การวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของเซลล์ต้นกำเนิดจากฟันน้ำนมของมนุษย์หลังผ่านการแช่เยือกแข็ง

Characterization of Cryopreserved Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth

อรอนงค์ ปานแก้ว

Onanong Parnkaew

วิทยานิพนธ์นี้สำหรับการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมชีวการแพทย์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Master of Science in Biomedical Engineering
Prince of Songkla University
2558

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของเซลล์ต้นกำเนิดจากฟันน้ำนมของมนุษย์หลังผ่านการแช่เยือกแข็ง

ผู้เขียน นางสาวอรอนงค์ ปานแก้ว

สาขาวิชา วิศวกรรมชีวการแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

……..

(รศ.ดร.ทพญ.สุทธาทิพย์ กมลมาตยากุล)

คณะกรรมการสอบ

……ประธานกรรมการ

(ผศ.ดร.ทพญ.กนกวรรณ จรูญภัทรพงษ์)

…….....กรรมการ

(ดร. สมยศ จิรสถิตสิน)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำหรับการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมชีวการแพทย์

……..……

(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ……...……..……

(รศ.ดร.ทพญ.สุทธาทิพย์ กมลมาตยากุล)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ……..……...……..

(นางสาวอรอนงค์ ปานแก้ว)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ……..……..

(นางสาวอรอนงค์ ปานแก้ว)

นักศึกษา

หัวข้อวิทยานิพนธ์ : การวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของเซลล์ต้นกำเนิดจากฟันน้ำนมของมนุษย์หลังผ่านการแช่เยือกแข็ง

ผู้เขียน : นางสาวอรอนงค์ ปานแก้ว

สาขาวิชา: วิศวกรรมชีวการแพทย์

ปีการศึกษา : 2557

บทคัดย่อ

เซลล์ต้นกำเนิดเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันน้ำนม เป็นที่ได้รับการพิจารณาแล้วว่าเป็นแหล่งเซลล์ต้นกำเนิดที่สามารถใช้ในการแพทย์ทางเลือกใหม่ เนื่องจากมีความสามารถแบ่งเซลล์ลักษณะเดิมทดแทนตัวเองได้และสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ชนิดอื่นๆได้ การศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่า เซลล์ต้นกำเนิดเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันน้ำนมที่ผ่านการแช่เยือกแข็งสามารถนำกลับมาใช้ประโยชน์เพื่อการรักษาได้ วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้ เพื่อการตรวจสอบเซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้ที่ผ่านการแช่เยือกแข็งเป็นเป็นเวลามากกว่า 5 ปี ในด้านการรวมตัวเป็นกลุ่ม การแบ่งตัวเจริญเติบโต และการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ชนิดอื่น โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันน้ำนมใหม่ เพื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ผ่านการแช่เยือกแข็ง ในด้านการแบ่งตัวเจริญเติบโต (n=5) การสร้างหน่วยโคโลนี (n=6) และการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ชนิดอื่น (n=4) จากการทดสอบพบว่าไม่พบความแตกต่างทั้งสองกลุ่มในลักษณะรูปร่างของเซลล์ การสร้างหน่วยโคโลนี และการแบ่งตัวเจริญเติบโตในวันที่ 1 แล 3 ของการเลี้ยง อย่างไรก็ตามในวันที่ 7 ของการเลี้ยง พบว่าการแบ่งตัวเจริญเติบโตในกลุ่มเซลล์เก่ามีค่าต่ำกว่ากลุ่มเซลล์ใหม่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P=0.003) นอกจากนี้ ไม่พบความแตกต่างที่มองเห็นได้ระหว่าง 2 กลุ่มของเซลล์ในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกและเซลล์สร้างก้อนไขมัน ผลจากการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าการแช่เยือกแข็งเซลล์ต้นกำเนิดเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันน้ำนม สามารถนำกลับมาใช้ประโยชน์ด้านการรักษาด้วยเซลล์ต้นกำเนิดและวิศวกรรมเนื้อเยื่อได้

คำสำคัญ: เซลล์ต้นกำเนิดเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันน้ำนมการแช่เยือกแข็ง การสร้างหน่วยโคโลนี การแบ่งตัวเจริญเติบโต การเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ชนิดอื่น

Thesis Title: Characterization of Cryopreserved Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth

Author: Miss.Onanong Parnkaew

Major Program: Biomedical Engineering

Academic year: 2014

Abstract

Introduction: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) have been considered to be a promising source for regenerative medicine due to their self-renewal capacity and multipotency ability. Several studies have indicated that cryopreserved dental pulp tissues from SHED are a retrievable and practical source for cell-based therapy. The aim of this study was to investigate the ability of SHED cryopreserved for 5-7 years in terms of clonogenicity, proliferation and multipotency ability. **Methods:** Human freshly isolated SHED (fSHED) were compared with cryopreserved SHED (cSHED) in terms of cell proliferation (n=5), colony-forming efficiency (n=6) and differentiation capacity (n=4). **Result:** There was no significant difference between fSHED and cSHED with regard to morphology or proliferation, except on day 7 that the cell proliferation was significantly lower in cSHED as compared with fSHED (P=0.003). There were also no visible differences between the 2 groups of exfoliated deciduous cells in osteogenic and adipogenic differentiations. **Conclusion:** These data suggest that cryopreserved cells from human exfoliated deciduous teeth can be retrieved to use for stem cell-based therapy and tissue engineering in regenerative medicine.

Keyword: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth, Cryopreservation, Colony forming, Cell Proliferation, Differentiation

สารบัญ

		หน้า
สารบัญ		(8)
รายการตาราง		(10)
รายการรูป		(11)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ		(12)
บทที่		
1	บทนำ	1
	ความเป็นมาและความสำคัญของ	1
	เป้าหมายของการวิจัย	4
	สมมุติฐานของการวิจัย	4
	วัตถุประสงค์ของการวิจัย	5
	ขอบเขตของการวิจัย	5
	นิยามศัพท์เฉพาะ	6
2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	7
	1. เซลล์ต้นกำเนิดและเซลล์ต้นกำเนิดบำบัด	7
	2. ชนิดของเซลล์ต้นกำเนิด	8
	3. การใช้เซลล์ต้นกำเนิดทางทันตกรรม	13
	4. แหล่งของเซลล์ต้นกำเนิดจากฟัน	14
	5. เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันน้ำนม	15
	6. การเก็บรักษาแบบแช่เยือกแข็ง	19
3	วิธีดำเนินการวิจัย	29
	1. ผู้เข้าร่วมวิจัย	29
	2. การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันน้ำนมของมนุษย์	29
	3. การแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันน้ำนมของมนุษย์	30
	4. การนำเซลล์ที่เก็บรักษาโดยการแช่เยือกแข็งมาเลี้ยงใหม่	34
	5. การวัดการสร้างหน่วยโคโลนี	34
	6. การวัดปริมาณเซลล์ด้วยเทคนิคเอ็มทีที	35
	7. การวัดความสามารถในการสร้างก้อนแร่ธาตุ	36
	8. การวัดความสามารถในการพัฒนาเป็นเซลล์ไขมัน	37

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
	9. การวิเคราะห์ข้อมูล	38
4	ผลการศึกษา	39
	1. การคัดแยกและการเพาะเลี้ยง SHED	39
	2. การเพาะเลี้ยง SHED ที่ผ่านเก็บรักษาโดยการแช่เยือกแข็ง	40
	3. การสร้างหน่วยโคโลนี	41
	4. การแบ่งตัวเจริญเติบโต	42
	5. การสร้างก้อนแร่ธาตุ	44
	6. การสร้างการพัฒนาเป็นเซลล์สร้างไขมัน	46
5	สรุปอภิปรายผลและข้อเสนอแนะ	48
	1. สรุปอภิปราย	48
	2. สรุปผลการวิจัย	51
	3. ข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยครั้งต่อไป	52
	บรรณานุกรม	53
	ภาคผนวก	65
	1. วัสดุและอุปกรณ์	66
	2. เอกสารรับรองความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมในงานวิจัย	70
	3. แบบเสนอโครงการวิจัยเพื่อการพิจารณารับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมในคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	71
	4. ใบเชิญชวน	76
	5. แบบยินยอมเข้าร่วมการศึกษา	78
	6. ใบยินยอมเก็บตัวอย่างชีวภาพเพื่อศึกษาวิจัยในอนาคต คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	80
	ประวัติย่อของผู้วิจัย	83

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	เปรียบเทียบเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อนกับเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวเต็มวัย	10
2	เซลล์ต้นกำเนิดจากตัวโตเต็มวัยในมนุษย์	11
3	การจำแนกชนิดของเซลล์ต้นกำเนิดตามคุณสมบัติ	13
4	สรุปคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันน้ำนมมนุษย์ เทคนิคการแช่เยือกแข็งและวิธีการที่ใช้เก็บรักษาฟันเพื่อธนาคารฟัน (Tooth banking methods)	23

รายการรูป

ภาพประกอบที่		หน้า
2.1	คุณสมบัติจำเพาะของเซลล์ต้นกำเนิด	8
2.2	โครงสร้างของบลาสโตซิสต์	10
2.3	แสดงตำแหน่งของเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากฟัน	16
3.1	การนำตัวอย่างฟันไปยังห้องปฏิบัติการ	30
3.2	ซี่ฟันแตกออกจากกันเพื่อทำการนำเนื้อเยื่อฟันออกมาจากโพรงประสาทฟัน	31
3.3	นำเนื้อเยื่อฟันในสารละลายเอนไซม์ไปย่อยที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	32
3.4	นำส่วนตะกอนไปเพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงขนาด 25 ตารางเซนติเมตร	33
	เติมอาหารเลี้ยงเซลล์	35
4.1	ลักษณะรูปร่างของ fSHED	39
4.2	ลักษณะรูปร่างของ cSHED	40
4.3	เซลล์ถูกย้อมด้วยสี toluidine blue	41
4.4	แผนภูมิแท่งค่าเฉลี่ยจำนวนการสร้างหน่วยโคโลนีระหว่างเซลล์	42
	กลุ่มที่ผ่านการแช่เยือกแข็ง (cSHED) กับเซลล์กลุ่มที่คัดแยกใหม่ (fSHED)	
4.5	การเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่วัดด้วยเทคนิคเอ็มทีที (MTT assay) ของเซลล์	43
	เนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันน้ำนมของกลุ่มเซลล์ที่ผ่านการแช่เยือกแข็ง (cSHED)	
	และเซลล์ที่คัดแยกใหม่ (fSHED	
4.6	ผลการทดสอบในการสร้างก้อนแร่ธาตุ (mineralized nodules)	45
4.7	ค่าการวัดการดูดกลืนแสงในเชิงปริมาณ (Quantification of extracted alizarin red S	46
	ของเซลล์ 3 กลุ่มที่ผ่านการย้อมด้วยสี Alizarin red S ณ วันที่ 21 ของการเลี้ยง	
4.8	ความสามารถในการพัฒนาเป็นเซลล์สร้างไขมันของเซลล์ต้นกำเนิดจาก	47
	เนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันน้ำนม	

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ลักษณะปากแหว่งเพดานโหว่ เป็นความผิดปกติที่สามารถ มองเห็นได้อย่างชัดเจนบริเวณใบหน้าและเป็นความผิดปกติแต่กำเนิดที่พบได้บ่อย (1, 2) ซึ่งความผิดปกติดังกล่าวเริ่มในระยะพัฒนาการของช่องปากและใบหน้าในสัปดาห์ที่ 4-12 ของการตั้งครรภ์ ลักษณะความผิดปกตินี้นอกจากจะทำให้เกิดความ ไม่สวยงามแล้ว ยังส่งผลต่อการทำงานของอวัยวะอื่นด้วย เช่น การพูด การได้ยิน การกลืน การบดเคี้ยวอาหาร และอาจเกิด ภาวะติดเชื้อได้ ปัจจัยที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะปากแหว่งเพดานโหว่ที่สำคัญ มี 2 ประการ (3) คือ ปัจจัยทางด้านพันธุกรรม และ ปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับการตั้งครรภ์ของมารดา โดยปัจจัยในเรื่องของสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วง 4 – 12 สัปดาห์แรกของการตั้งครรภ์ ได้แก่ ภาวะทุพโภชนาการของมารดา การได้รับสารเคมีที่เป็นพิษ การได้รับรังสี การดื่มแอลกอฮอล์ การสูบบุหรี่ หรือการติดเชื้อในขณะตั้งครรภ์ ล้วนมีส่วนสำคัญ ที่ทำให้เกิดภาวะปากแหว่งเพดานโหว่ได้ นอกจากนี้ในการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าอุบัติการณ์การเกิดภาวะปากแหว่งเพดานโหว่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยมีประมาณ 2.5 รายต่อเด็กแรกเกิด 1,000 ราย ซึ่งเป็นอัตราที่อยู่ในกลุ่มอุบัติการณ์ที่สูงที่สุดในโลก และทำให้สามารถประมาณการณ์ได้ว่าเด็กแรกเกิดที่มีภาวะปากแหว่งเพดานโหว่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือจะมีอัตราสูงถึงประมาณ 800 รายต่อปีหรือทั่วประเทศประมาณปีละกว่า 2,000 ราย (4) สำหรับการรักษาปฐมภูมินั้นคือการรักษาด้วยเครื่องมือจัดสันเหงือกทารก การเย็บปิดปากแหว่งเพดานโหว่ และการผ่าตัดปลูกกระดูกบริเวณสันเหงือก ตามลำดับ ขั้นตอนการผ่าตัดปลูกกระดูกบริเวณสันเหงือกนั้นต้องใช้กระดูกจากบริเวณสะโพกของผู้ป่วย (autologous bone graft) เพื่อกระตุ้นให้กระดูกข้างรอยแยกสร้างเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast)โดยกระดูกที่ปลูกจะทำหน้าที่เป็นโครงให้เซลล์เหล่านี้เจริญเติบโตและเกิดเมทริกซ์เพื่อการสร้างกระดูก (bone matrix) โดยอาศัยอาหารที่ผ่านมาทางเส้นเลือดที่มาหล่อเลี้ยงบริเวณที่ทำการปลูกถ่าย ทำให้มีการสร้างกระดูกใหม่ทดแทนส่วนที่ละลายไปของกระดูกที่นำมาปลูกถ่าย (5) ซึ่งวัตถุประสงค์ในการปลูกถ่ายกระดูกเบ้าฟันสามารถสรุปได้ ดังนี้ (5-7)

1. เพื่อสร้างกระดูกตรงรอยแยกทำให้เกิดการเชื่อมต่อเป็นชิ้นเดียวกันของสันเหงือก

2. เพื่อสร้างความแข็งแรงและคงความกว้างของส่วนโค้งด้านหน้าขากรรไกรบน

3. เพื่อปิดช่องเปิดติดต่อระหว่างช่องปากและจมูก (oronasal fistula) ที่เหลืออยู่

4. เพื่อสร้างกระดูกรองรับฟันเขี้ยวบนหรือฟันตัดบนซี่ข้างให้สามารถขึ้นได้เองตามธรรมชาติ (spontaneous eruption)

5. เพื่อสร้างกระดูกรองรับฟันที่อยู่ใกล้รอยแยก ให้ฟันมีตำแหน่งและการเอียงตัวปรกติได้

6. เพื่อลดความจำเป็นในการใส่ฟันปลอมในรายที่สามารถปิดช่องว่างโดยเคลื่อนฟันเข้าสู่ตำแหน่งรอยแยกเดิมได้ หรือในรายที่ไม่สามารถปิดช่องว่างดังกล่าวได้ การปลูกกระดูกจะช่วยสร้างกระดูกรองรับการใส่ฟันปลอมให้มีขนาดและรูปร่างที่สวยงาม ทั้งนี้ รวมถึงการเตรียมกระดูกเพื่อใส่รากฟันเทียม

7. เพื่อช่วยเพิ่มปริมาณเหงือกยึด (keratinized gingiva) จากการขึ้นของฟัน ทำให้อวัยวะปริทันต์บริเวณรอยแยกเดิมสมบูรณ์และแข็งแรงขึ้น

8. เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการพูดที่ต้องอาศัยฟันหน้าช่วยในการออกเสียง

9. เพื่อช่วยให้ผู้ป่วยมีสุขภาพช่องปากที่ดีขึ้น เนื่องจากฟันสามารถขึ้นได้ในตำแหน่งปรกติ ทำให้ดูแลทำความสะอาดง่ายขึ้น

10. เพื่อเสริมสร้างกระดูกรองรับฐานจมูกและริมฝีปาก ทำให้ใบหน้าสมดุล และได้ความสวยงามภายหลังการรักษา

อย่างไรก็ตาม ผู้ป่วยจะได้รับการผ่าตัดสองแห่งไปพร้อมๆ กัน คือ บริเวณสันเหงือกภายในช่องปากและที่บริเวณสะโพก กระดูกจากสะโพกจะถูกนำมาปลูกตรงช่องว่างบริเวณสันเหงือกและเย็บปิดสนิท ทำให้ผู้ป่วยต้องเจ็บตัวมากขึ้น เสียเลือดจากการผ่าตัดมากขึ้น กระดูกทดแทนที่ได้มีปริมาณที่น้อยมักจะไม่พอเพียงกับความจำเป็นต่อการใช้งาน ใช้เวลาการผ่าตัดนานมากขึ้น สูญเสียค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้น และเกิดการติดเชื้อบริเวณที่ปลูกถ่ายกระดูก (8) ดังนั้นจึงมีความพยายามที่จะทดแทนโดยใช้กระดูกจากแหล่งอื่น กระดูกสังเคราะห์ หรือการรักษาโดยใช้เซลล์ต้นกำเนิดร่วมกับโครงร่างทางชีวภาพ เพื่อปิดกระดูกบริเวณสันเหงือก

ฟันเป็นอวัยวะหนึ่งที่สามารถพบเซลล์ต้นกำเนิด โดยสามารถพบได้ในเนื้อเยื่อโพรงประสาทแท้ (Dental pulp) เอ็นยึดปริทันต์ (Periodontal ligament) เนื้อเยื่อส่วนปลายราก (Periapical tissues) เป็นต้น ในปี ค.ศ. 2003 Miura และคณะ (9)ได้ประสบความสำเร็จในการค้นพบ

เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันน้ำนมของมนุษย์ (Stem cell from human exfoliated deciduous teeth: SHED) จากการศึกษาพบว่า มีความสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว และสามารถเปลี่ยนไปเป็นเซลล์จำเพาะชนิดอื่นๆได้หลายชนิด ได้แก่ เซลล์ประสาท (neural cells) เซลล์ไขมัน (adipocytes) และ เซลล์สร้างเนื้อฟัน (odontoblast) เมื่อเปรียบเทียบเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก (Bone Marrow Stem Cells: BMSCs) หรือ เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันแท้ (Dental Pulp Stem Cells: DPSCs) พบว่า SHED มีความสามารถในการแบ่งตัวเจริญเติบโต (proliferation) ได้สูงกว่า นอกจากนั้นยังพบว่า SHED ยังมีคุณสมบัติสามารถสร้างกระดูกขึ้นใหม่ (bone formation) สร้างเนื้อฟัน (dentine) และมีการแสดงออกของเครื่องหมายเซลล์ประสาท (neural markers) เมื่อเพาะเลี้ยงในเนื้อสมองของหนูทดลอง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก SHED มีลักษณะเป็นเซลล์ที่ immature มากกว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวเต็มวัย (Adult Stem Cells) ชนิดอื่น (10) ซึ่งจากการศึกษานี้ทำให้เกิดแนวความคิดที่จะนำ SHED มาเป็นแหล่งของเซลล์ต้นกำเนิดที่ใช้ในการรักษาทางคลินิกสำหรับการรักษาโรคด้วยเซลล์ต้นกำเนิด (Stem Cell Therapies) ทั้งการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดโดยใช้เซลล์ของตนเอง (autologous stem cell transplantation) และ วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (tissue engineering) ให้กับผู้ป่วยในอนาคต (11) เช่น ผู้ป่วยปากแหว่งเพดานโหว่ เป็นต้น

ปัจจุบันเทคโนโลยีการเก็บรักษาเซลล์ต้นกำเนิดที่นิยมใช้กันมากคือ การเก็บรักษาแบบแช่เยือกแข็ง (cryopreservation) ซึ่งเป็นการเก็บภายใต้อุณหภูมิต่ำกว่าศูนย์องศาเซลเซียส โดยทั่วไปจะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส (12) เป็นการเก็บรักษาในสภาพที่อุณหภูมิต่ำทำให้การแบ่งเซลล์และขบวนการเมตทาบอลึซึม (metabolism) ต่าง ๆ ภายในเซลล์หยุดการทำงาน (13) ตัวอย่างเช่น ในปี 1949 Polge และคณะ (14) ได้รายงานความสำเร็จ ของการเก็บรักษาเซลล์อสุจิด้วยกลีเซอรอล ในปี 1953 Jackson และคณะ (15)ได้ทำการผสมเทียมจากเซลล์อสุจิที่แช่แข็งได้สำเร็จเป็นครั้งแรก จากนั้นก็มีความก้าวหน้าเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในปี 1985 Rall และคณะ (16) ได้ทำการเก็บแช่แข็งตัวอ่อนหนูเมาส์ที่ -196 องศาเซลเซียส และในปี 1999 Kuleshova และคณะ(17) ประสบผลสำเร็จในวิธีการเก็บรักษาเซลล์ไข่ (oocytes) หลังจากนั้นวิธีการเก็บรักษาเซลล์และเนื้อเยื่อได้มีการพัฒนาที่ดีขึ้นจนถึงปัจจุบัน จนในที่สุดเป็นวิธีการที่ยอมรับและเชื่อถือได้สำหรับการจัดเก็บรักษาเซลล์ต้นกำเนิด (18)

ในปี 2005 Seo และคณะได้รายงานผลสำเร็จจากการศึกษาคุณสมบัติจากเซลล์ต้นกำเนิดจากเอ็นยึดปริทันต์ที่ผ่านกระบวนการแช่แข็งเป็นเวลา 3-6 เดือน (19) เช่นเดียวกับ Ma และคณะ (20) ที่พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันน้ำนมของมนุษย์ ยังคงคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดไว้ แม้ผ่านการแช่แข็งเป็นระยะเวลานาน 2-3 ปี อย่างไรก็ตามปัญหาที่พบในการรักษาผู้ป่วยปากแหว่งเพดานโหว่คือ ระยะเวลาในการเก็บอาจจะนานถึง 5-7 ปี เพราะต้องเก็บรักษา

ไว้จนผู้ป่วยมีอายุประมาณ 9-12 ปี เมื่อถึงเวลาที่ฟันเขี้ยวแท้งอกจะต้องอาศัยกระดูกที่ปลูกถ่ายเข้าไปเพื่อช่วยให้งอกสู่ช่องปากได้ ดังนั้นเพื่อให้สอดคล้องกับช่วงอายุของเด็กปากแหว่งเพดานโหว่ที่มารับการรักษาด้วยการผ่าตัดปิดกระดูกบริเวณสันเหงือก ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะนำเซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟันน้ำนมของมนุษย์ที่ผ่านการแช่เก็บรักษามาแล้วประมาณ 5-7 ปี มาตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดที่ผ่านการแช่เก็บรักษาในระยะยาวโดยนำกลับมาเพาะเลี้ยงใหม่ (cell recovery) ในห้องปฏิบัติการ เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดว่ามีแนวโน้มที่จะพัฒนาไปใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (tissue engineering) เพื่อปิดกระดูกบริเวณสันเหงือกให้ผู้ป่วยเด็กปากแหว่งเพดานโหว่ได้หรือไม่

เป้าหมายของการวิจัย

เพื่อทดสอบความสามารถในการรวมตัวเป็นกลุ่ม (clonogenic capacity) ความสามารถในการแบ่งตัว (proliferation) ความสามารถในการเปลี่ยนไปเป็นเซลล์อื่นได้หลายชนิด (multilineage differentiation) และความสามารถสร้างก้อนแร่ธาตุ (mineralization nodule) ของเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันน้ำนมของมนุษย์ที่ผ่านการเก็บรักษาโดยการแช่เยือกแข็งในระยะยาว 5-7 ปี ในห้องปฏิบัติการ

สมมุติฐานของการวิจัย

เซลล์ต้นกำเนิดจากฟันน้ำนมของมนุษย์ที่ผ่านการเก็บรักษาโดยการแช่เยือกแข็งระยะยาว 5-7 ปี ในห้องปฏิบัติการ มีความสามารถในการรวมตัวเป็นกลุ่ม ความสามารถในการแบ่งตัว ความสามารถในการพัฒนาเป็นเซลล์ชนิดอื่นๆได้หลายชนิด และความสามารถในการสร้างก้อนแร่ธาตุได้ และไม่พบความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ทำการคัดแยกใหม่

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เปรียบเทียบคุณสมบัติระหว่างเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันน้ำนมของมนุษย์ที่ผ่านการแช่เยือกแข็งและเซลล์ที่คัดแยกใหม่ในด้านต่างๆ ได้แก่ การรวมตัวเป็นกลุ่ม การแบ่งตัวเจริญเติบโต และการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ชนิดอื่น ได้แก่ เซลล์กระดูก และเซลล์ไขมัน

ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาในห้องปฏิบัติการ (in vitro) ในภาชนะเพาะเลี้ยง ซึ่งผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

กลุ่มตัวอย่างเป็นผู้ป่วยที่จำเป็นจะต้องได้รับการถอนฟันน้ำนมที่ไม่มีรอยผุหรืออุดที่ฟันแท้กำลังจะงอกขึ้นมาแทน เพื่อการรักษาตามปกติ เลือกเก็บได้ทั้งฟันตัด ฟันเขี้ยว และฟันกราม ที่โรงพยาบาลทันตกรรม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ในช่วงเวลาที่ดำเนินการวิจัย โดยเกณฑ์การคัดเข้าคือ เด็กที่มีสุขภาพแข็งแรง ไม่มีโรคประจำตัว และเกณฑ์การคัดออกคือ เด็กที่มีโรคประจำตัว หรือเด็กพิเศษ

กลุ่มทดลอง คือ เซลล์ต้นกำเนิดจากฟันน้ำนมที่ผ่านการเก็บรักษา โดยผ่านการแช่เยือกแข็ง 5-7 ปี กลุ่มควบคุมคือ เซลล์ต้นกำเนิดจากฟันน้ำนมที่คัดแยกใหม่

นิยามศัพท์เฉพาะ

เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันน้ำนมของมนุษย์ (Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth) การแช่เยือกแข็ง (cryopreservation) การสร้างหน่วยโคโลนี (Colony-forming unit assay) การแบ่งตัวเจริญเติบโต (Proliferation) การเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ชนิดอื่น (Differentiation)

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. เซลล์ต้นกำเนิดและเซลล์ต้นกำเนิดบำบัด

เซลล์ต้นกำเนิด หรือ สเต็มเซลล์ หมายถึงเซลล์อ่อนที่ยังเจริญเติบโตไม่เต็มที่ สามารถพบได้ได้จากเซลล์อวัยวะของร่างกายหลายตำแหน่ง เซลล์ต้นกำเนิดมีคุณสมบัติพิเศษ 3 ประการ (21, 22) ดังนี้

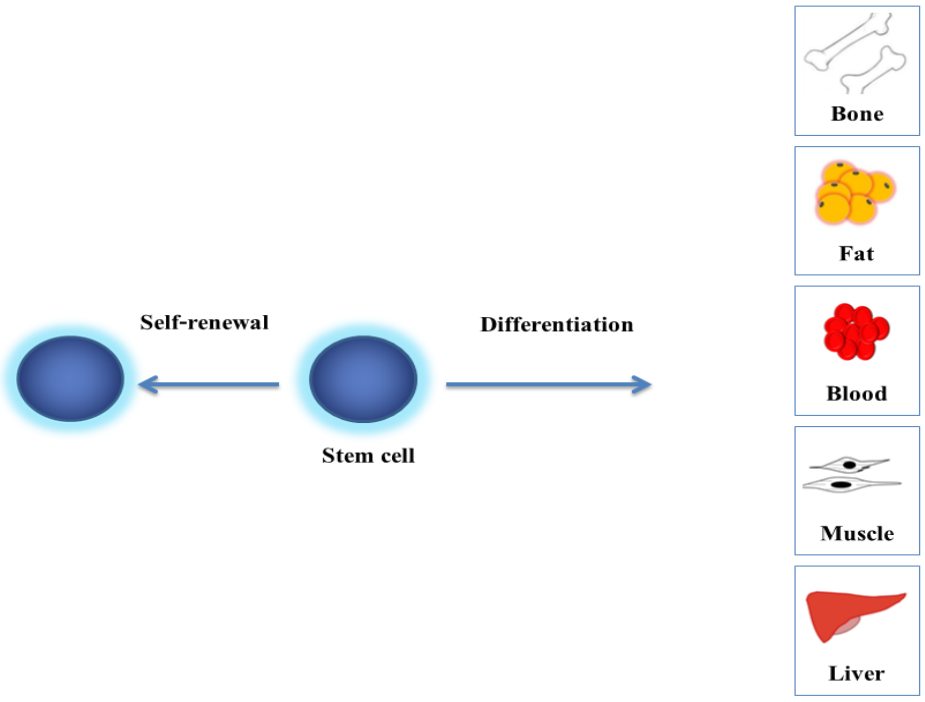
1.เซลล์ต้นกำเนิดเป็นเซลล์ที่ไม่ได้ทำหน้าที่เฉพาะเจาะจง (undifferentiated cell)

2.เซลล์ต้นกำเนิดสามารถเปลี่ยนแปลงและพัฒนาเพื่อไปทำหน้าที่ต่างๆ (differentiation)

3.เซลล์ต้นกำเนิดเป็นเซลล์ที่สามารถแบ่งเซลล์ลักษณะเดิมทดแทนตัวเองได้ (self-renewal) ดังแสดงในภาพ 2.1

เซลล์ต้นกำเนิดถูกค้นพบครั้งแรกในไขกระดูก เมื่อปี ค.ศ.1960 คือนักวิจัยชาวแคนาดา Ernest McCulloch และ James E.Till (23) และในปี ค.ศ.1970 Freidenstien และคณะพบเซลล์ต้นกำเนิดชนิด Clonogenic fibroblast precursor cells (CFU-F) จากไขกระดูก ที่สามารถพัฒนาเป็นกลุ่มของเซลล์กระดูกและกระดูกอ่อน (24)

จากคุณสมบัติพิเศษของเซลล์ต้นกำเนิด ทำให้นักวิทยาศาสตร์คิดค้นหาวิธีนำเซลล์ต้นกำเนิดไปใช้ประโยชน์ เช่น การนำเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก เพื่อใช้ในการปลูกถ่ายไขกระดูก (bone marrow transplantation) อาจถือเป็นการรักษาโดยใช้เซลล์ต้นกำเนิดอย่างแรกที่ใช้ในทางการแพทย์แผนปัจจุบัน (6) ซึ่งอาจแบ่งได้เป็น 2 กรณี คือ การรักษาโดยใช้เซลล์ไขกระดูกของตัวเอง และการใช้เซลล์ไขกระดูกของผู้อื่น ในการรักษาโรคโดยใช้เซลล์ไขกระดูกจากผู้อื่นจำเป็นต้องมีการตรวจหาความเข้ากันได้ (25) ซึ่งมีโอกาสเพียง 1:50,000 เพื่อป้องกันการเกิดการต่อต้านไขกระดูก (graft rejection) และภาวะ graft versus host disease (GvHD)



ภาพ 2.1 คุณสมบัติจำเพาะของเซลล์ต้นกำเนิด

2. ชนิดของเซลล์ต้นกำเนิด

ในปัจจุบันสามารถแบ่งชนิดของเซลล์ต้นกำเนิดได้ตามแหล่งที่มาและคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดตามรายละเอียดดังนี้

2.1 ชนิดของเซลล์ต้นกำเนิดแยกตามแหล่งที่มา

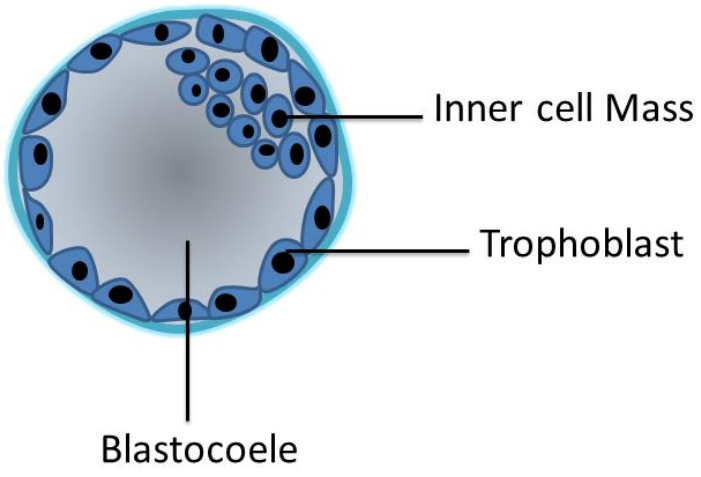
2.1.1 เซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อน (Embryonic Stem Cells: ES) เซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้ได้จากเซลล์ไข่ผสมกับเซลล์อสุจิได้ 5-7 วัน ระยะนี้เรียกว่า “บลาสโตซิสต์” ซึ่งตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์นี้จะประกอบไปด้วยเซลล์ 2 ชนิด คือ เซลล์ trophoblast และเซลล์ inner cell mass พบบริเวณผนังด้านในของบลาสโตซิสต์ ดังแสดงในภาพ 2.2 ซึ่งเซลล์ inner cell mass นี้มีความสามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์จำเพาะเนื้อเยื่อหรือเจริญไปเป็นอวัยวะได้ทุกชนิดในร่างกายหรือที่เรียกว่า “uncommitted cells” เช่น หัวใจ ตับ ปอด เม็ดเลือด เป็นต้น จากการศึกษาเกี่ยวกับเซลล์ต้น

กำเนิดพบว่าสามารถแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อนของหนู (26, 27) แยกเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อนของลิง (28) ไปจนถึงสามารถแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อนของมนุษย์ได้ในที่สุด (29) ด้วยคุณสมบัติที่เด่นชัดของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้จึงเป็นที่สนใจในการนำมาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์

2.1.2 เซลล์ต้นกำเนิดจากตัวเต็มวัย (Adult Stem Cells) เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากร่างกายสิ่งที่มีชีวิตที่เจริญวัยเต็มที่แล้ว (30, 31) พบได้ในเนื้อเยื่อหรืออวัยวะต่างๆในหลายตำแหน่งของร่างกาย เช่น รก สายสะดือ ไขกระดูก เนื้อเยื่อโพรงประสาทฟัน ตับ ไต ผิวหนัง สมอง เป็นต้น ดังแสดงในตาราง 1 เซลล์ต้นกำเนิดกลุ่มนี้ต่างจากเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อนในด้านความสามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์จำเพาะของเนื้อเยื่อหรืออวัยวะได้เฉพาะในสายวงศ์ของตนเองเท่านั้น ไม่มีมีปัญหาด้านจริยธรรมเมื่อเทียบกับเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อน ดังแสดงในตาราง 2 และโดยธรรมชาติแล้วเซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้มีหน้าที่หลักในการรักษา ทดแทน และซ่อมแซมเนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่มีเซลล์ต้นกำเนิดนั้นอยู่ให้มีการทำงานได้ตามปกติ อาจเรียกเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวเต็มวัย ที่มีการศึกษากันอย่างแพร่หลายว่า เซลล์ต้นกำเนิดมีเซ็นไคมอล (Mesenchymal stem cells: MSC) โดยพบว่าเซลล์สามารถเคลื่อนไปยังแหล่งที่มีการอักเสบ และสร้างสารชีวภาพที่ช่วยซ่อมแซมเนื้อเยื่อ ต้านการอักเสบ และปรับสมดุลภูมิต้านทานของร่างกาย (32, 33) นอกจากนี้ได้มีการศึกษาถึงคุณสมบัติของ MSC ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในการรักษาและป้องกันโรคในกลุ่มภูมิต้านทานต่อตนเอง (autoimmune disease) (34, 35) ตัวอย่างเช่น การใช้ MSC เพื่อป้องกันการเกิดภาวะ GvHD และลดการเกิด graft rejection ในผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไขกระดูก (36, 37)โรครูมาตอยด์ Crohn’s Disease และใช้แทน anti-interleukin 2 receptor ในคนที่รับการปลูกถ่ายไต (38) เป็นต้น

ตาราง 1 เปรียบเทียบเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อนกับเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวเต็มวัย (39)

เซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อน	เซลล์ต้นกำเนิดจากตัวเต็มวัย
มีปัญหาด้านจริยธรรม	ไม่มีมีปัญหาด้านจริยธรรม
พบในระยะตัวอ่อน blastocyst	พบได้บางส่วนของอวัยวะในร่างกาย
สามารถใช้งานกับผู้ป่วยได้ทันที	ต้องตรวจหมู่เลือด เม็ดเลือดขาว เนื้อเยื่อต้องเข้ากับผู้ป่วยได้
มีศักยภาพให้การแปรไปเป็นเซลล์เป้าหมายที่ต้องการได้สูง	มีศักยภาพให้การแปรไปเป็นเซลล์เป้าหมายที่ต้องการได้ต่ำกว่า



ภาพ 2.2 โครงสร้างของบลาสโตซิสต์

ตาราง 2 เซลล์ต้นกำเนิดจากตัวโตเต็มวัยในมนุษย์ (40)

Adult stem cell	Location (Source)	Cell or tissue produced
Hematopoietic Stem Cells	Bone marrow, peripheral blood stem cells	Blood, endothelial, hepatic(oval) and muscle cells
Mesenchymal Stem Cells	Bone marrow, peripheral blood stem cells	Bone, cartilage, tendon,adipose, muscle, marrow stroma and neural cells
Neural stem cells	Ependymal cell, astrocytes (subventricular zone), of the central nervous system	Neurone, astrocyte, oligodendrocyte
Hepatic stem cells	In or near the terminal bile ductules (canals of Hering)	Oval cells that subsequently generate hepatocytes and ductular cells
Pancreatic stem cells	Intraislet, nestin-positive cells, oval cells, duct cells	Beta cells
Skeletal-muscle stem cells	Muscle fibers	Skeletal muscle fibers
Stem cells of the skin (keratinocyte)	Basal layer of the epidermis, bulge zone of the hair follicles	Epidermis, hair follicles
Epithelial stem cells of lung	Tracheal basal and mucus secreting cells, Clara cells, alveolar type II pneumocyte	Mucus and ciliated cells, type I and II pneumocytes
Stem cells of the intestinal epithelium	Epithelial cells located around the base of each crypt	Paneth’s brush-border enterocytes, mucus-secreting goblet cells, enteroendocrine

2.2 ชนิดของเซลล์ต้นกำเนิดแยกตามคุณสมบัติ

2.2.1 Totipotent stem cells เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากการแบ่งตัวของไข่ผสมกับอสุจิระยะบลาสโตเมียร์ ประมาณวันที่ 2 เซลล์ชนิดนี้ที่สามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์จำเพาะทุกชนิดในร่างกาย สามารถเจริญไปเป็นเซลล์ตัวอ่อนทั้งตัว เซลล์ของรกและเซลล์สายสะดือ (41, 42) เซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้สามารถพบได้จากตัวอ่อนระยะ zygote

2.2.2 Pluripotent stem cells เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากการผสมระหว่างไข่กับเซลล์อสุจิมีการแบ่งตัวในระยะบลาสโตซิสต์ ประมาณ 5 วัน เซลล์ชนิดนี้สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ได้เกือบทุกชนิด (21, 43) แต่ไม่สามารถเป็นเนื้อเยื่อ extra embryonic (รกและสายสะดือ) ได้ จึงไม่สามารถพัฒนาเป็นสิ่งมีชีวิตตัวใหม่ได้ เซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้พบในเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน (Embryonic Stem Cells) และเซลล์ต้นกำเนิดที่มีการปรับแต่งยีน (induced pluripotent stem cells: iPSc)

2.2.3 Multipotent stem cells เป็นเซลล์ที่สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเนื้อเยื่อเฉพาะอย่างที่อยู่ในสายสกุลเดียวกัน สามารถพบได้ในเนื้อเยื่อทุกส่วนของร่างกายที่เจริญเต็มวัยแล้ว ดังแสดงในตาราง 3 เช่น เซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด และเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคมอล (Mesenchymal Stem Cells)

ส่วน Unipotency stem cell (progenitor cell) เป็นเซลล์ที่สามารถแบ่งตัวเป็นเซลล์จำเพาะได้ 2 เซลล์ พบได้ในเซลล์ผิวหนัง มีคุณสมบัติคล้ายกับเซลล์ต้นกำเนิดชนิด multipotent แต่ยังขาดความสามารถในการแบ่งเซลล์ลักษณะเดิมทดแทนตัวเองได้ (self-renewal) (44)

ในปี ค.ศ.2006 Yamanaka และคณะได้ทำการวิจัยเปลี่ยน Adult stem cells ให้กลายเป็น embryonic stem cell โดยการทำ nuclear programming เป็นการใส่ยีนที่สร้างโปรตีนจำเพาะต่อ ES cells ซึ่งได้แก่ Oct4, Sox2 และ klf4 เข้าไปพร้อมๆกัน และได้ตั้งชื่อเซลล์ชนิดนี้ว่า induced Pluripotent Stem Cells (iPSc) (45)

ตาราง 3 การจำแนกชนิดของเซลล์ต้นกำเนิดตามคุณสมบัติ (39)

แหล่งที่มา (Sources)	ศักยภาพ (Potentials)	ชนิดของเซลล์ (Type of cell)
ตัวอ่อน (zygote)	Totipotent	Fertilized egg
บลาสโตซิสต์ (blastocyst)	Pluripotent	Embryonic stemcell
ตัวเต็มวัย (adult)	Multipotent	Adult stem cell
อวัยวะ (Organ)	Limit potent	Pogenitor cell

3. การใช้เซลล์ต้นกำเนิดทางทันตกรรม (46)

ปัจจุบันมีงานวิจัยที่ใช้เซลล์ทางทันตกรรม ดังนี้

3.1 วิศวกรรมเนื้อเยื่อเพื่อสร้างอวัยวะในช่องปากและใบหน้า (Organ tissue engineering)

เพื่อแก้ปัญหาความวิการ ผิดรูปหรือการสูญเสียการทำหน้าที่ของอวัยวะบริเวณช่องปากและใบหน้าอันเกิดจากการติดเชื้อ การประสบอุบัติเหตุ ความพิการแต่กำเนิด และโรคมะเร็ง การผ่าตัดโดยใช้เนื้อเยื่อของผู้ป่วยเองมักพบปัญหาปริมาณเนื้อเยื่อไม่เพียงพอและมีความเสี่ยงสูงจากการผ่าตัด จึงเกิดความคิดค้นสร้างเนื้อเยื่อทดแทนโดยใช้กระบวนการวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ซึ่งประกอบด้วยองค์ ประกอบหลักสำคัญคือ เซลล์ต้นกำเนิด (stem cells) โครงร่างยึดเซลล์ (scaffold) และ signaling molecules เช่น การสร้างข้อต่อขากรรไกร (mandibular condyle reconstruction)

3.2 วิศวกรรมเนื้อเยื่อเพื่อสร้างฟันทั้งซี่ (tooth organogenesis) (47-50)

3.3 วิศวกรรมการสร้างเสริมอวัยวะบางส่วนหรือเพื่อทดแทนบางส่วน (tissue engineering)

ตัวอย่างงานวิจัยทางด้านนี้ ได้แก่ การสร้าง Periodontal complex ซึ่งประกอบด้วย cementum, periodontal ligament (51) และส่วนของกระดูกเบ้าฟัน (alveolar bone) (52) การปลูก

กระดูกในช่องปาก (53) การปลูกเนื้อเยื่ออ่อนในช่องปาก (54) และการสร้าง dentin/pulp tissue (55) เป็นต้น

3.4 การซ่อมแซมเนื้อเยื่อของฟัน (dental tissue regenerative therapy)

ตัวอย่างทางวิจัยด้านนี้ ได้แก่ การทำ dental pulp regeneration (56) dentine regeneration (57), periodontal ligament regeneration (55) ซึ่งใช้วิธีการนำเซลล์ต้นกำเนิดใส่ในโพรงประสาทฟัน เพื่อหวังผลให้เซลล์ต้นกำเนิดเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ต่างๆที่ประกอบเป็นเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟัน

3.5 การนำเซลล์ต้นกำเนิดมาใช้เสริมประสิทธิภาพของรากเทียม โดยการนำเซลล์ต้นกำเนิดมาเคลือบบนผิวรากเทียม (58)

4. แหล่งของเซลล์ต้นกำเนิดจากฟัน

เซลล์ต้นกำเนิดที่สามารถพบได้จากฟัน มี 5 ชนิดดังนี้ (46) ดังแสดงในภาพ 2.3

4.1 เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันแท้ (Dental Pulp Stem Cells; DPSCs)

ในปี 1985 Yamamura และคณะ ได้รายงานว่าสามารถพบและแยกเซลล์จากเนื้อเยื่อฟันแท้ (59) และในปี 1991 Caplan ได้พิสูจน์แล้วว่าเซลล์ชนิดนี้ความสามารถเปลี่ยนไปเป็นเซลล์กระดูก (osteogenic) และเซลล์กระดูกอ่อน (chondrogenic) ในห้องปฏิบัติการได้ (60) ในปี 2000 Gronthos และคณะได้รายงานความสำเร็จในการแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันแท้ ซึ่งมีความสามารถในการสร้างเนื้อฟัน (dentin-pulp-like complex) และเมื่อนำ DPSCs ปลูกถ่ายในหนูทดลองที่กดภูมิคุ้มกัน (immunocompromised mice) พบว่ามีสร้าง dentin like structure ที่มี odontoblast-like cells ล้อมรอบอยู่ การศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงความสามารถของ DPSCs ในการสร้าง dentin/pulp-comdlex ที่มีการจัดเรียงตัวคล้ายฟันปกติที่พบ (61) โดยเซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้มักได้จากฟันคุดหรือฟันกรามน้อยที่จำเป็นต้องถอนเพื่อประโยชน์ในการจัดฟัน

4.2 เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันน้ำนม (Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth; SHED)

เซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้ถูกค้นพบโดย Miura และคณะ ในปี 2003 โดยการแยกส่วนของเนื้อเยื่อที่เหลือในฟันน้ำนม (9) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า SHED สามารถเจริญเติบโตได้เร็ว

กว่าเมื่อเทียบกับ DPSCs หรือ BM-MSCs (62) และสามารถเจริญไปเป็นเซลล์ชนิดอื่นได้หลายชนิด เช่น เซลล์ประสาท (63) เซลล์กระดูก (64) และ เซลล์สร้างฟัน (65) เซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้สามารถพบได้ในฟันน้ำนมที่หลุดเองตามธรรมชาติ

4.3 เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อปริทันต์ (Periodontal Ligament Stem Cells; PDLSCs)

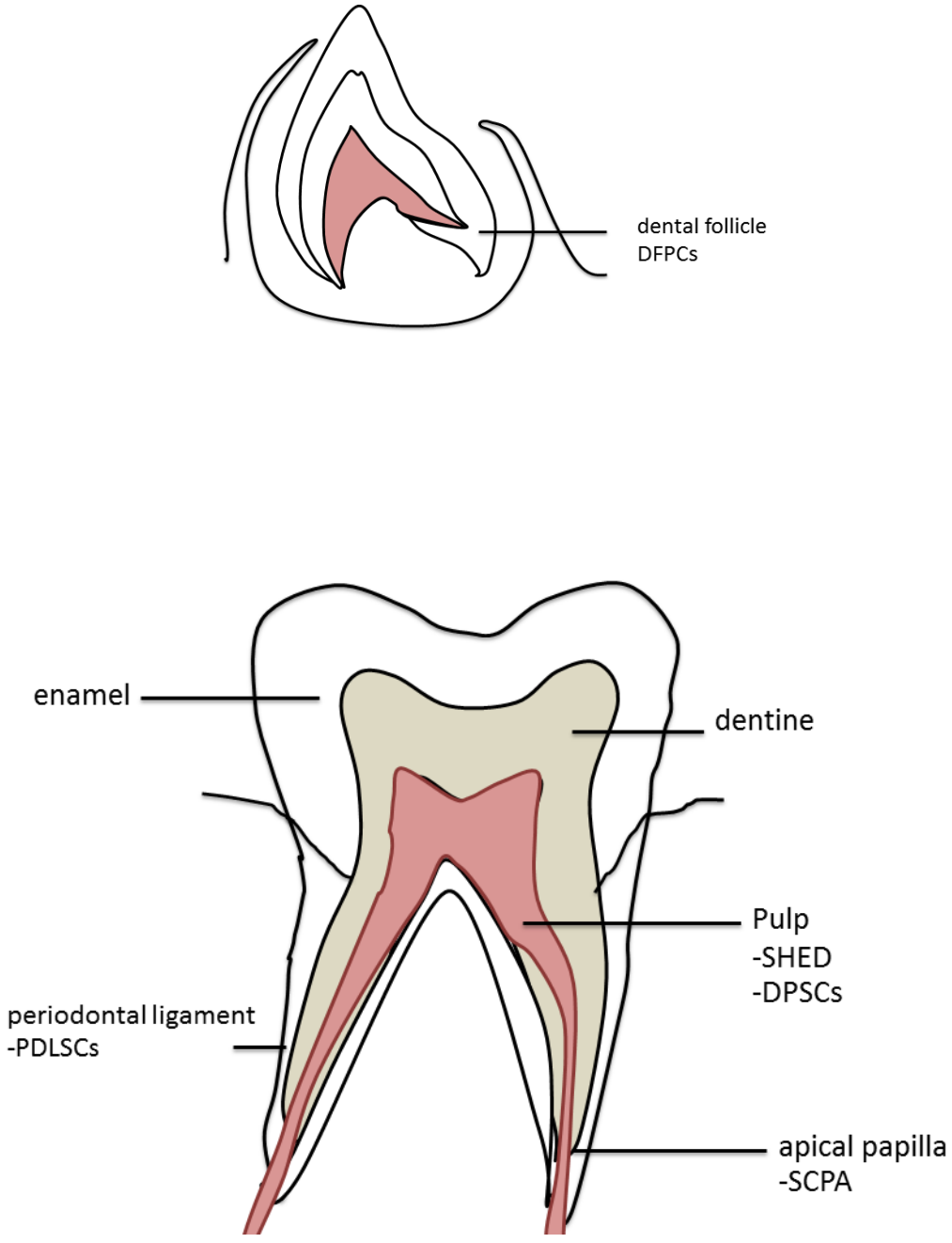
เซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้อยู่ในบริเวณของเอ็นยึดปริทันต์ จัดเป็นแหล่งเซลล์ต้นกำเนิดที่มีความเชื่อมั่นในการนำมาใช้สร้างเนื้อเยื่อปริทันต์มาก (66) ศักยภาพของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ไขมัน เซลล์กระดูก และเซลล์กระดูกอ่อนได้ นอกจากนี้ยังสามารถเปลี่ยนไปเป็นเซลล์คล้ายเซลล์เคลือบรากฟัน (cementoblast-like cells) และสร้างเนื้อเยื่อคล้ายเคลือบรากฟัน/เอ็นยึดปริทันต์ (cementum/periodontal ligament-like tissue) เป็นต้น (67)

4.4 เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อส่วนปลายราก (Stem Cells from Apical Papilla; SCAP)

เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อส่วนปลายรากค้นพบโดย Sonoyama และคณะ (51) เซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้มีคุณสมบัติเป็น mesenchymal stem cell มีการรายงานพบว่าสามารถแบ่งตัวเจริญเติบโตได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับ DPSCs และ BM-MSCs ในด้านความสามารถในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ชนิดอื่น เซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้สามารถเปลี่ยนไปเป็น เซลล์ไขมัน, เซลล์กระดูก และเซลล์กระดูกอ่อนได้ (68)

4.5 เซลล์ต้นกำเนิดจากถุงหุ้มฟัน (Dental Follicle Stem Cells; DFSCs)

ในปี 2005 และ 2007 ได้มีการค้นพบและระบุเซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้ว่าเป็น mesenchymal progenitor และถูกเรียกว่า “dental follicle precursor cells” (DFPCs) (69, 70) คุณลักษณะจำเพาะของ DFPCs คล้ายกับเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (bone marrow stem cells) สามารถแผ่ยึดเกาะ (adherent) และสร้างหน่วยโคโลนีได้ (colony-forming unit) มีความเชื่อว่า DFPCs ประกอบไปด้วยเซลล์ตั้งต้น (precursor) ของเซลล์เคลือบรากฟัน เนื้อเยื่อยึดปริทันต์ และเซลล์กระดูก เซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้สามารถเจริญไปเป็นเซลล์กระดูก เซลล์ไขมัน เซลล์เคลือบรากฟัน และเซลล์กระดูกอ่อนได้ (71)



ภาพ 2.3 แสดงตำแหน่งของเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากฟัน

5. เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันน้ำนมของมนุษย์

ฟันน้ำนมเป็นอวัยวะหนึ่งที่สามารถพบเซลล์ต้นกำเนิดชนิดเซลล์ต้นกำเนิดเจริญเต็มวัย (Adult Stem Cells) ในปี 2003 Muiura และคณะได้ประสบความสำเร็จในการค้นพบและแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากฟันน้ำนม ที่หลุดตามธรรมชาติของเด็กอายุ 7-8 ปี โดยได้นำเอาส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟัน (dental pulp) ไปคัดแยกและเพาะเลี้ยงได้สำเร็จ ทั้งยังศึกษาคุณสมบัติจำเพาะของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้ และได้ตั้งชื่อเรียกว่า Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth (SHED)

เนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันน้ำนม มาจาก cranial neural crest (CNC) ที่เจริญมาจากเอกโตมีเซนโคม์ (ectomesenchyme) ของสันระบบประสาท (neural crest) เซลล์ neural crest เป็น multipotent cell (72) ซึ่งการเคลื่อนตัวของเซลล์ทำให้เซลล์แบ่งออกเป็นกลุ่มในบริเวณเฉพาะ เช่น CNC, trunk neural crest, vagal-sacral neural crest และ cardiac neural crest cells ในระยะของการพัฒนากะโหลกศีรษะและใบหน้า เซลล์ในกลุ่ม CNC จะมีการเคลื่อนตัว เพื่อสร้างส่วนที่จะเจริญเป็นใบหน้า มีการสร้างส่วนยื่น (process) ต่างๆ การเติบโตของมีโซเดอม (mesoderm) การพัฒนาหน่อฟัน (tooth bud) โครงสร้างของหน่อฟันในส่วนที่เรียกว่า dental follicle จะประกอบไปด้วย progenitor cell หลายชนิด ซึ่งมีบทบาทเปลี่ยนเซลล์ไปเป็นฟันทั้งซี่ รวมถึง เซลล์กระดูกอ่อน เนื้อฟัน และเนื้อเยื่อยึดปริทันต์

คุณสมบัติจำเพาะของเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันน้ำนมของมนุษย์ จากการศึกษาที่ผ่านมา (73) พบว่า SHED มีลักษณะรูปร่างไม่แตกต่างจากเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อน มีลักษณะเป็นกระสวย คล้ายไฟโบรบลาสต์ มีความสามารถในการยึดเกาะของเซลล์และมีความสามารถในการเจริญเติบโตได้สูง ดังแสดงในตาราง 3

SHED มีความสามารถในการแบ่งตัวได้สูงเมื่อเทียบกับเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันแท้ และเซลล์ต้นกำเนิดจากกระดูกไขสันหลัง อาจเป็นเพราะ SHED มีความเป็น immature สูง (62, 74-78) นอกจากนี้ SHED มีการแสดงออกของ mesenchymal markers เช่น CD105 (endrogrin), CD90, CD146 และ CD44 (cell adhesion receptor) การแสดงออกหลายปัจจัยที่ช่วยในการเจริญเติบโตและการสร้างฟัน (growth factor) เช่น Fibroblast growth factor; FGF, Transforms growth factor beta; TGF-β, CT-GT, NGF และ Bone morphogenic protein; BMP ซึ่งปัจจัยเหล่านี้มีความเกี่ยวข้องในการแบ่งตัวเจริญเติบโต และสำคัญมากในการสร้าง extracellular matrix (ECM) แต่ SHED ไม่มีการแสดงออก hematopoietic markers เช่น CD14, CD45, CD34

lymphocyte และ leucocyte antigens เป็นต้น (62, 63, 74-76, 78-81) นอกจากนี้ Kerkis และคณะ (10)ได้ทำการศึกษาแยก SHED โดยเรียกว่า immature DPSCs (IDPSCs) พบว่า IDPSCs มีการแสดงออกของ Embryonic markers เช่น Oct4, Nanog, stagespecific embryonic antigens (SSEA-3, SSEA-4) และ tumor recognition antigens (TRA-1-60 , TRA-1-81)

จากหลายการศึกษาแสดงให้เห็นว่า SHED มีคุณสมบัติในการเปลี่ยนไปเป็นเซลล์ชนิดอื่นๆได้ทั้งในห้องปฏิบัติการและในสัตว์ทดลอง ในปี 2008 Gotlieb และคณะ (82) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากฟันน้ำนมลงในแบบจำลองฟันจำนวน 105 ซี่ ที่มีการเตรียมโพรงคลองฟันด้วยการใช้วิธีทางเอนโดดอนต์ร่วมกับการใช้โครงร่าง (scaffold) หลายชนิด พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้ยังคงสามารถมีชีวิตและแบ่งตัวเจริญเติบโต ยึดเกาะกับผนังของผิวคลองฟันได้เป็นอย่างดีและในปีเดียวกัน การทดลองของ Corderio และคณะ (83) โดยเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันน้ำนมในโครงร่าง Poly-L-Lactic acid scaffold (PLLA) แล้วนำส่วนผสมของเซลล์กับโครงร่าง ใส่ในชิ้นส่วนของฟันตามธรรมชาติที่ตัดเป็นแผ่นบางๆ ขนาด 1 มิลลิเมตร นำมาปลูกเลี้ยงใต้ผิวหนังของหนูทดลอง พบว่าเกิดการสร้างเนื้อเยื่อที่มีลักษณะคล้ายเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันตามธรรมชาติ ซึ่งเนื้อเยื่อที่เกิดขึ้นใหม่นี้มีลักษณะคล้ายกับเซลล์สร้างเนื้อฟัน (odontoblast) ที่เปลี่ยนแปลงมาจาก SHED อีกทั้งยังพบเซลล์ลักษณะคล้ายเซลล์หลอดเลือดอีกด้วย

ในปี 2009 Zheng และคณะ (84) ได้ทำการศึกษาโดยใช้ SHED เลี้ยงในโครงร่าง β-TCP นำไปปลูกฝังบริเวณขากรรไกรล่างของสุกร พบว่าเกิดการงอกของกระดูกใหม่เป็นผลที่น่าพอใจ ในสัปดาห์ที่ 24 และแสดงให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ในการศึกษาการฟื้นฟูกระดูกในสัตว์ทดลองที่มีขนาดใหญ่ จึงเกิดข้อเสนอโดย Arora และคณะ เพื่อสร้างธนาคารเซลล์ต้นกำเนิดจาก SHED เพื่อใช้งานในอนาคตของผู้บริจาค (85) จนมีหลายการศึกษาที่ได้รับการตีพิมพ์ออกมาเกี่ยวกับธนาคารเซลล์ต้นกำเนิดนี้ (86, 87) และการศึกษาของ Nakamura และคณะ ทำให้เกิดเชื่อมั่นว่า SHED มีจุดเด่นกว่าเซลล์ต้นกำเนิดชนิด BM-MSCs และ DPSCs ในด้านความสามารถแบ่งตัวเจริญเติบโตได้สูงกว่า ด้วยคุณลักษณะนี้ทำให้มีการสร้าง FGF2 และ TGF-β2 ที่สูงขึ้นด้วย จึงเป็นที่มาของการนำเสนอให้เป็นตัวแทนของเซลล์ต้นกำเนิดที่ดีที่สุดในการนำไปใช้งานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อและการแพทย์ทางเลือกใหม่ (62) และในปี 2010 ได้มีผลงานตีพิมพ์การประยุกต์ใช้ในสัตว์ทดลองเป็นครั้งแรกของ SHED ในการรักษาโรคพาร์กินสันและผลเบื้องต้นเป็นที่น่าพอใจมาก (88)

ตาราง 3 สรุปคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันน้ำนมมนุษย์ (86)

Properties	SHED
Location	Exfoliated Deciduous Tooth Pulp
Proliferation rate	High
Heterogeneity	Yes
Multipotentiality	Odontoblast, Osteoblast, Chondrocyte, Myocyte, Neurocyte, Adipocyte, iPS
Tissue repair	Bone regeneration, Neuro regeneration, Tubular dentin

6. การเก็บรักษาแบบแช่เยือกแข็ง

การเก็บรักษาแบบแช่เยือกแข็ง (cryopreservation) ซึ่งเป็นการเก็บภายใต้ความเย็นอุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียสถึง -196 องศาเซลเซียส การเก็บรักษาในสภาพที่อุณหภูมิต่ำทำให้การแบ่งเซลล์และขบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) ต่าง ๆ ภายในเซลล์หยุดการทำงาน (13) การเก็บรักษาแบบแช่เยือกแข็ง มีบทบาทสำคัญมากด้านการแพทย์ในงานระบบการสืบพันธุ์ในการเก็บรักษาเซลล์และเนื้อเยื่อ ตัวอย่างเช่น ในปี 1949 Polge และคณะ (14) ได้ประสบความสำเร็จในการเก็บรักษาเซลล์อสุจิในกลีเซอรอลซึ่งเป็นสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งจากความเย็น (cryoprotectant) และในปี 1953 สามารถทำการผสมเทียมจากน้ำเชื้อที่ผ่านการแช่แข็งได้สำเร็จเป็นครั้งแรก (15) ความก้าวหน้าของการเก็บรักษาได้รับผลดียิ่งขึ้นในปี 1999 Kuleshova และคณะประสบความสำเร็จในการเก็บรักษาเซลล์ไข่ (Oocyte) ของมนุษย์ (89) ในที่สุดวิธีการเก็บรักษาเซลล์และเนื้อเยื่อมีการพัฒนาที่ดี จนท้ายที่สุดเป็นวิธีการที่ยอมรับและเชื่อถือได้สำหรับการจัดเก็บรักษาเซลล์ต้นกำเนิด (90)

6.1 หลักการแช่เยือกแข็ง

น้ำเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเซลล์ในการทำหน้าที่ขนส่งสารทั้งภายในและภายนอกเซลล์ เมื่อทำการแช่แข็งน้ำจะเกิดการแยกตัวออกจากสารละลายกลายเป็นเกล็ดน้ำแข็ง ฉะนั้น การแช่เยือกแข็งเซลล์ทำให้เกิดเกล็ดน้ำแข็งทั้งภายในและภายนอกเซลล์ ส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ จึงจำเป็นที่ต้องทำให้เซลล์สูญเสียน้ำภายในบางส่วน เพื่อลดการเกิดผลึกน้ำแข็งในระหว่างการลดอุณหภูมิลง ซึ่งป้องกันโดยใส่สารชนิดหนึ่งเพื่อช่วยป้องกันไม่ให้เกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ ที่เรียกว่า ไครโอโพรเทกแทนต์ (cryoprotectant)

การตรวจสอบการรอดชีวิตของเซลล์มักทำไปพร้อมๆกับการแช่เยือกแข็ง ซึ่งเซลล์ส่วนใหญ่จะรอดชีวิตได้โดยที่ทำการลดอุณหภูมิลงอย่างช้าๆ คือการลดอุณหภูมิลงทีละน้อย เพราะเซลล์ส่วนใหญ่จะตายในกรณีที่แช่เยือกแข็งโดยลดอุณหภูมิลงทันที นอกจากนี้การเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์มีผลต่ออิเล็กโทรไลท์ (electrolyte) ของน้ำภายในเซลล์มีความเข้มข้นมากขึ้น การเติมสาร cryoprotectant จะช่วยให้อิเล็กโทรไลท์เป็นกลางและลดการแข็งตัวของน้ำภายในเซลล์จึงช่วยให้มีน้ำเหลืออยู่บ้าง (residual water) ซึ่งจะทำให้เซลล์รอดชีวิตมากขึ้น (91)

6.2 วิธีการแช่เยือกแข็ง (92)

ปัจจุบันการแช่เยือกแข็งเนื้อเยื่อหรือเซลล์มี 2 วิธี ดังนี้

6.2.1 การแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิช้า (conventional slow freezing) วิธีนี้เป็นการนำเซลล์บรรจุในน้ำยาที่มีสารป้องกันการแช่แข็งแล้ว ใส่หลอดบรรจุเซลล์แล้ววางลงในตู้แช่แข็งที่ปรับอุณหภูมิแช่แข็งตามโปรแกรมที่กำหนด โดยใช้คอมพิวเตอร์ช่วยควบคุม (Computerized Programmable Freezer) อาจลดระดับอุณหภูมิลง 2-3 ขั้นตอน เช่น ขั้นตอนที่ 1 ระหว่าง 22 องศาเซลเซียส ถึง 4 องศาเซลเซียส ขั้นตอนต่อมาลดอุณหภูมิลงจาก 4 องศาเซลเซียส ถึง -30 องศาเซลเซียส ขั้นตอนสุดท้ายลดอุณหภูมิจาก -30 องศาเซลเซียส ไปจนถึง -140 องศาเซลเซียส ก่อนเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส เป็นลำดับสุดท้าย ซึ่งวิธีการนี้ มีข้อเสียที่เครื่องลดอุณหภูมิที่ต้องตั้งโปรแกรมนี้ มีราคาแพง และมีหลายขั้นตอนในการแช่แข็ง (93)

การศึกษาก่อนหน้านี้ (94-97) ได้รายงานการนำสนามแม่เหล็ก (magnetic field) มาใช้ในกระบวนการแช่แข็งเซลล์ต้นกำเนิดทางทันตกรรม เพื่อเก็บรักษาเซลล์และเนื้อเยื่อให้อยู่ในสถานะโครงสร้างเหมือนเดิมและที่สำคัญเพื่อป้องกันการก่อตัวของน้ำแข็งภายในเซลล์ จึงได้มีการพัฒนาการแช่แข็งขึ้นใหม่โดยใช้สนามแม่เหล็กที่เรียกว่า "Cells Alive System " (CAS) ซึ่งวิธีการนี้ได้ถูกนำไปใช้ใช้อุตสาหกรรมการแช่แข็งอาหาร ผลความสำเร็จที่ได้คือสามารถรักษารสชาติและความสดใหม่ของอาหารได้ (94) ด้วยหลักการสั่นสะเทือนของสนามแม่เหล็กช่วยยับยั้งการรวมกลุ่ม

ของโมเลกุลน้ำในระหว่างขั้นตอนการแช่แข็ง ทำให้ไม่เกิดน้ำแข็งภายในเซลล์ (98)

นอกจากนี้ ในปี 2000 Aleksandrov และคณะ (99) พบว่า ระดับสนามแม่เหล็กที่มากกว่า 0.5 T มีผลต่อการก่อตัวเป็นน้ำแข็งในน้ำกลั่นให้เกิดภาวะสมดุลในการแช่แข็งที่อุณหภูมิที่ 0 องศาเซลเซียส และการศึกษาล่าสุดพบว่า การใช้สนามแม่เหล็กไฟฟ้า (static magnetic fields: SMFs) ร่วมกับขั้นตอนการแช่เยือกแข็งเซลล์ ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพความแข็งแรงและเสถียรภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ได้ (97, 100)

6.2.2 การแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิเร็ว (vitrification) เป็นวิธีการลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็ว ประกอบกับการใช้สารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งที่มีความเข้มข้นสูงแต่ไม่มีการเกิดผลึกน้ำแข็งในเซลล์ซึ่งสัมผัสกับสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งนานเกินไปซึ่งจะเป็นพิษต่อเซลล์ (101) เนื่องจากสารที่ใช้แช่แข็งมีความเข้มข้นสูง ประกอบกับอุณหภูมิที่ลดลงอย่างรวดเร็วเพราะจุ่มลงในไนโตรเจนเหลวจะทำให้สารป้องกันมีความหนืดมากและเย็นจัดจนเกิดสภาวะคล้ายแก้วได้ นักวิจัยจึงเกิดความคิดค้นหาวิธีที่เพิ่มอัตราความการแช่แข็งให้เร็วขึ้น และลดการใช้สารป้องกันให้น้อยที่สุด ด้วยการใช้อุปกรณ์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการแช่เยือกแข็งให้ดีขึ้น ได้แก่ วิธี Etectron microscope (EM) grid vitrification, Open pulled straw (OPS) vitrification และ Cryoloop vitrification (CLV) เป็นต้น วิธีการแช่เยือกแข็งนี้นิยมใช้เก็บรักษาตัวอ่อน หรือเซลล์ไข่ (92)

6.3 ประเภทของสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง (102)

สารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง (Cryoprotectant) มีหลายชนิดที่นิยมใช้เป็นส่วนผสมสำหรับการแช่เยือกแข็งเซลล์ ได้แก่ ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulfoxide, DMSO) และกลีเซอรอล (glycerol) สารเคมีเหล่านี้จำเป็นอย่างยิ่งต่อการมีชีวิตของเซลล์ สามารถจำแนกออกเป็น 3 ประเภท

6.3.1 สารที่สามารถซึมผ่านเข้าเซลล์ได้ (permeating cryoprotectants) สารกลุ่มนี้สามารถเข้าไปแทนน้ำในเซลล์ เพื่อช่วยลดการเปลี่ยนแปลงเซลล์ได้ทันทีและช่วยป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็ง ได้แก่ กลีเซอรอล (MW 92.1) ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ (MW 78.13) และสารกลุ่มแอลกอฮอล์ เช่น เมธานอล (MW 32.04) และ โพรเพนไดออล (MW 76.l)

6.3.2 สารที่ไม่สามารถซึมผ่านเข้าเซลล์ได้ มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (low molecular weight non permeating cryoprotectants) สารกลุ่มนี้ทำหน้าที่ร่วมกับสารกลุ่มที่สามารถซึมผ่านเข้าเซลล์ได้ ช่วยดึงน้ำออกจากเซลล์ให้เร็วขึ้น ได้แก่ น้ำตาลชนิดต่างๆ เช่น ซูโครส (MW 342.3) กลูโคส (MW 181.1) ทรีฮาโลส (MW 181.1) และ กาแลคโตส (MW 180.2)

6.3.3 สารที่ไม่สามารถซึมผ่านเข้าเซลล์ได้ มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (high molecular weight non permeating cryoprotectants) (MW >50,000 Dalton) สารกลุ่มนี้ออกฤทธิ์

ป้องกันอันตรายให้กับเซลล์ขณะที่อยู่นอกเซลล์ และ และใช้ได้ผลดีที่ความเข้มข้นต่ำกว่า ได้แก่ Polyvinylpyrrolidone polyvinyl alcohol และ Sodium Hyaluronate

6.4 ขั้นตอนการเก็บรักษาและสัดส่วนการใช้สารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง

ความสำคัญในการเก็บรักษาเซลล์และเนื้อเยื่อทางทันตกรรม ได้เริ่มต้นขึ้นเมื่อปี 1966 เพื่อการใช้งานทางด้านการแพทย์ในนาม ธนาคารฟัน (103) ได้มีการศึกษาอีกหลายๆกลุ่มเพื่อค้นหาเทคนิคการเก็บรักษา ความถี่ในการใช้สาร cryoprotectant การควบคุมอุณหภูมิ เพื่อเก็บรักษาเซลล์ต้นกำเนิดทางทันตกรรม ดังแสดงในตาราง 4 อย่างไรก็ตาม วิธีการที่เหมาะสมที่สุดเพื่อเก็บรักษาเซลล์ต้นกำเนิดทางทันตกรรมเหล่านี้ยังมีข้อจำกัด และต้องทำการศึกษาอีกต่อไป

ตาราง 4 เทคนิคการแช่เยือกแข็งและวิธีการที่ใช้เก็บรักษาฟันเพื่อธนาคารฟัน (Tooth banking methods) (12)

สถานที่ (Location)	ข้อมูลบ่งใช้ (Indication)	ขั้นตอนการเก็บรักษา (Cryopreservation method)	Tooth-derived stem cell	Tooth preserved	แหล่งอ้างอิง
United States	Tissue culture Autotransplantation	สารละลาย: น้ำเกลือ/ ยาปฏิชีวนะ/กลีเซอรอล การควบคุมอุณหภูมิ: -20°C เป็นเวลา 25 นาที อบเย็น และ แช่ในอ่างแอลกอฮอล์ เป็นเวลา 15 นาที จนถึงอุณหภูมิ -80°C อุณหภูมิการเก็บรักษา: -80°C	-	-	Coburn, 1966 (103)
Denmark	Autotransplantation	สารละลาย: อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM 10% เซรั่มมนุษย์ 10% DMSO การควบคุมอุณหภูมิ: 1.2°C/นาที ไปจนถึง อุณหภูมิ -40°C 6°C/min ไปจนถึง อุณหภูมิ -100°C อุณหภูมิการเก็บรักษา: -196°C (ไนโตรเจนเหลว)	-	+	Schwartz, 1986 (104)

ตาราง 4 (ต่อ)

สถานที่ (Location)	ข้อมูลบ่งใช้ (Indication)	ขั้นตอนการเก็บรักษา (Cryopreservation method)	Tooth-derived stem cell	Tooth preserved	แหล่งอ้างอิง
Korea	PDL cell viability	สารละลาย: อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM F12=3:1 10% เซรั่มวัว (FBS) 10% DMSO การควบคุมอุณหภูมิ: -196°C อุณหภูมิการเก็บรักษา: -196°C (ไนโตรเจนเหลว)	-	-	Oh, 2005(105)
Japan	PDL cell viability	สารละลาย: BAMBANKER 2 (Lymphotec, Tokyo, Japan) 10% DMSO การควบคุมอุณหภูมิ: โปรแกรมควบคุมอุณหภูมิ (ABI Corp. Ltd.) ใช้กระแสไฟ (75 mA)ในการสร้างสนามแม่เหล็ก -5 °C เป็นเวลา 15 นาที 0.5°C/นาที ไปจนถึง อุณหภูมิ -30°C อุณหภูมิการเก็บรักษา: -150°C	-	+	Kaku,2007(94)

ตาราง 4 (ต่อ)

สถานที่ (Location)	ข้อมูลบ่งใช้ (Indication)	ขั้นตอนการเก็บรักษา (Cryopreservation method)	Tooth-derived stem cell	Tooth preserved	แหล่งอ้างอิง
Taiwan	Autotransplantation DPSC isolation PDLSC isolation	สารละลาย: BAMBANKER 2 (Lymphotec, Tokyo, Japan) การควบคุมอุณหภูมิ: โปรแกรมควบคุมอุณหภูมิ (ABI Corp. Ltd.) ใช้กระแสไฟ (75 mA)ในการสร้างสนามแม่เหล็ก -5 °C เป็นเวลา 15 นาที 0.5°C/นาที ไปจนถึง อุณหภูมิ -30°C อุณหภูมิการเก็บรักษา: -150°C	+	+	Chang, 2010 (106)

6.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเก็บรักษาเซลล์ต้นกำเนิดจากฟันด้วยวิธีการแช่เยือกแข็ง

การเก็บรักษาเซลล์ต้นกำเนิดโดยการแช่เยือกแข็งเริ่มเป็นที่ยอมรับในปี 2004 (90) เป็นการเก็บรักษาทั้งเซลล์และเนื้อเยื่อ ไม่ว่าจะเป็นเซลล์อสุจิ เซลล์โอโอไซต์มนุษย์ เพื่อประโยชน์ทางการแพทย์ หรือเพื่อการรักษาโรคมะเร็งของผู้ป่วยที่อายุน้อย ปัจจุบันเทคนิคการเก็บรักษาได้นำมาใช้ในการเก็บรักษาเซลล์ต้นกำเนิดมากขึ้น เช่น เซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด (107) เซลล์ต้นกำเนิดเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันน้ำนม (20) เซลล์ต้นกำเนิดเลือดสายสะดือ เป็นต้น เนื่องจากเซลล์ดังกล่าวประกอบด้วยเซลล์ต้นกำเนิดที่เป็นหนึ่งเดียวจากตัวผู้ให้และมีรหัสพันธุกรรมใกล้เคียงกับคนในครอบครัว สามารถเก็บรักษาเซลล์ต้นกำเนิดอันมีค่าไว้ สำหรับการรักษาโดยใช้เทคโนโลยีสมัยใหม่ที่สามารถใช้เซลล์ต้นกำเนิดได้ในอนาคต เช่น นำไปรักษาโรคหัวใจหรือโรคอัลไซเมอร์ นอกจากนั้น เซลล์ต้นกำเนิดที่เก็บยังเปรียบเสมือนอวัยวะสำรอง สำหรับการรักษาโรคมะเร็งหรือโรคเลือดที่อาจจะรักษาให้หายได้โดยใช้เซลล์ต้นกำเนิด

Seo และคณะ ได้ทำการศึกษาผลกระทบจากการเก็บรักษาแช่เยือกแข็งเซลล์ต้นกำเนิดทางทันตกรรมเป็นครั้งแรก (19) โดยนำเนื้อเยื่อยึดปริทันต์ที่เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวที่มีสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งที่มีส่วนผสมระหว่างซีรั่มวัวร้อยละ 90 และ DMSO ร้อยละ 10 เป็นเวลา 3 และ 6 เดือน พบว่า เซลล์กลุ่มนี้ยังคง คุณลักษณะเฉพาะ (characteristics) ของเซลล์ต้นกำเนิด ได้แก่ การแสดงออกของการแสดงเครื่องหมายบนผิวเซลล์ (STRO-1) การสร้างตัวเป็นกลุ่ม การเปลี่ยนไปเป็นเซลล์จำเพาะ และการสร้างเนื้อเยื่อคล้ายเคลือบรากฟัน/เยื่อยึดปริทันต์

นอกจากนี้แล้ว Kaku และคณะ พบว่าการใช้โปรแกรมสนามแม่เหล็ก (0.01 mT) ในขั้นตอนการควบคุมอุณหภูมิการเก็บรักษาฟันทั้งซี่เป็นเวลา 1 ปี ทำการเพาะแยกเยื่อยึดปริทันต์จากฟันที่เก็บรักษาให้ผลดีต่ออัตราการแบ่งตัวเจริญเติบโตสูงเท่าๆกับกลุ่มเซลล์ที่ได้จากฟันที่เพิ่งถอนใหม่ (94) สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Lee และคณะ ที่ทำการทดสอบการเก็บรักษาเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันแท้ของมนุษย์ โดยใช้เทคนิคการเก็บรักษาด้วยโปรแกรมแช่แข็ง (ABI, Chiba, Japan) ควบคู่กับการใช้สร้างสนามสนามแม่เหล็ก (0.01 mT) โดยใช้ serum-free cryopreservation medium (SFM) ร่วมกับ DMSO ร้อยละ 3 ซึ่งเป็นสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง หลังการทำละลายเซลล์ชนิดนี้ยังคงความสามารถในการยึดเกาะ การแสดงออกของเครื่องหมายบนผิวเซลล์สามารถเปลี่ยนไปเป็นเซลล์ชนิดอื่น และยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงของ DNA วิธีการนี้ให้ผลดีในการเป็นสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งเพื่อใช้ในกระบวนการเก็บรักษาเซลล์ต้นกำเนิด (108)

Lee และคณะทำการทดสอบเซลล์ต้นกำเนิดทางทันตกรรม เก็บรักษาฟันทั้งซี่ในสารป้องกันการแข็งตัว (cryoprotectant) (BAMBANKER, Lymphotec, Tokyo, Japan) ใช้

โปรแกรมควบคุมอุณหภูมิ (ABI, Chiba, Japan) ที่มีสนามแม่เหล็ก แช่ฟันไว้เป็นเวลา 7 วัน เพื่อทำการศึกษาผลของการเก็บรักษา พบว่า เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันแท้ของมนุษย์ที่สกัดจากฟันที่ผ่านการเก็บรักษาแช่เยือกแข็ง มีอัตราการแยกเพาะเลี้ยงได้ร้อยละ 73 ไม่พบความแตกต่างในด้านลักษณะรูปร่างเซลล์ การแสดงออกของเครื่องหมายจำเพาะ(STRO-1) การเปลี่ยนไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก และเซลล์สร้างเม็ดไขมัน เมื่อทำการเปรียบเทียบเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันของมนุษย์ที่ทำการแยกเพาะเลี้ยงใหม่ (109) และในปีเดียวกัน Ding และคณะ ศึกษาการเก็บรักษาแช่เยือกแข็งเซลล์ต้นกำเนิดทางทันตกรรม ชนิดเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อส่วนปลายรากของมนุษย์ (Stem Cells from Apical Papilla; SCAP) ซึ่งเป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการพัฒนารากฟัน ไม่พบความแตกต่างของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้ในด้านความมีชีวิตของเซลล์ การแบ่งตัวเจริญเติบโต การแสดงออกเครื่องหมายบนผิวเซลล์ การสร้างตัวเป็นกลุ่ม การเปลี่ยนไปเป็นเซลล์ชนิดอื่น อัตราการตายของเซลล์ และการจัดลำดับโครโมโซมตามขนาดและรูปร่าง (karyotype) แม้จะผ่านเก็บรักษาแช่เยือกแข็งเป็นเวลา 6 เดือน ภายใต้ไนโตรเจนเหลว (110)

ในปี 2012 Ma และคณะ ได้ทำการศึกษาในสิ่งที่น่าสนใจยิ่งขึ้น (20) ด้วยการศึกษาผลกระทบจากการแช่เยือกแข็งในเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันน้ำนมฟันน้ำนมมนุษย์ เป็นเวลามากกว่า 2 ปี (25–30 เดือน) ในไนโตรเจนเหลว โดยใช้ซีรั่มวัว (FBS) ร้อยละ 90 และ DMSO ร้อยละ 10 พบว่า เซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้ยังคงรักษาคุณสมบัติความสามารถในการรวมตัวเป็นกลุ่ม มีความสามารถในการเกิดใหม่ เซลล์มีการแสดงเครื่องหมายบนผิวเซลล์ต่างๆ และมีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ชนิดอื่น นอกจากนี้ได้ทำการรักษาด้วยเซลล์ต้นกำเนิดที่ผ่านการแช่เยือกแข็งในหนูทดลอง (MRL/lpr) ที่เป็นโรคซิสทีมิคลูปัสอีริทีมาโทซัส(systemic lupus erythematosus; SLE) โดยการฉีดเซลล์ต้นกำเนิดเข้าทางเส้นเลือดพบว่า ช่วยให้ปรับความผิดปกติต่างๆของโรคนี้ให้ดีขึ้น ได้แก่ ช่วงอายุขัยที่สั้น ภาวะการสร้าง autoantibody ที่สูง และภาวะไตอักเสบ เซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้ยังช่วยลด ภาวะทำงานมากเกินไปของ interleukin 17 (IL-17) ที่หลั่งมากจากเฮลเปอร์ทีเซลล์ (helper T cells) และพบว่า มีการลดลงลงของภาวะกระดูกพรุนอีกด้วย

อย่างไรก็ตาม ยังไม่เคยมีการศึกษาผลของการเก็บรักษาแบบแช่เยือกแข็งในเซลล์ต้นกำเนิดทางทันตกรรมเป็นระยะเวลานาน 5-7 ปี โดยทำการตรวจสอบลักษณะเฉพาะของเซลล์ต้นกำเนิด และสามารถมาใช้งานได้จริงในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ กล่าวคือการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดในการรักษาผู้ป่วยปากแหว่งเพดานโหว่ ดังนั้น การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันน้ำนมในมนุษย์ที่ผ่านการเก็บรักษาโดยการแช่เยือกแข็งเป็นเวลา 5-7 ปี โดยพิจารณาจากการสร้างหน่วยโคโลนี การแบ่งตัวเจริญเติบโต การเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ชนิดอื่น ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ป่วยปากแหว่งเพดาน

โหว่ในด้านธนาคารเซลล์ต้นกำเนิด ซึ่งไม่ก่อให้เกิดความเจ็บปวดต่อผู้บริจาค รวมทั้งเป็นการสร้างองค์ความรู้ใหม่ในเรื่องการเก็บรักษาเซลล์ต้นกำเนิด ซึ่งอาจจะพัฒนาไปสู่วิธีการและขั้นตอนการเก็บรักษาเซลล์ต้นกำเนิด ที่ช่วยให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นในอนาคต

บทที่ 3

วัสดุและวิธีการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาในห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) ในภาชนะเพาะเลี้ยง ที่ไม่ใช้สัตว์ทดลองที่ยังมีชีวิตอยู่ ซึ่งผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ คณะทันตแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์แล้ว

1. ผู้เข้าร่วมวิจัย

หลักเกณฑ์การคัดเลือกผู้เข้าร่วมงานวิจัยมีดังนี้

1.เป็นเด็กอายุ 6-12 ปี ที่มีสุขภาพแข็งแรง ไม่มีโรคประจำตัว

2.ได้เข้ารับการรักษาทางทันตกรรมด้วยการถอนฟันเพื่อการรักษาจากทันตแพทย์ผู้เชี่ยวชาญซึ่งเป็นฟันน้ำนมที่เริ่มโยกใกล้หลุด เนื่องจากฟันแท้กำลังจะงอกขึ้นมาแทนที่ เลือกเก็บได้ทั้งฟันตัด ฟันเขี้ยว และฟันกรามในช่วงเวลาที่ดำเนินการวิจัย

2. การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันน้ำนมของมนุษย์

นำฟันน้ำนมที่ถอนจากกระดูกเบ้าฟันทั้งซี่ใส่หลอดโพลีโพรพิลีนขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดแอลฟาเอ็มอีเอ็มที่มีฟีนอลแรด (α-MEM; Invitrogen: Gibco) ประกอบด้วยซีรั่มวัวร้อยละ 10 (fetal bovine serum: FBS; J R Scientific, Inc, cat. No. 43635) เพื่อนำไปแยกเนื้อเยื่อในห้องปฏิบัติการ ดังแสดงในภาพ 3.1

ภาพ 3.1 การนำตัวอย่างฟันไปยังห้องปฏิบัติการ

3. การแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันน้ำนมของมนุษย์

ใช้วิธีการคัดแยกเซลล์ด้วยเอนไซม์สำหรับการย่อยสลายเนื้อเยื่อ (enzymatic digestion) โดยมีขั้นตอนต่างๆ ดังต่อไปนี้

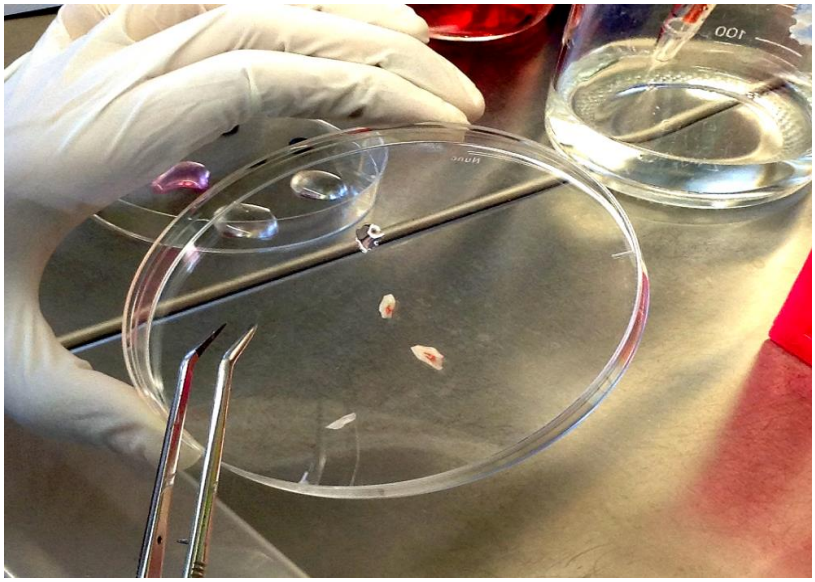
1. ล้างซี่ฟันด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลายน์ ที่ปราศจากเชื้อ (Phosphate Buffer Saline; PBS) 2 ครั้ง

2.ใช้เครื่องมือที่ไม่มีคมตัดให้ซี่ฟันแตกออกจากกัน ดังแสดงในภาพ 3.2 แล้วใช้ปลายใบมีดตัดชิ้นเนื้อโพรงประสาทฟันออกมาใส่ในจานแก้ว (glass dish)

3. ล้างเนื้อเยื่อด้วยสารละลายโพวิโดไอโอดีน นาน 2 นาที

4. ล้างเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันน้ำนมด้วยสารละลาย PBS 2 ครั้ง

5. ล้างเนื้อเยื่อด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ (α-MEM) 1 ครั้ง



ภาพ 3.2 ซี่ฟันแตกออกจากกันเพื่อทำการนำเนื้อเยื่อฟันออกมาจากโพรงประสาทฟัน

6. หั่นชิ้นเนื้อโพรงประสาทฟันน้ำนมด้วยใบมีด (sterile blade) เป็นชิ้นเล็กๆด้วยขนาดประมาณ 1×1×1 มิลลิเมตร

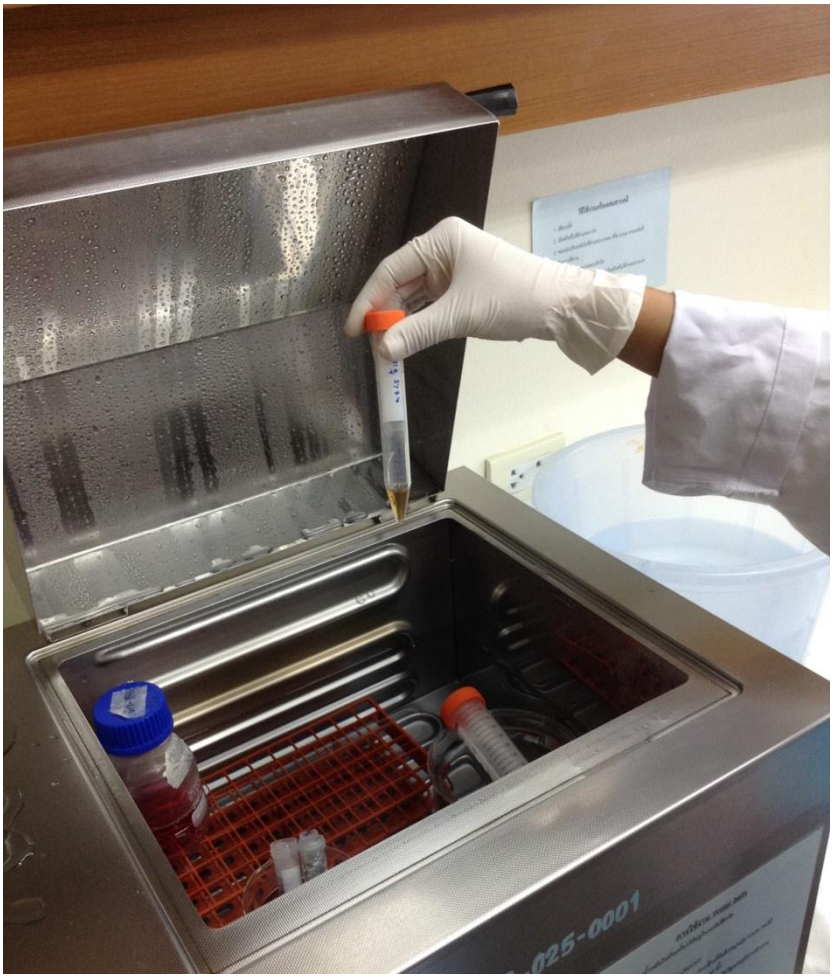
7. นำชิ้นเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันทั้งหมดไปย่อยด้วยสารละลายเอนไซม์ระหว่างคอลลาจิเนสชนิดที่1 (collagenase type I) ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กับ ดิสเปส (dipase) ที่ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยบรรจุในหลอดโพลีโพรพิลีนขนาด 15 มิลลิลิตร

8. นำสารละลายทั้งหมดย่อยที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการเขย่าสารละลายทุกๆ 15 นาที เพื่อช่วยในการย่อย ดังแสดงในภาพ 3.3

9. กรองสารละลายทั้งหมดด้วยตัวกรอง (Cell Strainers) ขนาด 70 ไมโครเมตร (BD Falcon, San Jose, CA)

10. ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ลงในหลอดเอปเพ็นดอร์ฟ (Eppendorf Tubes) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

11. นำส่วนตะกอนไปเพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงขนาด 25 ตารางเซนติเมตร เติมอาหารเลี้ยงเซลล์แอลฟาเอ็มอีเอ็มที่มีฟีนอลเรด ที่ผสมด้วยซีรั่มวัวร้อยละ 10 และยาปฏิชีวนะร้อยละ 1 ที่ประกอบด้วย Penicillin, Streptomycin, Kanamycin และ Mycostatin จำนวน 3-5 มิลลิลิตร ดังแสดงในภาพ 3.4



ภาพ 3.3 นำเนื้อเยื่อฟันในสารละลายเอนไซม์ไปย่อยที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ภาพ 3.4 นำส่วนตะกอนไปเพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงขนาด 25 ตารางเซนติเมตร เติมอาหารเลี้ยงเซลล์

12. เพาะเลี้ยงในตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5

13. เปลี่ยนอาหาร 2 ครั้งต่อสัปดาห์ จนเซลล์เติบโตเต็มจานเลี้ยง (ประมาณร้อยละ 70-80) เซลล์ที่ใช้สำหรับการทดลองเป็นเซลล์รุ่นที่ 3-5

4. การนำเซลล์ที่เก็บรักษาโดยการแช่เยือกแข็งมาเลี้ยงใหม่

1. นำหลอดไครโอไวอัลส์ (Cryovials) ที่มีเซลล์ที่แช่เยือกแข็งไว้ในถังไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen tank) เป็นเวลา 5-7 ปี ใส่ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิน้ำ (water bath) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จน Cell suspension ละลายเกือบหมดเหลือเกล็ดน้ำแข็งประมาณ 2 มิลลิลิตร

2. ดูด Cell suspension ขึ้นลง 2-3 ครั้ง เพื่อให้เซลล์ไม่จับตัวเป็นกลุ่มก้อน แล้วดูด Cell suspension ทั้งหมด ใส่จานเลี้ยงขนาด 25 ตารางเซนติเมตร เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ (culture media) แอลฟาเอ็มอีเอ็มที่มีฟีนอลเรด ที่ผสมด้วยซีรั่มวัวร้อยละ 10 และยาปฏิชีวนะร้อยละ 1 ที่ประกอบด้วย Penicillin, Streptomycin, Kanamycin และ Mycostatin จำนวน 3-5 มิลลิลิตร อย่างช้าๆทีละหยดในช่วงต้น 2-3 หยด เพื่อให้เซลล์ค่อยๆปรับตัว

3. เพาะเลี้ยงในตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5

4. เปลี่ยนอาหาร 2 ครั้งต่อสัปดาห์ จนกระทั้งเซลล์เติบโตเต็มจานเลี้ยง (ประมาณร้อยละ 70-80) เซลล์ที่ใช้สำหรับการทดลองเป็นเซลล์รุ่นที่ 3-5

5. การวัดการสร้างหน่วยโคโลนี

1. หว่านเซลล์เนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันน้ำนมลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบหลุมขนาด 6 หลุม ด้วยปริมาณ 1×10^2 เซลล์ต่อหลุม (n=6) เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์จำนวน 3 มิลลิลิตร เป็นเวลา 10 วัน

2. เมื่อครบกำหนดเวลานำเซลล์มาวัดการสร้างหน่วยโคโลนี โดยตรึง (fix) เซลล์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ฟอร์มาลินร้อยละ 4 (buffer formalin) นาน 20 นาที

3. ย้อมด้วยสีโทลูอิดีนดีนบลูร้อยละ 0.1 (toluidine blue) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4. นับจำนวนโคโลนีที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 2 มิลลิเมตร (74, 78, 111)

6. การวัดปริมาณเซลล์ด้วยเทคนิคเอ็มทีที

1. นำจานอาหารที่มีเซลล์ประมาณร้อยละ 70-80 ของพื้นที่ ดูดเอาอาหารเก่าออก แล้วล้างด้วยสารสารละลาย PBS ที่ปราศจากเชื้อจำนวน 4 มิลลิลิตร 2 ครั้ง

2. ทำการทริปซิไนซ์ (trypsinized) เซลล์ ด้วย Trypsin – EDTA ร้อยละ 0.25 (Gibco, USA) จำนวน 3 มิลลิลิตร

3. นำไปบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 5 นาทีเมื่อครบกำหนด สังเกตอาหาร ถ้ามีสีขาวขุ่นแสดงว่าเซลล์หลุดออกจากจานเพาะเลี้ยงแล้ว แล้วนำไปดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

4. เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ จำนวน 3 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาของ Trypsin – EDTA ร้อยละ 0.25

5. ดูด Cell Suspension ใส่หลอดทดลอง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

6. เมื่อครบเวลากำหนด สังเกตก้นหลอดทดลองจะมีกลุ่มเซลล์เกาะกันแน่น ดูดของเหลวใสข้างบนทิ้ง

7. เติมอาหารเลี้ยงเซลล์จำนวน 2 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆให้เข้ากันเพื่อเตรียมการนับเซลล์ด้วย Hemocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 10 เท่า

8.หว่านเซลล์เนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันน้ำนมลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบหลุมขนาด 24 หลุม ด้วยปริมาณเซลล์หลุมละ 1×10^4 เซลล์ เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ (n=6)

9. เพาะเลี้ยงในตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5

10. ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยง 1, 3 และ 7 วันเปลี่ยนอาหารวันเว้นวัน

11. เมื่อครบตามกำหนดเวลา ดูดเอาอาหารเก่าออก แล้วล้างด้วยสารละลาย PBS ที่ปราศจากเชื้อ จำนวน 4 มิลลิลิตร 2 ครั้ง

12. เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มชนิดไม่มีฟีนอลเรด (DMEM, Gibco) หลุมละ 500 ไมโครลิตร

13. เติมสารละลายเอ็มทีที ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Invitrogen, USA) เพาะเลี้ยงในตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

14. เมื่อครบกำหนดเวลา ดูดอาหารเก่าออกแล้วเติม DMSO ปริมาณ 200 ไมโครลิตร (Amresco, Geramany) ต่อหลุม เขย่าให้ให้สีของสารละลายเข้ากัน

15. นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านค่าบนไมโครเพลทรุ่น Multiskan FC ELISA reader (Thermo Scientific) ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร

16. จากนั้นใช้ค่าการดูดกลืนแสงเป็นจำนวนเซลล์ตามกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นจากการวัดความสามารถในการเปลี่ยนเอ็มทีทีเป็นผลึกฟอร์มาซานของเซลล์ที่ทราบจำนวน

7. การวัดความสามารถในการสร้างก้อนแร่ธาตุ

1. หว่านเซลล์เนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันน้ำนมลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบหลุมขนาด 24 หลุม ด้วยปริมาณ 1×10^4 เซลล์ต่อหลุม (n=4)

2. เพาะเลี้ยงจนเซลล์เจริญเติบโตเต็มจานประมาณร้อยละ 80 ของพื้นที่

3.เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งซึ่งประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์แอลฟาเอ็มอีเอ็มที่มีฟีนอลเรดที่มียาปฏิชีวนะร้อยละ 1 ผสมกับกรดแอสคอร์บิคที่มีความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Sigma, USA) เดกซาเมทาโซน 100 นาโนโมลาร์ (Sigma, USA) และเบต้า กลีเซอโรฟอสเฟต 10 มิลลิโมลาร์ (Sigma, USA) โดยใช้เซลล์ MG-63 เป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก และเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติเป็นกลุ่มควบคุมเชิงลบ

4.โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์วันเว้นวัน เป็นเวลา 21 วัน

5. เมื่อครบกำหนดเวลา ทำการวัดค่าการสร้างก้อนแร่ธาตุ โดยทำการล้างเซลล์ด้วยสารละลาย PBS ปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง

6. ตรึงเซลล์ด้วยสารละลายพาราฟอร์มาดีไฮด์ร้อยละ 4 จำนวน 300 ไมโครลิตร นาน 15 นาทีที่อุณหภูมิห้อง (74)

7. ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย PBS ที่ปราศจากเชื้อ 3 ครั้ง

8. ย้อมเซลล์ด้วยสารลายอะลิซารินเรดเอสร้อยละ 0.5 (Alizarin Red S) (Sigma, USA) นาน 30 นาที

9. ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง

10. บันทึกภาพด้วยกล้อง (Nikon, Eclipse Ti-S, Digital camera DS-Fi1-U2)

11. วัดปริมาณเซลล์ที่สร้างก้อนแร่ธาตุ โดยนำเซลล์ที่ย้อมบ่มรวมกับ สารละลายกรดอะซิติคร้อยละ 10 จำนวน 500 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที (112)

12. ดูดสารละลายทั้งหมดใส่หลอดเอปเพ็นดอร์ฟขนาด 1.5 มิลลิลิตร ต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

13. นำสารละลายปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,400 รอบต่อนาที นาน 15 นาที

14. ดูดสารละลาย 150 ไมโครลิตร นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านค่าบนไมโครเพลทรุ่น Multiskan FC ELISA reader ที่ความยาวคลื่นแสง 405 นาโนเมตร

8. การวัดความสามารถในการพัฒนาเป็นเซลล์สร้างไขมัน

1.หว่านเซลล์เนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันน้ำนมลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบหลุมขนาด 24 หลุม ด้วยปริมาณ 1×10^4 เซลล์ต่อหลุม (n=4)

2. เพาะเลี้ยงจนเซลล์เจริญเติบโตเต็มจานประมาณร้อยละ 80 ของพื้นที่

3. เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit (Gibco, USA, A10070-01) ที่เหมาะสมกับการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างไขมัน จำนวน 1 มิลลิลิตรต่อหลุม

4. เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์วันเว้นวัน เป็นเวลา 21 วัน

5. เมื่อครบกำหนดเวลาวัดค่าการสร้างเม็ดไขมัน โดยล้างเซลล์ด้วยสารละลาย steriled PBS 2 ครั้ง

6. ตรึงเซลล์ด้วยสารละลายพาราฟอร์มาดีไฮด์ร้อยละ 4 จำนวน 300 ไมโครลิตร นาน 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

7. ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง

8. ย้อมเซลล์ด้วยสีออยเรดโอร้อยละ 0.5 (Oil Red O) (Sigma, USA) นาน 1 ชั่วโมง

9. ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง

10. บันทึกภาพด้วยกล้อง (Nikon, Eclipse Ti-S, Digital camera DS-Fi1-U2)

9. การวิเคราะห์ข้อมูล

ในแต่ละการทดลองใช้เซลล์ที่นำมารวมกลุ่มกัน (pool cells) จำนวน 5 ซี่ (n=5) จากตัวอย่างที่ไม่ใช่บุคคลเดียวกัน (74, 113) โดยในแต่ละการทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง

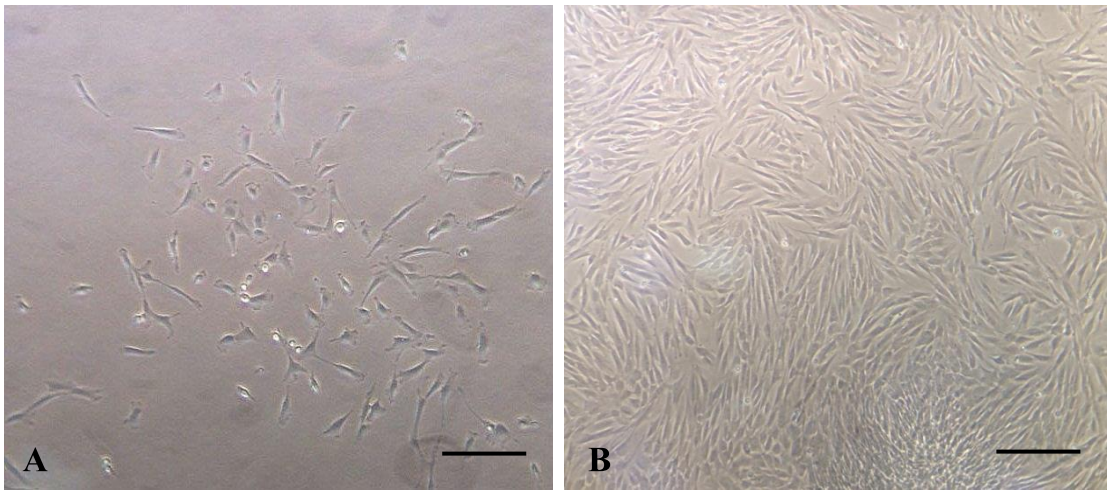
การตรวจสอบความสามารถในการรวมตัวเป็นกลุ่ม โดยการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม ใช้การคำนวณหาค่าเฉลี่ยกลุ่มเซลล์±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) การทดสอบความสามารถในการเจริญเติบโตที่ทดสอบด้วยเทคนิคเอ็มทีที โดยการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม แสดงเป็นค่าเฉลี่ยของค่า OD ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) โดยวิธี Student's t-test และการทดสอบการสร้างก้อนธาตุเลือกใช้สถิติพรรณนาเปรียบเทียบการติดสีในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณเซลล์ที่ละลายออกมา±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน(SD) โดยวิธี Scheffé's post hoc test ที่ระดับความเชื่อมั่น (confidence interval) 95 เปอร์เซ็นต์ โดยโปรแกรมสถิติเอสพีเอสเอส 16.0 (SPSS 16.0)

บทที่ 4

ผลการศึกษา

1. การคัดแยกและการเพาะเลี้ยง SHED

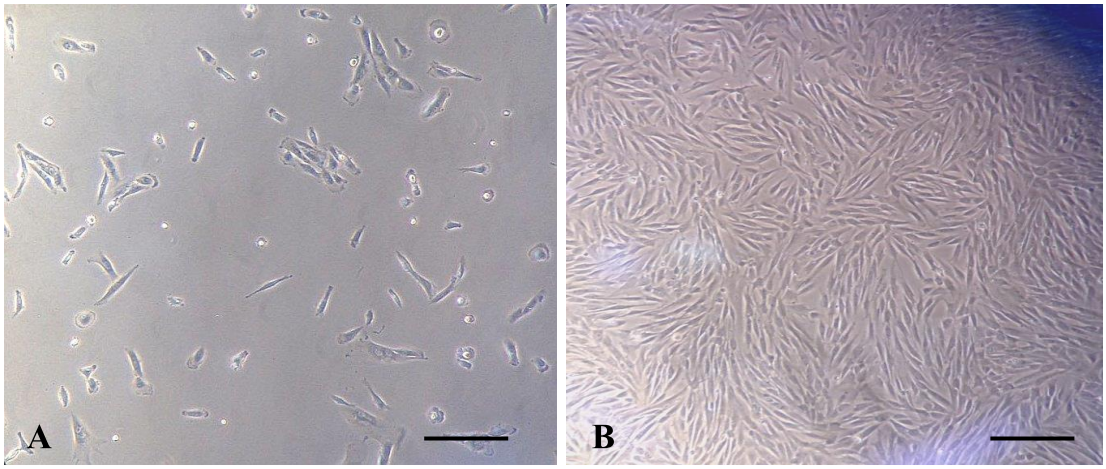
จากศึกษาการคัดแยกเซลล์เนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันน้ำนมใหม่ (fSHED) มีรูปร่างคล้ายเซลล์ไฟโบรบลาส (fibroblast-like cell) สามารถยึดเกาะจานเพาะเลี้ยงในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง ดังแสดงในภาพที่ 4.1 A และสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้จนเต็มพื้นที่ดังแสดงในภาพ 4.1 B



ภาพ 4.1 ลักษณะรูปร่างของ fSHED (scale bar = 0.2 mm)
A: วันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง
B: fSHED แบ่งตัวเจริญเติบโตร้อยละ 80 ของจานเพาะเลี้ยง

2. การเพาะเลี้ยง SHED ที่ผ่านเก็บรักษาโดยการแช่เยือกแข็ง

จากศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันน้ำนม ที่ผ่านการเก็บรักษาโดยการแช่เยือกแข็งเป็นเวลา 5-7 ปี (cSHED) มีรูปร่างคล้ายเซลล์ไฟโบรบลาส (fibroblast-like cell) สามารถยึดเกาะจานเพาะเลี้ยงภายใน 24 ชั่วโมงหลังการทำละลาย (thawed) ดังแสดงในภาพที่ 4.2 A และสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้จนเต็มพื้นที่ดังแสดงในภาพ 4.2 B



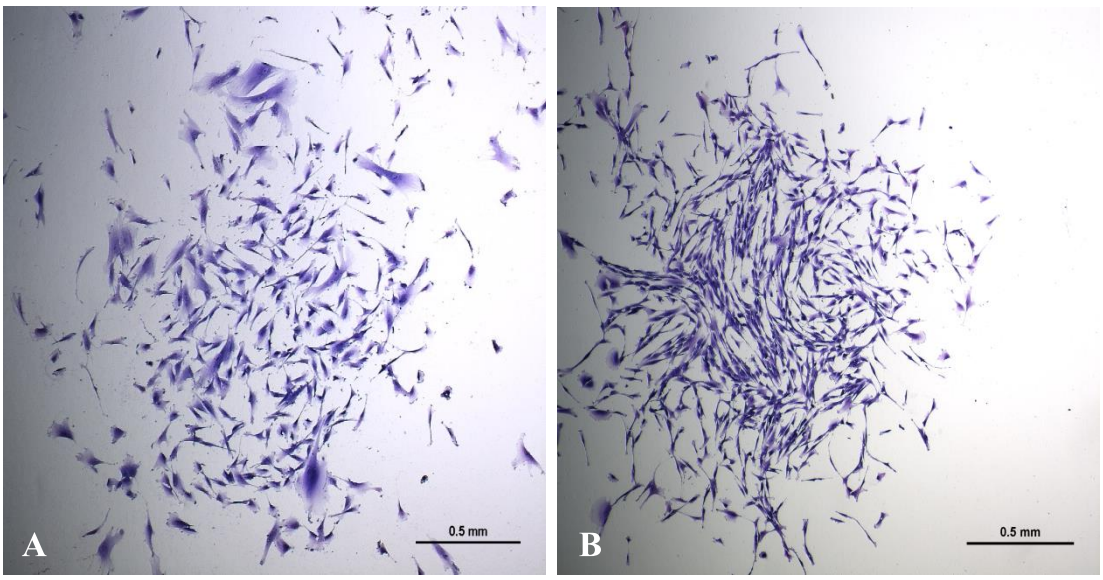
ภาพ 4.2 ลักษณะรูปร่างของ cSHED รุ่นที่ 2 (scale bar = 0.2 mm)

A: การเพาะเลี้ยงหลัง 24 ชั่วโมงของการทำละลาย

B: cSHED แบ่งตัวเจริญเติบโตร้อยละ 80 ของจานเพาะเลี้ยง

3. การสร้างหน่วยโคโลนี

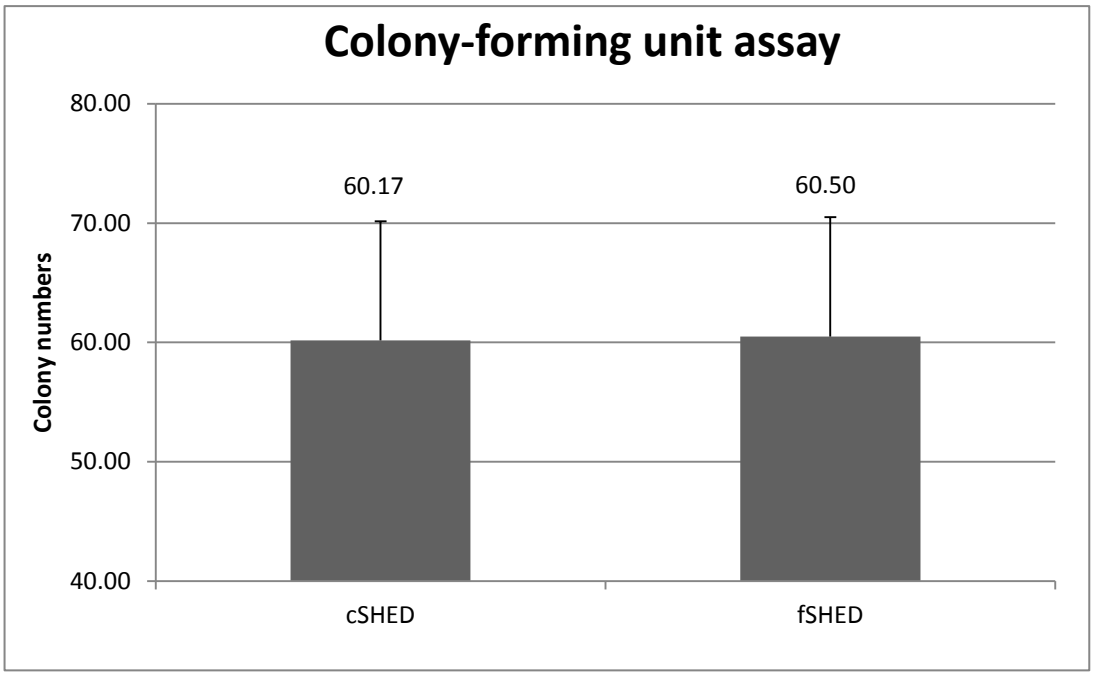
จากการวิเคราะห์การสร้างหน่วยโคโลนีของเซลล์ทั้ง 2 กลุ่ม พบว่ามีลักษณะรูปร่างเซลล์ (cell morphology) ยืดยาวเป็นรูปกระสวย (spindle shape)และ fibroblast-like shape ดังแสดงในภาพ 4.4 และผลการสร้างหน่วยโคโลนีของเซลล์ทั้ง 2 เซลล์ไม่แตกต่างกัน (P=0.605) โดยเซลล์กลุ่มที่ผ่านการแช่เยือกแข็ง (cSHED) มีค่าเท่ากับ 60.17±5.19 และเซลล์กลุ่มที่คัดแยกใหม่ (sSHED) มีค่าเท่ากับ 60.50±2.50 ดังแสดงในภาพ 4.5



ภาพ 4.3 เซลล์ถูกย้อมด้วยสี toluidine blue (scale bar = 0.5mm)

A: cSHED

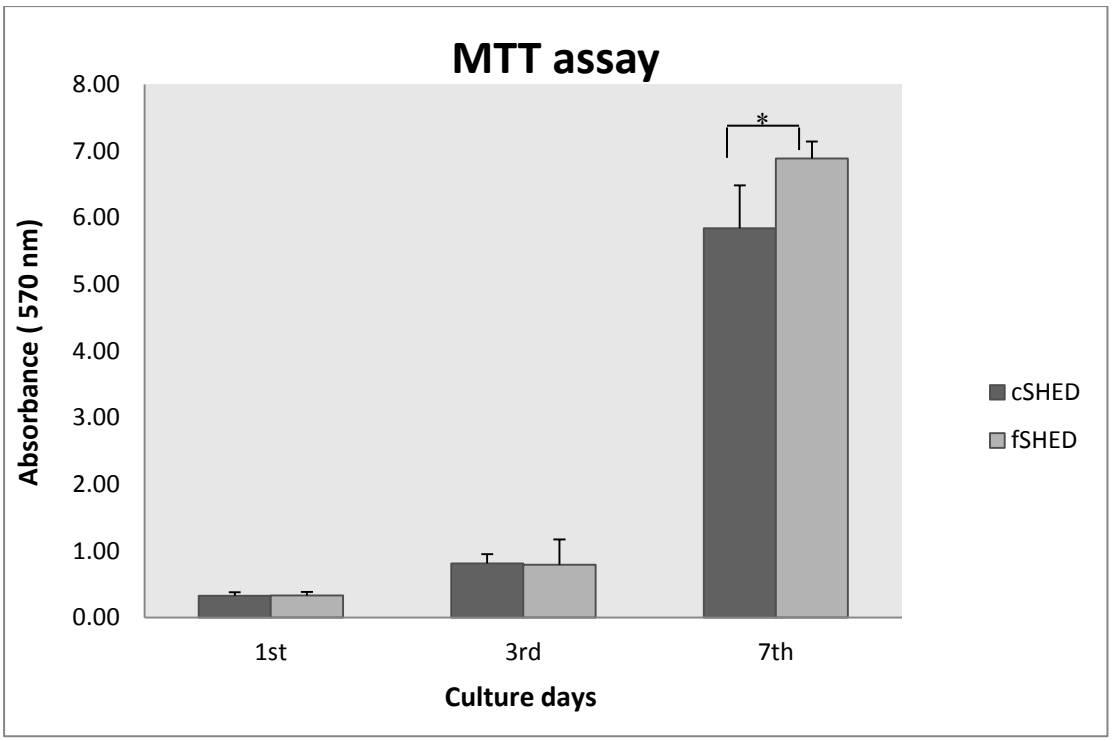
B: fSHED



ภาพ 4.4 แผนภูมิแท่งค่าเฉลี่ยจำนวนการสร้างหน่วยโคโลนี ระหว่างเซลล์กลุ่มที่ผ่านการแช่เยือกแข็ง (cSHED) กับเซลล์กลุ่มที่คัดแยกใหม่ (fSHED)

4. การแบ่งตัวเจริญเติบโต

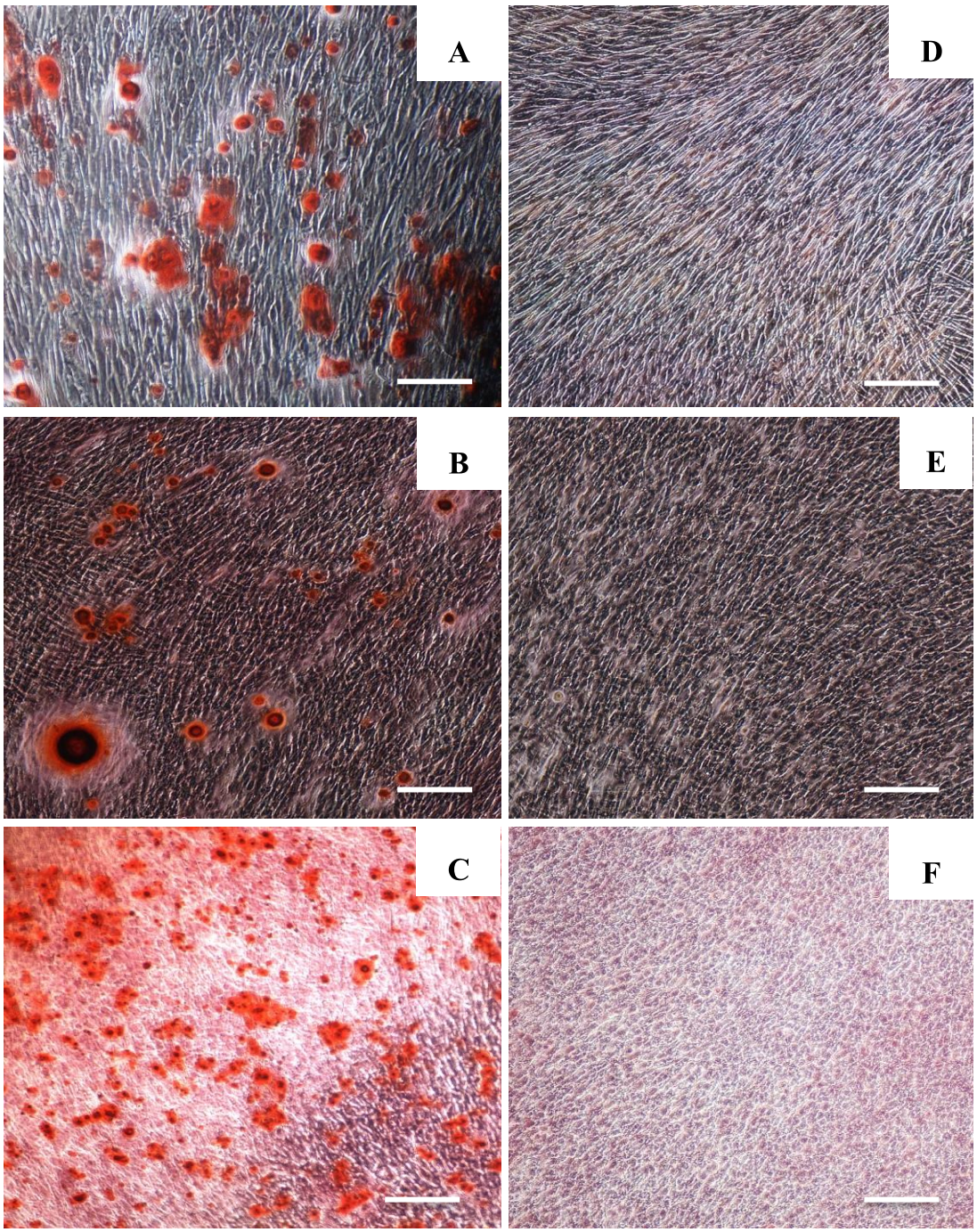
ผลการศึกษาการแบ่งตัวของเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันน้ำนม พบว่าเซลล์ของทั้ง 2 กลุ่ม สามารถเพิ่มจำนวนมากขึ้นตามระยะเวลาที่ทำการเพาะเลี้ยงได้ไม่แตกต่างกันในวันที่ 1 (P=0.960) และวันที่ 3 (P=0.919) อย่างไรก็ตามเซลล์เนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันน้ำนมในกลุ่มเซลล์เก่าที่ผ่านการแช่เยือกแข็ง (cSHED=5.64±0.539) ในระยะการเพาะเลี้ยงวันที่ 7 มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P=0.003)เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันน้ำนมในกลุ่มเซลล์ที่คัดแยกใหม่ (fSHED=7.39±0.748) ดังแสดงในภาพ 4.6



ภาพ 4.5 การเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่วัดด้วยเทคนิคเอ็มทีที (MTT assay) ของเซลล์เนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันน้ำนมของกลุ่มเซลล์ที่ผ่านการแช่เยือกแข็ง (cSHED) และเซลล์ที่คัดแยกใหม่ (fSHED) โดยแกนตั้งแสดงค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) เฉลี่ยของปริมาณเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยง และแกนนอนแสดงระยะเวลาเพาะเลี้ยงเซลล์ (* : $P<0.05$)

5. การสร้างก้อนแร่ธาตุ

ผลจาการศึกษาการสร้างก้อนแร่ธาตุขอเซลล์ทั้ง 3 กลุ่ม พบว่าเซลล์ทุกกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกเป็นเวลา 21 วัน มีการสร้างก้อนแร่ธาตุที่ไม่แตกต่างกัน ดังแสดงในภาพ4.7 และผลการวัดเชิงปริมาณโดยการนำตัวอย่างที่ย้อมสีนำไปบ่มด้วยกรดอะซิติกร้อยละ 10 และวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ค่าความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร (111) พบว่า ไม่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มเซลล์กลุ่ม cSHED (P = 0.853) และกลุ่ม fSHED (P = 0.853) แต่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่ม MG-63 ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก (positive control) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม cSHED (P=0.004) และกลุ่ม fSHED (P=0.005) ดังแสดงในภาพ 4.8

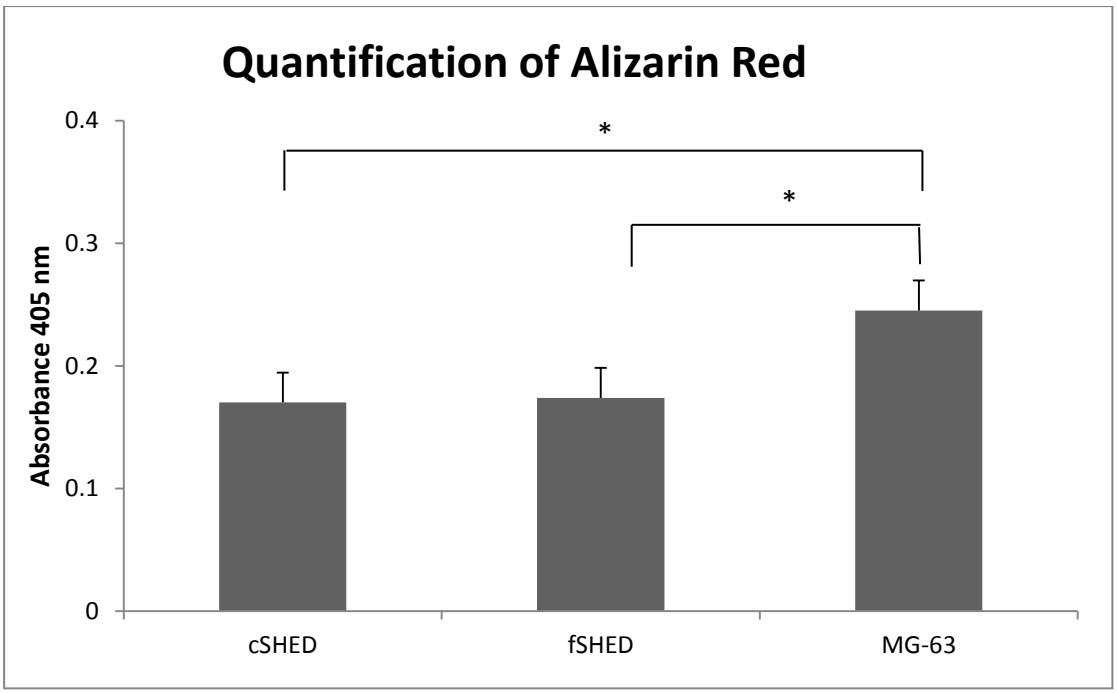


ภาพ 4.6 ผลการทดสอบในการสร้างก้อนแร่ธาตุ (mineralized nodules) (scale bar = 0.2 mm)

A: เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันที่ผ่านการแช่เยือกแข็ง (cSHED)

B: เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันน้ำนมที่คัดแยกใหม่ (fSHED)

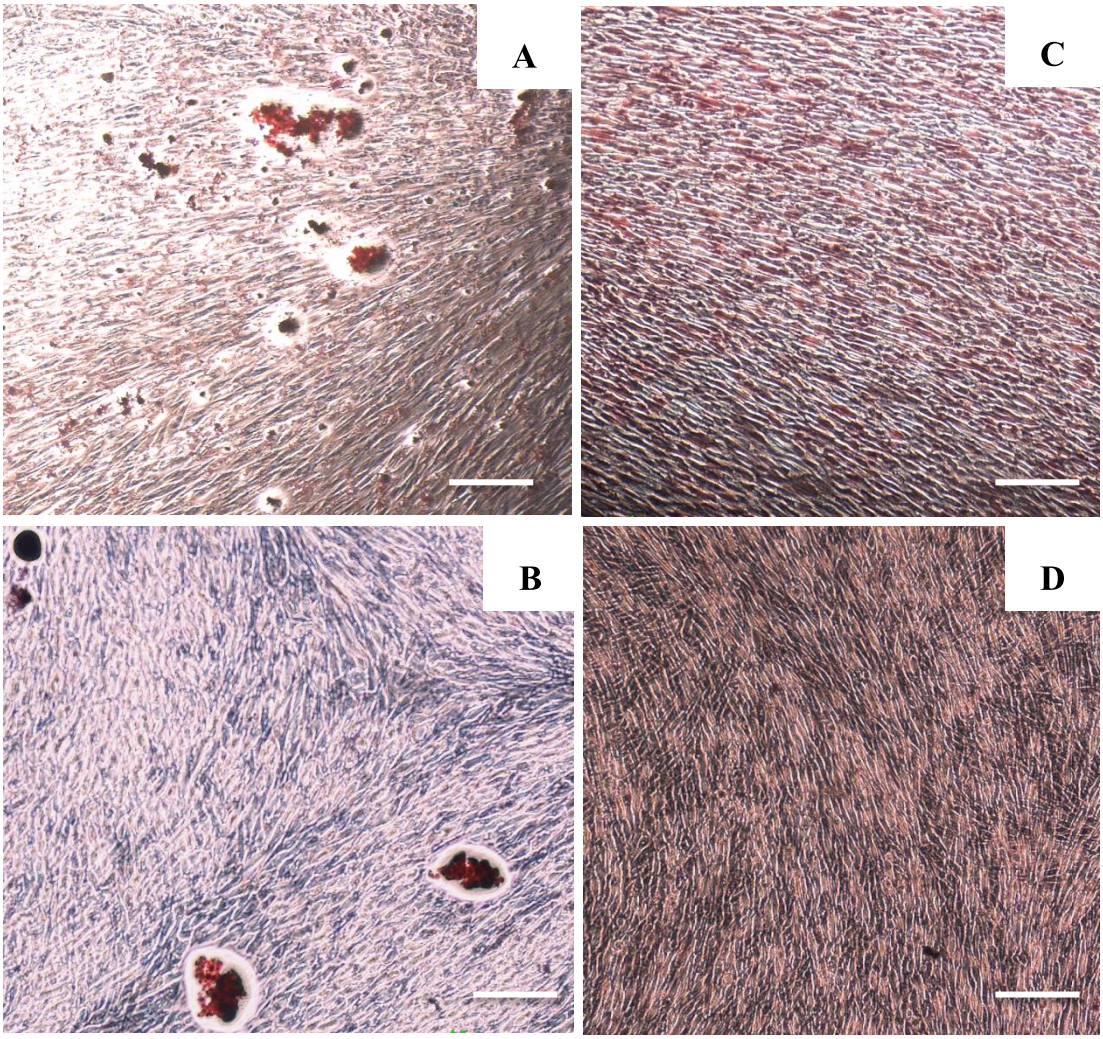
C: เซลล์ MG-63, D-F: กลุ่มเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารปกติซึ่งกำหนดให้เป็นกลุ่มควบคุมเชิงลบ



ภาพ 4.7 ค่าการวัดการดูดกลืนแสงในเชิงปริมาณ (Quantification of extracted alizarin red S) ของเซลล์ 3 กลุ่มที่ผ่านการย้อมด้วยสี Alizarin red S ณ วันที่ 21 ของการเลี้ยง โดยแกนตั้งแสดงค่าค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของเซลล์ที่มีการพอกตัวแคลเซียม (calcification) และแกนนอนแสดงกลุ่มเซลล์

6. การสร้างการพัฒนาเป็นเซลล์สร้างไขมัน

ผลการศึกษาการพัฒนาเป็นเซลล์สร้างไขมันของเซลล์กลุ่ม cSHED และ fSHED ด้วยการเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารชนิดพิเศษที่ชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ adipocyte เป็นเวลา 28 วันพบว่าเซลล์ทั้งสองสามารถการสร้างก้อนไขมันได้ ดังแสดงในภาพ 4.9



ภาพ 4.8 ความสามารถในการพัฒนาเป็นเซลล์สร้างไขมันของเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันน้ำนม (scale bar = 0.2 mm)

A: เซลล์ต้นกำเนิดที่ผ่านการแช่เยือกแข็ง (cSHED)

B: เซลล์ต้นกำเนิดที่เพาะเลี้ยงใหม่ (fSHED)

C-D: กลุ่มเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารชนิดปกติซึ่งกำหนดให้เป็นกลุ่มควบคุมเชิงลบ

บทที่ 5

สรุปอภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

1. สรุปอภิปรายผล

วัตถุประสงค์งานวิจัยครั้งนี้เพื่อต้องการอธิบายและวิเคราะห์คุณสมบัติทางชีวภาพขของเซลล์กลุ่ม cSHED และ fSHED ซึ่งก่อนหน้านี้ ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ 2 กลุ่มนี้ (20) เหตุผลที่เลือกใช้เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันน้ำนม (SHED) เนื่องด้วยสามารถคัดแยกจัดเก็บได้ง่ายสะดวกและมีปัญหาด้านจริยธรรมน้อยกว่าเมื่อเทียบเทียบกับเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (62) Miura และคณะ (9) พบว่าเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันน้ำนม 1 ซี่ สามารถให้เซลล์ต้นกำเนิด 12-20 เซลล์และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงต่อไป เซลล์เหล่านี้สามารถสร้างเป็นกระดูกได้ 100% นอกจากนี้ SHED มีการแสดงออกของคุณสมบัติเซลล์ต้นกำเนิดชนิด multipotent ในการเปลี่ยนเป็นเซลล์อื่นได้หลากหลายเช่น เนื้อฟันและก้อนกระดูก (65,114) เซลล์ผนังหลอดเลือด และเซลล์ประสาท (63,114) ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า SHED ที่เก็บรักษาโดยการแช่เยือกแข็ง ในระยะเวลา 5-7 ปี ยังสามารถคงคุณสมบัติที่นำมาใช้งานได้ จึงช่วยให้การใช้งานทางด้านคลินิกและวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกในอนาคตมีความเป็นไปได้สูงและมีประสิทธิภาพที่ดี การศึกษาครั้งนี้เราแสดงให้เห็นว่า การเก็บเซลล์ต้นกำเนิดในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 5-7 ปี ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลักษณะรูปร่างเซลล์ ทั้ง cSHED และ fSHED การแสดงออกของลักษณะเซลล์ fibroblast ที่เหมือนกัน การมีชีวิตรอด การสร้างหน่วยโคโลนี และการแบ่งตัวรวมทั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ทั้งสองกลุ่มไม่พบความแตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองก่อนหน้านี้ (20, 114) การวัดการรวมตัวเป็นกลุ่มของเซลล์พบว่าการหว่านเซลล์จำนาน 10 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตรทำให้ได้จำนวนกลุ่มโคโลนีสูง (77) อย่างไรก็ตาม การแบ่งตัวเจริญเติบโตในวันที่ 7 ในกลุ่ม cSHED มีค่าต่ำกว่ากลุ่ม fSHED อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งมีหลายปัจจัยที่ส่งผลให้การแบ่งตัวของเซลล์ต้นกำเนิดที่ผ่านการแช่เยือกแข็งลดน้อยลง ได้แก่ ขั้นตอนก่อนการแช่แข็งเซลล์ การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและระยะเวลาของการจัดเก็บ และขั้นตอนหลังการแช่แข็งเซลล์ (115) และสาเหตุการตายของเซลล์ส่วนใหญ่เกิดจากน้ำแข็งภายในเซลล์ระหว่างขั้นตอนการแช่เยือกแข็ง (90,116) อย่างไรก็ตามแม้เซลล์ที่ผ่านการแช่เยือกแข็งจะแบ่งตัวเจริญเติบโตได้น้อยในวันที่ 7 แต่

ยังคงสามารถทำหน้าที่ในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ชนิดอื่นได้ดี อย่างเช่นการศึกษาความสามารถในการเปลี่ยนไปเป็นเซลล์ชนิดอื่นของเซลล์ที่ผ่านการแช่เยือกแข็ง ทำการศึกษาการเปลี่ยนไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก (Osteogenic Differentiation) พบว่าเซลล์กลุ่มนี้สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกได้ ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้เกี่ยวข้องกับสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในอาหารชนิดพิเศษที่เลี้ยงเซลล์และแหล่งที่มาของเซลล์ แสดงให้เห็นถึงความสำคัญในการกำหนดการแสดงออกฟีโนไทป์ของเซลล์ต้นกำเนิด (117) ด้วยเหตุนี้ SHED จึงเป็นที่สนใจในการใช้เซลล์ต้นกำเนิดทางทันตกรรมเพื่อใช้งานการแพทย์ทางเลือกใหม่ (Regenerative medicine) (118, 119) ที่สำคัญใช้เซลล์จำนวนค่อนข้างน้อย (ประมาณ 1×10^6 เซลล์) สำหรับการใช้งานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (119, 120) จากการศึกษาความสามารถในการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ชนิดอื่นนั้นพบข้อจำกัดในการหว่านจำนวนเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยง หากมีจำนวนเซลล์ที่มากเกิน ส่งผลให้เกิดความเสียหายในการทดสอบ กล่าวคือ มีผลให้เซลล์ที่เพาะเลี้ยงไว้หลุดลอกออกเป็นแผ่นในระหว่างการทดลอง จากการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่าการหว่านเซลล์จำนวน 800-1000 เซลล์ต่อพื้นที่ตารางเซนติเมตรของจานเพาะเลี้ยงนั้น นับว่าเป็นจำนวนเหมาะสมสุดในการแบ่งตัวเจริญเติบโตได้ผลผลิต (yield)สูงสุดเหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยงในระยะเวลายาวนาน นอกจากนี้พบว่ารูปร่างของเซลล์มีลักษณะเรียวเป็นกระสวยอีกด้วย (121) และผลการศึกษาการวัดปริมาณการสร้างก้อนแร่ธาตุพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทั้งสองกลุ่ม เช่นเดียวกับการทดลองก่อนหน้านี้ (95) อย่างไรก็ตามได้มีงานวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดที่ทำละลายหลังการแช่แข็งมีการลดลงของการแสดงเครื่องหมายบนผิวเซลล์ เช่น CD90 และ CD166 (122) ซึ่ง CD 166 เป็นโปรตีนที่พบในเซลล์ต้นกำเนิดซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกและโบนโมโฟจินิซิส (bone morphogenesis) ชักนำให้เกิดการสร้างและการเปลี่ยนแปลงและช่วยคุมควบการสร้างกระดูก (123) และ CD 90 เป็นโปรตีนจำเพาะในเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์มอล ซึ่งเป็นตัวบ่งบอกการเจริญเติบโตของเซลล์สร้างกระดูก ซึ่งมีการเพิ่มจำนวนน้อยลงเมื่อเกิดกระบวนการจับตัวของแร่ธาตุเกิดขึ้นภายในเซลล์ (124) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่า การใช้สนามแม่เหล็กในการเก็บรักษาเซลล์ต้นกำเนิดทางทันตกรรม ช่วยเพิ่มความสามารถในการเปลี่ยนไปเป็นเซลล์คล้ายเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast like cell) (125) สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าสนามแม่เหล็กช่วยช่วยเพิ่มศักยภาพการแสดงเป็นเซลล์สร้างกระดูกได้ดีกว่ากลุ่มที่เก็บรักษาแบบลดอุณหภูมิลงช้าๆ (94, 95,109) ดังนั้น ผลการศึกษานี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้งานเพื่อการเก็บรักษาเซลล์ต้นกำเนิดในครั้งต่อๆไป เพื่อให้เซลล์ยังคงแสดงออกของการสร้างเซลล์กระดูก

สำหรับการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างก้อนไขมันของเซลล์ทั้ง 2 กลุ่มนั้น การศึกษาครั้งนี้พบว่าเซลล์มีการสร้างก้อนไขมันทั้งสองกลุ่ม และสามารถตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ด้วยการย้อมสี Oil red O (126) อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ พบการสร้างก้อนไขมันในปริมาณที่น้อย อาจเพราะใช้ระยะเวลาในการเหนี่ยวนำเพียง 4 สัปดาห์ ซึ่ง Muira และคณะ(9) ได้รายงานก่อนหน้านี้ว่า หลังจากสัปดาห์ที่ 5 ของการเหนี่ยวนำ มีเพียงร้อยละ 5 ของเซลล์ที่เลี้ยงที่มีความสามารถสร้างในการสร้างก้อนไขมัน แสดงให้เห็นว่าเซลล์ต้นกำเนิดที่ผ่านเก็บรักษาเป็นระยะเวลานาน 5-7 ปี ยังคงรักษาคุณสมบัติการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ไขมัน เซลล์กระดูก สำหรับเซลล์กระดูกอ่อนไม่ได้ดำเนินการทดสอบในการศึกษาครั้งนี้ และเนื่องจากข้อกำหนดของ International Society for Cellular Therapy (ISCT) ซึ่งได้กำหนดไว้ในปี 2006 ว่าเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคมอล ควรยึดเกาะติดพื้นผิวจานเพาะเลี้ยงได้ มีการแสดงออกเครื่องหมายบนผิวเซลล์ได้แก่ CD105,CD73, CD90 และไม่แสดงออกเครื่องหมายบนผิวเซลล์ได้แก่ CD45, CD34, CD14 หรือ CD11b, CD79α, CD19 และ HLA-DR และสามารถมีเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ชนิดอื่นได้น้อยสุด 3 สายสกุล (lineages) ได้แก่ เซลล์สร้างกระดูก เซลล์สร้างไขมัน และเซลล์สร้างกระดูกอ่อน โดยทำการตรวจสอบด้วยวิธีการย้อมด้วยสีในเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ (127) ดังนั้นในการศึกษาครั้งต่อไป จึงควรทดสอบการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกอ่อน การแสดงออกเครื่องหมายบนผิวเซลล์ และทำการทดลองในสัตว์ทดลองเพื่อศึกษาการสร้างและฟื้นฟูกระดูกใหม่ เพื่อเป็นเหตุผลยืนยันได้ชัดเจนยิ่งขึ้นของความสามารถและคุณสมบัติของเซลล์ที่ผ่านการแช่เยือกแข็งในระยะเวลานานถึง 5-7 ปี

จากการศึกษาครั้งนี้ ใช้สารป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งชนิด DMSO ความเข้มข้นร้อยละ 10 เช่นเดียวงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ทำการศึกษาเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อส่วนปลายราก พบอัตราการฟื้นตัวร้อยละ 73 (110) ซึ่งอัตราส่วนนี้ได้ถูกนำไปใช้ในการเก็บรักษาเนื้อเยื่อและเซลล์ต้นกำเนิดทางทันตกรรม เช่น เซลล์ต้นกำเนิดเนื้อเยื่อปริทันต์ (19) และเซลล์ต้นกำเนิดเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันแท้ (128) ที่ทำการเก็บรักษาเป็นเวลา 6 เดือนและ 2 ปี ตามลำดับ

นอกจากนี้ ได้มีการศึกษาค้นพบวิธีการเพิ่มศักยภาพสารป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งในการแช่เยือกแข็งเซลล์ต้นกำเนิดต้นกำเนิด เพื่อเพิ่มอัตราการมีชีวิตของเซลล์หลังการทำละลาย เช่น การใช้ทรีฮาโลส (trehalose) ซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่มีคุณสมบัติป้องกันการเสียสภาพของโปรตีน โดยเฉพาะอย่างยิ่งภายใต้สภาพเยือกแข็งหรือ อุณหภูมิต่ำและป้องกันการสูญเสียน้ำระหว่างการทำละลาย (129) ซึ่งการศึกษาพบว่า ทรีฮาโลสจะช่วยปกป้องเซลล์และช่วยเพิ่มการมีชีวิตของเซลล์สัตว์ที่ผ่านการแช่เยือกแข็ง (130, 131) สอดคล้องกับการศึกษาของ De Rosa และคณะ (132) ที่ใช้ DMSO ร้อยละ 4 + trehalose ร้อยละ 6 + FBS ร้อยละ 90 เป็นสารป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็ง พบว่าเป็นอัตราส่วนเหมาะสมสำหรับการใช้เก็บรักษาแช่เยือกแข็งเซลล์ ทำให้เซลล์มีชีวิตรอดเพิ่มขึ้น เพิ่มประสิทธิภาพในการเปลี่ยนไปเป็นเซลล์ชนิดอื่น และลดผลกระทบจากการใช้

DMSO นอกจากสารป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็ง ที่อาจจะมีผลต่อการฟื้นตัวของเซลล์หลังการทำละลายแล้ว วิธีการคัดแยกเซลล์ยังส่งผลต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์ต้นกำเนิดจากฟันด้วยเช่นกัน จากงานวิจัยของ Ding และคณะ (110) ศึกษาการเก็บรักษาเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อส่วนปลายราก (SCAP) ด้วยวิธีการแช่เยือกแข็งทำการลดอุณหภูมิให้เป็นไปอย่างช้าจากอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง -20 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง -80 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมงและ -196 องศาเซลเซียส นาน 6 เดือน พบอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 73 ในขณะที่การแช่เซลล์เนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันน้ำนมที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้น ลดอุณหภูมิลง 1 องศาเซลเซียสต่อนาที ไปจนถึง -80 องศาเซลเซียส เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 3-9 เดือน พบอัตราการเจริญเติบโตเพียงแค่ร้อยละ 43 (133) อาจเป็นเพราะการศึกษานี้ คัดแยกเซลล์ด้วยวิธีการไม่ใช้เอนไซม์ (outgrowth) ซึ่งจากการศึกษาพบว่า วิธีการคัดแยกเซลล์ต้นกำเนิดเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันน้ำนมด้วยวิธีการใช้เอนไซม์ย่อยสลายเนื้อเยื่อ (enzymatic digestion) มีผลทำให้การแบ่งตัวเจริญเติบโต การรวมตัวเป็นกลุ่ม การแสดงเครื่องหมายบนผิวเซลล์ (Stro-1, CD146) สูงกว่ากลุ่มเซลล์ที่คัดแยกด้วยวิธีการไม่ใช้เอนไซม์ (outgrowth) และมีความสามารถในการเปลี่ยนไปเป็นเซลล์สร้างไขมันได้ดีกว่า (134)

2. สรุปผลการวิจัย

การเก็บรักษาเซลล์ต้นกำเนิดเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันน้ำนม ที่คักแยกด้วยวิธีการย่อยด้วยเอนไซม์ ในสารป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็ง (cryoprotectant) ที่มี DMSO ร้อยละ 10 โดยวิธีลดอุณหภูมิลดลงช้าๆเป็นระยะเวลานาน 5-7 ปี เซลล์ยังคงความสามารถในการแบ่งตัวเจริญเติบโต การรวมตัวเป็นกลุ่ม และความสามารถในการเปลี่ยนเป็นเซลล์กระดูก และเซลล์สร้างก้อนไขมันได้ตามคุณสมบัติพื้นฐานจำเพาะของเซลล์ต้นกำเนิด

3. ข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยครั้งต่อไป

การวิจัยในครั้งนี้จำกัดเพียงขั้นตอนการศึกษาคุณสมบัติเซลล์ต้นกำเนิดที่ผ่านการแช่เยือกแข็งเป็นระยะเวลา 5-7 ปี ซึ่งสามารถสรุปผลการเสนอแนะได้ ดังต่อไปนี้

1. ผลการวิจัยครั้งนี้ สามารถพิสูจน์ได้ว่าเซลล์ที่ผ่านการเก็บรักษาเซลล์ต้นกำนิดในระยะเวลา 5-7 ปี สามารถนำไประยุกต์ใช้งานในด้านการบำบัดรักษาด้วยเซลล์ต้นกำเนิด ธนาคารเซลล์ต้นกำเนิดได้

2. เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการฟื้นตัวของเซลล์ต้นกำเนิดหลังการทำลายละลายให้มีอัตราการมีชีวิตรอดมากยิ่งขึ้น ต้องปรับปรุงเทคนิคในห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) ในขั้นตอนการเก็บรักษา เช่น การใช้สนามแม่เหล็กในขั้นตอนการเก็บรักษา และการใช้สารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งที่เหมาะสม

3. การวิจัยครั้งนี้ ยังขาดการตรวจสอบการเหนี่ยวนำให้เป็นเซลล์สร้างกระดูกอ่อนเพื่อพิสูจน์ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคมอล และการทดลองในสัตว์ทดลองเพื่อตรวจสอบความสามารถในการสร้างกระดูกเพื่อเป็นข้อมูลและมีเหตุผลเพียงพอในการใช้งานกับผู้ป่วยได้ในอนาคต

บรรณานุกรม

1. Proffit WR, Fields HW. Contemporary orthodontics. 2nd ed. ***Am J Orthod Dentofacial Orthoped***. 1993;104(6):620.

2. อำพร แดงแสงทอง, คัดเค้า วงษ์สวรรค์, ปานทิพย์ สวัสดิมงคล. อุบัติการณ์ของการเกิดปากแหว่งและเพดานโหว่ในโรงพยาบาลศิริราชในปีพ.ศ.2530. ***สารศิริราช***. 2531;40:741-4.

3. Shapira Y, Kuftinec MM, Borell G, Lubit E. The distribution of clefts of the primary and secondary palates by sex, type, and location. ***Angle Orthod***. 1999;69(6):523-8.

4. บวรศิลป์ เชาวน์ชื่น, เบญจมาศ พระธานี, สุธีรา ประดับวงษ์. คู่มือผู้ปกครองแนวทางการดูแลรักษาผู้ที่มีภาวะปากแหว่งเพดานโหว่. พิมพ์ครั้งที่.1 ขอนแก่น: ศูนย์วิจัยผู้ป่วยปากแหว่ง เพดานโหว่และความพิการแต่กำเนิดของศีรษะและใบหน้าคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2554.

5. มารศรี ชัยวรวิทย์กุล. การจัดการรอยแยกกระดูกเบ้าฟัน.ใน: การดูแลผู้ป่วยปากแหว่งเพดานโหว่สำหรับทันตแพทย์และทันตแพทย์จัดฟัน เล่ม2. พิมพ์ครั้งที่ 1,. เชียงใหม่: ทรีโอ แอดเวอร์ไทซิ่ง แอนด์ มีเดีย; 2555. หน้า 49-85.

6. Boyne PJ, Sands NR. Secondary bone grafting of residual alveolar and palatal clefts. ***J Oral Surg***. 1972; 30(2):87-92.

7. Bergland O, Semb G, Abyholm F, Borchgrevink H, Eskeland G. Secondary bone grafting and orthodontic treatment in patients with bilateral complete clefts of the lip and palate. ***Ann Plast Surg***. 1986; 17(6):460-74.

8. Tai CC, Sutherland IS, McFadden L. Prospective analysis of secondary alveolar bone grafting using computed tomography. ***J Oral Maxillofac Surg***. 2000; 58(11):1241-9.

9. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. ***Proc Natl Acad Sci U S A***. 2003; 100(10):5807-12.

10. Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D, Stukart-Parsons GC, Gomes Massironi SM, Pereira LV, et al. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. ***Cells Tissues Organs***. 2006; 184(3-4):105-16.

11. วิทยา ยินดีเดช. สเต็มเซลล์จากฟันและความสามารถในการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์จำเพาะมีเซงไคม์ต่างๆ. ใน: สถาบันวิจัยและประเมินเทคโนโลยีทางการแพทย์ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธาณสุข. วิชาการ กรมการแพทย์ Stem cells 2. 2554;1:31-9.

12. Huang YH, Yang JC, Wang CW, Lee SY. Dental stem cells and tooth banking for regenerative medicine. ***J Exp Clin Med***. 2010;2(3):111-7.

13. Penmetcha S, Arali V. Cryopreservation of teeth: freeze them now to use later. ***J Clin Diagn Res***. 2011;5(4):899-902.

14. Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. ***Nature***. 1949;164(4172):666.

15. Jackson MC, Richardson DW. The use of fresh and frozen semen in human artificial insemination. ***J Biosoc Sci***. 1977;9(2):251-62.

16. Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. ***Nature.*** 1985;313(6003):573-5.

17. Kuleshova L, Gianaroli L, Magli C, Ferraretti A, Trounson A. Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report. ***Hum Reprod***. 1999;14(12):3077-9.

18. Woods EJ, Wells HB. 002 Cryobiology in the future. ***Cryobiology***. 2013;67(3):398.

19. Seo BM, Miura M, Sonoyama W, Coppe C, Stanyon R, Shi S. Recovery of stem cells from cryopreserved periodontal ligament. ***J Dent Res***. 2005;84(10):907-12.

20. Ma L, Makino Y, Yamaza H, Akiyama K, Hoshino Y, Song G, et al. Cryopreserved dental pulp tissues of exfoliated deciduous teeth is a feasible stem cell resource for regenerative medicine***. PLOS ONE***. 2012;7(12):1-15.

21. Kiatpongsan S, Tannirandorn Y, Virutamasen P. Introduction to stem cell medicine. ***J Med Assoc Thai***. 2006;89(1):111-7.

22. Sylvester K, Longaker M. Stem cells - review and update. ***Arch Surg***. 2004;139:93-9.

23. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. ***Cell Tissue Kinet***. 1987;20(3):263-72.

24. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. ***Cell Prolif***. 1970;3(4):393-403.

25. พัฒนา เต็งอำนวย. ข้อคิดเกี่ยวกับสเต็มเซลล์บำบัด: Stem Cell Therapy. ***วารสารสำนักการแพทย์ทางเลือก***. 2555;5(2):19-27.

26. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. ***Nature***. 1981;292(5819):154-6.

27. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. ***Proc Natl Acad Sci U S A***.. 1981;78(12):7634-8

28. Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Becker RA, et al. Isolation of a primate embryonic stem cell line. ***Proc Natl Acad Sci U S A***. 1995;92(17):7844-8.

29. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. ***Science.*** 1998;282(5391):1145-7.

30. Nelson TJ, Behfar A, Yamada S, Martinez-Fernandez A, Terzic A. Stem cell platforms for regenerative medicine. ***Clin Transl Sci***. 2009;2(3):222-7.

31. Solter D. From teratocarcinomas to embryonic stem cells and beyond: a history of embryonic stem cell research. ***Nat Rev Genet***. 2006;7(4):319-27.

32. Kode JA, Mukherjee S, Joglekar MV, Hardikar AA. Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration. ***Cytotherapy***. 2009;11(4):377-91.

33. François M, Galipeau J. New insights on translational development of mesenchymal stromal cells for suppressor therapy. ***J Cell Physiol***. 2012;227(11):3535-8.

34. Giordano A, Galderisi U, Marino IR. From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells. ***J Cell Physiol***. 2007;211(1):27-35.

35. Le Blanc K. Mesenchymal stromal cells: Tissue repair and immune modulation. ***Cytotherapy***. 2006;8(6):559-61.

36. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Götherström C, Hassan M, Uzunel M, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells**.** ***Lancet***. 2004;363(9419):1439-41.

37. Weng JY, Du X, Geng SX, Peng YW, Wang Z, Lu ZS, et al. Mesenchymal stem cell as salvage treatment for refractory chronic GVHD. ***Bone Marrow Transplant***. 2010;45(12):1732-40.

38. Tan J, Wu W, Xu X, Liao L, Zheng F, Messinger S, et al. Induction therapy with autologous mesenchymal stem cells in living-related kidney transplants. ***JAMA***.2012;(11):1169.

39. สมเกียรติ โพธิสัตย์, จีราพร หิรัญธรรม. พื้นฐานเซลล์ต้นกำเนิด.ใน: สถาบันวิจัยและประเมินผลเทคโนโลยีทางการแพทย์ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. วิชาการ กรมการแพทย์ Stem cells . 2552;1:2-14.

40. Körbling M, Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair — a new therapeutic concept? ***New Engl J Med***. 2003;349(6):570-82.

41. Tsonis PA. Bridging knowledge gaps on the long road to regeneration: classical models meet stem cell manipulation and bioengineering. ***Mol Interv***. 2007;7(5):249-50.

42. Mitalipov S, Wolf D. Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. ***Adv Biochem Eng Biotechnol***. 2009;114:185-99.

43. Yu J, Thomson JA. Pluripotent stem cell lines. ***Gene Dev***. 2008;22(15):1987-97.

44. ทัศนีย์ เพิ่มไทย. ความรู้เบื้องต้นของชีววิทยาเซลล์ต้นกำเนิด Overview of stem cell biology. ***เวชบันทึกศิริราช.*** 2554;4(3):73-82.

45. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. ***Cell***. 2007;131(5):861-72.

46. กรรณิการ์ ชูเกียรติมั่น. Stem cell and dental implantation. เอกสารประกอบการประชุมวิชาการ สถานบันทันตกรรม กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. 2552:16-50.

47. Ikeda E, Morita R, Nakao K, Ishida K, Nakamura T, Takano-Yamamoto T, et al. Fully functional bioengineered tooth replacement as an organ replacement therapy. ***Proc Natl Acad Sci U S A***. 2009;106(32):13475-80.

48. Mantesso A, Sharpe P. Dental stem cells for tooth regeneration and repair. ***Expet Opin Biol Ther***. 2009;9(9):1143-54.

49. Duailibi SE, Duailibi MT, Zhang W, Yelick PC, Asrican R, Vacanti JP. Bioengineered dental tissues grown in the rat jaw**. *J Dent Res***. 2008;87(8):745-50.

50. Nakao K, Morita R, Saji Y, Ishida K, Tomita Y, Ogawa M, et al. The development of a bioengineered organ germ method. ***Nat Methods***. 2007;4(3):227-30.

51. Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. ***PLOS ONE***. 2006;1(1):e79.

52. Otaki S, Ueshima S, Shiraishi K, Sugiyama K, Hamada S, Yorimoto M, et al. Mesenchymal progenitor cells in adult human dental pulp and their ability to form bone when transplanted into immunocompromised mice. ***Cell Biol Int***. 2007;31(10):1191-7.

53. Feng F, Akiyama K, Liu Y, Yamaza T, Wang TM, Chen JH, et al. Utility of PDL progenitors for in vivo tissue regeneration: a report of 3 cases. ***Oral Dis***. 2010;16(1):20-8.

54. Rouabhia M, Allaire P. Gingival mucosa regeneration in athymic mice using in vitro engineered human oral mucosa. ***Biomaterials***. 2010;31(22):5798-804.

55. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. ***Proc Natl Acad Sci U S A***. 2000;97(25):13625-30.

56. Iohara K, Nakashima M, Ishikawa M, Akamine A, Nakasima A, Ito M. Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2. ***J Dent Res***. 2004;83(8):590-5.

57. Park CH, Rios HF, Jin Q, Bland ME, Flanagan CL, Hollister SJ, et al. Biomimetic hybrid scaffolds for engineering human tooth-ligament interfaces. ***Biomaterials***. 2010;31(23):5945-52.

58. Willumeit R, Schossing M, Clemens H, Feyerabend F. In-vitro interactions of human chondrocytes and mesenchymal stem cells and of mouse macrophages with phospholipid-covered metallic implant materials. ***Eur Cell Mater***. 2007;13:11-24.

59. Yamamura T. Differentiation of pulpal cells and inductive influences of various matrices with reference to pulpal wound healing. ***J Dent Res***. 1985;64:530-40.

60. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. ***J Orthop Res***. 1991;9(5):641-50.

61. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. ***Proc Natl Acad Sci U S A***. 2000;97(25):13625-30.

62. Nakamura S, Katagiri W, Sugito T, Ito K, Ueda M, Yamada Y. 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***. 2009;35(11):1536-42.

63. Nourbakhsh N, Kiyani GA, Rabiei F, Soleimani M, Taghipour Z, Mardani M, et al. Induced in vitro differentiation of neural-like cells from human exfoliated deciduous teeth-derived stem cells. ***Int J Dev Biol***. 2011;55(2):189-95.

64. Chadipiralla K, Yochim J, Bahuleyan B, Huang CY, Garcia-Godoy F, Murray PE, et al. Osteogenic differentiation of stem cells derived from human periodontal ligaments and pulp of human exfoliated deciduous teeth. ***Cell Tissue Res***. 2010;340(2):323-33.

65. Sakai VT, Zhang Z, Dong Z, Neiva KG, Machado MA, Shi S, et al. SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium. ***J Dent Res***. 2010;89(8):791-6.

66. Yoshida T, Washio K, Iwata T, Okano T, Ishikawa I. Current status and future development of cell transplantation therapy for periodontal tissue regeneration. ***Int J Dent*** 2012 16;2012:307024.

67. Acharya A, Shetty S, Deshmukh V. Periodontal ligament stem cells: an overview. ***J Oral Biosci***. 2010;52(3):275-82.

68. Sonoyama W, Yamaza T, Shi S, Liu Y, Wang S, Tuan RS, et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. ***J Endod.*** 2008;34(2):166-71.

69. Morsczeck C, Schierholz J, Möhl C, Sippel C, Hoffmann KH, Götz W, et al. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. ***Matrix Biol***. 2005;24(2):155-65.

70. Kémoun P, Laurencin-Dalicieux S, Rue J, Brunel G, Farges JC, Gennero I, et al. Human dental follicle cells acquire cementoblast features under stimulation by BMP-2/-7 and enamel matrix derivatives (EMD) in vitro. ***Cell Tissue Res***. 2007;329(2):283-94.

71. Morsczeck C, Schmalz G, Reichert T, Völlner F, Galler K, Driemel O. Somatic stem cells for regenerative dentistry. ***Clin Oral Investig***. 2008;12(2):113-8.

72. Abbas A, Diakonov I, Sharpe P. Neural Crest Origin of Dental Stem Cells. Pan European Federation of the International Association for Dental Research (PEF IADR) Seq #96-Oral Stem Cells Abs 0917, 2008

73. Annibali S, Cristalli MP, Tonoli F, Polimeni A. Stem cells derived from human exfoliated deciduous teeth: a narrative synthesis of literature. ***Eur Rev Med Pharmacol Sc.*** 2014;18(19):2863.

74. Govindasamy V, Abdullah AN, Ronald VS, Musa S, Zain RB, Totey S. et al. Inherent differential propensity of dental pulp stem cells derived from human deciduous and permanent teeth. ***J Endod.*** 2010;36(9):1504-15.

75. Wang X, Sha XJ, Li GH, Yang FS, Ji K, Wen LY, et al. Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells. ***Arch Oral Biol***. 2012;57(9):1231-40.

76. Wang J, Wei X, Ling J, Huo Y, Huang Y, Zhou Y. The presence of a side population and its marker ABCG2 in human deciduous dental pulp cells. ***Biochem Biophys Res Comm***. 2010;400(3):334-9.

77. Sukarawan W, Kerdpon P, Nowwarote N, Pavasant P, Osathanon T. Effect of basic fibroblast growth factor on pluripotent marker expression and colony forming unit capacity of stem cells isolated from human exfoliated deciduous teeth. ***Odontology***. 2014;102(2):160-6.

78. Nikoli**Ć** N, Krsti**Ć** A, Trivanovi**Ć** D, Mojsilovi**Ć** S, Koci**Ć** J, Santibanez JF, et al. Mesenchymal stem cell properties of dental pulp cells from deciduous teeth**.** ***Arch Biol Sci***. 2011;63(4):933-42.

79. Nishino Y, Ebisawa K, Okabe K, Ueda M, Kamei Y, Yamada Y. Human deciduous teeth dental pulp cells with basic fibroblast growth factor enhance wound healing of skin defect. ***J Craniofac Surg***. 2011;22(2):438-42.

80. Hara K, Yamada Y, Nakamura S, Umemura E, Ito K, Ueda M. Potential characteristics of stem cells from human exfoliated deciduous teeth compared with bone marrow–derived mesenchymal stem cells for mineralized tissue-forming cell biology. ***J Endod***. 2011;37(12):1647-52.

81. Vakhrushev IV, Suzdaltseva YG, Burunova VV, Karalkin PA, Lupatov AY, Yarygin KN. Mesenchymal cells of the deciduous tooth pulp: cytophenotype and initial evaluation of possibility of their use in bone tissue engineering. ***Bull Exp Biol Med***. 2010;149(1):161-5.

82. Gotlieb EL, Murray PE, Namerow KN, Kuttler S, Garcia-Godoy F. An ultrastructural investigation of tissue-engineered pulp constructs implanted within endodontically treated teeth. ***J Am Dent Assoc***. 2008;139(4):457-65.

83. Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T, Zhang Z, Miyazawa M, Shi S, et al. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. ***J Endod***. 2008;34(8):962-9.

84. Zheng Y, Liu Y, Zhang CM, Zhang HY, Li WH, Shi S, et al. Stem cells from deciduous tooth repair mandibular defect in swine. ***J Dent Res***. 2009;88(3):249-54.

85. Arora V, Arora P, Munshi A. Banking stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED): saving for the future. ***J Clin Pediatr Dent***. 2009;33(4):289-94.

86. Estrela C, Alencar AH, Kitten GT, Vencio EF, Gava E. Mesenchymal stem cells in the dental tissues: perspectives for tissue regeneration. ***Braz Dent J***. 2011;22(2):91-8.

87. Petrovic V, Stefanovic V. Dental tissue--new source for stem cells. ***Sci World J***. 2009;9:1167-77.

88. Wang J, Wang X, Sun Z, Wang X, Yang H, Shi S, et al. Stem cells from human-exfoliated deciduous teeth can differentiate into dopaminergic neuron-like cells. ***Stem Cell Dev***. 2010;19(9):1375-83.

89. Kuleshova L, Gianaroli L, Magli C, Ferraretti A, Trounson A. Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report. ***Hum Reprod***. 1999;14(12):3077-9.

90. Woods EJ, Benson JD, Agca Y, Critser JK. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. ***Cryobiology***. 2004;48(2):146-56.

91. สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์. เทคนิคการเก็บรักษาจุลินทรีย์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. 2539;ครั้งที่2:194

92. ดวงใจ บุญกุศล. Oocyte gryopreservation for medical application. ***วารสารวิจัยทางวิทยาศาสตร์สุขภาพ.*** 2551;2(1).

93. Jetanin Institute for Assisted Reproduction. Sperm freezing. [Web]. 2013. [Cited 2014 December4].Available from http://www.jetanin.com/en/service/technology_detail/10.

94. Kaku M, Kamada H, Kawata T, Koseki H, Abedini S, Kojima S, et al. Cryopreservation of periodontal ligament cells with magnetic field for tooth banking. ***Cryobiology***. 2010;61(1):73-8.

95. Lee SY, Huang GW, Shiung JN, Huang YH, Jeng JH, Kuo TF, et al. Magnetic cryopreservation for dental pulp stem cells. ***Cells Tissues Organs***. 2012;196(1):23-33.

96. Kawata T, Abedini S, Kaku M, Koseki H, Kojima S, Sumi H, et al. Effects of DMSO (Dimethyl sulfoxide) free cryopreservation with program freezing using a magnetic field on periodontal ligament cells and dental pulp tissues. ***Biomed Res***. 2012;23(3): 438-43

97. Lin SL, Chang WJ, Lin CY, Hsieh SC, Lee SY, Fan KH, et al. Static magnetic field increases survival rate of dental pulp stem cells during DMSO-free cryopreservation. ***Electromagn Biol Med***. 2014; 23:1-7.

98. Takeda F. The effect of a magnetic field on water treatment. ***Water purification and liquid wastes treatment***. 1991;32:515-7.

99. Aleksandrov VD, Barannikov AA, Dobritsa NV. Effect of magnetic field on the supercooling of water drops. ***Inorg Mater***. 2000;36(9):895-8.

100. Lin CY, Wei PL, Chang WJ, Huang YK, Feng SW, Lin CT, et al. Slow freezing coupled static magnetic field exposure enhances cryopreservative efficiency—a study on human erythrocytes. ***PLOS ONE***. 2013;8(3):e58988.

101. Mukaida T, Wada S, Takahashi K, Pedro PB, An TZ, Kasai M. Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8-cell mouse embryos. ***Hum Reprod.*** 1998;13(10):2874-9.

102. Liebermann J, Tucker MJ. Effect of carrier system on the yield of human oocytes and embryos as assessed by survival and developmental potential after vitrification. ***Reproduction.*** 2002;124(4):483-9.

103. Coburn RJ, Henriques BL, Francis LE. The development of an experimental tooth bank using deep freeze and tissue culture techniques. ***J Oral Ther Pharmacol***. 1966;2(6):445-50.

104. Schwartz O. Cryopreservation as long-term storage of teeth for transplantation or replantation. ***Int J Oral Maxillofac Surg***. 1986;15(1):30-2.

105. Oh YH, Che ZM, Hong JC, Lee EJ, Lee SJ, Kim J. Cryopreservation of human teeth for future organization of a tooth bank-a preliminary study. ***Cryobiology***. 2005;51(3):322-9.

106. Chang PC, Huang HM, SY. L. Influences of magnetic cryopreservation on the dental pulp stem cells. MSD thesis,Taipei Medical University,Taipei. 2010.

107. Berz D, McCormack EM, Winer ES, Colvin GA, Quesenberry PJ. Cryopreservation of Hematopoietic Stem Cells. ***Am J Hematol***. 2007; 82(6): 463–72.

108. Lee SY, Huang GW, Shiung JN, Huang YH, Jeng JH, Kuo TF, et al. Magnetic cryopreservation for dental pulp stem cells. ***Cells Tissues Organs***. 2012;196(1):23-33

109. Lee SY, Chiang PC, Tsai YH, Tsai SY, Huang HM, Jeng JH, et al. Effects of cryopreservation of intact teeth on the isolated dental pulp stem cells. ***J Endod***. 2010;36(8):1336-40.

110. Ding G, Liu Y, Zhang C, Wang S, Wang W, An Y, et al. Effect of cryopreservation on biological and immunological properties of stem cells from apical papilla. ***J Cell Physiol***. 2010;223(2):415-22.

111. Eslaminejad MB, Vahabi S, Shariati M, Nazarian H. In vitro growth and characterization of stem cells from human dental pulp of deciduous versus permanent teeth. ***J Dent (Tehran).*** 2010;7(4):185-95.

112. Marrelli M, Tatullo M, Paduano F. Cells isolated from human periapical cysts express mesenchymal stem cell-like properties. ***Int J Biol Sci***. 2013;9(10):1070-8.

113. Leite MF, Ganzerla E, Marques MM, Nicolau J. Diabetes induces metabolic alterations in dental pulp. ***J Endod***. 2008;34(10):1211-4.

114. Tancharoen S, Tengrungsun T, Suddhasthira T, Kikuchi K, Vechvongvan N, Tokuda M. Overexpression of receptor for advanced glycation end products and high-mobility group box 1 in human dental pulp inflammation. ***Mediat Inflamm*** 2014;2014:754069.

115. Hubel A. Parameters of cell freezing: implications for the cryopreservation of stem cells. ***Transfus Med Rev***. 1997;11(3):224-33.

116. Rowley SD, Feng Z, Chen L, Holmberg L, Heimfeld S, MacLeod B, et al. A randomized phase III clinical trial of autologous blood stem cell transplantation comparing cryopreservation using dimethylsulfoxide vs dimethylsulfoxide with hydroxyethylstarch. ***Bone Marrow Transplant***. 2003;31(11):1043.

117. Fuchs E, Tumbar T, Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. ***Cell.*** 2004;116(6):769-78.

118. Rosa V, Botero TM, Nör JE. Regenerative endodontics in light of the stem cell paradigm. ***Int Dent J***. 2011;61:23-8.

119. Rosa V, Zhang Z, Grande RH, Nör JE. Dental pulp tissue engineering in full-length human root canals. ***J Dent Res***. 2013;92(11):970-5.

120. Ikeda H, Sumita Y, Ikeda M, Ikeda H, Okumura T, Sakai E, et al. Engineering bone formation from human dental pulp- and periodontal ligament-derived cells. ***Ann Biomed Eng***. 2011;39(1):26-34.

121. Govindasamy V, Ronald VS, Totey S, Din SB, Mustafa WM, Totey S, et al. Micromanipulation of culture niche permits long-term expansion of dental pulp stem cells--an economic and commercial angle. ***In Vitro Cell Dev Biol Anim***. 2010;46(9):764-73.

122. Haack-Sorensen M, Bindslev L, Mortensen S, Friis T, Kastrup J. The influence of freezing and storage on the characteristics and functions of human mesenchymal stromal cells isolated for clinical use. ***Cytotherapy***. 2007;9(4):328-37

123. Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. ***J Cell Biochem***. 1997;64(2):278-94.

124. Chen XD, Qian HY, Neff L, Satomura K, Horowitz MC. Thy-1 antigen expression by cells in the osteoblast lineage. ***J Bone Miner Res***. 1999;14(3):362-75.

125. Hsu SH, Chang JC. The static magnetic field accelerates the osteogenic differentiation and mineralization of dental pulp cells. ***Cytotechnology***. 2010;62(2):143-55.

126 Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. ***Int J Biochem Cell Biol***. 2004;36(4):568-84.

127. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. ***Cytotherapy***. 2006;8(4):315-7.

128. Papaccio G, Graziano A, d'Aquino R, Graziano MF, Pirozzi G, Menditti D, et al. Long-term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBP-DPSCs) and their differentiated osteoblasts: a cell source for tissue repair. ***J Cell Physiol***. 2006;208(2):319-25.

129. Yingngam B, Supaka N, Rungseevijitprapa W. Cyoprotectants for concentration and stability improvement of niosomes. The 4th Annual Northeast Pharmacy Research Conference of 2012 “Pharmacy Profession in Harmony” Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Thailand 2012;8(1):246-38.

130. Guo N, Puhlev I, Brown DR, Mansbridge J, Levine F. Trehalose expression confers desiccation tolerance on human cells. ***Nat Biotechnol***. 2000;18(2):168.

131. Eroglu A, Russo MJ, Bieganski R, Fowler A, Cheley S, Bayley H, et al. Intracellular trehalose improves the survival of cryopreserved mammalian cells. ***Nat Biotechnol***. 2000;18(2):163.

132. De Rosa A, De Francesco F, Tirino V, Desiderio V, Paino F, Papaccio G, et al. A new method for cryopreserving adipose-derived stem cells: An attractive and suitable large-scale and long-term cell banking technology. ***Tissue Eng.*** 2009;15(4):659-67.

133. Ji EH, Song JS, Kim SO, Jeon M, Choi BJ, Lee JH. Viability of pulp stromal cells in cryopreserved deciduous teeth. ***Cell Tissue Bank***. 2014;15(1):67-74.

134. Jeon M, Song JS, Choi BJ, Choi HJ, Shin DM, Jung HS, et al. In vitro and in vivo characteristics of stem cells from human exfoliated deciduous teeth obtained by enzymatic disaggregation and outgrowth. ***Arch Oral Biol.*** 2014;59(10):1013-23.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

วัสดุและอุปกรณ์

1. สารละลายการเลี้ยงเซลล์ในห้องปฏิบัติการ (Cell Culture Laboratory)

1.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด α-MEM (Alpha-minimum essential medium) pH 7.2

α-MEM (Invitrogen: Gibco, cat.no. 11900-24)	13.9 g.
$NaHCO_3$ (Merck, USA)	2.2 g.

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นจำนวน 800 ml. ปรับค่า pH 7.2 ด้วยสารละลายไฮโดรคลอริก (HCl) ปรับปริมาตรเป็น 1000 ml. กรองด้วยตัวกรองและเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.2 เอนไซม์คอลลาจิเนสชนิดที่ 1(Collagenases type I 30 mg/ml)

ผงคอลลาจิเนส (Sigma, USA, cat.no. C0130-100MG)	30 mg.
น้ำกลั่น	1 ml.

1.3 เอนไซม์ดิสเปส (Dispase 40 mg/ml)

ผงคอลลาจิเนส (Sigma, USA, cat.no. C0130-100MG)	30 mg.
น้ำกลั่น	1 ml.

1.4 สารละลายแอล-แอสคอร์บิคเอซิด (L-ascorbic acid 100 mM)

ผงแอล-แอสคอร์บิค เอซิด (Sigma,USA, cat.no. A4544-25G)	100 mg.
น้ำกลั่น	5.68 ml.
สารละลายแอสคอร์บิค เอซิด (100 mM)	50 µl
ในอาหารเลี้ยงเซลล์	100 ml

1.5 สารละลายเดกซาเมททาโซน (Dexamethasone 50 μM)

ผงเดกซาเมททาโซน (Sigma, USA, cat.no. D4902-25MG)	25 mg.
แอลกอฮอล์ความเข้มข้น 100%	1 ml.
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น (ความเข้มข้น 254.81 μM)	250 ml.
ปรับความเข้มข้นของ stock solution เป็น 250 μM จำนวน	100 ml.
ดูด stock solution เดิม (ความเข้มข้น 254.81 μM)	98.10 ml.
น้ำกลั่น	1.90 ml.
ได้ stock solution ใหม่ ที่ความเข้มข้น 250 μM	100 ml.
เตรียม working solution ความเข้มข้น 50 μM จำนวน	10 ml.
ดูด stock solution ใหม่ ที่ความเข้มข้น 250 μM	2 ml.
น้ำกลั่น	8 ml.
สารละลายเดกซาเมททาโซน (50 μM)	200 μl.
ในอาหารเลี้ยงเซลล์	100 ml.

1.6 สารละลายเบต้า-กลีเซอโรฟอสเฟต (β-glycerophosphate 1 M)

ผงเบต้า-กลีเซอโรฟอสเฟต (Sigma, USA, cat.no.G9891-25G)	21.64 g.
น้ำกลั่น	100 ml.
สารละลายเบต้า-กลีเซอโรฟอสเฟต (1 M)	1 ml.
ในอาหารเลี้ยงเซลล์	100 ml.

1.7 ยาปฏิชีวนะ (Antibiotics 20 %)

Penicillin	1,000,000 Unit/5ml.
Streptomycin	1 g/5ml.
Kanamycin	1 g/5ml.
Nycostatin	5 ml.
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น	100 ml.

1.8 การเตรียมสารละลาย Phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	8 g.
โปแทสเซียมคลไรด์ (KCl)	0.2 g.
โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	1.44 g.
โปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH2PO4)	0.24 g.

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นจำนวน 800 ml. ปรับค่า pH 7.2 ด้วยสารละลายไฮโดรคลอริก(HCl) ปรับปริมาตรเป็น 1000 ml. ฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส นาน 15 นาทีและเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. เทคนิคเอ็มทีที (MTT Assay)

2.1 สารละลาย MTT ความเข้มข้น 5 mg/ml

ผง MTT 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (Invitrogen, USA, cat.no. M6494-1G)	50 mg.
สารละลาย phosphate buffer saline (PBS)	10 ml.

3. การย้อมสีเซลล์ (Cell Staining)

3.1 การเตรียมสารละลาย paraformaldehyde ความเข้มข้น 4%

ผงพาราฟอร์มาลดีไฮด์ (Sigma, USA, cat.no.15,812-7)	4.21g.
สารละลาย phosphate buffer saline (PBS)	100 ml.

แหว่งสารละลายด้วยเครื่อง stirrer ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส หยดสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 1 หยด และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.2 การเตรียมสารละลาย formalin ความเข้มข้น 10%

ผงพาราฟอร์มาลดีไฮด์ (Sigma, USA, cat.no.15,812-7)	4.21g.
สารละลาย phosphate buffer saline (PBS)	100 ml.

3.3 การเตรียมสีย้อม Toluidine Blue O ความเข้มข้น 0.1%

ผงสี Toluidine blue O (Sigma, USA, cat.noT3260-25G)	0.01 g.
สารละลาย phosphate buffer saline (PBS)	9 ml.
สารละลาย paraformaldehyde ความเข้มข้น 4%	1 ml.

3.4 การเตรียมสีย้อม Alizarin Red O ความเข้มข้น 5%

ผงสี Alizarin red S (Sigma, USA, cat.no. A5533-25G)	0.5 g.
สารละลาย phosphate buffer saline (PBS)	10 ml.

ปรับค่า pH 4.2-4.3 ด้วยสารละลายไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์

3.5 การเตรียมสีย้อม Oil Red O ความเข้มข้น 30 %

ผงสี Oil red O (Sigma, USA, cat.no. D4902-25G)	0.5 g.
ทำละลายในสารละลาย isopropanol (100%)	10 ml.

ภาคผนวก ข

เอกสารรับรองความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมในงานวิจัย

ที่ ศธ 0521.1.03/ 0916

คณะทันตแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ตู้ไปรษณีย์เลขที่ 17
ที่ทำการไปรษณีย์โทรเลขคอหงส์
อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112

หนังสือฉบับนี้ให้ไว้เพื่อรับรองว่า

โครงการวิจัยเรื่อง "การวิเคราะห์คุณสมบัติเซลล์ต้นกำเนิดจากฟันน้ำนมหลังผ่านการแช่เยือกแข็ง"

รหัสโครงการ EC5705-12-P-LR

หัวหน้าโครงการ นางสาวอรอนงค์ ปานแก้ว

สังกัดหน่วยงาน นักศึกษาหลังปริญญา วิศวกรรมชีวการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ได้ผ่านการพิจารณาและได้รับความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมในการวิจัย (Research Ethics Committee) ซึ่งเป็นคณะกรรมการพิจารณาศึกษาการวิจัยในคนของคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ดำเนินการให้การรับรองโครงการวิจัยตามแนวทางหลักจริยธรรมการวิจัยในคนที่เป็นสากล ได้แก่ Declaration of Helsinki, the Belmont Report, CIOMS Guidelines และ the International Conference on Harmonization in Good Clinical Practice (ICH-GCP)

ในคราวประชุมครั้งที่ 5/2557 **เมื่อวันที่** 19 มิถุนายน 2557

ให้ไว้ ณ วันที่ 5 ส.ค. 2557

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทพญ.ศรีสุรางค์ สุทธปรียาศรี)
ประธานคณะกรรมการจริยธรรมในการวิจัย

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทพ.นพ.สุรพงษ์ วงศ์วัชรานนท์)

.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร. ทพญ.สุพัชรินทร์ พิวัฒน์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นพ.พรชัย สถิรปัญญา)

.....กรรมการ
(อาจารย์ ทพ.กมลพันธ์ เนื่องศรี)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทพญ.อังคณา เชียรมนตรี)

.....กรรมการ
(อาจารย์วศิน สุวรรณรัตน์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทพญ.สุวรรณา จิตภักดีบดินทร์)

ภาคผนวก ค

แบบเสนอโครงการวิจัยเพื่อการพิจารณารับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมในการวิจัย
คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

1. โครงการวิจัย

(ภาษาไทย) การวิเคราะห์คุณสมบัติเซลล์ต้นกำเนิดจากฟันน้ำนมหลังผ่านการแช่เยือกแข็ง

(ภาษาอังกฤษ) Analysis of Cryopreserved Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth

1.1 ประเภทของโครงการวิจัย

☐ Intervention ☑ Non Intervention

1.2 จำนวนสถานพยาบาลที่ร่วมวิจัย

☐ Multicenters (ในประเทศ)

☐ Multicenters (ร่วมกับต่างประเทศ)

☑ Single center

2. ชื่อ-ที่อยู่ หัวหน้าโครงการวิจัยและผู้ร่วมวิจัยทุกท่านที่สามารถติดต่อได้สะดวก **(กรณีที่เป็นนักศึกษาให้ระบุรายละเอียดของอาจารย์ที่ปรึกษาด้วย)**

ชื่อหัวหน้าโครงการ

(ภาษาไทย) …นางสาวอรอรนงค์ ปานแก้ว

(ภาษาอังกฤษ) Miss.Onanong Parnkaew

คุณวุฒิ วิทยาศาสตรบัณฑิต ตำแหน่งทาง -

ภาควิชา วิศวกรรมชีวการแพทย์ โทรศัพท์……089-9749905……....

อาจารย์ที่ปรึกษา

(ภาษาไทย) …ผศ.ดร สุทธาทิพย์ กมลมาตยากุล

(ภาษาอังกฤษ) Asst.Prof.Dr. SUTTATIP KAMOLMATYAKUL

คุณวุฒิ ทันตแพทยศาสตรดุษฎีบัณฑิต ตำแหน่งทางวิชาการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์

ภาควิชา ทันตกรรมป้องกัน โทรศัพท์ 074-287561 /0891983399

3. แหล่งทุนสนับสนุนการวิจัย

งบประมาณแผ่นดินและทุนอุดหนุนวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

4. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อวิเคราะห์ความสามารถในการแบ่งตัวเจริญเติบโต (Proliferation) ความสารถในการรวมตัวเป็นกลุ่ม (Clonogenic capacity) และความสารถในการแบ่งตัวเป็นเซลล์อื่นได้หลายชนิด (Multilineage Differentiation) ของเซลล์ต้นกำเนิดที่ผ่านการเก็บรักษาในระยะยาวในห้องปฏิบัติการ

5. การดำเนินการวิจัย

5.1 สถานที่ทำการวิจัย ศูนย์วิจัยกลาง คณะทันตแพทยศาสตร์

5.2 กรณีที่ดำเนินโครงการวิจัยที่โรงพยาบาลทันตกรรม

( ) มีค่าใช้จ่ายที่เกี่ยวข้องกับโรงพยาบาลทันตกรรม จำนวน.....บาทเพื่อเป็นค่า .....

( ) ได้ขออนุมัติให้ยกเว้นในเรื่อง.....(กรุณาแนบหนังสือที่ได้รับการอนุมัติให้ยกเว้น)

(✓) ไม่มีค่าใช้จ่ายที่เกี่ยวข้องกับโรงพยาบาลทันตกรรม

5.3ประชากรที่เข้ารับการศึกษา

5.3.1 เกณฑ์การคัดเลือก (Inclusion Criteria) ประชากร

<u>คัดเลือกฟันน้ำนมของเด็กทีมีสุขภาพแข็งแรง ไม่มีโรคประจำตัวโดยมีข้อบ่งชี้ในการถอนเพื่อการรักษาจากทันตแพทย์ผู้เชี่ยวชาญ ซึ่งเป็นฟันน้ำนมที่เริ่มโยกใกล้หลุด เนื่องจากฟันแท้ที่กำลังงอกขึ้นมาแทน เลือกเก็บได้ทั้งฟันตัด ฟันเขี้ยว และฟันกราม</u>

5.3.2 เกณฑ์การคัดออก (Exclusion Criteria) ประชากร

<u>โดยเลือกฟันน้ำนมที่ไม่มีรอยผุและรอยโรคปลายราก</u>

5.3.3 จำนวนประชากรทุกกลุ่ม

เด็กอายุ 6-10 ปี จำนวน 10 คน

5.3.3.การเพาะเลี้ยงเซลล์ (Cell culture)

<u>ภายหลังการถอนฟัน เก็บฟันตัวอย่างใส่ลงในหลอดพลาสติกที่มีฝาเกลียวปิดสนิทภายในบรรจุอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและนำมาเพาะเลี้ยงเซลล์ภายใน 24 ชั่วโมง ทำความสะอาดฟันด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เซลายน์ที่ปราศจากเชื้อ เพื่อกำจัดเลือดและสิ่งสกปรกออกจากตัวฟัน จากนั้นดึงเนื้อเยื่อออกจากโพรงฟัน นำมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ นำไปย่อย</u>

ด้วยเอนไซม์ที่ผสมด้วย คอลลาจิเนสชนิดที่ 1 ที่ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมิลลิลิตร (Gibco, USA)และดิสเปสที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เขย่าทุกๆ15 นาทีเพื่อการย่อยได้ดีขึ้น กรองสารละลายทั้งหมดด้วยด้วยเมมเบรนขนาด 70 ไมโครเมตร จากนั้นนำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 2000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และนำส่วนตกตะกอนไปเพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงขนาด 25 ตารางเซนติเมตรในอาหารเลี้ยงเซลล์แอลฟาเอ็มอีเอ็มที่มีฟีนอลเรด (α-MEM; Invitrogen: Gibco) ที่ผสม FBS (fetal bovine serum) 20% และยาปฏิชีวนะ 1% ที่ประกอบด้วย penicillin, streptomycin, Kanamycin และ Mycostatin จำนวน 3-5 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์วันเว้นวัน จนกระทั่งเซลล์เติบโตเต็มจานเลี้ยง เซลล์ที่ใช้สำหรับการทดลองเป็นเซลล์รุ่นที่ 3-4

5.4 สิ่งที่ผู้วิจัยต้องการศึกษา (Intervention) และจะให้ (Administer) กับประชากรที่เข้าร่วมการศึกษาต้องระบุรายละเอียด: ไม่มี

5.5 สิ่งที่ประชากรที่ศึกษาจะได้รับหรือจะต้องปฏิบัตินอกเหนือไปจากข้อ 5.4: ไม่มี

5.6 ระยะเวลาการวิจัย ใช้เวลาในการวิจัยประมาณ 6 เดือน

6. **ข้อพิจารณาด้านจริยธรรม**

6.1 เหตุผลและความจำเป็นที่ต้องวิจัยในคน

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า Seo และคณะได้ประสบผลสำเร็จการศึกษาคุณสมบัติเบื้องจากเซลล์ต้นกำเนิดเอ็นยึดปริทันต์ที่ผ่านกระบวนการแช่แข็งเป็นเวลา 3-6 เดือน เช่นเดียวกับ Ma และคณะที่พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันน้ำนมยังคงคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดไว้แม้ผ่านการแช่แข็งเป็นระยะเวลานาน (2-3 ปี) ดังนั้นในการศึกษานี้ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะนำเซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟันน้ำนมที่ผ่านการแช่เก็บรักษามาแล้วประมาณ 5-7 ปี มาตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดที่ผ่านการแช่เก็บรักษาในระยะยาวโดยนำกลับมาเพาะเลี้ยงใหม่ (cell recovery)เพื่อระบุความสามารถในการเกิดแบ่งตัว (Proliferation) ความสารถในการรวมตัวเป็นกลุ่ม (Clonogenic capacity) และความสารถในการแบ่งตัวเป็นเซลล์อื่นได้หลายชนิด (Multilineage Differentiation) โดยการศึกษาครั้งนี้ใช้เซลล์ passage 3-4 (P3-P4)ให้เซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟันน้ำนมที่ทำการคัดแยกกลุ่มใหม่ เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (Positive control)

6.2ประโยชน์ที่จะได้รับจากการวิจัยนี้ รวมทั้งประโยชน์ต่อประชากรที่เข้าร่วมในโครงการวิจัย

สามารถใช้เซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟันน้ำนมที่ผ่านการเก็บรักษาในระยะยาวมารักษาโรคในช่องปาก เช่น ปากแหว่งเพดานโหว่และโรคทางระบบอื่นๆต่อไป

6.3 ความเสี่ยงที่ประชากรที่เข้าร่วมการศึกษาจะได้รับ ต้องระบุทั้งโอกาสที่จะเกิด รายละเอียดของความเสี่ยงที่อาจจะเกิด และมาตรการป้องกันและรักษารวมทั้งการชดเชยที่ผู้วิจัยได้เตรียมไว้

ไม่มีความเสี่ยง เนื่องจากฟันน้ำนมที่ได้นั้นเป็นฟันที่มีข้อบ่งชี้การถอนเพื่อการรักษาตามความจำเป็นจากการวินิจฉัยโดยทันตแพทย์

6.4 หลักฐานหรือข้อมูล (เอกสารอ้างอิง) ที่แสดงให้เห็นว่าการวิจัยนี้น่าจะมีความปลอดภัยต่อประชากรที่เข้าร่วมการศึกษา

1. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, et al. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100: 5807–5812.

2. Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D, Stukart-Parsons GC, Gomes Massironi SM, Pereira LV, et al. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT4 and other embryonic stem cell markers. Cells Tissues Organs 2006; 184:105-16.

3. L, Makino Y, Yamaza H, Akiyama K, Hoshino Y, et al. Cryopreserved Dental Pulp Tissues of Exfoliated Deciduous Teeth Is a Feasible Stem Cell Resource for Regenerative Medicine. PLoS ONE 2013; 7(12): e51777.

4. Seo B, Miura M, Sonoyama W, Coppe C, Stanyon R, Shi S. Recovery of stem cells from cryopreserved periodontal ligament. J Dent Res, 2005; 84:907-912.

6.5 แบบหนังสือยินยอมเข้าร่วมการศึกษาของประชากรที่เข้าร่วมในการวิจัยที่ระบุข้อมูลต่าง ๆ ตามแบบที่คณะกรรมการฯกำหนดตามเอกสารแนบท้าย

7. รายชื่อ ที่อยู่และคุณวุฒิของผู้ร่วมวิจัยทุกคน

1.นางสาวอรอนงค์ ปานแก้ว

ชื่อนักวิจัย (ภาษาอังกฤษ) : Miss. Onanong Parnkaew)

รหัสนักศึกษา : 5510320015

หลักสูตร : วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต

สาขาวิชา : วิศวกรรมชีวการแพทย์ คณะ แพทยศาสตร์

2.ผศ.ดร สุทธาทิพย์ กมลมาตยากุล

ชื่อนักวิจัย(ภาษาอังกฤษ) : Asst.Prof.Dr. SUTTATIP KAMOLMATYAKUL

ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ : ภาควิชาทันตกรรมป้องกัน คณะทันตแพทยศาสตร์

8. ให้เติมข้อความต่อไปนี้ พร้อมลงลายมือชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยและผู้ร่วมวิจัยทุกคน

ผู้เสนอโครงการวิจัยสัญญาว่าคณะผู้วิจัยจะดำเนินการวิจัยตามรายละเอียดที่ระบุไว้ในข้อเสนอโครงการวิจัยอย่างเคร่งครัด หากมีการแก้ไขข้อเสนอโครงการวิจัย ผู้เสนอโครงการจะแจ้งให้คณะกรรมการฯ ทราบโดยเร็ว เพื่อการพิจารณาอนุมัติ นอกจากนี้หากประชากรที่รับไว้ในโครงการวิจัยนี้เกิดผลข้างเคียงหรืออันตรายจากการวิจัย หรือหากมีข้อมูลองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับประโยชน์หรือโทษจากแหล่งอื่นในระหว่างทำการศึกษา หัวหน้าโครงการวิจัยจะรายงานให้คณะกรรมการจริยธรรมในการวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ ทราบโดยเร็ว และจะส่งรายงานการวิจัยจำนวน 1 ชุด ให้คณะกรรมการฯ ภายใน 6 เดือน เมื่อการวิจัยสิ้นสุดลงหรือเมื่อการวิจัยถูกยกเลิก

9. ลงลายมือชื่อของหัวหน้าโครงการวิจัย

9.1 กรณีที่เป็นโครงการวิจัยที่เป็นวิทยานิพนธ์ จะต้องมีชื่อ พร้อมลายเซ็นของผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์หลักด้วย

9.2 กรณีที่เป็นโครงการ Junior Project ให้อาจารย์ที่ปรึกษาเป็นหัวหน้าโครงการ

ลงชื่อ

.....

.

(นางสาวอรอนงค์ ปานแก้ว)

หัวหน้าโครงการ

ลงชื่อ

.....

(ผศ.ดร สุทธาทิพย์ กมลมาตยากุล)

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

ภาคผนวก ง

ใบเชิญชวน

ขอเชิญเข้าร่วมโครงการวิจัยเรื่อง การวิเคราะห์คุณสมบัติเซลล์ต้นกำเนิดจากฟันน้ำนมหลังผ่านการแช่เยือกแข็ง

เรียน ท่านผู้อ่านที่นับถือ

ข้าพเจ้า น.ส.อรอนงค์ ปานแก้ว นักศึกษาหลักสูตร...วิศวกรรมชีวการแพทย์คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ใคร่ขอเล่าถึงโครงการวิจัยที่กำลังทำอยู่และขอเชิญชวนท่านเข้าร่วมโครงการนี้

ฟันเป็นอวัยวะหนึ่งที่สามารถพบเซลล์ต้นกำเนิด โดยสามารถพบได้ในเนื้อเยื่อโพรงประสาท(Dental pulp) เนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันน้ำนม (Human exfoliated deciduous teeth) เอ็นยึดปริทันต์ (Periodontal ligament) ในปี 2003 Miura และคณะได้ประสบความสำเร็จในการค้นพบเซลล์ต้นกำเนิดจากฟันน้ำนม จากการศึกษาพบว่าเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันน้ำนมที่พบมีความสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว และสามารถเปลี่ยนไปเป็นเซลล์จำเพาะชนิดอื่นๆได้หลายชนิด นอกจากนั้นยังพบว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากฟันน้ำนม ยังมีคุณสมบัติสามารถสร้างก้อนกระดูก สร้างเนื้อฟันและมีการแสดงออกของเซลล์ประสาท เมื่อเพาะเลี้ยงในเนื้อสมองหนูทดลอง ซึ่งจากการศึกษานี้เกิดแนวในความคิดที่จะนำ เนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันน้ำนม มาเป็นแหล่งของเซลล์ต้นกำเนิดที่ใช้ในการรักษาทางคลินิกสำหรับการรักษาโรคและวิศวกรรมเนื้อเยื่อแข็งให้กับผู้ป่วยในอนาคต

ถ้าท่านตัดสินใจเข้าร่วมในโครงการนี้<u>เป็นการใช้ฟันน้ำนมบุตร/หลานของท่าน ซึ่งจำเป็นจะต้องได้รับการถอนเพื่อการรักษาตามปกติ</u> โดยมีขั้นตอนดังนี้คือคัดเลือกฟันน้ำนมของเด็กที่มีสุขภาพแข็งแรง ไม่มีโรคประจำตัว โดยมีข้อบ่งชี้ในการถอนเพื่อการรักษาจากทันตแพทย์ผู้เชี่ยวชาญซึ่งเป็นฟันน้ำนมที่เริ่มโยกใกล้หลุด เนื่องจากฟันแท้ที่กำลังงอกขึ้นมาแทน เลือกเก็บได้ทั้งฟันตัด ฟันเขี้ยว และฟันกราม โดยฟันน้ำนมที่ได้นั้นทำการคัดแยกและเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อใช้

ในการทดลองในห้องปฏิบัติการ และจะทำการขอการขออนุญาตการใช้รักษาเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากการเก็บจากโครงการนี้ใช้ รวมทั้งบุตร/หลานท่านจะได้รับการรักษาตามวิธีมาตรฐานอย่างครบถ้วน โดยผู้รับผิดชอบโครงการวิจัยนี้คือ

1.นางสาวอรอนงค์ ปานแก้ว สถานที่ติดต่อ สถาบันวิศวกรรมชีวการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ เบอร์โทรศัพท์ 0899749905 อีเมล์ phiyok@hotmail.com

2. ผศ.ดร สุทธาทิพย์ กมลมาตยากุล สถานที่ติดต่อภาควิชาทันตกรรมป้องกัน คณะทันตแพทยศาสตร์ เบอร์โทรศัพท์ 074-287561 /0891983399

ไม่ว่าท่านจะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้หรือไม่ ท่านจะยังคงได้รับการรักษาที่ดีเช่นเดียวกับผู้ป่วยคนอื่นๆ และถ้าท่านต้องการที่จะถอนตัวออกจากการศึกษานี้เมื่อใด ท่านก็สามารถกระทำได้อย่างอิสระ

หากท่านมีคำถามใด ๆ ก่อนที่จะตัดสินใจเข้าร่วมโครงการนี้ โปรดซักถามคณะผู้วิจัยได้อย่างเต็มที่

ขอขอบคุณเป็นอย่างสูง

นางสาวอรอนงค์ ปานแก้ว
หัวหน้าโครงการ

หมายเหตุ :- กรุณาอ่านข้อความให้เข้าใจก่อนเซ็นชื่อยินยอมเข้าร่วมโครงการ

ภาคผนวก จ

แบบยินยอมเข้าร่วมการศึกษา

โครงการวิจัยเรื่อง การวิเคราะห์คุณสมบัติเซลล์ต้นกำเนิดจากฟันน้ำนมหลังผ่านการแช่เยือกแข็ง

วันที่……เดือน……..……พ.ศ……..……

ข้าพเจ้า.....ผู้ปกครองของ ด.ช. /ด.ญ./ นาย/น.ส.....อายุ.....ปี อาศัยอยู่บ้านเลขที่……. ถนน……...……ตำบล……..……อำเภอ……...……..จังหวัด……...……... ได้อ่าน/ได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการวิจัย อันตรายหรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัยหรือจากยาที่ใช้ รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียดและมีความเข้าใจดีแล้ว

หากข้าพเจ้าได้รับผลข้างเคียงจากการวิจัย ข้าพเจ้าจะได้รับการปฏิบัติ/การชดชย ดังนี้……..…….....โดยผู้รับผิดชอบโครงการวิจัยนี้คือ

1.นางสาวอรอนงค์ ปานแก้ว สถานที่ติดต่อ สถาบันวิศวกรรมชีวการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ เบอร์โทรศัพท์ 089-9749905

2. ผศ.ดร สุทธาทิพย์ กมลมาตยากุล…….สถานที่ติดต่อ…ภาควิชาทันตกรรมป้องกัน คณะทันตแพทยศาสตร์เบอร์โทรศัพท์… 074-287561 /0891983399

หรือเมื่อมีปัญหาใดๆ เกิดขึ้นเนื่องจากการทำวิจัยในเรื่องนี้ข้าพเจ้าสามารถร้องเรียนไปที่คณบดีคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112 โทรศัพท์ 074-28-7500

หากผู้วิจัยมีข้อมูลเพิ่มเติมทั้งด้านประโยชน์และโทษที่เกี่ยวข้องกับการวิจัยนี้ ผู้วิจัยจะแจ้งให้ข้าพเจ้าทราบอย่างรวดเร็ว โดยไม่ปิดบัง

ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะของดการเข้าร่วมโครงการวิจัยโดยมิต้องแจ้งให้ทราบล่วงหน้าโดยการงดการเข้าร่วมการวิจัยนี้ จะไม่มีผลกระทบต่อการได้รับบริการหรือการรักษาที่ข้าพเจ้าจะได้รับแต่ประการใด

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลเฉพาะที่เกี่ยวกับตัวข้าพเจ้าเป็นความลับ จะไม่เปิดเผยข้อมูลหรือผลการวิจัยของข้าพเจ้าเป็นรายบุคคลต่อสาธารณชน จะเปิดเผยได้เฉพาะในรูปที่เป็นสรุปผลการวิจัย หรือการเปิดเผยข้อมูลต่อผู้มีหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับการสนับสนุนและกำกับดูแลการวิจัย

ข้าพเจ้าได้อ่าน/ได้รับการอธิบายข้อความข้างต้นแล้ว และมีความเข้าใจดีทุกประการ จึงได้ลงนามในใบยินยอมนี้ด้วยความเต็มใจโดยนักวิจัยได้ให้สำเนาแบบยินยอมที่ลงนามแล้วกับข้าพเจ้าเพื่อเก็บไว้เป็นหลักฐาน จำนวน 1 ชุด

ลงชื่อ……..…….……ผู้ยินยอม

ลงชื่อ……บิดา/มารดา/ผู้ใช้อำนาจปกครอง

ลงชื่อ……....……หัวหน้าโครงการ

ลงชื่อ……..……พยาน

ลงชื่อ…….……..พยาน

หมายเหตุ: ผู้เข้าร่วมโครงการที่ยังไม่บรรลุนิติภาวะและสามารถเขียนหนังสือได้ให้เซ็นชื่อยินยอมเข้าร่วมโครงการด้วย

ภาคผนวก ฉ

ใบยินยอมเก็บตัวอย่างชีวภาพเพื่อศึกษาวิจัยในอนาคต
คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อโครงการวิจัย การวิเคราะห์คุณสมบัติเซลล์ต้นกำเนิดจากฟันน้ำนมหลังผ่านการแช่เยือกแข็ง
หัวหน้าโครงการวิจัยฯ น.ส.อรอนงค์ ปานแก้ว
หน่วยงาน สาขาวิศวกรรมชีวการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์
รหัสโครงการวิจัยฯ (ถ้ามี)
แหล่งทุนวิจัย (ถ้ามี) งบประมาณแผ่นดิน
ผู้ขอการยินยอม ทพ./ทพญ./นาย/นาง/ นางสาวอรอนงค์ นามสกุล ปานแก้ว
หน่วยงาน สาขาวิศวกรรมชีวการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์
ผู้ให้การยินยอม (นาย/นาง/นางสาว).....นามสกุล.....
โรค/ภาวะ/การบาดเจ็บ (ระบุเหตุที่เข้ารับการรักษา).....
1.การยินยอม
[ ] ยินยอมให้เก็บตัวอย่างชีวภาพ (ระบุชนิด เช่น ฟัน เนื้อเยื่อทั่วไป เลือด เป็นต้น)..... ของข้าพเจ้า
[ ] ยินยอมให้เก็บตัวอย่างชีวภาพ (ระบุชนิด เช่น ฟัน เนื้อเยื่อทั่วไป เลือด เป็นต้น).....ของบุตร/ ผู้อยู่ในความปกครองของข้าพเจ้า ชื่อ .....นามสกุล..... อายุขณะเก็บตัวอย่าง.....ปี ตรวจ/ใช้ศึกษาวิจัย (ระบุประเภท/ชนิดการตรวจทางห้องปฏิบัติการ/ทางคลินิก)
.....
2. ข้าพเจ้าเข้าใจและได้รับคำอธิบายว่า การเก็บตัวอย่างชีวภาพเพื่อศึกษาวิจัยในอนาคต นำมาซึ่งประโยชน์ของการวินิจฉัย/ การรักษา/การป้องกันใหม่ การเก็บตัวอย่างชีวภาพครั้งนี้ไม่เกิดประโยชน์โดยตรงต่อการดูแลรักษาโรค/ภาวะ/บาดเจ็บของข้าพเจ้าในปัจจุบัน อนึ่ง ข้าพเจ้าได้รับรู้รับทราบว่า ตัวอย่างทางชีวภาพ (ระบุชนิด เช่น ฟัน/เนื้อเยื่อฟัน) ของข้าพเจ้า/บุตร/ ผู้อยู่ในความปกครองของข้าพเจ้า ไม่มีการศึกษา/การทดลอง/การตัดต่อสารพันธุกรรมใดๆทั้งสิ้น

3. ข้าพเจ้ารับทราบว่า ตัวอย่างชีวภาพได้รับการเก็บรักษาโดยระบุรหัส โดยปราศจากชื่อและข้อมูลที่สามารถพิสูจน์ทราบเกี่ยวกับข้าพเจ้า

4. ข้าพเจ้าเข้าใจและทราบดีว่า ตัวอย่างทางชีวภาพเป็นสมบัติของข้าพเจ้า สำหรับการศึกษาวิจัยตัวอย่างชีวภาพเหล่านี้ ไม่ว่า โครงการวิจัยฯ ที่ระบุข้างต้นหรือโครงการวิจัยฯ อื่นในอนาคต ต้องได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมในวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ ทั้งนี้ภายใต้ระเบียบที่คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์กำหนดในเวลานี้หรือในภายหน้า

5. ข้าพเจ้ายินยอมให้แบ่งปันตัวอย่างชีวภาพให้กับโครงการศึกษาวิจัยอื่น เฉพาะโครงการศึกษาวิจัยที่ได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมในการวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์เท่านั้น โดยหัวหน้าโครงการ วิจัยฯ ข้างต้น และ/หรือ คณะกรรมการจริยธรรมในการวิจัย คณะทันตแพทศาสตร์ ในกรณีที่หัวหน้าโครงการวิจัยฯ

ข้างต้นพ้นจากหน้าที่ราชการ/พนักงานของคณะทันตแพทยศาสตร์ คณะกรรมการจริยธรรมในการวิจัยเป็นผู้พิจารณาว่า

โครงการวิจัยฯ/ นักวิจัยโครงการใดเป็นผู้ได้รับความเห็นชอบในการศึกษาวิจัยตัวอย่างชีวภาพของข้าพเจ้า

6. ข้าพเจ้ารับทราบว่า ข้าพเจ้ามีสิทธิเพิกถอนการยินยอมของข้าพเจ้าได้ทุกเมื่อ และเมื่อใดก็ตามที่ข้าพเจ้าแจ้งความประสงค์ให้กับหัวหน้าโครงการวิจัยฯ ณ หมายเลขโทรศัพท์ .....ทั้งตัวอย่างชีวภาพและสิ่งที่เชื่อมโยงไปถึงบันทึกข้อมูลทางการแพทย์ของข้าพเจ้าต้องได้รับการทำลายทิ้ง นอกจากนี้ ข้าพเจ้ามีสิทธิที่ปฏิเสธการให้ข้อมูลใหม่นอกเหนือจากบันทึกข้อมูลทางการแพทย์ที่คงอยู่ในปัจจุบัน

7. ข้าพเจ้ารับทราบว่า ในกรณีเป็นตัวอย่างชีวภาพของผู้เยาว์ เมื่อผู้เยาว์บรรลุนิติภาวะเจ้าของตัวอย่างชีวภาพมีสิทธิเพิกถอนการยินยอมได้ทุกเมื่อ เช่นเดียวกับความในข้อ 8

8. ข้าพเจ้ารับทราบว่า การตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อศึกษาวิจัยในอนาคต มีโอกาสพบปัจจัยเสี่ยงทางการแพทย์ที่ไม่ ประจักษ์ชัดในปัจจุบัน และหากข้อมูลดังกล่าวเป็นปัจจัยทำนาย/ชวนเกิด อันส่งผลร้ายถึงสุขภาพของข้าพเจ้า โดยมีหลักฐานทางการแพทย์ประจักษ์ชัดเจน ข้าพเจ้า/บุตร/ผู้อยู่ในความปกครอง (ผู้ให้การยินยอมร่วม) ของข้าพเจ้ามีความประสงค์ให้ดำเนินการ ดังนี้

[ ] ไม่ประสงค์รับรู้รับทราบ

[ ] ประสงค์รับรู้รับทราบ โดยหัวหน้าโครงการวิจัยฯ มีหน้าที่ต้องรายงานให้ข้าพเจ้ารับรู้รับทราบ ณ สถานที่ติดต่อ สถาบันวิศวกรรมชีวการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ โทรศัพท์ 089-9749905 อีเมล์ phiyok@hotmail.com. และ/หรือผู้ใกล้ชิดของข้าพเจ้า ชื่อนางสาวสุภาพร นามสกุลแสงเกิด

สถานที่ติดต่อ สถาบันวิศวกรรมชีวการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ โทรศัพท์ 08-8363770 อีเมล์ dek-subya@hotmail.com

9. เมื่อมีปัญหาใดๆเกิดขึ้นอันเป็นผลมาจากการทำวิจัยในโครงการวิจัยฯ ข้าพเจ้าสามารถร้องเรียนไปที่คณบดีคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ตำบลคอหงส์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112โทรศัพท์ 074-28-7500

ข้าพเจ้ายินยอมเกี่ยวกับระยะเวลาการเก็บรักษาตัวอย่างชีวภาพของข้าพเจ้า/บุตร/ผู้อยู่ในปกครอง โดยให้เก็บรักษาไว้เป็นเวลา.....ปี (ระบุตามความประสงค์ของผู้ให้การยินยอม แต่ไม่เกิน 10 ปี) และหากนักวิจัยจะนำไปใช้ต้องผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมอีกครั้งหนึ่งจึงจะนำไปใช้ได้

.....ผู้ให้การยินยอม .....ผู้เยาว์

(.....) (.....)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ..... วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

.....ผู้ขอการยินยอม

(.....)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

.....พยาน

(.....)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

.....พยาน

(.....)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวอรอนงค์ ปานแก้ว

รหัสประจาตัวนักศึกษา 5510320015

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (สัตวศาสตร์)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2552

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

งบประมาณแผ่นดิน

ทุนอุดหนุนงานวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ 2557

ตำแหน่งและสถานที่ทำงาน

เจ้าหน้าที่ธุรการ บริษัท ทริปเปิลที บรอดแบนด์ จำกัด (มหาชน)

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Onanong P, Suttatip K. Analysis of Cryopreserved Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth (Abst). Isan Journal of Pharmaceutical Sciences.2015; 10:263

Onanonog Parnkaew, Suttatip Kamolmatyakul. Effect of Cryopreservation on Biological Properties of Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth. Creative Education: Intellectual Capital toward ASEAN.2015: 497-505