ผลของทิวเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์แอลฟาต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ และการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมและฟันแท้มนุษย์

ว่าที่ร้อยโทหญิงมโนวดี สารพานิช

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาทันตกรรมสำหรับเด็ก ภาควิชาทันตกรรมสำหรับเด็ก
คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2556

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

EFFECT OF TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA ON CELL PROLIFERATION AND OSTEOGENIC DIFFERENTIATION OF HUMAN DENTAL PULP CELLS FROM DECIDUOUS AND PERMANENT TEETH

Acting Lieutenant Manovadee Sarapanich

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Pediatric Dentistry

Department of Pediatric Dentistry

Faculty of Dentistry

Chulalongkorn University

Academic Year 2013

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของทิวเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์แอลฟาต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ และการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมและฟันแท้มนุษย์
โดย	ว่าที่ร้อยโทหญิงมโนวดี สารพานิช
สาขาวิชา	ทันตกรรมสำหรับเด็ก
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.วรรณธิดา ศรีอาจ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร.ประสิทธิ์ ภวสันต์

คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

……..……..……คณบดีคณะทันตแพทยศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร.สุชิต พูลทอง)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

……..……ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.ทิพวรรณ ธราภิวัฒนานนท์)

……..……อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.วรรณธิดา ศรีอาจ)

……อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร.ประสิทธิ์ ภวสันต์)

……กรรมการ
(อาจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.วลีรัตน์ ศุกรวรรณ)

……..…กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.นิรดา ธเนศวร)

มโนวดี สารพานิช : ผลของทิวเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์แอลฟาต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ และการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมและฟันแท้มนุษย์. (EFFECT OF TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA ON CELL PROLIFERATION AND OSTEOGENIC DIFFERENTIATION OF HUMAN DENTAL PULP CELLS FROM DECIDUOUS AND PERMANENT TEETH) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : อ.ทญ.ดร.วรรณธิดา ศรีอาจ, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ศ.ทพ.ดร.ประสิทธิ์ ภวสันต์, 80 หน้า.

วัตถุประสงค์ การศึกษานี้มีขึ้นเพื่อศึกษาผลของทิวเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์แอลฟา (ทีเอ็นเอฟแอลฟา) ต่อการเหนี่ยวนำการซ่อมแซมเนื้อเยื่อในโพรงฟันฟันน้ำนมและฟันแท้มนุษย์ ในแง่ของการเพิ่มจำนวนเซลล์และการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง **วิธีวิจัย** เซลล์จะถูกเพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อในโพรงฟันของฟันน้ำนมและฟันแท้ที่ไม่มีรอยผุ และกระตุ้นด้วยทีเอ็นเอฟแอลฟาที่ความเข้มข้นต่างๆ การเพิ่มจำนวนเซลล์จะศึกษาด้วยเทคนิคเอ็มทีที และการแปรสภาพของเซลล์จะใช้การแสดงออกของเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ (บีเอฟจีเอฟ) ซอกซ์2 และเดนทีนไซอะโลฟอสโฟโปรตีน (ดีเอสพีพี) ด้วยวิธีรีเวอร์สทรานสคริปชัน-โพลีเมอรเรสเชนรีแอคชัน (อาร์ที-พีซีอาร์) **ผลการศึกษา** ทีเอ็นเอฟแอลฟาไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ทั้งสองชนิด แต่การกระตุ้นเป็นเวลา 1 วัน จะเพิ่มการแสดงออกของบีเอฟจีเอฟได้ทั้งในเซลล์จากฟันแท้และฟันน้ำนม อีกทั้งเซลล์จากฟันแท้ยังเพิ่มการแสดงออกของซอกซ์2 ด้วย และเมื่อกระตุ้นเป็นเวลา 7 วัน จะพบการแสดงออกของดีเอสพีพี ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ในการแปรสภาพของเซลล์เพิ่มขึ้นในเซลล์จากฟันแท้ ขณะที่พบการลดลงในเซลล์จากฟันน้ำนม **สรุป** ทีเอ็นเอฟแอลฟามีอิทธิพลต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด และการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง โดยการกระตุ้นด้วยทีเอ็นเอฟแอลฟาในระยะสั้นส่งเสริมความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมากขึ้นทั้งจากฟันแท้และฟันน้ำนม ส่วนการกระตุ้นในระยะยาว ฟันแท้มีแนวโน้มที่จะส่งเสริมการแปรสภาพไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง ในขณะที่ฟันน้ำนมอาจมีการยับยั้งผลดังกล่าว อย่างไรก็ตามในการประยุกต์ใช้ในทางคลินิก จำเป็นจะต้องศึกษาในรายละเอียดเพิ่มเติมต่อไป

ภาควิชา ทันตกรรมสำหรับเด็ก ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา ทันตกรรมสำหรับเด็ก ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

ปีการศึกษา 2556 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5475817632 : MAJOR PEDIATRIC DENTISTRY
KEYWORDS : HUMAN DENTAL PULP CELLS / DPSCS / SHEDS / TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA / TNF-ALPHA / PROLIFERATION / OSTEOGENIC DIFFERENTIATION

MANOVADEE SARAPANICH : EFFECT OF TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA ON CELL PROLIFERATION AND OSTEOGENIC DIFFERENTIATION OF HUMAN DENTAL PULP CELLS FROM DECIDUOUS AND PERMANENT TEETH. ADVISOR : WANTIDA SRIARJ, Ph.D., CO-ADVISOR : PROF. PRASIT PAVASANT, Ph.D., 80 pp.

Objective The purpose of this study is to examine the effects of tumor necrosis factor alpha (TNF-α) on cell proliferation and osteogenic differentiation of human dental pulp cells from deciduous and permanent teeth. **Materials and Methods** Dental pulp cells were cultured from dental pulp tissue obtained from exfoliated deciduous teeth (SHEDs) and impacted teeth (DPSCs). Cells were treated with various doses of TNF-α. MTT and Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) assay were performed to determine cell proliferation and gene expression, respectively. **Results** TNF-α had no effect on cell proliferation in both DPSCs and SHEDs. However, in 1-day treatment with 10 ng/ml of TNF-α, both types of cell increased the expression of basic fibroblast growth factor (*bFGF*). TNF-α could also increase *SOX2* expression in DPSCs. In 7-day treatment, a significant increase of dentinsialophosphoprotein (*DSPP*) expression could be observed in DPSCs, while *DSPP* expression was decreased in SHEDs. **Conclusion** TNF-α influenced both DPSCs and SHEDs on stemness and osteogenic differentiation. For a short time exposure, TNF-α might promote stemness in both types of cell. While in the longer exposure, TNF-α might promote osteogenic differentiation in DPSCs but inhibit in SHEDs. Further studies are needed to clarify the detail mechanism.

Department : Pediatric Dentistry	Student's Signature .....
Field of Study : Pediatric Dentistry	Advisor's Signature .....
Academic Year : 2013	Co-advisor's Signature .....

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณสถาบันและผู้มีส่วนร่วมให้วิทยานิพนธ์นี้เสร็จสมบูรณ์ดังรายนามต่อไปนี้

อ.ทพญ.ดร.วรรณธิดา ศรีอาจ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และ ศ.ทพ.ดร. ประสิทธิ์ ภวสันต์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะในการทำวิทยานิพนธ์

คณะกรรมการสอบโครงร่างวิทยานิพนธ์ และสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ทุกท่านที่ให้คำแนะนำ ชี้แนะข้อบกพร่องและแนวทางปรับปรุงแก้ไขวิทยานิพนธ์

อาจารย์สาขาวิชาทันตกรรมสำหรับเด็ก ภาควิชาทันตกรรมสำหรับเด็ก จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ได้ถ่ายทอดความรู้ ความใฝ่รู้ ตลอดจนจริยธรรมให้แก่ข้าพเจ้า

เจ้าหน้าที่หน่วยปฏิบัติการวิจัยเนื้อเยื่ออินทรีย์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่ให้คำแนะนำในการใช้เครื่องมือวิจัยในครั้งนี้เป็นอย่างดี

คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เป็นสถานที่ให้ความรู้ อบรมจริยธรรม และปลูกจิตสำนึกที่ดีแก่ข้าพเจ้า

เพื่อน พี่ น้อง ทันตแพทย์ที่ทำงาน และที่คณะทันตแพทยศาสตร์ ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจมาโดยตลอด

อาสาสมัครทุกท่านที่ยินยอมบริจาคฟันแท้และฟันน้ำนมที่ถอนออกมาร่วมการวิจัยครั้งนี้

บิดา มารดา และครอบครัว ตลอดจนผู้มีพระคุณทุกท่านที่ไม่ได้กล่าวถึง ประโยชน์ใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้ทำวิทยานิพนธ์ขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน ซึ่งมีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์สำเร็จลงด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย……	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฏ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1
คำถามการวิจัย.....	4
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	4
สมมติฐานการวิจัย.....	4
คำจำกัดความในการวิจัยและข้อตกลงเบื้องต้น.....	4
กรอบแนวคิดการวิจัย……...	6
คำสำคัญ.....	6
ชนิดของการศึกษา.....	6
ข้อจำกัดของการวิจัย.....	7
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	7
ข้อพิจารณาด้านจริยธรรม.....	7
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	8
เนื้อเยื่อในโพรงฟันและการซ่อมแซมเนื้อเยื่อในโพรงฟัน.....	8
ทิวเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์แอลฟา หรือทีเอ็นเอฟแอลฟา.....	10
เบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ หรือบีเอฟจีเอฟ.....	14
เซกซ์ ดีเทอมีนนิง รีเจียนวาย บอกซ์2 หรือซอกซ์2.....	15
เดนทีน ไซอะโลฟอสโฟโปรตีน หรือดีเอสพีพี.....	16

หน้า

บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย..... 18
ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง..... 18
สถานที่ทำการวิจัย..... 19
เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย..... 19
ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย..... 22
การวิเคราะห์ข้อมูล..... 26
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล..... 28
การศึกษาอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์โดยการวัดปริมาณเซลล์ด้วยเทคนิคเอ็มทีที.. 28
การศึกษาระดับการแสดงออกของอาร์เอ็นเอนำรหัสด้วยวิธีอาร์ที-พีซีอาร์..... 28
การแสดงออกของบีเอฟจีเอฟ..... 28
การแสดงออกของซอกซ์2..... 30
การแสดงออกของดีเอสพีพี..... 30
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ..... 32
อภิปรายผลการวิจัย..... 32
สรุปผลการวิจัย..... 36
ข้อเสนอแนะ..... 36
รายการอ้างอิง..... 37
ภาคผนวก..... 48
ภาคผนวก ก เอกสารผลการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์..... 49
ภาคผนวก ข เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับอาสาสมัครที่เข้าร่วมการวิจัย..... 50
ภาคผนวก ค เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับอาสาสมัครเด็กอายุ 7-12 ปี…….. 54
ภาคผนวก ค เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้ปกครองของอาสาสมัครเด็ก..... 58
ภาคผนวก ง เอกสารยินยอมเข้าร่วมการวิจัย..... 60
ภาคผนวก จ เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมการวิจัยสำหรับอาสาสมัครเด็ก
อายุ 7-12 ปี..... 63
ภาคผนวก ฉ เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมการวิจัยสำหรับผู้ปกครองของ
อาสาสมัครเด็ก..... 65
ภาคผนวก ช เอกสารยกเลิกการยินยอมเข้าร่วมวิจัย..... 67

หน้า

ภาคผนวก ซ รายละเอียดการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ..... 68
ภาคผนวก ญ การบริหารงานวิจัย..... 77
ภาคผนวก ฎ งบประมาณ..... 78
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 80

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ลำดับเบสของไพร์มเมอร์ที่จำเพาะต่ออาร์เอ็นเอของยีนที่ใช้ในการทดลอง..... 26
ตารางที่ 2 การวิเคราะห์เปรียบเทียบอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ด้วยวิธีเอ็มทีทีในเวลา 24 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมงของกลุ่มศึกษา และกลุ่มควบคุม โดยวิธีการทดสอบการแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA)..... 68
ตารางที่ 3 การวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของอาร์เอ็นเอนำรหัสของยีนบีเอฟจีเอฟ ใน 1 วัน และ 7 วันของกลุ่มศึกษา และกลุ่มควบคุม โดยวิธีการทดสอบการแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA)..... 69
ตารางที่ 4 การวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของอาร์เอ็นเอนำรหัสของยีนซอกซ์2 ใน 1 วัน และ 7 วันของกลุ่มศึกษา และกลุ่มควบคุม โดยวิธีการทดสอบการแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA)..... 72
ตารางที่ 5 การวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของอาร์เอ็นเอนำรหัสของยีนดีเอสพีพี ใน 7 วันของกลุ่มศึกษา และกลุ่มควบคุม โดยวิธีการทดสอบการแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA)..... 74
ตารางที่ 6 การบริหารงานวิจัย..... 77

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 กรอบแนวคิดการวิจัย..... 6

ภาพที่ 2 กราฟแสดงอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์จากเนื้อเยื่อในโพรงฟันหลังการกระตุ้นด้วยทีเอ็นเอฟแอลฟาเป็นเวลา 24 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมง..... 28

ภาพที่ 3 ภาพการแสดงออกของยีน และแผนภูมิการแสดงออกของยีนบีเอฟจีเอฟ..... 29

ภาพที่ 4 ภาพการแสดงออกของยีน และแผนภูมิการแสดงออกของยีนซอกซ์2..... 30

ภาพที่ 5 ภาพการแสดงออกของยีน และแผนภูมิการแสดงออกของยีนดีเอสพีพี..... 31

..

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

เป็นที่ยอมรับกันว่าเมื่อมีการบาดเจ็บเกิดขึ้นกับฟัน เซลล์ของเนื้อเยื่อในโพรงฟัน (dental pulp cells) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ (mesenchymal stem cells) สามารถที่จะแปรสภาพไปเป็นเซลล์คล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟัน (odontoblast-like cell) เพื่อทำหน้าที่สร้างเนื้อฟันตติยภูมิ (tertiary dentin) ชนิดเนื้อฟันซ่อมเสริม (reparative dentin) ขึ้นมาป้องกันความมีชีวิตของฟันได้ และแม้ว่าเซลล์ของเนื้อเยื่อในโพรงฟันจะมีความสามารถดังกล่าว แต่รายละเอียดของกลไกหรือปัจจัยที่ควบคุมการแปรสภาพของเซลล์เหล่านี้ ยังไม่มีความชัดเจน

ปัจจัยตัวหนึ่งที่อาจจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างเนื้อฟันซ่อมเสริม คือ ไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (inflammatory cytokines) เนื่องจากมีรายงานจำนวนมากที่แสดงว่ากระบวนการอักเสบที่เกิดขึ้นภายหลังจากที่เนื้อเยื่อได้รับอันตรายนั้น เป็นปัจจัยสำคัญในการกระตุ้นการซ่อมแซมของเนื้อเยื่อ (Artlett, 2013; Cooper และคณะ, 2010; Eming, Krieg และ Davidson, 2007; Goldberg และคณะ, 2008; Park และ Barbul, 2004) สารอักเสบตัวหนึ่งที่มีความสำคัญคือ ทิวเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์แอลฟา หรือ ทีเอ็นเอฟ แอลฟา (tumor necrosis factor alpha; TNF-α) ซึ่งมีรายงานที่แสดงว่าเป็นสารอักเสบตัวแรกๆ ที่ปรากฏขึ้นเมื่อฟันได้รับอันตราย และเป็นดรรชนีบ่งชี้การอักเสบในระยะแรก (Cooper และคณะ, 2010; Kjeldsen, Holmstrup และ Bendtzen, 1993) นอกจากบทบาทในด้านการอักเสบแล้ว ยังมีรายงานว่าทีเอ็นเอฟแอลฟาสามารถทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมเนื้อเยื่อแข็งด้วย โดยมีรายงานว่าทีเอ็นเอฟแอลฟาสามารถเหนี่ยวนำเซลล์จากไขกระดูกหนู และเซลล์จากเนื้อเยื่อในโพรงฟันแท้ของหนูและมนุษย์แปรสภาพเป็นเซลล์สร้างกระดูก (osteogenic differentiation) (Huang และคณะ, 2011; Min และคณะ, 2006; Paula-Silva และคณะ, 2009; Yang และคณะ, 2012) นอกจากนี้ ยังมีรายงานที่แสดงถึงการเพิ่มจำนวนของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันแท้ของหนู เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยทีเอ็นเอฟแอลฟาอีกด้วย (Yang และคณะ, 2012)

แม้ว่ารายงานที่กล่าวถึงข้างต้นจะสนับสนุนบทบาทของทีเอ็นเอฟแอลฟาในกระบวนการซ่อมแซมเนื้อเยื่อแข็ง แต่ก็มีรายงานที่แสดงว่าทีเอ็นเอฟแอลฟาให้ผลในการยับยั้งการแปรสภาพของเซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อในโพรงฟันแท้มนุษย์และเซลล์จากไขกระดูกของหนูไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก (Huang และคณะ, 2011; Komine และคณะ, 2001; Lam และคณะ, 2000; Min

และคณะ, 2006; Nanes, 2003) ซึ่งจากรายงานการศึกษาเหล่านี้ แสดงให้เห็นว่าความแตกต่างของผลของทีเอ็นเอฟแอลฟาที่มีต่อการซ่อมแซมเนื้อเยื่อแข็งจะขึ้นกับชนิดของเซลล์ที่ศึกษา ความเข้มข้นของทีเอ็นเอฟแอลฟาและระยะเวลาที่เหมาะสม ซึ่งจากผลการทดลองในปัจจุบันยังไม่มีข้อสรุปที่ชัดเจน

โดยทั่วไปแล้ว ขั้นตอนของการซ่อมแซมเนื้อเยื่อในโพรงฟันจะเริ่มจากการเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดภายในเนื้อเยื่อในโพรงฟัน ตามด้วยการแปรสภาพของเซลล์ต้นกำเนิดไปเป็นเซลล์คล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟัน ซึ่งในขั้นตอนเหล่านี้จะพบควบคู่ไปกับการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน (gene expression) ที่เกี่ยวข้องกับความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด หรือยีนที่ควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์ รวมทั้งยีนที่เกี่ยวข้องกับการแปรสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก

มีรายงานที่แสดงว่า เซลล์ของเนื้อเยื่อในโพรงฟันทั้งจากฟันน้ำนมและฟันแท้มีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดหลายตัว ได้แก่ ออกเทเมอร์4 หรือออกท์4 (octamer4; *OCT4*) นานอก (*NANOG*) และ เซกซ์ ดีเทอมีนนิง รีเจียนวาย บอกซ์2 หรือซอกซ์2 (SRY (sex determining region Y)-box2; *SOX2*) (Atari และคณะ, 2011; Cheng และคณะ, 2008; Govindasamy และคณะ, 2010; Yalvac และคณะ, 2010) แม้จะมีรายงานที่แสดงว่า การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนกลุ่มนี้สามารถจะบ่งชี้สภาวะของการแปรสภาพได้ แต่หน้าที่ของยีนเหล่านี้ในเซลล์ของเนื้อเยื่อในโพรงฟันยังไม่มีความชัดเจน

แม้ว่าการแสดงออกของออกท์4 นานอก และซอกซ์2 สัมพันธ์กับการคงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด และการควบคุมการแปรสภาพของเซลล์ (Ivanova และคณะ, 2006; Jaenisch และ Young, 2008; Loh และ Lim, 2011; Takahashi และคณะ, 2007; Takahashi และ Yamanaka, 2006) แต่มีเพียงการแสดงออกของซอกซ์2 เท่านั้นที่มีรายงานว่าทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการกำหนดการแปรสภาพของเซลล์ (differentiation lineage) โดยเฉพาะในการสร้างกระดูก (osteogenesis) และการแปรสภาพเป็นเซลล์ประสาท (neurogenic differentiation) (Park และคณะ, 2012; Seo และคณะ, 2011) ในขณะที่หน้าที่ของออกท์4 และนานอก ในการกำหนดการแปรสภาพของเซลล์ไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกและเซลล์ประสาทยังไม่มีความชัดเจน อย่างไรก็ดี หน้าที่ของซอกซ์2 ในเซลล์ของเนื้อเยื่อในโพรงฟัน ยังคงไม่มีรายงานการศึกษามาก่อน

นอกจากซอกซ์2 แล้ว เบสิกไฟโบรบลาสโกรทแฟกเตอร์หรือบีเอฟจีเอฟ (basic fibroblast growth factor; bFGF) เป็นโปรตีนอีกตัวหนึ่งที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด

และการควบคุมการแปรสภาพเช่นกัน โดยบีเอฟจีเอฟนั้น มีหน้าที่หลากหลาย (multifunctional growth factor) ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับทั้งการคงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด (stemness) การเพิ่มจำนวน (proliferation) การเหนี่ยวนำการสร้างเส้นเลือดใหม่ (angiogenesis) การควบคุมการแปรสภาพของเซลล์ (Hasegawa และคณะ, 2010) และการป้องกันการตายหรือการอยู่รอดของเซลล์ (cell survival) (Eiselleova และคณะ, 2009; Meijs และคณะ, 2004) โดยทำหน้าที่ทั้งในระหว่างพัฒนาการ และในเนื้อเยื่อที่มีพัฒนาการเต็มที่แล้ว (Coutu และ Galipeau, 2011) โดยในกรณีของเซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อในโพรงฟันนั้น มีรายงานที่แสดงว่าบีเอฟจีเอฟทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการคงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด และยับยั้งการแปรสภาพของเซลล์ (Morito และคณะ, 2009; Osathanon, Nowwarote และ Pavasant, 2011; Shiba และคณะ, 1995)

ในส่วนของการแปรสภาพไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่เฉพาะด้านนั้น เป็นที่ยอมรับกันว่าการแสดงออกของยีนบางตัว สามารถบ่งชี้การแปรสภาพของเซลล์ได้ ว่ามีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ในสาย (lineage) ใด เช่น การแสดงออกของรันซ์2 หรือซีบีเอฟเอ1 *(RUNX2/CBFA1)* นั้นพบว่าสัมพันธ์กับการแปรสภาพของเซลล์ไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก (Lian และคณะ, 2004) เป็นต้น หรือการแสดงออกของโปรตีนที่ทำหน้าที่เฉพาะ เช่น ออสติโอแคลซิน (osteocalcin) ซึ่งพบแสดงออกโดยเซลล์สร้างกระดูก ก็สามารถใช้เป็นดรรชนีบ่งชี้ความเป็นเซลล์สร้างกระดูกได้ (Lee, Hodges และ Eastell, 2000) เป็นต้น

นอกจากออสติโอแคลซินแล้ว การแสดงออกของเดนทีนไซอะโลฟอสโฟโปรตีนหรือดีเอสพีพี (dentinsialophosphoprotein; *DSPP*) ซึ่งเป็นยีนที่กำหนดรหัสของโปรตีนสองชนิด คือเดนทีนไซอะโลโปรตีน (dentin sialoprotein) และเดนทีน ฟอสโฟโปรตีน (dentin phosphoprotein) ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเหนี่ยวนำการสะสมแร่ธาตุในเนื้อฟัน (mineralization) (Prasad, Butler และ Qin, 2010; Staines, Macrae และ Farquharson, 2012) ก็สามารถใช้เป็นดรรชนีบ่งชี้การแปรสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกได้เช่นกัน เนื่องจากยีนดีเอสพีพีนี้ พบการแสดงออกในเซลล์สร้างเนื้อฟัน และอาจพบในเซลล์สร้างกระดูกได้ จึงมีการใช้การแสดงออกของยีนตัวนี้ เป็นตัวบ่งชี้ในการแสดงความเป็นเซลล์สร้างเนื้อฟัน (odontoblast) (Chen และคณะ, 2005) และใช้บ่งชี้การแปรสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกได้

ดังนั้น วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้ จึงต้องการศึกษาผลของทีเอ็นเอฟแอลฟาที่มีต่อการเหนี่ยวนำการซ่อมแซมเนื้อเยื่อในโพรงฟันของทั้งฟันน้ำนมและฟันแท้ ในห้องปฏิบัติการ โดยใช้ดรรชนีบ่งชี้คือ ผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ ผลต่อการเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนที่

เกี่ยวข้องกับความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด และยีนที่เกี่ยวข้องกับการแปรสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกได้ ได้แก่ การแสดงออกของบีเอฟจีเอฟ ซอกซ์2 และดีเอสพีพี ตามลำดับ ด้วยเทคนิคเอ็มทีที (MTT) และวิธีรีเวอร์สทรานสคริปชัน-โพลีเมอรเรสเชนรีแอคชันหรืออาร์ที-พีซีอาร์ (reverse transcription polymerase chain reaction; RT-PCR) ทั้งนี้ เพื่อทำความเข้าใจถึงบทบาทของทีเอ็นเอฟแอลฟาในการซ่อมแซมของเนื้อเยื่อในโพรงฟันหลังการอักเสบ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการนำไปพัฒนาวิธีการเหนี่ยวนำการซ่อมแซมเนื้อเยื่อฟันต่อไป

คำถามการวิจัย

1. ทีเอ็นเอฟแอลฟามีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมและฟันแท้มนุษย์หรือไม่
2. ทีเอ็นเอฟแอลฟามีผลต่อการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมและฟันแท้มนุษย์หรือไม่

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาผลของทีเอ็นเอฟแอลฟาต่อเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันของฟันน้ำนมและฟันแท้มนุษย์ ในแง่ของ

1. การเพิ่มจำนวนของเซลล์
2. การแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง

สมมุติฐาน

1. ทีเอ็นเอฟแอลฟามีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมและฟันแท้มนุษย์
2. ทีเอ็นเอฟแอลฟามีผลต่อการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมและฟันแท้มนุษย์

คำจำกัดความในการวิจัยและข้อตกลงเบื้องต้น

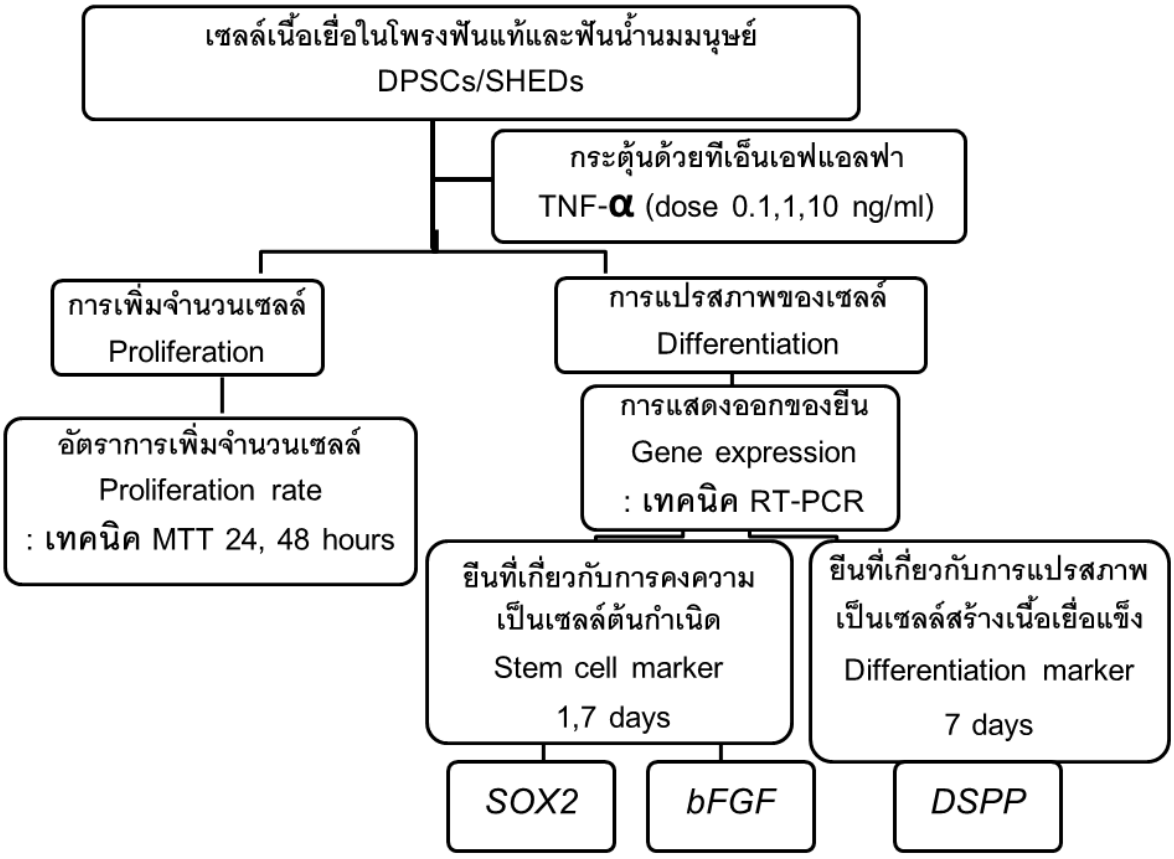
- เซลล์จากเนื้อเยื่อในโพรงฟันแท้มนุษย์ หมายถึง เซลล์ที่เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อในโพรงฟันแท้ของมนุษย์ที่ไม่มีรอยผุและไม่มีรอยโรคที่ปลายรากฟัน

- เซลล์จากเนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมมนุษย์ หมายถึง เซลล์ที่เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมของมนุษย์ที่ไม่มีรอยผุและไม่มีรอยโรคที่ปลายรากฟัน

- อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม หมายถึง อาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็ม (Dulbecco's Modified Eagle Medium; DMEM, Gibco, USA) ชนิดที่มีฟีนอลเรด (phenol red) ที่ผสมซีรัมจากฟีตัสวัว ร้อยละ 10 (fetal bovine serum; FBS, Gibco, USA) ยาปฏิชีวนะและยาต้านจุลชีพร้อยละ 1 ประกอบด้วย เพนนิซิลินจีโซเดียม (penicillin G sodium 100 units/mL, Invitrogen, USA) แอมโฟเทอริซินบี (amphotericin B 5 μg/mL, Invitrogen, USA) สเตรปโตมัยซินซัลเฟต (streptomycin sulfate 100 μg/mL, Invitrogen, USA) และแอลกลูตามีน ร้อยละ 1 (L-glutamine 200 mM, Invitrogen, USA)

- อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัม หมายถึง อาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็ม (Dulbecco's Modified Eagle Medium; DMEM, Gibco, USA) ชนิดที่มีฟีนอลเรด (phenol red) ที่ผสมแลคตัลบูมิน (lactalbumin, Invitrogen, USA) ร้อยละ 1 ยาปฏิชีวนะและยาต้านจุลชีพร้อยละ 1 ประกอบด้วย เพนนิซิลินจีโซเดียม (penicillin G sodium 100 units/mL, Invitrogen, USA) แอมโฟเทอริซินบี (amphotericin B 5 μg/mL, Invitrogen, USA) สเตรปโตมัยซินซัลเฟต (streptomycin sulfate 100 μg/mL, Invitrogen, USA) และแอลกลูตามีน ร้อยละ 1 (L-glutamine 200 mM, Invitrogen, USA)

กรอบแนวคิดการวิจัย



ภาพที่ 1 กรอบแนวคิดการวิจัย

คำสำคัญ

- เซลล์จากเนื้อเยื่อในโพรงฟันแท้มนุษย์ (human dental pulp cells from permanent teeth or dental pulp stem cells; DPSCs)
- เซลล์จากเนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมมนุษย์ (human dental pulp cells from deciduous teeth or stem cells from human exfoliated deciduous teeth; SHEDs)
- ทิวเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์แอลฟา (tumor necrosis factor alpha; TNF-α)
- การเพิ่มจำนวนของเซลล์ (proliferation)
- การแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง (osteogenic differentiation)

ชนิดของการศึกษา

การวิจัยเชิงทดลองในห้องปฏิบัติการ (laboratory experimental research)

ข้อจำกัดของการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาในห้องปฏิบัติการ จึงไม่สามารถเลียนแบบสภาวะจริงในร่างกายได้อย่างสมบูรณ์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การศึกษานี้เป็นการศึกษาถึงผลของทีเอ็นเอฟแอลฟาเพื่อที่จะทำความเข้าใจบทบาทของทีเอ็นเอฟแอลฟาต่อการซ่อมแซมเนื้อเยื่อในโพรงฟัน ความรู้ที่ได้นี้ จะช่วยเพิ่มความเข้าใจในกระบวนการซ่อมแซมเนื้อเยื่อฟัน และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาวัสดุหรือวิธีการรักษาทางทันตกรรม เพื่อช่วยรักษาความมีชีวิตของฟันและ/หรือการซ่อมแซมเนื้อเยื่อในโพรงฟันอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

ข้อพิจารณาปัญหาทางจริยธรรม

วิธีการเตรียมเซลล์เพื่อเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ จะต้องได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการพิจารณา จริยธรรมการทำงานวิจัยในมนุษย์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และในการทดลองนี้ จะใช้เซลล์จากฟันที่มีข้อบ่งชี้ในการถอน และได้รับคำยินยอมจากผู้ป่วยด้วยความเต็มใจ

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เนื้อเยื่อในโพรงฟัน (dental pulp) **และการซ่อมแซมเนื้อเยื่อในโพรงฟัน** (dental pulp repair)

เนื้อเยื่อในโพรงฟันเป็นเนื้อเยื่ออ่อนที่อยู่ภายในฟันและมีการล้อมรอบด้วยผนังของเนื้อเยื่อแข็งเกือบทั้งหมด (Orchardson และ Cadden, 2001) ประกอบด้วยเซลล์หลายชนิด ได้แก่ เซลล์สร้างเนื้อฟัน (odontoblast) เซลล์สร้างเส้นใย (fibroblast) เซลล์บุหลอดเลือด (endothelial cells) เซลล์รอบหลอดเลือด (perivascular cells) เซลล์ประสาท (neural cell) เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน (immunocompetent cells) เป็นต้น เนื้อเยื่อในโพรงฟันมีความสามารถในการซ่อมแซมโดยจะเกิดการตอบสนองเมื่อมีพยาธิสภาพเกิดขึ้น เซลล์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการซ่อมแซมเนื้อเยื่อในโพรงฟัน คือเซลล์ต้นกำเนิดในเนื้อเยื่อในโพรงฟัน (dental pulp stem cells) ซึ่งได้มีหลักฐานที่แสดงว่าเซลล์ต้นกำเนิดเหล่านี้มีศักยภาพในการแปรสภาพไปเป็นเซลล์ในกลุ่มต่างๆ (lineages) ได้หลายชนิด ได้แก่ เซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง (osteoblast) เซลล์สร้างไขมัน (adipocyte) และเซลล์ประสาท (neural cell) ทั้งในห้องปฏิบัติการ และในสัตว์ทดลอง (Gronthos และคณะ, 2002; Gronthos และคณะ, 2000; Koyama และคณะ, 2009; Miura และคณะ, 2003; Zhang และคณะ, 2006)

มีการศึกษาถึงคุณสมบัติความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเนื้อเยื่อในโพรงฟันแท้มนุษย์ พบว่ามีคุณสมบัติคล้ายกับเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ ได้แก่ ความสามารถในการแบ่งตัวได้อย่างไม่มีขีดจำกัด (self-renewal) (Gronthos และคณะ, 2002) ความสามารถในการแปรสภาพไปเป็นเซลล์ต่างๆ ได้แก่ เซลล์สร้างกระดูก เซลล์ประสาท เซลล์ไขมัน เซลล์กล้ามเนื้อเรียบ และเซลล์กระดูกอ่อน (Gronthos และคณะ, 2002; Gronthos และคณะ, 2000; Koyama และคณะ, 2009) รวมทั้งการแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์ก็มีความคล้ายกับเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ เช่น ซีดี-44 (CD-44) ซีดี-106 (CD-106) ซีดี-146 (CD-146) และสโตร-1 (STRO-1) (Gronthos และคณะ, 2002; Shi และคณะ, 2005)

ส่วนคุณสมบัติของความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมมนุษย์นั้น พบว่ามีคุณสมบัติในการแบ่งตัวและแปรสภาพไปเป็นเซลล์ต่างๆ ได้เช่นเดียวกับเซลล์จากเนื้อเยื่อโพรงในฟันแท้ ได้แก่ เซลล์สร้างกระดูก เซลล์ไขมัน เซลล์ประสาท เซลล์กระดูกอ่อน เซลล์กล้ามเนื้อ เป็นต้น การแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์นั้นก็ยังมีความคล้ายกับเซลล์จากเนื้อเยื่อ

ในโพรงฟันแท้มนุษย์ เช่น ซีดี-146 และสโตร-1 (Miura และคณะ, 2003) อย่างไรก็ตาม แม้ว่าเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันแท้และฟันน้ำนมจะมีคุณสมบัติในการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดเช่นเดียวกัน แต่ลักษณะหรือองค์ประกอบของเซลล์ และความสามารถในการทำหน้าที่แตกต่างกันออกไป จากการศึกษา พบว่า เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนม มีความใกล้เคียงกับเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ (pluripotent stem cell) มากกว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในโพรงฟันฟันแท้มนุษย์ มีอัตราการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนสูงกว่า (Guan, 2011; Miura และคณะ, 2003; Nakamura และคณะ, 2009) และมีการแสดงออกของโปรตีนหรือตัวรับที่ผิวเซลล์มีความแตกต่างกัน เช่น โปรตีนที่พบในเซลล์ต้นกำเนิดของตัวอ่อนหรือเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ เช่น ออกเทเมอร์4 ซอกซ์2 นานอก และ เร็กซ์1 มากกว่าเซลล์จากเนื้อเยื่อในโพรงฟันแท้ (Govindasamy และคณะ, 2010) เป็นต้น จากคุณสมบัติความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดดังกล่าว เช่น ความสามารถในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ตนเอง ความสามารถในการคงสภาพความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด และความสามารถในการแปรสภาพเป็นเซลล์จำเพาะชนิดต่างๆ ได้ในสภาวะที่เหมาะสม ทำให้เซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันแท้และฟันน้ำนมมนุษย์ มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการซ่อมแซมเนื้อเยื่อในโพรงฟัน

เมื่อมีพยาธิสภาพเกิดขึ้นในเนื้อเยื่อในโพรงฟันได้แก่ ฟันผุ การบาดเจ็บเชิงกล ทางกายภาพ หรือ อันตรายจากผลของสารเคมีหรือวัสดุทางทันตกรรม เป็นต้น ซึ่งอาจจะทำให้เกิดการตายของเซลล์สร้างเนื้อฟัน (odontoblast) และชักนำปฏิกิริยาการอักเสบขึ้นภายในเนื้อเยื่อโพรงฟัน การตอบสนองต่อกระบวนการอักเสบของเซลล์ในบริเวณดังกล่าวนี้ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจะสามารถเอื้อให้เกิดการซ่อมแซมหรือการสร้างเนื้อฟันตติยภูมิ (tertiary dentin) ชนิดเนื้อฟันซ่อมเสริม (reparative dentin) ได้ (Hargreaves และ Goodis, 2002)

เนื้อฟันซ่อมเสริมสร้างขึ้นจากเซลล์คล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟัน (odontoblast-like cell) โดยในกระบวนการสร้างเนื้อฟันซ่อมเสริมนี้ (reparative dentinogenesis) จะเริ่มจากการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเซลล์ต้นกำเนิด (stem cell/progenitors) ที่อยู่ในเนื้อเยื่อในบริเวณใต้ต่อเซลล์สร้างเนื้อฟัน (subodontoblastic cell-rich zone) ถูกกระตุ้นให้แปรสภาพเป็นเซลล์คล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟัน หรืออาจมีการเคลื่อนที่เข้ามา (migration) ของเซลล์ต้นกำเนิดจากส่วนกลางของเนื้อเยื่อในโพรงฟันก่อนจะเพิ่มจำนวน และแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อฟัน และผลของการแปรสภาพจะทำให้เซลล์เหล่านี้ สามารถสร้างคอลลาเจน (collagen) และโมเลกุลของสารองค์ประกอบนอกเซลล์ (extracellular matrix) และสังเคราะห์เป็นโครงร่าง (scaffold) เพื่อการสะสมแร่ธาตุ (mineralization) ซึ่งต่อมาจะสร้างเป็นเนื้อฟันซ่อมเสริม (Fitzgerald, Chiego และ Heys, 1990; Goldberg และคณะ, 2008; Schroder, 1985; Tziafas, 1995)

เมื่อเกิดสภาวะอักเสบขึ้นกับเนื้อเยื่อในโพรงฟัน เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันหรือเซลล์อักเสบ (immune/inflammatory cell) ภายในเนื้อเยื่อในโพรงฟัน เช่น เซลล์เดนไดรติก (dendritic cell) ทีเซลล์ลิมโฟไซท์ (T cell lymphocyte) และเซลล์แมคโครฟาจ (macrophage) เป็นต้น จะเคลื่อนมายังตำแหน่งที่อักเสบและหลั่งสารอักเสบ (inflammatory cytokines) หลายชนิดซึ่งทำหน้าที่เหนี่ยวนำให้เซลล์จากเนื้อเยื่อในโพรงฟันหรือเซลล์ต้นกำเนิดมีการทำหน้าที่ในการตอบสนองต่อกระบวนการอักเสบ ซึ่งจะชักนำให้เกิดกาซ่อมแซมของเนื้อเยื่อขึ้น ฉะนั้น สารอักเสบที่หลั่งออกมาน่าจะมีบทบาทสำคัญในการซ่อมแซมเนื้อเยื่อในโพรงฟันที่ได้รับบาดเจ็บ (Goldberg และคณะ, 2008)

ทิวเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์แอลฟาหรือทีเอ็นเอฟแอลฟา (Tumor necrosis factor alpha; TNF-α)

สารอักเสบที่พบได้มากในภาวะที่มีการอักเสบของเนื้อเยื่อในโพรงฟันจากสาเหตุต่างๆ ได้แก่ อินเตอร์ลิวคีน-1เบตาหรือไอแอล-1เบตา (interleukin-1β; IL-1β) ทิวเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์แอลฟาหรือทีเอ็นเอฟแอลฟา (tumor necrosis factor alpha; TNF-α) อินเตอร์ลิวคีน-12 (interleukin-12; IL-12) และอินเตอร์ลิวคีน-6 (interleukin-6; IL-6) เป็นต้น โดยสารอักเสบที่พบได้อย่างเด่นชัดในระยะแรกคือทีเอ็นเอฟแอลฟา

ทีเอ็นเอฟแอลฟาเป็นสารอักเสบตัวหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในการตอบสนองต่อการอักเสบและเป็นตัวบ่งชี้ในการอักเสบระยะแรก (Cooper และคณะ, 2010; Kjeldsen และคณะ, 1993) มีรายงานว่าสามารถพบทีเอ็นเอฟแอลฟาปริมาณสูงในเนื้อเยื่อในโพรงฟันที่อักเสบ (Coil, Tam และ Waterfield, 2004; Stashenko, Teles และ D'Souza, 1998) โดยพบหลั่งออกมาโดยเซลล์แมคโครฟาจ (Carswell และคณะ, 1975) เป็นหลัก แต่ยังมีเซลล์อื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการหลั่งของทีเอ็นเอฟแอลฟา เช่น เซลล์ลิมโฟไซท์ชนิดซีดี+4 ($CD^{+}4$ lymphocyte) เนเชอรัลคิวเลอร์เซลล์ (Natural Killer cell; NK cell) มาสเซลล์ (mast cell) เซลล์หลอดเลือด (endothelial cell) การหลั่งทีเอ็นเอฟแอลฟานั้นมักจะเกิดขึ้นจากการตอบสนองต่อตัวกระตุ้นจำพวกไลโปโพลีแซกคาไรด์ (lipopolysaccharide) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ในแบคทีเรีย (Walsh และคณะ, 1991)

กลไกการทำงานของทีเอ็นเอฟแอลฟาจะส่งผ่านเข้าสู่เซลล์ทางตัวรับบนผิวเซลล์ 2 ชนิด คือ ตัวรับทีเอ็นเอฟชนิดที่ 1 (TNF-Receptor type1; TNF-R1; CD120a; P55/60) และตัวรับทีเอ็นเอฟชนิดที่ 2 (TNF-Receptor type2; TNF-R2; CD120b; P75/80) ซึ่งในเนื้อเยื่อส่วนใหญ่จะพบ

ตัวรับทีเอ็นเอฟชนิดที่ 1 มากกว่า อย่างไรก็ดี ในส่วนของเซลล์เนื้อเยื่อใน ยังไม่มีรายงานชัดเจนที่แสดงถึงชนิด และปริมาณของตัวรับทีเอ็นเอฟแต่ละชนิด เมื่อได้รับการกระตุ้น ตัวรับทีเอ็นเอฟจะสามารถส่งวิถีสัญญาณ (signaling pathway) ได้ทั้งหมด 3 วิถีสัญญาณ (Chen และ Goeddel, 2002; Olszewski และคณะ, 2007; Wajant, Pfizenmaier และ Scheurich, 2003) ดังนี้

1. วิถีสัญญาณผ่านนิวเคลียร์แฟคเตอร์แคปปาบี (nuclear factor-kappa B; NFkB) ซึ่งจะมีบทบาทเกี่ยวข้องกับกระบวนการเพิ่มจำนวนของเซลล์ รวมถึงกระบวนการตอบสนองต่อการอักเสบและปัจจัยที่ยับยั้งการตายของเซลล์ (Nanes, 2003)

2. วิถีสัญญาณผ่านเอ็นไซม์ไมโตเจนแอคติเวตเตดโปรตีนไคเนส (mitogen-activated protein kinase; MAPK or P38) ซึ่งจะมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการแปรสภาพของเซลล์ การเพิ่มจำนวนเซลล์ และการตายของเซลล์

3. วิถีสัญญาณเหนี่ยวนำให้เซลล์ตาย (death signaling) (Gaur และ Aggarwal, 2003)

บทบาทของทีเอ็นเอฟแอลฟานั้น มีรายงานเกี่ยวข้องกับการอักเสบและการทำลายเนื้อเยื่อในร่างกายเป็นจำนวนมาก ได้แก่ โรครูมาตอยส์ (rheumatoid arthritis) (Romas, Gillespie และ Martin, 2002) โรคลำไส้อักเสบ (Brynskov และคณะ, 2002) โรคปริทันต์ (Garlet, 2010) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการศึกษาบทบาทของทีเอ็นเอฟแอลฟาในเซลล์ต้นกำเนิดในแง่ของการทำลายกระดูก เช่น ในการศึกษาผลของทีเอ็นเอฟแอลฟาต่อเซลล์แมคโครฟาจ (macrophage) ที่นำมาจากไขกระดูกส่วนกระดูกขาของหนู พบว่าทีเอ็นเอฟแอลฟาร่วมกับตัวรับแอคติเวเตอร์นิวเคลียร์แฟคเตอร์แคปปาบีไลแกน (receptor for activator of nuclear factor kappa B ligand; RANKL) จะสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการแปรสภาพของเซลล์ตั้งต้นของเซลล์ทำลายกระดูกให้เป็นเซลล์ทำลายกระดูก (osteoclast) แต่อย่างไรก็ตาม การกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจด้วยทีเอ็นเอฟแอลฟาอย่างเดียว ไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดเซลล์ทำลายกระดูกได้ (Komine และคณะ, 2001; Lam และคณะ, 2000) มีการศึกษาที่รวบรวมผลในห้องปฏิบัติการและการทดลองในสัตว์ทดลองของทีเอ็นเอฟแอลฟาต่อกระบวนการทำลายกระดูกว่ามีความเกี่ยวข้องกับวิถีสัญญาณที่สำคัญคือ นิวเคลียร์แฟกเตอร์แคปปาบี และวิถีสัญญาณที่เกี่ยวกับการตายของเซลล์ โดยมีผลยับยั้งการเคลื่อนเข้ามาทำหน้าที่ (recruitment) ของเซลล์สร้างกระดูก รวมทั้งยับยั้งการแปรสภาพของเซลล์ต้นกำเนิด (Gilbert และคณะ, 2000; Gilbert และคณะ, 2002; Nanes, 2003)

นอกจากบทบาทในเชิงการทำลายแล้ว ยังเป็นที่น่าสนใจว่า มีรายงานที่แสดงถึงบทบาทในแง่ของการซ่อมแซม เช่น การซ่อมแซมกระดูกที่หัก (fracture bone) (Glass และคณะ, 2011) การกระตุ้นการสร้างเซลล์ตับ (Argast และคณะ, 2004) และการหายของแผลที่ผิวหนังในหนูทดลอง (Boleman และคณะ, 2012) ซึ่งสอดคล้องกับแนวคิดที่ว่ากระบวนการอักเสบสามารถกระตุ้นกระบวนการซ่อมแซมของเนื้อเยื่อได้ (Eming และคณะ, 2007) ดังนั้นการศึกษานี้จึงต้องการศึกษาผลของทีเอ็นเอฟแอลฟาในเนื้อเยื่อในโพรงฟันว่าจะมีการตอบสนองในทางการทำลายหรือการซ่อมแซม

ในเนื้อเยื่อในโพรงฟันนั้น มีรายงานการศึกษาถึงผลของสารอักเสบต่างๆ ได้แก่ ทีเอ็นเอฟแอลฟา ไอแอล-1เบตา และทีเอ็นเอฟแอลฟาร่วมกับไอแอล-1เบตา ที่มีต่อคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดที่พบในเนื้อเยื่อในโพรงฟันของฟันหนู โดยศึกษาถึงผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ การทำงานของเอ็นไซม์อาลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase activity; ALP activity) และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างเนื้อเยื่อแข็ง (mineralized marker) เช่น ออสตีโอแคลซิน (osteocalcin; *OC*) โบนไซอะโลโปรตีน (bone sialoprotein; *BSP*) เดนทีนไซอะโลฟอสโฟโปรตีนหรือดีเอสพีพี (dentinsialophosphoprotein; *DSPP*) และเดนทีนเมทริกซ์โปรตีน1 หรือดีเอ็มพี1 (dentin matrix protein1; *DMP1*) เป็นต้น ในวันที่ 3 7 และ 12 โดยใช้ความเข้มข้นของทีเอ็นเอฟแอลฟา 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการศึกษาดังกล่าวพบว่าการกระตุ้นในระยะสั้นหรือ 3 วัน กลุ่มที่มีทีเอ็นเอฟแอลฟาร่วมกับไอแอล-1เบตามีการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเนื้อเยื่อในโพรงฟันได้เร็วกว่ากลุ่มทดลองที่ไม่ได้ใส่สารอักเสบใดๆ ส่วนทีเอ็นเอฟแอลฟา หรือไอแอล-1 เบตา เพียงอย่างใดอย่างหนึ่ง จะสามารถเพิ่มการทำงานของเอ็นไซม์อาลคาไลน์ฟอสฟาเตสและการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างแร่ธาตุมากกว่ากลุ่มทดลอง และเมื่อนำเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในโพรงฟันมาเพาะเลี้ยงร่วมกับโครงร่างเซรามิค (ceramic scaffold) และได้รับการกระตุ้นด้วยสารอักเสบทั้ง 2 ชนิดที่กล่าวข้างต้น นำไปปลูกถ่ายในกระดูกส่วนหลังของหนูทดลอง ผลการทดลองที่เวลา 8 สัปดาห์ จะพบการเกิดเนื้อเยื่อแข็งในส่วนที่ปลูกถ่ายอย่างชัดเจนมากกว่ากลุ่มทดลอง ซึ่งในการศึกษานี้พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในโพรงฟันที่ได้ปลูกถ่ายเข้าไปมีบทบาทในการสร้างเนื้อเยื่อแข็งดังกล่าว (Yang และคณะ, 2012)

ส่วนในเนื้อเยื่อในโพรงฟันของมนุษย์ พบว่าเนื้อเยื่อในโพรงฟันในฟันแท้ของมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นด้วยทีเอ็นเอฟแอลฟาที่ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถชักนำเข้าสู่กระบวนการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อฟันซึ่งเป็นกระบวนการสำคัญในการสร้างเนื้อฟันใหม่ได้

ดีขึ้น โดยภายในระยะเวลา 6 และ 24 ชั่วโมงหลังการกระตุ้น จะพบการแสดงออกของโปรตีนที่บ่งชี้การสร้างแร่ธาตุ เช่น เดนทีนฟอสโฟโปรตีน (dentin phosphoprotein; DPP) และเดนทีนไซอะโลโปรตีน (dentinsialoprotein; DSP) มากกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ใส่ทีเอ็นเอฟแอลฟา และหลังการกระตุ้น 28 วัน จะพบการเกิดผลึกแร่ธาตุ (mineralize nodule) ในกลุ่มที่มีทีเอ็นเอฟแอลฟามากกว่ากลุ่มควบคุมอีกด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าวิถีสัญญาณที่เกิดขึ้นในการศึกษานี้ น่าจะเกิดผ่านเอ็นไซม์ไมโตเจนแอคติเวตเตดโปรตีนไคเนส โดยที่การยับยั้งการเกิดวิถีสัญญาณดังกล่าวทำให้การสร้างผลึกแร่ธาตุลดลง (Paula-Silva และคณะ, 2009)

แต่อย่างไรก็ตาม ได้มีรายงานว่าผลของทีเอ็นเอฟแอลฟาในระยะยาวจะเกิดการยับยั้งการแปรสภาพของเซลล์จากเนื้อเยื่อในโพรงฟันมนุษย์ โดยการกระตุ้นเซลล์ด้วยทีเอ็นเอฟแอลฟาเป็นเวลา 7 และ 14 วันนั้น จะมีผลลดการทำงานของเอ็นไซม์อาลคาไลน์ฟอสฟาเตสและลดการแสดงออกของโปรตีนออสตีโอเนคติน (osteonectin; ON) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อฟัน และไม่พบการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีนออสตีโอแคลซินและโปรตีนโบนไซอะโลโปรตีน เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งเป็นผลในทางยับยั้งกระบวนการสร้างแร่ธาตุ (Min และคณะ, 2006)

จากผลการศึกษาต่างๆ ที่กล่าวถึงข้างต้น จะพบว่ายังไม่มีความชัดเจนในผลการทำงานของทีเอ็นเอฟแอลฟา โดยผลการศึกษาสามารถสรุปได้เป็น 2 ทางใหญ่ๆ คือผลในทางเสริมสร้างหรือซ่อมแซมเนื้อเยื่อและผลในทางทำลายเนื้อเยื่อ ซึ่งน่าจะขึ้นกับชนิดของเซลล์ ความเข้มข้นของทีเอ็นเอฟแอลฟารวมทั้งระยะเวลาที่กระตุ้น นอกจากนี้ ชนิดของตัวรับ ซึ่งมีอย่างน้อย 2 ชนิดที่กล่าวมาของทีเอ็นเอฟแอลฟาและวิถีสัญญาณที่จำเพาะของตัวรับ น่าจะมีบทบาทสำคัญที่ทำให้หน้าที่ของทีเอ็นเอฟแตกต่างกันไปในเซลล์แต่ละชนิด เช่น ตัวรับชนิดที่หนึ่งจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการทำลายหรือการตายของเซลล์ (Markel และคณะ, 2007; Schutze, Tchikov และ Schneider-Brachert, 2008) ส่วนตัวรับชนิดที่สองที่พบได้น้อยกว่าอาจมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการเพิ่มจำนวนเซลล์ (cell proliferation) และการแสดงออกของโปรตีนที่ยับยั้งกลไกการตายของเซลล์ (anti-apoptosis) (Ait-Ali และคณะ, 2008; Marchetti และคณะ, 2004; Wallach และคณะ, 1999)

เบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์หรือบีเอฟจีเอฟ (basic fibroblast growth factor; bFGF)

เบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์หรือบีเอฟจีเอฟมีอีกชื่อหนึ่งคือเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์-2 จัดเป็นโปรตีนที่มีหน้าที่หลากหลาย (multi-functional growth factor) เกี่ยวข้องกับทั้งการคงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด (stemness) การเพิ่มจำนวนเซลล์ การแปรสภาพเป็นเซลล์บางชนิด เช่น เซลล์มีโซเดิร์ม (mesodermal cell) และเซลล์นิวโรเอกโตเดิร์ม (neuro-ectodermal cell) (Hasegawa และคณะ, 2010) และการป้องกันการตายหรือการคงความมีชีวิตของเซลล์ ในเซลล์ชนิดต่างๆ เช่น เซลล์ประสาท เซลล์ตัวอ่อน เป็นต้น (Eiselleova และคณะ, 2009; Meijs และคณะ, 2004; Miettinen และคณะ, 2011)

กลไกการทำงานของบีเอฟจีเอฟจะเกิดผ่านวิถีการส่งสัญญาณเข้าสู่นิวเคลียสผ่านตัวรับผิวเซลล์ ซึ่งมีอย่างน้อย 4 ชนิดได้แก่ เอฟจีเอฟอาร์1 (FGFR1) เอฟจีเอฟอาร์2 (FGFR2) เอฟจีเอฟอาร์3 (FGFR3) และเอฟจีเอฟอาร์4 (FGFR4) ซึ่งจะมีผลต่อการเจริญเติบโต การแปรสภาพของเซลล์ และการตอบสนองของเซลล์ (Dvorak และ Hampl, 2005) โดยความสามารถของบีเอฟจีเอฟในการคงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดนั้น พบรายงานในเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในส่วนปุ่มปลายรากฟัน (apical papilla) (Wu และคณะ, 2012) ในเซลล์ต้นกำเนิดของเม็ดเลือดของเซลล์ประสาท และเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อน (embryonic stem cell) โดยบีเอฟจีเอฟจะมีอิทธิพลทำให้เซลล์เหล่านี้คงความสามารถในการแบ่งตัว และสร้างตัวเองขึ้นมาใหม่ได้อย่างไม่มีขีดจำกัด (Xu และคณะ, 2005) สำหรับกลไกในการคงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดนั้น ได้มีรายงานถึงวิถีสัญญาณหลักของบีเอฟจีเอฟในการคงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดในเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อนมนุษย์ ซึ่งพบว่าเมื่อบีเอฟจีเอฟจับกับตัวรับเอฟจีเอฟอาร์2 ทำให้เกิดการกระตุ้นวิถีสัญญาณผ่านเอ็นไซม์ไมโตเจนแอคติเวดเตดโปรตีนไคเนส เพื่อคงคุณสมบัติความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดขึ้นได้ อย่างไรก็ตามยังมีวิถีสัญญาณอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติการป้องกันการตายของเซลล์ และส่งเสริมการแบ่งตัวของเซลล์อีกด้วย (Eiselleova และคณะ, 2009)

สำหรับบทบาทในการหายของแผลนั้น มีการศึกษาผลของบีเอฟจีเอฟในหนูทดลอง พบว่าการใส่บีเอฟจีเอฟไปที่รอยแผลในหนู จะช่วยให้แผลหายเร็วกว่ากลุ่มควบคุมซึ่งใส่ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ (phosphate-buffered saline) (Nishino และคณะ, 2011) ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการที่บีเอฟจีเอฟช่วยกระตุ้นการสร้างเส้นเลือดใหม่ โดยมีรายงานที่พบว่าบีเอฟจีเอฟมีความสำคัญในการเหนี่ยวนำการสร้างเส้นเลือดใหม่ (angiogenesis) (Ferrara และ Davis-

Smyth, 1997) โดยจะผ่านตัวรับของวาสคูลา เอ็นโดทีเลียม โกรทแฟกเตอร์1 หรือวีอีจีเอฟอาร์1 (vascular endothelial growth factor receptor1; VEGFR1) (Kanda, Miyata และ Kanetake, 2004) โดยมีรายงานในเนื้อเยื่อในโพรงฟันว่า บีเอฟจีเอฟเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของตัวรับจำเพาะของเซลล์หลอดเลือด เช่น อีจีเอฟอาร์2 (VEGFR2) เป็นต้น (Hasegawa และคณะ, 2010)

จากการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้น จะเห็นว่าการทำหน้าที่ที่หลากหลายของบีเอฟจีเอฟอาจจะขึ้นกับชนิดของเซลล์ที่ศึกษาที่แตกต่างกันออกไป ทั้งนี้ ในแง่ของบทบาทของบีเอฟจีเอฟในเซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อโพรงฟันนั้น แม้จะมีรายงานไม่มากนัก แต่ผลการศึกษาก็แสดงว่ามีความสัมพันธ์กับการคงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด และยับยั้งการแปรสภาพของเซลล์ (Osathanon และคณะ, 2011)

เซกซ์ ดีเทอมีนนิง รีเจียนวาย บอกซ์2 หรือซอกซ์2 (SRY (sex determining region Y)-box2; SOX2)

ซอกซ์2 เป็นทรานสคริปชันโปรตีน (transcription protein) ที่มีความสำคัญในการคงสภาพของเซลล์ต้นกำเนิดและการควบคุมการแปรสภาพของเซลล์ พบการแสดงออกของซอกซ์2 ในเซลล์ต้นกำเนิดชนิดพลูริโพเทนต์ (pluripotent stem cells) (Basu-Roy และคณะ, 2010) การแสดงออกของซอกซ์2 จะพบร่วมกับยีนอีกสามตัว คือ ออกเทเมอร์4 หรือออกท์4 (POU transcription factor Octamer4; *OCT4*) เค1เอฟ4 (*K1F4*) และซีมิก (*MYC*) ซอกซ์2 จะสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ที่โตเต็มวัยเปลี่ยนกลับเป็นเซลล์ต้นกำเนิดได้ และเรียกเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำในลักษณะนี้ว่าเซลล์ต้นกำเนิดชนิดอินดิวซ์ พลูริโพเทนต์ (induced-Pluripotent stem cell) (Takahashi และ Yamanaka, 2006) โดยเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเซลล์ต้นกำเนิดในลักษณะนี้จะมีคุณสมบัติคล้ายกับเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อนซึ่งมีความสามารถในการแปรสภาพไปเป็นเซลล์ได้หลายชนิด แต่แตกต่างกันที่จำนวนของยีนและลักษณะของเซลล์ (phenotype) ที่ถูกเหนี่ยวนำจะอยู่ระหว่างเซลล์โซมาติกและเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อนจริงๆ (Zhao และ Daley, 2008)

กลไกสำคัญของซอกซ์2 ในการเหนี่ยวนำให้เป็นเซลล์ต้นกำเนิด คือการควบคุมการแสดงออกของยีนที่แสดงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดตัวอื่นๆ โดยซอกซ์2 จะทำงานร่วมกับออกท์3/4 (*OCT3/4*) และกระตุ้นให้ตัวส่งเสริมออกท์-ซอกซ์ (*OCT-SOX* enhancer) ทำงาน ซึ่งกระบวนการนี้จะเป็นการควบคุมการแสดงออกของยีนที่จำเพาะของเซลล์ต้นกำเนิดหลายชนิด เช่น นานอก

(*NANOG*) ออกท์3/4 และ ซอกซ์2 เอง ถือเป็นการคงสภาพของเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อนให้ยังคงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดอยู่ (Masui และคณะ, 2007)

ในเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ของมนุษย์ (human mesenchymal stem cell) มีรายงานว่าซอกซ์2 มีบทบาทในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์และการควบคุมการแปรสภาพของเซลล์ เนื่องจากการลดลงของซอกซ์2 จะทำให้การเพิ่มจำนวนเซลล์ลดลงและเหนี่ยวนำให้มีการแปรสภาพของเซลล์เกิดขึ้น (Park และคณะ, 2012) ส่วนในเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในโพรงฟันนั้น ได้มีรายงานถึงบทบาทของซอกซ์2 ในการคงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดเช่นเดียวกัน และพบว่าเมื่อการแสดงออกของซอกซ์2 ลดลง จะมีผลให้เกิดการเหนี่ยวนำการแปรสภาพของเซลล์ขึ้นได้ นอกจากนี้มีรายงานว่า การแสดงออกของยีนตัวนี้จะขัดขวางกระบวนการแปรสภาพของเซลล์ไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งโดยจะไปยับยั้งวิถีสัญญาณที่ควบคุมการแปรสภาพของเซลล์ที่สร้างกระดูก (Seo และคณะ, 2011)และยังมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการอยู่รอดของเซลล์ (cell survival) เช่น ในเซลล์มะเร็ง (Bass และคณะ, 2009; Huang และคณะ, 2011) และ มูลเลอร์เซลล์ (Muller stem cell) (Bhatia และคณะ, 2011)

จากที่กล่าวมาข้างต้น การแสดงออกของยีนซอกซ์2 จึงสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงคุณสมบัติความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์ที่ได้มาจากเนื้อเยื่อในโพรงฟันแท้ (DPSCs) และเนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนม (SHEDs) ซึ่งมีรายงานที่แสดงถึงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์จากเนื้อเยื่อในโพรงฟันนี้เป็นจำนวนมาก (Gronthos และคณะ, 2002; Gronthos และคณะ, 2000; Yang และคณะ, 2009; Yang และคณะ, 2009) นอกจากนี้ จากการที่ซอกซ์2 สามารถยับยั้งวิถีสัญญาณในการเปลี่ยนเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งได้นั้น การศึกษาผลการแสดงออกของซอกซ์2 จึงน่าจะสามารถใช้บ่งชี้ผลในการควบคุมการแปรสภาพของเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งของเนื้อเยื่อในโพรงฟันทั้ง 2 ชนิดนี้ได้อีกด้วย (Seo และคณะ, 2011)

เดนทีนไซอะโลฟอสโฟโปรตีนหรือดีเอสพีพี (dentinsialophosphoprotein; *DSPP*)

เดนทีนไซอะโลฟอสโฟโปรตีนหรือดีเอสพีพีเป็นยีนที่ให้กำเนิดโปรตีนสองชนิด คือ เดนทีนไซอะโลโปรตีน (dentin sialoprotein; DSP) และเดนทีน ฟอสโฟโปรตีน (dentinphosphoprotein; DPP) ซึ่งเป็นโปรตีนในกลุ่มที่ไม่ใช่คอลลาเจน (noncollagenous protein) โปรตีนทั้ง 2 ชนิดสร้างขึ้นโดยเซลล์สร้างเนื้อฟัน (Feng และคณะ, 1998; MacDougall และคณะ, 1997; Ritchie และคณะ, 1994) จึงมีความสำคัญในการสะสมแร่ธาตุในตัวฟัน มีรายงานที่แสดงถึงการแสดงออกของ

ยีนดีเอสพีพีอย่างเด่นชัดในเซลล์สร้างเนื้อฟัน (odontoblast) (D'Souza และคณะ, 1997; Qin และคณะ, 2003; Qin และคณะ, 2002) และผลการศึกษาในเนื้อเยื่อในโพรงฟันของหนู พบว่า ดีเอสพีพีนอกจากจะพบในระยะแรกของการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อฟันแล้ว ยังคงพบการแสดงอย่างเด่นชัดในระยะหลังจากมีการสร้างแร่ธาตุอีกด้วย (D'Souza และคณะ, 1997) อีกทั้งยังมีการศึกษาในเซลล์เนื้อเยื่อฟันกรามล่างของหนูซึ่งมีการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อฟัน พบว่ามีการแสดงออกของดีเอสพีพีในปริมาณสูง (Chen และคณะ, 2005)

ในเซลล์ต้นกำเนิดเนื้อเยื่อในโพรงฟันของมนุษย์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีการแปรสภาพไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อฟันนั้น จะพบควบคู่กับการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีนที่ผิวเซลล์ (Qin, Baba และ Butler, 2004) โดยพบการแสดงออกของยีนดีเอสพีพีอย่างเด่นชัดและจะไม่พบในเซลล์ต้นกำเนิด นอกจากพบการแสดงออกในเซลล์สร้างเนื้อฟันแล้ว ปัจจุบันยังพบการแสดงออกของดีเอสพีพีในเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งเช่นกัน เนื่องจากยีนตัวนี้มีบทบาทสำคัญในการเหนี่ยวนำการสะสมแร่ธาตุ (mineralization) (Prasad และคณะ, 2010; Staines และคณะ, 2012) จึงสามารถใช้เป็นดรรชนีบ่งชี้การแปรสภาพของเซลล์ต้นกำเนิดเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งได้

บทที่ 3
ระเบียบวิธีการวิจัย

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างและจำนวนตัวอย่าง

เซลล์ที่นำมาใช้ในการทดลองได้จากเนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมและฟันแท้ ฟันน้ำนมได้รับมาจากผู้ที่มีสุขภาพแข็งแรง ไม่มีโรคประจำตัว จำนวน 3 คน อายุเฉลี่ย 7 ถึง 12 ปี และไม่จำกัดเพศ โดยเก็บฟันตัวอย่างจำนวน 3 ซี่ จากตัวอย่างที่ไม่ใช่บุคคลเดียวกัน เป็นฟันน้ำนมซี่ใดก็ได้ที่มีข้อบ่งชี้ในการถอน เนื่องจากได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นฟันหลุดช้า ตามแผนการรักษาทางทันตกรรมที่ภาควิชาทันตกรรมสำหรับเด็ก คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ฟันแท้ ได้รับมาจากผู้ที่มีสุขภาพแข็งแรง ไม่มีโรคประจำตัว จำนวน 3 คน อายุเฉลี่ย 18 ถึง 24 ปี และไม่จำกัดเพศ โดยเก็บฟันตัวอย่างจำนวน 3 ซี่ จากตัวอย่างที่ไม่ใช่บุคคลเดียวกัน เป็นฟันกรามแท้ซี่ที่สามที่มีข้อบ่งชี้ในการถอน เนื่องจากได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นฟันคุดที่ไม่มีรอยผุและรอยโรคปลายรากฟัน ตามแผนการรักษาทางทันตกรรมที่ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดยทั้งฟันน้ำนมและฟันแท้ที่นำมาใช้ได้รับความยินยอมจากผู้ป่วย และมีการลงนามในเอกสารยินยอมด้วยความเต็มใจ (informed consent) วิธีการเตรียมเซลล์เพื่อเลี้ยงในห้องปฏิบัติการได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการทำงานวิจัยในมนุษย์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>กลุ่มศึกษาและกลุ่มควบคุม</u>

เซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้จะถูกแบ่งออกเป็นสองส่วน ส่วนแรกจะถูกเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วยทีเอ็นเอฟแอลฟาเป็นกลุ่มควบคุม และส่วนที่สองจะได้รับการกระตุ้นด้วยทีเอ็นเอฟแอลฟาเป็นกลุ่มศึกษา และแต่ละการทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง

เนื่องจากสารทีเอ็นแอฟแอลฟาสามารถละลายในน้ำ ดังนั้นในกลุ่มควบคุมจะได้รับน้ำซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายทีเอ็นเอฟแอลฟา ในปริมาณเดียวกับที่กลุ่มศึกษาได้รับ และความเข้มข้นของทีเอ็นเอฟแอลฟาที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ได้แก่ 0.1 1 และ10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

สถานที่ทำการวิจัย

หน่วยปฏิบัติการวิจัยเนื้อเยื่ออนินทรีย์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

<u>วัสดุ</u>

1. อาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็ม (Dulbecco's Modified Eagle Medium; DMEM, Gibco, USA) ชนิดที่มีฟีนอลเรด (phenol red) และไม่มีฟีนอลเรด
2. ซีรัมจากฟีตัสวัว (fetal bovine serum; FBS, Gibco, USA)
3. แอลกลูตามีน (L-glutamine, Invitrogen, USA)
4. เพนนิซิลินจีโซเดียม (penicillin G sodium, Invitrogen, USA)
5. สเตรปโตมัยซินซัลเฟต (streptomycin sulfate, Invitrogen, USA)
6. แอมโฟเทอริซินบี (amphotericin B, Invitrogen, USA)
7. แลคตัลบูมิน (lactalbumin, Invitrogen, USA)
8. เอนไซม์ทริพซินอีดีทีเอร้อยละ 0.25 (0.25% trypsin-EDTA, Gibco, USA)
9. ทิวเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์แอลฟาหรือทีเอ็นเอฟแอลฟา (tumor necrosis factor alpha; TNF-α, Sigma chemical Co., St. Louis, MO)
10. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลายน์ที่ปราศจากเชื้อ (sterile phosphate buffer Saline; PBS)
11. น้ำกลั่น
12. เอ็มทีที (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; MTT, Sigma, USA)
13. ไดเมทิวซัลฟอกไซด์หรือดีเอ็มเอสโอ (dimethylsulfoxide; DMSO)

14. สารละลายไกลซีนบัฟเฟอร์ (glycine buffer)

15. ทริสไฮโดรคลอไรด์ (Tris-Hydrochloride; Tris-HCl)

16. แมกนีเซียมคลอไรด์ (magnesiumchloride; MgCl2)

17. สารละลายไตรซอล (TRIzol, Gibco, USA)

18. คลอโรฟอร์ม (chloroform)

19. ไอโซโพรพานอล (isopropanol)

20. อะกาโรส (agarose)

21. ไพร์มเมอร์สำหรับยีนกลีเซอรัลดีฮายด์ ไตรฟอสเฟส ดีไฮโดรจีเนสหรือจีเอพีดีเฮช (primer for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *GAPDH*)

22. ไพร์มเมอร์สำหรับยีนเดนทีน ไซอะโลฟอสโฟโปรตีนหรือดีเอสพีพี (primer for dentinsialophosphoprotein; *DSPP*)

23. ไพร์มเมอร์สำหรับยีนเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ (primer for *bFGF*)

24. ไพร์มเมอร์สำหรับยีนเซกซ์ ดีเทอมีนนิง รีเจียนวาย บอกซ์2 หรือซอกซ์2 (primer for sex determining region Y-box2 ;*SOX2*)

25. น้ำปราศจากเอนไซม์นิวคลิเอส (nuclease free water) เอนไซม์ที่ย่อยกรดนิวคลิอิก

26. ชุดสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอ

27. เอนไซม์แทคโพลีเมอเรส (taq polymerase) –เอนไซม์สำหรับขยายสัญญาณใน PCR

28. ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไทรฟอสเฟต (deoxyribonucleotidetriphosphate; dNTP)

29. แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (absolute ethanol)

30. เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 (70% ethanol)

31. หลอดพลาสติกสำหรับเก็บฟันมีฝาเกลียวขนาด 5 มิลลิลิตร

32. หลอดเหวี่ยงขนาด 0.5 และ 1.5 มิลลิลิตร (microcentrifuge tube)

33. หลอดพีซีอาร์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร (PCR tube)

34. ทิปใช้ครั้งเดียวทิ้งสำหรับปิเปตขนาด 10 200 1000 ไมโครลิตร (disposable pipette tip)

35. ถุงมือยางใช้ครั้งเดียวทิ้ง (disposable latex glove)

36. จานเลี้ยงขนาด 35 และ 60 มิลลิเมตร (35, 60-mm culture dish)

37. จานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม (24-well plate)

<u>อุปกรณ์</u>

1. ตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ (CO_2 incubator)

2. ตู้ปฏิบัติการปลอดเชื้อ (laminar-flow Hood)

3. เครื่องอ่านค่าบนไมโครเพลต (microplate reader; ELxx800; BOI-TEK®)

4. เครื่องวิเคราะห์สารโปรตีนและพันธุกรรม นาโนดรอป (NanoDrop™)

5. เครื่องสั่นไฟฟ้า (vortex; Genie2; Scientific Industries, USA)

6. เครื่องเหวี่ยง (centrifuge; Sigma, 101; Western Germany)

7. เครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง (high speed centrifuge; Sorvall, Super T 21; Dupont Company, USA)

8. เครื่องเหวี่ยงขนาดเล็ก (microcentrifuge; Hero lab, Microcen 13; Hero lab GmbH, Germany)

9. เครื่องหมุนความเร็วต่ำ (low speed rotor)

10. เครื่องเขย่า (shake ‘n’ stack hybridization oven; Hybaid, HBOVCST220; Hybaid Limited, UK)

11. เครื่องนับจำนวนเซลล์ (haemocytometer)

12. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

13. เครื่องนำความร้อนชนิดหลุม (heating block)

14. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ (polymerase chain reaction, PCR; PCR system Tpersonal, Biometra)

15. เครื่องแยกอาร์เอ็นเอด้วยไฟฟ้าชนิดแนวนอน (horizontal electrophoresis apparatus)

16. เครื่องชั่งไฟฟ้า (analytical balance)

17. กรรไกรชนิดสแตนเลสตัดเนื้อเยื่อ

18. ปากคีบสแตนเลสชนิดปลายแหลม

19. กล้องจุลทรรศน์ (phase contrast light microscope)

20. กล้องถ่ายภาพฟูจิฟิล์ม (Fujifilm)

ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

การเก็บฟันตัวอย่างก่อนการเพาะเลี้ยงเซลล์

ฟันที่ถอนจะถูกใส่ลงในหลอดพลาสติกที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ และมีฝาเกลียวปิดสนิท จากนั้นจึงนำมาที่ห้องปฏิบัติการ หรือเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำมาเพาะเลี้ยงเซลล์ภายใน 24 ชั่วโมง

การเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell culture)

ทำความสะอาดฟันที่ถอนด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลายน์ที่ปราศจากเชื้อหลายๆครั้ง เพื่อกำจัดเลือดและสิ่งสกปรกออกจากตัวฟัน จากนั้นแบ่งฟันออกเป็นสองส่วนและดึงเนื้อเยื่อในออกจากโพรงฟันนำมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 1x1 มิลลิเมตร นำไปย่อยด้วยเอนไซม์คอลลาจิเนสชนิดที่ 1 ที่ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยวางบนเครื่องหมุนความเร็วต่ำ จากนั้นนำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 2000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และนำส่วนตกตะกอนไปเพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงขนาด 35 มิลลิเมตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม คือดีเอ็มอีเอ็ม (Dulbecco's Modified Eagle Medium; DMEM, Gibco, USA) ชนิดที่มีฟีนอลเรด (phenol red) ประกอบด้วยซีรัมจากฟีตัสวัว ร้อยละ 10 ยาปฏิชีวนะและยาต้านจุลชีพร้อยละ 1 ประกอบด้วยของ เพนนิซิลินจีโซเดียม (penicillin G sodium 100 units/mL, Invitrogen, USA) แอมโฟเทอริซินบี (amphotericin B 5 μg/mL, Invitrogen, USA) สเตรปโตมัยซินซัลเฟต (streptomycin sulfate 100 μg/mL, Invitrogen, USA) และแอลกลูตามีน ร้อยละ 1 (L-glutamine 200 mM, Invitrogen, USA)

เซลล์จะถูกเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนวันเว้นวัน จนกระทั่งเซลล์คลานออกจากชิ้นเนื้อ และเมื่อเซลล์เจริญเติบโตเต็มจานเลี้ยง จะถูกถ่ายลงจานใหม่ โดยการย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน-อีดีทีเอ ร้อยละ 0.25 (0.25% trypsin-EDTA, Gibco, USA) ซึ่งจะย่อยเซลล์ให้หลุดออกจากพื้นผิวของจานเลี้ยง นับจำนวนเซลล์ด้วยแผ่นสไลด์นับเซลล์ (hemacytometer) จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปเพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงชุดใหม่ขนาด 35 มิลลิลิตร ที่ความหนาแน่นประมาณ $5x10^4$ เซลล์/ตารางเซนติเมตร เมื่อเซลล์มีจำนวนมากขึ้นและมีการเรียงตัวหนาแน่นในจานเพาะเลี้ยง จึงทำการหว่านเซลล์ใหม่ทุก 5-7 วัน เซลล์ที่ใช้สำหรับการทดลองเป็นเซลล์รุ่นที่ 3-5

การวัดปริมาณเซลล์ด้วยเทคนิคเอ็มทีที (MTT assay)

เซลล์จากเนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมและฟันแท้ถูกหว่านลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบหลุมขนาด 24 หลุม จำนวน 2 จานเลี้ยง โดยแบ่งเป็นจานเลี้ยงที่เก็บผลภายใน 24 ชั่วโมง และจานเลี้ยงที่เก็บผลภายใน 48 ชั่วโมง หว่านเซลล์ด้วยปริมาณเซลล์หลุมละ $3x10^4$ เซลล์ และแบ่งเซลล์ออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 3 หลุม เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมไปเป็นเวลา 1 วัน หรือจนมีความหนาแน่น

ของเซลล์ร้อยละ 70 แล้วเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัม คือ อาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่ผสมแลคตัลบูมิน (lactalbumin, Invitrogen, USA) ร้อยละ 1 ยาปฏิชีวนะและยาต้านจุลชีพร้อยละ 1 ประกอบด้วย เพนนิซิลินจีโซเดียม (penicillin G sodium 100 units/mL, Invitrogen, USA) แอมโฟเทอริซินบี (amphotericin B 5 μg/mL, Invitrogen, USA) สเตรปโตมัยซินซัลเฟต (streptomycin sulfate 100 μg/mL, Invitrogen, USA) และแอลกลูตามีน ร้อยละ 1 (L-glutamine 200 mM, Invitrogen, USA) เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมงก่อนจะเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัมแต่มีสารละลายทีเอ็นเอฟแอลฟา (tumor necrosis factor alpha; TNF-α, Sigma chemical Co., St. Louis, MO) ที่มีความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ ความเข้มข้น 0.1 1 และ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างละ 3 หลุม โดยกลุ่มควบคุมจะใส่เพียงตัวทำละลายของทีเอ็นเอฟแอลฟา เมื่อครบตามกำหนดเวลา คือ 24 และ 48 ชั่วโมง อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนเป็นดีเอ็มอีเอ็มชนิดที่ไม่มีฟีนอลเรด และเติมสารละลายเอ็มทีทีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยงในตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลา อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกดูดทิ้งแล้วเติมไดเมทิวซัลฟอกไซด์หรือดีเอ็มเอสโอ (dimethylsulfoxide; DMSO) ปริมาณ 900 ไมโครลิตร และสารละลายไกลซีนบัฟเฟอร์ (glycine buffer) ปริมาณ 125 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมของจานเลี้ยงเซลล์เพื่อละลายผลึกฟอร์มาซาน (formazan) ที่เซลล์สร้างขึ้นจากสารละลายเอ็มทีที และนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านค่าบนไมโครเพลต (microplate reader) ที่ความยาวคลื่นแสง 570 นาโนเมตร จากนั้นแปลงค่าการดูดกลืนแสงเป็นจำนวนเซลล์ตามกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้น จากการวัดความสามารถในการเปลี่ยนเอ็มทีทีเป็นผลึกฟอร์มาซานของเซลล์ที่ทราบจำนวน และนำเสนอเป็นจำนวนเท่าของความแตกต่าง โดยกำหนดให้ค่าของกลุ่มควบคุมเท่ากับ 1

การวิเคราะห์ปริมาณอาร์เอ็นเอนำรหัส (mRNA) ของยีนเบสิกเอฟจีเอฟ ซอกซ์2 ดีเอสพีพี ด้วยวิธีรีเวอร์สทรานสคริปชัน-โพลีเมอรเรสเชนรีแอกชันหรืออาร์ที-พีซีอาร์ (reverse transcription polymerase chain reaction; RT-PCR)

การกระตุ้นเซลล์ด้วยทีเอ็นเอฟแอลฟา

เซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันแท้และฟันน้ำนมจะถูกหว่านลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบหลุมขนาด 12 หลุม ด้วยปริมาณเซลล์หลุมละ $1x10^5$ เซลล์ จำนวน 4 หลุม เป็นจำนวน 2 จานเลี้ยง โดย

แบ่งเป็นจานเลี้ยงที่เก็บผลภายใน 1 วัน และจานเลี้ยงที่เก็บผลภายใน 7 วัน จากนั้นเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมจนเซลล์มีความหนาแน่นเต็มจานเลี้ยงพอดี (confluence) เซลล์ในจานเลี้ยงจะถูกแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1-3 ได้รับทีเอ็นเอฟแอลฟาที่ความเข้มข้น 0.1 1 และ10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยกลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่สารละลายทีเอ็นเอฟแอลฟา จากนั้นเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อไปตามเวลาที่กำหนด คือ 1 และ 7 วัน

การวิเคราะห์ปริมาณอาร์เอ็นเอนำรหัสด้วยวิธีอาร์ที-พีซีอาร์

เมื่อครบตามกำหนดเวลาดังกล่าว เซลล์ถูกทำละลายด้วยสารละลายไตรซอล (TRIzol, Gibco, USA) เพื่อสกัดอาร์เอ็นเอจากเซลล์ตามวิธีการที่ทางบริษัทแนะนำ จากนั้นวัดปริมาณอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่องวิเคราะห์สารโปรตีนและพันธุกรรม (นาโนดรอป) ที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร เมื่อทราบปริมาณแล้ว แบ่งอาร์เอ็นเอจำนวน 1 ไมโครกรัมจากแต่ละกลุ่มทดลอง เพื่อนำไปผ่านกระบวนการรีเวอร์สทรานสคริปชัน (reverse transcripton) เพื่อสร้างคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอ (complementary DNA; cDNA) โดยใช้เอนไซม์รีเวอร์สทรานสคริปเตส (reverse transcriptase) จากนั้นจึงขยายสัญญาณของยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้เอนไซม์แทคโพลีเมอเรส (taq polymerase) ร่วมกับไพร์มเมอร์ (primer) ที่จำเพาะต่อเอ็มอาร์เอ็นเอของยีนเบสิกเอฟจีเอฟ ซอกซ์2 และ ดีเอสพีพี (โดยจะตรวจสอบดีเอสพีพี เฉพาะในการทดลอง 7 วันเท่านั้น) และใช้ยีนกลีเซอรัลดีฮายด์ ไตรฟอสเฟส ดีไฮโดรจีเนสหรือจีเอพีดีเฮซ (primer for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *GAPDH*) เป็นตัวควบคุมภายในของการทดลอง (internal control) สำหรับการตรวจสอบว่าปริมาณของอาร์เอ็นเอตั้งต้นที่ใช้มีปริมาณเท่ากัน ลำดับของเบสในไพร์มเมอร์ แสดงในตารางที่ 1 สัญญาณที่ได้จากพีซีอาร์ถูกวิเคราะห์โดยการแยกด้วยไฟฟ้าในอะกาโรสเจล (agarose gel) และบันทึกภาพด้วยกล้องดิจิตอลที่นำไปอ่านค่าความเข้มด้วยระบบเจล ดอกคิวเมนเทชัน (gel documentation apparatus) ซึ่งใช้โปรแกรมฟิวชันแคปท์ แอดวานซ์ เอสแอล4 (FusionCapt Advance SL4)

ตารางที่ 1 ลำดับเบสของไพร์มเมอร์ที่จำเพาะต่อเอ็มอาร์เอ็นเอของยีนที่ใช้ในการทดลอง

	Primer sequence	sequence ID	Size (base pairs)
GAPDH	Forward: 5' TGAAGGTCGGAGTCAACGGAT 3' Reverse: 5' TCACACCCATGACGAACATGG 3'	NM 002046.3	396
bFGF	Forward: 5' GGCTTCTTCCTGCGCATCCAC 3' Reverse: 5' GGTAACGGTTAGCACACACTCCTT 3'	NM_002006.4	136
SOX2	Forward: 5' ACC AGCTCGCAGACCTACAT 3' Reverse: 5' ATGTGTGAGAGGGGCAGTGT 3'	NM_003106.3	320
DSPP	Forward: 5' TCACAAGGGAGAAGGGAATG 3' Reverse: 3' TGCCATTTGCTGTGATGTTT 5'	NM_014208.3	182

การวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการทดลองจะแสดงข้อมูลแบบสถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistics) ดังนี้

- อัตราการแบ่งตัวของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจำนวนเท่าของจำนวนเซลล์จากกลุ่มศึกษาเทียบกับข้อมูลจากกลุ่มควบคุม $\pm$ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ในแต่ละความเข้มข้นที่เพาะเลี้ยง โดยให้กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เติมทีเอ็นเอฟแอลฟาในการตรวจสอบที่ 24 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 1

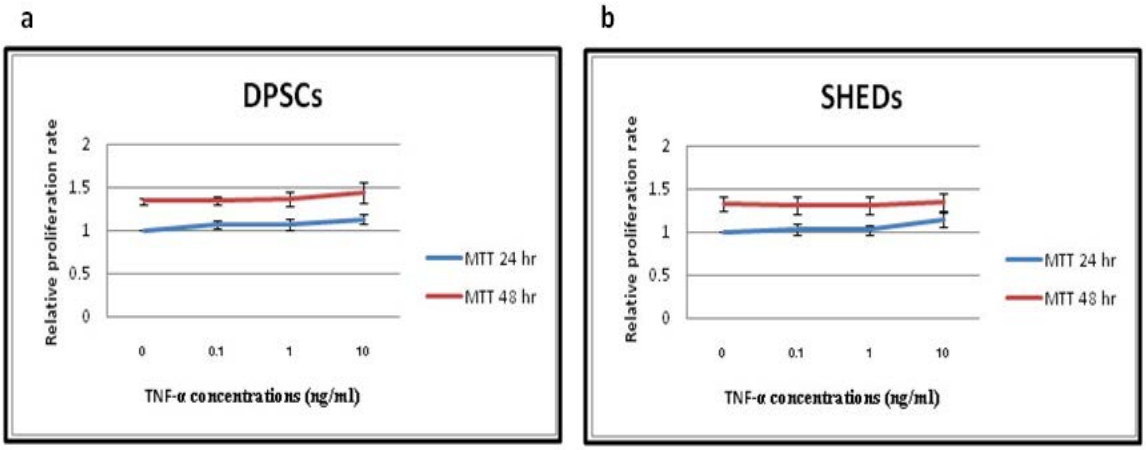
- ปริมาณอาร์เอ็นเอนำรหัสของยีนเบสิกเอฟจีเอฟ ซอกซ์2 และดีเอสพีพี แสดงเป็นสัดส่วนค่าเฉลี่ยความเข้มของยีนแต่ละตัวของกลุ่มศึกษาในแต่ละความเข้มข้นต่อกลุ่มควบคุม $\pm$ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) โดยให้กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เติมทีเอ็นเอฟแอลฟามีค่าเท่ากับ 1 ทั้งนี้จะใช้ความเข้มของยีนจีเอพีดีเฮชเป็นตัวควบคุมภายใน

การเปรียบเทียบอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ ปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอของยีนเบสิกเอฟจีเอฟซอกซ์2 และ ดีเอสพีพีระหว่างกลุ่มศึกษา (เซลล์จากเนื้อเยื่อในโพรงฟันแท้และฟันน้ำนมมนุษย์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์กับสารละลายทีเอ็นเอฟแอลฟาที่มีความเข้มข้นต่างๆ) และกลุ่มควบคุม (เซลล์จากเนื้อเยื่อในฟันแท้และฟันน้ำนมมนุษย์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ได้เติมทีเอ็นเอฟแอลฟา) ใช้วิธีการทดสอบการแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้โปรแกรมสถิติเอสพีเอสเอส 17.0 (SPSS 17.0)

บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

1. การศึกษาอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์โดยการวัดปริมาณเซลล์ด้วยเทคนิคเอ็มทีที

การวัดอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์หลังการกระตุ้นด้วยทีเอ็นเอฟแอลฟาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง ด้วยเทคนิคเอ็มทีที ผลการศึกษาพบว่า ทีเอ็นเอฟแอลฟาในทุกความเข้มข้นที่ใช้กระตุ้นเซลล์ทั้งจากฟันแท้และฟันน้ำนมนั้น ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในภาพที่ 2

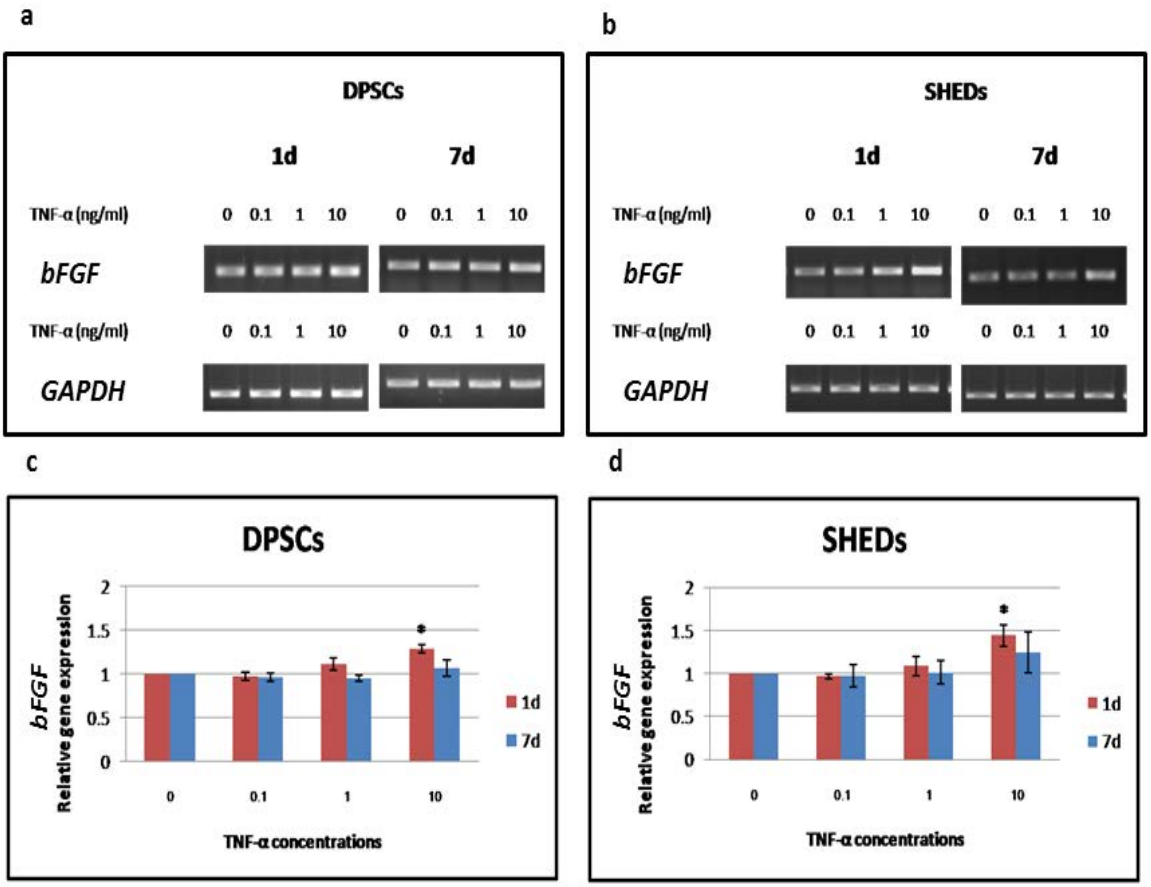


ภาพที่ 2 กราฟแสดง (a) อัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์จากเนื้อเยื่อในโพรงฟันแท้หลังการกระตุ้นด้วยทีเอ็นเอฟแอลฟาเป็นเวลา 24 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 0 0.1 1 และ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (b) อัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์จากเนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมหลังการกระตุ้นด้วยทีเอ็นเอฟแอลฟาเป็นเวลา 24 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 0 0.1 1 และ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

2. การศึกษาระดับการแสดงออกของอาร์เอ็นเอนำรหัสด้วยวิธีอาร์ที-พีซีอาร์

2.1 การแสดงออกของบีเอฟจีเอฟ

ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนบีเอฟจีเอฟ ด้วยวิธีอาร์ที-พีซีอาร์ พบว่า หลังการกระตุ้นเซลล์ด้วยทีเอ็นเอฟแอลฟาเป็นเวลา 1 วัน เซลล์จากเนื้อเยื่อในโพรงฟันแท้และฟันน้ำนมมีการแสดงออกของยีนบีเอฟจีเอฟเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ที่ความเข้มข้นของทีเอ็นเอฟแอลฟา 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ดี ไม่พบความแตกต่างเมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วยทีเอ็นเอฟแอลฟาเป็นเวลา 7 วัน ($p>0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 3

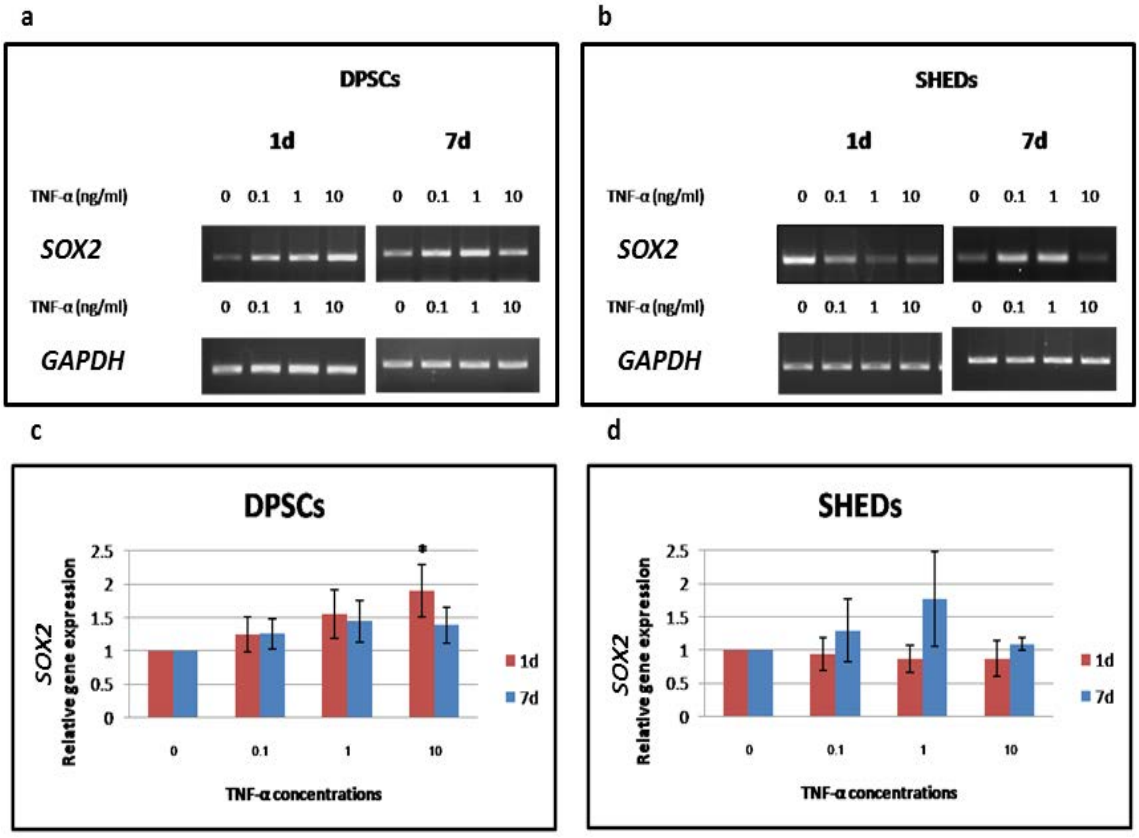


ภาพที่ 3 ภาพการแสดงออกของยีน (a, b) และแผนภูมิการแสดงออกของยีนบีเอฟจีเอฟ (c, d) จากเนื้อเยื่อในโพรงฟันหลังการกระตุ้นด้วยทีเอ็นเอฟแอลฟาเป็นเวลา 1 และ 7 วัน ที่ความเข้มข้น 0 0.1 1 และ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดย a และ c เป็นการแสดงออกของเซลล์จากฟันแท้ ส่วน b และ d จากฟันน้ำนม (* $p<0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม)

2.3 การแสดงออกของซอกซ์2

เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนซอกซ์2 จะพบการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในเซลล์จากเนื้อเยื่อในโพรงฟันแท้หลังการกระตุ้นด้วยทีเอ็นเอฟแอลฟาเป็นเวลา 1 วัน แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงในเซลล์จากฟันน้ำนม ดังแสดงในภาพที่ 4

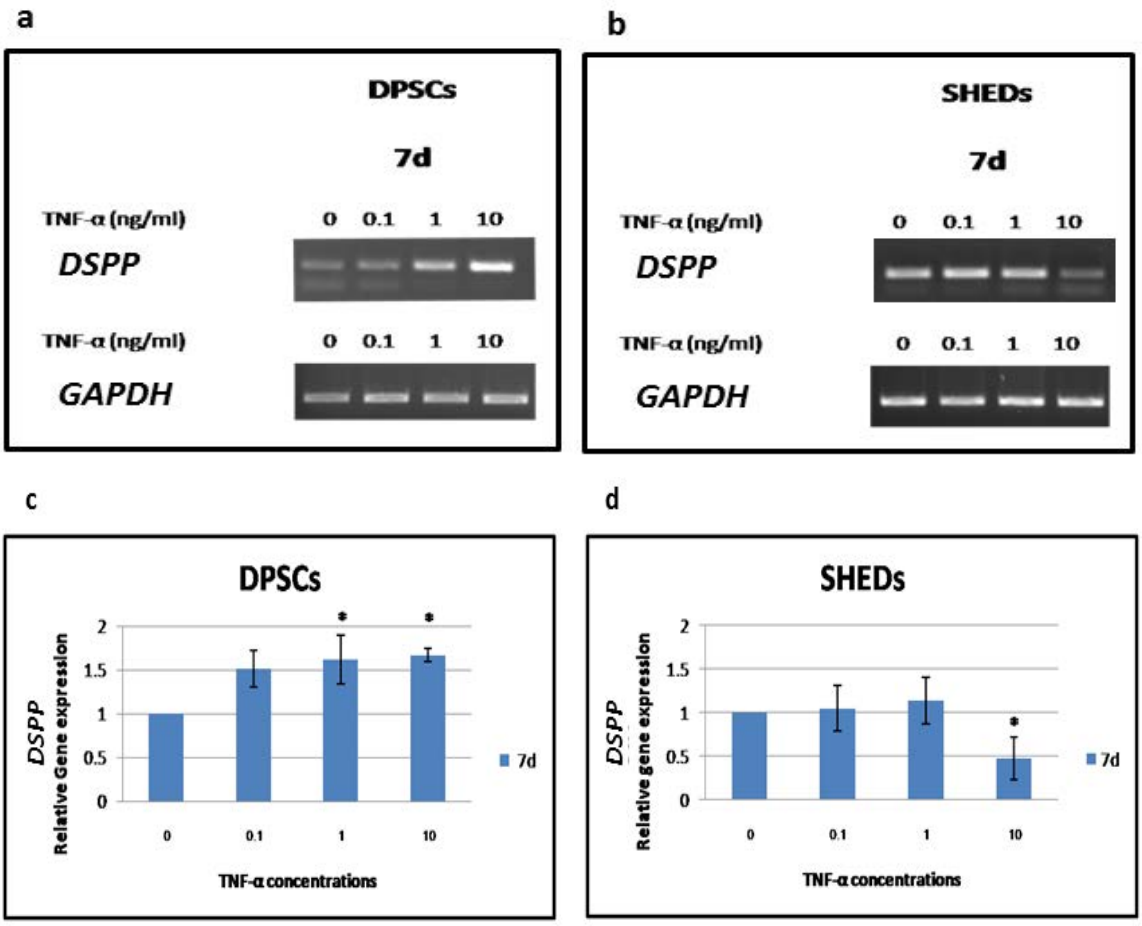
และเมื่อกระตุ้นเซลล์ไปเป็นเวลา 7 วัน พบว่าระดับการแสดงออกของซอกซ์2 ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในเซลล์ทั้งสองชนิด เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม



ภาพที่ 4 ภาพการแสดงออกของยีน (a, b) และแผนภูมิการแสดงออกของยีนซอกซ์2 (c, d) จากเนื้อเยื่อในโพรงฟันหลังการกระตุ้นด้วยทีเอ็นเอฟแอลฟาเป็นเวลา 1 และ 7 วัน ที่ความเข้มข้น 0 0.1 1 และ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดย a และ c เป็นการแสดงออกของเซลล์จากฟันแท้ ส่วน b และ d จากฟันน้ำนม (* $p<0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม)

2.3 การแสดงออกของดีเอสพีพี

ผลการแสดงออกของยีนดีเอสพีพีเมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วยทีเอ็นเอฟแอลฟาเป็นเวลา 7 วัน พบว่า การแสดงออกของดีเอสพีพีเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วยทีเอ็นเอฟแอลฟาที่ความเข้มข้น 1 และ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในเซลล์จากฟันแท้ ในขณะที่ผลการกระตุ้นในเซลล์จากฟันน้ำนมกลับพบการลดลงของดีเอสพีพีที่ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 5 ภาพการแสดงออกของยีน (a, b) และแผนภูมิการแสดงออกของยีนดีเอสพีพี (c, d) จากเนื้อเยื่อในโพรงฟันหลังการกระตุ้นด้วยทีเอ็นเอฟแอลฟาเป็นเวลา 7 วัน ที่ความเข้มข้น 0 0.1 1 และ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดย a และ c เป็นการแสดงออกของเซลล์จากฟันแท้ ส่วน b และ d จากฟันน้ำนม (* $p<0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม)

บทที่ 5
อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

อภิปรายผลการวิจัย

ผลการศึกษาครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่า ทีเอ็นเอฟแอลฟามีอิทธิพลต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดและการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งในเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันจากทั้งฟันน้ำนมและฟันแท้ อย่างไรก็ดี ผลการทดลองบ่งชี้ว่า เซลล์ทั้งสองชนิดนี้อาจมีรูปแบบของการตอบสนองต่อทีเอ็นเอฟแอลฟาที่แตกต่างกัน และเกิดเป็นสมมติฐานว่าเซลล์ของฟันแท้และฟันน้ำนมนั้น อาจมีการตอบสนองต่อกระบวนการอักเสบที่ไม่เหมือนกัน โดยผลของการศึกษาในครั้งนี้ พบว่า ทีเอ็นเอฟแอลฟาไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ ในขณะที่การกระตุ้นด้วยทีเอ็นเอฟแอลฟาเป็นเวลา 1 วันจะกระตุ้นการแสดงออกของเบสิกเอฟจีเอฟได้ในเซลล์ทั้งสองชนิด ในขณะที่จะพบการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของยีนซอกซ์2 ในเซลล์จากฟันแท้ โดยไม่พบในเซลล์จากฟันน้ำนม และเมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วยทีเอ็นเอฟแอลฟาไปเป็นเวลา 7 วัน จะพบการเพิ่มขึ้นของดีเอสพีพีในฟันแท้ ขณะที่มีผลลดลงในฟันน้ำนม

ในแง่ของผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ พบว่าทีเอ็นเอฟแอลฟาไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ทั้งสองชนิด เมื่อตรวจสอบที่ 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมงหลังการกระตุ้น การที่ไม่เห็นผลของทีเอ็นเอฟแอลฟาในระยะเวลา 48 ชั่วโมงหลังการกระตุ้น น่าจะแสดงว่าทีเอ็นเอฟแอลฟาอาจไม่มีผลในการเพิ่มจำนวนเซลล์โดยตรง เพราะหากทีเอ็นเอฟแอลฟามีผลโดยตรงกับเซลล์ ควรจะพบการเปลี่ยนแปลงภายใน 24-48 ชั่วโมงแรกหลังการกระตุ้น อย่างไรก็ดี รายงานนี้เป็นรายงานแรกที่แสดงว่าทีเอ็นเอฟแอลฟา สามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของเบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ หรือ บีเอฟจีเอฟและซอกซ์2 ในเซลล์จากเนื้อเยื่อในโพรงฟัน ซึ่งแสดงถึงความเป็นไปได้ในการที่ทีเอ็นเอฟแอลฟา อาจทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการรักษาภาวะความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์เนื้อเยื่อใน เนื่องจากมีรายงานที่แสดงว่าบีเอฟจีเอฟและซอกซ์2 นั้น สามารถทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการคงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดได้

บีเอฟจีเอฟ เป็นโกรทแฟคเตอร์ที่ทำหน้าที่สัมพันธ์กับการคงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Wu และคณะ, 2012; Xu และคณะ, 2005) มีรายงานที่แสดงว่าการเติมบีเอฟจีเอฟลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์จะช่วยในการรักษาคุณสมบัติของความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด โดยการเพิ่มการแสดงออกของดรรชนีบ่งชี้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดและคงความสามารถในการแปรสภาพของเซลล์ (Colleoni และคณะ, 2009; Levenstein และคณะ, 2006; Li และคณะ, 2012) ดังนั้น จึงมีความเป็นไปได้ที่การเพิ่มของบีเอฟจีเอฟโดยทีเอ็น

เอฟแอลฟานั้น มีขึ้นเพื่อส่งเสริมภาวะความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟัน และควบคุมการแปรสภาพของเซลล์เหล่านี้

การที่ผลการศึกษาไม่พบการเพิ่มจำนวนเซลล์หลังการกระตุ้นด้วยทีเอ็นเอฟแอลฟา แม้จะพบการเพิ่มขึ้นของบีเอฟจีเอฟก็ตาม สนับสนุนว่าหน้าที่ของบีเอฟจีเอฟอาจไม่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟัน ซึ่งการที่บีเอฟจีเอฟที่ไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ในเซลล์จากเนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมนั้น สอดคล้องกับงานวิทยานิพนธ์ของปิยะรัตน์ (Kerdpon, 2012) ที่พบว่าการเติม บีเอฟจีเอฟในอาหารเลี้ยงเซลล์ ไม่สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ในฟันน้ำนม อย่างไรก็ดี ในรายงานดังกล่าวกลับพบว่าบีเอฟจีเอฟกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่บ่งชี้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด ได้แก่ เรกซ์1 (*REX1*)

ในกรณีของเซลล์จากเนื้อเยื่อในโพรงฟันแท้ ผลการศึกษาครั้งนี้ขัดแย้งกับรายงานที่แสดงว่าทีเอ็นเอฟแอลฟาสามารถกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ในวันที่สามหลังการกระตุ้น (Yang และคณะ, 2012) แต่ในการทดลองนั้นเป็นการทดลองในเซลล์จากเนื้อเยื่อในโพรงฟันของหนู ซึ่งอาจจะมีการตอบสนองต่างจากเซลล์มนุษย์ ซึ่งความแตกต่างในการตอบสนองระหว่างหนูกับมนุษย์นี้เคยมีรายงานโดย Sooampon และคณะ ที่พบว่าเซลล์กระดูกจากคนและหนูจะตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยแคปไซซิน (capsaicin) แตกต่างกัน ทั้งนี้ สนับสนุนว่าการตอบสนองของทีเอ็นเอฟแอลฟาอาจมีลักษณะจำเพาะในแต่ละสายพันธุ์ (species specific) (Sooampon, Manokawinchoke และ Pavasant, 2013)

นอกจากนี้ ยังพบรายงานที่แสดงถึงบทบาทของบีเอฟจีเอฟในการยับยั้งการแปรสภาพของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันจากฟันแท้ (Osathanon และคณะ, 2011) รวมทั้งหน้าที่ในการรักษาความมีชีวิตของเซลล์ โดยเฉพาะในเซลล์ประสาท และเซลล์ตัวอ่อน ทั้งนี้ เพื่อป้องกันไม่ให้เซลล์ตายจากอันตรายที่เกิดขึ้นกับเนื้อเยื่อ (Eiselleova และคณะ, 2009; Meijs และคณะ, 2004; Miettinen และคณะ, 2011) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่า ผลของทีเอ็นเอฟแอลฟาในการเหนี่ยวนำการแสดงออกของบีเอฟจีเอฟทั้งจากเซลล์ของฟันแท้และฟันน้ำนมภายในวันแรกนั้น อาจเกี่ยวข้องกับการดำรงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด และการป้องกันการตายของเซลล์จากอันตรายที่เกิดขึ้น รวมทั้งการป้องกันไม่ให้เซลล์เกิดการแปรสภาพก่อนเวลาที่สมควร

แนวคิดที่ว่าการเพิ่มของบีเอฟจีเอฟสัมพันธ์กับการรักษาความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดนั้นสอดคล้องกับผลการทดลองที่แสดงการเพิ่มขึ้นของซอกซ์2 เนื่องจากหน้าที่ของซอกซ์2 เกี่ยวข้องกับการคงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด (Basu-Roy และคณะ, 2010) และการยับยั้งการแปรสภาพของเซลล์ไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง (Seo และคณะ, 2011) นอกจากนี้ ซอกซ์2 ยังมีบทบาท

เกี่ยวข้องกับการอยู่รอดของเซลล์ (cell survival) เช่น เซลล์มะเร็ง (Bass และคณะ, 2009; Huang และคณะ, 2011) เป็นต้น ซึ่งรายงานเหล่านี้สอดคล้องกับหน้าที่ของบีเอฟจีเอฟที่กล่าวถึงข้างต้น ฉะนั้นการเพิ่มการแสดงออกของซอกซ์2 ในวันที่ 1 หลังการกระตุ้นด้วยทีเอ็นเอฟแอลฟาในเซลล์จากฟันแท้ จึงอาจจะเป็นไปเพื่อคงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด การยับยั้งการแปรสภาพของเซลล์ก่อนเวลาอันควร และการป้องกันการตายของเซลล์เช่นกัน

อย่างไรก็ดี ผลการทดลองในครั้งนี้ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของซอกซ์2 ในเซลล์จากฟันน้ำนม ซึ่งความแตกต่างในการตอบสนองต่อทีเอ็นเอฟแอลฟาระหว่างเซลล์จากฟันแท้และฟันน้ำนมนี้ ส่วนหนึ่งอาจเกิดจากคุณสมบัติพื้นฐานที่แตกต่างกันของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมกับฟันแท้ เช่น การแสดงออกของโปรตีนหรือตัวรับที่ผิวเซลล์ที่มีความแตกต่างกัน (Guan, 2011; Nakamura และคณะ, 2009; Shi และคณะ, 2005) อัตราการเจริญที่แตกต่างกัน รวมทั้งการที่มีการแสดงออกของยีนที่แสดงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดชนิดพลูริโพเทนต์ (Pluripotent) ที่แตกต่างกัน (Guan, 2011; Miura และคณะ, 2003; Nakamura และคณะ, 2009) นอกจากนี้เซลล์ทั้งสองนี้ ยังมีความสามารถในการเปลี่ยนเป็นเซลล์คล้ายเซลล์ประสาท (neuron-like cells) ได้ต่างกันอีกด้วย (Govindasamy และคณะ, 2010; Kerkis และคณะ, 2006; Nakamura และคณะ, 2009) ซึ่งความแตกต่างเหล่านี้ สะท้อนคุณสมบัติที่แตกต่างกันที่อาจนำไปสู่การตอบสนองต่อสิ่งเร้าแตกต่างกันด้วย

จากรายงานการทดลองของ Osathanon และคณะ (Osathanon และคณะ, 2013) พบว่า เมื่อกระตุ้นเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่จำเพาะต่อการเหนี่ยวนำการสร้างเนื้อเยื่อแข็ง (osteogenic media) จะสามารถกระตุ้นการแปรสภาพของเซลล์ได้เร็วกว่าเซลล์กระดูก โดยพบการสะสมแร่ธาตุ (calcification) ในห้องปฏิบัติการได้ภายใน 14 วัน และพบการแสดงออกของดรรชนีบ่งชี้ความเป็นเซลล์สร้างกระดูกหรือเนื้อเยื่อแข็ง (osteogenic markers) ได้ตั้งแต่วันที่ 7 หลังการกระตุ้น ส่วนในการศึกษานี้ การแสดงออกของดีเอสพีพีซึ่งเป็นดรรชนีบ่งชี้ของการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อฟัน (odontogenic differentiation) พบการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อกระตุ้นเซลล์จากเนื้อเยื่อในโพรงฟันแท้เป็นเวลา 7 วัน เช่นเดียวกัน ทั้งนี้บทบาทของดีเอสพีพีนั้น ทำหน้าที่เกี่ยวกับการเหนี่ยวนำการสะสมแร่ธาตุในเนื้อฟัน และการพบการแสดงออกของยีนนี้สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ความเป็นเซลล์สร้างเนื้อฟัน (odontoblast) (Chen และคณะ, 2005) และใช้บ่งชี้การแปรสภาพเซลล์ในสายการสร้างกระดูกหรือเนื้อเยื่อแข็งได้ด้วย ดังนั้น ผลการทดลองนี้สนับสนุนว่าทีเอ็นเอฟแอลฟาสนับสนุนการแปรสภาพในเซลล์จากโพรงฟันแท้ ในขณะที่ผลต่อฟันน้ำนมไม่ชัดเจน

การที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของบีเอฟจีเอฟและซอกซ์2 ในวันที่ 7 หลังการกระตุ้นด้วยทีเอ็นเอฟแอลฟานั้น สอดคล้องกับรายงานที่แสดงว่า ทั้งบีเอฟจีเอฟและซอกซ์2 มีอิทธิพลในการยับยั้งการแปรสภาพของเซลล์ (Osathanon และคณะ, 2011; Park และคณะ, 2012) และมีรายงานว่า การเกิดการแปรสภาพของเซลล์นั้น จะสัมพันธ์กับการลดลงของตัวบ่งชี้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด (Liu และคณะ, 2011; Wang และคณะ, 2012) ด้วย และเมื่อตรวจสอบการแสดงออกของนานอกและออกท์4 หลังการกระตุ้นด้วยทีเอ็นเอฟแอลฟาเป็นเวลา 7 วัน พบการลดลงเช่นกัน และสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของดีเอสพีพี จึงสนับสนุนแนวคิดว่าการได้รับไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบในระยะยาวนั้น อาจมีผลในการเปลี่ยนแปลงการแปรสภาพของเซลล์ โดยในกรณีของทีเอ็นเอฟแอลฟานั้น เมื่อกระตุ้นเซลล์จากฟันแท้เป็นเวลา 7 วัน น่าจะส่งเสริมการแปรสภาพไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง และส่งเสริมการซ่อมแซมของเนื้อเยื่อโพรงฟัน อย่างไรก็ดี แนวคิดนี้ยังจะต้องมีการพิสูจน์โดยการประเมินการแปรสภาพของเซลล์ต่อไป

การที่ผลในฟันน้ำนมไม่พบการเพิ่มขึ้นของดีเอสพีพีนั้น ส่วนหนึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่าทีเอ็นเอฟแอลฟาไม่มีผลต่อการแปรสภาพของเซลล์ ดังที่ได้อธิบายข้างต้นแล้วถึงความแตกต่างของเซลล์จากฟันน้ำนมและฟันแท้ หรืออีกนัยหนึ่ง ทีเอ็นเอฟแอลฟาอาจกระตุ้นการแปรสภาพของเซลล์จากฟันน้ำนมไปในอีกสาย (lineage) หนึ่งได้ เช่น เซลล์ประสาท เป็นต้น เนื่องจากการศึกษานี้ไม่ได้ตรวจสอบดรรชนีบ่งชี้ในการแปรสภาพเป็นเซลล์ในสายอื่นๆ ทั้งนี้แนวคิดดังกล่าวจะต้องศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

นอกจากนี้ ความแตกต่างของการตอบสนองของเซลล์ต่อทีเอ็นเอฟแอลฟานั้น อาจเกี่ยวข้องกับความแตกต่างทางทางสรีรวิทยาระหว่างฟันน้ำนมกับฟันแท้เช่นกัน เนื่องจากฟันน้ำนมจะมีการละลายตัวของรากฟันตามธรรมชาติ เมื่อฟันแท้งอกขึ้นมาแทนที่ ในขณะที่ฟันแท้นั้นจะไม่มีการละลายตัวของรากฟัน ดังนั้นการกระตุ้นด้วยทีเอ็นเอฟแอลฟาเป็นเวลานานในฟันน้ำนมอาจจะล้อสภาวะที่คล้ายกับกลไกการละลายตัวของรากฟันได้ แนวคิดนี้สอดคล้องกับรายงานที่แสดงว่า ทีเอ็นเอฟแอลฟาสามารถเพิ่มการแสดงออกของตัวรับแอคติเวเตอร์นิวเคลียร์แฟคเตอร์แคปปาบีไลแกนหรือแรงก์ไลแกน (RANKL) ซึ่งเป็นโมเลกุลที่เหนี่ยวนำการเกิดและการทำงานของเซลล์สลายกระดูก (Rossa และคณะ, 2006) โดยมีรายงานจำนวนมากที่แสดงถึงบทบาทของทีเอ็นเอฟแอลฟาและแรงก์ไลแกน ในการเหนี่ยวนำการทำงานของเซลล์สลายกระดูก (Fukushima และคณะ, 2003; Komine และคณะ, 2001; Lam และคณะ, 2000) และส่งเสริมการละลายตัวของเนื้อเยื่อแข็ง ดังนั้น ในกรณีของฟันน้ำนม การกระตุ้นด้วยทีเอ็นเอฟแอลฟาในระยะเวลานานอาจจะส่งเสริมการละลายตัวของรากฟันมากกว่าส่งเสริมการซ่อมแซมเนื้อเยื่อ

สรุป

ทีเอ็นเอฟแอลฟามีผลต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดและการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง โดยการกระตุ้นด้วยทีเอ็นเอฟแอลฟาในระยะสั้นส่งเสริมความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมากขึ้นทั้งจากฟันแท้และฟันน้ำนม ส่วนการกระตุ้นในระยะยาวฟันแท้มีแนวโน้มที่จะส่งเสริมการแปรสภาพไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง ในขณะที่ฟันน้ำนมอาจมีการยับยั้งผลดังกล่าว อย่างไรก็ตาม ยังจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันผลต่อไป

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากการศึกษานี้ ดูผลโดยตรงของทีเอ็นเอฟแอลฟาในการเพิ่มจำนวนและการแปรสภาพของเซลล์เป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาผลในการแปรสภาพของเซลล์ไปในสายอื่นๆ และรายละเอียดกลไกการทำงานของทีเอ็นเอฟแอลฟาเพิ่มเติม เพื่อนำองค์ความรู้ไปประยุกต์ใช้ในทางคลินิกต่อไปในอนาคต

รายการอ้างอิง

Ait-Ali, D.,Turquier, V.,Tanguy, Y.,Thouennon, E.,Ghzili, H.,Mounien, L., et al. 2008. Tumor necrosis factor (TNF)-alpha persistently activates nuclear factor-kappaB signaling through the type 2 TNF receptor in chromaffin cells: implications for long-term regulation of neuropeptide gene expression in inflammation. Endocrinology 149(6): 2840-2852.

Argast, G. M.,Campbell, J. S.,Brooling, J. T. andFausto, N. 2004. Epidermal growth factor receptor transactivation mediates tumor necrosis factor-induced hepatocyte replication. J Biol Chem 279(33): 34530-34536.

Artlett, C. M. 2013. Inflammasomes in wound healing and fibrosis. J Pathol 229(2): 157-167.

Atari, M.,Barajas, M.,Hernandez-Alfaro, F.,Gil, C.,Fabregat, M.,Ferres Padro, E., et al. 2011. Isolation of pluripotent stem cells from human third molar dental pulp. Histology and histopathology 26(8): 1057-1070.

Bass, A. J.,Watanabe, H.,Mermel, C. H.,Yu, S.,Perner, S.,Verhaak, R. G., et al. 2009. SOX2 is an amplified lineage-survival oncogene in lung and esophageal squamous cell carcinomas. Nat Genet 41(11): 1238-1242.

Basu-Roy, U.,Ambrosetti, D.,Favaro, R.,Nicolis, S. K.,Mansukhani, A. andBasilico, C. 2010. The transcription factor Sox2 is required for osteoblast self-renewal. Cell Death Differ 17(8): 1345-1353.

Bhatia, B.,Singhal, S.,Tadman, D. N.,Khaw, P. T. andLimb, G. A. 2011. SOX2 is required for adult human muller stem cell survival and maintenance of progenicity in vitro. Invest Ophthalmol Vis Sci 52(1): 136-145.

Boleman, A. I.,Tănasie, G.,Găluşcan, A.,Cristea, M.,Bojin, F.,Panaitescu, C., et al. 2012. Studies regarding the in vitro wound healing potential of mouse dental pulp stem-like progenitor cells. Biotechnol & Biotechnol Eq 26(1): 2781-2785.

Brynskov, J.,Foegh, P.,Pedersen, G.,Ellervik, C.,Kirkegaard, T.,Bingham, A., et al. 2002. Tumour necrosis factor alpha converting enzyme (TACE) activity in the colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease. Gut 51(1): 37-43.

Carswell, E. A.,Old, L. J.,Kassel, R. L.,Green, S.,Fiore, N. andWilliamson, B. 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. Proc Natl Acad Sci U S A 72(9): 3666-3670.

Chen, G. andGoeddel, D. V. 2002. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. Science 296(5573): 1634-1635.

Chen, S.,Rani, S.,Wu, Y.,Unterbrink, A.,Gu, T. T.,Gluhak-Heinrich, J., et al. 2005. Differential regulation of dentin sialophosphoprotein expression by Runx2 during odontoblast cytodifferentiation. J Biol Chem 280(33): 29717-29727.

Cheng, P. H.,Snyder, B.,Fillos, D.,Ibegbu, C. C.,Huang, A. H. andChan, A. W. 2008. Postnatal stem/progenitor cells derived from the dental pulp of adult chimpanzee. BMC cell biology 920.

Coil, J.,Tam, E. andWaterfield, J. D. 2004. Proinflammatory cytokine profiles in pulp fibroblasts stimulated with lipopolysaccharide and methyl mercaptan. J Endod 30(2): 88-91.

Colleoni, S.,Bottani, E.,Tessaro, I.,Mari, G.,Merlo, B.,Romagnoli, N., et al. 2009. Isolation, growth and differentiation of equine mesenchymal stem cells: effect of donor, source, amount of tissue and supplementation with basic fibroblast growth factor. Vet Res Commun 33(8): 811-821.

Cooper, P. R.,Takahashi, Y.,Graham, L. W.,Simon, S.,Imazato, S. andSmith, A. J. 2010. Inflammation-regeneration interplay in the dentine-pulp complex. J Dent 38(9): 687-697.

Coutu, D. L. andGalipeau, J. 2011. Roles of FGF signaling in stem cell self-renewal, senescence and aging. Aging 3(10): 920-933.

D'Souza, R. N.,Cavender, A.,Sunavala, G.,Alvarez, J.,Ohshima, T.,Kulkarni, A. B., et al. 1997. Gene expression patterns of murine dentin matrix protein 1 (Dmp1) and

dentin sialophosphoprotein (DSPP) suggest distinct developmental functions in vivo. J Bone Miner Res 12(12): 2040-2049.

Dvorak, P. andHampl, A. 2005. Basic fibroblast growth factor and its receptors in human embryonic stem cells. Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society 43(4): 203-208.

Eiselleova, L.,Matulka, K.,Kriz, V.,Kunova, M.,Schmidtova, Z.,Neradil, J., et al. 2009. A complex role for FGF-2 in self-renewal, survival, and adhesion of human embryonic stem cells. Stem Cells 27(8): 1847-1857.

Eming, S. A.,Krieg, T. andDavidson, J. M. 2007. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. J Invest Dermatol 127(3): 514-525.

Feng, J. Q.,Luan, X.,Wallace, J.,Jing, D.,Ohshima, T.,Kulkarni, A. B., et al. 1998. Genomic organization, chromosomal mapping, and promoter analysis of the mouse dentin sialophosphoprotein (Dspp) gene, which codes for both dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein. J Biol Chem 273(16): 9457-9464.

Ferrara, N. andDavis-Smyth, T. 1997. The biology of vascular endothelial growth factor. Endocrine reviews 18(1): 4-25.

Fitzgerald, M.,Chiego, D. J., Jr. andHeys, D. R. 1990. Autoradiographic analysis of odontoblast replacement following pulp exposure in primate teeth. Arch Oral Biol 35(9): 707-715.

Fukushima, H.,Kajiya, H.,Takada, K.,Okamoto, F. andOkabe, K. 2003. Expression and role of RANKL in periodontal ligament cells during physiological root-resorption in human deciduous teeth. European journal of oral sciences 111(4): 346-352.

Garlet, G. P. 2010. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. J Dent Res 89(12): 1349-1363.

Gaur, U. andAggarwal, B. B. 2003. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. Biochem Pharmacol 66(8): 1403-1408.

Gilbert, L.,He, X.,Farmer, P.,Boden, S.,Kozlowski, M.,Rubin, J., et al. 2000. Inhibition of osteoblast differentiation by tumor necrosis factor-alpha. Endocrinology 141(11): 3956-3964.

Gilbert, L.,He, X.,Farmer, P.,Rubin, J.,Drissi, H.,van Wijnen, A. J., et al. 2002. Expression of the osteoblast differentiation factor RUNX2 (Cbfa1/AML3/Pebp2alpha A) is inhibited by tumor necrosis factor-alpha. J Biol Chem 277(4): 2695-2701.

Glass, G. E.,Chan, J. K.,Freidin, A.,Feldmann, M.,Horwood, N. J. andNanchahal, J. 2011. TNF-alpha promotes fracture repair by augmenting the recruitment and differentiation of muscle-derived stromal cells. Proc Natl Acad Sci U S A 108(4): 1585-1590.

Goldberg, M.,Farges, J. C.,Lacerda-Pinheiro, S.,Six, N.,Jegat, N.,Decup, F., et al. 2008. Inflammatory and immunological aspects of dental pulp repair. Pharmacol Res 58(2): 137-147.

Govindasamy, V.,Abdullah, A. N.,Ronald, V. S.,Musa, S.,Ab Aziz, Z. A.,Zain, R. B., et al. 2010. Inherent differential propensity of dental pulp stem cells derived from human deciduous and permanent teeth. J Endod 36(9): 1504-1515.

Gronthos, S.,Brahim, J.,Li, W.,Fisher, L. W.,Cherman, N.,Boyde, A., et al. 2002. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. J Dent Res 81(8): 531-535.

Gronthos, S.,Mankani, M.,Brahim, J.,Robey, P. G. andShi, S. 2000. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 97(25): 13625-13630.

Guan, Z., Shi S, Kamolmatyakul S. 2011. Proliferation and mineralization ability of dental pulp cells derived from primary and permanent teeth. Songklanakarin JSci Technol 33(2): 129-134.

Hargreaves, K. M. andGoodis, H. E. 2002. Seltzer and Bender's Dental pulp. Univ. of Texas health science Center, San Antonio : Quintessence publishing.

Hasegawa, T.,Chosa, N.,Asakawa, T.,Yoshimura, Y.,Asakawa, A.,Ishisaki, A., et al. 2010. Effect of fibroblast growth factor-2 on dental pulp cells
derived from human deciduous teeth in vitro. Exp Ther Med 1477-480.

Huang, H.,Zhao, N.,Xu, X.,Xu, Y.,Li, S.,Zhang, J., et al. 2011. Dose-specific effects of tumor necrosis factor alpha on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. Cell Prolif 44(5): 420-427.

Huang, P.,Qiu, J.,Li, B.,Hong, J.,Lu, C.,Wang, L., et al. 2011. Role of Sox2 and Oct4 in predicting survival of hepatocellular carcinoma patients after hepatectomy. Clinical biochemistry 44(8-9): 582-589.

Ivanova, N.,Dobrin, R.,Lu, R.,Kotenko, I.,Levorse, J.,DeCoste, C., et al. 2006. Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. Nature 442(7102): 533-538.

Jaenisch, R. andYoung, R. 2008. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. Cell 132(4): 567-582.

Kanda, S.,Miyata, Y. andKanetake, H. 2004. Fibroblast growth factor-2-mediated capillary morphogenesis of endothelial cells requires signals via Flt-1/vascular endothelial growth factor receptor-1: possible involvement of c-Akt. J Biol Chem 279(6): 4007-4016.

Kerdpon, P. 2012. Effects of basic fibroblast growth factor on self-renewal properties and rex-1 expression of human deciduous pulp cells in long term culture. Master's Thesis. Pediatric dentistry Chulalongkorn University.

Kerkis, I.,Kerkis, A.,Dozortsev, D.,Stukart-Parsons, G. C.,Gomes Massironi, S. M.,Pereira, L. V., et al. 2006. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. Cells Tissues Organs 184(3-4): 105-116.

Kjeldsen, M.,Holmstrup, P. andBendtzen, K. 1993. Marginal periodontitis and cytokines: a review of the literature. J Periodontol 64(11): 1013-1022.

Komine, M.,Kukita, A.,Kukita, T.,Ogata, Y.,Hotokebuchi, T. andKohashi, O. 2001. Tumor necrosis factor-alpha cooperates with receptor activator of nuclear factor kappaB ligand in generation of osteoclasts in stromal cell-depleted rat bone marrow cell culture. Bone 28(5): 474-483.

Koyama, N.,Okubo, Y.,Nakao, K. andBessho, K. 2009. Evaluation of pluripotency in human dental pulp cells. Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons 67(3): 501-506.

Lam, J.,Takeshita, S.,Barker, J. E.,Kanagawa, O.,Ross, F. P. andTeitelbaum, S. L. 2000. TNF-alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. J Clin Invest 106(12): 1481-1488.

Lee, A. J.,Hodges, S. andEastell, R. 2000. Measurement of osteocalcin. Annals of clinical biochemistry 37 (Pt 4)432-446.

Levenstein, M. E.,Ludwig, T. E.,Xu, R. H.,Llanas, R. A.,VanDenHeuvel-Kramer, K.,Manning, D., et al. 2006. Basic fibroblast growth factor support of human embryonic stem cell self-renewal. Stem Cells 24(3): 568-574.

Li, Y.,Tsai, Y. T.,Hsu, C. W.,Erol, D.,Yang, J.,Wu, W. H., et al. 2012. Long-term safety and efficacy of human-induced pluripotent stem cell (iPS) grafts in a preclinical model of retinitis pigmentosa. Mol Med 181312-1319.

Lian, J. B.,Javed, A.,Zaidi, S. K.,Lengner, C.,Montecino, M.,van Wijnen, A. J., et al. 2004. Regulatory controls for osteoblast growth and differentiation: role of Runx/Cbfa/AML factors. Critical reviews in eukaryotic gene expression 14(1-2): 1-41.

Liu, L.,Wei, X.,Ling, J.,Wu, L. andXiao, Y. 2011. Expression pattern of Oct-4, Sox2, and c-Myc in the primary culture of human dental pulp derived cells. J Endod 37(4): 466-472.

Loh, K. M. andLim, B. 2011. A precarious balance: pluripotency factors as lineage specifiers. Cell Stem Cell 8(4): 363-369.

MacDougall, M.,Simmons, D.,Luan, X.,Nydegger, J.,Feng, J. andGu, T. T. 1997. Dentin phosphoprotein and dentin sialoprotein are cleavage products expressed from a single transcript coded by a gene on human chromosome 4. Dentin phosphoprotein DNA sequence determination. J Biol Chem 272(2): 835-842.

Marchetti, L.,Klein, M.,Schlett, K.,Pfizenmaier, K. andEisel, U. L. 2004. Tumor necrosis factor (TNF)-mediated neuroprotection against glutamate-induced excitotoxicity

is enhanced by N-methyl-D-aspartate receptor activation. Essential role of a TNF receptor 2-mediated phosphatidylinositol 3-kinase-dependent NF-kappa B pathway. J Biol Chem 279(31): 32869-32881.

Markel, T. A.,Crisostomo, P. R.,Wang, M.,Herring, C. M. andMeldrum, D. R. 2007. Activation of individual tumor necrosis factor receptors differentially affects stem cell growth factor and cytokine production. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 293(4): G657-662.

Masui, S.,Nakatake, Y.,Toyooka, Y.,Shimosato, D.,Yagi, R.,Takahashi, K., et al. 2007. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. Nature cell biology 9(6): 625-635.

Meijs, M. F.,Timmers, L.,Pearse, D. D.,Tresco, P. A.,Bates, M. L.,Joosten, E. A., et al. 2004. Basic fibroblast growth factor promotes neuronal survival but not behavioral recovery in the transected and Schwann cell implanted rat thoracic spinal cord. J Neurotrauma 21(10): 1415-1430.

Miettinen, J. A.,Pietila, M.,Salonen, R. J.,Ohlmeier, S.,Ylitalo, K.,Huikuri, H. V., et al. 2011. Tumor necrosis factor alpha promotes the expression of immunosuppressive proteins and enhances the cell growth in a human bone marrow-derived stem cell culture. Exp Cell Res 317(6): 791-801.

Min, K. S.,Kwon, Y. Y.,Lee, H. J.,Lee, S. K.,Kang, K. H. andKim, E. C. 2006. Effects of proinflammatory cytokines on the expression of mineralization markers and heme oxygenase-1 in human pulp cells. J Endod 32(1): 39-43.

Miura, M.,Gronthos, S.,Zhao, M.,Lu, B.,Fisher, L. W.,Robey, P. G., et al. 2003. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. Proc Natl Acad Sci U S A 100(10): 5807-5812.

Morito, A.,Kida, Y.,Suzuki, K.,Inoue, K.,Kuroda, N.,Gomi, K., et al. 2009. Effects of basic fibroblast growth factor on the development of the stem cell properties of human dental pulp cells. Arch Histol Cytol 72(1): 51-64.

Nakamura, S.,Yamada, Y.,Katagiri, W.,Sugito, T.,Ito, K. andUeda, M. 2009. Stem cell proliferation pathways comparison between human exfoliated deciduous teeth

and dental pulp stem cells by gene expression profile from promising dental pulp. J Endod 35(11): 1536-1542.

Nanes, M. S. 2003. Tumor necrosis factor-alpha: molecular and cellular mechanisms in skeletal pathology. Gene 3211-15.

Nishino, Y.,Ebisawa, K.,Yamada, Y.,Okabe, K.,Kamei, Y. andUeda, M. 2011. Human deciduous teeth dental pulp cells with basic fibroblast growth factor enhance wound healing of skin defect. J Craniofac Surg 22(2): 438-442.

Olszewski, M. B.,Groot, A. J.,Dastych, J. andKnol, E. F. 2007. TNF trafficking to human mast cell granules: mature chain-dependent endocytosis. J Immunol 178(9): 5701-5709.

Orchardson, R. andCadden, S. W. 2001. An update on the physiology of the dentine-pulp complex. Dental update 28(4): 200-206, 208-209.

Osathanon, T.,Nowwarote, N.,Manokawinchoke, J. andPavasant, P. 2013. Regulation of alkaline phosphatase expression and mineralization by basic fibroblast growth factor and Notch in human periodontal ligament stem cells and stem cells isolated from human exfoliated deciduous teeth. Bangkok: Chulalongkorn University. (Unpublished Manuscript)

Osathanon, T.,Nowwarote, N. andPavasant, P. 2011. Basic fibroblast growth factor inhibits mineralization but induces neuronal differentiation by human dental pulp stem cells through a FGFR and PLCgamma signaling pathway. J Cell Biochem 112(7): 1807-1816.

Park, J. E. andBarbul, A. 2004. Understanding the role of immune regulation in wound healing. American journal of surgery 187(5A): 11S-16S.

Park, S. B.,Seo, K. W.,So, A. Y.,Seo, M. S.,Yu, K. R.,Kang, S. K., et al. 2012. SOX2 has a crucial role in the lineage determination and proliferation of mesenchymal stem cells through Dickkopf-1 and c-MYC. Cell Death Differ 19(3): 534-545.

Paula-Silva, F. W.,Ghosh, A.,Silva, L. A. andKapila, Y. L. 2009. TNF-alpha promotes an odontoblastic phenotype in dental pulp cells. J Dent Res 88(4): 339-344.

Prasad, M.,Butler, W. T. andQin, C. 2010. Dentin sialophosphoprotein in biomineralization. Connect Tissue Res 51(5): 404-417.

Qin, C.,Baba, O. andButler, W. T. 2004. Post-translational modifications of sibling proteins and their roles in osteogenesis and dentinogenesis. Crit Rev Oral Biol Med 15(3): 126-136.

Qin, C.,Brunn, J. C.,Baba, O.,Wygant, J. N.,McIntyre, B. W. andButler, W. T. 2003. Dentin sialoprotein isoforms: detection and characterization of a high molecular weight dentin sialoprotein. European journal of oral sciences 111(3): 235-242.

Qin, C.,Brunn, J. C.,Cadena, E.,Ridall, A.,Tsujigiwa, H.,Nagatsuka, H., et al. 2002. The expression of dentin sialophosphoprotein gene in bone. J Dent Res 81(6): 392-394.

Ritchie, H. H.,Hou, H.,Veis, A. andButler, W. T. 1994. Cloning and sequence determination of rat dentin sialoprotein, a novel dentin protein. J Biol Chem 269(5): 3698-3702.

Romas, E.,Gillespie, M. T. andMartin, T. J. 2002. Involvement of receptor activator of NFkappaB ligand and tumor necrosis factor-alpha in bone destruction in rheumatoid arthritis. Bone 30(2): 340-346.

Rossa, C.,Ehmann, K.,Liu, M.,Patil, C. andKirkwood, K. L. 2006. MKK3/6-p38 MAPK signaling is required for IL-1beta and TNF-alpha-induced RANKL expression in bone marrow stromal cells. J Interferon Cytokine Res 26(10): 719-729.

Schroder, U. 1985. Effects of calcium hydroxide-containing pulp-capping agents on pulp cell migration, proliferation, and differentiation. J Dent Res 64 Spec No541-548.

Schutze, S.,Tchikov, V. andSchneider-Brachert, W. 2008. Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization. Nat Rev Mol Cell Biol 9(8): 655-662.

Seo, E.,Basu-Roy, U.,Zavadil, J.,Basilico, C. andMansukhani, A. 2011. Distinct functions of Sox2 control self-renewal and differentiation in the osteoblast lineage. Molecular and cellular biology 31(22): 4593-4608.

Shi, S.,Bartold, P. M.,Miura, M.,Seo, B. M.,Robey, P. G. andGronthos, S. 2005. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. Orthodontics & craniofacial research 8(3): 191-199.

Shiba, H.,Nakamura, S.,Shirakawa, M.,Nakanishi, K.,Okamoto, H.,Satakeda, H., et al. 1995. Effects of basic fibroblast growth factor on proliferation, the expression of osteonectin (SPARC) and alkaline phosphatase, and calcification in cultures of human pulp cells. Developmental biology 170(2): 457-466.

Sooampon, S.,Manokawinchoke, J. andPavasant, P. 2013. Transient receptor potential vanilloid-1 regulates osteoprotegerin/RANKL homeostasis in human periodontal ligament cells. J Periodontal Res 48(1): 22-29.

Staines, K. A.,Macrae, V. E. andFarquharson, C. 2012. The importance of the SIBLING family of proteins on skeletal mineralisation and bone remodelling. J Endocrinol 214(3): 241-255.

Stashenko, P.,Teles, R. andD'Souza, R. 1998. Periapical inflammatory responses and their modulation. Crit Rev Oral Biol Med 9(4): 498-521.

Takahashi, K.,Tanabe, K.,Ohnuki, M.,Narita, M.,Ichisaka, T.,Tomoda, K., et al. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell 131(5): 861-872.

Takahashi, K. andYamanaka, S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 126(4): 663-676.

Tziafas, D. 1995. Basic mechanisms of cytodifferentiation and dentinogenesis during dental pulp repair. Int J Dev Biol 39(1): 281-290.

Wajant, H.,Pfizenmaier, K. andScheurich, P. 2003. Tumor necrosis factor signaling. Cell Death Differ 10(1): 45-65.

Wallach, D.,Varfolomeev, E. E.,Malinin, N. L.,Goltsev, Y. V.,Kovalenko, A. V. andBoldin, M. P. 1999. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. Annu Rev Immunol 17331-367.

Walsh, L. J.,Trinchieri, G.,Waldorf, H. A.,Whitaker, D. andMurphy, G. F. 1991. Human dermal mast cells contain and release tumor necrosis factor alpha, which

induces endothelial leukocyte adhesion molecule 1. Proc Natl Acad Sci U S A 88(10): 4220-4224.

Wang, Z.,Oron, E.,Nelson, B.,Razis, S. andIvanova, N. 2012. Distinct lineage specification roles for NANOG, OCT4, and SOX2 in human embryonic stem cells. Cell Stem Cell 10(4): 440-454.

Wu, J.,Huang, G. T.,He, W.,Wang, P.,Tong, Z.,Jia, Q., et al. 2012. Basic fibroblast growth factor enhances stemness of human stem cells from the apical papilla. J Endod 38(5): 614-622.

Xu, C.,Rosler, E.,Jiang, J.,Lebkowski, J. S.,Gold, J. D.,O'Sullivan, C., et al. 2005. Basic fibroblast growth factor supports undifferentiated human embryonic stem cell growth without conditioned medium. Stem Cells 23(3): 315-323.

Yalvac, M. E.,Ramazanoglu, M.,Rizvanov, A. A.,Sahin, F.,Bayrak, O. F.,Salli, U., et al. 2010. Isolation and characterization of stem cells derived from human third molar tooth germs of young adults: implications in neo-vascularization, osteo-, adipo- and neurogenesis. The pharmacogenomics journal 10(2): 105-113.

Yang, X.,van der Kraan, P. M.,Bian, Z.,Fan, M.,Walboomers, X. F. andJansen, J. A. 2009. Mineralized tissue formation by BMP2-transfected pulp stem cells. J Dent Res 88(11): 1020-1025.

Yang, X.,Walboomers, X. F.,van den Beucken, J. J.,Bian, Z.,Fan, M. andJansen, J. A. 2009. Hard tissue formation of STRO-1-selected rat dental pulp stem cells in vivo. Tissue Eng Part A 15(2): 367-375.

Yang, X.,Zhang, S.,Pang, X. andFan, M. 2012. Pro-inflammatory cytokines induce odontogenic differentiation of dental pulp-derived stem cells. J Cell Biochem 113(2): 669-677.

Zhang, W.,Walboomers, X. F.,Shi, S.,Fan, M. andJansen, J. A. 2006. Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. Tissue engineering 12(10): 2813-2823.

Zhao, R. andDaley, G. Q. 2008. From fibroblasts to iPS cells: induced pluripotency by defined factors. J Cell Biochem 105(4): 949-955.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
เอกสารผลการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์

บันทึกข้อความ

ส่วนงาน งานบริการวิจัยและพัฒนา คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาฯ โทร. 02-2188816 โทรสาร 02-2188810
ที่ จธ. 170/2555 วันที่ 7 ธันวาคม 2555.
เรื่อง ผลการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์

เรียน รองคณบดีฝ่ายวิจัย

คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการศึกษาวิจัยในมนุษย์ ได้พิจารณาโครงการวิจัย เรื่อง "ผลของทิวเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์แอลฟาต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ และการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมและฟันแท้มนุษย์ (Effect of tumor necrosis factor alpha on cell proliferation and osteogenic differentiation of human dental pulp cells from deciduous and permanent teeth)" ผู้วิจัยหลัก ทญ. มโนวตี สารพานิช HREC-DCU 2012-074 ซึ่งผู้วิจัยได้แก้ไขและเพิ่มเติมข้อมูลตามที่คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการศึกษาวิจัยในมนุษย์มีมติอนุมัติโดยมีเงื่อนไข มาให้คณะกรรมการฯ พิจารณาอีกครั้งหนึ่งแล้ว

คณะกรรมการฯ โดยการพิจารณาของเลขานุการ เมื่อ วันที่ 4 ธันวาคม 2555 มีมติ อนุมัติโดยไม่มีเงื่อนไข โดยมีระยะเวลาการรับรองการทำวิจัยตั้งแต่ 4 ธันวาคม 2555 ถึง 4 ธันวาคม 2557 และให้ผู้วิจัยปฏิบัติดังนี้คือ

- ดำเนินการวิจัยตามขั้นตอนที่ปรากฏในเอกสารโครงการที่ได้รับการรับรองอย่างเคร่งครัด หากมีการเปลี่ยนแปลงหรือเพิ่มขั้นตอนของการวิจัยจะต้องส่งเอกสารขออนุมัติต่อคณะกรรมการฯ
- รายงานต่อคณะกรรมการฯ ทันที กรณีที่มีความผิดพลาดหรือเหตุการณ์อันไม่พึงประสงค์เกิดขึ้นในการวิจัย
- ส่งรายงานสรุปผลการดำเนินการ (จธ. 5) ภายใน 1 เดือน หลังสิ้นสุดโครงการ

ทั้งนี้ คณะกรรมการฯ จะออกเอกสารรับรองด้านจริยธรรมซึ่งลงนามกำกับโดยประธานคณะกรรมการฯ และ รองคณบดีฝ่ายวิจัย ให้แก่ผู้วิจัยต่อไป

จึงเรียนมาเพื่อโปรดดำเนินการต่อไปด้วย จักขอบคุณยิ่ง

(รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร. ปิยมาศ สำเร็จกาญจนกิจ)
กรรมการและเลขานุการ

แจ้งผลให้ผู้วิจัยทราบ

(ผศ.ทญ.ดร. กนกพร พะลัง)
รองคณบดีฝ่ายวิจัย

ภาคผนวก ข

เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับอาสาสมัครที่เข้าร่วมในการวิจัย

(Patient/Participant Information Sheet)"

1. โครงการเรื่อง ผลของทิวเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์แอลฟาต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ และการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมและฟันแท้มนุษย์

2. ชื่อผู้วิจัยหลัก ว่าที่ร้อยโทหญิง มโนวดี สารพานิช

สถาบันที่สังกัด ภาควิชาทันตกรรมสำหรับเด็ก คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แหล่งทุนวิจัย คาดว่าจะมาจากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. วัตถุประสงค์ของโครงการ เพื่อศึกษาผลของทีเอ็นเอฟแอลฟาที่มีต่อเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันของฟันน้ำนมและฟันแท้ในมนุษย์ ในแง่ของการเพิ่มจำนวนของเซลล์และการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง

4. สถานที่ดำเนินการวิจัย หน่วยปฏิบัติการวิจัยเนื้อเยื่ออนินทรีย์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. วิธีการที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการทดลองในห้องปฏิบัติการ โดยใช้เซลล์เนื้อเยื่อในฟันที่ได้จากฟันแท้และฟันน้ำนมที่ไม่มีรอยผุและรอยโรคปลายรากของผู้ที่มีสุขภาพแข็งแรง ไม่มีโรคประจำตัว สำหรับฟันแท้จะได้รับมาจากการถอนฟันแท้ตามแผนการรักษาทางทันตกรรมที่ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จำนวน 3 ซี่ จากตัวอย่างที่ไม่ใช่บุคคลเดียวกัน ส่วนฟันน้ำนมจะได้รับมาจากการถอนฟันน้ำนมตามแผนการรักษาทางทันตกรรมที่ภาควิชาทันตกรรมสำหรับเด็ก คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จำนวน 3 ซี่ จากตัวอย่างที่ไม่ใช่บุคคลเดียวกัน โดยกระบวนการต่างๆ ที่ใช้ในการทดลองไม่ก่อให้เกิดอันตรายใดๆทั้งสิ้นต่ออาสาสมัคร

6. เหตุผลที่เชิญเข้าร่วมเป็นอาสาสมัครในโครงการ

เนื่องจากการศึกษานี้จะใช้ฟันแท้และฟันน้ำนมที่ไม่มีรอยผุและไม่มีรอยโรคปลายรากซึ่งจำเป็นต้องถอนด้วยเหตุผลทางการรักษามาทำการทดลอง โดยฟันที่ได้ต้องมาจากอาสาสมัครที่มีสุขภาพแข็งแรง ไม่มีโรคประจำตัว

7. ความรับผิดชอบของอาสาสมัคร และ ระยะเวลาที่อาสาสมัครจะอยู่ในโครงการ

อาสาสมัครจะได้รับทราบข้อมูลของงานวิจัยก่อนถอนฟันตามแผนการรักษาปกติ เพื่อตัดสินใจว่าจะบริจาคฟันซี่ที่ถอนไปนั้นเพื่อนำไปใช้ในงานวิจัยหรือไม่ ดังนั้นอาสาสมัครจึงไม่ต้องมี

ความรับผิดชอบใดๆ และไม่มีระยะเวลาที่อาสาสมัครเข้าร่วมโครงการ เนื่องจากอาสาสมัครจะต้องได้รับการถอนฟันตามแผนการรักษาตามปกติ

8. ประโยชน์ของการวิจัยที่อาสาสมัครและ/หรือผู้อื่นที่อาจได้รับ

ผลการวิจัยที่ได้จะแสดงให้เห็นถึงบทบาทของทิวเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์แอลฟาต่อการซ่อมแซมเนื้อเยื่อในโพรงฟัน ในแง่ของการเพิ่มจำนวนของเซลล์ และการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมและฟันแท้มนุษย์ เพื่อนำไปสู่การพัฒนาวิธีการรักษาความมีชีวิตของฟันอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป ท่านจะไม่ได้รับประโยชน์โดยตรงในการร่วมการวิจัยครั้งนี้

9. ความเสี่ยงหรือความไม่สะดวกที่อาจจะเกิดขึ้นแก่อาสาสมัคร และในบางกรณีแก่ทารกในครรภ์หรือทารกที่ดื่มนมมารดา การวิจัยนี้ไม่ก่อให้เกิดความเสี่ยงใดๆ

10. ค่าใช้จ่ายที่อาสาสมัครจะต้องจ่าย หรืออาจจะต้องจ่าย

การเข้าร่วมงานวิจัยนี้ไม่มีค่าใช้จ่ายใดๆทั้งสิ้น

11. การชดเชยใดๆ และการรักษาที่จะจัดให้แก่อาสาสมัครในกรณีที่ได้รับอันตรายซึ่งเกี่ยวข้องกับการวิจัย

การวิจัยนี้ใช้เนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงจากฟันของอาสาสมัครที่ถอนตามแผนการรักษา โดยอาสาสมัครจะไม่ได้รับอันตรายใดๆ ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยนี้

12. การจ่ายค่าเดินทาง ค่าเสียเวลา (ถ้ามี) <u>ซึ่งต้องกำหนดไว้เป็นรายครั้ง</u> แก่อาสาสมัครที่เข้าร่วมในการวิจัย (ทั้งนี้ต้องไม่มีข้อแม้หรือเงื่อนไขใดๆ ทั้งสิ้นในการจ่ายเงิน)

ไม่มีการจ่ายค่าเดินทางหรือค่าเสียเวลา เนื่องจากเป็นการรักษาตามแผนการรักษาของอาสาสมัครเอง

13. เหตุการณ์ที่อาจจะเกิดขึ้น หรือเหตุผลซึ่งผู้วิจัยจะต้องยกเลิกการเข้าร่วมในโครงการวิจัยของอาสาสมัคร

ไม่มีเหตุการณ์ใดที่จะเกิดขึ้นกับอาสาสมัคร

14. มีการเก็บชิ้นตัวอย่างที่ได้มาจากอาสาสมัครเอาไว้ใช้ในโครงการวิจัยในอนาคตหรือไม่ เก็บจำนวนเท่าไหร่ อย่างไร และที่ไหน

.....ไม่มีการเก็บชิ้นตัวอย่างใดๆ เอาไว้ใช้ในงานวิจัยในอนาคต.....

15. การกำกับดูแลและควบคุมการดำเนินโครงการ

ผู้กำกับดูแลการวิจัย ผู้ตรวจสอบ คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรม และคณะกรรมการที่เกี่ยวข้อง สามารถเข้าไปตรวจสอบการดำเนินโครงการ รวมทั้ง ตรวจสอบบันทึกข้อมูลของ

อาสาสมัคร เพื่อเป็นการยืนยันถึงขั้นตอนในการวิจัยทางคลินิกและข้อมูลอื่นๆ โดยไม่ล่วงละเมิดเอกสิทธิ์ในการปิดบังข้อมูลของอาสาสมัคร ตามกรอบที่กฎหมายและกฎระเบียบได้อนุญาตไว้ นอกจากนี้ โดยการลงนามให้ความยินยอม อาสาสมัครหรือ ผู้แทนตามกฎหมายจะมีสิทธิตรวจสอบและมีสิทธิที่จะได้รับข้อมูลด้วยเช่นกัน

16. จริยธรรมการวิจัย

การดำเนินการโครงการวิจัยนี้ ผู้วิจัยคำนึงถึงหลักจริยธรรมการวิจัย ดังนี้

1. หลักความเคารพในบุคคล (Respect for person) โดยการให้ข้อมูลจนอาสาสมัครเข้าใจเป็นอย่างดี และตัดสินใจอย่างอิสระในการให้ความยินยอมเข้าร่วมในการวิจัย รวมทั้งการเก็บรักษาความลับของอาสาสมัคร

2. หลักการให้ประโยชน์ไม่ก่อให้เกิดอันตราย (Beneficence/Non-Maleficence) ซึ่งได้ระบุในข้อ 8 และ 9 ว่าจะมีประโยชน์หรือความเสี่ยงกับอาสาสมัครหรือไม่

3. หลักความยุติธรรม (Justice) คือมีเกณฑ์คัดเข้าและคัดออกชัดเจน มีการกระจายความเสี่ยงและผลประโยชน์อย่างเท่าเทียมกัน โดยวิธีสุ่มเข้ากลุ่มศึกษา

17. ข้อมูลที่อาจนำไปสู่การเปิดเผยตัวของอาสาสมัครจะได้รับการปกปิด ยกเว้นว่าได้รับคำยินยอมไว้โดยกฎระเบียบและกฎหมายที่เกี่ยวข้องเท่านั้น จึงจะเปิดเผยข้อมูลแก่สาธารณชนได้ ในกรณีที่ผลการวิจัยได้รับการตีพิมพ์ ชื่อและที่อยู่ของอาสาสมัครจะต้องได้รับการปกปิดอยู่เสมอ และอาสาสมัครหรือผู้แทนตามกฎหมายจะได้รับแจ้งโดยทันท่วงที ในกรณีที่มีข้อมูลใหม่ซึ่งอาจใช้ประกอบการตัดสินใจของอาสาสมัครว่าจะยังคงเข้าร่วมในโครงการวิจัยต่อไปได้หรือไม่

18. หากท่านมีข้อสงสัยต้องการสอบถามเกี่ยวกับสิทธิของท่านหรือผู้วิจัยไม่ปฏิบัติตามที่เขียนไว้ในเอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในการวิจัย ท่านสามารถติดต่อหรือร้องเรียนได้ที่ ฝ่ายวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตึกสมเด็จย่า 93 ชั้น 10 หรือที่หมายเลขโทรศัพท์ 0-2218-8816 ในเวลาราชการ

19. หากท่านต้องการยกเลิกการเข้าร่วมเป็นอาสาสมัครในโครงการนี้ ให้ท่านกรอกและส่งเอกสารขอยกเลิกมาที่ ผู้วิจัยหลัก ทันตแพทย์หญิง มโนวดี สารพานิช
ที่อยู่ ซ.สุขุมวิท49/15 ถ.สุขุมวิท เขตวัฒนา กรุงเทพ 10110.

20. อาสาสมัครสามารถติดต่อผู้วิจัยได้ตลอด 24 ชั่วโมง ที่:

ผู้วิจัยหลัก ทันตแพทย์หญิง มโนวดี สารพานิช 084-6411391

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ทันตแพทย์หญิง ดร.วรรณธิดา ศรีอาจ 02-2188906

ที่ทำงาน ภาควิชาทันตกรรมสำหรับเด็ก คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

.....

(...ว่าที่ร้อยโทหญิง มโนวดี สารพานิช...)

ผู้วิจัยหลัก

วันที่...../...../.....

ภาคผนวก ค
เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้ปกครองของอาสาสมัครเด็ก
(Patient/Participant Information Sheet)

1. โครงการเรื่อง ผลของทิวเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์แอลฟาต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ และการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมและฟันแท้มนุษย์

2. ชื่อผู้วิจัยหลัก ว่าที่ร้อยโทหญิง มโนวดี สารพานิช
สถาบันที่สังกัด คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
แหล่งทุนวิจัย คาดว่าจะเป็นบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. วัตถุประสงค์ของโครงการ
เพื่อศึกษาผลของทีเอ็นเอฟแอลฟาที่มีต่อเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันของฟันน้ำนมและฟันแท้ในมนุษย์ ในแง่ของการเพิ่มจำนวนของเซลล์และการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง

4. สถานที่ดำเนินการวิจัย หน่วยปฏิบัติการวิจัยเนื้อเยื่ออนินทรีย์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. วิธีการที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย
การศึกษานี้มี 2 กลุ่มการศึกษา กลุ่มละ 3 คน ผู้วิจัยจะขอฟันน้ำนมจากบุตรหลานของท่านคนละ 1 ซี่ นำฟันไปแยกเนื้อเยื่อ ทำการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเซลล์ เพื่อใช้ในการทดลอง

5. เหตุผลที่เชิญเข้าร่วมเป็นอาสาสมัครในโครงการ
เนื่องจากการศึกษานี้จะใช้ฟันน้ำนมที่ไม่มีรอยผุ และไม่มีรอยโรคที่ปลายรากฟันซึ่งจำเป็นต้องถอนด้วยเหตุผลทางการรักษามาทดลอง โดยฟันที่ได้ต้องมาจากอาสาสมัครที่มีสุขภาพแข็งแรง ไม่มีโรคประจำตัว

6. ความรับผิดชอบของอาสาสมัคร ระยะเวลาที่อาสาสมัครจะอยู่ในโครงการ
อาสาสมัครจะได้รับทราบข้อมูลของงานวิจัยก่อนถอนฟันตามแผนการรักษาปกติ เพื่อตัดสินใจว่าจะบริจาคฟันซี่ที่ถอนไปนั้นเพื่อนำไปใช้ในงานวิจัยหรือไม่ ดังนั้นอาสาสมัคร

จึงไม่ต้องมีความรับผิดชอบใดๆ และไม่มีระยะเวลาที่อาสาสมัครเข้าร่วมโครงการ เนื่องจากอาสาสมัครจะต้องได้รับการถอนฟันตามแผนการรักษาตามปกติ

7. ประโยชน์ของการวิจัยที่อาสาสมัครและ/หรือผู้อื่นที่อาจได้รับ (ในกรณีที่การวิจัยนี้ไม่ได้ประโยชน์แต่ประการใดทั้งสิ้นแก่อาสาสมัคร ก็สมควรที่จะต้องแจ้งให้อาสาสมัครรับทราบด้วยเช่นกัน)

ผลการวิจัยที่ได้จะแสดงให้เห็นถึงบทบาทของทิวเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์แอลฟาต่อการซ่อมแซมเนื้อเยื่อในโพรงฟัน ในแง่ของการเพิ่มจำนวนของเซลล์ และการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมและฟันแท้มนุษย์ เพื่อนำไปสู่การพัฒนาวิธีการรักษาความมีชีวิตของฟันอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป ท่านจะไม่ได้รับประโยชน์โดยตรงในการร่วมการวิจัยครั้งนี้

8. ความเสี่ยงหรือความไม่สะดวกที่อาจจะเกิดขึ้นแก่อาสาสมัครและในบางกรณีแก่ทารกในครรภ์หรือทารกที่ดื่มนมมารดา

การแยกเนื้อเยื่อ นำไปเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเซลล์และทำการทดลอง จะไม่มีผลกระทบต่อบุตรหลานของท่าน และไม่มีความเสี่ยงเพิ่มขึ้น

10. ค่าใช้จ่ายที่อาสาสมัครจะต้องจ่าย หรืออาจจะต้องจ่าย สำหรับการเข้าร่วมในการวิจัย

การเข้าร่วมในการวิจัยครั้งนี้ไม่มีค่าใช้จ่ายใดๆทั้งสิ้น

11. การชดเชยใดๆ และการรักษาที่จะจัดให้แก่อาสาสมัครในกรณีที่ได้รับอันตรายซึ่งเกี่ยวข้องกับการวิจัย

การวิจัยนี้ใช้เนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงจากฟันของอาสาสมัครที่ถอนตามแผนการรักษา โดยอาสาสมัครจะไม่ได้รับอันตรายใดๆ ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยนี้

12. การจ่ายค่าเดินทาง ค่าเสียเวลา ซึ่งต้องกำหนดไว้เป็นรายครั้งแก่อาสาสมัครที่เข้าร่วมในการวิจัย (ทั้งนี้ต้องไม่มีข้อแม้หรือเงื่อนไขใดๆ ทั้งสิ้นในการจ่ายเงิน)

ไม่มีการจ่ายค่าเดินทาง หรือค่าเสียเวลา

13. เหตุการณ์ที่อาจจะเกิดขึ้น หรือเหตุผลซึ่งผู้วิจัยจะต้องยกเลิกการเข้าร่วมในโครงการวิจัยของอาสาสมัคร

ในกรณีที่ผู้ปกครองหรือบุตรหลานของท่านปฏิเสธไม่ให้ชิ้นส่วนของฟันตั้งแต่ยังไม่เริ่มทำ หรือหลังจากทำไปแล้ว ผู้วิจัยจะหยุดทำการวิจัยทันที

14. การกำกับดูแลและควบคุมการดำเนินโครงการ

ผู้กำกับดูแลการวิจัย ผู้ตรวจสอบ คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรม และคณะกรรมการที่เกี่ยวข้องสามารถเข้าไปตรวจสอบการดำเนินโครงการ รวมทั้งตรวจสอบบันทึกข้อมูลของอาสาสมัคร เพื่อเป็นการยืนยันถึงขั้นตอนในการวิจัยทางคลินิกและข้อมูลอื่นๆ โดยไม่ล่วงละเมิดเอกสิทธิ์ในการปิดบังข้อมูลของอาสาสมัคร ตามกรอบที่กฎหมายและกฎระเบียบได้อนุญาตไว้ นอกจากนี้โดยการลงนามให้ความยินยอม อาสาสมัครหรือผู้แทนตามกฎหมายจะมีสิทธิตรวจสอบและมีสิทธิที่จะได้รับข้อมูลด้วยเช่นกัน

15. จริยธรรมการวิจัย

การดำเนินการโครงการวิจัยนี้ ผู้วิจัยคำนึงถึงหลักจริยธรรมการวิจัย ดังนี้

1. หลักความเคารพในบุคคล (Respect for person) โดยการให้ข้อมูลจนอาสาสมัครเข้าใจเป็นอย่างดีและตัดสินใจอย่างอิสระ ในการให้ความยินยอมเข้าร่วมในการวิจัย รวมทั้งการเก็บรักษาความลับของอาสาสมัคร
2. หลักการให้ประโยชน์ไม่ก่อให้เกิดอันตราย (Beneficence/Non-Maleficence) โดยระบุในข้อ 8 และ 9 ว่าจะมีประโยชน์หรือความเสี่ยงกับอาสาสมัครหรือไม่
3. หลักความยุติธรรม (Justice) คือ มีเกณฑ์คัดเข้าและคัดออกชัดเจน มีการกระจายความเสี่ยงและผลประโยชน์อย่างเท่าเทียมกัน โดยวิธีสุ่มเข้ากลุ่มศึกษา

16. ข้อมูลที่อาจนำไปสู่การเปิดเผยตัวของอาสาสมัครจะได้รับการปกปิด ยกเว้นว่าได้รับคำยินยอมไว้โดยกฎระเบียบและกฎหมายที่เกี่ยวข้องเท่านั้น จึงจะเปิดเผยข้อมูลแก่สาธารณชนได้ ในกรณีที่ผลการวิจัยได้รับการตีพิมพ์ ชื่อและที่อยู่ของอาสาสมัครจะต้องได้รับการปกปิดอยู่เสมอ และอาสาสมัครหรือผู้แทนตามกฎหมายจะได้รับแจ้งโดยทันท่วงที ในกรณีที่มีข้อมูลใหม่ ซึ่งอาจใช้ประกอบการตัดสินใจของอาสาสมัคร ว่าจะยังคงเข้าร่วมในโครงการวิจัยต่อไปได้หรือไม่

17. หากท่านมีข้อสงสัยต้องการสอบถามเกี่ยวกับสิทธิของท่าน หรือผู้วิจัยไม่ปฏิบัติตามที่เขียนไว้เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในการวิจัย ท่านสามารถติดต่อหรือร้องเรียนได้ที่ ฝ่ายวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตึกสมเด็จย่า 93 ชั้น 10 หรือที่หมายเลขโทรศัพท์ 0-22188816 ในเวลาราชการ

18. หากท่านต้องการยกเลิกการเข้าร่วมเป็นอาสาสมัครในโครงการนี้ ให้ท่านกรอกและส่งเอกสารขอยกเลิกมาที่ผู้วิจัย ทันตแพทย์หญิง มโนวดี สารพานิช
บ้านเลขที่ 269 ซ.สุขุมวิท 49/15 ถ.สุขุมวิท เขตวัฒนา กรุงเทพฯ 10110

19. อาสาสมัครสามารถติดต่อผู้วิจัยได้ตลอด 24 ชั่วโมง ที่:
ผู้วิจัย ทันตแพทย์หญิง มโนวดี สารพานิช เบอร์โทรศัพท์ 084-6411391
อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.วรรณธิดา ศรีอาจ
เบอร์โทรศัพท์ 02-218-8906
ภาควิชาทันตกรรมสำหรับเด็ก คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

.....
(ว่าที่ร้อยโทหญิงมโนวดี สารพานิช)
ผู้วิจัยหลัก
วันที่...../...../.....

ภาคผนวก ง
เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับอาสาสมัครเด็กอายุ 7-12 ปี
(Patient/Participant Information Sheet)

1. โครงการเรื่อง ผลของทิวเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์แอลฟาต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ และการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมและฟันแท้มนุษย์

2. ชื่อผู้วิจัยหลัก ว่าที่ร้อยโทหญิง มโนวดี สารพานิช
สถาบันที่สังกัด คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.วัตถุประสงค์ของโครงการ เป็นโครงการที่ศึกษาเกี่ยวกับสารชนิดหนึ่ง ชื่อว่า ทิวเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์แอลฟา ต่อคุณสมบัติการเพิ่มจำนวนของเซลล์ และการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมและฟันแท้มนุษย์ โดยเนื้อเยื่อในฟันที่ได้จะถูกนำไปเพาะเลี้ยงขยายจำนวนเซลล์และทดลองในห้องทดลอง

4. สถานที่ดำเนินการวิจัย หน่วยปฏิบัติการวิจัยเนื้อเยื่ออนินทรีย์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. วิธีการที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย

ผู้วิจัยจะขอฟันน้ำนม/ฟันแท้ จากอาสาสมัครคนละ 1 ซี่ นำไปทำการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเซลล์ เพื่อใช้ในการทดลอง ซึ่งการทดลองนี้จะใช้ฟันน้ำนม 3 ซี่ และฟันแท้ 3 ซี่ จากตัวอย่างที่ไม่ใช่บุคคลเดียวกัน

6. เหตุผลที่เชิญเข้าร่วมเป็นอาสาสมัครในโครงการ

เนื่องจากอาสาสมัครมีสุขภาพแข็งแรง ไม่มีโรคประจำตัว และมีฟันน้ำนม/ฟันแท้ที่ต้องถอนตามแผนการรักษาอยู่แล้ว ผู้วิจัยจึงขอเชิญให้เข้าร่วมโครงการวิจัยนี้

7. ความรับผิดชอบของอาสาสมัคร ระยะเวลาที่อาสาสมัครจะอยู่ในโครงการ

อาสาสมัครจะได้รับทราบข้อมูลของงานวิจัยก่อนถอนฟันตามแผนการรักษาปกติ เพื่อตัดสินใจว่าจะบริจาคฟันซี่ที่ถอนไปนั้นเพื่อนำไปใช้ในงานวิจัยหรือไม่ ดังนั้นอาสาสมัครจึงไม่ต้องมีความรับผิดชอบใดๆ และไม่มีระยะเวลาที่อาสาสมัครเข้าร่วมโครงการ เนื่องจากอาสาสมัครจะต้องได้รับการถอนฟันตามแผนการรักษาตามปกติ

8. ประโยชน์ของการวิจัยที่อาสาสมัครและ/หรือผู้อื่นที่อาจได้รับ

การวิจัยนี้อาจไม่เกิดผลประโยชน์โดยตรงต่ออาสาสมัคร แต่ผลที่ได้จะเป็นความรู้ที่จะสามารถนำไปใช้ได้ในอนาคต

9. ความเสี่ยงหรือความไม่สะดวกที่อาจจะเกิดขึ้นแก่อาสาสมัคร

การทดลองนี้จะไม่มีผลกระทบต่อตัวอาสาสมัครและไม่มีอันตรายใดๆ

10. การเข้าร่วมในการวิจัยครั้งนี้ไม่มีค่าใช้จ่ายใดๆทั้งสิ้น

11. กรณีที่ผู้ปกครองหรือตัวอาสาสมัครเอง ปฏิเสธไม่ให้ชิ้นส่วนของฟันตั้งแต่ยังไม่เริ่มทำ หรือหลังจากทำไปแล้ว ผู้วิจัยจะหยุดการวิจัยทันที

12. ผู้วิจัยจะเก็บข้อมูลเฉพาะเกี่ยวกับอาสาสมัครเป็นความลับ และจะเปิดเผยได้เฉพาะในรูปที่เป็นสรุปผลการวิจัย

13. หากท่านมีข้อสงสัย หรือผู้วิจัยไม่ปฏิบัติตามที่เขียนไว้ในเอกสารข้อมูล คำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในการวิจัย ท่านสามารถติดต่อหรือร้องเรียนได้ที่ ฝ่ายวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตึกสมเด็จย่า 93 ชั้น 10 หรือที่หมายเลขโทรศัพท์ 0-2218-8816 ในเวลาราชการ

14. ท่านสามารถยกเลิกการเข้าร่วมเป็นอาสาสมัครในโครงการนี้เมื่อใดก็ได้ โดยให้คุณพ่อ คุณแม่ หรือผู้ปกครองของอาสาสมัครและส่งเอกสารขอยกเลิกมาที่

ผู้วิจัย ว่าที่ร้อยโทหญิง มโนวดี สารพานิช

บ้านเลขที่ 269 ซ.สุขุมวิท 49/15 ถ.สุขุมวิท เขตวัฒนา กรุงเทพฯ 10110

15. อาสาสมัครสามารถติดต่อผู้วิจัยได้ตลอด 24 ชั่วโมง ที่:

ผู้วิจัย ว่าที่ร้อยโทหญิง มโนวดี สารพานิช เบอร์โทรศัพท์ 084-641-1391

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร. วรรณธิดา ศรีอาจ

เบอร์โทรศัพท์ 02-218-8906

ภาควิชาทันตกรรมสำหรับเด็ก คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

.....

(ว่าที่ร้อยโทหญิง มโนวดี สารพานิช)

ผู้วิจัยหลัก

วันที่...../...../.....

ภาคผนวก จ
เอกสารยินยอมเข้าร่วมการวิจัย (Consent Form)

การวิจัยเรื่อง ผลของทิวเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์แอลฟาต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ และการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมและฟันแท้มนุษย์

“ข้าพเจ้า (นาย, นาง, นางสาว, เด็กชาย, เด็กหญิง).....

อยู่บ้านเลขที่.....ถนน.....ตำบล/แขวง.....

อำเภอ/เขต.....จังหวัด.....รหัสไปรษณีย์.....

ก่อนที่จะลงนามในใบยินยอมให้ทำการวิจัยนี้ ข้าพเจ้าได้รับเอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับอาสาสมัครที่เข้าร่วมในการวิจัยแล้ว 1 ฉบับ รวมทั้งได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการทำวิจัย อันตรายหรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการทำวิจัยหรือจากยาที่ใช้ รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด และมีความเข้าใจดีแล้ว

ผู้วิจัยรับรองว่าจะตอบคำถามต่าง ๆ ที่ข้าพเจ้าสงสัยด้วยความเต็มใจไม่ปิดบังซ่อนเร้นจนข้าพเจ้าพอใจข้าพเจ้าเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้โดยสมัครใจ ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะบอกเลิกการเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้เมื่อใดก็ได้และการบอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัยนี้จะไม่มีผลต่อการรักษาโรคที่ข้าพเจ้าจะพึงได้รับต่อไป

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลเฉพาะเกี่ยวกับตัวข้าพเจ้าเป็นความลับ และจะเปิดเผยได้เฉพาะในรูปที่เป็นสรุปผลการวิจัย การเปิดเผยข้อมูลเกี่ยวกับตัวข้าพเจ้าต่อหน่วยงานต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกระทำได้เฉพาะกรณีจำเป็น ด้วยเหตุผลทางวิชาการเท่านั้น และผู้วิจัยรับรองว่าหากเกิดอันตรายใด ๆ จากการวิจัยดังกล่าว ข้าพเจ้าจะได้รับการรักษาพยาบาลโดยไม่คิดมูลค่า

ข้าพเจ้าได้อ่านเอกสารและข้อความข้างต้นแล้ว มีความเข้าใจดีทุกประการ และได้ลงนามในใบยินยอมนี้ด้วยความเต็มใจ

ข้าพเจ้าได้รับสำเนาเอกสารใบยินยอมที่ข้าพเจ้าลงนามและลงวันที่ และเอกสารยกเลิกการเข้าร่วมวิจัย อย่างละ 1 ฉบับ เป็นที่เรียบร้อยแล้ว

ลงนาม..... ผู้ยินยอม

(.....)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ลงนาม..... พยาน

(.....)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ลงนาม.....

ผู้วิจัยหลัก

(.....)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้าไม่สามารถอ่านหนังสือได้ แต่ผู้วิจัยได้อ่านข้อความในใบยินยอมนี้ให้แก่ข้าพเจ้าฟังจนเข้าใจดีแล้ว ข้าพเจ้าจึงลงนาม หรือประทับลายนิ้วหัวแม่มือขวาของข้าพเจ้าในใบยินยอมนี้ด้วยความเต็มใจ

ลงนาม.....ผู้ยินยอม

(.....)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ลงนาม.....พยาน

(.....)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ลงนาม.....ผู้วิจัยหลัก

(.....ว่าที่ร้อยโทหญิง มโนวดี สารพานิช.....)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ในกรณีที่ผู้ถูกทดลองยังไม่บรรลุนิติภาวะ จะต้องได้รับการยินยอมจากผู้ปกครองหรือผู้อุปการะโดยชอบด้วยกฎหมาย

ลงนาม..... ผู้ยินยอม

(.....)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ลงนาม..... พยาน

(.....)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ลงนาม..... ผู้วิจัยหลัก

(.....ว่าที่ร้อยโทหญิง มโนวดี สารพานิช.....)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ภาคผนวก ฉ

เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมการวิจัยสำหรับอาสาสมัครเด็กอายุ 7-12 ปี

(Assent Form)

หนู/ผมชื่อ (เด็กหญิง, เด็กชาย).....

อยู่บ้านเลขที่.....ถนน.....ตำบล/แขวง.....

อำเภอ/เขต.....จังหวัด.....รหัสไปรษณีย์.....

หนู/ผมได้รับเชิญให้เข้าร่วมโครงการวิจัยเรื่อง “ผลของทิวเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์แอลฟาต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ และการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมและฟันแท้มนุษย์”

ซึ่งเป็นโครงการที่ศึกษาเกี่ยวกับสารชนิดหนึ่ง ชื่อว่า ทิวเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์แอลฟาต่อคุณสมบัติการเพิ่มจำนวนของเซลล์ และการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมและฟันแท้มนุษย์ โดยเนื้อเยื่อในฟันที่ได้จะถูกนำไปเพาะเลี้ยงขยายจำนวนเซลล์และทดลองในห้องทดลอง เนื่องจากหนู/ผมมีฟันน้ำนมที่ต้องถอนตามแผนการรักษาอยู่แล้ว ผู้วิจัยจึงขอเชิญให้หนู/ผมเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ สิ่งที่ผู้วิจัยจะทำกับหนู/ผมคือ ใส่ยาชาและถอนฟันตามปกติ และเก็บฟันน้ำนมไปทดลอง โครงการนี้ไม่มีผลกระทบต่อหนู/ผม และไม่ทำให้เกิดความเสี่ยงหรืออันตรายเพิ่มขึ้น

ผู้วิจัยได้ให้หนู/ผมอ่านข้อมูลนี้อย่างละเอียดหรืออ่านข้อมูลนี้ให้หนู/ผมฟัง พร้อมกับได้ให้โอกาสหนู/ผมได้ทบทวนข้อมูลเหล่านี้กับคุณพ่อคุณแม่หรือผู้ปกครองและซักถามจนได้ข้อมูลครบถ้วนแล้ว

หนู/ผมมีสิทธิ์ที่จะเข้าร่วมโครงการ หรือจะปฏิเสธไม่เข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ก็ได้ โดยไม่มีใครบังคับ แม้ว่าผู้ปกครองหรือพ่อแม่จะให้เข้าร่วมโครงการนี้ก็ตาม และหากหนู/ผมเข้าร่วมโครงการนี้แล้วหนู/ผมก็มีสิทธิ์ที่จะบอกเลิกการเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้เมื่อใดก็ได้ ซึ่งการบอกเลิกการเข้าร่วมวิจัยนี้จะไม่มีผลต่อการศึกษาหรือการรักษาพยาบาลที่หนู/ผมจะได้รับต่อไป ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลเฉพาะเกี่ยวกับตัวหนู/ผมเป็นความลับ และจะเปิดเผยได้เฉพาะในรูปที่เป็นสรุปผลการวิจัย

หากเกิดอันตรายใด ๆ หรือผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์จากการวิจัยขึ้นกับหนู/ผม หนู/ผมจะได้รับการรักษาพยาบาลโดยไม่คิดค่าการรักษาพยาบาลใด ๆ

หนู/ผมได้อ่านหรือฟังจนเข้าใจดีแล้ว และ หนู/ผมเต็มใจเข้าร่วมโครงการนี้

(หมายเหตุ เอกสารชิ้นนี้จะไม่มีผลใดๆ หากบิดา มารดา หรือผู้ปกครองของเด็กไม่ลงนามยินยอมในเอกสารยินยอมให้เด็กเข้าร่วมโครงการวิจัย ต่างหากอีก 1 ฉบับ)

ลงนาม..... ผู้ยินยอม

(.....)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ลงนาม..... พยาน

(.....)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ลงนาม..... ผู้วิจัยหลัก

(.....ว่าที่ร้อยโทหญิง..มโนวดี สารพานิช.....)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

หนู/ผมไม่สามารถอ่านหนังสือและเขียนได้ แต่ผู้วิจัยได้อ่านข้อความในใบยินยอมนี้ให้แก่หนู/ผมฟังจนเข้าใจดีแล้ว หนู/ผมจึงลงนาม หรือประทับลายนิ้วหัวแม่มือขวาของหนู/ผมในใบยินยอมนี้ด้วยความเต็มใจ

ลงนาม.....ผู้ยินยอม

(.....)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ลงนาม.....พยาน

(.....)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ลงนาม.....ผู้วิจัยหลัก

(.....ว่าที่ร้อยโทหญิง..มโนวดี สารพานิช.....)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ภาคผนวก ช

เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมการวิจัยสำหรับผู้ปกครองของอาสาสมัครเด็ก

(Consent Form)

การวิจัยเรื่อง ผลของทิวเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์แอลฟาต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ และการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมและฟันแท้มนุษย์

ข้าพเจ้า(นาย, นาง, นางสาว)…….....

มีความสัมพันธ์เป็น.....ของ(เด็กชาย,เด็กหญิง).....

อยู่บ้านเลขที่.....ถนน.....ตำบล/แขวง.....

อำเภอ/เขต.....จังหวัด

.....รหัสไปรษณีย์.....

ก่อนที่จะลงนามในใบยินยอมให้ทำการวิจัยนี้ ข้าพเจ้าได้รับเอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับอาสาสมัครที่เข้าร่วมในการวิจัยแล้ว 1 ฉบับ รวมทั้งได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการทำวิจัย อันตรายหรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการทำวิจัยหรือจากยาที่ใช้ รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด และมีความเข้าใจดีแล้ว

ผู้วิจัยรับรองว่าจะตอบคำถามต่าง ๆ ที่ข้าพเจ้าสงสัยด้วยความเต็มใจไม่ปิดบังซ่อนเร้นจนข้าพเจ้าพอใจ

บุตรหลานของข้าพเจ้าเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้โดยสมัครใจ ข้าพเจ้าและบุตรหลานของข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะบอกเลิกการเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้เมื่อใดก็ได้และการบอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัยนี้จะไม่มีผลต่อการรักษาโรคที่บุตรหลานของข้าพเจ้าจะพึงได้รับต่อไป

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลเฉพาะเกี่ยวกับตัวบุตรหลานของข้าพเจ้าเป็นความลับ และจะเปิดเผยได้เฉพาะในรูปที่เป็นสรุปผลการวิจัย การเปิดเผยข้อมูลเกี่ยวกับตัวข้าพเจ้าต่อหน่วยงานต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกระทำได้เฉพาะกรณีจำเป็น ด้วยเหตุผลทางวิชาการเท่านั้น และผู้วิจัยรับรองว่าหากเกิดอันตรายใด ๆ จากการวิจัยดังกล่าว บุตรหลานของข้าพเจ้าจะได้รับการรักษาพยาบาลโดยไม่คิดมูลค่า

ข้าพเจ้าได้อ่านเอกสารและข้อความข้างต้นแล้ว มีความเข้าใจดีทุกประการ ข้าพเจ้ายินยอมให้บุตรหลานของข้าพเจ้าเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ และได้ลงนามในใบยินยอมนี้ด้วยความเต็มใจ

ข้าพเจ้าได้รับสำเนาเอกสารใบยินยอมที่ข้าพเจ้าลงนามและลงวันที่ และเอกสารยกเลิกการเข้าร่วมวิจัย อย่างละ 1 ฉบับ เป็นที่เรียบร้อยแล้ว

ลงนาม..... ผู้ยินยอม

(.....)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ลงนาม..... ..... พยาน

(.....)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ลงนาม..... ผู้วิจัยหลัก

(.....ว่าที่ร้อยโทหญิง..มโนวดี สารพานิช.....)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้าไม่สามารถอ่านหนังสือได้ แต่ผู้วิจัยได้อ่านข้อความในใบยินยอมนี้ให้แก่ข้าพเจ้าฟังจนเข้าใจดีแล้ว ข้าพเจ้าจึงลงนาม หรือประทับลายนิ้วหัวแม่มือขวาของข้าพเจ้าในใบยินยอมนี้ด้วยความเต็มใจ

ลงนาม.....ผู้ยินยอม

(.....)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ลงนาม.....พยาน

(.....)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ลงนาม.....ผู้วิจัยหลัก

(.....ว่าที่ร้อยโทหญิงมโนวดี สารพานิช.....)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ภาคผนวก ซ

เอกสารยกเลิกการเข้าร่วมวิจัย (Withdrawal Form)

การวิจัยเรื่อง ผลของทิวเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์แอลฟาต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ และการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมและฟันแท้มนุษย์

“ข้าพเจ้า (นาย, นาง, นางสาว, เด็กชาย, เด็กหญิง).....

อยู่บ้านเลขที่.....ถนน.....ตำบล/แขวง.....

อำเภอ/เขต.....จังหวัด.....รหัสไปรษณีย์.....

ขอยกเลิกการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ โดยมีเหตุผลในการยกเลิกการเข้าร่วมวิจัยคือ

- ❑ ย้ายภูมิลำเนา
- ❑ ไม่สะดวกในการเดินทาง
- ❑ เหตุผลอื่น.....

ลงนาม.....ผู้ยกเลิก

(.....)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

ลงนาม.....พยาน

(.....)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

ลงนาม.....ผู้วิจัยหลัก

(.....ว่าที่ร้อยโทหญิง มโนวดี สารพานิช.....)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

ที่อยู่สำหรับส่งเอกสาร ชื่อ .....ว่าที่ร้อยโทหญิง มโนวดี สารพานิช.....

บ้านเลขที่.....269.....ถนน.....สุขุมวิท.....ตำบล/แขวง.....คลองตันเหนือ.....

อำเภอ/เขต.....วัฒนา.....จังหวัด.....กรุงเทพ.....รหัสไปรษณีย์10110

ภาคผนวก ฌ
รายละเอียดการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ตารางที่ 2 การวิเคราะห์เปรียบเทียบอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ด้วยวิธีเอ็มทีทีในเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมงของกลุ่มศึกษา (เซลล์จากฟันแท้และฟันน้ำนมที่ใส่สารละลายทีเอ็นเอฟแอลฟาในความเข้มข้นต่างๆ) และกลุ่มควบคุม โดยวิธีการทดสอบการแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA)

Group Statistics

	Group	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
MTT_DPSCs_24h	Control	3	1	0	0
	TNF-α 0.1 ng/ml	3	1.0711	.04346	.02509
	TNF-α 1 ng/ml	3	1.0705	.07011	.04048
	TNF-α 10 ng/ml	3	1.1317	.05616	.03242
MTT_DPSCs_48h	Control	3	1.3372	.03067	.01771
	TNF-α 0.1 ng/ml	3	1.3454	.05236	.03023
	TNF-α 1 ng/ml	3	1.3596	.08442	.04874
	TNF-α 10 ng/ml	3	1.4417	.12179	.07031
MTT_SHEDs_24h	Control	3	1	0	0
	TNF-α 0.1 ng/ml	3	1.0280	.05902	.03407
	TNF-α 1 ng/ml	3	1.0280	.05902	.03407
	TNF-α 10 ng/ml	3	1.1437	.08035	.04639
MTT_SHEDs_48h	Control	3	1.3217	.10626	.06135
	TNF-α 0.1 ng/ml	3	1.3255	.10046	.05800
	TNF-α 1 ng/ml	3	1.3070	.11953	.06901
	TNF-α 10 ng/ml	3	1.3490	.12760	.07367

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
MTT_DPSC1d	Between Groups	.026	3	.009	3.496	.070
	Within Groups	.020	8	.002		
	Total	.046	11			

MTT_DPSC2d	Between Groups	.021	3	.007	1.080	.411
	Within Groups	.051	8	.006		
	Total	.072	11			
MTT_SHED1d	Between Groups	.037	3	.012	3.648	.064
	Within Groups	.027	8	.003		
	Total	.064	11			
MTT_SHED2d	Between Groups	.003	3	.001	.070	.974
	Within Groups	.104	8	.013		
	Total	.107	11			

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางที่ 3 การวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของอาร์เอ็นเอนำรหัสของยีนบีเอฟจีเอฟใน 1 วัน และ 7 วันของกลุ่มศึกษา (เซลล์จากฟันแท้และฟันน้ำนมที่ใส่สารละลายทีเอ็นเอฟแอลฟาในความเข้มข้นต่างๆ) และกลุ่มควบคุม โดยวิธีการทดสอบการแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA)

Group Statistics

	Group	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
*bFGF*_DPSCs_1d	Control	3	1	0	0
	TNF-α 0.1 ng/ml	3	.9752	.04420	.02552
	TNF-α 1 ng/ml	3	1.1170	.06925	.03998
	TNF-α 10 ng/ml	3	1.2942	.04611	.02662
*bFGF*_DPSCs_7d	Control	3	1	0	0
	TNF-α 0.1 ng/ml	3	.9611	.04525	.02612
	TNF-α 1 ng/ml	3	.9528	.03035	.01752
	TNF-α 10 ng/ml	3	1.0732	.09174	.05297
*bFGF*_SHEDs_1d	Control	3	1	0	0
	TNF-α 0.1 ng/ml	3	.9699	.03032	.01750
	TNF-α 1 ng/ml	3	1.0861	.11541	.06663
	TNF-α 10 ng/ml	3	1.4449	.12280	.07090
*bFGF*_SHEDs_7d	Control	3	1	0	0
	TNF-α 0.1 ng/ml	3	.9717	.12804	.07393
	TNF-α 1 ng/ml	3	1.0138	.13619	.07863
	TNF-α 10 ng/ml	3	1.2466	.23920	.13810

ANOVA

		F	Sig.
DPSC*bFGF*1d	Between Groups	28.626	.000
SHED*bFGF*1d	Between Groups	19.587	.000
DPSC*bFGF*7d	Between Groups	3.184	.085
SHED*bFGF*7d	Between Groups	2.098	.179

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable		(I) TNF dose	(J) TNFdose	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval Lower Bound	95% Confidence Interval Upper Bound
DPSC *bFGF*1d	Tukey HSD	control	0.1ng/ml	.02482	.03846	.914	-.0984	.1480
			1ng/ml	-.11697	.03846	.063	-.2401	.0062
			10ng/ml	-.29417*	.03846	.000	-.4173	-.1710
		0.1ng/ml	control	-.02482	.03846	.914	-.1480	.0984
			1ng/ml	-.14178*	.03846	.025	-.2650	-.0186
			10ng/ml	-.31899*	.03846	.000	-.4422	-.1958
		1ng/ml	control	.11697	.03846	.063	-.0062	.2401
			0.1ng/ml	.14178*	.03846	.025	.0186	.2650
			10ng/ml	-.17721*	.03846	.008	-.3004	-.0540
		10ng/ml	control	.29417*	.03846	.000	.1710	.4173
			0.1ng/ml	.31899*	.03846	.000	.1958	.4422
			1ng/ml	.17721*	.03846	.008	.0540	.3004
SHED*bFGF*1d	Tukey HSD	control	0.1ng/ml	.03013	.06990	.971	-.1937	.2540
			1ng/ml	-.08608	.06990	.626	-.3099	.1378
			10ng/ml	-.44493*	.06990	.001	-.6688	-.2211
		0.1ng/ml	control	-.03013	.06990	.971	-.2540	.1937
			1ng/ml	-.11621	.06990	.400	-.3401	.1076
			10ng/ml	-.47506*	.06990	.001	-.6989	-.2512

		1ng/ml	control	.08608	.06990	.626	-.1378	.3099
			0.1ng/ml	.11621	.06990	.400	-.1076	.3401
			10ng/ml	-.35885*	.06990	.004	-.5827	-.1350
		10ng/ml	control	.44493*	.06990	.001	.2211	.6688
			0.1ng/ml	.47506*	.06990	.001	.2512	.6989
			1ng/ml	.35885*	.06990	.004	.1350	.5827
DPSCbfgf7d	Tukey HSD	control	0.1ng/ml	.03889	.04356	.809	-.1006	.1784
			1ng/ml	.04722	.04356	.708	-.0923	.1867
			10ng/ml	-.07323	.04356	.392	-.2127	.0663
		0.1ng/ml	control	-.03889	.04356	.809	-.1784	.1006
			1ng/ml	.00833	.04356	.997	-.1312	.1478
			10ng/ml	-.11212	.04356	.121	-.2516	.0274
		1ng/ml	control	-.04722	.04356	.708	-.1867	.0923
			0.1ng/ml	-.00833	.04356	.997	-.1478	.1312
			10ng/ml	-.12045	.04356	.093	-.2599	.0190
		10ng/ml	control	.07323	.04356	.392	-.0663	.2127
			0.1ng/ml	.11212	.04356	.121	-.0274	.2516
			1ng/ml	.12045	.04356	.093	-.0190	.2599
SHED *bFGF7*d	Tukey HSD	control	0.1ng/ml	.02830	.12393	.995	-.3686	.4252
			1ng/ml	-.01379	.12393	.999	-.4107	.3831
			10ng/ml	-.24658	.12393	.268	-.6435	.1503
		0.1ng/ml	control	-.02830	.12393	.995	-.4252	.3686
			1ng/ml	-.04210	.12393	.986	-.4390	.3548
			10ng/ml	-.27489	.12393	.198	-.6718	.1220
		1ng/ml	control	.01379	.12393	.999	-.3831	.4107
			0.1ng/ml	.04210	.12393	.986	-.3548	.4390
			10ng/ml	-.23279	.12393	.308	-.6297	.1641
		10ng/ml	control	.24658	.12393	.268	-.1503	.6435
			0.1ng/ml	.27489	.12393	.198	-.1220	.6718
			1ng/ml	.23279	.12393	.308	-.1641	.6297

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางที่ 4 การวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของอาร์เอ็นเอนำรหัสของยีนซอกซ์2 ใน 1 และ 7 วัน ของกลุ่มศึกษา (เซลล์จากฟันแท้และฟันน้ำนมที่ใส่สารละลายทีเอ็นเอฟแอลฟาในความเข้มข้นต่างๆ) และกลุ่มควบคุม โดยวิธีการทดสอบการแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA)

Group Statistics

	Group	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
*SOX2*_DPSCs_1d	Control	3	1	0	0
	TNF-α 0.1 ng/ml	3	1.2484	.26157	.15102
	TNF-α 1 ng/ml	3	1.5482	.36627	.21146
	TNF-α 10 ng/ml	3	1.8948	.39301	.22691
*SOX2*_DPSCs_7d	Control	3	1	0	0
	TNF-α 0.1 ng/ml	3	1.2537	.22666	.13086
	TNF-α 1 ng/ml	3	1.4424	.30847	.17810
	TNF-α 10 ng/ml	3	1.3878	.26802	.15474
*SOX2*_SHEDs_1d	Control	3	1	0	0
	TNF-α 0.1 ng/ml	3	.9394	.24106	.13918
	TNF-α 1 ng/ml	3	.8694	.20789	.12002
	TNF-α 10 ng/ml	3	.8722	.27187	.15696
*SOX2*_SHEDs_7d	Control	3	1	0	0
	TNF-α 0.1 ng/ml	3	1.2956	.47572	.27466
	TNF-α 1 ng/ml	3	1.7696	.71167	.41088
	TNF-α 10 ng/ml	3	1.0925	.09071	.05237

ANOVA

		F	Sig.
DPSC *SOX2*_1d	Between Groups	5.016	.030
SHED *SOX2*_1d	Between Groups	.265	.849
DPSC *SOX2*_7d	Between Groups	2.139	.173
SHED *SOX2*_7d	Between Groups	1.906	.207

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable		(I) TNF dose	(J) TNF dose	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval Lower Bound	95% Confidence Interval Upper Bound
DPSC *SOX2*_1d	Tukey HSD	Control	0.1ng/ml	-.24839	.24394	.744	-1.0296	.5328
			1ng/ml	-.54817	.24394	.190	-1.3293	.2330
			10ng/ml	-.89483*	.24394	.026	-1.6760	-.1137
		0.1ng/ml	control	.24839	.24394	.744	-.5328	1.0296
			1ng/ml	-.29978	.24394	.627	-1.0809	.4814
			10ng/ml	-.64644	.24394	.109	-1.4276	.1347
		1ng/ml	control	.54817	.24394	.190	-.2330	1.3293
			0.1ng/ml	.29978	.24394	.627	-.4814	1.0809
			10ng/ml	-.34666	.24394	.522	-1.1278	.4345
		10ng/ml	control	.89483*	.24394	.026	.1137	1.6760
			0.1ng/ml	.64644	.24394	.109	-.1347	1.4276
			1ng/ml	.34666	.24394	.522	-.4345	1.1278
SHED *SOX2*_1d	Tukey HSD	Control	0.1ng/ml	.06058	.17090	.984	-.4867	.6079
			1ng/ml	.13061	.17090	.868	-.4167	.6779
			10ng/ml	.12785	.17090	.875	-.4194	.6751
		0.1ng/ml	control	-.06058	.17090	.984	-.6079	.4867
			1ng/ml	.07003	.17090	.975	-.4773	.6173
			10ng/ml	.06726	.17090	.978	-.4800	.6145
		1ng/ml	control	-.13061	.17090	.868	-.6779	.4167
			0.1ng/ml	-.07003	.17090	.975	-.6173	.4773
			10ng/ml	-.00276	.17090	1.000	-.5500	.5445
		10ng/ml	control	-.12785	.17090	.875	-.6751	.4194
			0.1ng/ml	-.06726	.17090	.978	-.6145	.4800
			1ng/ml	.00276	.17090	1.000	-.5445	.5500
DPSC *SOX2*_7d	Tukey HSD	Control	0.1ng/ml	-.25372	.19077	.571	-.8646	.3572
			1ng/ml	-.44238	.19077	.173	-1.0533	.1686

			10ng/ml	-.38781	.19077	.253	-.9987	.2231
		0.1ng/ml	control	.25372	.19077	.571	-.3572	.8646
			1ng/ml	-.18866	.19077	.760	-.7996	.4223
			10ng/ml	-.13409	.19077	.893	-.7450	.4768
		1ng/ml	control	.44238	.19077	.173	-.1686	1.0533
			0.1ng/ml	.18866	.19077	.760	-.4223	.7996
			10ng/ml	.05457	.19077	.991	-.5564	.6655
		10ng/ml	control	.38781	.19077	.253	-.2231	.9987
			0.1ng/ml	.13409	.19077	.893	-.4768	.7450
			1ng/ml	-.05457	.19077	.991	-.6655	.5564
SHED *SOX2*_7d	Tukey HSD	Control	0.1ng/ml	-.29558	.35143	.834	-1.4210	.8298
			1ng/ml	-.76956	.35143	.206	-1.8950	.3558
			10ng/ml	-.09247	.35143	.993	-1.2179	1.0329
		0.1ng/ml	control	.29558	.35143	.834	-.8298	1.4210
			1ng/ml	-.47398	.35143	.561	-1.5994	.6514
			10ng/ml	.20312	.35143	.936	-.9223	1.3285
		1ng/ml	control	.76956	.35143	.206	-.3558	1.8950
			0.1ng/ml	.47398	.35143	.561	-.6514	1.5994
			10ng/ml	.67709	.35143	.290	-.4483	1.8025
		10ng/ml	control	.09247	.35143	.993	-1.0329	1.2179
			0.1ng/ml	-.20312	.35143	.936	-1.3285	.9223
			1ng/ml	-.67709	.35143	.290	-1.8025	.4483

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางที่ 5 การวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของอาร์เอ็นเอนำรหัสของยีนดีเอสพีพีใน 7 วัน ของกลุ่มศึกษา (เซลล์จากฟันแท้และฟันน้ำนมที่ใส่สารละลายทีเอ็นเอฟแอลฟาในความเข้มข้นต่างๆ) และกลุ่มควบคุม โดยวิธีการทดสอบการแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA)

Group Statistics

	Group	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
*DSPP*_DPSCs_7d	Control	3	1	0	0
	TNF-α 0.1 ng/ml	3	1.3930	.21215	.12248
	TNF-α 1 ng/ml	3	1.6170	.23995	.13853

Group Statistics

	Group	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
*DSPP*_DPSCs_7d	Control	3	1	0	0
	TNF-α 0.1 ng/ml	3	1.3930	.21215	.12248
	TNF-α 1 ng/ml	3	1.6170	.23995	.13853
	TNF-α 10 ng/ml	3	1.5586	.07631	.04406
DSPP _SHEDs_7d	Control	3	1	0	0
	TNF-α 0.1 ng/ml	3	1.0476	.26272	.15168
	TNF-α 1 ng/ml	3	1.1362	.26714	.15423
	TNF-α 10 ng/ml	3	.4745	.24073	.13898

ANOVA

		F	Sig.
DPSC_ *DSPP* 7d	Between Groups	8.089	.007
SHED_ *DSPP* 7d	Between Groups	5.401	.025

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable		(I) TNF dose	(J) TNF dose	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval Lower Bound	95% Confidence Interval Upper Bound
DPSC_ *DSPP* 7d	Tukey HSD	Control	0.1ng/ml	-.39300	.13441	.074	-.8234	.0374
			1ng/ml	-.61702*	.13441	.008	-1.0475	-.1866
			10ng/ml	-.55856*	.13441	.014	-.9890	-.1281
		0.1ng/ml	control	.39300	.13441	.074	-.0374	.8234
			1ng/ml	-.22402	.13441	.398	-.6545	.2064
			10ng/ml	-.16556	.13441	.626	-.5960	.2649
		1ng/ml	control	.61702*	.13441	.008	.1866	1.0475
			0.1ng/ml	.22402	.13441	.398	-.2064	.6545
			10ng/ml	.05846	.13441	.971	-.3720	.4889
		10ng/ml	control	.55856*	.13441	.014	.1281	.9890

			0.1ng/ml	.16556	.13441	.626	-.2649	.5960
			1ng/ml	-.05846	.13441	.971	-.4889	.3720
SHED_ *DSPP* 7d	Tukey HSD	Control	0.1ng/ml	-.04759	.18181	.993	-.6298	.5346
			1ng/ml	-.13621	.18181	.875	-.7184	.4460
			10ng/ml	.52550	.18181	.078	-.0567	1.1077
		0.1ng/ml	control	.04759	.18181	.993	-.5346	.6298
			1ng/ml	-.08862	.18181	.960	-.6708	.4936
			10ng/ml	.57309	.18181	.054	-.0091	1.1553
		1ng/ml	control	.13621	.18181	.875	-.4460	.7184
			0.1ng/ml	.08862	.18181	.960	-.4936	.6708
			10ng/ml	.66171*	.18181	.027	.0795	1.2439
		10ng/ml	control	-.52550	.18181	.078	-1.1077	.0567
			0.1ng/ml	-.57309	.18181	.054	-1.1553	.0091
			1ng/ml	-.66171*	.18181	.027	-1.2439	-.0795

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ภาคผนวก ญ

ตารางที่ 6 การบริหารงานวิจัย

ใช้ระยะเวลาการศึกษาตั้งแต่เริ่มต้นจนเสร็จสิ้น ใช้เวลาประมาณ 15 เดือน

	ระยะเวลาดำเนินการ									
	พ.ศ.2555					**พ.ศ.2556**				
	มี.ค.-เม.ย.	พ.ค.-มิ.ย.	ก.ค.-ส.ค.	ก.ย.-ต.ค.	พ.ย.-ธ.ค.	ม.ค.	ก.พ.	มี.ค.	เม.ย.	พ.ค.-ก.ค.
1.ขั้นเตรียมการ										
-ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	←	—	—	→						
-ขอรับคำรับรองจาก คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาฯ				←	→					
-เขียนโครงร่างวิทยานิพนธ์		←	—	→						
2.เสนอโครงร่างวิทยานิพนธ์				↔						
3.ขั้นปฏิบัติงาน										
-ทดลอง					←	—	→			
-วิเคราะห์ข้อมูล							↔			
4. เขียนรายงาน								↔		
5.นำเสนอผลวิทยานิพนธ์										↔

ภาคผนวก ฏ

งบประมาณ

1. งบประมาณสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์

- อาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟีนอลเรด	3,500 บาท
- อาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่ไม่มีฟีนอลเรด	850 บาท
- ฟีทอลโบวีนซีรัม	1,300 บาท
- ยาปฏิชีวนะและยาต้านเชื้อรา	1,800 บาท
- ดีเอ็มเอสโอ	1,300 บาท
- จานเลี้ยง	
- ขนาด 35 มิลลิเมตร อันละ 9 บาท	270 บาท
- ขนาด 60 มิลลิเมตร อันละ 10 บาท	2,000 บาท
- จานเลี้ยงเซลล์แบบหลุม	
- ขนาด 24 หลุม อันละ 45 บาท	1,800 บาท
- ขนาด 12 หลุม อันละ 45 บาท	900 บาท
- ทิปใช้ครั้งเดียวทิ้งสำหรับปิเปต	
- ขนาด 10 ไมโครลิตรอันละ 0.6 บาท	600 บาท
- ขนาด 200 ไมโครลิตรอันละ 0.5 บาท	500 บาท
- ขนาด 1000 ไมโครลิตร อันละ 0.6 บาท	600 บาท

2. งบประมาณสำหรับค่าสารเคมีต่างๆ

- ทิวเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์แอลฟา 20,000 บาท

- เอ็มทีที 2,800 บาท

3. งบประมาณสำหรับการทำอาร์ที-พีซีอาร์และรีลไทม์พีซีอาร์

- สารละลายไตรซอล 9,060 บาท

- คลอโรฟอร์ม 2,800 บาท

- ไอโซโพรพานอล 3,300 บาท

- ชุดสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอ 24,100 บาท

- เอนไซม์แทคโพลีเมอเรส 2,500 บาท

- ไพร์มเมอร์ - เบสิกเอฟจีเอฟ 1,300 บาท

- ซอกซ์2 1,300 บาท

- ดีเอสพีพี 1,300 บาท

- จีเอพีดีเฮช 1,300 บาท

- อะกาโรส 3,500 บาท

- หลอดเหวี่ยง

- ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 1.3 บาท 1,300 บาท

- ขนาด 0.6 มิลลิลิตรหลอดละ 0.9 บาท 900 บาท

- หลอดพีซีอาร์ 0.2 มิลลิลิตร หลอดละ 1.5 บาท 1,500 บาท

4. งบประมาณสำหรับการจัดทำเอกสาร 2,000 บาท

รวม 94,380 บาท

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ว่าที่ร้อยโทหญิงมโนวดี สารพานิช เกิดเมื่อวันที่ 4 ธันวาคม พ.ศ. 2527 ที่กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาทันตแพทยศาสตรบัณฑิต คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อเดือนมีนาคม พ.ศ. 2552 ได้เข้ารับราชการ สังกัดกรมแพทย์ทหารบก ตำแหน่งรักษาการหัวหน้าแผนกทันตกรรม โรงพยาบาลค่ายเขตอุดมศักดิ์ จังหวัดชุมพร ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2552-2554

ปัจจุบันศึกษาต่อในหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาทันตกรรมสำหรับเด็ก คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย