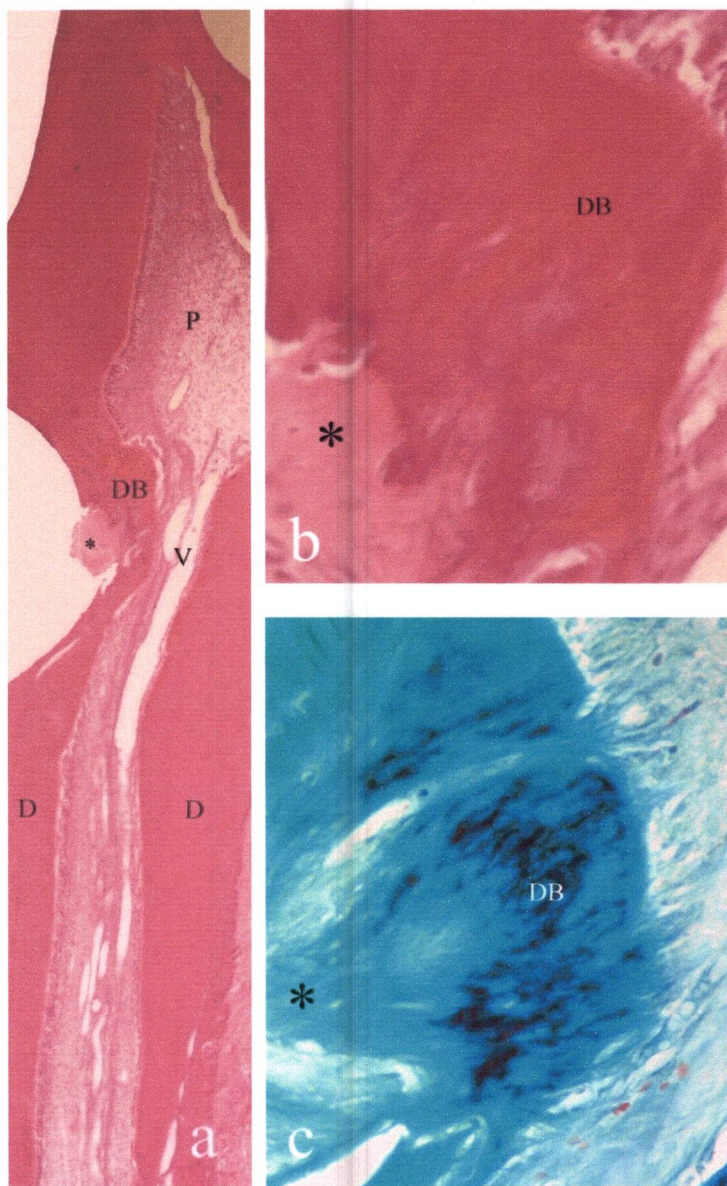
รูปที่ 16 ภาพจุลพยาธิวิทยาของโพรงหัวใจที่ใส่อะซีแมนแนนเป็นเวลา 7 วัน ที่สังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดสองกลีบ ภายในโพรงหัวใจพบเศษเนื้อฟัน (DC) และหลอดเลือด (V) พบเซลล์โพรงหัวใจอย่างหนาแน่นโดยทั่วไป มีการอักเสบเรื้อรังอย่างอ่อน มีการจัดเรียงตัวของเนื้อเยื่ออ่อนยังไม่เป็นระเบียบ สังเกตเส้นใยคอลลาเจนเรียงตัวหนาแน่น (COL) ได้จากภาพที่ย้อมด้วยสีมาสของส์ ไตรโครม (a) ภายใต้เลนส์วัตถุที่มีกำลังขยาย 4 เท่า (ย้อมด้วยสีสีมาท็อกซีลินและอีโอซิน) (b) ภายใต้เลนส์วัตถุที่มีกำลังขยาย 20 เท่า (ย้อมด้วยสีสีมาท็อกซีลินและอีโอซิน) (c) ภายใต้เลนส์วัตถุที่มีกำลังขยาย 20 เท่า (ย้อมด้วยสีมาสของส์ ไตรโครม) หมายเหตุ : D หมายถึง เนื้อฟัน DC หมายถึงเศษเนื้อฟัน P หมายถึง เนื้อเยื่อโพรงหัวใจ



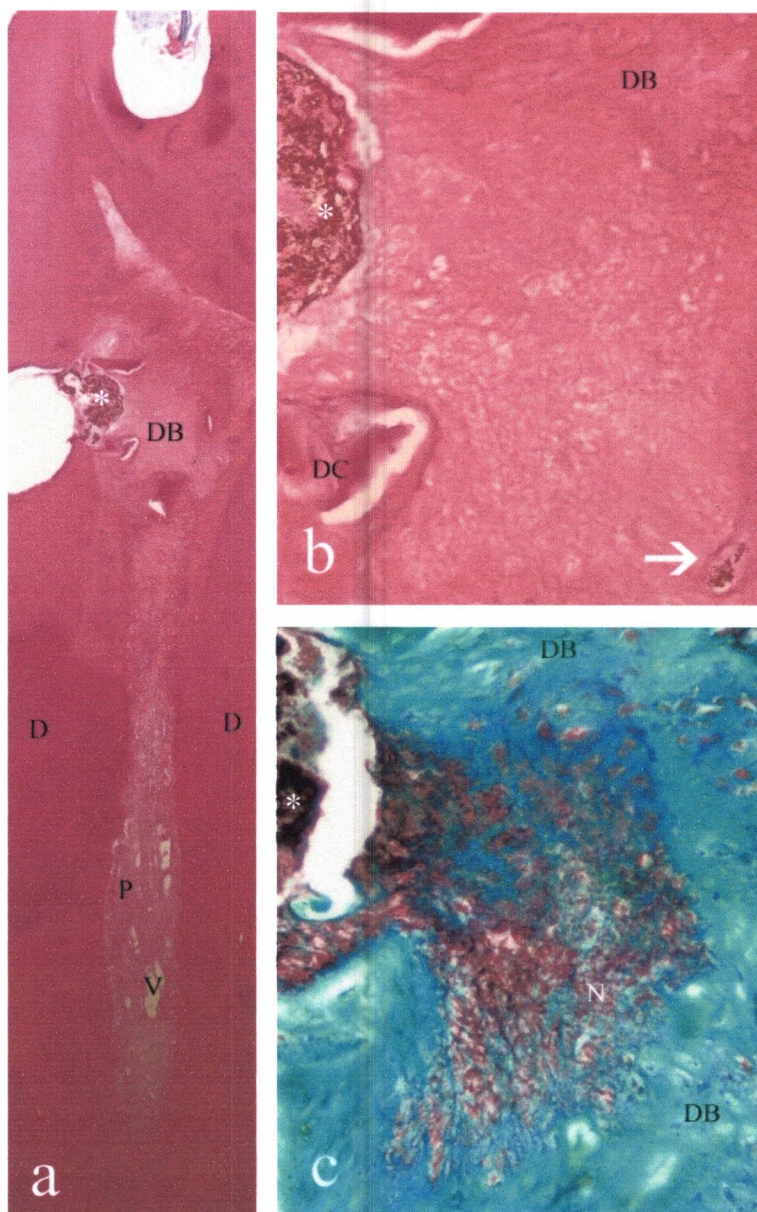
รูปที่ 17 ภาพจุลพยาธิวิทยาของโพรงรังไข่ที่ปิดด้วยไดแคลเป็นเวลา 7 วัน ที่สังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกลับพบเศษไดแคลอยู่ที่รอยทะเล (*) ใต้ต่อไดแคลพบเซลล์อีกเสบนานแน่นเป็นถุงหนองขนาดเล็ก พบเศษเนื้อรังไข่ (DC) การจัดเรียงตัวของเนื้อเยื่ออ่อนยังคงไม่เป็นระเบียบ (a) ภายใต้เลนส์วัตถุที่มีกำลังขยาย 4 เท่า (ย้อมด้วยสีฮีมาทอกซิดินและอีโอซิน) (b) ภายใต้เลนส์วัตถุที่มีกำลังขยาย 20 เท่า (ย้อมด้วยสีฮีมาทอกซิดินและอีโอซิน) (c) ภายใต้เลนส์วัตถุที่มีกำลังขยาย 20 เท่า (ย้อมด้วยสีมาสของส์ ไตรโครม) หมายเหตุ : D หมายถึง เนื้อรังไข่ DC หมายถึง เศษเนื้อรังไข่ P หมายถึง เนื้อเยื่อโพรงรังไข่ V หมายถึง หลอดเลือด



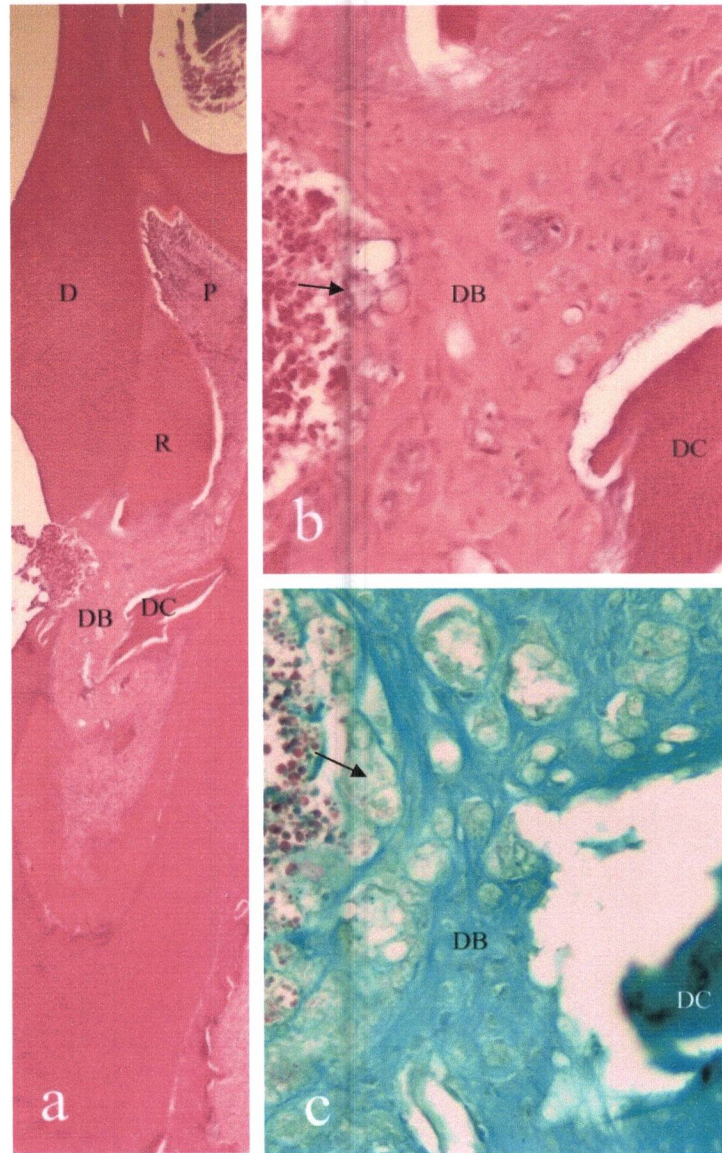
รูปที่ 18 ภาพจุลพยาธิวิทยาของโพรงพื้นที่ปิดด้วยฟูลิไคนิงแอลซี เป็นเวลา 7 วัน ที่สังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกลับ พบวัสดุบูรณะ ภายในโพรงพื้นที่พบการอักเสบเรื้อรังอย่างอ่อน พบเศษเนื้อฟัน และเมทริกซ์เนื้อฟัน (*) การจัดเรียงตัวของเนื้อเยื่ออ่อนไม่เป็นปกติ (a) ภายใตเลนส์วัตถุที่มีกำลังขยาย 4 เท่า (ย้อมด้วยสีฮีมาท็อกซีลินและอีโอซิน) (b) ภายใตเลนส์วัตถุที่มีกำลังขยาย 20 เท่า (ย้อมด้วยสีฮีมาท็อกซีลินและอีโอซิน) (c) ภายใตเลนส์วัตถุที่มีกำลังขยาย 20 เท่า (ย้อมด้วยสีมาสของส์ ไตรโครม) หมายเหตุ : D หมายถึง เนื้อฟัน DM หมายถึง เมทริกซ์เนื้อฟัน P หมายถึง เนื้อเยื่อโพรงพื้นที่ DC หมายถึง เศษเนื้อฟัน V หมายถึง เส้นเลือด ลูกศร หมายถึง สิ่งแปลกปน(artifact) จากกรรมวิธีการย้อม



รูปที่ 19 ภาพจุลพยาธิวิทยาของโพรงหัวใจที่ใส่สารอะซีแมนแนนเป็นเวลา 28 วัน ที่สังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกลับ พบเนื้อเยื่อคล้ายเนื้อพินชอมเดิร์มที่ปิดรอยทะลุหรือเดนทินบริดจ์ (DB) พบหลอดเลือด (V) ไม่พบการอักเสบในเนื้อเยื่อโพรงหัวใจ การจัดเรียงตัวของเนื้อเยื่ออ่อนเป็นปกติ และพบเนื้อเยื่อคล้ายเนื้อพินชอมเดิร์มที่ไม่แตกตะกอนเกล็ดแร่ (*) (a) ภายใต้อินฟราเรดที่มีกำลังขยาย 4 เท่า (ย้อมด้วยสีฮีมาทอกซึลีนและอีโอซิน) (b) ภายใต้อินฟราเรดที่มีกำลังขยาย 20 เท่า (ย้อมด้วยสีฮีมาทอกซึลีนและอีโอซิน) (c) ภายใต้อินฟราเรดที่มีกำลังขยาย 20 เท่า (ย้อมด้วยสีมาสของส์ ไตรโครม) หมายเหตุ : D หมายถึง เนื้อพิน P หมายถึง เนื้อเยื่อโพรงหัวใจ



รูปที่ 20 ภาพจุลพยาธิวิทยาของโพรงรังไข่ที่ปิดด้วยไตแคลเป็นเวลา 28 วัน ที่สังเกตุด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกลับ พบเศษไตแคลอยู่ที่รอยทะลุ (*) ภายในโพรงรังไข่พบการอักเสบเรื้อรังเล็กน้อย พบเศษเซลล์ตายเป็นชั้นหนา (N) แทรกในเดนทิเนบริดจ์ (DB) พบเศษเนื้อรังไข่ (DC) และเศษไตแคล (ลูกศร) (a) ภายใตเลนส์วัตถุที่มีกำลังขยาย 4 เท่า (ย้อมด้วยสีฮีมาทอกซิดินและอีโอซิน) (b) ภายใตเลนส์วัตถุที่มีกำลังขยาย 20 เท่า (ย้อมด้วยสีฮีมาทอกซิดินและอีโอซิน) (c) ภายใตเลนส์วัตถุที่มีกำลังขยาย 20 เท่า (ย้อมด้วยสีมาสของส์ ไตรโครม) หมายถึง : D หมายถึงเนื้อรังไข่ V หมายถึง หลอดเลือด



รูปที่ 21 ภาพจุลพยาธิวิทยาของโพรงฟันที่ปิดด้วยฟูลิไลนิงแอลซี เป็นเวลา 28 วัน ที่สังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกลับ ภายในโพรงฟันพบเซลล์อักเสบเรื้อรังอย่างอ่อน เศษเนื้อฟัน (DC) และเดนตินบริดจ์ (DB) ซึ่งมีลักษณะไม่มีการตกตะกอนเกลือแร่ และมีเศษฟูลิไลนิงแอลซีแทรกอยู่ (ลูกศร) (a) ภายได้เลนส์วัตถุที่มีกำลังขยาย 4 เท่า (ย้อมด้วยสีฮีมาทอกซีลินและอีโอซิน) (b) ภายได้เลนส์วัตถุที่มีกำลังขยาย 20 เท่า (ย้อมด้วยสีฮีมาทอกซีลินและอีโอซิน) (c) ภายได้เลนส์วัตถุที่มีกำลังขยาย 20 เท่า (ย้อมด้วยสีมาสของส ไตรโครม) หมายเหตุ : D หมายถึง เนื้อฟัน P หมายถึง เนื้อเยื่อโพรงฟัน R หมายถึง เนื้อฟันซ่อมเสริม

ตารางที่ 5 ลักษณะจุลพยาธิวิทยาของโพรงฟันทะลุที่ปิดด้วยอะซีแมนแนน ไดแคล และฟูจิโลนิง แอลซี ที่ระยะเวลา 7 วันและ 28 วัน

ระยะเวลา	กลุ่ม	การอักเสบ *					การสร้าง เดนตินปริดจ์ **				การจัดเรียงตัว ของเนื้อ เยื่ออ่อน ***			จำนวน ฟัน รวม	
		1	2(a)	2(c)	3	4	5	1	2	3	4	1	2		3
7 วัน	อะซีแมนแนน	-	-	5	-	2	-	-	-	1	6	-	6	1	7
	ไดแคล	-	-	2	4	2	-	-	-	2	6	-	7	1	8
	ฟูจิโลนิงแอลซี	1	-	4	1	-	-	-	-	2	4	-	6	-	6
28 วัน	อะซีแมนแนน	5	-	-	1	2	-	5	3	-	-	4	4	-	8
	ไดแคล	-	-	-	5	1	2	-	3	4	1	-	7	1	8
	ฟูจิโลนิงแอลซี	2	-	1	2	1	1	-	5	2	-	-	6	1	7

* การอักเสบ

- 1 หมายถึง ไม่มี หรือมีการกระจายของเซลล์อักเสบเพียงเล็กน้อย (น้อยกว่า 10 เซลล์) ในบริเวณใต้ต่อรอยทะลุ หรือบริเวณเดนตินปริดจ์
- 2(a) หมายถึง มีการอักเสบแบบเฉียบพลันอย่างอ่อน สังเกตจากการแทรกเข้าของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดหลายนิวเคลียส (10-50 เซลล์) ในบริเวณใต้ต่อรอยทะลุ หรือบริเวณเดนตินปริดจ์
- 2(c) หมายถึง มีการอักเสบแบบเรื้อรังอย่างอ่อน สังเกตเห็นการแทรกเข้าของเซลล์เม็ดเลือดขาว ชนิดนิวเคลียสเดียว (10-50 เซลล์) ในบริเวณใต้ต่อรอยทะลุ หรือบริเวณเดนตินปริดจ์
- 3 หมายถึง มีการอักเสบปานกลาง มีการแทรกเข้าของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดหลายนิวเคลียสหรือนิวเคลียสเดียว (มากกว่า 50 เซลล์) ในบริเวณใต้ต่อรอยทะลุ หรือบริเวณเดนตินปริดจ์
- 4 หมายถึง มีการอักเสบปรากฏเป็นถุงหนองขนาดเล็ก การแทรกเข้าของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดหลายนิวเคลียสหรือนิวเคลียสเดียว อย่างหนาแน่นในบริเวณใต้ต่อรอยทะลุ หรือบริเวณเดนตินปริดจ์
- 5 หมายถึง มีการอักเสบปรากฏเป็นถุงหนองขนาดใหญ่ การแทรกเข้าของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดหลายนิวเคลียสหรือนิวเคลียสเดียว อย่างหนาแน่น ครอบคลุมเป็นพื้นที่มากกว่าบริเวณรอยทะลุ

** การสร้างเดนตินปริดจ์

- 1 หมายถึง ปิดรอยทะลุสมบูรณ์
- 2 หมายถึง ปิดรอยทะลุเกือบสมบูรณ์
- 3 หมายถึง ปิดรอยทะลุบางส่วน
- 4 หมายถึง ไม่ปิดรอยทะลุ

*** การจัดเรียงตัวของเนื้อเยื่ออ่อน

- 4 หมายถึง การจัดเรียงตัวของเนื้อเยื่ออ่อนยังเป็นปกติหรือเกือบปกติ เซลล์และเนื้อเยื่อที่อยู่ใต้ต่อวัสดุ และ/หรือ ใต้เดนตินปริดจ์มีลักษณะปกติ หรือเกือบปกติ พบเซลล์คล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟันที่สร้างใหม่จำนวนมาก พบเส้นใยคอลลาเจนที่สร้างใหม่เรียงตัวเป็นปกติ เซลล์และเนื้อเยื่อโพรงฟันในส่วนลึกมีลักษณะจัดเรียงตัวเป็นปกติ
- 5 หมายถึง การจัดเรียงตัวของเนื้อเยื่ออ่อนยังไม่เป็นปกติ ใต้ต่อวัสดุและ/หรือ ใต้เดนตินปริดจ์ พบเซลล์คล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟันที่สร้างใหม่จำนวนเล็กน้อย พบเส้นใยคอลลาเจนที่เพิ่งสร้างใหม่ที่เรียงตัวไม่เป็นปกติ เซลล์และเนื้อเยื่อโพรงฟันในส่วนลึกอยู่ยังคงมีลักษณะจัดเรียงตัวเป็นปกติ
- 6 หมายถึง สูญเสียการจัดเรียงตัวของเนื้อเยื่ออ่อน มีการสูญเสียลักษณะโดยทั่วไปของการจัดเรียงตัวของเซลล์และเนื้อเยื่อภายในโพรงฟัน พบเส้นใยคอลลาเจนจำนวนเล็กน้อย พบบริเวณช่องว่างที่ปราศจากเซลล์และเนื้อเยื่อ

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

สารที่สกัดจากส่วนหัวของว่านหางจระเข้เป็นสารอะซีแมนแนน ซึ่งมีผลทางชีวภาพต่อเซลล์โพรงฟัน สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ ระดับการหลังโปรตีนโบนมอร์โฟเจเนติก-2 การทำงานของเอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส และการตกตะกอนเกลือแร่ ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ไม่มีสารอะซีแมนแนน)

ในหนูทดลองที่ฟันถูกทำให้ทะลุโพรงฟันเป็นเวลา 28 วัน พบการปิดโพรงฟันด้วยอะซีแมนแนนกระตุ้นการสร้างเดนตินบริดจ์แบบปิดสมบูรณ์ชนิดเนื้อเยื่อแข็งที่เป็นเนื้อเดียวกัน (5 ใน 8 ซี่ หรือร้อยละ 62.5) และส่งเสริมการจัดเรียงตัวของเนื้อเยื่ออ่อนให้เข้าสู่สภาพปกติ (4 ใน 8 ซี่ หรือร้อยละ 50) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ไดแคล) และกลุ่มหลอก (ฟูจิไล-นิงแอลซี) ในขณะที่กลุ่มควบคุม ไม่พบเดนตินบริดจ์ปิดสมบูรณ์ แต่ส่วนใหญ่เป็นแบบปิดบางส่วน (4 ใน 8 ซี่ หรือร้อยละ 50) ซึ่งเป็นชนิดเนื้อเยื่อแข็งแบบเนื้อผสมที่มีการปนเปื้อนด้วยเศษวัสดุหรือเศษเซลล์ และการจัดเรียงตัวของเนื้อเยื่ออ่อนยังไม่เป็นปกติ (7 ใน 8 ซี่ หรือร้อยละ 87.5) ส่วนกลุ่มหลอก โดยมากเกิดเดนตินบริดจ์แบบปิดเกือบสมบูรณ์ (5 ใน 7 ซี่ หรือร้อยละ 71.4) โดยเป็นชนิดเนื้อเยื่ออ่อนที่พบเศษวัสดุปะปน และการจัดเรียงตัวของเนื้อเยื่ออ่อนยังไม่เป็นปกติ (6 ใน 7 ซี่ หรือร้อยละ 85.7)

อภิปรายผลการวิจัย

จากการการวิเคราะห์น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว พบอะซีแมนแนนมีแมนโนส กลูโคส และกาแลกโตสเป็นส่วนใหญ่ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Tai-Nin และคณะ (2005) (ภาคผนวก ตารางที่ 6) เมื่อวิเคราะห์สเปกตรัมของคาร์บอนเทอร์ทินิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์พบผลที่สอดคล้องกับการศึกษาของ Tai-Nin และคณะ (2005) (ภาคผนวก รูปที่ 1) ผลวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีเชิงตัดตอนขนาด พบอะซีแมนแนนเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (มากกว่า 400 กิโลดาลตัน) สอดคล้องกับอะซีแมนแนนที่สกัดจากห้องปฏิบัติการคาริริงตัน ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 741 กิโลดาลตัน (Turner และคณะ, 2004)

นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์สเปกตรัมของรังสีอินฟราเรด พบหมู่ทำหน้าที่ที่สอดคล้องกับรายงานของ McAnalley (1983) (ภาคผนวก ตารางที่ 2 รูปที่ 2)

ในการศึกษานี้ พบสารสกัดอะซีแมนแนนสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์โพรงฟัน (1 2 4 และ 8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ซึ่งผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Jettanacheawchankit และคณะ (2009) ที่พบสารอะซีแมนแนนสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์สร้างเส้นใยจากเหงือก

โปรตีนโบนมอร์โฟเจนติก-2 เป็นโกรทแฟกเตอร์ที่มีบทบาทในการเหนี่ยวนำการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์โพรงฟัน (Begue-Kirn และคณะ, 1992; Saito และคณะ, 2004) จากการศึกษาด้วยเทคนิคอีไลซา พบอะซีแมนแนนความเข้มข้น 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถเพิ่มระดับการหลั่งโปรตีนโบนมอร์โฟเจนติก-2 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมในช่วงเวลาที่ทดสอบ 3 วัน และอะซีแมนแนนที่มีความเข้มข้น 2 4 และ 8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถเพิ่มการหลั่งโปรตีนโบนมอร์โฟเจนติก-2 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมในช่วงเวลา 9 และ 12 วัน แสดงว่าอะซีแมนแนนมีแนวโน้มในการเหนี่ยวนำการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์โพรงฟันด้วยการกระตุ้นการหลั่งโปรตีนโบนมอร์โฟเจนติก-2

เอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส มีบทบาทส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์สร้างเนื้อฟันและเหนี่ยวนำการตกตะกอนเกลือแร่ (Yokose และคณะ, 2000) ในสัตว์ทดลองที่มีการทำลายจีน (gene) ของเอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส พบความผิดปกติในการสร้างกระดูกและฟัน (Weiss และคณะ, 1988; Macfarlane และ Swart, 1989) การศึกษาในครั้งนี้พบ อะซีแมนแนนที่มีความเข้มข้น 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถกระตุ้นการทำงานของเอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในเซลล์โพรงฟันได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (3 วัน) แสดงว่าอะซีแมนแนนอาจมีบทบาทในการส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์โพรงฟัน และเหนี่ยวนำการตกตะกอนเกลือแร่ ด้วยเหตุที่มีรายงานพบโปรตีนโบนมอร์โฟเจนติก-2 สามารถกระตุ้นการทำงานของเอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (Saito และคณะ, 2004) ดังนั้นจากผลการทดลองในครั้งนี้ที่พบการเพิ่มการหลั่งโปรตีนโบนมอร์โฟเจนติก-2 และการทำงานของเอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสโดยสารอะซีแมนแนน จึงเป็นข้อสันนิษฐานเกี่ยวกับกลไกการกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์สร้างเนื้อฟัน และกระบวนการตกตะกอนเกลือแร่โดยสารอะซีแมนแนน ผ่านวิถี (pathway) ของโปรตีนโบนมอร์โฟเจนติก-2

เพื่อศึกษาผลของอะซีแมนแนนต่อการสร้างเนื้อฟันในระดับห้องปฏิบัติการ จึงทดสอบเซลล์โพรงฟันด้วยอะซีแมนแนนเป็นเวลาติดต่อกัน 15 วัน ผลการศึกษา พบอะซีแมนแนนที่มีความเข้มข้น 2 4 และ 8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ส่งเสริมปริมาณการตกตะกอนเกลือแร่เมื่อเปรียบเทียบ

กับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าสารอะซีแมนแนนมีผลต่อกลไกการสร้างเนื้อฟันตั้งแต่ระยะการเพิ่มจำนวนเซลล์จนถึงระยะการตกตะกอนเกลือแร่

ในการศึกษานี้ใช้โปรตีนโบนมอร์โฟเจเนติก-2 สังเคราะห์ของมนุษย์ เป็นกลุ่มควบคุมบวก เนื่องจากมีรายงานการกระตุ้นการตกตะกอนเกลือแร่ในเซลล์สร้างกระดูก (osteoblasts) โดยสารโปรตีนโบนมอร์โฟเจเนติก-2 สังเคราะห์ของมนุษย์ (Kim และคณะ, 2003) ผลการทดลองพบการติดสีปุ่มเล็กชัดเจนและเข้มกว่ากลุ่มควบคุมลบ แต่มีความหนาแน่นของจำนวนปุ่มเล็กน้อยกว่าเมื่อสังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องภายใต้เลนส์วัตถุที่มีกำลังขยาย 4 เท่า เมื่อทำละลายสีด้วยเอทิลไพริดีน-เนียมคลอไรด์ พบว่าความเข้มข้นของสีไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะโปรตีนโบนมอร์โฟเจเนติก-2 สังเคราะห์ของมนุษย์ ที่มีความเข้มข้น 100 นาโน-กรัม/มิลลิลิตร กระตุ้นการเติบโตของก้อนตะกอนเกลือแร่ (growth phase) ในเซลล์โพรงฟันมากกว่าการเกิดนิวเคลียสผลึกของการตกตะกอนเกลือแร่ (nucleation phase) ดังนั้นการใช้โกรทแฟกเตอร์อื่น เช่น ทรานสเฟอร์มิงโกรทแฟกเตอร์บีตา-1 เป็นกลุ่มควบคุมบวกอาจมีความเหมาะสมกว่า เพราะเคยมีรายงานถึงความสามารถในการกระตุ้นการตกตะกอนเกลือแร่ในเซลล์โพรงฟัน (Nie และคณะ, 2006)

อย่างไรก็ตาม การศึกษาในห้องปฏิบัติการ มีข้อจำกัดบางประการทำให้ไม่สามารถจำลองสภาพการตอบสนองของเนื้อเยื่อในร่างกาย เพราะไม่มีปัจจัยของระบบหมุนเวียนของเลือด/น้ำเหลือง และภูมิคุ้มกันเข้ามาเกี่ยวข้อง (Freshney, 2005) ดังนั้น ผู้วิจัยจึงขยายการทดสอบสู่ระดับสัตว์ทดลองด้วยการใช้ฟันกรามหนูแรทเป็นต้นแบบศึกษา สาเหตุที่เลือกหนูแรทเพราะเป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมที่มีขนาดเล็ก เลี้ยงดูง่าย และมีลักษณะฟันกรามคล้ายกับมนุษย์

เมื่อทดสอบในสัตว์ทดลองเป็นเวลา 7 วัน กลุ่มอะซีแมนแนนและกลุ่มหลอก ส่วนใหญ่พบการอักเสบเรื้อรังอย่างอ่อน (5 ใน 7 ซี่หรือร้อยละ 71.4 และ 4 ใน 6 ซี่หรือร้อยละ 66.7 ตามลำดับ) ในขณะที่กลุ่มควบคุม โดยมากพบการอักเสบแบบปานกลาง (4 ใน 8 ซี่หรือร้อยละ 50) ซึ่งอาจเป็นผลจากความพิษของโดแคล เนื่องจาก Murray และคณะ (2000) รายงานพบโดแคลมีความเป็นพิษกับเซลล์โพรงฟันในห้องปฏิบัติการ แต่อย่างไรก็ตาม การปิดโพรงฟันด้วยอะซีแมนแนนกลับมีคะแนนของการอักเสบไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมและกลุ่มหลอกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ซึ่งอาจเป็นผลจากปัจจัยของระบบหมุนเวียนของเลือด/น้ำเหลือง

(Freshney, 2005) นอกจากนี้ ในทุกกลุ่ม โดยส่วนใหญ่ยังไม่มีการสร้างเดนทิโนบริดจ์ และการจัดเรียงตัวของเนื้อเยื่ออ่อนยังไม่เป็นปกติ

ลักษณะของเนื้อเยื่ออ่อนของโพรงฟันที่ปิดด้วยอะซีแมนแนนเป็นเวลา 7 วัน มักพบเส้นใยคอลลาเจนจำนวนมาก และพบการแทรกตัวของหลอดเลือดอยู่ในเนื้อเยื่อบริเวณดังกล่าว แสดงให้เห็นถึงความเข้ากันได้ของอะซีแมนแนนต่อเนื้อเยื่อโพรงฟันเมื่อเปรียบเทียบกับไดแคล (กลุ่มควบคุม) ซึ่งมีความเป็นต่างสูง (Prosser และคณะ, 1982) และสอดคล้องกับรายงานของคณะผู้วิจัย ที่พบอะซีแมนแนนเพิ่มระดับการแสดงออกของอาร์เอ็นเอเข้ารหัสของคอลลาเจนชนิดที่ 1 ในเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกและเซลล์เอ็นดอทีเลียล (Jittapiromsak และคณะ, 2005) และส่งเสริมการสร้างวาสคิวลาร์เอ็นโดทีเลียลโกรทแฟกเตอร์จากเซลล์สร้างเส้นใยจากเหงือก (Jettanacheawchankit และคณะ, 2009) อย่างไรก็ตาม การศึกษาการหลังโปรตีนดังกล่าว (วาสคิวลาร์เอ็นโดทีเลียลโกรทแฟกเตอร์ และ คอลลาเจนชนิดที่ 1) ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี (immunohistochemistry) เพื่อยืนยันแนวความคิดจึงเป็นสิ่งที่น่าศึกษาต่อไป

เมื่อทดสอบเป็นเวลา 28 วัน โพรงฟันที่ปิดด้วยอะซีแมนแนนพบการอักเสบน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มหลอก แต่อย่างไรก็ตาม พบไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) สำหรับการสร้างเดนทิโนบริดจ์ พบโพรงฟันที่ปิดด้วยอะซีแมนแนนมีการสร้างเดนทิโนบริดจ์ปิดสมบูรณ์มากกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มหลอกได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โพรงฟันที่ปิดด้วยอะซีแมนแนนโดยมากพบเดนทิโนบริดจ์ปิดสมบูรณ์ (5 ใน 8 ซี่หรือร้อยละ 62.5) ลักษณะเป็นเนื้อเยื่อแข็งชนิดเนื้อเดียวกัน ในขณะที่กลุ่มควบคุม ไม่มีซี่ใดที่พบเดนทิโนบริดจ์ปิดสมบูรณ์ (0 ใน 8 ซี่) โดยมากเป็นการปิดบางส่วน (5 ใน 8 ซี่หรือร้อยละ 62.5) เป็นเนื้อเยื่อแข็ง ที่มีเนื้อผสมของเศษเซลล์และไดแคล ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมา (Cox และคณะ, 1996; Kitasako, Shibata, และ Takami, 2006; Kitasako, Ikeda, และ Takami, 2008) ส่วนกลุ่มหลอก (ฟูจิไลนิงแอลซี) ไม่มีซี่ใดที่พบเดนทิโนบริดจ์ปิดสมบูรณ์ (0 ใน 7 ซี่) พบเดนทิโนบริดจ์ปิดเกือบสมบูรณ์เป็นส่วนใหญ่ (5 ใน 7 ซี่ หรือร้อยละ 71.4) แต่อย่างไรก็ตาม เป็นการเกิดเดนทิโนบริดจ์ที่มีลักษณะที่ไม่แน่นอน ส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นเดนทิโนเมทริกซ์ที่ไม่มีการตกตะกอนเกลือแร่ (4 ใน 7 ซี่ หรือร้อยละ 57.1) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Costa และคณะ (2003) ที่พบลักษณะเดนทิโนเมทริกซ์ภายในโพรงฟันที่ปิดด้วยกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ชนิดดัดแปรด้วยเรซินในหนูแรทเป็นเวลา 60 วัน สำหรับการจัดเรียงตัวของเนื้อเยื่ออ่อน พบอะซีแมนแนน (4 ใน 8 ซี่หรือร้อยละ 50) ส่งเสริมการจัดเรียงตัวของเนื้อเยื่ออ่อนให้กลับสู่สภาพปกติได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (0 ใน 8 ซี่) และกลุ่มหลอก (0 ใน 7 ซี่) ($p < 0.05$)

อะซีแมนแนนช่วยเร่งกระบวนการหายภายในโพรงฟัน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่พบอะซีแมนแนนสามารถเร่งการหายของบาดแผลในฝ้าเท้าของหนูทดลอง (Parnell, Chinnah, และ Tizard, 2002) และเร่งการหายของบาดแผลที่เพดานปากของหนูทดลอง (Jettanacheawchankit และคณะ, 2009) สำหรับกลไกการกระตุ้นการหายภายในโพรงฟัน ได้แก่ การเร่งการจัดเรียงตัวของเนื้อเยื่ออ่อนให้กลับคืนสู่สภาพปกติ เพิ่มการสร้างเส้นใยคอลลาเจน และเร่งการสร้างเดนทินบริดจ์นั้นยังไม่มีเป็นที่ทราบแน่ชัด และยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน อย่างไรก็ตาม มีข้อสันนิษฐานว่ากลไกการกระตุ้นการหายอาจมีความเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์โพรงฟัน และการหลังโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตกตะกอนเกลือแร่

ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยไม่สามารถอธิบายกลไกเชิงลึกของอะซีแมนแนนต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ การเปลี่ยนสภาพเซลล์ และการตกตะกอนเกลือแร่ จากการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง มีการค้นพบตัวรับแมนโนส (mannose receptor) บนผิวเซลล์สร้างเส้นใย ที่สามารถจับชิ้นส่วนของแมนโนสและนำเข้าไปในเซลล์ยูไลโซโซม (East และ Isacke, 2002) และอาจถูกแปรสภาพต่อเป็นโมเลกุลที่กระตุ้นปัจจัยการถอดรหัส (transcription factor) บางอย่างที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนเซลล์ ความเป็นไปได้อีกประการหนึ่งคือ อะซีแมนแนนเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ คล้ายเมทริกซ์นอกเซลล์ ทำให้เซลล์โพรงฟันอยู่ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ การเปลี่ยนสภาพเซลล์ และการตกตะกอนเกลือแร่ เหมือนกับเดนทินเมทริกซ์ที่สามารถเหนี่ยวนำการเปลี่ยนสภาพเซลล์ และการตกตะกอนเกลือแร่ของเนื้อฟัน (Goldberg และคณะ, 1995)

รูปแบบของสารอะซีแมนแนนที่ใช้ในการทดลองในหนูครั้งนี้เป็นรูปแบบพรีซดราย ซึ่งมีกรรมวิธีเตรียมไม่ยุ่งยาก และสะดวกในการใช้งานเมื่อรวมผลที่ได้จากการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการและสัตว์ทดลอง ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ในการนำสารอะซีแมนแนนรูปแบบพรีซดรายมาใช้ในคลินิกทันตกรรม

ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาเกี่ยวกับกลไกการกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์สร้างเนื้อฟัน และกระบวนการตกตะกอนเกลือแร่โดยสารอะซีแมนแนน ได้แก่ กลไกวิถีของโปรตีนโบนมอร์โฟเจเนติก-2 และตัวรับแมนโนส
2. การศึกษาการกระตุ้นการหลั่งโปรตีนวาคูลาร์เอ็นโดธิเลียลโกรทแฟกเตอร์ และคอลลาเจนชนิดที่ 1 โดยสารอะซีแมนแนนในฟันกรามของหนู ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี
3. การนำอะซีแมนแนนมาทดสอบประสิทธิภาพในการสร้างเนื้อฟันซ่อมแซมในอาสาสมัคร

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

พีชนิการ์ หล้าดวงดี. 2549. ผลของสารโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดจากส่วนฟันของว่านหางจระเข้ต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์และระดับอาร์เอ็นเอของยีนเดนทินเมทริกซ์โปรตีน 1 ในเซลล์สร้างเส้นใยของเนื้อเยื่อในโพรงฟันมนุษย์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. ภาควิชาทันตกรรมสำหรับเด็ก คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

- Baba, O., Qin, C., Brunn, J. C., Wygant, J. N., McIntyre, B. W., and Butler, W. T. 2004. Colocalization of dentin matrix protein 1 and dentin sialoprotein at late stages of rat molar development. Matrix Biol 23: 371-379.
- Barnes, I. E., and Kidd, E. A. 1979. Disappearing Dycal. Br Dent J 147: 111.
- Beertsen, W., and van den Bos, T. 1992. Alkaline phosphatase induces the mineralization of sheets of collagen implanted subcutaneously in the rat. J Clin Invest 89: 1974-1980.
- Begue-Kirn, C., Smith, A. J., Ruch, J. V., Wozney, J. M., Purchio, A., Hartmann, D., and Lesot, H. 1992. Effects of dentin proteins, transforming growth factor beta 1 (TGF beta 1) and bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on the differentiation of odontoblast in vitro. Int J Dev Biol 36: 491-503.
- Bergenholtz, G. 1990. Pathogenic mechanisms in pulpal disease. J Endod 16: 98-101.
- Bergenholtz, G. 1991. Iatrogenic injury to the pulp in dental procedures: aspects of pathogenesis, management and preventive measures. Int Dent J 41: 99-110.
- Conover, M. A., and Urist, M. R. 1979. Transmembrane bone morphogenesis by implants of dentin matrix. J Dent Res 58: 1911.
- Costa, C. A., Oliveira, M. F., Giro, E. M., and Hebling, J. 2003. Biocompatibility of resin-based materials used as pulp-capping agents. Int Endod J 36: 831-839.

- Cox, C. F., Bergenholtz, G., Fitzgerald, M., Heys, D. R., Heys, R. J., Avery, J. K., and Baker, J. A. 1982. Capping of the dental pulp mechanically exposed to the oral microflora -- a 5 week observation of wound healing in the monkey. J Oral Pathol 11: 327-339.
- Cox, C. F., Subay, R. K., Ostro, E., Suzuki, S. and Suzuki, S. H. 1996. Tunnel defects in dentin bridges: their formation following direct pulp capping. Oper Dent 21: 4-11.
- Cvek, M. 1978. A clinical report on partial pulpotomy and capping with calcium hydroxide in permanent incisors with complicated crown fracture. J Endod 4: 232-237.
- Dammaschke, T. 2008. The history of direct pulp capping. J Hist Dent 56: 9-23.
- Davidson, C. L., and Mjör, I. A. 1999. Advances in glass-ionomer cements. Chicago: Quintessence Publishing.
- D'Arcangelo, C., Di Maio, F. D., Prosperi, G. D., Conte, E., Baldi, M., and Caputi, S. 2007. A preliminary study of healing of diode laser versus scalpel incisions in rat oral tissue: a comparison of clinical, histological, and immunohistochemical results. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 103: 764-773.
- Decup, F., Six, N., Palmier, B., Buch, D., Lasfargues, J. J., Salih, E., and Goldberg, M. 2000. Bone sialoprotein-induced reparative dentinogenesis in the pulp of rat's molar. Clin Oral Investig 4: 110-119.
- Djeraba, A., and Quere, P. 2000. In vivo macrophage activation in chickens with Acemannan, a complex carbohydrate extracted from Aloe vera. Int J Immunopharmacol 22: 365-372.
- East, L., and Isacke, CM. 2002. The mannose receptor family. Biochim Biophys Acta 1572: 364-386.
- El-Araby, A., and Al-Jabab, A. 2005. The influence of some dentin primers on calcium hydroxide lining cement. J Contemp Dent Pract 15: 1-9.
- Feit, J., Metelova, M., and Sindelka, Z. 1970. Incorporation of 3H thymidine into damaged pulp of rat incisors. J Dent Res 49: 783-786.

- Fermentia A, G.-P. P., Simal S, and Rossello C. 2003. Effects of heatment and dehydration on bioactive polysaccharide acemannan and cell wall polymer from *Aloe barbadensis* Miller. carbohydr Polym 51: 397-405.
- Fitzgerald, M. 1979. Cellular mechanics of dentinal bridge repair using 3H-thymidine. J Dent Res 58: 2198-2206.
- Fitzgerald, M., Chiego, D. J., Jr., and Heys, D. R. 1990. Autoradiographic analysis of odontoblast replacement following pulp exposure in primate teeth. Arch Oral Biol 35: 707-715.
- Fogleman, R. W., Chapdelaine, J. M., Carpenter, R. H., and McAnalley, B. H. 1992. Toxicologic evaluation of injectable acemannan in the mouse, rat and dog. Vet Hum Toxicol 34: 201-205.
- Fogleman, R. W., Shellenberger, T. E., Balmer, M. F., Carpenter, R. H., and McAnalley, B. H. 1992. Subchronic oral administration of acemannan in the rat and dog. Vet Hum Toxicol 34: 144-147.
- Freshney, R. I. 2005. Advantages of tissue culture. In R. I. Freshney (ed.), Culture of animal cells: A manual of basic technique, pp. 6-7. New Jersey: John Wiley & Sons.
- Fux, C., Mitta, B., Kramer, B. P., and Fussenegger, M. 2004. Dual-regulated expression of C/EBP-alpha and BMP-2 enables differential differentiation of C2C12 cells into adipocytes and osteoblasts. Nucleic Acids Res[Online]. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?tool=pubmed&pubmedid=14704358>[2009, May 8]
- Garimella, R., Bi, X., Anderson, H. C., and Camacho, N. P. 2006. Nature of phosphate substrate as a major determinant of mineral type formed in matrix vesicle-mediated in vitro mineralization: An FTIR imaging study. Bone 38: 811-817.
- Genge, B. R., Sauer, G. R., Wu, L. N., McLean, F. M., and Wuthier, R. E. 1988. Correlation between loss of alkaline phosphatase activity and accumulation of calcium during matrix vesicle-mediated mineralization. J Biol Chem 263: 18513-18519.

- Ghosh-Choudhury, N., Abboud, S. L., Chandrasekar, B., and Ghosh Choudhury, G. 2003. BMP-2 regulates cardiomyocyte contractility in a phosphatidylinositol 3 kinase-dependent manner. FEBS Lett 544: 181-184.
- Goldberg M, Septier D, Lecolle S, Chardin H, Quintana MA, Acevedo AC, et al. 1995. Dental mineralization. Int J Dev Biol 39: 93-110.
- Goseki, M., Oida, S., Nifuji, A. and Sasaki, S. 1990. Properties of alkaline phosphatase of the human dental pulp. J Dent Res 69: 909-912.
- Goseki, M., Oida, S., Ogata, Y., and Sasaki, S. 1995. Immunological differentiation of human tissue-nonspecific type alkaline phosphatases by a monoclonal antibody to the enzyme of human osteoblast-like cells. Bull Tokyo Med Dent Univ 42: 51-56.
- Gu, K., Smoke, R. H., and Rutherford, R. B. 1996. Expression of genes for bone morphogenetic proteins and receptors in human dental pulp. Arch Oral Biol 41: 919-923.
- Hanks, C. T., Bergenholtz, G., and Kim, J. S. 1983. Protein synthesis in vitro, in the presence of Ca(OH)₂-containing pulp-capping medicaments. J Oral Pathol 12: 356-365.
- Hao, J., Zou, B., Narayanan, K., and George, A. 2004. Differential expression patterns of the dentin matrix proteins during mineralized tissue formation. Bone 34: 921-932.
- Harris, C., Pierce, K., King, G., Yates, K. M., Hall, J., and Tizard, I. 1991. Efficacy of acemannan in treatment of canine and feline spontaneous neoplasms. Mol Biother 3: 207-213.
- Heikinheimo, K. 1994. Stage-specific expression of decapentaplegic-Vg-related genes 2, 4, and 6 (bone morphogenetic proteins 2, 4, and 6) during human tooth morphogenesis. J Dent Res 73: 590-597.
- Heyeraas, K. J., Sveen, O. B., and Mjor, I. A. 2001. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 3: Pulpal inflammation and its sequelae. Quintessence Int 32: 611-625.
- Hu, C. C., Zhang, C., Qian, Q., and Tatum, N. B. 1998. Reparative dentin formation in rat molars after direct pulp capping with growth factors. J Endod 24: 744-751.

- Hwas, M., and Sandrik, J.L. 1984. Acid and water solubility and strength of calcium hydroxide bases. J Am Dent Assoc 108: 46-48.
- Iohara, K., Nakashima, M., Ito, M., Ishikawa, M., Nakasima, A., and Akamine, A. 2004. Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2. J Dent Res 83: 590-595.
- Jettanacheawchankit, S., Sasithanasate, S., Sangvanich, P., Banlunara, W., and Thunyakitpisal, P. (2009). Acemannan stimulates gingival fibroblast proliferation; expressions of keratinocyte growth factor-1, vascular endothelial growth factor, and type I collagen; and wound healing. J Pharmacol Sci 109: 525-531.
- Jittapiromsak, N., Musikapong, P., Jettanacheawchankit, S., and Thunyakitpisal, P. 2005. Effects of acemannan on proliferation and type I collagen mRNA expression in primary gingival fibroblasts and periodontal ligament cells. Dentistry for the Nano-Informic-Genomic-Technology Era, pp. 517-532.
- Jittapiromsak, N., Jettanacheawchankit, S., Larduangdee, P., Sangvanich, P., and Thunyakitpisal, P. D. 2007. Effect of acemannan on BMP-2 expression in primary pulpal fibroblasts and periodontal fibroblasts, in vitro study. J Oral Tissue Engin 4: 149-154.
- Karaca, K., Sharma, J. M., and Nordgren, R. 1995. Nitric oxide production by chicken macrophages activated by Acemannan, a complex carbohydrate extracted from Aloe vera. Int J Immunopharmacol 17: 183-188.
- Kenneth, H.M., and Harold, G.E. 2002. Seltzer and Bender's Dental Pulp. Chicago: Quintessence Publishing.
- Kitasako, Y., Shibata, S., and Tagami, J. 2006. Migration and particle clearance from hard-setting Ca(OH)₂ and self-etching adhesive resin following direct pulp capping. Am J Dent 19: 370-375.
- Kitasako, Y., Ikeda, M., and Tagami, J. 2008. Pulpal responses to bacterial contamination following dentin bridging beneath hard-setting calcium hydroxide and self-etching adhesive resin system. Dent Traumatol 24: 201-206.
- Kim, D. J., Moon, S. H., Kim, H., Kwon, U. H., Park, M. S., Hahn, S. B., and Lee, H. M. (2003). Bone morphogenetic protein-2 facilitates expression of chondrogenic,

- not osteogenic, phenotype of human intervertebral disc cells. Spine 28: 2679-2684.
- King, G. K., Yates, K. M., Greenlee, P. G., Pierce, K. R., Ford, C. R., McAnalley, B. H., and Tizard, I. R. 1995. The effect of Acemannan Immunostimulant in combination with surgery and radiation therapy on spontaneous canine and feline fibrosarcomas. J Am Anim Hosp Assoc 31: 439-447.
- Parnell, L. K. S., Chinnah, A. D., and Tizard, I. R. 2002. Use of Mouse Footpad Model to Test Effectiveness of Wound Dressings. Wounds[Online]. Available from: <http://www.woundsresearch.com/article/551>[2009, Apr 22]
- Lee, J. K., Lee, M. K., Yun, Y. P., Kim, Y., Kim, J. S., Kim, Y. S., Han, S. S., and Lee, C. K. 2001. Acemannan purified from Aloe vera induces phenotypic and functional maturation of immature dendritic cells. Int Immunopharmacol 1: 1275-1284.
- Linde, A., and Goldberg, M. 1993. Dentinogenesis. Crit Rev Oral Biol Med 4: 679-728.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N.J., Farr, A. L., and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 193: 265-275.
- Lundgren, T., and Linde, A. 1992. Calcium ion transport kinetics during dentinogenesis: effects of disrupting odontoblast cellular transport systems. Bone Miner 19: 31-44.
- McAnalley, B. H. 1993. Process preparation of aloe products. European patent EP0356484[Online]. Available from: <http://www.freepatentsonline.com/EP0356484B1.html>[2008, Feb 5]
- Macfarlane, J. D., Swart, J. G. 1989. Dental aspects of hypophosphatasia: a case report, family study, and literature review. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 67: 521-526.
- Matsui, S., Tsujimoto, Y., and Matsushima, K. 2007. Stimulatory effects of hydroxyl radical generation by Ga-Al-As laser irradiation on mineralization ability of human dental pulp cells. Biol Pharm Bull 30: 27-31.
- Mjör, I. A. 2002. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 7: The exposed pulp. Quintessence Int 33: 113-135.
- Murray, P. E., Lumley, P. J., Ross, H. F., and Smith, A. J. 2000. Tooth slice organ culture for cytotoxicity assessment of dental materials. Biomaterials 21: 1711-1721.

- Murray, P. E., Hafez, A. A., Smith, A. J., and Cox, C. F. 2002. Hierarchy of pulp capping and repair activities responsible for dentin bridge formation. Am J Dent 15: 236-243.
- Nagata, A., Komoda, T., and Sakagishi, Y. 1989. Relationship between the uptake of calcium or phosphorus and alkaline phosphatase activity induced by certain modulators in rat organs. Calcif Tissue Int 45: 173-181.
- Nakade, O., Koyama, H., Arai, J., Arijji, H., Takada, J., and Kaku, T. 1999. Stimulation by low concentrations of fluoride of the proliferation and alkaline phosphatase activity of human dental pulp cells in vitro. Arch Oral Biol 44: 89-92.
- Nakamura, Y., Hammarstrom, L., Lundberg, E., Ekdahl, H., Matsumoto, K., Gestrelus, S., and Lyngstadaas, S. P. 2001. Enamel matrix derivative promotes reparative processes in the dental pulp. Adv Dent Res 15: 105-107.
- Nakamura, Y., Slaby, I., Spahr, A., Pezeshki, G., Matsumoto, K., and Lyngstadaas, S. P. 2006. Ameloblastin Fusion Protein Enhances Pulpal Healing and Dentin Formation in Porcine Teeth. Calcif Tissue Int 78: 278-284.
- Nakashima, M. 1994. Induction of dentin formation on canine amputated pulp by recombinant human bone morphogenetic proteins (BMP)-2 and -4. J Dent Res 73: 1515-1522.
- Ni, Y., Turner, D., Yates, K. M., and Tizard, I. 2004. Isolation and characterization of structural components of Aloe vera L. leaf pulp. Int Immunopharmacol 4: 1745-1755.
- Nie, X., Tian, W., Zhang, Y., Chen, X., Dong, R., Jiang, M., Chen, F., and Jin, Y. 2006. Induction of transforming growth factor-beta 1 on dentine pulp cells in different culture patterns. Cell Biol Int 30: 295-300.
- Poor, M. R., Hall, J. E., and Poor, A. S. 2002. Reduction in the incidence of alveolar osteitis in patients treated with the SaliCept patch, containing Acemannan hydrogel. J Oral Maxillofac Surg 60: 374-379.
- Prosser, H. J., Groffman, D. M., and Wilson, A. D. 1982. The effect of composition on the erosion properties of calcium hydroxide cements. J Dent Res 61: 1431-1435.

- Roberts, D. B., and Travis, E. L. 1995. Acemannan-containing wound dressing gel reduces radiation-induced skin reactions in C3H mice. Int J Radiat Oncol Biol Phys 32: 1047-1052.
- Ruch, J. V., Lesot, H., and Begue-Kirn, C. 1995. Odontoblast differentiation. Int J Dev Biol 39: 51-68.
- Rutherford, R. B., Wahle, J., Tucker, M., Rueger, D., and Charette, M. 1993. Induction of reparative dentine formation in monkeys by recombinant human osteogenic protein-1. Arch Oral Biol 38: 571-576.
- Saito, T., Ogawa, M., Hata, Y., and Bessho, K. 2004. Acceleration effect of human recombinant bone morphogenetic protein-2 on differentiation of human pulp cells into odontoblasts. J Endod 30: 205-208.
- Sayegh, F. S. 1967. H 3-proline and tetracycline as marking agents in the study of reparative dentine formation. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 23: 221-229.
- Sayegh, F. S., and Rochester, N. Y. 1969. The dentinal bridge in pulp-involved teeth. I. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 28: 579-586.
- Schour, I., and Massler, M. 1949. The rat in laboratory investigation. New York: Hafner Press A division of Macmillan Publishing.
- Schroder, U., and Granath, L. E. 1971. Early reaction of intact human teeth to calcium hydroxide following experimental pulpotomy and its significance to the development of hard tissue barrier. Odontol Revy 22: 379-395.
- Schroder, U. 1978. A 2-year follow-up of primary molars, pulpotomized with a gentle technique and capped with calcium hydroxide. Scand J Dent Res 86: 273-278.
- Schroder, U. 1985. Effects of calcium hydroxide-containing pulp-capping agents on pulp cell migration, proliferation, and differentiation. J Dent Res 64: 541-548.
- Six, N., Lasfargues, J. J., and Goldberg, M. 2000. In vivo study of the pulp reaction to Fuji IX, a glass ionomer cement. J Dent 28: 413-422.
- Smith, A. J., Selzer, S., and Bender, I. B. 2002. Dental Pulp. 3rd ed. Illinois: Quintessence Publishing.
- Stanley, H. R., and Lundy, T. 1972. Dycal therapy for pulp exposures. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 34: 818-827.

- Stuart, R. W., Lefkowitz, D. L., Lincoln, J. A., Howard, K., Gelderman, M. P., and Lefkowitz, S. S. 1997. Upregulation of phagocytosis and candidicidal activity of macrophages exposed to the immunostimulant acemannan. Int J Immunopharmacol 19: 75-82.
- Tai-Nin Chow, J., Williamson, D. A., Yates, K. M., and Goux, W. J. 2005. Chemical characterization of the immunomodulating polysaccharide of Aloe vera L. Carbohydr Res 340: 1131-1142.
- Tai-Nin Chow, J., Williamson, D. A., Yates, K. M., and Goux, W. J. 2007. Chemical characterization of the immunomodulating polysaccharide of Aloe vera L.[Online]. (n.d.). Available from: [http://www.isac.org/AloeStructure080604.pdf\[2007, Feb 22\]](http://www.isac.org/AloeStructure080604.pdf[2007, Feb 22])
- Takeda, K., Oida, S., Goseki, M., Iimura, T., Maruoka, Y., Amagasa, T., and Sasaki, S. 1994. Expression of bone morphogenetic protein genes in the human dental pulp cells. Bone 15: 467-470.
- Takiguchi, T., Kobayashi, M., Suzuki, R., Yamaguchi, A., Isatsu, K., Nishihara, T., Nagumo, M., and Hasegawa, K. (1998). Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblast differentiation and suppresses matrix metalloproteinase-1 production in human bone cells isolated from mandibulae. J Periodontal Res 33: 476-485.
- Talmadge, J., Chavez, J., Jacobs, L., Munger, C., Chinnah, T., Chow, J. T., Williamson, D., and Yates, K. 2004. Fractionation of Aloe vera L. inner gel, purification and molecular profiling of activity. Int Immunopharmacol 4: 1757-1773.
- Tarim, B., Hafez, A. A., and Cox, C. F. 1998. Pulpal response to a resin-modified glass-ionomer material on nonexposed and exposed monkey pulps. Quintessence Int 29: 535-542.
- Theodorsson-Norheim, E. 1986. Kruskal-Wallis test: BASIC computer program to perform nonparametric one-way analysis of variance and multiple comparisons on ranks of several independent samples. Comput Methods Programs Biomed 23: 57-62.
- Thesleff, I. 2003. Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. J Cell Sci 116: 1647-1648.

- Thomas, D. R., Goode, P. S., LaMaster, K., and Tennyson, T. 1998. Acemannan hydrogel dressing versus saline dressing for pressure ulcers. A randomized, controlled trial. Adv Wound Care 11: 273-276.
- Turner, D. F., Marfurt, C. F., and Sattelberg, C. 1989. Demonstration of physiological barrier between pulpal odontoblasts and its perturbation following routine restorative procedures: a horseradish peroxidase tracing study in the rat. J Dent Res 68: 1262-1268.
- Turner, C. E., Williamson, D. A., Stroud, P. A., and Talley, D. J. 2004. Evaluation and comparison of commercially available Aloe vera L. products using size exclusion chromatography with refractive index and multi-angle laser light scattering detection. Int Immunopharmacol 4: 1727-1737.
- Wang, Y. H., Liu, Y., Maye, P., and Rowe, D. W. 2006. Examination of mineralized nodule formation in living osteoblastic cultures using fluorescent dyes. Biotechnol Prog 22: 1697-1701.
- Weiss MJ, Cole DE, Ray K, Whyte MP, Lafferty MA, Mulivor RA, and Harris, S. (1988). A missense mutation in the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene causing a lethal form of hypophosphatasia. Proc Natl Acad Sci U S A. 85: 7666-7669.
- Womble, D., and Helderman, J. H. 1988. Enhancement of allo-responsiveness of human lymphocytes by acemannan (Carrisyn). Int J Immunopharmacol 10: 967-974.
- Womble, D., and Helderman, J. H. 1992. The impact of acemannan on the generation and function of cytotoxic T-lymphocytes. Immunopharmacol Immunotoxicol 14: 63-77.
- Yamamura, T. 1985. Differentiation of pulpal cells and inductive influences of various matrices with reference to pulpal wound healing. J Dent Res 64: 530-540.
- Yasuda, Y., Ogawa, M., Arakawa, T., Kadowaki, T., and Saito, T. 2008. The effect of mineral trioxide aggregate on the mineralization ability of rat dental pulp cells: an in vitro study. J Endod 34: 1057-1060.

- Yokose, S., Kadokura, H., Tajima, Y., Fujieda, K., Katayama, I., Matsuoka, T., and Katayama, T. 2000. Establishment and characterization of a culture system for enzymatically released rat dental pulp cells. Calcif Tissue Int 66: 139-144.
- Zhang, L., and Tizard, I. R. 1996. Activation of a mouse macrophage cell line by acemannan: the major carbohydrate fraction from Aloe vera gel. Immunopharmacology 35: 119-128.
- Zhang, Q., Wang, X., Chen, Z., Liu, G., and Chen, Z. 2007. Semi-quantitative RT-PCR analysis of LIM mineralization protein 1 and its associated molecules in cultured human dental pulp cells. Arch Oral Biol 58: 720-726.
- Zoricic, S., Maric, I., Bobinac, D., and Vukicevic, S. 2003. Expression of bone morphogenetic proteins and cartilage-derived morphogenetic proteins during osteophyte formation in humans. J Anat 202: 269-277.

ภาคผนวก ก

ตารางที่ 1 ก องค์ประกอบ (ร้อยละโดยโมล) ของแฟรกชันที่ละลายน้ำได้ของสารสกัดจากคณะผู้วิจัย และของอะซีแมนแนนจากห้องปฏิบัติการคารริงตัน หลังจากผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วยกรดไตรฟลูออโรอะซิติก วิเคราะห์ด้วยเทคนิคกาซโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโทรสโกปี

ชนิดของน้ำตาล	อะราบิโนส (Arabinose)	แรมนโนส (Rhamnose)	ฟรุกโตส (Fructose)	ไซโลส (Xylose)	แมนโนส (Mannose)	กลูโคส (Glucose)	กาแลคโตส (Galactose)	กรดกาแลคทูโรนิก (Galacturonic acid)	กรดกลูคูโรนิก (Glucuronic acid)
สารสกัดจากคณะผู้วิจัย	0.7	0.2	0.34	0.7	77.16	15.3	4.9	0.7	ND ¹
อะซีแมนแนนจากห้องปฏิบัติการคารริงตัน	0.3	0.1	0.21	0.5	82.7	12.9	3.4	0.2	ND ¹

¹ ND หมายถึง ไม่สามารถตรวจพบ

ตารางที่ 2 ก การวิเคราะห์อินฟราเรดสเปกตรัมของหมู่ทำหน้าที่ในสารสกัดจากคณะผู้วิจัย และอะซีแมนแนนจากห้องปฏิบัติการคารริงตัน

หมู่ทำหน้าที่	เลขที่คลื่น (ซ.ม. ⁻¹)	
	สารสกัดจากคณะผู้วิจัย	อะซีแมนแนนจากห้องปฏิบัติการคารริงตัน
O-H stretch	3435.89	3422.1
C-H stretch	2925.76	2928.3
C=O stretch (acetyl)	1741.81	1740.0
C=O stretch (amide I)	1643.67	1649.3
N-H deformation (amide II)	1433.92	1541.3
C-H bending	1376.06	1377.3
C-O-C stretch (acetyl)	1243.41	1250.0
C-O stretch (pyranose ring)	1067.37	1066.8

ตารางที่ 3 ก ข้อมูลดิบของร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในเซลล์โพรงฟันที่ทดสอบกับอะซีแมน-แนนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อใช้วิธีเอ็มทีที

ตัวอย่างที่	ความเข้มข้นของอะซีแมนแนน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)					
	0	0.5	1	2	4	8
1	102.21	120.88	147.17	152.40	144.49	144.20
2	102.64	126.11	136.00	150.57	151.70	161.17
3	95.15	116.92	143.36	154.52	169.51	168.80

ตารางที่ 4 ก ข้อมูลดิบของระดับการหลังโปรตีนโบนมอร์โฟเจเนติก-2 ในเซลล์โพรงฟัน ที่ทดสอบกับอะซีแมนแนน ณ จุดเวลาต่าง ๆ เมื่อใช้เทคนิคอีไลซา

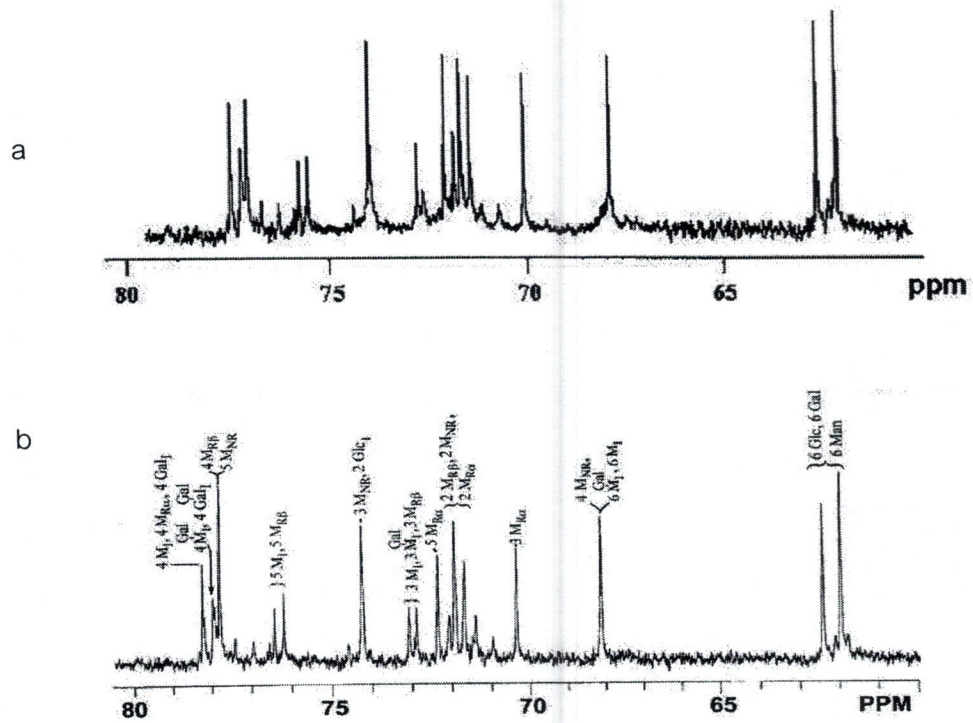
วันที่	ตัวอย่างที่	ความเข้มข้นของอะซีแมนแนน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)					
		0	0.5	1	2	4	8
3	1	102.781	101.748	102.264	107.560	116.317	112.845
	2	103.302	101.492	102.781	106.748	116.611	107.560
	3	103.041	100.726	102.522	106.211	120.198	103.041
	4	101.492	102.006	103.041	110.869	123.271	107.289
9	1	100.726	101.492	103.824	129.656	136.715	117.201
	2	102.522	101.236	100.981	131.967	137.407	116.611
	3	102.781	102.006	102.006	140.211	139.858	120.502
	4	101.748	101.748	104.614	149.724	133.307	122.960
12	1	94.047	96.930	95.487	126.231	135.171	126.231
	2	95.487	99.823	102.724	118.831	133.677	126.231
	3	94.047	104.178	107.092	136.667	142.669	130.693
	4	88.308	89.739	102.724	129.204	136.667	114.414

ตารางที่ 5 ก ข้อมูลดิบของร้อยละของอัตราการทำงานของเอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในเซลล์
โพรงพื้นที่ทดสอบกับอะซีแมนแนนเป็นเวลา 3 วัน เมื่อใช้วิธีทางชีวเคมี

ตัวอย่างที่	ความเข้มข้นของอะซีแมนแนน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)					
	0	0.5	1	2	4	8
1	89.16	92.78	98.74	107.50	136.56	108.49
2	102.66	113.87	88.33	113.72	147.28	106.32
3	91.40	98.24	98.93	141.11	154.14	107.71
4	116.78	error	96.51	108.61	135.85	117.78

ตารางที่ 6 ก ข้อมูลดิบของร้อยละของการตกตะกอนเกลือแร่ในเซลล์โพรงพื้นที่ทดสอบกับอะซี
แมนแนนเป็นเวลา 15 วัน เมื่อย้อมด้วยอะลิซาริน เรด

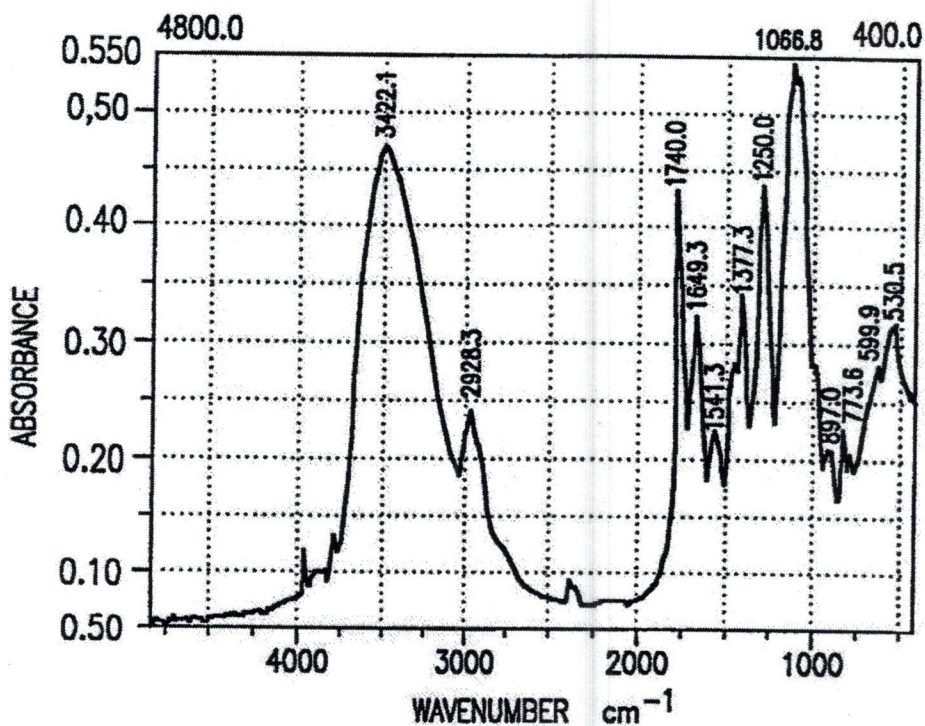
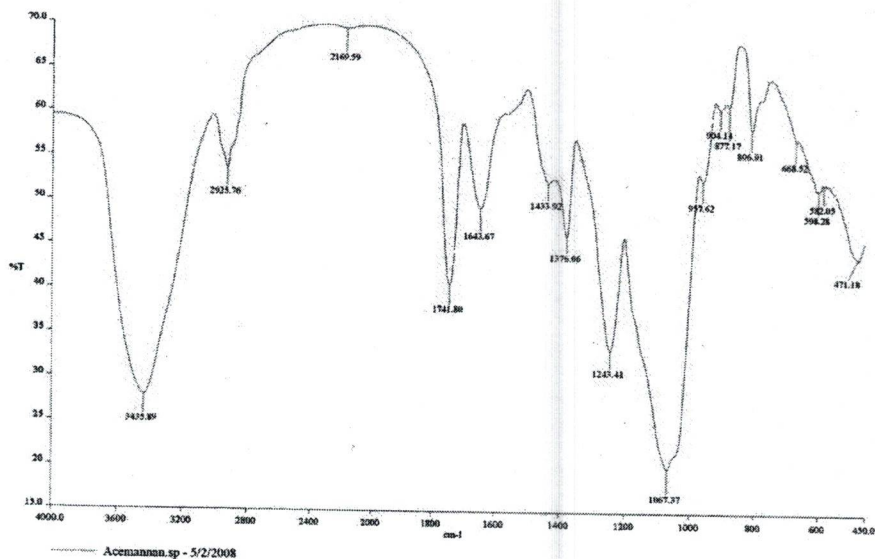
ตัวอย่างที่	กลุ่มควบคุมลบ	ความเข้มข้นของอะซีแมนแนน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)			
		โปรตีนโบนมอร์โฟเจ- เนติก-2 สังเคราะห์ ของมนุษย์	อะซีแมนแนน เข้มข้น 2 มก./มล.	อะซีแมนแนน เข้มข้น 4 มก./มล.	อะซีแมนแนน เข้มข้น 8 มก./มล.
1	0.100	0.060	0.232	0.503	0.419
2	0.093	0.049	0.385	0.515	0.510
3	0.062	0.040	0.447	0.512	0.604
4	0.067	0.055	0.424	0.496	0.489



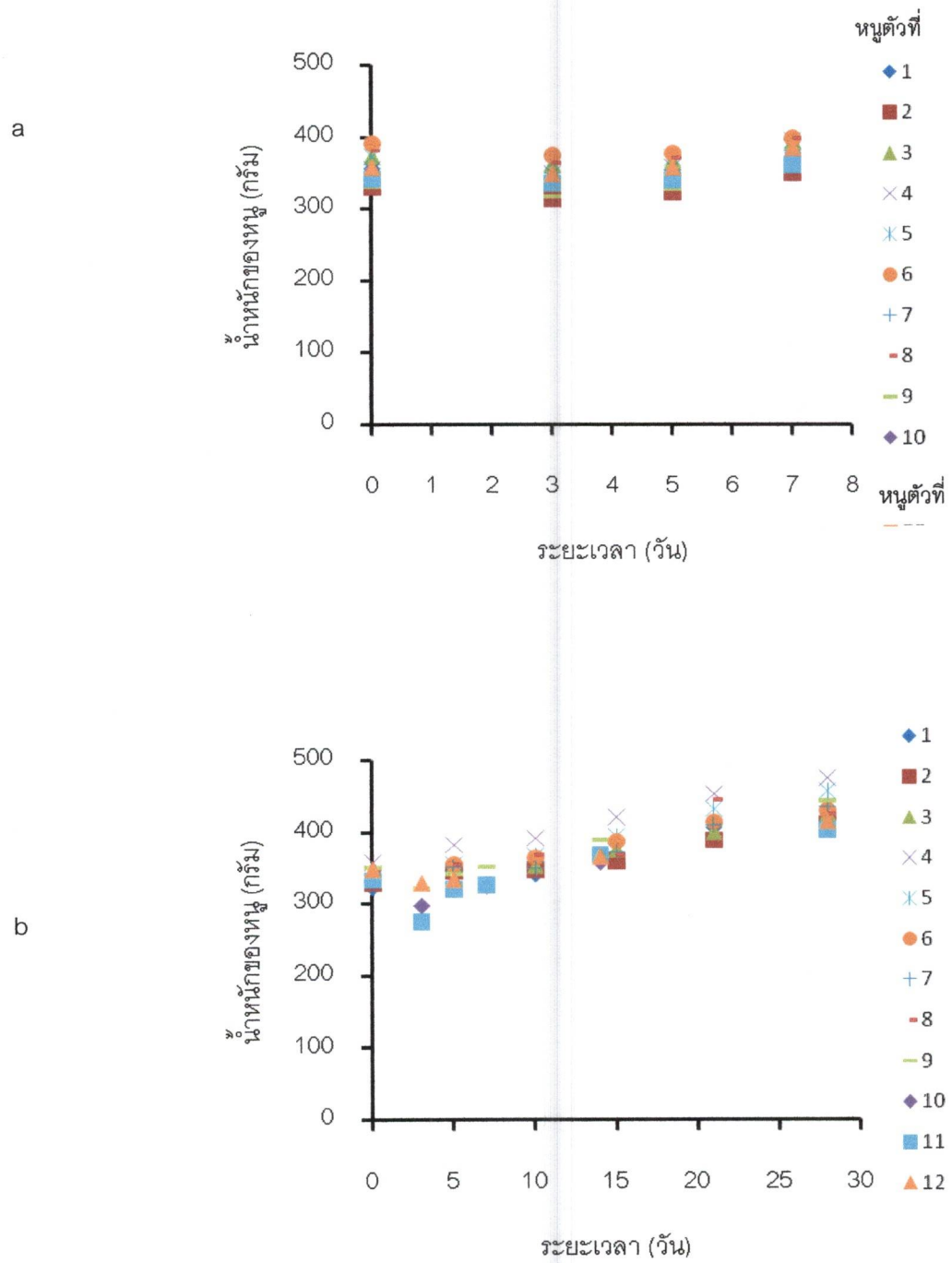
รูปที่ 1 ก สเปกตรัมของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวจากกาารวิเคราะห์ด้วยคาร์บอนเทอร์ที่นินิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (a) สเปกตรัมของคณะผู้วิจัย (b) สเปกตรัมของสารอะซีแมนแนนจากห้องปฏิบัติการคารริงตัน

Scientific and Technological Research Equipment Centre
Chulalongkorn University

Fourier Transform Infrared Spectrometer, PerkinElmer (Spectrum One)



รูปที่ 2 ก สเปกตรัมของหมูทำหน้าทีจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี
(a) สเปกตรัมของคณะผู้วิจัย (b) สเปกตรัมของสารอะซีแมนแนนจากห้องปฏิบัติการการริงตัน



รูปที่ 3 ก น้ำหนักของน้ำผึ้งหลังจากการกรอพื้นทะเลลูโพรงพื้น (a) กลุ่ม 7 วัน และ (b) กลุ่ม 28 วัน

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ทางสถิติ

การทดสอบสมมติฐานของร้อยละของจำนวนเซลล์โพรงฟันที่ทดสอบกับอะซีแมนแนนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1. การทดสอบการแจกแจงของร้อยละของจำนวนเซลล์โพรงฟันที่ทดสอบกับอะซีแมนแนนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยวิธีทดสอบโคโมโกรอฟ สไมร์นอฟ คำนัยสำคัญที่กำหนดคือ 0.05

H_0 : ร้อยละของจำนวนเซลล์โพรงฟัน มีการแจกแจงเป็นปกติ

H_1 : ร้อยละของจำนวนเซลล์โพรงฟัน มีการแจกแจงไม่เป็นปกติ

2. การวิเคราะห์ทางสถิติของความแปรปรวนของร้อยละของจำนวนเซลล์โพรงฟันที่ทดสอบกับอะซีแมนแนนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยวิธีทดสอบลิวีน คำนัยสำคัญที่กำหนดคือ 0.05

H_0 : ร้อยละของจำนวนเซลล์โพรงฟันของทุกกลุ่มมีความแปรปรวนไม่แตกต่างกัน

H_1 : ร้อยละของจำนวนเซลล์โพรงฟันมีความแปรปรวนแตกต่างกันอย่างน้อย 2 กลุ่ม

3. การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเซลล์โพรงฟันที่ทดสอบกับอะซีแมนแนนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยวิธีทดสอบเอฟ คำนัยสำคัญที่กำหนดคือ 0.05

H_0 : ร้อยละของจำนวนเซลล์โพรงฟันของทุกกลุ่มมีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน

H_1 : ร้อยละของจำนวนเซลล์โพรงฟันมีค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างน้อย 2 กลุ่ม

4. การเปรียบเทียบเชิงซ้อนของค่าเฉลี่ยของร้อยละของจำนวนเซลล์โพรงฟันที่ทดสอบกับอะซีแมนแนนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยวิธีการทดสอบเชิงซ้อนแบบเชฟเฟ คำนัยสำคัญที่กำหนดคือ 0.05

H_0 : ร้อยละของจำนวนเซลล์โพรงฟันมีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน

H_1 : ร้อยละของจำนวนเซลล์โพรงฟันมีค่าเฉลี่ยแตกต่างกัน

การทดสอบสมมติฐานของระดับการหลังโปรตีนโบนมอร์โฟเจนติก-2 ในเซลล์โพรงฟันที่ทดสอบกับอะซีแมนแนน ณ จุดเวลาต่าง ๆ

1. การทดสอบการแจกแจงของระดับการหลังโปรตีนโบนมอร์โฟเจนติก-2 ในเซลล์โพรงฟันที่ทดสอบกับอะซีแมนแนน ณ จุดเวลาต่าง ๆ ด้วยวิธีทดสอบโคโมโกรอฟ สไมร์นอฟ ค่านัยสำคัญที่กำหนดคือ 0.05

H_0 : ระดับการหลังโปรตีนโบนมอร์โฟเจนติก-2 ในเซลล์โพรงฟันมีการแจกแจงเป็นปกติ

H_1 : ระดับการหลังโปรตีนโบนมอร์โฟเจนติก-2 ในเซลล์โพรงฟันมีการแจกแจงไม่เป็นปกติ

2. การวิเคราะห์ทางสถิติของความแปรปรวนของระดับการหลังโปรตีนโบนมอร์โฟเจนติก-2 ในเซลล์โพรงฟันที่ทดสอบกับอะซีแมนแนน ณ จุดเวลาต่าง ๆ ด้วยวิธีทดสอบลิวน์ ค่านัยสำคัญที่กำหนดคือ 0.05

H_0 : ระดับการหลังโปรตีนโบนมอร์โฟเจนติก-2 ในเซลล์โพรงฟันของทุกกลุ่มมีความแปรปรวนไม่แตกต่างกัน

H_1 : ระดับการหลังโปรตีนโบนมอร์โฟเจนติก-2 ในเซลล์โพรงฟันมีความแปรปรวนแตกต่างกันอย่างน้อย 2 กลุ่ม

3. การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของระดับการหลังโปรตีนโบนมอร์โฟเจนติก-2 ในเซลล์โพรงฟันที่ทดสอบกับอะซีแมนแนน ณ จุดเวลาต่าง ๆ ด้วยวิธีทดสอบเอฟ ค่านัยสำคัญที่กำหนดคือ 0.05

H_0 : ระดับการหลังโปรตีนโบนมอร์โฟเจนติก-2 ในเซลล์โพรงฟันของทุกกลุ่มมีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน

H_1 : ระดับการหลังโปรตีนโบนมอร์โฟเจนติก-2 ในเซลล์โพรงฟันมีค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างน้อย 2 กลุ่ม

4. การเปรียบเทียบเชิงซ้อนของค่าเฉลี่ยของระดับการหลังโปรตีนโบนมอร์โฟเจนติก-2 ในเซลล์โพรงฟันที่ทดสอบกับอะซีแมนแนน ณ จุดเวลาต่าง ๆ ด้วยวิธีทดสอบเชิงซ้อนเซฟเฟ ค่านัยสำคัญที่กำหนดคือ 0.05

H_0 : ระดับการหลังโปรตีนโบนมอร์โฟเจนติก-2 ในเซลล์โพรงฟันที่ทดสอบกับอะซีแมนแนน ณ จุดเวลาต่าง ๆ มีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน

H_1 : ระดับการหลังโปรตีนโบนมอร์โฟเจเนติก-2 ในเซลล์โพรงพื้นที่ทดสอบกับอะซีแมนแนน ณ จุดเวลาต่าง ๆ มีค่าเฉลี่ยแตกต่างกัน

การทดสอบสมมติฐานของร้อยละของอัตราการทำงานของเอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเป็นเวลา 3 วัน

1. การทดสอบการแจกแจงของร้อยละของอัตราการทำงานของเอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเป็นเวลา 3 วัน ด้วยวิธีทดสอบโคโมโกรอฟ สไมร์นอฟ คำนัยสำคัญที่กำหนดคือ 0.05

H_0 : ร้อยละของอัตราการทำงานของเอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเป็นเวลา 3 วัน มีการแจกแจงเป็นปกติ

H_1 : ร้อยละของอัตราการทำงานของเอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเป็นเวลา 3 วัน มีการแจกแจงไม่เป็นปกติ

2. การวิเคราะห์ทางสถิติของความแปรปรวนของร้อยละของอัตราการทำงานของเอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเป็นเวลา 3 วัน ด้วยวิธีทดสอบสกีวิน คำนัยสำคัญที่กำหนดคือ 0.05

H_0 : ร้อยละของอัตราการทำงานของเอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเป็นเวลา 3 วัน ของทุกกลุ่ม มีความแปรปรวนไม่แตกต่างกัน

H_1 : ร้อยละของอัตราการทำงานของเอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเป็นเวลา 3 วัน มีความแปรปรวนแตกต่างกันอย่างน้อย 2 กลุ่ม

3. การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของร้อยละของอัตราการทำงานของเอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเป็นเวลา 3 วัน ด้วยวิธีทดสอบเอฟ คำนัยสำคัญที่กำหนดคือ 0.05

H_0 : ร้อยละของอัตราการทำงานของเอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเป็นเวลา 3 วัน ของทุกกลุ่มมีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน

H_1 : ร้อยละของอัตราการทำงานของเอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเป็นเวลา 3 วัน มีค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างน้อย 2 กลุ่ม

4. การเปรียบเทียบเชิงซ้อนของค่าเฉลี่ยของร้อยละของอัตราการทำงานของเอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเป็นเวลา 3 วัน ด้วยวิธีทดสอบเชิงซ้อนแบบเชฟเฟ คำนัยสำคัญที่กำหนดคือ 0.05

H_0 : ร้อยละของอัตราการทำงานของเอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเป็นเวลา 3 วัน มีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน

H_1 : ร้อยละของอัตราการทำงานของเอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเป็นเวลา 3 วัน มีค่าเฉลี่ยแตกต่างกัน

การทดสอบสมมติฐานของปริมาณการตกตะกอนเกลือแร่ในเซลล์โพรงพื้นที่ทดสอบกับอะซี-แมนแนนเป็นเวลา 15 วัน

1. การทดสอบการแจกแจงของปริมาณการตกตะกอนเกลือแร่ในเซลล์โพรงพื้นที่ทดสอบกับอะซีแมนแนนเป็นเวลา 15 วัน ด้วยวิธีทดสอบโคโมโกรอฟ สไมร์นอฟ คำนัยสำคัญที่กำหนดคือ 0.05

H_0 : ปริมาณการตกตะกอนเกลือแร่ มีการแจกแจงเป็นปกติ

H_1 : ปริมาณการตกตะกอนเกลือแร่ มีการแจกแจงไม่เป็นปกติ

2. การวิเคราะห์ทางสถิติของความแปรปรวนของปริมาณการตกตะกอนเกลือแร่ในเซลล์โพรงพื้นที่ทดสอบกับอะซีแมนแนนเป็นเวลา 15 วัน ด้วยวิธีทดสอบทีวิน คำนัยสำคัญที่กำหนดคือ 0.05

H_0 : ปริมาณการตกตะกอนเกลือแร่ของทุกกลุ่ม มีความแปรปรวนไม่แตกต่างกัน

H_1 : ปริมาณการตกตะกอนเกลือแร่ มีความแปรปรวนแตกต่างกันอย่างน้อย 2 กลุ่ม

3. การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณการตกตะกอนเกลือแร่ในเซลล์โพรงพื้นที่ทดสอบกับอะซีแมนแนนเป็นเวลา 15 วัน ด้วยวิธีทดสอบเอฟ คำนัยสำคัญที่กำหนดคือ 0.05

H_0 : ปริมาณการตกตะกอนเกลือแร่ของทุกกลุ่มมีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน

H_1 : ปริมาณการตกตะกอนเกลือแร่ มีค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างน้อย 2 กลุ่ม

4. การเปรียบเทียบเชิงซ้อนของค่าเฉลี่ยของปริมาณการตกตะกอนเกลือแร่ในเซลล์โพรงพื้นที่ทดสอบกับอะซีแมนแนนเป็นเวลา 15 วัน ด้วยวิธีทดสอบเซฟเฟ คำนัยสำคัญที่กำหนดคือ 0.05

H_0 : ปริมาณการตกตะกอนเกลือแร่ มีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน

H_1 : ปริมาณการตกตะกอนเกลือแร่ มีค่าเฉลี่ยแตกต่างกัน

การทดสอบสมมติฐานของการอักเสบหลังจากปิดโพรงพื้นที่ด้วยวัสดุต่าง ๆ ในฟันกรามหนูแรท ณ 7 และ 28 วัน

1. การเปรียบเทียบค่ากลางของคะแนนการอักเสบหลังจากปิดโพรงพื้นที่ด้วยวัสดุต่าง ๆ ในฟันกรามหนูแรท ณ 7 และ 28 วัน

H_0 : คะแนนการอักเสบหลังจากปิดโพรงฟันด้วยวัสดุต่าง ๆ ในฟันกรามหนูแรทมีค่ากลางไม่แตกต่างกัน

H_1 : คะแนนการอักเสบหลังจากปิดโพรงฟันด้วยวัสดุต่าง ๆ ในฟันกรามหนูแรทมีค่ากลางแตกต่างกันอย่างน้อย 2 กลุ่ม

2. การเปรียบเทียบเชิงซ้อนของค่ากลางของคะแนนการอักเสบหลังจากปิดโพรงฟันด้วยวัสดุต่าง ๆ ในฟันกรามหนูแรท ณ 7 และ 28 วัน

H_0 : คะแนนการอักเสบหลังจากปิดโพรงฟันด้วยวัสดุต่าง ๆ ในฟันกรามหนูแรทมีค่ากลางไม่แตกต่างกัน

H_1 : คะแนนการอักเสบหลังจากปิดโพรงฟันด้วยวัสดุต่าง ๆ ในฟันกรามหนูแรทมีค่ากลางแตกต่างกัน

การทดสอบสมมติฐานของการสร้างเดนตินบริดจ์หลังจากปิดโพรงฟันในฟันกรามหนูแรท ณ 7 และ 28 วัน

1. การเปรียบเทียบค่ากลางของคะแนนการสร้างเดนตินบริดจ์หลังจากปิดโพรงฟันด้วยวัสดุต่าง ๆ ในฟันกรามหนูแรท ณ 7 และ 28 วัน

H_0 : คะแนนการสร้างเดนตินบริดจ์หลังจากปิดโพรงฟันด้วยวัสดุต่าง ๆ ในฟันกรามหนูแรทมีค่ากลางไม่แตกต่างกัน

H_1 : คะแนนการสร้างเดนตินบริดจ์หลังจากปิดโพรงฟันด้วยวัสดุต่าง ๆ ในฟันกรามหนูแรทมีค่ากลางแตกต่างกันอย่างน้อย 2 กลุ่ม

2. การเปรียบเทียบเชิงซ้อนของค่ากลางของคะแนนการสร้างเดนตินบริดจ์หลังจากปิดโพรงฟันด้วยวัสดุต่าง ๆ ในฟันกรามหนูแรท ณ 7 และ 28 วัน

H_0 : คะแนนการสร้างเดนตินบริดจ์หลังจากปิดโพรงฟันด้วยวัสดุต่าง ๆ ในฟันกรามหนูแรท มีค่ากลางไม่แตกต่างกัน

H_1 : คะแนนการสร้างเดนตินบริดจ์หลังจากปิดโพรงฟันด้วยวัสดุต่าง ๆ ในฟันกรามหนูแรท มีค่ากลางแตกต่างกัน

การทดสอบสมมติฐานของการจัดเรียงตัวของเนื้อเยื่ออ่อนหลังจากปิดโพรงฟันในฟัน
กรามบนแท้ ณ 7 และ 28 วัน

1. การเปรียบเทียบค่ากลางของคะแนนการจัดเรียงตัวของเนื้อเยื่ออ่อนหลังจากปิดโพรงฟันด้วย
วัสดุต่าง ๆ ในฟันกรามบนแท้ ณ 7 และ 28 วัน

H_0 : คะแนนการจัดเรียงตัวของเนื้อเยื่ออ่อนหลังจากปิดโพรงฟันด้วยวัสดุต่าง ๆ มีค่า
กลางไม่แตกต่างกัน

H_1 : คะแนนการจัดเรียงตัวของเนื้อเยื่ออ่อนหลังจากปิดโพรงฟันด้วยวัสดุต่าง ๆ มีค่า
กลางแตกต่างกันอย่างน้อย 2 กลุ่ม

2. การเปรียบเทียบเชิงซ้อนของค่ากลางของคะแนนการจัดเรียงตัวของเนื้อเยื่ออ่อนหลังจากปิด
โพรงฟันด้วยวัสดุต่าง ๆ ในฟันกรามบนแท้ ณ 7 และ 28 วัน

H_0 : คะแนนการจัดเรียงตัวของเนื้อเยื่ออ่อนหลังจากปิดโพรงฟันด้วยวัสดุต่าง ๆ มีค่า
กลางไม่แตกต่างกัน

H_1 : คะแนนการจัดเรียงตัวของเนื้อเยื่ออ่อนหลังจากปิดโพรงฟันด้วยวัสดุต่าง ๆ มีค่า
กลางแตกต่างกัน

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ทางสถิติของร้อยละของจำนวนเซลล์โพรงฟันที่ทดสอบกับอะซีแมนแนนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1. การวิเคราะห์การแจกแจงของร้อยละของจำนวนเซลล์โพรงฟันที่ทดสอบกับอะซีแมนแนนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ข การวิเคราะห์การแจกแจงของร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเซลล์โพรงฟันที่ทดสอบกับอะซีแมนแนนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยวิธีทดสอบโคโมโกรอฟ สไมร์นอฟ

		control	0.5 mg/ml	1 mg/ml	2 mg/ml	4 mg/ml	8 mg/ml
N		3	3	3	3	3	3
Normal Parameters(a,b)	Mean	100.0000	121.3033	142.1767	152.4967	155.2333	158.0567
	Std. Deviation	4.20572	4.60960	5.67824	1.97677	12.87880	12.59205
Most Extreme Differences	Absolute	.367	.203	.249	.186	.275	.264
	Positive	.265	.203	.195	.186	.275	.198
	Negative	-.367	-.185	-.249	-.180	-.202	-.264
Kolmogorov-Smirnov Z		.636	.352	.432	.322	.476	.458
Asymp. Sig. (2-tailed)		.814	1.000	.992	1.000	.977	.985

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

ผลการการวิเคราะห์การแจกแจงของร้อยละของจำนวนเซลล์โพรงฟันที่ทดสอบกับอะซีแมนแนนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงค่านัยสำคัญของการทดสอบทุกกลุ่ม มีค่ามากกว่า 0.05 ดังนั้นจึงยอมรับสมมติฐาน H_0 แสดงว่า ทุกกลุ่มมีการแจกแจงเป็นปกติ

2. การวิเคราะห์ความแปรปรวนของร้อยละของจำนวนเซลล์โพรงฟันที่ทดสอบกับอะซีแมนแนนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ข การวิเคราะห์ความแปรปรวนของร้อยละของจำนวนเซลล์โพรงฟันที่ทดสอบกับอะซีแมนแนนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยวิธีทดสอบลีวิน

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.769	5	12	.069

ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของร้อยละของจำนวนเซลล์โพรงฟันที่ทดสอบกับอะซีแมนแนนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงค่านัยสำคัญมีค่ามากกว่า 0.05 ดังนั้น จึงยอมรับสมมติฐาน H_0 แสดงว่าในแต่ละกลุ่มมีความแปรปรวนไม่แตกต่างกัน

3. การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของร้อยละของจำนวนเซลล์โพรงฟันที่ทดสอบกับอะซีแมนแนนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ข การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของร้อยละของจำนวนเซลล์โพรงฟันที่ทดสอบกับอะซีแมนแนนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้การทดสอบแบบเอฟ

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7948.100	5	1589.620	23.874	.000
Within Groups	799.019	12	66.585		
Total	8747.120	17			

ผลการวิเคราะห์การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของร้อยละของจำนวนเซลล์โพรงฟันที่ทดสอบกับอะซีแมนแนนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อทดสอบด้วยวิธีเอ็มทีที แสดงค่านัยสำคัญมีค่าน้อยกว่า 0.05 ดังนั้น จึงปฏิเสธสมมติฐาน H_0 แสดงว่ามีค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างน้อย 2 กลุ่ม

4. การเปรียบเทียบเชิงซ้อนของค่าเฉลี่ยของร้อยละของจำนวนเซลล์โพรงฟันที่ทดสอบกับอะซีแมนแนนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ข การเปรียบเทียบเชิงซ้อนของค่าเฉลี่ยของร้อยละของจำนวนเซลล์โพรงฟัน ที่ทดสอบกับอะซีแมนแนนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยวิธีทดสอบเชิงซ้อนเซฟเฟ

(I) group	(J) group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
control	0.5 mg/ml	-21.30333	6.66258	.144
	1 mg/ml	-42.17667(*)	6.66258	.002
	2 mg/ml	-52.49667(*)	6.66258	.000
	4 mg/ml	-55.23333(*)	6.66258	.000
	8 mg/ml	-58.05667(*)	6.66258	.000
0.5 mg/ml	control	21.30333	6.66258	.144
	1 mg/ml	-20.87333	6.66258	.157
	2 mg/ml	-31.19333(*)	6.66258	.017
	4 mg/ml	-33.93000(*)	6.66258	.009
	8 mg/ml	-36.75333(*)	6.66258	.005
1 mg/ml	control	42.17667(*)	6.66258	.002
	0.5 mg/ml	20.87333	6.66258	.157
	2 mg/ml	-10.32000	6.66258	.785
	4 mg/ml	-13.05667	6.66258	.590
	8 mg/ml	-15.88000	6.66258	.393
2 mg/ml	control	52.49667(*)	6.66258	.000
	0.5 mg/ml	31.19333(*)	6.66258	.017
	1 mg/ml	10.32000	6.66258	.785
	4 mg/ml	-2.73667	6.66258	.999
	8 mg/ml	-5.56000	6.66258	.980
4 mg/ml	control	55.23333(*)	6.66258	.000
	0.5 mg/ml	33.93000(*)	6.66258	.009
	1 mg/ml	13.05667	6.66258	.590
	2 mg/ml	2.73667	6.66258	.999
	8 mg/ml	-2.82333	6.66258	.999
8 mg/ml	control	58.05667(*)	6.66258	.000
	0.5 mg/ml	36.75333(*)	6.66258	.005
	1 mg/ml	15.88000	6.66258	.393
	2 mg/ml	5.56000	6.66258	.980
	4 mg/ml	2.82333	6.66258	.999

* The mean difference is significant at the .05 level.

การเปรียบเทียบเชิงซ้อนของค่าเฉลี่ยของร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเซลล์โพรงฟันที่ทดสอบกับอะซีแมนแนนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงค่านัยสำคัญมีค่าน้อยกว่า 0.05 ระหว่างกลุ่ม 1 2 4 และ 8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และกลุ่มควบคุม ดังนั้น จึงปฏิเสธสมมติฐาน H_0 แสดงว่ามีค่าเฉลี่ยแตกต่างกันระหว่างกลุ่ม 1 2 4 และ 8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และกลุ่มควบคุม

การวิเคราะห์ทางสถิติของระดับการหลังโปรตีนโบนมอร์โฟเจเนติก-2 ในเซลล์โพรงฟันที่ทดสอบกับอะซีแมนแนน ณ จุดเวลาต่าง ๆ

1. การทดสอบการแจกแจงของระดับการหลังโปรตีนโบนมอร์โฟเจเนติก-2 ในเซลล์โพรงฟันที่ทดสอบกับอะซีแมนแนน ณ 3 9 และ 12 วัน แสดงดังตารางที่ 11 12 และ 13 ตามลำดับ

ตารางที่ 11 ข การทดสอบการแจกแจงของระดับการหลังโปรตีนโบนมอร์โฟเจเนติก-2 ในเซลล์โพรงฟันที่ทดสอบกับอะซีแมนแนน ณ 3 วัน ด้วยวิธีทดสอบโคโมโกรอฟ สไมร์นอฟ

		control	0.5 mg/ml	1 mg/ml	2 mg/ml	4 mg/ml	8 mg/ml
N		4	4	4	4	4	4
Normal Parameters(a,b)	Mean	102.6520	107.8470	119.0993	107.6838	102.6540	101.4930
	Std. Deviation	.33437	2.08959	3.29358	4.01517	.80334	.55272
Most Extreme Differences	Absolute	.151	.305	.275	.262	.313	.249
	Positive	.151	.305	.275	.262	.210	.177
	Negative	-.150	-.217	-.199	-.211	-.313	-.249
Kolmogorov-Smirnov Z		.303	.609	.550	.525	.626	.499
Asymp. Sig. (2-tailed)		1.000	.852	.923	.946	.829	.965

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

ตารางที่ 12 ข การทดสอบการแจกแจงของระดับการหลังโปรตีนโบนมอร์โฟเจเนติก-2 ในเซลล์
โพรงพื้นที่ทดสอบกับอะซีแมนแนน ณ 9 วัน ด้วยวิธีทดสอบโคโมโกรอฟ สไมร์นอฟ

		control	0.5 mg/ml	1 mg/ml	2 mg/ml	4 mg/ml	8 mg/ml
N		4	4	4	4	24	4
Normal	Mean	101.9443	101.6205	102.8563	137.8895	113.6363	136.8218
Parameters(a,b)	Std. Deviation	.92315	.33127	1.65989	9.09783	17.79727	2.70347
Most Extreme Differences	Absolute	.234	.151	.220	.242	.177	.234
	Positive	.182	.151	.196	.242	.161	.164
	Negative	-.234	-.150	-.220	-.183	-.177	-.234
Kolmogorov-Smirnov Z		.469	.302	.440	.485	.868	.469
Asymp. Sig. (2-tailed)		.981	1.000	.990	.973	.439	.981

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

ตารางที่ 13 ข การทดสอบการแจกแจงของระดับการหลังโปรตีนโบนมอร์โฟเจเนติก-2 ในเซลล์
โพรงพื้นที่ทดสอบกับอะซีแมนแนน ณ 12 วัน ด้วยวิธีทดสอบโคโมโกรอฟ สไมร์นอฟ

		control	0.5 mg/ml	1 mg/ml	2 mg/ml	4 mg/ml	8 mg/ml
N		4	4	4	4	4	4
Normal	Mean	92.9723	97.6675	102.0068	127.7333	137.0460	124.3923
Parameters(a,b)	Std. Deviation	3.18273	6.06734	4.80957	7.38200	3.94240	6.97679
Most Extreme Differences	Absolute	.382	.202	.309	.171	.288	.354
	Positive	.215	.154	.191	.171	.288	.183
	Negative	-.382	-.202	-.309	-.169	-.196	-.354
Kolmogorov-Smirnov Z		.764	.403	.619	.342	.577	.708
Asymp. Sig. (2-tailed)		.603	.997	.839	1.000	.894	.698

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

ผลการวิเคราะห์การแจกแจงของระดับการหลังโปรตีนโบนมอร์โฟเจเนติก-2 ในเซลล์โพรงพื้นที่ทดสอบกับอะซีแมนแนน ณ จุดเวลาต่าง ๆ แสดงค่านัยสำคัญของการทดสอบทุกกลุ่มมีค่ามากกว่า 0.05 ดังนั้น จึงยอมรับสมมติฐาน H_0 แสดงว่าทุกกลุ่มมีการแจกแจงเป็นปกติ

2. การทดสอบทางสถิติของความแปรปรวนของระดับการหลังโปรตีนโบนมอร์โฟเจเนติก-2 ในเซลล์โพรงพื้นที่ทดสอบกับอะซีแมนแนน ณ จุดเวลาต่าง ๆ แสดงดังตารางที่ 14

ตารางที่ 14 ข การทดสอบทางสถิติของความแปรปรวนของระดับการหลังโปรตีนโบนมอร์โฟเจเนติก-2 ในเซลล์โพรงพื้นที่ทดสอบกับอะซีแมนแนน ณ จุดเวลาต่าง ๆ ด้วยวิธีทดสอบลีวัน

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3d	2.704	5	18	.054
9d	7.194	5	18	.001
12d	.544	5	18	.741

ผลการวิเคราะห์การทดสอบทางสถิติของความแปรปรวนของระดับการหลังโปรตีนโบนมอร์โฟเจเนติก-2 ในเซลล์โพรงพื้นที่ทดสอบกับอะซีแมนแนน ณ 3 และ 12 วัน แสดงค่านัยสำคัญมีค่ามากกว่า 0.05 ดังนั้น จึงยอมรับสมมติฐาน H_0 แสดงว่าในแต่ละกลุ่มมีความแปรปรวนไม่แตกต่างกัน ในขั้นตอนต่อไปจึงใช้การทดสอบเชิงซ้อนเชฟเฟ ส่วน ณ 9 วัน แสดงค่านัยสำคัญมีค่าน้อยกว่า 0.05 ดังนั้น จึงปฏิเสธสมมติฐาน H_0 แสดงว่ามีความแปรปรวนแตกต่างกันอย่างน้อย 2 กลุ่ม ในขั้นตอนต่อไปจึงใช้การทดสอบเชิงซ้อนดันเนตต์ ทีทีรี

3. การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของระดับการหลังโปรตีนโบนมอร์โฟเจเนติก-2 ในเซลล์โพรงพื้นที่ทดสอบกับอะซีแมนแนน ณ จุดเวลาต่าง ๆ แสดงดังตารางที่ 15

ตารางที่ 15 ข การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของระดับการหลังโปรตีนโบนมอร์โฟเจเนติก-2 ในเซลล์
โพรงพื้นที่ทดสอบกับอะซีแมนแนน ณ จุดเวลาต่าง ๆ ด้วยวิธีทดสอบเอฟ

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
3d	Between Groups	862.569	5	172.514	31.949	.000
	Within Groups	97.195	18	5.400		
	Total	959.764	23			
9d	Between Groups	5989.995	5	1197.999	70.044	.000
	Within Groups	307.865	18	17.104		
	Total	6297.859	23			
12d	Between Groups	6718.722	5	1343.744	42.707	.000
	Within Groups	566.359	18	31.464		
	Total	7285.081	23			

ผลการวิเคราะห์การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของระดับการหลังโปรตีนโบนมอร์โฟเจเนติก-2
ในเซลล์โพรงพื้นที่ทดสอบกับอะซีแมนแนน ณ จุดเวลาต่าง ๆ แสดงค่านัยสำคัญมีค่าน้อยกว่า
0.05 ดังนั้น จึงปฏิเสธสมมติฐาน H_0 แสดงว่ามีค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างน้อย 2 กลุ่ม

4. การเปรียบเทียบเชิงซ้อนของค่าเฉลี่ยของระดับการหลังโปรตีนโบนมอร์โฟเจเนติก-2
ในเซลล์โพรงพื้นที่ทดสอบกับอะซีแมนแนน ณ จุดเวลาต่าง ๆ แสดงดังตารางที่ 16

ตารางที่ 16 ข การเปรียบเทียบเชิงซ้อนของค่าเฉลี่ยของระดับการหลังโปรตีนโบนมอร์โฟเจเนติก-
2 ในเซลล์โพรงพื้นที่ทดสอบกับอะซีแมนแนน ณ จุดเวลาต่าง ๆ ใช้การทดสอบเชิงซ้อนแบบเชฟเฟ
หรือด้นเนตต์ ทีทีรี

Dependent Variable		(I) group	(J) group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
3d	Scheffe	control	0.5 mg/ml	1.16100	1.64312	.991
			1 mg/ml	.00200	1.64312	1.000
			2 mg/ml	-5.19300	1.64312	.128
			4 mg/ml	-16.44525(*)	1.64312	.000
			8 mg/ml	-5.02975	1.64312	.149
			0.5 mg/ml	-1.16100	1.64312	.991
			control			

Dependent Variable	(I) group	(J) group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	
9d	Dunnett T3	1 mg/ml	-1.15900	1.64312	.991	
		2 mg/ml	-6.35400(*)	1.64312	.039	
		4 mg/ml	-17.60625(*)	1.64312	.000	
		8 mg/ml	-6.19075(*)	1.64312	.046	
		1 mg/ml	control	-.00200	1.64312	1.000
		0.5 mg/ml	1.15900	1.64312	.991	
		2 mg/ml	-5.19500	1.64312	.128	
		4 mg/ml	-16.44725(*)	1.64312	.000	
		8 mg/ml	-5.03175	1.64312	.149	
		2 mg/ml	control	5.19300	1.64312	.128
		0.5 mg/ml	6.35400(*)	1.64312	.039	
		1 mg/ml	5.19500	1.64312	.128	
		4 mg/ml	-11.25225(*)	1.64312	.000	
		8 mg/ml	.16325	1.64312	1.000	
		4 mg/ml	control	16.44525(*)	1.64312	.000
		0.5 mg/ml	17.60625(*)	1.64312	.000	
		1 mg/ml	16.44725(*)	1.64312	.000	
		2 mg/ml	11.25225(*)	1.64312	.000	
		8 mg/ml	11.41550(*)	1.64312	.000	
		8 mg/ml	control	5.02975	1.64312	.149
		0.5 mg/ml	6.19075(*)	1.64312	.046	
		1 mg/ml	5.03175	1.64312	.149	
		2 mg/ml	-.16325	1.64312	1.000	
		4 mg/ml	-11.41550(*)	1.64312	.000	
		control	0.5 mg/ml	.32375	.49039	.999
		1 mg/ml	-.91200	.94966	.984	
		2 mg/ml	-35.94525(*)	4.57227	.025	
		4 mg/ml	-34.87750(*)	1.42837	.000	
		8 mg/ml	-17.37425(*)	1.55542	.005	
		0.5 mg/ml	control	-.32375	.49039	.999
		1 mg/ml	-1.23575	.84631	.831	
		2 mg/ml	-36.26900(*)	4.55193	.025	
		4 mg/ml	-35.20125(*)	1.36184	.001	
		8 mg/ml	-17.69800(*)	1.49457	.007	
		1 mg/ml	control	.91200	.94966	.984
		0.5 mg/ml	1.23575	.84631	.831	
		2 mg/ml	-35.03325(*)	4.62400	.025	
		4 mg/ml	-33.96550(*)	1.58619	.000	
		8 mg/ml	-16.46225(*)	1.70150	.003	
		2 mg/ml	control	35.94525(*)	4.57227	.025
		0.5 mg/ml	36.26900(*)	4.55193	.025	
		1 mg/ml	35.03325(*)	4.62400	.025	
		4 mg/ml	1.06775	4.74550	1.000	

Dependent Variable	(I) group	(J) group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.		
12d	Scheffe	8 mg/ml	18.57100	4.78528	.140		
		4 mg/ml	control	34.87750(*)	1.42837	.000	
			0.5 mg/ml	35.20125(*)	1.36184	.001	
			1 mg/ml	33.96550(*)	1.58619	.000	
			2 mg/ml	-1.06775	4.74550	1.000	
			8 mg/ml	17.50325(*)	2.00835	.001	
			8 mg/ml	control	17.37425(*)	1.55542	.005
				0.5 mg/ml	17.69800(*)	1.49457	.007
				1 mg/ml	16.46225(*)	1.70150	.003
				2 mg/ml	-18.57100	4.78528	.140
				4 mg/ml	-17.50325(*)	2.00835	.001
			control	0.5 mg/ml	-4.69525	3.96638	.918
				1 mg/ml	-9.03450	3.96638	.426
				2 mg/ml	-34.76100(*)	3.96638	.000
				4 mg/ml	-44.07375(*)	3.96638	.000
				8 mg/ml	-31.42000(*)	3.96638	.000
			0.5 mg/ml	control	4.69525	3.96638	.918
				1 mg/ml	-4.33925	3.96638	.940
				2 mg/ml	-30.06575(*)	3.96638	.000
				4 mg/ml	-39.37850(*)	3.96638	.000
				8 mg/ml	-26.72475(*)	3.96638	.000
			1 mg/ml	control	9.03450	3.96638	.426
				0.5 mg/ml	4.33925	3.96638	.940
				2 mg/ml	-25.72650(*)	3.96638	.000
				4 mg/ml	-35.03925(*)	3.96638	.000
				8 mg/ml	-22.38550(*)	3.96638	.001
			2 mg/ml	control	34.76100(*)	3.96638	.000
				0.5 mg/ml	30.06575(*)	3.96638	.000
				1 mg/ml	25.72650(*)	3.96638	.000
				4 mg/ml	-9.31275	3.96638	.393
				8 mg/ml	3.34100	3.96638	.980
			4 mg/ml	control	44.07375(*)	3.96638	.000
				0.5 mg/ml	39.37850(*)	3.96638	.000
				1 mg/ml	35.03925(*)	3.96638	.000
				2 mg/ml	9.31275	3.96638	.393
				8 mg/ml	12.65375	3.96638	.122
			8 mg/ml	control	31.42000(*)	3.96638	.000
				0.5 mg/ml	26.72475(*)	3.96638	.000
				1 mg/ml	22.38550(*)	3.96638	.001
				2 mg/ml	-3.34100	3.96638	.980
		4 mg/ml	-12.65375	3.96638	.122		

* The mean difference is significant at the .05 level.

การเปรียบเทียบเชิงซ้อนของค่าเฉลี่ยของระดับการหลังโปรตีนโบนมอร์โฟเจเนติก-2 ใน เซลล์โพรงพื้นที่ทดสอบกับอะซีแมนแนน ณ จุดเวลาต่าง ๆ แสดงค่านัยสำคัญมีค่าน้อยกว่า 0.05 ระหว่างกลุ่ม 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และกลุ่มควบคุม (3 วัน) และระหว่างกลุ่ม 2 4 และ 8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และกลุ่มควบคุม (9 และ 12 วัน) ดังนั้น จึงปฏิเสธสมมติฐาน H_0 แสดงว่ามีค่าเฉลี่ยแตกต่างกัน

การวิเคราะห์ทางสถิติของร้อยละของอัตราการทำงานของเอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส เป็นเวลา 3 วัน

1. การทดสอบการแจกแจงของร้อยละของเอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเป็นเวลา 3 วัน แสดงดังตารางที่ 17

ตารางที่ 17 ข การทดสอบการแจกแจงของร้อยละของเอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเป็นเวลา 3 วัน ด้วยวิธีทดสอบโคโมโกรอฟ สไมร์นอฟ

		control	0.5 mg/ml	1 mg/ml	2 mg/ml	4 mg/ml	8 mg/ml
N		4	3	4	4	4	4
Normal Parameters(a,b)	Mean	100.0000	101.6287	95.6283	117.7365	143.4562	110.0754
	Std. Deviation	12.65224	10.94697	4.98542	15.81680	8.83685	5.21296
Most Extreme Differences	Absolute	.252	.288	.320	.350	.283	.369
	Positive	.252	.288	.254	.350	.283	.369
	Negative	-.196	-.209	-.320	-.259	-.195	-.235
Kolmogorov-Smirnov Z		.503	.499	.641	.700	.565	.739
Asymp. Sig. (2-tailed)		.962	.964	.806	.711	.907	.646

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

ผลการการวิเคราะห์การแจกแจงของร้อยละของเอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเป็นเวลา 3 วัน แสดงค่านัยสำคัญของการทดสอบทุกกลุ่มมีค่ามากกว่า 0.05 ดังนั้น จึงยอมรับสมมติฐาน H_0 แสดงว่าทุกกลุ่มมีการแจกแจงเป็นปกติ

2. การวิเคราะห์ทางสถิติของความแปรปรวนของร้อยละของอัตราการทำงานของเอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเมื่อทดสอบด้วยวิธีทางชีวเคมี แสดงดังตารางที่ 18

ตารางที่ 18 ข การวิเคราะห์ทางสถิติของความแปรปรวนของร้อยละของอัตราการทำงาน ของเอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเวลา 3 วัน ด้วยวิธีทดสอบที

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.673	5	17	.195

ผลการวิเคราะห์การทดสอบทางสถิติของความแปรปรวนของร้อยละของอัตราการทำงาน ของเอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเป็นเวลา 3 วัน แสดงค่านัยสำคัญมีค่ามากกว่า 0.05 ดังนั้น จึงยอมรับสมมติฐาน H_0 แสดงว่าในแต่ละกลุ่มมีความแปรปรวนไม่แตกต่างกัน

3. การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของร้อยละของอัตราการทำงาน ของเอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเป็นเวลา 3 วัน แสดงดังตารางที่ 19

ตารางที่ 19 ข การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของอัตราการทำงาน ของเอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเป็นเวลา 3 วัน ใช้การทดสอบแบบเอฟ

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6074.704	5	1214.941	11.100	.000
Within Groups	1860.781	17	109.458		
Total	7935.485	22			

ผลการวิเคราะห์การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของร้อยละของอัตราการทำงาน ของเอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเป็นเวลา 3 วัน แสดงค่านัยสำคัญมีค่าน้อยกว่า 0.05 ดังนั้น จึงปฏิเสธสมมติฐาน H_0 แสดงว่ามีค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างน้อย 2 กลุ่ม

4. การเปรียบเทียบเชิงซ้อนของค่าเฉลี่ยของร้อยละของอัตราการทำงาน ของเอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเป็นเวลา 3 วัน แสดงดังตารางที่ 20

ตารางที่ 20 ข การเปรียบเทียบเชิงซ้อนของค่าเฉลี่ยของร้อยละของอัตราการทำงานของเอ็นไซม์อัล-คาไลน์ฟอสฟาเตสเป็นเวลา 3 วัน ใช้การทดสอบเชิงซ้อนแบบเชฟเฟ

(I) group	(J) group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
control	0.5 mg/ml	-1.62868	7.99064	1.000
	1 mg/ml	4.37171	7.39789	.996
	2 mg/ml	-17.73647	7.39789	.373
	4 mg/ml	-43.45622(*)	7.39789	.001
	8 mg/ml	-10.07539	7.39789	.862
0.5 mg/ml	control	1.62868	7.99064	1.000
	1 mg/ml	6.00038	7.99064	.988
	2 mg/ml	-16.10779	7.99064	.557
	4 mg/ml	-41.82755(*)	7.99064	.003
	8 mg/ml	-8.44672	7.99064	.947
1 mg/ml	control	-4.37171	7.39789	.996
	0.5 mg/ml	-6.00038	7.99064	.988
	2 mg/ml	-22.10817	7.39789	.169
	4 mg/ml	-47.82793(*)	7.39789	.000
	8 mg/ml	-14.44710	7.39789	.589
2 mg/ml	control	17.73647	7.39789	.373
	0.5 mg/ml	16.10779	7.99064	.557
	1 mg/ml	22.10817	7.39789	.169
	4 mg/ml	-25.71976	7.39789	.079
	8 mg/ml	7.66107	7.39789	.952
4 mg/ml	control	43.45622(*)	7.39789	.001
	0.5 mg/ml	41.82755(*)	7.99064	.003
	1 mg/ml	47.82793(*)	7.39789	.000
	2 mg/ml	25.71976	7.39789	.079
	8 mg/ml	33.38083(*)	7.39789	.013
8 mg/ml	control	10.07539	7.39789	.862
	0.5 mg/ml	8.44672	7.99064	.947
	1 mg/ml	14.44710	7.39789	.589
	2 mg/ml	-7.66107	7.39789	.952
	4 mg/ml	-33.38083(*)	7.39789	.013

* The mean difference is significant at the .05 level.

การเปรียบเทียบเชิงซ้อนของค่าเฉลี่ยของร้อยละของอัตราการทำงานของเอ็นไซม์อัล-คาไลน์ฟอสฟาเตสเป็นเวลา 3 วัน แสดงค่านัยสำคัญมีค่าน้อยกว่า 0.05 ระหว่างกลุ่ม 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และกลุ่มควบคุม ดังนั้น จึงปฏิเสธสมมติฐาน H_0 แสดงว่ามีค่าเฉลี่ยแตกต่างกัน

การวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณการตกตะกอนเกล็ดเลือดในเซลล์โพรงฟันที่ทดสอบกับอะซี-แมนแนนเป็นเวลา 15 วัน

1. การทดสอบการแจกแจงของปริมาณการตกตะกอนเกล็ดเลือดในเซลล์โพรงฟันที่ทดสอบกับอะซีแมนแนนเป็นเวลา 15 วัน แสดงดังตารางที่ 21

ตารางที่ 21 ข การทดสอบการแจกแจงของปริมาณการตกตะกอนเกล็ดเลือดในเซลล์โพรงฟันที่ทดสอบกับอะซีแมนแนนเป็นเวลา 15 วัน ด้วยวิธีทดสอบโคโมโกรอฟ สไมร์นอฟ

		control	rhBMP-2	2 mg/ml	4 mg/ml	8 mg/ml
N		4	4	4	4	4
Normal Parameters(a,b)	Mean	.0805	.0509	.3719	.5064	.50575
	Std. Deviation	.01874	.00875	.09680	.00844	.076300
Most Extreme Differences	Absolute	.261	.176	.304	.227	.229
	Positive	.261	.147	.219	.172	.229
	Negative	-.246	-.176	-.304	-.227	-.165
Kolmogorov-Smirnov Z		.521	.351	.607	.454	.458
Asymp. Sig. (2-tailed)		.949	1.000	.855	.986	.985

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

ผลการการวิเคราะห์การแจกแจงในแต่ละกลุ่มของปริมาณการตกตะกอนเกล็ดเลือดในเซลล์โพรงฟันที่ทดสอบกับอะซีแมนแนนเป็นเวลา 15 วัน แสดงค่านัยสำคัญของการทดสอบทุกกลุ่มมีค่ามากกว่า 0.05 ดังนั้น จึงยอมรับสมมติฐาน H_0 แสดงว่าทุกกลุ่มมีการแจกแจงเป็นปกติ

2. การวิเคราะห์ทางสถิติของความแปรปรวนในแต่ละกลุ่มของปริมาณการตกตะกอนเกล็ดเลือดในเซลล์โพรงฟันที่ทดสอบกับอะซีแมนแนนเป็นเวลา 15 วัน แสดงดังตารางที่ 22

ตารางที่ 22 ข การวิเคราะห์ทางสถิติของความแปรปรวนของปริมาณการตกตะกอนเกล็ดเลือดในเซลล์โพรงฟันที่ทดสอบกับอะซีแมนแนนเป็นเวลา 15 วัน ด้วยวิธีทดสอบลีวิน

Levene	df1	df2	Sig.
Statistic			
3.219	4	15	.043

ผลการการวิเคราะห์การทดสอบทางสถิติของความแปรปรวนของปริมาณการตกตะกอนเกล็ดเลือดในเซลล์โพรงฟันที่ทดสอบกับอะซีแมนแนนเป็นเวลา 15 วัน แสดงค่านัยสำคัญมีค่าน้อย

กว่า 0.05 ดังนั้น จึงปฏิเสธสมมติฐาน H_0 แสดงว่ามีอย่างน้อย 2 กลุ่มที่มีความแปรปรวนแตกต่างกัน ในขั้นตอนต่อไปจึงใช้การเปรียบเทียบเชิงซ้อนกันแบบทีที

3. การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณการตกตะกอนเกล็ดแร่ในเซลล์โพรงฟันที่ทดสอบกับอะซีแมนแนนเป็นเวลา 15 วัน แสดงดังตารางที่ 23

ตารางที่ 23 ข การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณการตกตะกอนเกล็ดแร่ในเซลล์โพรงฟันที่ทดสอบกับอะซีแมนแนนเป็นเวลา 15 วัน ด้วยวิธีทดสอบเอฟ

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.801	4	.200	63.823	.000
Within Groups	.047	15	.003		
Total	.848	19			

ผลการวิเคราะห์การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณการตกตะกอนเกล็ดแร่ในเซลล์โพรงฟันที่ทดสอบกับอะซีแมนแนนเป็นเวลา 15 วัน แสดงค่านัยสำคัญมีค่าน้อยกว่า 0.05 ดังนั้น จึงปฏิเสธสมมติฐาน H_0 แสดงว่ามีค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างน้อย 2 กลุ่ม

4. การเปรียบเทียบเชิงซ้อนของค่าเฉลี่ยของปริมาณการตกตะกอนเกล็ดแร่ในเซลล์โพรงฟันที่ทดสอบกับอะซีแมนแนนเป็นเวลา 15 วัน แสดงดังตารางที่ 24

ตารางที่ 24 ข การเปรียบเทียบเชิงซ้อนของค่าเฉลี่ยของปริมาณการตกตะกอนเกล็ดแร่ในเซลล์โพรงฟันที่ทดสอบกับอะซีแมนแนนเป็นเวลา 15 วัน ด้วยการทดสอบเชิงซ้อนกันแบบทีที

(I) group	(J) group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
control	2 mg/ml	-.29137(*)	.04930	.041
	4 mg/ml	-.42588(*)	.01028	.000
	8 mg/ml	-.42522(*)	.03928	.005
	rhBMP-2	.02965	.01034	.227
2 mg/ml	control	.29137(*)	.04930	.041
	4 mg/ml	-.13451	.04858	.299
	8 mg/ml	-.13385	.06163	.404
	9 mg/ml	.32102(*)	.04860	.034
4 mg/ml	control	.42588(*)	.01028	.000

(I) group	(J) group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
8 mg/ml	2 mg/ml	.13451	.04858	.299
	8 mg/ml	.00066	.03838	1.000
	rhBMP-2	.45553(*)	.00608	.000
	control	.42522(*)	.03928	.005
rhBMP-2	2 mg/ml	.13385	.06163	.404
	4 mg/ml	-.00066	.03838	1.000
	rhBMP-2	.45487(*)	.03840	.006
	control	-.02965	.01034	.227
	2 mg/ml	-.32102(*)	.04860	.034
	4 mg/ml	-.45553(*)	.00608	.000
	8 mg/ml	-.45487(*)	.03840	.006

* The mean difference is significant at the .05 level.

การเปรียบเทียบเชิงซ้อนของการตกตะกอนเกล็ดเลือดในเซลล์โพรงฟันที่ทดสอบกับอะซีแมนแนนเป็นเวลา 15 วัน เมื่อย้อมด้วยอะลิซาริน เรด แสดงค่านัยสำคัญมีค่าน้อยกว่า 0.05 ระหว่างกลุ่ม 2 4 และ 8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และกลุ่มควบคุม ดังนั้น จึงปฏิเสธสมมติฐาน H_0 แสดงว่ามีค่าเฉลี่ยแตกต่างกัน

การวิเคราะห์ทางสถิติของการอักเสบหลังจากปิดโพรงฟันด้วยวัสดุต่าง ๆ ในฟันกรามหนูแรท ณ 7 และ 28 วัน

1. การเปรียบเทียบค่ากลางของการอักเสบหลังจากปิดโพรงฟันด้วยวัสดุต่าง ๆ ในฟันกรามหนูแรท ณ 7 วัน แสดงดังตารางที่ 25

ตารางที่ 25 ข การเปรียบเทียบค่ากลางของการอักเสบหลังจากปิดโพรงฟันด้วยวัสดุต่าง ๆ ณ 7 วัน ด้วยวิธีทดสอบครัสคัล วาลิส เอส

Inflammation 7d	
Chi-Square	4.964
df	2
Asymp. Sig.	.084

ผลการวิเคราะห์การเปรียบเทียบค่ากลางของการอักเสบหลังจากปิดโพรงฟันด้วยวัสดุต่าง ๆ ณ 7 วัน แสดงค่านัยสำคัญมีค่ามากกว่า 0.05 ดังนั้น จึงยอมรับสมมติฐาน H_0 แสดงว่าค่ากลางของทุกกลุ่มไม่แตกต่างกัน

2. การเปรียบเทียบค่ากลางของการอักเสบหลังจากปิดโพรงฟันด้วยวัสดุต่าง ๆ ณ 28 วัน แสดงดังตารางที่ 26

ตารางที่ 26 ข การเปรียบเทียบค่ากลางเฉลี่ยของการอักเสบ หลังจากปิดโพรงฟันด้วยวัสดุต่าง ๆ ณ 28 วัน ด้วยวิธีทดสอบครัสคัล วาลิส เอส

Inflammation 28d	
Chi-Square	4.560
df	2
Asymp. Sig.	.102

ผลการวิเคราะห์การเปรียบเทียบค่ากลางของการอักเสบหลังจากปิดโพรงฟันด้วยวัสดุต่าง ๆ ณ 28 วัน แสดงค่านัยสำคัญมีค่ามากกว่า 0.05 ดังนั้น จึงยอมรับสมมติฐาน H_0 แสดงว่าค่ากลางของทุกกลุ่มไม่แตกต่างกัน

การวิเคราะห์ทางสถิติของการสร้างเดนตินบริดจ์หลังจากปิดโพรงฟันด้วยวัสดุต่าง ๆ ในฟันกรามหนูแรท ณ 7 และ 28 วัน

1. การเปรียบเทียบค่ากลางของการสร้างเดนตินบริดจ์หลังจากปิดโพรงฟันด้วยวัสดุต่าง ๆ ในฟันกรามหนูแรท ณ 7 วัน แสดงดังตารางที่ 27

ตารางที่ 27 ข การเปรียบเทียบค่ากลางของการสร้างเดนตินบริดจ์หลังจากปิดโพรงฟันด้วยวัสดุต่าง ๆ ในฟันกรามหนูแรท ณ 7 วัน ด้วยวิธีทดสอบครัสคัล วาลิส เอส

Dentin Bridge 7d	
Chi-Square	.250
df	1
Asymp. Sig.	.617

ผลการวิเคราะห์การเปรียบเทียบค่ากลางของการสร้างเดนตินบริดจ์หลังจากปิดโพรงฟันด้วยวัสดุต่าง ๆ ในฟันกรามหนูแรท ณ 7 วัน แสดงค่านัยสำคัญมีค่ามากกว่า 0.05 ดังนั้น จึงยอมรับสมมติฐาน H_0 แสดงว่าค่ากลางของทุกกลุ่มไม่แตกต่างกัน

2. การเปรียบเทียบค่ากลางของของการสร้างเดนตินบริดจ์หลังจากปิดโพรงฟันด้วยวัสดุต่าง ๆ ในฟันกรามหนูแรท ณ 28 วัน แสดงดังตารางที่ 28

ตารางที่ 28 ข การเปรียบเทียบค่ากลางของของการสร้างเดนตินบริดจ์หลังจากปิดโพรงฟันด้วยวัสดุต่าง ๆ ในฟันกรามหนูแรท ณ 28 วัน ด้วยวิธีทดสอบครัสคัล วาลิส เอส

Dentin bridge 28d	
Chi-Square	12.146
df	2
Asymp. Sig.	.002

ผลการวิเคราะห์การเปรียบเทียบค่ากลางของของการสร้างเดนตินบริดจ์หลังจากปิดโพรงฟันด้วยวัสดุต่าง ๆ ในฟันกรามหนูแรท ณ 28 วัน แสดงค่านัยสำคัญมีค่าน้อยกว่า 0.05 ดังนั้น จึงปฏิเสธสมมติฐาน H_0 แสดงว่าค่ากลางมีความแตกต่างกันอย่างน้อย 2 กลุ่ม ในขั้นตอนต่อไปจึงใช้การเปรียบเทียบเชิงซ้อนบอนเฟอร์รอนนี

3. การเปรียบเทียบเชิงซ้อนของค่ากลางของของการสร้างเดนตินบริดจ์ หลังจากปิดโพรงฟันด้วยวัสดุต่าง ๆ ในฟันกรามหนูแรท ณ 28 วัน แสดงดังตารางที่ 29

ตารางที่ 29 ข การเปรียบเทียบเชิงซ้อนของค่ากลางของของการสร้างเดนตินบริดจ์หลังจากปิดโพรงฟันด้วยวัสดุต่าง ๆ ในฟันกรามหนูแรท ณ 28 วัน ด้วยวิธีทดสอบบอนเฟอร์รอนนี

(I) Material	(J) Material	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Acemannan	Dycal	-1.375(*)	.292	.000
	Fuji Lining LC	-.911(*)	.302	.020
Dycal	Acemannan	1.375(*)	.292	.000
	Fuji Lining LC	.464	.302	.419
Fuji Lining LC	Acemannan	.911(*)	.302	.020
	Dycal	-.464	.302	.419

* The mean difference is significant at the 0.05 level.

การเปรียบเทียบเชิงซ้อนของค่ากลางของของการสร้างเดนตินบริดจ์หลังจากปิดโพรงฟันด้วยวัสดุต่าง ๆ ในฟันกรามหนูแรท ณ 28 วัน แสดงค่านัยสำคัญมีค่าน้อยกว่า 0.05 ระหว่างกลุ่มอะซี

แมนแนนและไดแคล และ อะซีแมนแนนและฟูจิไอนิงแอลซี ดังนั้น จึงปฏิเสธสมมติฐาน H_0 แสดงว่า ระหว่างกลุ่มอะซีแมนแนนและไดแคล และ อะซีแมนแนนและฟูจิไอนิงมีค่ากลางแตกต่างกัน

การวิเคราะห์ทางสถิติของการตอบสนองของเนื้อเยื่ออ่อน หลังจากปิดโพรงฟันด้วยวัสดุต่าง ๆ ในฟันกรามหนูแรท ณ 7 และ 28 วัน

1. การเปรียบเทียบค่ากลางของการตอบสนองของเนื้อเยื่ออ่อนหลังจากปิดโพรงฟันด้วยวัสดุต่าง ๆ ในฟันกรามหนูแรท ณ 7 วัน แสดงดังตารางที่ 30

ตารางที่ 30 ข การเปรียบเทียบค่ากลางของการตอบสนองของเนื้อเยื่ออ่อนหลังจากปิดโพรงฟันด้วยวัสดุต่าง ๆ ในฟันกรามหนูแรท ณ 7 วัน ด้วยวิธีทดสอบครัสคัล วาลิส เอส

Soft tissue organization 7d	
Chi-Square	.855
df	2
Asymp. Sig.	.652

ผลการวิเคราะห์การเปรียบเทียบค่ากลางของการตอบสนองของเนื้อเยื่ออ่อนที่ระยะเวลา 7 วัน แสดงค่านัยสำคัญมีค่ามากกว่า 0.05 ดังนั้น จึงยอมรับสมมติฐาน H_0 แสดงว่าค่ากลางของทุกกลุ่มไม่แตกต่างกัน

2. การเปรียบเทียบค่ากลางของการตอบสนองของเนื้อเยื่ออ่อนหลังจากปิดโพรงฟันด้วยวัสดุต่าง ๆ ในฟันกรามหนูแรท ณ 28 วัน แสดงดังตารางที่ 31

ตารางที่ 31 ข การเปรียบเทียบค่ากลางของการตอบสนองของเนื้อเยื่ออ่อนหลังจากปิดโพรงฟันด้วยวัสดุต่าง ๆ ในฟันกรามหนูแรท ณ 28 วัน ด้วยวิธีทดสอบครัสคัล วาลิส เอส

Soft tissue organization 28d	
Chi-Square	8.148
df	2
Asymp. Sig.	.017

ผลการวิเคราะห์การเปรียบเทียบค่ากลางของการตอบสนองของเนื้อเยื่ออ่อนหลังจากปิดโพรงฟันด้วยวัสดุต่าง ๆ ในฟันกรามหนูแรท ณ 28 วัน แสดงค่านัยสำคัญมีค่ามากกว่า 0.05 ดังนั้นจึงยอมรับสมมติฐาน H_0 แสดงว่าค่ากลางมีความแตกต่างกันอย่างน้อย 2 กลุ่ม ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปจึงใช้การเปรียบเทียบเชิงซ้อนด้วยวิธีบอนเฟอร์รอนนี่

3. การเปรียบเทียบเชิงซ้อนของการตอบสนองของเนื้อเยื่ออ่อนหลังจากปิดโพรงฟันด้วยวัสดุต่าง ๆ ในฟันกรามหนูแรท ณ 28 วัน แสดงดังตารางที่ 32

ตารางที่ 32 ข การเปรียบเทียบเชิงซ้อนของการตอบสนองของเนื้อเยื่ออ่อนหลังจากปิดโพรงฟันด้วยวัสดุต่าง ๆ ในฟันกรามหนูแรท ณ 28 วัน ด้วยวิธีบอนเฟอร์รอนนี่

(I) Material	(J) Material	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Acemannan	Dycal	-.625(*)	.216	.027
	Fuji Lining LC	-.643(*)	.224	.028
Dycal	Acemannan	.625(*)	.216	.027
	Fuji Lining LC	-.018	.224	1.000
Fuji Lining LC	Acemannan	.643(*)	.224	.028
	Dycal	.018	.224	1.000

* The mean difference is significant at the 0.05 level.

การเปรียบเทียบเชิงซ้อนของการตอบสนองของเนื้อเยื่ออ่อนหลังจากปิดโพรงฟันด้วยวัสดุต่าง ๆ ในฟันกรามหนูแรท ณ 28 วัน แสดงค่านัยสำคัญมีค่าน้อยกว่า 0.05 ระหว่างกลุ่มอะซีแมนแนนและไดแคล และ อะซีแมนแนนและฟูจิไลนิงแอลซี ดังนั้น จึงปฏิเสธสมมติฐาน H_0 แสดงว่าระหว่างกลุ่มอะซีแมนแนนและไดแคล และ อะซีแมนแนนและฟูจิไลนิงมีค่ากลางแตกต่างกัน

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว นวภรณ์ จิตตภิรมย์ศักดิ์ เกิดวันที่ 5 มกราคม พ.ศ. 2519 ที่กรุงเทพมหานคร สำเร็จปริญญาตรีทันตแพทยศาสตรบัณฑิต ในปี พ.ศ. 2542 จากคณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จากนั้นเข้ารับราชการเป็นอาจารย์ระดับ 4 ที่คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ต่อมาในปี พ.ศ. 2543 ได้เข้าศึกษาต่อระดับปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาทันตกรรมประดิษฐ์ ที่คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และสำเร็จการศึกษาในปี พ.ศ. 2546 จากนั้นกลับเข้ารับราชการเป็นอาจารย์ระดับ 5 ที่คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ต่อมาในปี พ.ศ. 2547 ได้เข้าศึกษาต่อระดับปริญญา หลักสูตรวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิตบัณฑิต สหสาขาวิชาทันตชีววัสดุศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย