คุณสมบัติทางชีวภาพของทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 ที่ปลดปล่อยจากวัสดุไคโตซานประยุกต์กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ต่อเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟัน

Biological Properties of Transforming Growth Factor beta1 Released from Chitosan Modified Glass-Ionomer Cement on Pulp Cells

นิตรา รักษ์เกียรติวงศ์

Nitra Rakkiettiwong

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพช่องปาก

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Oral Health Sciences

Prince of Songkla University

2551

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ คุณสมบัติทางชีวภาพของทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 ที่ปลดปล่อยจากวัสดุไคโตซานประยุกต์กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ต่อเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟัน

ผู้เขียน นางสาวนิตรา รักษ์เกียรติวงศ์

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์สุขภาพช่องปาก

ปีการศึกษา 2551

บทคัดย่อ

กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์จัดเป็นวัสดุที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพและสามารถนำมาเพิ่มพัฒนาศักยภาพให้เกิดการเจริญทดแทน (regeneration) โดยการเติมไคโตซาน และโกรว์ทแฟกเตอร์ เพื่อให้ได้วัสดุตัวใหม่ที่สามารถปลดปล่อยโปรตีนที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (growth factor delivery systems) ที่เหมาะสมในงานรักษาทางการแพทย์และงานทันตกรรมในอนาคต

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาการคงฤทธิ์ทางชีวภาพของทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 ที่ปลดปล่อยจากวัสดุไคโตซานประยุกต์กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ต่อเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟัน และลักษณะที่ปรากฏทางพื้นผิว ภาคตัดขวางของวัสดุไคโตซานประยุกต์กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์

วัสดุและวิธีการ: ชิ้นทดสอบถูกเตรียมโดยมีสัดส่วนโดยน้ำหนักของไคโตซาน ร้อยละ15 (C) โปรตีนจากซีรัมลูกวัว หรืออัลบูมิน (BSA) ร้อยละ10 (A) ในส่วนผงของกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ (G) และทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 (TGF- β_1) ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรต่อชิ้นทดสอบ ทดสอบกับเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันมนุษย์ที่เลี้ยงในทรานสเวลล์เป็น 9 กลุ่มทดสอบ ดังนี้ กลุ่ม 1: G เป็นกลุ่มควบคุม กลุ่ม 2: G-TGF กลุ่ม 3: G-A กลุ่ม 4: G-A-TGF กลุ่ม 5: G-C กลุ่ม 6: G-A-C กลุ่ม 7: G-A-C-TGF กลุ่มควบคุมที่ 8 เลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์โดยไม่ใส่ชิ้นทดสอบ และกลุ่มควบคุมที่ 9 เลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เติมทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 ที่ความเข้มข้น 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรโดยไม่ใส่ชิ้นทดสอบ ศึกษาการคงคุณสมบัติทางชีวภาพของโกรว์ทแฟกเตอร์ 1 ที่ปลดปล่อยออกมาด้วยการทดสอบหาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วยวิธีเอ็มทีที (MTT) ทดสอบที่ 5 วัน ตรวจหาอัคคาไลน์ฟอสฟาเตสแอคติวิตี (alkaline phosphatase activity) ของเซลล์เมื่อทดสอบ 14 วัน ตรวจดูการสร้างแคลเซียมของเซลล์ด้วยการย้อม von Kossa เมื่อทดสอบ 21 วัน และนำชิ้นทดสอบที่ใช้ในการตรวจหาแคลเซียม ไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน วิเคราะห์ข้อมูลเอ็มทีที ด้วยสถิติทดสอบ การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-way ANOVA) ร่วมกับการเปรียบเทียบความแตกต่างชนิดพหุแบบตูเก้ (Tukey's multiple comparison test) และวิเคราะห์ข้อมูลอัคคาไลน์ฟอสฟาเตสแอคติวิตี ด้วยสถิติการทดสอบของครัสคาลวัลลิส (Kruskal Wallis test) ร่วมกับการเปรียบเทียบความแตกต่างชนิดพหุของสตีวเดนท์นิวแมนคูลส์ (Student-Newman-Keuls test) ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และเปรียบเทียบการสร้างแคลเซียมของแต่ละกลุ่มเป็นร้อยละของพื้นที่ที่สร้างแคลเซียม

ผลการทดลอง: การเติมทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 ร่วมกับการเติมโปรตีนอัลบลูมิน (G-A-TGF) มีร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์สูงสุด แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคุญทางสถิติจากกลุ่มกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ (G) กลุ่มที่เติมทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 อย่างเดียว (G-TGF) หรือร่วมกับการเติมโปรตีนอัลบลูมิน (G-A-TGF) ส่วนกลุ่มที่เติมไคโตซานร่วมด้วย (G-C, G-A-C, G-A-C-TGF) พบว่า ค่าเฉลี่ยร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่เติมไคโตซานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ค่าอัคคาไลน์ฟอสฟาเตสแอคติวิตีของเซลล์ในกลุ่มที่เติมทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 (G-TGF) และกลุ่มที่เติมโปรตีนอัลบลูมิน ไคโตซาน ร่วมกับทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 (G-A-C-TGF) มีค่าสูงกว่ากลุ่มอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและกลุ่มที่เติมโปรตีนอัลบลูมินร่วมกับเติมทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 (G-A-TGF) ค่าอัคคาไลน์ฟอสฟาเตสแอคติวิตีไม่แตกต่างจากกลุ่มกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์อย่างเดียว (G) แต่มีค่าอัคคาไลน์ฟอสฟาเตสแอคติวิตีสูงกว่ากลุ่มอื่น ๆ (G-A, G-C, G-A-C) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการสร้างแคลเซียมของเซลล์ คิดจากร้อยละของพื้นที่ที่สร้างแคลเซียม เรียงจากมากไปน้อยได้ดังนี้ ชิ้นทดสอบที่เติมทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 (G-TGF-) ชิ้นทดสอบที่เติมโปรตีนอัลบลูมิน ไคโตซาน และทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 (G-A-C-TGF) ชิ้นทดสอบกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ (G) ชิ้นทดสอบที่เติมโปรตีนอัลบลูมิน และทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟตเตอร์เบต้า 1 (G-A-TGF) ชิ้นทดสอบที่เติมโปรตีนอัลบลูมิน ร่วมกับไคโตซาน (G-A-C) และชิ้นทดสอบที่เติมโปรตีนอัลบลูมิน (G-A) และการศึกษาด้วยภาพจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงให้เห็นก้อนกลมซึ่งคาดว่าเป็นโปรตีนอัลบลูมินและทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟตเตอร์เบต้า 1 ที่อยู่ตามโพรงและช่องว่างในชิ้นทดสอบ ร่วมกับพบลักษณะเส้นใยคล้ายรอยพับทบไปมาซึ่งคาดว่าเป็นไคโตซาน

สรุป: ฤทธิ์ทางชีวภาพทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 ที่เติมลงไปในวัสดุไคโตซานประยุกต์กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ไม่ได้ถูกทำลายไป

Thesis Title Biological Properties of Transforming Growth Factor beta 1 Released from Chitosan Modified Glass-Ionomer Cement

Author Miss Nitra Rakkiettiwong
Major Program Oral Health Sciences
Academic Year 2008

ABSTRACT

Introduction: Glass-ionomer cement is a bioactive material and it is potential to increase the property of sustained protein release that lead to the development of new biological approaches for tissue regeneration. Glass-ionomer cement incorporated with chitosan and bioactive molecules might utilize as a model for controlling the release or sustained delivery of bioactive molecules.

Objectives: The purposes of this study were to evaluate the biological properties of transforming growth factor-β_1 that released from chitosan modified glass-ionomer cement on human dental pulp cells. The physical characteristic of the cements was investigated under SEM.

Materials and methods: Commercial glass-ionomer cement (G) (Lining cement, GC®) has been modified by adding chitosan (C) 15% and bovine serum albumin (A) 10% by weight. They were mixed thoroughly into the powder of G prior specimen preparation. One hundred nanograms of transforming growth factor beta 1 (TGF- β_1) were added in each tested specimen. Seven groups of the specimens were prepared as follow: G-TGF, G-A, G-A-TGF, G-C, G-A-C, and G-A-C-TGF, where as a conventional G was acted as a control. The specimens were tested with primary human dental pulp cells cultured in the Transwell® and the other control groups were primary human dental pulp cells cultured in α-MEM pulp medium and in α-MEM pulp medium supplemented with 1ng/ml TGF- β_1 without specimens. The biological properties of TGF- β_1 released from chitosan modified glass-ionomer cements were tested by MTT assay, alkaline phosphatase activity (ALP), and von Kossa staining. Specimens were examined under scanning electron microscope (SEM). The MTT results were statistically analyzed using one way ANOVA to compare the mean values among groups and a Tukey's test was performed to investigate the differences between groups significance level 0.05. The statistical significance the differences between groups in ALP was determined with Student-Newman-Keuls test at significance level 0.05. Mineralized nodule area detected by von Kossa staining was expressed by percentage of black stained area compared with total dish area.

Results: The cell viability of specimens showed no significant different between the G, G-TGF, G-A, G-A-TGF, however, the G-C, G-A-C, and G-A-C-TGF showed more cytotoxic to human dental pulp cells. The means of alkaline phosphatase activity in the G-TGF and G-A-C-TGF were the highest, alkaline phosphatase activity of the G and G-A-TGF were no significant different, though there was significant different from the G-A, G-C, and G-A-C. The percentage of mineralization nodule area was reported respectively form the highest to the least, G-TGF (57.82%), G-A-C-TGF (44.49%), G (39.67%), G-A-TGF (34.05%), G-A-C (26.34%), and G-A (25.72%). The fractures section SEM micrographs of specimens after immersed in cultured medium for 21 days revealed some spherical particles within the voids that possibly are globular proteins and chitosan fibers in the specimens.

Conclusion: The biological properties of TGF- β_1 released from the incorporating of TGF- β_1, chitosan, and BSA in glass-ionomer cements were not denatured by the matrix formation.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาช่วยเหลือจากบุคคลหลายท่าน ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ทันตแพทย์หญิง อุรีพร เล็กกัต ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทันตแพทย์หญิง ชโณทัย เฮงตระกูล อาจารย์ทันตแพทย์หญิง ดร. เกวลิน ธรรมสิทธิ์บูรณ์ ที่กรุณาเป็นที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และเสียสละเวลาในการให้คำปรึกษา ตรวจสอบเพื่อแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วง ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ทันตแพทย์ ธงชัย นันทนรานนท์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทันตแพทย์หญิง นัทธมน วัฒนอรุณวงศ์ ที่ให้ข้อแนะนำในการสอบโครงร่างวิทยานิพนธ์ รวมทั้งคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์รองศาสตราจารย์ ดร.ทันตแพทย์ ชลธชา ห้านิรัติศัย และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทันตแพทย์หญิง นัทธมน วัฒนอรุณวงศ์ ผู้ให้ข้อแนะนำเพื่อแก้ไขปรับปรุงวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยาช่องปากและระบบการบดเคี้ยว ศูนย์วิจัยกลาง คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่เอื้ออำนวยสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ในงานวิจัย ขอขอบคุณ คุณบรรเจิด ยะพงศ์ คุณสุปรียา วาณิชย์ปกรณ์ นักวิทยาศาสตร์ประจำภาควิชาชีววิทยาช่องปากฯ คุณอรวรรณ บัวแก้วฉีด นักวิทยาศาสตร์ประจำศูนย์วิจัยกลางที่ให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำในการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ ขอขอบคุณคุณซารีป๊ะ หมันหมู้ ผู้ช่วยวิจัยของรองศาสตราจารย์ ดร.ทันตแพทย์หญิง อุรีพร ที่ช่วยเหลือในการเตรียมชิ้นทดสอบ ขอขอบคุณพี่ ๆ น้อง ๆ ในภาควิชาชีววิทยาช่องปากฯ ทุกท่านที่ไม่ได้กล่าวนามมา ณ ที่นี้ ที่ให้การต้อนรับเป็นอย่างดี และให้การสนับสนุนในเรื่องการทำวิจัย การทำรายงาน รวมไปถึงให้กำลังใจในยามท้อแท้ ขอขอบคุณเลขานุการและเจ้าหน้าที่ของภาควิชาชีววิทยาช่องปากฯ และภาคทันตกรรมอนุรักษ์ที่ช่วยติดต่อประสานงาน

ข้าพเจ้าขอขอบคุณ โรงพยาบาลนราธิวาสราชนครินทร์ ต้นสังกัด ที่ให้การสนับสนุนการลาศึกษาต่อและบัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่ให้ทุนอุดหนุนวิจัยในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอน้อมรำลึกถึงพระคุณบิดามารดาที่สนับสนุนช่วยเหลือในทุก ๆ เรื่องตลอดจนอาจารย์ทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาและสั่งสอนให้มีคุณธรรมและจริยธรรมในการดำรงชีวิตและการประกอบวิชาชีพ

นอกจากนี้ ขอขอบคุณสามี ลูกสาว (เพ่ย เพ่ย) และพี่อ้วน ที่ให้กำลังใจและอดทนรอคอยข้าพเจ้าจนร่ำเรียนสำเร็จ

นิตรา รักษ์เกียรติวงศ์

สารบาญ

	หน้า
สารบาญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการรูป	(10)
บทที่	
1 บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การทบทวนวรรณกรรม	3
- งานวิศวกรรมเนื้อเยื่อในทางทันตกรรม	3
- กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์	6
- ไคโตซาน	10
วัตถุประสงค์	15
2 วิธีการวิจัย	17
1. การเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟัน	17
2. การเตรียมชิ้นทดสอบ	17
3. การตรวจหาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต	18
4. การหาแอคติวิตีของเอนไซม์อัคคาไลน์ฟอสฟาเตส	22
5. การศึกษาการสร้างแคลเซียมของเซลล์ด้วยวิธีย้อม von Kossa	26
6. การศึกษาพื้นผิวและภาคตัดขวางของชิ้นทดสอบด้วยภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด	28
3 ผลการวิจัย	37
1. ผลการตรวจหาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต	37
2. ผลการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์อัคคาไลน์ฟอสฟาเตส	40
3. ผลการศึกษาการสร้างแคลเซียม	40
4. ผลของภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของชิ้นทดสอบ	44
4 บทวิจารณ์	46
5 บทสรุป	55
เอกสารอ้างอิง	56
ภาคผนวก	63
ประวัติผู้เขียน	73

รายการตาราง

ตาราง		หน้า
1	แสดงสัดส่วนผงกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ ไคโตซานและโปรตีนในส่วนผงของชิ้นทดสอบโดยน้ำหนัก	19
2	แสดงส่วนประกอบของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในการเตรียมสารละลาย 1 ลิตร	19
3	แสดงกลุ่มการศึกษาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและเอนไซม์อัคคาไลน์ฟอสฟาเตสแอคติวิตี	22
4	แสดงการเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐานเพื่อนำไปใช้ในการหาโปรตีนของเซลล์ทั้งหมด	24
5	แสดงกลุ่มการศึกษาการสร้างแคลเซียมของเซลล์ด้วยวิธีย้อม von Kossa	28
6	แสดงรายละเอียดของวัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย	33
7	แสดงส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเซลล์ สารเคมีและบริษัทผู้ผลิต	36
8	แสดงค่านัยสำคัญทางสถิติทดสอบค่าเฉลี่ย ค่าเฉลี่ยร้อยละของการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยสถิติการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว	38
9	แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยร้อยละของการรอดชีวิตของเซลล์ ทดสอบด้วยสถิติวิเคราะห์ชนิดพหุแบบตูเก้	38
10	สรุปผลค่าเฉลี่ยร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์	39
11	แสดงค่าเฉลี่ยเอนไซม์อัคคาไลน์ฟอสฟาเตสแอคติวิตีของเซลล์	41
12	แสดงการทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยเอนไซม์อัคคาไลน์ฟอสฟาเตสแอคติวิตีด้วยสถิติการเปรียบเทียบความแตกต่างชนิดพหุสติวเดนท์นิวแมนคูลส์	42
13	แสดงพื้นที่ที่สร้างแคลเซียมจากการย้อม von Kossa	42

รายการรูป

รูป		หน้า
1	แสดงปฏิกิริยาทางเคมีของการก่อตัวของกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์.....	9
2	แสดงโครงสร้างของกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์.....	10
3	แสดงโครงสร้างไคติน, ไคโตซาน และ ไคติน-ไคโตซานพอลิเมอร์ร่วม.....	12
4	แสดงกลไกโดยรวมของหมู่เคมีในหน่วยไคติน-ไคโตซาน.....	12
5	แสดงอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวโดยรวมของหน่วยไคติน-ไคโตซาน.....	12
6	แสดงวิธีการเตรียมส่วนผงและวิธีการเตรียมชิ้นทดสอบ.....	20
7	แสดงชิ้นทดสอบที่วางในทรานส์เวลล์และทดสอบกับเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟัน.....	21
8	แสดงเครื่องวัดความทึบแสงสเปคโตรโฟโตมิเตอร์.....	21
9	แสดงกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน (STD) และค่าความทึบแสง(OD).....	25
10	แสดงการทำงานของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด.....	29
11	แสดงกราฟค่าเฉลี่ยร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์.....	39
12	แสดงภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงเซลล์ที่ย้อมด้วยวิธี von Kossa.....	43
13	ภาพทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงผิวเรียบ และภาคหักขวางของชิ้นทดสอบ.....	44

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

การรักษาทางการแพทย์เพื่อทดแทนอวัยวะที่เกิดความวิการจากอุบัติเหตุหรือโรคต่างๆ เพื่อให้อวัยวะเหล่านั้นสามารถใช้งานได้ใกล้เคียงปกติหรือปกติที่สุดนั้น มีความซับซ้อน ต้องใช้ค่าใช้จ่ายจำนวนมาก และผลสุดท้ายที่ได้ อวัยวะนั้นอาจจะไม่สามารถทำหน้าที่ได้ใกล้เคียงปกติและอาจมีความพิการเกิดตามมา ดังนั้นในช่วงหลายทศวรรษที่ผ่านมาจึงมุ่งพัฒนามาทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (tissue engineering) โดยมีจุดมุ่งหมายที่จะช่วยให้เนื้อเยื่อหรืออวัยวะกลับมาทำหน้าที่ได้อย่างปกติ เช่นเดียวกับการรักษาบริเวณช่องปาก กะโหลกศีรษะ และใบหน้า ได้มีการศึกษาค้นคว้าวิธีการ และพัฒนาวัสดุชีวภาพ (biomaterials) ที่สามารถรักษาหรือกระตุ้นให้มีการหายของเนื้อเยื่อในลักษณะเจริญทดแทนขึ้นมาใหม่ (regeneration)[1]

เนื้อฟัน (dentin) และเนื้อเยื่อในฟัน(dental pulp) มีต้นกำเนิดจากแหล่งเดียวกัน คือ นิวรอลเครสท์ (neural crest) ทั้ง 2 ส่วนมีความสัมพันธ์ใกล้ชิด ทำงานเป็นหน่วยเดียวกันมาตั้งแต่ตัวอ่อนจนตลอดชีวิต จึงเรียกโดยรวมว่า เดนทินพัลป์คอมเพลกซ์ (dentin-pulp complex) จากการศึกษาพบว่า ฟันที่มีการสร้างสมบูรณ์แล้ว (mature) มีกลไกการสื่อสารระหว่างโมเลกุลของเมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix molecules) โกรว์ทแฟกเตอร์ (growth factors) ทรานสคริบชันแฟกเตอร์ (transcription factors) ชนิดต่างๆ ส่งสัญญาณให้เนื้อเยื่อในโพรงฟันให้มีการสร้างเนื้อฟันตติยภูมิ (tertiary dentinogenesis) ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งในการฟื้นฟูและซ่อมสร้างใหม่ของเนื้อเยื่อใน เพื่อจะลดความรุนแรงของสารอักเสบหรือสิ่งกระตุ้นภายนอก โดยการชักนำให้มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ (proliferation) การเคลื่อนรวมพลของเซลล์ (recruitment) และการเปลี่ยนสภาพของเซลล์ (differentiation)ไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่เฉพาะ (differentiated cells)[2]

งานวิจัยที่พยายามพัฒนาทันตวัสดุให้เป็นวัสดุชีวภาพ ได้ให้ความสำคัญในการใช้โมเลกุลส่งสัญญาณจากภายนอก (exogenous signaling molecules) เช่น พวกโกรว์ทแฟกเตอร์ เติมลงไปในวัสดุปิดพื้นโพรงฟัน (capping materials) ชนิดต่างๆ เพื่อให้วัสดุสามารถนำส่ง (delivery) สารชีวโมเลกุลได้[2] โกรว์ทแฟกเตอร์ที่ได้รับการศึกษากันมากทั้งในสิ่งมีชีวิต (*in vivo*) และในห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) ชนิดหนึ่ง คือ โปรตีนในกลุ่มของอภิตระกูลทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า (transforming growth factor - β (TGF - β) superfamily)[3] ซึ่งประกอบด้วย ตระกูลทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า (TGF- βs family) ตระกูลโบน มอร์ฟอเจนิกโปรตีน (bone morphogenic protein: BMPs family) โดยที่พบว่า ทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 ที่ถูกปลดปล่อยออกจากเดนทินเมทริกซ์ มีตัวรับสัญญาณ (target receptors) คือ เซลล์โอ

ดอนโตบลาสท์ (odontoblasts) หรือเซลล์สร้างเนื้อฟันและเนื้อเยื่อในฟัน มีความสัมพันธ์กับปฏิกิริยาตอบสนองต่อการบาดเจ็บของฟัน ทำให้เซลล์เพิ่มจำนวนและเปลี่ยนแปรเซลล์ไปทำหน้าที่หลั่งสารป้องกันตนเองด้วยการสร้างเนื้อฟันตติยภูมิ[4]

กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์เป็นวัสดุบูรณะฟันที่มีคุณสมบัติเป็นวัสดุชีวภาพมีความเข้ากันได้กับเซลล์และเนื้อเยื่อได้ดี (good biocompatibility) จึงได้ถูกนำไปประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ โดยนำมาเป็นกาวหรือซีเมนต์ยึดกระดูกรูปหอยโข่ง (cochlea) และซ่อมความวิการของกะโหลกศีรษะ เซลล์กระดูกสามารถเจริญเติบโตโดยใช้กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์เป็นโครงร่างยึดเกาะ (osteoconductive) และได้มีความพยายามพัฒนากลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์มาใช้ในการปลดปล่อยสาร หรือใช้ในระบบการนำส่งยา (drug delivery system)[5] จึงน่าสนใจที่จะเพิ่มศักยภาพของกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ในการปลดปล่อยสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

ไคโตซาน (chitosan) เป็นวัสดุตัวหนึ่งที่นำมาพัฒนาใช้ทั้งทางการแพทย์และงานวิจัยทางทันตกรรมเป็นอย่างมาก เนื่องจากคุณสมบัติที่ชอบน้ำ[6] ไม่เป็นพิษ[6] ไม่กระตุ้นให้เกิดการต่อต้านจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ไม่ก่อมะเร็ง[7] มีผลต้านเชื้อจุลชีพและเชื้อรา[8] ส่งเสริมการยึดเกาะและการรวมตัวของเกร็ดเลือดเร่งให้เกิดการหายของแผล[9, 10] เสื่อมสลายตัวทางชีวภาพ (biodegradable)ได้ มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatibility)[6, 11] และสามารถเป็นโครงร่างให้เซลล์กระดูกมาเจริญเติบโต[12] ไคโตซานสามารถนำมาพัฒนาในระบบนำส่งยีนหรือโปรตีนหรือโมเลกุลที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ[13] นอกจากนั้นไคโตซานยังสามารถเกิดปฏิกิริยาเชิงประจุกับกรดพอลีอคริลิก ซึ่งกรดพอลีอคริลิกเป็นองค์ประกอบในส่วนเหลวของกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ไม่ละลายน้ำหรือละลายน้ำได้เล็กน้อย ที่เรียกว่าพอลีอิเล็กโทรไลต์คอมเพลกซ์ (polyelectrolyte complex)[14] ในระหว่างที่เกิดปฏิกิริยาเป็นพอลีอิเล็กโทรไลต์คอมเพลกซ์ ไอออนบวกในไคโตซานนอกจากสามารถเกิดพันธะกับไอออนลบในกรดพอลีอคริลิกแล้ว ยังสามารถเกิดพันธะกับไอออนที่เป็นประจุลบบนดีเอ็นเอ (DNA)[13] ยา สารอื่น และเยื่อเมือกในสิ่งมีชีวิตที่มีประจุลบ จึงได้นำมาประยุกต์ใช้ในระบบการนำส่งและควบคุมการปลดปล่อยยา[6, 12, 15-19]

จากข้อมูลข้างต้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการประยุกต์ใช้ไคโตซานและสารชีวโมเลกุล คือ ทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟตเตอร์เบต้า 1 โดยนำมาเติมลงไปในกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ และศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพของทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟตเตอร์เบต้า 1 ที่เติมเข้าไป ว่าถูกปลดปล่อยออกมาและยังคงฤทธิ์ทางชีวภาพได้หรือไม่ เนื่องจากปัญหาการปลดปล่อยโปรตีนจากวัสดุ อาจสูญเสียคุณสมบัติทางชีวภาพ (biological activities) ของโกรว์ทแฟตเตอร์ จากการเสื่อมสภาพ (denature) ระหว่างผสมหรือการก่อตัวของเมทริกซ์[20, 21] โดยจะทำการศึกษาวัสดุดังกล่าวกับเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันมนุษย์ เพื่อเป็นจุดเริ่มต้นในงานพัฒนากลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ในด้านการเจริญทดแทน

การทบทวนวรรณกรรม

ในงานวิจัยนี้แบ่งการทบทวนวรรณกรรมเป็น ตอนที่ 1 การทบทวนวรรณกรรมเกี่ยวกับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อในทางทันตกรรม ตอนที่ 2 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องกับกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ และตอนที่ 3 เป็นการทบทวนวรรณกรรมเกี่ยวกับไคโตซาน

1. งานวิศวกรรมเนื้อเยื่อในทางทันตกรรม

1.1 วิศวกรรมเนื้อเยื่อ และเซลล์ต้นกำเนิด ในทางทันตกรรม

การพัฒนาด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อเพื่อสร้างเนื้อเยื่อหรืออวัยวะเพื่อทดแทนส่วนที่สึกหรอหรือสูญเสียไปในทางการแพทย์และในสัตว์ทดลองมีการพัฒนามาอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานานแล้ว เช่นเดียวกันกับงานด้านทันตกรรม มีความพยายามที่จะสร้างเนื้อเยื่อในช่องปากหรือสร้างฟันใหม่ทดแทนฟันธรรมชาติที่สูญเสียไป องค์ประกอบที่สำคัญในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อในช่องปาก ประกอบด้วย การมีเซลล์ต้นกำเนิดที่เหมาะสม โมเลกุลสื่อสัญญาณ (signaling molecules) ที่จะเหนี่ยวนำให้เซลล์ต้นกำเนิดเกิดการเปลี่ยนสภาพ และมีร่างแห (scaffold) เป็นที่ช่วยยึดเซลล์และสารชีวโมเลกุลที่ใช้ส่งสัญญาณให้เซลล์เจริญเติบโตและพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อที่ต้องการ[22] เซลล์ต้นกำเนิดเป็นเซลล์ที่มีความสามารถในการเกิดใหม่ เพิ่มจำนวนตัวเอง ซ่อมแซมตัวเอง และพัฒนาไปเป็นเซลล์อื่นๆได้ (multilineage differentiation) โดยทั่วไปสามารถแบ่งเซลล์ต้นกำเนิดออกได้เป็น 2 ชนิด คือ เซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อน (embryonic stem cells) จะมีคุณสมบัติเปลี่ยนไปเป็นเซลล์อื่นได้เกือบทุกชนิด เซลล์ต้นกำเนิดชนิดที่สอง คือ เซลล์ต้นกำเนิดที่พบตั้งแต่แรกเกิด (adult stem cells) เซลล์ชนิดนี้มีคุณสมบัติในการเปลี่ยนแปลงด้อยกว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อน คือ เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์อื่นได้บางชนิดเท่านั้น[20, 22]

1.2 เซลล์ในเนื้อเยื่อในโพรงฟันมนุษย์

เนื้อเยื่อในโพรงฟันเป็นเนื้อเยื่อยึดต่อ (connective tissue) ภายในประกอบด้วยเซลล์ต่างๆ เช่น หลอดเลือด หลอดน้ำเหลือง เส้นประสาทและของเหลวระหว่างเซลล์ (interstitial fluid) ซึ่งส่วนประกอบต่างๆนี้ เป็นตัวกำหนดสภาวะของเนื้อเยื่อในโพรงฟัน โดยมีของเหลวระหว่างเซลล์ทำหน้าที่เป็นสื่อกลางให้เกิดการทำงานหรือมีปฏิกิริยาของเซลล์และเนื้อเยื่อต่างๆร่วมกัน เซลล์ที่พบส่วนใหญ่คือ ไฟโบรบลาสท์ (fibroblast) ทำหน้าที่สร้างเมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix: ECM) โดยบริเวณขอบนอกสุดของเนื้อเยื่อในฟันส่วนที่ติดกับชั้นพรีเดนทิน (predentin) จะเป็นที่อยู่ของเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญในเดนทินพัลพ์คอมเพลกซ์ คือ เซลล์สร้างเนื้อฟันหรือเซลล์โอดอนโตบลาสท์ซึ่งเซลล์จะเรียงตัวเป็นชั้นเดียว มีหลอดเลือดฝอย เส้นประสาทแทรกอยู่ภายใน เซลล์โอดอนโตบลาสท์แต่ละเซลล์จะมีแขนงยื่นเข้าไปใน

ส่วนของท่อเนื้อฟันเรียกว่า โอดอนโตบลาสติกโพรเซส (odontoblastic process) ทำหน้าที่เป็นตัวกลางในการติดต่อกันระหว่างเนื้อเยื่อในกับเนื้อฟัน ส่วนของเนื้อเยื่อในโพรงฟันใต้ต่อชั้นของเซลล์โอดอนโตบลาสท์ คือ บริเวณที่มีเซลล์จำนวนน้อย (cell-poor zone) และชั้นที่อยู่ลึกลงไปอีก คือ บริเวณที่มีเซลล์จำนวนมาก (cell-rich zone) ซึ่งชั้นนี้จะมีเซลล์อยู่กันหนาแน่น ประกอบด้วย เซลล์ไฟโบรบลาสท์ เซลล์เยื่อประสานที่ยังไม่ได้มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปเพื่อทำหน้าที่เฉพาะ (undifferentiated mesenchymal cell) หลอดเลือดฝอย เส้นประสาทและเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน คือ แมคโครฟาจ (macrophage) และเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซท์ (lymphocyte) ส่วนชั้นในสุดคือ พัลพ์พรอเพอร์ (pulp proper) ซึ่งเป็นส่วนกลางของเนื้อเยื่อในฟัน โดยส่วนประกอบภายในชั้นนี้ จะเหมือนกับชั้นบน แต่มีความหนาแน่นของเซลล์น้อยกว่า รวมทั้งภายในชั้นนี้จะเป็นที่อยู่ของเส้นเลือดและเส้นประสาทขนาดใหญ่[23]

เซลล์จากเนื้อเยื่อในโพรงฟัน ทั้งในฟันชุดถาวรและฟันน้ำนม จัดเป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่มีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับเซลล์ต้นกำเนิดมีเซ็นไคมอล (mesenchymal stem cells) ที่พบที่ไขกระดูกและสายรก จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า เซลล์ต้นกำเนิดจากฟันมีคุณสมบัติการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนสูง สามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์ต่างๆได้ การศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่าสามารถเหนี่ยวนำให้เนื้อเยื่อที่ไม่สร้างฟัน สร้างเนื้อเยื่อเสมือนเดนทินพัลป์คอมเพลกซ์ได้ [24, 25, 26] นอกจากนั้นยังพัฒนาไปเป็นเซลล์สร้างไขมัน (adipocyte) เซลล์เนื้อเยื่อประสาท (neural cells)[25, 26] เซลล์สร้างกระดูก (osteoblast)[25, 26] เซลล์ต้นกำเนิดในการสร้างเนื้อฟัน อาจมาจากเซลล์ไฟโบรบลาสท์ที่อยู่บริเวณส่วนกลางของเนื้อเยื่อในฟัน (fibroblast in the pulp core)[27] เซลล์บริเวณที่มีเซลล์จำนวนมากที่เรียกว่า ชั้นโฮลล์ (Höhl layer)[28] เพอริไซท์ (pericyte) ซึ่งเป็นเซลล์ในเนื้อเยื่อบุโพรงหลอดเลือด กลุ่มเซลล์รอบ ๆ เส้นเลือดในเนื้อเยื่อในโพรงฟัน (perivascular niche)[29] เซลล์มีเซ็นไคมอลที่ยังไม่ได้มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปเพื่อทำหน้าที่เฉพาะ[30]

การศึกษาต่างๆในด้านชีววิทยาในช่องปากในกระบวนการเปลี่ยนสภาพของเซลล์และการสร้างใหม่ทดแทนด้วยเซลล์ต้นกำเนิดจากฟัน ทำให้คาดว่าจะสามารถนำเซลล์ต้นกำเนิดมาใช้เป็นเซลล์บำบัดในอนาคตได้ ในช่วงที่พัฒนาสร้างฟัน (tooth development) พบว่า มีชีวโมเลกุล (bioactive molecules) หลายตัวที่ทำงานร่วมกัน หรือยับยั้งกันและกันในแต่ละช่วงเวลาและเนื้อเยื่อต่างๆ แตกต่างกันไป โมเลกุลเหล่านี้จะมีอวัยวะเป้าหมายที่จะไปจับอย่างเฉพาะเจาะจงและในเวลาที่เหมาะสม[21, 22]

1.3 โมเลกุลส่งสัญญาณ

การสื่อสารระหว่างเซลล์ (cell-cell) หรือระหว่างเซลล์กับเมทริกซ์นอกเซลล์ (cell-ECM) ล้วนต้องอาศัยโมเลกุลส่งสัญญาณเป็นสื่อติดต่อกัน โกรว์ทแฟคเตอร์จัดเป็นโมเลกุลสื่อสัญญาณชนิดหนึ่งที่มีผลต่อเซลล์เป้าหมายที่จำเพาะ (specific target cells) เท่านั้น[31] การสื่อสารมีความซับซ้อนขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ปริมาณของโกรว์ทแฟคเตอร์ที่พอเหมาะต่อชนิดของเซลล์นั้น รวมทั้งเวลาที่เหมาะสมที่โกรว์ทแฟคเตอร์

ถูกปลดปล่อยออกมา โกรว์ทแฟตเตอร์เป็นโปรตีนที่เสื่อมสภาพได้ง่ายเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง[21]

โกรว์ทแฟตเตอร์ที่มีบทบาทในการสร้างเนื้อฟันและได้รับการศึกษากันมากตัวหนึ่ง คือ โกรว์ทแฟตเตอร์ในตระกูลทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟตเตอร์เบต้า (transforming growth factor beta family) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีบทบาทในการเพิ่มจำนวนเซลล์และการเปลี่ยนสภาพของเซลล์ ประกอบด้วยทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟตเตอร์เบต้า 1 2 3 ในฟันที่มีการสร้างสมบูรณ์แล้ว พบว่า เซลล์เนื้อเยื่อในและเซลล์โอดอนโตบลาสท์มีการแสดงออกของทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟตเตอร์เบต้า 1 2 และ 3 และยังพบว่าทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟตเตอร์เบต้าทั้ง 3 ไอโซฟอร์ม (isoforms) จะถูกปลดปล่อยออกมาจากในเดนทินเมทริกซ์ ในภาวะที่เกิดฟันผุ เพื่อสื่อสารกับเซลล์โอดอนโตบลาสท์และเซลล์เนื้อเยื่อใน ให้เซลล์สร้างเนื้อฟันและเซลล์เนื้อเยื่อในฟันเปลี่ยนสภาพ และสร้างเนื้อเยื่อที่มีการสะสมแร่ธาตุหรือเนื้อฟัน ซึ่งเป็นกระบวนการในการป้องกันและซ่อมแซมตนเองของฟัน[3]

การศึกษาผลของทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟตเตอร์เบต้าทั้ง 3 ไอโซฟอร์มของ Sloan และ Smith ในปี ค.ศ. 1999 โดยนำเม็ดวุ้น (agarose beads) ที่ชุบด้วยทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟตเตอร์เบต้าทั้ง 3 ไอโซฟอร์ม วางบนเซลล์สร้างเนื้อฟันของฟันหนูซึ่งถูกตัดฟันออกมาเป็นแผ่น (tooth slides) ประกอบด้วยเนื้อฟัน เซลล์สร้างเนื้อฟัน และเนื้อเยื่อในฟัน เมื่อศึกษาไป 7 วัน พบว่า ทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟตเตอร์เบต้า 1 และ 3 สามารถกระตุ้นการสร้างพรีเดนทีน (predentin) และมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นบริเวณชั้นโอดอนโตบลาสท์และใต้ต่อชั้นโอดอนโตบลาสท์ แต่ในแผ่นฟันที่ทดสอบด้วยเม็ดวุ้นชุบทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟตเตอร์เบต้า 2 กลับไม่มีผลต่อเซลล์โอดอนโตบลาสท์[32] การศึกษาที่ผ่านมา พบว่าทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟตเตอร์เบต้า 2 มีความสัมพันธ์กับรูปร่างและขนาดของฟันมากกว่าการสร้างเนื้อฟัน[33]

ส่วนทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟตเตอร์เบต้า 3 นั้น ในการศึกษาของ Huojia และคณะ พบว่า ทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟตเตอร์เบต้า 3 สามารถกระตุ้นเนื้อเยื่อที่ปกติไม่สร้างแร่ธาตุ ให้สร้างแร่ธาตุได้[34] อย่างไรก็ตาม การศึกษาเกี่ยวกับทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟตเตอร์เบต้า 3 ยังมีค่อนข้างจำกัด ดังนั้น การวิจัยในครั้งนี้จึงได้นำทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟตเตอร์เบต้า 1 มาเป็นโมเดลในการศึกษา เนื่องจากรายงานการศึกษาต่างๆที่ยืนยันว่า ทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟตเตอร์เบต้า 1 มีผลต่อการสร้างเมทริกซ์นอกเซลล์ สร้างเนื้อเยื่อที่มีการสะสมแร่ธาตุของเซลล์สร้างเนื้อฟันและเนื้อเยื่อในโพรงฟัน[35, 36, 37] โดยทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟตเตอร์เบต้า 1 จะมีผลทำให้เซลล์เนื้อเยื่อในเพิ่มจำนวนขึ้น มีการกระตุ้นการทำงานของอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase activity) เพิ่มการสังเคราะห์คอลลาเจนชนิดที่ 1 (type I collagen) รวมทั้งทำให้เซลล์สร้างสารที่มีการสะสมแร่ธาตุ (crystalline materials)[38-41] และผลเหล่านี้มีวิธีที่จะตรวจหาได้ด้วยเทคนิคต่าง ๆ ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการได้

1.4 ระบบการนำส่งโกรว์ทแฟกเตอร์ (Growth factor delivery systems)

การพัฒนาวัสดุที่จะใช้เป็นตัวนำส่งโมเลกุลส่งสัญญาณจากภายนอกเซลล์แก่เซลล์เป้าหมาย ส่วนใหญ่จะนำโปรตีนเหล่านั้นผสมลงไปในตัวนำพา (carrier) ซึ่งอาจจะเป็นวัสดุที่มีแคลเซียมเป็นพื้นฐาน (calcium-based) พอลิเมอร์สังเคราะห์ (synthetic polymers) พอลิเมอร์ธรรมชาติ หรือคอลลาเจน โดยกลไกการปลดปล่อยโกรว์ทแฟกเตอร์ เกิดจากการแพร่ (diffusion) หรือการเสื่อมสภาพหรือเสื่อมพันธะทางเคมีของเมทริกซ์ที่เป็นตัวนำพา ซึ่งการวิจัยนี้ มีเป้าหมายที่จะเพิ่มคุณสมบัติของกลาสไอโอโนเมอร์ในด้านการปลดปล่อยโปรตีนชีวภาพ โดยที่ปัจจัยสำคัญที่ต้องคำนึงถึงในระบบการนำส่งโกรว์ทแฟกเตอร์ คือ การควบคุมการปลดปล่อยโกรว์ทแฟกเตอร์ไปยังตำแหน่งที่ต้องการให้โกรว์ทแฟกเตอร์ไปออกฤทธิ์ และออกฤทธิ์ได้ในระยะเวลาที่นานพอที่จะมีผลต่อเซลล์เป้าหมาย โดยไม่สูญเสียฤทธิ์ทางชีวภาพของโกรว์ทแฟกเตอร์ไปจากการผสมหรือการก่อตัวของวัสดุ[20, 21]

2. กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ (Glass-ionomer cement)[42]

ในปี ค.ศ.1969 Wilson และ Kent ได้พัฒนากลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์เพื่อใช้เป็นซีเมนต์ทางทันตกรรม โดยนำคุณสมบัติที่ดีของซิลิเกตซีเมนต์ (silicate cement) ที่มีสีเหมือนฟัน และพอลิคาร์บอกซิเลตซีเมนต์ (polycarboxylate cement) ที่สามารถยึดติดกับฟันได้ด้วยพันธะเคมี นำมาพัฒนาเป็นวัสดุตัวใหม่ ซึ่งเป็นครั้งแรกของการค้นพบวัสดุบูรณะที่ให้การยึดติดกับเนื้อฟัน และมีคุณสมบัติยับยั้งฟันผุ ด้วยการปลดปล่อยฟลูออไรด์ หลังจากนั้น มีการพัฒนาต่อมา โดย McLean และ Wilson ในช่วงปี ค.ศ. 1970 และนำออกจำหน่ายสู่ตลาดในปี ค.ศ. 1975 และมีการนำกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์มาใช้บูรณะฟันอย่างแพร่หลายจนถึงปัจจุบัน[42]

กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์มีคุณสมบัติทางชีวภาพที่ดี[5] มีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ[43, 44] ขณะที่ก่อตัวไม่เกิดความร้อน[42] จึงไม่เป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อ หรือทำลายสารที่ไม่ทนต่อความร้อน สามารถนำมาพัฒนาในระบบการนำส่งยาได้[45-48] การหดตัวขณะที่ก่อตัวต่ำ[42] กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์สามารถปลดปล่อยฟลูออไรด์ได้นานถึง 18 เดือน ซึ่งมีส่วนป้องกันฟันผุได้ ซีเมนต์ชนิดนี้ยังมีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ[49] สามารถยึดติดกับส่วนต่างๆของฟัน กระดูก รวมทั้งโลหะได้ กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ยังเป็นโครงร่างในเซลล์กระดูกมาเจริญเติบโตได้ด้วย[45]

ปัจจุบันได้นำกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์มาใช้ในระบบการนำส่งยา (drug delivery system) เช่น การศึกษาการปลดปล่อยเมธีลีนบลู (Methylene blue) จากกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ที่เตรียมร่วมกับพอลิเมอร์อีกตัวหนึ่งของ Lindsjö และคณะ ปี ค.ศ. 1996 พบว่า แช่ชิ้นซีเมนต์ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรดด่างที่ 2 และ 7.4 พบว่า สามารถปลดปล่อยเมธีลีนบลูได้ ในสารละลายที่เป็นกลาง (pH 7.4)

มากกว่าและเร็วกว่า สารละลายที่เป็นกรด เนื่องจากสภาวะที่เป็นกลาง ซีเมนต์เมทริกซ์และเมธีลีนบลูที่จับกันในพอลิอิเล็กโทรไลต์คอมเพลกซ์จะมีลักษณะคลายเกลียวหรือคลายพันธะ (uncoiled ionic) ทำให้สารน้ำสามารถแพร่เข้าไปในเมทริกซ์ได้ดีกว่า จึงปลดปล่อยเมธีลีนบลูได้ดีกว่า[46] Palmer ได้ศึกษาการปลดปล่อยคลอเฮกซิดีนที่ผสมไว้ในกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ พบว่าเมื่อเติมคลอเฮกซิดีนลงไปในกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์มาก จะมีการปลดปล่อยคลอเฮกซิดีนออกมามากและนาน แต่ปลดปล่อยได้ไม่เกินร้อยละ 10 ของคลอเฮกซิดีนที่เติมลงไป และยังมีคลอเฮกซิดีนที่ถูกกักไว้ในเมทริกซ์อยู่อีกมาก[47] นอกจากนี้งานวิจัยที่ศึกษาการเติมสารต่างอื่นๆลงไปในกาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ในงานของ Mazzaoui และคณะ โดยผสมเคซินฟอสฟอเปปไทด์อะมอร์ฟัสแคลเซียมฟอสเฟต (casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate) ลงไปในกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ ทำให้มีฤทธิ์ต้านทานฟันผุได้มากขึ้น[48] และในปีค.ศ. 2003 Botelho ได้เติมสารต้านแบคทีเรียลงไปในกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์และทดสอบผลการระงับเชื้อโดยการแพร่ผ่านแผ่นวุ้น (agar diffusion) พบว่ากลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ที่เติมสารฆ่าเชื้อให้ผลฆ่าเชื้อได้ดีกว่ากลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์อย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ[50] และงานวิจัยของ Wittwer และคณะ ปี ค.ศ. 1994 ได้ศึกษาการปล่อยปล่อยโปรตีนของกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ และพบว่าน่าจะนำเอากลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์มาพัฒนาในระบบการควบคุมการปลดปล่อยโปรตีนได้[52]

2.1 ส่วนประกอบของกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์

กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ประกอบด้วยส่วนผงและส่วนเหลว ส่วนผงจะเป็นอะลูมิโนซิลิเกตกลาส (alumino-silicate glass) ผลึกแก้วนี้มีส่วนผสมของซิลิกา (silica) อะลูมินา (alumina) แคลเซียมฟลูออไรต์ (calcium fluorite, CaF_2) ครีโอไลต์ (cryolite, $Na_3Al_2F_6$) อะลูมิเนียมไตรฟลูออไรด์ (aluminium trifluoride) และอะลูมิเนียมฟอสเฟต (aluminium phosphate) ผสมกันในอัตราส่วนต่างๆ นำมาเผาที่อุณหภูมิ 1100-1500 องศาเซลเซียส และเมื่อหลอมละลายแล้วนำไปผ่านน้ำเย็นเพื่อให้แตกออกเป็นผงและบดจนมีขนาดต่ำกว่า 50 ไมโครเมตร[42] ส่วนเหลวเป็นกรดพอลิอัลคีโนอิก (polyalkenoic acid) ที่มีองค์ประกอบหลัก คือ กรดพอลีอคิริลิก (polyacrylic acid) เข้มข้นร้อยละ 40-55 อาจเติมกรดอิทาโคนิก (itaconic acid) เพื่อลดความหนืดในการเกิดวุ้น (gelation) เพิ่มเสถียรภาพและอายุการเก็บของวัสดุ และเติมกรดทาร์ทาริก (tartaric acid) เพื่อช่วยเพิ่มเวลาทำงานและทำให้การแข็งตัวเร็วขึ้น โดยปฏิกิริยาระหว่างส่วนผงและส่วนเหลวของกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ มีน้ำเป็นส่วนประกอบสำคัญในปฏิกิริยากรดด่าง จึงกล่าวได้ว่า กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์เป็นวัสดุที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบหลัก (water-based materials)

2.2 ปฏิกิริยาการก่อตัวของกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์

กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์เกิดจากปฏิกิริยากรดด่าง (acid-base reaction) ระหว่างการละลายตัวของอะลูมิโนซิลิเกตกลาสและส่วนเหลวของกรดพอลิอัลคีโนอิก มีน้ำเป็นตัวกลางของปฏิกิริยา กรดจะทำละลาย

อะลูมิโนซิลิเกตกลาส จึงส่งผลให้เกิดการปลดปล่อยแคลเซียมไอออน(Ca^{2+}) และอะลูมิเนียมไอออน(Al^{3+}) ไอออนบวกเหล่านี้ จะไปจับกับไอออนลบจากหมู่คาร์บอกซิเลต (carboxylate groups) เกิดการเชื่อมโยงข้าม (crosslink) ของกรดพอลิอัลคีโนอิก ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่ต่อเนื่องส่งผลให้คุณสมบัติเชิงกลของซีเมนต์เพิ่มขึ้นตามเวลา การก่อตัวของกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์มี 2 ระยะ ระยะแรกของการก่อตัวจะเป็นการก่อตัวทางคลินิก (clinical set) เกิดขึ้นภายใน 10 นาทีแรกหลังการผสม โดยแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) จะเป็นตัวจับกับไอออนลบจากหมู่คาร์บอกซิล (carboxyl group) ของกรดก่อน และเกิดเป็นแคลเซียมคาร์บอกซิเลต (calcium carboxylate) ที่มีคุณสมบัติละลายน้ำ การก่อตัวนี้เป็นการก่อตัวเริ่มต้นจึงมีความแข็งแรงค่อนข้างต่ำ ระยะที่ 2 เมื่ออะลูมิเนียมไอออน (Al^{3+}) ซึ่งมีประจุมากกว่าเป็นตัวจับกับโมเลกุลของกรด เกิดเป็นอะลูมิเนียมคาร์บอกซิเลต (aluminium carboxylate) อะลูมิเนียมคาร์บอกซิเลตไม่สามารถละลายน้ำและค่อนข้างคงตัวกว่า จึงทำให้วัสดุมีความแข็งแรงมากขึ้น ระยะนี้จะเกิดขึ้นช้าๆ และมีปฏิกิริยากรด-ด่างต่อเนื่องยาวนาน ดังนั้นในระยะแรกของปฏิกิริยา วัสดุจะค่อนข้างไวต่อการดูดน้ำ ส่วนในระยะที่สองของปฏิกิริยา วัสดุจะค่อนข้างไวต่อการสูญเสียน้ำ โดยในช่วงสั้นๆของการไวต่อการดูดน้ำ ถ้าสัมผัสน้ำจะมีผลทำให้วัสดุมีผิวที่นิ่ม และต้านทานต่อการสึกกร่อนต่ำ เป็นผลของการยับยั้งปฏิกิริยาการก่อตัวในชั้นผิวของซีเมนต์ นอกจากนี้แล้ว แคลเซียมที่อยู่ในตัวฟันยังสามารถจับกับโมเลกุลของกรดได้เช่นกัน ทำให้กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ยึดกับเนื้อฟันได้ ส่วนประจุอื่นๆ เช่น ฟลูออไรด์ไอออน (F^-) ซึ่งไม่ได้เกี่ยวข้องกับการทำปฏิกิริยาก็จะอยู่เป็นอิสระและค่อยๆ ถูกปลดปล่อยออกมาจากวัสดุ เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดลง ส่วนผงที่เหลือจากการแตกตัวก็จะกระจายแทรกอยู่ทั่วๆไปในซีเมนต์ ปฏิกิริยาทางเคมีของกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ขณะก่อตัว ตั้งแต่เริ่มผสม สามารถแบ่งออกได้ดังนี้ (รูปที่ 1)

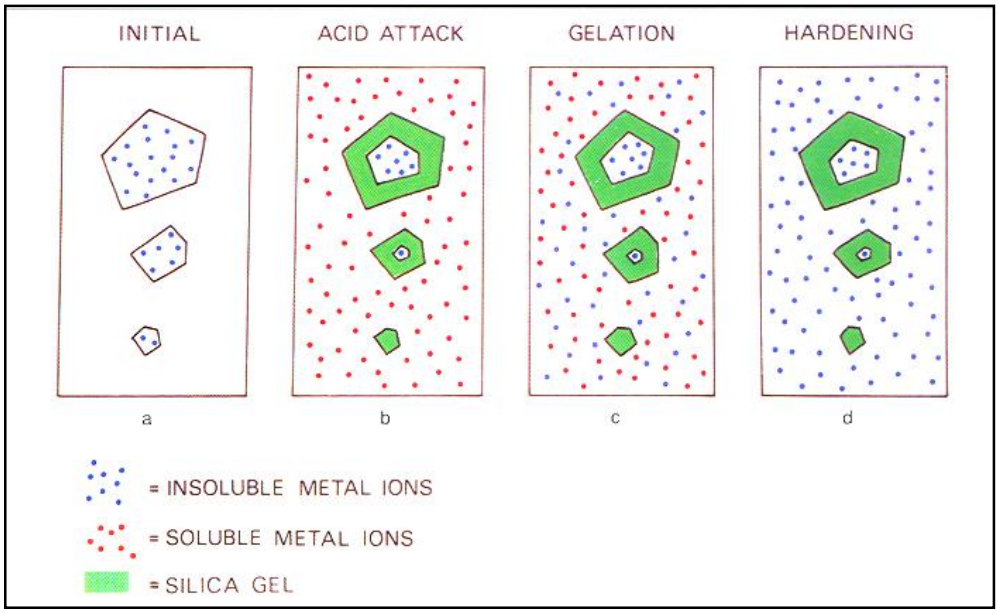
1. **การแยกตัวของแก้วและการเคลื่อนตัวของประจุ** (Decomposition of the glass and migration of ions)

เมื่อผสมส่วนผงเข้ากับส่วนเหลว กรดในส่วนเหลวจะจับกับผิวของผงแก้วอะลูมิเนียมซิลิเกต แต่ส่วนผงจะมีมากกว่าส่วนเหลวประมาณร้อยละ 20-30 การที่กรดจับกับผงแก้วจะทำให้ผงแก้วอะลูมิเนียมซิลิเกตเกิดการละลายกลายเป็นซิลิกาเจล พร้อมทั้งปล่อยประจุต่าง ๆ ซึ่งได้แก่ แคลเซียม อะลูมิเนียมและฟลูออไรด์ไอออนออกมา ไอออนเหล่านี้จะเคลื่อนสู่ส่วนเหลวของซีเมนต์ และส่วนของกรดสามารถจับกับไอออนบวกของแคลเซียมได้ดีกว่าอะลูมิเนียม ความเข้มข้นของแคลเซียมไอออนจึงมีสูงกว่าความเข้มข้นของอะลูมิเนียมไอออน[51] นอกจากนั้นค่าความเป็นกรด-ด่างก็เพิ่มขึ้น และซีเมนต์จะมีความหนืดมากขึ้น

2. **การเกิดวุ้นและความไวต่อน้ำ** (Gelation and vulnerability to water)

ระยะนี้ซีเมนต์จะเริ่มก่อตัว โดยเกิดเป็นแคลเซียมพอลิอะคริเลตก่อน และจะค่อยๆแข็งตัวมากขึ้นเมื่ออะลูมิเนียมพอลิอะคริเลตในเมทริกซ์เพิ่มขึ้น ซึ่งอะลูมิเนียมพอลิอะคริเลตในเมทริกซ์จะเพิ่มขึ้นค่อนข้างช้า แคลเซียมพอลิอะคริเลตละลายน้ำได้ง่ายกว่าและเสถียรน้อยกว่าอะลูมิเนียมพอลิอะคริ

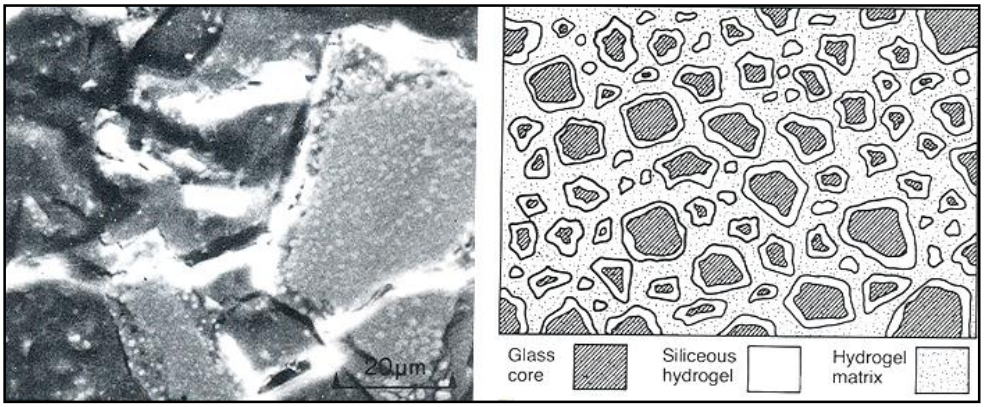
เลต โครงสร้างของซีเมนต์จะประกอบด้วย ซิลิเชียสไฮโดรเจล (เกิดจากซิลิกาเจลที่แยกตัวออกมารวมกับไฮโดรเจนไอออน) ล้อมรอบผงแก้วที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาไว้ และมีเมทริกซที่มีส่วนประกอบของแคลเซียมพอลิอะคริเลตและอะลูมิเนียมพอลิอะคริเลตเป็บตัวประสานของซีเมนต์ ดังรูปที่ 2 ในระยะนี้มีความสำคัญต่อการปฏิบัติงานในคลินิก คือ แม้ซีเมนต์จะก่อตัวแข็งระดับหนึ่งแล้ว แต่การก่อตัวยังไม่สมบูรณ์ แคลเซียม อะลูมิเนียมและฟลูออไรด์ไอออน ซึ่งละลายในน้ำได้ หากสัมผัสกับน้ำก็จะถูกละลายออกมาได้ ความแข็งแรงของซีเมนต์จะด้อยลง และดูดซับน้ำ ทำให้วัสดุขาดความสวยงาม ดังนั้นจึงไม่ควรให้สัมผัสกับน้ำ



รูปที่ 1 แสดงปฏิกิริยาทางเคมีของการก่อตัวของกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ ตั้งแต่เริ่มทำปฏิกิริยาจนกระทั่งปฏิกิริยาสิ้นสุด (คัดลอกจาก Glass ionomer cement, Wilson AD, McLean JW 1998[42])

3. การแข็งตัวหลังจากการก่อตัว (Post-set hardening)

หลังจากผสมส่วนผงและส่วนเหลวผ่านไป 1 ชั่วโมง ซีเมนต์จึงจะแข็งแรงเพียงพอที่จะไม่อ่อนแอเมื่อสัมผัสความชื้น แต่ซีเมนต์ยังจะแข็งมากขึ้นเรื่อยๆ และแข็งตัวเต็มที่ใช้เวลาประมาณ 24 ชั่วโมง หรือมากกว่า ซึ่งหลังจาก 24 ชั่วโมงไปแล้ว ซีเมนต์จะใสขึ้น และทนต่อความชื้นได้มากขึ้น



รูปที่ 2 แสดงโครงสร้างของกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ที่ก่อตัว โดยมีแกนแก้วล้อมรอบด้วยซิลิเชียสไฮโดรเจล และมีเมทริกซ์ของแคลเซียมพอลิอะคริเลตและอะลูมิเนียมพอลิอะคริเลตเป็นตัวประสานของซีเมนต์ (คัดลอกจาก Glass ionomer cement, Wilson AD, McLean JW 1998[42])

3. ไคโตซาน (Chitosan)

ไคโตซานมีคุณสมบัติชอบน้ำ ไม่มีพิษ[6] ไม่กระตุ้นให้เกิดการต่อต้านจากระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย สามารถสลายตัวได้ในร่างกายสิ่งมีชีวิต ด้วยเอนไซม์ไคติเนส (Chitinases) และไลโซไซม์ (lysozymes)[10] โดยผลิตผลที่ได้คือน้ำตาลอะมิโนซึ่งไม่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต มีความเสื่อมได้ทางชีวภาพ[7] มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ[7, 11] มีความยึดติดทางชีวภาพ (bioadhesion)[12] ไม่ก่อให้เกิดภูมิแพ้และไม่ก่อให้เกิดมะเร็ง[7] มีฤทธิ์ต้านจุลชีพและต้านเชื้อราได้[54] มีการนำไคโตซานมาใช้ในวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ส่งเสริมการหายของแผลบริเวณผิวหนัง เนื้อเยื่อในช่องปาก และกระดูก ใช้เป็นสารช่วยควบคุมการปลดปล่อยยา[6] ทำให้ยาออกฤทธิ์ได้นานขึ้น หรือพัฒนาในระบบการนำส่งสาร เช่น ยา วัคซีน[55] สารชีวโมเลกุล ยีนหรือดีเอนเอ ไปยังอวัยวะเป้าหมาย แนวคิดในการนำไคโตซานมาใช้กระตุ้นให้เกิดการงอกใหม่ของเนื้อเยื่อจำเป็นต้องมีการเติมชีวโมเลกุลที่มีความสามารถกระตุ้นกระบวนการสร้างเนื้อเยื่อ กระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ กระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์และเกิดการปรับรูปแบบ (remodeling) ของเมทริกซ์นอกเซลล์ได้

3.1 โครงสร้างทางเคมี

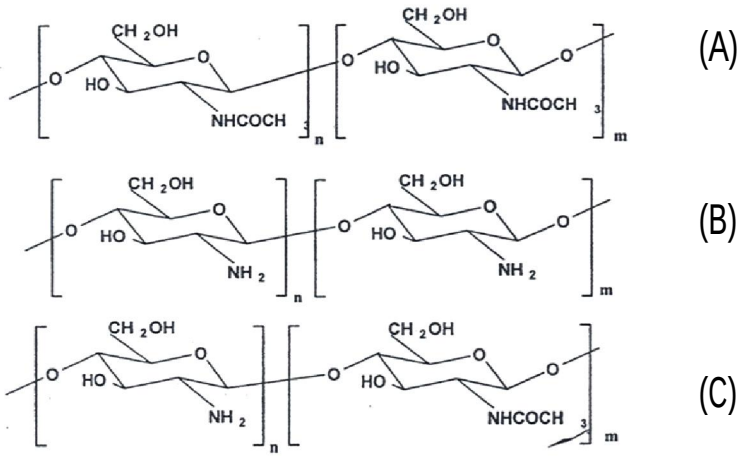
ไคโตซานเป็นพอลิเมอร์ที่เตรียมได้จากปฏิกิริยาดีอะเซตทิเลชัน (deacetylation) ของไคติน (chitin) ที่ละลายด้วยสารละลายด่างเข้มข้น ไคตินเป็นสารประกอบพวกคาร์โบไฮเดรตที่มีธาตุไนโตรเจนติดอยู่ เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ในเปลือกของสัตว์มีกระดอง เช่น เปลือกกุ้ง กระดองปูแกน

ปลาหมึก แมลงที่มีเปลือกหุ้มแข็ง ในผนังเซลล์เชื้อรา ยีสต์ และสาหร่ายบางชนิด โครงสร้างทางเคมีของไคติน (รูปที่ 3(A)) คือ poly(β-(1-4)-2-acetamido-D-glucose) สารไคตินที่พบในธรรมชาติจะมีโครงสร้างที่แตกต่างกันไปขึ้นกับแหล่งที่พบ หน่วยย่อยของไคตินประกอบด้วย น้ำตาลเอน-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีน (*N*-acetyl-D-glucosamine) การเปลี่ยนไคตินเป็นไคโตซานทำได้โดยการตัดหมู่แอซีทิลออกจากน้ำตาลเอน-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีน แทนที่ด้วยหมู่อะมิโน เรียกน้ำตาลตัวนี้ว่า น้ำตาลกลูโคซามีน (D-glucosamine) การดึงหมู่แอซีทิลออกเกินครึ่งหนึ่งหรือร้อยละ50 ขึ้นไปจะทำให้มีคุณสมบัติต่างไปจากไคติน เรียกว่า “ไคโตซาน” ซึ่งชื่อทางเคมี คือ poly(β-(1-4)-2-amino-D-glucose) (รูปที่ 3 (B))

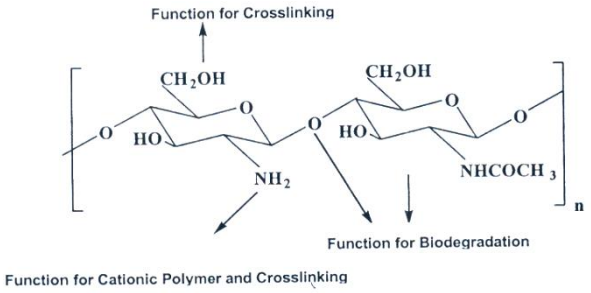
สายโซ่ที่มีหน่วยย่อยของไคตินและไคโตซานนั้นเป็นที่น่าสังเกตว่าจะอยู่ในรูปที่ผสมกันอยู่สลับหน่วยปะปนกันไปเป็นพอลิเมอร์ร่วม แม้ว่าจะนำไคตินมาผ่านกระบวนการปรับโครงสร้างทางเคมีด้วยการเปลี่ยนหมู่แอซีทาไมด์เป็นหมู่อะมิโน แต่จะไม่สามารถได้สายโซ่นี้ในรูปของไคโตซานร้อยละ 100 ดังนั้น จึงประกอบด้วยโมโนเมอร์ 2 ชนิด คือ *N*-acetyl-D-glucosamine และ D-glucosamine โดยที่ *N*-acetyl-D-glucosamine มีหมู่แอซีทาไมด์เป็นหมู่แทนที่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่สองในวงแหวนไพราโนส ส่วนกลูโคซามีน มีหมู่อะมิโนเป็นหมู่แทนที่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่สองในวงแหวนไพราโนส เมื่อพิจารณารูปที่ 3(C) จะเห็นได้ว่าโครงสร้างทางเคมีของพอลิเมอร์ร่วมมีหมู่อะมิโน (-NH2) และหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ที่ทำให้เกิดพันธะไฮโดรเจนภายในสายโซ่ (intramolecular hydrogen bonding) และระหว่างสายโซ่ (intermolecular hydrogen bonding) โดยที่พันธะไฮโดรเจนแบบภายในสายโซ่เดียวกันจะเกิดขึ้นระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง C-3 กับอะตอมออกซิเจน และระหว่างหมู่อะมิโนกับหมู่ไฮดรอกซิลที่ C-6 ซึ่งกันและกัน พอลิเมอร์ร่วมที่เกิดขึ้นจึงมีโครงสร้างที่แข็งแรง มีคุณสมบัติทางกายภาพทนต่อความร้อนสูง 320 องศาเซลเซียส

3.2 คุณสมบัติทางเคมี

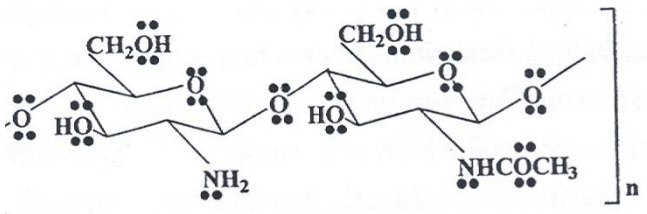
โครงสร้างของพอลิเมอร์ร่วมไคติน-ไคโตซานมีอะตอมไนโตรเจนเข้าไปอยู่ในรูปของหมู่แอซีตาไมด์และหมู่อะมิโนหมู่ฟังก์ชั่งที่สำคัญของไคติน-ไคโตซานจึงมี 3 หมู่ (รูปที่ 4)คือ หมู่อะมิโน หมู่แอซีตาไมด์ที่ตำแหน่ง C-2 และหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง C-3 (secondary alcohol) และ C-6 (primary alcohol) การศึกษาและพัฒนา ประยุกต์ใช้ไคติน-ไคโตซาน จะพิจารณาจากโครงสร้างทางเคมี โดยเฉพาะไคติน-ไคโตซานมีคู่อิเล็กตรอนอิสระประกอบอยู่ในอะตอมของไนโตรเจนและในหมู่ไฮดรอกซิล ดังรูป 5 ไคติน-ไคโตซานจึงสร้างพันธะไอออนกับไอออนบวกของโลหะด้วย รวมทั้งสามารถจับกับประจุลบบนผนังเซลล์ของจุลชีพ ทำให้เซลล์เสียสมดุลและเสียโครงสร้างไป จึงทำให้ไคติน-ไคโตซานมีคุณสมบัติต้านเชื้อจุลชีพได้



รูปที่ 3 แสดงโครงสร้างทางเคมีของไคติน (A) ไคโตซาน (B) และพอลิเมอร์ร่วมไคติน-ไคโตซาน(C) (คัดลอกจากเอกสารประกอบการบรรยายการประชุมเชิงปฏิบัติการ เรื่องไคตินและไคโตซานจากวัตถุดิบธรรมชาติสู่การประยุกต์ใช้ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2544[53])



รูปที่ 4 แสดงกลไกโดยรวมของหมู่เคมีในหน่วยไคติน-ไคโตซานที่มีหมู่ฟังก์ชั่ง 3 หมู่ (คัดลอกจากเอกสารประกอบการบรรยายการประชุมเชิงปฏิบัติการ เรื่องไคตินและไคโตซานจากวัตถุดิบธรรมชาติสู่การประยุกต์ใช้ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2544[53])



รูปที่ 5 แสดงอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวโดยรวมของหน่วยไคติน-ไคโตซาน (คัดลอกจากเอกสารประกอบการบรรยายการประชุมเชิงปฏิบัติการ เรื่องไคตินและไคโตซานจากวัตถุดิบธรรมชาติสู่การประยุกต์ใช้ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2544[53])

การศึกษาคุณสมบัติพิเศษของ ไคโตซานจากโครงสร้างทางเคมีอื่น ๆ ดังนี้

หมู่อะมิโนหรือแอซีทาไมด์

ไคโตซานเมื่อละลายในกรด หมู่อะมิโนจะกลายเป็นอะมิโนที่มีประจุบวก คือ $-NH_3^+$ สามารถจับกับพอลิเมอร์ของเนื้อเยื่อที่มีประจุลบ เช่น โปรตีน กรดนิวคลิอิก ทำให้มีคุณสมบัติในการเป็นสารเคลือบผิว รักษาความชุ่มชื้น ป้องกันเชื้อรา หรือแบคทีเรียได้ และในการย่อยสลายทางชีวภาพไคติน-ไคโตซานจะถูกย่อยด้วยปฏิกิริยาเอนไซมาติก ไฮโดรไลซิส (enzymatic hydrolysis) ได้น้ำตาลเอน-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีน และน้ำตาลกลูโคซามีน ซึ่งกลูโคซามีนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในร่างกายที่จะขจัดพิษในตับและไต รวมทั้งการดักจับไขมัน ช่วยลดระดับคลอเรสเตอรอล การที่ไคติน-ไคโตซานถูกย่อยเป็นมวลโมเลกุล หรือออลิโกเมอร์ (oligomer) จะช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ จึงมีการศึกษา การใช้ไคโตซานออลิโกเมอร์ใส่ลงบนบาดแผล จะทำให้บาดแผลหายได้เร็วขึ้น จากการที่เนื้อเยื่อหรือผิวหนังมีการเจริญเติบโตเร็วขึ้น ซึ่งอาจเนื่องมาจากไคโตซานออลิโกเมอร์ทำหน้าที่เป็นสายโซ่หลักของเส้นใยในลักษณะเซลล์สร้างเส้นใย (fibroblast) ส่งผลให้เกิดการก่อตัวของคอลลาเจนเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ[9]

หมู่อะมิโนมีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาเคมีสูง อนุพันธ์ของมันไม่เป็นอันตรายต่อร่างกาย ไคโตซานจึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการพัฒนาระบบการปลดปล่อยยา เป็นสารที่เหมาะแก่การนำไปพัฒนาเป็นระบบนำส่งยาเข้าสู่ร่างกายได้ หลักการ คือ นำโมเลกุลยาเชื่อมด้วยพันธะทางเคมีเข้ากับไคโตซาน โดยที่สามารถทำให้ยานั้นมีความเสถียรขึ้น ออกฤทธิ์ได้นานขึ้น หรือควบคุมการออกฤทธิ์ยาได้จากการแตกของพันธะในโครงสร้าง ดังนั้น หมู่อะมิโนบนไคโตซานนี้เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะสร้างพันธะเคมีกับโมเลกุลของยาให้เกิดระบบควบคุมการปล่อยยา (controlled release system)[53]

หมู่ไฮดรอกซิล

ในโครงสร้างทางเคมีของไคโตซาน พบว่า ทุกหน่วยของวงไพราโนสประกอบด้วย หมู่ไฮดรอกซิล 2 ประเภท คือ ประเภทปฐมภูมิ (primary alcohol) ที่คาร์บอนตำแหน่ง 6 และประเภททุติยภูมิ (secondary alcohol) ที่คาร์บอนตำแหน่ง 3 และจากความเป็นขั้วของหมู่ไฮดรอกซิล ทำให้ไคโตซานแสดงลักษณะจำเพาะคือชอบน้ำ (hydrophilic) จึงสามารถนำมาใช้เป็นสารเติมแต่งรักษาความชุ่มชื้นได้ แม้หมู่ไฮดรอกซิลจะมีความว่องไวในการทำปฏิกิริยาน้อยกว่าหมู่อะมิโน แต่ปริมาณของหมู่ไฮดรอกซิลไม่ได้ขึ้นกับร้อยละของการดึงหมู่แอซีทิลออก จึงสามารถปรับเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีที่ต้องการระดับการทดแทนที่สูงขึ้น (degree of substitution)

3.3 การเกิดพอลีอิเล็กโทรไลต์คอมเพลกซ์ (polyelectrolyte complex)

ไคโตซานสามารถเกิดเป็นพอลีอิเล็กโทรไลต์คอมเพลกซ์ด้วยพันธะไอออนระหว่างไคโตซานและกรดพอลีอคริลิก[14] ดังสมการ

$$(\text{Chitosan-NH}_2) + (\text{Polyacrylic-COO}^-) \xrightarrow{H^+} \text{polyelectrolyte complex } (NH3^+ \text{-OOC})$$

จากสมการเห็นได้ว่า การเกิดพอลีอิเล็กโทรไลต์คอมเพลกซ์ จะส่งผลให้ปริมาณไฮโดรเจนไอออน (H^+) อิสระลดลง ยังผลให้ค่าความกรด-ด่างกลับสู่สภาวะเป็นกลางได้เร็วขึ้น[14] ลักษณะเด่นของพอลีอิเล็กโทรไลต์คอมเพลกซ์ คือ มีความสามารถดูดน้ำหรือของเหลวจากสิ่งแวดล้อมได้ดี จึงได้รับความสนใจในการนำไปประยุกต์ใช้เป็นวัสดุในการควบคุมการปลดปล่อยยา เนื่องจากความสามารถในการดูดน้ำดังที่กล่าวไป คุณสมบัติการเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเนื้อเยื่อและคุณสมบัติที่ตัวยาหรือสารที่เราต้องการให้พอลีอิเล็กโทรไลต์คอมเพลกซ์ช่วยในการควบคุมการปลดปล่อยสามารถกระจายในเมทริกซ์ของพอลีอิเล็กโทรไลต์คอมเพลกซ์ได้ง่ายเพราะในขณะที่กรดพอลีอริลิกที่ละลายไคโตซานนั้น ไอออนบวกจากไคโตซานสามารถเกิดพันธะกับไอออนลบของกรดพอลีอคริลิก และยังสามารถเกิดพันธะระหว่างยาหรือสารและพอลิเมอร์อื่น ๆ ได้ มีผลทำให้การละลายตัวของสารเหล่านั้นลดลง และการที่พอลีอิเล็กโทรไลต์คอมเพลกซ์เกิดการบวมน้ำทำให้ยาแพร่ออกมาอย่างช้า ๆ[19]

งานวิจัยมากมายที่พยายามนำไคโตซานซึ่งละลายในกรดพอลีอคริลิกมาใช้เป็นวัสดุปิดแผล และมีการนำมาประยุกต์ใช้เป็นระบบนำส่งยา เช่น ในปี ค.ศ. 2006 คณะของ Mutsunaga[56] ได้ใช้ ไคโตซานโมโนเมอร์เป็นสารปิดเนื้อเยื่อในโพรงฟันของหนู (direct pulp capping) พบว่าเซลล์เนื้อเยื่อในสามารถสร้างเนื้อเยื่อที่มีการสะสมแร่ธาตุได้ นอกจากนั้นในการหาอัคคาไลน์ฟอสฟาเตสแอคติวิตีของเซลล์เนื้อเยื่อมนุษย์ก็พบว่ามีค่าอัคคาไลน์ฟอสฟาเตสแอคติวิตีสูงขึ้น แสดงว่า ไคโตซานมีความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อในของสัตว์และในเซลล์เนื้อเยื่อฟันมนุษย์ที่เพาะเลี้ยงไว้ งานวิจัยของ Ahn ค.ศ. 2002[16] ได้ทดลองนำมาใช้เป็นสารนำส่งยาไตรแอมซิโนโลนอะซิโตไนด์ (triamcinolone acetonide) ผ่านทางเยื่อเมือก และงานวิจัยของ de la Torre ค.ศ. 2005[17] ได้นำไคโตซานที่ละลายในกรดพอลิอคริลิกไปใช้เป็นสารนำส่งยาแอมม็อกซีซิลิน (amoxicillin) เพื่อควบคุมการส่งมอบยาแอมม็อกซีซิลิน ในกระเพาะอาหาร Petri และคณะ ปี ค.ศ. 2006[57] ได้ศึกษาการปลดปล่อยฟลูออไรด์ไอออนและความต้านแรงโค้งงอ (flexural strength) ของไคโตซานประยุกต์กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ พบว่า การเติมไคโตซานในกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ ร้อยละ 0.0044 โดยน้ำหนัก สามารถเพิ่มความต้านแรงโค้งงอได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการปลดปล่อยฟลูออไรด์

ในระยะเริ่มต้นใกล้เคียงกับกลาสไอโนเมอร์ซีเมนต์ แต่เมื่อเวลาผ่านไป 1 เดือน ปริมาณฟลูออไรด์สะสมที่ปลดปล่อยออกมาจากไคโตซานประยุกต์กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ พบว่า มากกว่าปริมาณฟลูออไรด์สะสมที่ปลดปล่อยจากกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ถึง 7.5 เท่า งานวิทยานิพนธ์ของอารยา ลิมาภรณ์วณิชย์ และคณะ พ.ศ. 2549 ศึกษาการปลดปล่อยโปรตีนในวัสดุไคโตซานประยุกต์กลาสไอโอโนเมอรซีเมนต์ โดยเติมไคโตซานร้อยละ 20 และโปรตีนร้อยละ 1.5 พบการปลดปล่อยโปรตีนเป็นผลแบบเบิซท (burst effect) ในชั่วโมงแรก คือ ในกลุ่ม GIC-AL มีการปลดปล่อยโปรตีนร้อยละ 0.09 และกลุ่ม GIC-CS-AL มีการปลดปล่อยโปรตีนร้อยละ 0.3 หลังจากนั้นมีการปลดปล่อยออกมาในระดับต่ำได้ตลอด 2 สัปดาห์ โดยในกลุ่ม GIC-AL คิดเป็นร้อยละ 0.3 และ กลุ่ม GIC-CS-AL คิดเป็นร้อยละ 1.19 นอกจากนั้นในงานวิจัยของอารยา ยังพบว่า โปรตีนที่ปลดปล่อยออกมาไม่ถูกทำลายโดยกรดของส่วนเหลวในกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ รวมทั้งสารละลายจากการแช่ชิ้นทดสอบไม่ได้เพิ่มความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟัน[58] และงานวิทยานิพนธ์ของนริศา แซ่เตียวในปี พ.ศ. 2551[59] ศึกษาการปลดปล่อยโปรตีนในวัสดุประยุกต์กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ โดยเติมไคโตซาน และโปรตีน พบว่า การปลดปล่อยโปรตีนโดยรวมได้ไม่ถึงร้อยละ 1 ในทุกกลุ่มตัวอย่างและในกลุ่มที่เติมไคโตซานจะมีการปลดปล่อยโปรตีนสูงกว่ากลุ่มที่ไม่เติม หรือเติมในสัดส่วนที่น้อยกว่า

จากการทบทวนวรรณกรรมข้างต้น ผู้วิจัยจึงมีความสนใจศึกษาผลการเติมไคโตซานลงในกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ร่วมกับสารชีวโมเลกุลโกรว์ทแฟตเตอร์ต่อคุณสมบัติทางชีวภาพ (biological properties) ของโกรว์ทแฟตเตอร์ที่เติมเข้าไป เนื่องจากปัญหาหนึ่งของการปลดปล่อยโปรตีน คือ การสูญเสียคุณสมบัติทางชีวภาพของโปรตีนที่ปลดปล่อยจากสารประกอบร่วมของไคโตซานกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์และโกรว์ทแฟตเตอร์ ซึ่งเป็นผลจากการเสียสภาพ (denature) และจากการทำลาย (deactivity) ของโปรตีนในกระบวนการสร้างเมทริกซ์ของสารประกอบดังกล่าว[20,21]

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพของของทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 ที่ปลดปล่อยออกวัสดุประยุกต์กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ที่มีต่อเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันมนุษย์ด้วยการทดสอบดังนี้
1.1 การตรวจหาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (cell viability) ด้วยวิธีเอ็มทีที (MTT assay)
1.2 การหาแอคติวิตีของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase activity)
1.3 การสร้างแคลเซียมของเซลล์เนื้อเยื่อในด้วยการย้อม von Kossa
2. เพื่อศึกษาลักษณะที่ปรากฏทางพื้นผิวและภาพหักขวางของวัสดุประยุกต์กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์

สมมุติฐานการวิจัย

1. ทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 ที่ปลดปล่อยออกวัสดุประยุกต์กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ส่งเสริมให้เซลล์เนื้อเยื่อในมีการเพิ่มจำนวนและเปลี่ยนสภาพไปเป็นเนื้อเยื่อที่สามารถสร้างแร่ธาตุได้แตกต่างจากกลาสไอโอโนเมอร์ชนิดดั้งเดิม
2. ลักษณะทางกายภาพที่ปรากฏบนพื้นผิวและภาพหักขวางของวัสดุประยุกต์กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์แตกต่างจากกลาสไอโอโนเมอร์ชนิดดั้งเดิม

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การศึกษานี้เป็นการศึกษานำร่องในการพัฒนาคุณสมบัติทางชีวภาพกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ร่วมกับสารชีวโมเลกุลเพื่อนำไปสู่การพัฒนาทันตวัสดุที่มีประสิทธิ์ผลในการสร้างเนื้อเยื่อทดแทนทั้งในส่วนเนื้อเยื่อใน หรือเนื้อเยื่อของอวัยวะอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับงานทันตกรรม

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

การดำเนินงานวิจัยเรื่อง คุณสมบัติทางชีวภาพของทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 ที่ปลดปล่อยจากวัสดุประยุกต์กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ต่อเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟัน ได้ผ่านคณะกรรมการจริยธรรมในการวิจัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (ภาคผนวก) การศึกษานี้ แบ่งวิธีการวิจัยดังนี้ คือ ตอนที่ 1 การเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟัน ตอนที่ 2 การเตรียมชิ้นทดสอบ ตอนที่ 3 การตรวจหาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ตอนที่ 4 การหาแอคติวิตีของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ตอนที่ 5 ศึกษาการสร้างแคลเซียมของเซลล์ด้วยการย้อม von Kossa ตอนที่ 6 ศึกษาพื้นผิวและภาพหักขวางของชิ้นทดสอบด้วยภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Scanning electron microscope: SEM) และตอนสุดท้ายกล่าวถึงวิธีการวิเคราะห์ผล แผนภูมิแสดงขั้นตอนการวิจัย รายละเอียดของวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้

ตอนที่ 1 การเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อใน

เนื้อเยื่อในโพรงฟันจากฟันกรามซี่สุดท้ายของมนุษย์ถูกเก็บมาโดยตัดผ่านตัวฟันด้วยหัวกรอที่ทำให้ปราศจากเชื้อ กรอด้วยความเร็วสูงร่วมกับหล่อเย็นด้วยน้ำปราศจากเชื้อ จากนั้นจึงนำเนื้อเยื่อนั้นไปผ่านขบวนการย่อยด้วยเอนไซม์ และเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์แอลฟา มอดิฟายด์ อีเกิลส (alpha modified Eagle's (α-MEM)) และเติมซีรัมจากลูกวัว (fetal calf serum: FCS) ร้อยละ 20 กรดแอสคอร์บิค 100 ไมโครโมล (L-ascorbic acid 2-phosphate) แอล กลูตามีน (L-glutamine) 2 มิลลิโมล เพนนิซิลลิน 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สเตรปโตมัยซิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเพาะเลี้ยงในตู้ที่คงอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5[24]

ตอนที่ 2 การเตรียมชิ้นทดสอบ (Specimens preparation)

ชิ้นทดสอบ 7 กลุ่มถูกเตรียมโดยมีสัดส่วนของส่วนผงและส่วนเหลวโดยน้ำหนัก และปริมาณทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 หรือสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer solution: PBS) ที่เพิ่มเติมโดยชิ้นทดสอบแต่ละชิ้นจะแทนด้วยสัญลักษณ์ย่อ ดังแสดงในตารางที่ 1

ชิ้นทดสอบถูกเตรียมโดยการชั่งส่วนผงกลาสไอโอโนเมอร์ (ฟลูออโรอะมิโนซิลิเกต กลาส ร้อยละ 100) ผงไคโตซาน และผงโปรตีนอัลบูมินจากซีรัมวัว (bovine serum alblumin: BSA) สัดส่วนให้น้ำหนักรวม

เป็น 700 มิลลิกรัม นำส่วนผสมใส่ในแคปซูลปั่นอมัลกัม ปั่นในเครื่องปั่นอมัลกัมปั่นที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 วินาที ดังรูปที่ 6a เพื่อให้ส่วนผงผสมเข้ากันได้ดี นำส่วนผสมดังกล่าวเก็บไว้ในหลอดพลาสติกที่ปราศจากเชื้อ และเมื่อต้องการผสมชิ้นทดสอบ จึงนำออกมาชั่งน้ำหนักส่วนผงที่ผสมแล้ว โดยสัดส่วนการผสมของส่วนผงต่อส่วนเหลว (กรดพอลีอคริลิกร้อยละ 40) เท่ากับ 1.17:1 [58, 59] และทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 ปริมาณ 100 นาโนกรัมต่อ 1 ชิ้นทดสอบ

การเตรียมทรานสฟอรมมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 ทำตามบริษัทผู้ผลิตแนะนำโดยใช้กรดซิตริก 10 มิลลิโมล ที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 3 ให้มีความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ส่วนประกอบของสารละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ใช้ในการศึกษาขั้นตอน แสดงในตารางที่ 2) แล้วจึงเจือจางให้ได้ความเข้มข้นของทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 เป็น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่มีอัลบูมินผสมอยู่ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บไว้ที่ตู้เย็น -80 องศาเซลเซียส เมื่อจะนำมาใช้จึงจะนำมาวางไว้ให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง ส่วนชิ้นทดสอบที่ไม่ได้ผสมสารชีวภาพ จะผสมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่มีอัลบูมินผสมอยู่ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในปริมาตรเท่ากับสารชีวภาพ เพื่อควบคุมให้มีปริมาตรส่วนเหลวที่เติมเข้าไปในชิ้นทดสอบแต่ละชิ้นเท่ากัน คือ ชิ้นงานละ 2 ไมโครลิตร

เมื่อผสมส่วนผง ส่วนเหลว และสารชีวภาพ หรือ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้ากันแล้ว จึงตักใส่แบบพิมพ์เทฟล่อน (Teflon mold) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร หนา 1 มิลลิเมตร ซึ่งวางบนแผ่นแก้ว (Glass slab) ที่หุ้มด้วยแผ่นพอลีเอทธิลีน โดยแบบพิมพ์เทฟล่อนจะบากร่องแยกไว้เพื่อให้วัสดุส่วนเกินไหลออกได้ จากนั้นใช้แผ่นแก้วที่หุ้มด้วยแผ่นพอลิเอทธิลีนอีกแผ่นหนึ่งกดทับไว้ ดังรูปที่ 6b และนำเข้าตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และแกะชิ้นทดสอบออกจากแบบพิมพ์ กำจัดส่วนเกินออก และนำไปทดสอบในแต่ละขั้นตอนต่อไป

ตอนที่ 3 การตรวจหาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต

การศึกษานี้ออกแบบกลุ่มเป็น 9 กลุ่ม ดังตารางที่ 3 และทำการทดสอบกลุ่มตัวอย่างๆละ 3 ชิ้น และทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง ทำให้กลุ่มการทดสอบมีขนาดกลุ่มตัวอย่าง 9 ชิ้นงาน โดยมีกลุ่มที่1 (G) กลุ่มที่ 8 และ 9 เป็นกลุ่มควบคุม ในรายงานการศึกษาตอนที่ 3 และ 4 จะเรียกกลุ่มที่ 8 ว่า กลุ่มที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เติมซีรัมจากลูกวัวร้อยละ 10 และกลุ่มที่ 9 ซึ่งเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี ซีรัมจากลูกวัวร้อยละ 10 ซึ่งเติมทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 ความเข้มข้น 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรหรือเรียกกลุ่มทดสอบทีจีเอฟมีเดียม (TGF medium) ทำการศึกษาเป็นเวลา 5 วัน

ตารางที่ 1 แสดงสัดส่วนผงกลาสไอโอโนเมอร์ ไคโตซาน โปรตีนอัลบูมินจากซีรัมวัว ในส่วนผงของชิ้นทดสอบ โดยน้ำหนัก

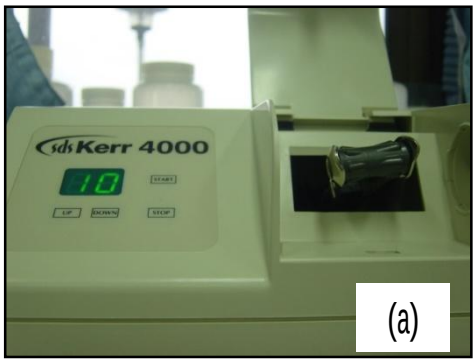
กลุ่มที่	สัญลักษณ์ย่อ	กลาสไอโอโนเมอร์ (G)	ไคโตซาน (C)	BSA (A)
1. G	G	100%	-	-
2. G-100ngTGF-β_1	G-TGF	100%	-	-
3. G-10A	G-A	90%	-	10%
4. G-10A-100ngTGF-β_1	G-A-TGF	90%	-	10%
5. G-15C	G-C	85%	15%	-
6. G-10A-15C	G-A-C	75%	15%	10%
7. G-10A-15C-100ngTGF-β_1	G-A-C-TGF	75%	15%	10%

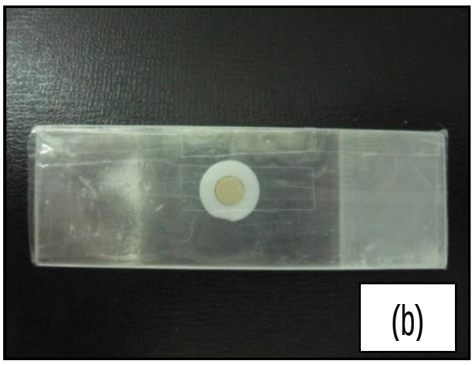
ตารางที่ 2 ส่วนประกอบของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ในการเตรียมสารละลาย 1 ลิตรที่ใช้ใน การเจือจางความเข้มข้นของทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 ปรับค่าความเป็นกรดด่างที่ 7.4

สาร	น้ำหนัก (กรัม)
NaCl	8
KCl	0.2
Na_2HPO_4	1.44
KH_2PO_4	0.24
BSA	1

หลักการตรวจหาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตวิธีเอ็มทีที (MTT Assay)[60]

เอ็มทีทีเป็นการวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต โดยวัดจากการทำงานของไมโตคอนเดรีย (Mitochondria activity) เนื่องจากเซลล์ที่มีชีวิต จะมีการสังเคราะห์อะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (adenosine triphosphate: ATP) และเปลี่ยนซัคซิเนต (succinate) ไปเป็นฟูมาเรต (fumarate) และเมื่อฟูมาเรตทำปฏิกิริยากับเกลือเตทตะโซเลียม (tetrazolium) ในเอ็มทีที ซึ่งคือ 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide จะเกิดเป็นผลึกสีน้ำเงิน ระดับความเข้มของสีจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับการรอดชีวิตของเซลล์[60]





รูปที่ 6 ส่วนผงที่ผ่านการชั่งน้ำหนักตามสัดส่วนถูกนำมาบรรจุในแคปซูลผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นอมัลกัม (SDS Kerr 4000) (a) นำส่วนผงที่ได้มาผสมกับส่วนเหลวของกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ แล้วจึงตักใส่ลงในแบบพิมพ์เทฟล่อนที่มีแผ่นพอลิเอทธิลีน และกระจกปิดอยู่ด้านบนและด้านล่างของแบบพิมพ์ (b)

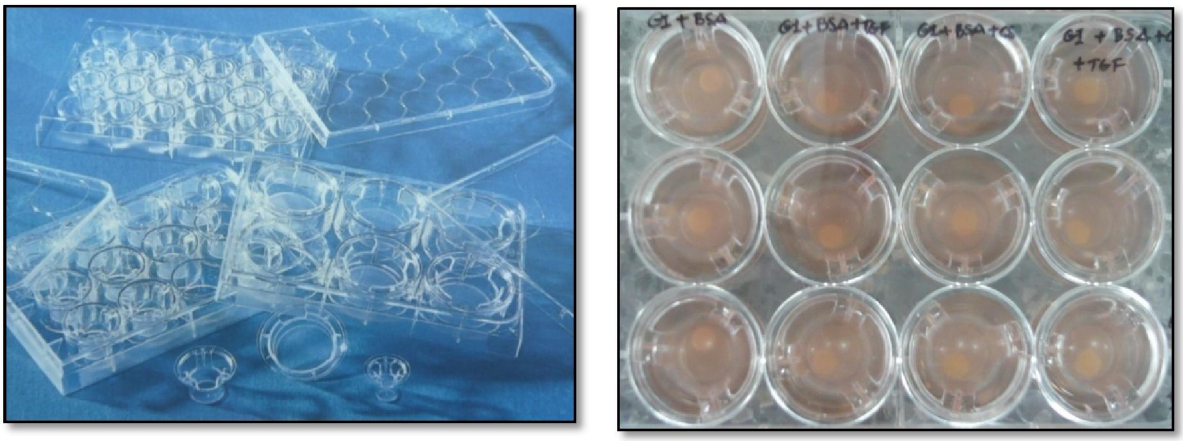
3.1 ขั้นตอนการเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อ การวางชิ้นทดสอบ และการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับการตรวจหาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต

เซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันมนุษย์จากผู้ที่เข้ามารับการผ่าตัดฟันคุดจำนวน 2 คนที่มีอายุ 18 ปี จำนวน 2 ซี่ ถูกนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ และนำเซลล์ในแพสเซจ (passage) ที่ 3-8 มาทดสอบ ใส่เซลล์จำนวน $6x10^4$ เซลล์ต่อหลุม เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันที่เติมซีรัมจากลูกวัวร้อยละ 10 กรดแอสคอร์บิค 100 ไมโครโมล แอล กลูตามีน 2 มิลลิโมล เพนนิซิลิน 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สเตรปโตมัยซิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเลี้ยงในชั้นล่างของทรานสเวลล์ (Transwell®, Corning) ชนิด 12 หลุม ดังรูปที่ 7 โดยใส่อาหารเลี้ยงเซลล์หลุมละ 1.5 มิลลิลิตร เลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ และนำชิ้นงานที่ผสมเตรียมไว้แล้ว วางในชั้นกั้นส่วนบน (Transwell Insert) เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ในชั้นบน 0.5 มิลลิลิตร โดยให้ท่วมชิ้นทดสอบ นำกลับเข้าตู้เลี้ยงเซลล์ และเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์หลังจากวางชิ้นทดสอบ 24 และ 48 ชั่วโมง ทำการทดสอบเอ็มทีทีหลังจากวางชิ้นทดสอบเป็นเวลา 5 วัน

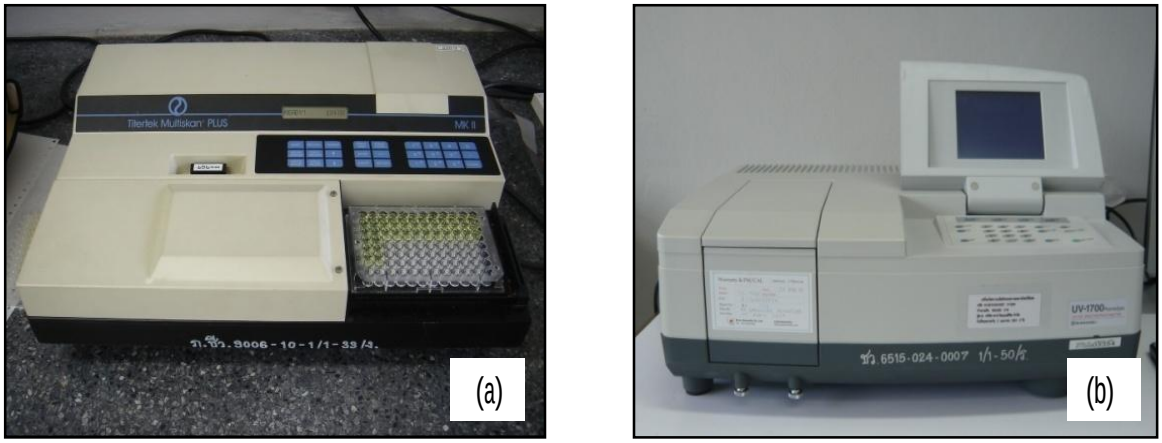
3.2 ขั้นตอนการทำเอ็มทีที

ชิ้นทดสอบและอาหารเลี้ยงเซลล์ถูกนำออกจนหมด จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสม 10 มิลลิโมล HEPES ที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 7.4 หลุมละ 1.5 มิลลิลิตร และเติม 375 ไมโครลิตรเอ็มทีที ที่ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.2 โดยมีความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ และปิดด้วยแผ่นกระดาษตะกั่ว (foil) นำเข้าตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้น ดูดเอาสารที่ใส่ไว้ออก

เติมไดเมธิลซัลฟอเนต (Dimethyl sulfonate: DMSO) 1.5 มิลลิลิตร และซอเรนเสน ไกลซีน บัฟเฟอร์ (Sorensen's glycine buffer) 187.5 มิลลิลิตร ในทุกหลุม จากนั้นดูดสารดังกล่าว หลุมละ 200 ไมโครลิตรลงใน 96 หลุม (96 well plate) นำไปอ่านค่าความทึบแสง (optical density: OD) ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ในเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectro-photometer) รุ่น Titertek Multiscan Plus MK II (เฮลซิงกิ ประเทศฟินแลนด์) ดังรูปที่ 8 (a) นำค่าที่ได้มาคำนวณการรอดชีวิตของเซลล์เป็นร้อยละ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม คือ กลุ่มที่ 8 โดยการรอดชีวิตของเซลล์ในกลุ่มที่ 8 ถือเป็นร้อยละหนึ่งร้อย นำค่าร้อยละของการรอดชีวิตมาวิเคราะห์ทางสถิติ



รูปที่ 7 แสดงทรานสเวลล์ชนิด 12 และ 6 หลุมที่ใช้ในงานวิจัยนี้



รูปที่ 8 เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (a) Titertek Multiscan Plus MK II และ (b) UV-1700 PhamaSpec

ตารางที่ 3 แสดงกลุ่มการศึกษาเซลล์ที่มีชีวิตและเอนไซม์อัคคาไลน์ฟอสฟาเตสแอคติวิตี

กลุ่มที่	กลาสไอโอโนเมอร์ (G)	ไคโตซาน (C)	BSA (A)	จำนวน (ชิ้น)
1.G	100%	-	-	3
2.G-TGF	100%	-	-	3
3.G-A	90%	-	10%	3
4.G-A-TGF	90%	-	10%	3
5.G-C	85%	15%	-	3
6.G-A-C	75%	15%	10%	3
7.G-A-C-TGF	75%	15%	10%	3
8.10% FCS pulp medium	-	-	-	3
9.10% FCS pulp medium with 1ng/mlTGF	-	-	-	3

หลักการทำงานของเครื่อง Titertek Multiscan MK II คือ ให้แสงอัลตราไวโอเลทหรือแสงในช่วงที่มองเห็นได้ฉายผ่านสารละลายชีวโมเลกุล พลังงานแสงจะไปกระตุ้นอิเล็คตรอนชีวโมเลกุล ทำให้ดูดกลืนพลังงานบางส่วนไว้ จึงทำให้แสงที่ผ่านออกมามีความเข้มข้นน้อยลง และค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) หรือความทึบแสง จะสัมพันธ์กับความเข้มข้น (c) ของชีวโมเลกุลในสารละลายตามกฎเบียร์-แลมเบริต (Beer-Lambert) ตามสมการดังนี้

$$A = \log_{10}(I_0/I) = kcl$$

I_0 และ I = ความเข้มข้นของแสงที่ฉายเข้าไปและที่ผ่านออกมาตามลำดับ
c = ความเข้มข้นของสารชีวโมเลกุลเป็นโมลาร์ (Molar (M))
l = ความหนาของสารละลายที่แสงผ่าน หน่วยเป็นเซนติเมตร
k = ค่าคงที่ทีเรียกว่า molar extinction coefficient หน่วยเป็น $M^{-1}cm^{-1}$

ตอนที่ 4 การหาแอคติวิตีของเอนไซม์อัคคาไลน์ฟอสฟาเตส

การศึกษานี้ออกแบบกลุ่มเป็น 9 กลุ่ม ดังตารางที่ 3 ทำการทดสอบกลุ่มตัวอย่าง ๆ ละ 3 ชิ้น โดยมีกลุ่มที่ 8 และ 9 เป็นกลุ่มควบคุม และทำการศึกษาเป็นเวลา 14 วัน การรายงานผลอัคคาไลน์ฟอสฟาเตสแอคติวิตีจะรายงานเป็น

ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีนของเซลล์ทั้งหมด (unit/mg total protein) เนื่องจากในแต่ละกลุ่มทดสอบมีจำนวนเซลล์รอดชีวิตแตกต่างกัน จึงคิดจากโปรตีนของเซลล์แทน ดังนั้น จึงต้องย่อยเซลล์ (lysate cell) และนำไปตรวจหาโปรตีนของเซลล์ก่อนจึงจะคำนวณค่าอัคคาไลน์ฟอสฟาเตสแอคติวิตีได้

4.1 ขั้นตอนการเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อใน การวางชิ้นทดสอบ และการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับงานหาแอคติวิตีของเอนไซม์อัคคาไลน์ฟอสฟาเตส

การศึกษานี้ใช้เซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันมนุษย์ของผู้ที่รับการผ่าตัดฟันคุด ของผู้ป่วย 1 คน อายุ 18 ปี จำนวน 1 ซี่ วิธีการเลี้ยงเซลล์ การใส่เซลล์ และการวางชิ้นทดสอบ มีขั้นตอนเหมือนใน 3.1 แต่จะใช้เซลล์เพียงหลุมละ $5x10^4$ เซลล์ ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ 24 ชั่วโมงแรกหลังวางชิ้นทดสอบ และจากนั้นจะเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์อีกทุก 48 ชั่วโมงหลังจากการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์หลังวางชิ้นทดสอบครั้งแรก จนครบ 14 วัน จากนั้นจึงทำการย่อยเซลล์ นำส่วนดูดลอย (supernatant) ที่ได้จากการย่อยเซลล์ ไปวัดเอนไซม์อัคคาไลน์ฟอสฟาเตสและหาปริมาณโปรตีนทั้งหมด

4.2 ขั้นตอนการย่อยเซลล์ (Preparation of lysate from adherent cells)

ขั้นตอนการย่อยเซลล์ได้ปฏิบัติตามคำแนะนำของบริษัท Promega Corporation (เมดิสัน ประเทศสหรัฐอเมริกา) ดังนี้ เมื่อครบกำหนดการวางชิ้นทดสอบ 14 วัน จึงนำชิ้นทดสอบและอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมด ล้างเบา ๆ ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2 ครั้งเพื่อกำจัดเซลล์ที่ตาย จากนั้น ย่อยเซลล์ด้วยรีโฟเตอร์ ไลซิส บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1 เท่า (1X Reporter Lysis Buffer: RLB) 150 ไมโครลิตร โดยให้คลุมเซลล์ทั้งหมด เขย่าเบาๆ และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที ระหว่างที่บ่มให้เขย่าหลายๆครั้ง หลังจากนั้นขูดเซลล์ออกจากก้นหลุมให้หมด และดูดสารละลายพร้อมเซลล์ดังกล่าวใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ (microcentrifuge) วางบนน้ำแข็ง เขย่าเบาๆ 10-15 วินาที นำไปเข้าเครื่องเหวี่ยงสารตกตะกอน เหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 15000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ดูดส่วนลอยใส่ในหลอดใหม่ แล้วจึงนำไปหาปริมาณโปรตีนเซลล์ทั้งหมดด้วยเทคนิคไบซินโคนินิกหรือบีซีเอ (Bicinchoninic Acid: BCA Protein Assay Colorimethod) และเอนไซม์อัคคาไลน์ฟอสฟาเตสด้วยวิธีของ Bessey และคณะ[61]

4.3 การเตรียมสารละลายโปรตีนอัลบลูมิน (BSA) มาตรฐาน

การเตรียมสารละลายโปรตีนอัลบลูมินจากซีรัมวัวนั้น เตรียมโดยนำสารละลายโปรตีนอัลบลูมินจากซีรัมวัวที่มีความเข้มข้นมาตรฐาน 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามชุดทดสอบที่บริษัท Pierce Biotechnology (ร็อกฟอร์ด ประเทศสหรัฐอเมริกา) กำหนด เจือจางด้วยรีโฟเตอร์ ไลซิส บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1 เท่า ให้ความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนอัลบลูมินจากซีรัมวัว มาตรฐานเป็น 1500 1000 750 500 250 125 และ 25 และไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังตารางที่ 4

4.4 การวัดปริมาณโปรตีนเซลล์ด้วยวิธีบีซีเอ

การวัดปริมาณโปรตีนด้วยเทคนิคบีซีเอ มีหลักการคือ โปรตีนในตัวอย่างทำปฏิกิริยากับคูปริค (Cupric: Cu^{2+}) ในสภาวะที่เป็นด่าง เกิดการเปลี่ยนคูปริค ให้เป็นคูปรัส (cuprous: Cu^{1+}) และเมื่อ คูปรัสจับกับกรดไบซินโคนินิก (Bicinchoninic) 2 โมเลกุล เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีม่วงการคำนวณปริมาณโปรตีนจะคำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตรจากเครื่อง สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น Titertek Multiscan MK II

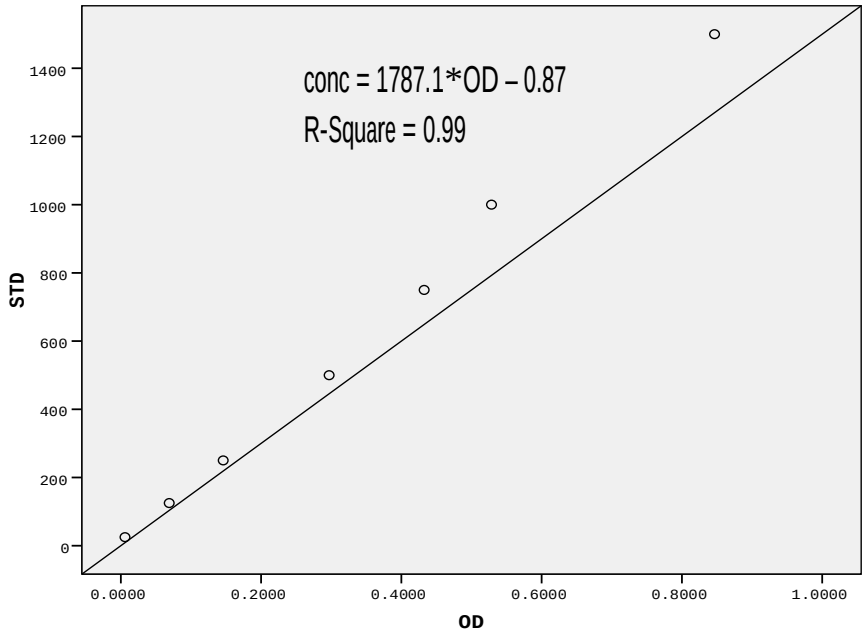
ตารางที่ 4 ความเข้มข้นโปรตีนอัลบูมินมาตรฐาน (ไมโครกรัม/ไมโครลิตร) ตามที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ

BSA มาตรฐาน	ปริมาตรและแหล่งของ BSA	ปริมาตรสารละลาย1X RLB
1. 1500 µg/ml	375 µl of stock	125 µl
2. 1000 µg/ml	325 µl of stock	325 µl
3. 750 µg/ml	175 µl of vial 1	175 µl
4. 500 µg/ml	325 µl of vial 2	175 µl
5. 250 µg/ml	325 µl of vial 4	325 µl
6. 125 µg/ml	325 µl of vial 5	325 µl
7. 25 µg/ml	100 µl of vial 6	400 µl

ขั้นตอนและวิธีการวัดปริมาณโปรตีน

ในการวัดปริมาณโปรตีนจะทำการวัดซ้ำ 2 ครั้ง ทั้งส่วนแบงค์ (blank) สารละลายโปรตีนอัลบูมินมาตรฐาน และส่วนลอยจากการย่อยเซลล์ และนำส่วนลอยจากการย่อยเซลล์ โดยทำใน 96 เวลล์ ไมโครไตเตอร์ (wells microtiter plate) และชุดตรวจปริมาณโปรตีนสำเร็จรูป (BCA kit, Pierce ร็อกฟอร์ด ประเทศสหรัฐอเมริกา) ที่อัตราส่วนตัวอย่างต่อเวิกกิงรีเอเจนต์ (working reagent) เท่ากับ 1:20 เริ่มจากการหยดสารละลายรีโฟเตอร์ ไลซิส บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1 เท่า เพื่อเป็นแบงค์ จำนวน 2 หลุมๆละ 10 ไมโครลิตร จากนั้นหยดสารละลายโปรตีนอัลบูมิน มาตรฐานความเข้มข้นที่เตรียมไว้และสารส่วนลอยจากการย่อยเซลล์ในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง เช่นเดียวกับการหยดแบงค์ จากนั้นเติมสารละลายเวิกกิงรีเอเจนต์ ที่ผสมจากรีเอเจนต์เอ (reagent A) และรีเอเจนต์บี (reagent B) ในอัตราส่วน 50:1 โดยหยดสารละลายเวิกกิงรีเอเจนต์ หลุมละ 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที ห่อปิดด้วยแผ่นกระดาษตะกั่ว และนำเข้าตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 30 นาที นำออกมาจากตู้อบและทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง วัดความทึบแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโต

มิเตอร์ รุ่น Titertek Multiscan MK II นำค่าความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนอัลบูมินมาตรฐาน และค่าความทึบแสง มาเขียนกราฟในโปรแกรมเอสพีเอสเอส (SPSS) และหาความสัมพันธ์เชิงเส้น (linear regression model) ระหว่างความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐานและค่าดูดกลืนแสง ดังรูป 9 เพื่อให้ได้สมการคำนวณความเข้มข้นโปรตีนในส่วนดูดลอยจากการย่อยเซลล์ โดยค่าความเข้มข้นของโปรตีนมีหน่วยเป็นไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 9 กราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน (STD) และค่าความทึบแสง (OD)

4.5 การหาค่าแอคติวิตีของเอนไซม์อัคคาไลน์ฟอสฟาเตส

เอนไซม์อัคคาไลน์ฟอสฟาเตส เป็นเอนไซม์ในกลุ่มไฮโดรเลส (hydrolase) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการแตกตัวของเอซิล เอสเธอร์ (Acyl ester) และฟอสฟอริล เอสเธอร์ (phosphoryl ester) เอนไซม์อัคคาไลน์ฟอสฟาเตสมีมากในเซลล์ที่ทำหน้าที่สร้างกระดูก ฟัน ตับ รก เซลล์ของท่อน้ำดี[62] นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์นี้เป็นสัญลักษณ์ (marker) ของการเปลี่ยนสภาพเป็นเซลล์เสมือนเซลล์สร้างเนื้อฟัน[62, 63] หน้าที่ของเอนไซม์อัคคาไลน์ฟอสฟาเตสยังไม่ทราบแน่ชัด แต่พบว่า จะทำงานร่วมกับการนำส่งไขมันที่ลำไส้เล็ก และร่วมกับการจับของแคลเซียม (calcification) ในกระดูก แต่เอนไซม์นี้ในกระดูกจะเสื่อมสภาพได้ง่ายเมื่ออุณหภูมิสูงประมาณ 60 องศาเซลเซียส การตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์อัคคาไลน์ฟอสฟาเตส อาศัยวิธีของ Bessey และคณะ[61] ซึ่งใช้พาราไนโตรฟีนอลฟอสเฟต (*p*-nitrophenol phosphate) เป็นสับสเตรท (substrate) คือ เอนไซม์อัคคาไลน์ฟอสฟาเตส จะไปเร่งปฏิกิริยา-

ทรานสฟอสฟอรีเลชัน (transphosphorylation) ของพาราไนโตรฟีนอลฟอสเฟตไปเป็นพาราไนโตรฟีนอล (*p*-nitrophenol) โดยการใช้ทรานสฟอสฟอรีเลติงบัฟเฟอร์ (transphosphorylating buffer) คือ 2-amino-2-methyl-1-propanol (AMP) และยังเร่งปฏิกิริยาด้วยแมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) หรือซิงค์ไอออน (Zinc ion) การเปลี่ยนแปลงในการดูดกลืนแสงจากการเกิดพาราไนโตรฟีนอล จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับแอคติวิตีของเอนไซม์อัคคาไลน์ฟอสฟาเตส

ขั้นตอนและวิธีหาค่าแอคติวิตีของเอนไซม์อัคคาไลน์ฟอสฟาเตส

สารละลายส่วนลอยจากขั้นตอนการย่อยเซลล์ ถูกนำมาหาค่าแอคติวิตีของเอนไซม์อัคคาไลน์ฟอสฟาเตสด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูปของบริษัท Human Gesellschaft Für Biochemica und Diagnostica mbH ประเทศเยอรมัน และขั้นตอนการหาแอคติวิตีจะปฏิบัติตามขั้นตอนที่บริษัทแนะนำ การเกิดปฏิกิริยาของสารเป็นไปตามสมการปฏิกิริยาดังนี้

$$p\text{-Nitrophenyl phosphate} + \text{AMP} \xleftrightarrow[Mg2+]{AP} \text{AMP-PO}_4 + p\text{-nitrophenol}$$

ขั้นตอนการทดสอบ เริ่มจากการอุ่นคิวเวตต์ (Cuvettes) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำส่วนดูดลอยจากกลุ่มทดสอบมา 20 ไมโครลิตรผสมกับบียูเอฟ (BUF) 1000 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 นาที จากนั้นใส่เอสยูบี (SUB) จำนวน 250 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน 1 นาที และนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงทันทีเมื่อครบ 1 นาที และวัดซ้ำหลังจากเวลาผ่านไป 1 2 และ 3 นาที การอ่านค่า การดูดกลืนแสงได้ใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ยี่ห้อ UV-1700 PhamaSpec (เกียวโต ประเทศญี่ปุ่น) ดังรูปที่ 8(b) ตั้งค่าความถี่คลื่น 405 นาโนเมตร การคำนวณหาค่าแอคติวิตีของอัคคาไลน์ฟอสฟาเตส จะคำนวณจากค่าเฉลี่ยการเปลี่ยนแปลงต่อหนึ่งหน่วยนาที (ΔA/min) คูณกับแฟคเตอร์ที่บริษัทกำหนดมา คือ 3433 มีหน่วยเป็นยูนิตต่อลิตร (U/L) เขียนเป็นสูตรได้ดังนี้

$$\text{ALP active (U/L)} = \Delta\text{A/min} \times 3433$$

ตอนที่ 5 ศึกษาการสร้างแคลเซียมของเซลล์ด้วยวิธีย้อม von Kossa

การศึกษานี้ออกแบบกลุ่มเป็น 8 กลุ่ม ดังตารางที่ 3 และทำการทดสอบกลุ่มตัวอย่างๆละ 1 ชิ้น และ โดยมีกลุ่มที่ 7 และ 8 เป็นกลุ่มควบคุม โดยในรายงานตอนที่ 5 จะเรียกกลุ่มที่ 7 ว่ากลุ่มที่เลี้ยงในโอดอนโตเจนนิกอินดักชัน(odontogenic inductive medium) และเรียกกลุ่มที่ 8 ว่ากลุ่มที่เลี้ยงในทีจีเอฟโอดอนโตเจนนิกอิน (TGF odontogenic inductive medium) ทำการศึกษาเป็นเวลา 21 วัน

5.1 ขั้นตอนการเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อใน การวางชิ้นทดสอบ และการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับการศึกษาการสร้างแคลเซียมของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันต่อชิ้นทดสอบ

การเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟัน จะใช้อาหารเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันที่เติมซีรัมจากลูกวัวร้อยละ15 และเมื่อเพาะเซลล์ลงในทรานสเวลล์ชนิด 6 หลุมแล้ว จะใช้อาหารที่เป็นโอดอนต์โตเจนนิก อินดักชัน[64] ซึ่งมีการเติมเบต้า กลีเซอโรฟอสเฟต (β-glycerophosphate) 10 มิลลิโมลต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค 0.2 มิลลิโมลต่อลิตร การเพาะเซลล์ และการวางชิ้นทดสอบ มีขั้นตอนเหมือนใน 3.1 แต่จะใช้เซลล์เพียงหลุมละ $3x10^4$ เซลล์ โดยเลี้ยงในชั้นล่างของทรานสเวลล์ ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์หลุมละ 2.6 มิลลิลิตร เลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ และนำชิ้นงานที่ผสมเตรียมไว้แล้ว วางในชั้นกั้นส่วนบน เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ในชั้นบน 1.5 มิลลิลิตร โดยให้ท่วมชิ้นทดสอบ นำกลับเข้าตู้เลี้ยงเซลล์ และเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์หลังจากวางชิ้นทดสอบ 24 และทุก 48 ชั่วโมง จนกระทั้งครบ 21 วัน จึงนำมาย้อมดูการสร้างแคลเซียมด้วยวิธี von Kossa[65]

5.2 ขั้นตอนการย้อม von Kossa

การตรวจดูการสะสมของแคลเซียมในเนื้อเยื่อโดยทั่วไปมักจะใช้วิธีย้อมด้วยวิธี von Kossa โดยที่ซิลเวอร์ไอออนเข้าแทนที่แคลเซียมในเนื้อเยื่อซึ่งจับกับฟอสเฟตหรือคาร์บอเนตไอออนอยู่แล้ว และเมื่อแคลเซียมถูกแทนที่ด้วยซิลเวอร์ไอออนแล้ว จะเห็นเป็นสีดำของซิลเวอร์ไอออน หลังจากวางชิ้นทดสอบจนครบ 21 วันแล้ว จากนั้นนำชิ้นทดสอบออก และดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจนหมด ล้างเซลล์ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2 ครั้ง จากนั้นตรึง (fixed) ด้วย เอธานอลร้อยละ 50 ต่อสารละลายฟอร์มาดีไฮด์ร้อยละ 18 เป็นเวลา 30 นาที ดูดสารออก เติมซิลเวอร์ไนเตรท (Silver nitrate) ร้อยละ 5 ให้คลุมเซลล์และบ่มภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตหรือยูวีเป็นเวลา 30 นาที ดูดสารออก และล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง เติมโซเดียมไธโอซัลเฟต (Sodium thiosulfate) ร้อยละ 5 บ่มไว้ 5 นาที จากนั้นใส่นิวเคลียร์ฟาสเรด (Neuclear fast red) ให้ท่วมเซลล์ แล้วดูดสารออก และทำให้แห้ง สีดำที่เกิดขึ้น คือ บริเวณที่มีการสร้างแคลเซียม ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ 3 ตา (AXIOSKOP 40 Carl Zeiss MicroImage GmbH, Zeiss ประเทศเยอรมัน)ที่กำลังขยาย 5 เท่า และถ่ายภาพด้วยกล้องถ่ายรูปดิจิตอล (Evolution™ LC Camera Kit version 4.5 บริษัท Media Cybernetics Inc ประเทศสหรัฐอเมริกา) จากนั้นนำไปคำนวณพื้นที่ที่สร้างแคลเซียมด้วยระบบประมวลผลชนิดความละเอียดสูง(digitalized image analysis system (Image Pro®Plus) Media Cybernetics Inc ประเทศสหรัฐอเมริกา) โดยพื้นที่ที่สร้างแคลเซียมคิดเป็นร้อยละ คือ พื้นที่ที่ติดสีดำหารด้วยพื้นที่ของหลุมที่เลี้ยงเซลล์ทั้งหมด คูณด้วย 100[65] ซึ่งแสดงดังสมการต่อไปนี้

ร้อยละของพื้นที่ที่สร้างแคลเซียม = (พื้นที่ที่ติดสีดำ/พื้นที่ทั้งหมด) x 100

ตารางที่ 5 กลุ่มศึกษาการสร้างแคลเซียมของเซลล์ด้วยวิธีย้อม von Kossa

กลุ่มที่	กลาสไอโอโนเมอร์ (G)	ไคโตซาน (C)	อัลบูมิน (BSA)	จำนวน (ชิ้น)
1. G	100%	-	-	1
2. G-TGF	100%	-	-	1
3. G-A	90%	-	10%	1
4. G-A-TGF	90%	-	10%	1
5. G-A-C	75%	15%	10%	1
6. G-A-C-TGF	75%	15%	10%	1
7.15%FCS odontogenic inductive medium	-	-	-	1
8.15%FCS odontogenic inductive medium with 1ngTGF/ml	-	-	-	1

ตอนที่ 6 ศึกษาพื้นผิวและภาพหักขวางของชิ้นทดสอบด้วยภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope (SEM))

กล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราด สร้างขึ้นโดย เอ็ม วอน เอนเดนนี (M. Von Andenne) ในปี ค.ศ. 1938 โดยลำแสงอิเล็กตรอนจะส่องกราดไปบนผิวของวัตถุ ทำให้ได้ภาพ 3 มิติ

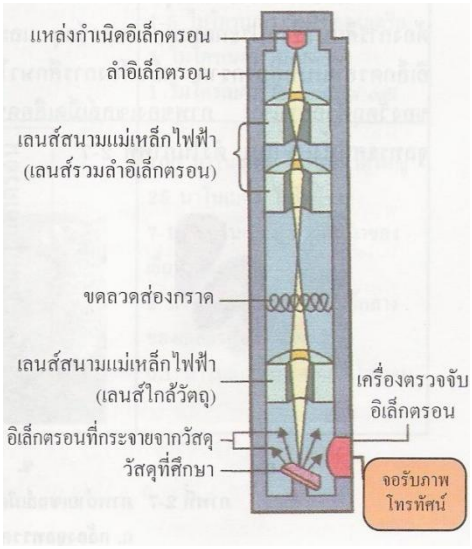
หลักการทำงานของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด[66]

แหล่งกำเนิดแสงอิเล็กตรอน ได้มาจากปืนยิงอิเล็กตรอน (Electron gun) ซึ่งเป็นขดลวดทังสเตน รูปตัววี เมื่อขดลวดทังสเตนรั้นขึ้นโดยการเพิ่มกระแสไฟฟ้าเข้าไปในขดลวด ทำให้อิเล็กตรอนถูกปลดปล่อยออกจากขดลวดทังสเตน อิเล็กตรอนมีขนาดเล็กมาก เมื่อชนกับมวลอากาศ จะทำให้ลำแสงอิเล็กตรอนเกิดการหักเห จึงได้ดูดอากาศออกจากตัวกล้องให้เป็นสุญญากาศ เลนส์ของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนจะเป็นเลนส์แม่เหล็กไฟฟ้า (electromagnetic lens) เมื่ออิเล็กตรอนถูกปล่อยออกมา อิเล็กตรอนจะผ่านเลนส์คอนเดนเซอร์ (condenser lens) เพื่อปรับให้มีความเข้มตามความเหมาะสมกับลักษณะตัวอย่าง ลำอิเล็กตรอนที่ถูกทำให้เข้มขึ้น แล้วจึงส่งผ่านตัวอย่าง ภาพของตัวอย่างที่ถูกส่องสว่างจะถูกขยายด้วยเลนส์วัตถุ (objective lens) จากนั้นสแกนคอยล์ (Scan coil) จะควบคุมการกวาดของลำแสงอิเล็กตรอนให้กวาดจากซ้ายไปขวา จนครบทั้งกรอบพื้นที่ผิวตัวอย่างซึ่งที่

ผิวตัวอย่างที่อิเล็กตรอนตกใส่ จะเกิดสัญญาณอิเล็กตรอนหลายรูปแบบ ถ้าผิวตัวอย่างเรียบ จะให้สัญญาณสะท้อนอิเล็กตรอนได้ดี แต่ถ้าผิวตัวอย่างเป็นหลุมลึก จะไม่ให้สัญญาณหรือให้สัญญาณได้น้อย ซึ่งจะรับสัญญาณโดยใช้ตัวตรวจจับสัญญาณ (detector) ที่เหมาะสมกับชนิดของสัญญาณ จากนั้นสัญญาณจะถูกขยายให้มีความแรงที่เหมาะสม แล้วนำมาสร้างเป็นภาพส่วนประกอบ หลักการทำงานของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงในรูปที่ 10

การเตรียมชิ้นทดสอบเพื่อใช้ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

ชิ้นทดสอบกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ (G) กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ที่เติม 100 นาโนกรัมทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 (G-TGF) กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ที่เติมโปรตีนอัลบูมิน ร้อยละ 10 (G-A) กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ที่เติมโปรตีนอัลบูมินร้อยละ10 และ100 นาโนกรัมทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 (G-A-TGF) กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ที่เติมโปรตีนอัลบูมิน ร้อยละ10 และไคโตซานร้อยละ15 (G-A-C) กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ที่เติมโปรตีนอัลบูมิน ร้อยละ10 ไคโตซานร้อยละ15 และเติม 100 นาโนกรัมทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 (G-A-C-TGF) ที่ผ่านการทดสอบในการศึกษาการสร้างแคลเซียมของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟัน ซึ่งแช่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์มานาน 21 วันเป็นตัวแทนในการศึกษา โดยนำชิ้นทดสอบมาซับให้แห้งและเก็บชิ้นทดสอบในเครื่องดูดความชื้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำชิ้นทดสอบมาหัก 3-4 ส่วน นำไปติดบนแท่นโลหะเล็กๆ (stub) ด้วยกาว 2 หน้า จากนั้นนำเข้าไปฉาบทองในเครื่อง Sputter coater เป็นเวลา 2 นาที ชิ้นทดสอบจะมีความหนาของทองที่เคลือบประมาณ 300-350 อังสตรอม (Å) จากนั้นจึงนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ศึกษาส่วนของพื้นผิวเรียบและพื้นผิวส่วนหัก (fracture surface) ของชิ้นทดสอบที่กำลังขยาย 2000 และ 7500 เท่า



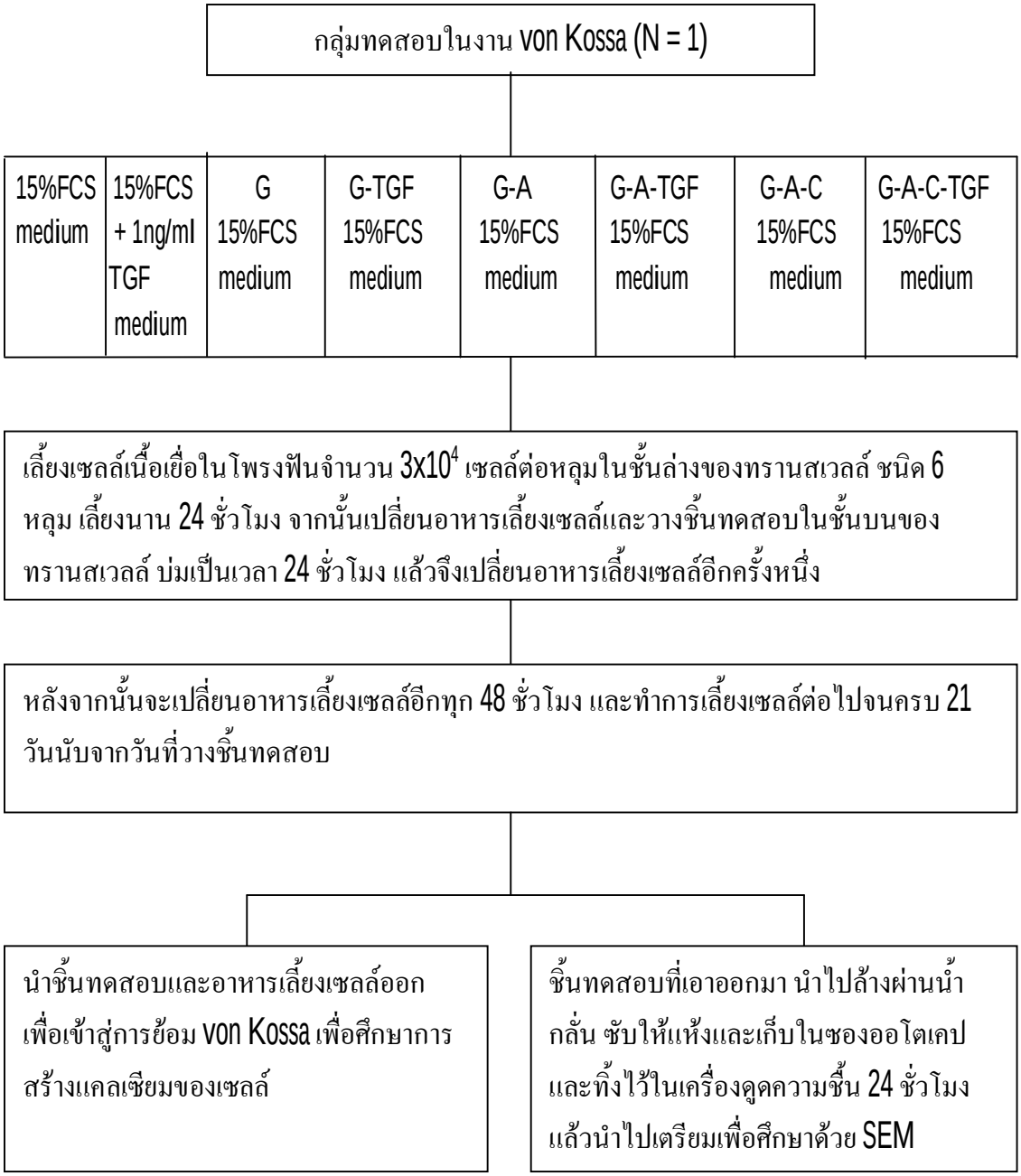
รูปที่10 การทำงานของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (คัดลอกจากเอกสาร " กล้องจุลทรรศน์" ศูนย์ความรู้วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี http://www1.stkc.go.th/stporta/IDocument/stportal_1170654028.doc[66])

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

ข้อมูลจากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์และการเพิ่มจำนวนเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันของมนุษย์เมื่อนำมาทดสอบการแจกแจง พบว่ามีความแตกต่างของค่าความแปรปรวนของข้อมูล และข้อมูลส่วนใหญ่มีการแจกแจงเป็นปกติ จึงเลือกใช้สถิติการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) ร่วมกับการเปรียบเทียบความแตกต่างชนิดพหุแบบตูเก้ (Tukey's multiple comparison test) ส่วนค่าเฉลี่ยแอคติวิตีของเอนไซม์อัคคาไลน์ฟอสฟาเตสของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันวิเคราะห์ด้วยสถิติการทดสอบที่ไม่ใช่พารามิเตอร์ ด้วยการทดสอบของครัสคาล วัลลิส (Kruskal Wallis test) ร่วมกับการเปรียบเทียบความแตกต่างชนิดพหุสติวเดนท์นิวแมนคูลส์ (Student-Newman-Keuls test) ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และการศึกษาผลการสร้างแคลเซียมของเซลล์เนื้อเยื่อในเปรียบเทียบแต่ละกลุ่มด้วยร้อยละของพื้นที่ที่สร้างแคลเซียม

แผนภูมิแสดงขั้นตอนการวิจัย

แผนภูมิแสดงขั้นตอนการวิจัย



ตารางที่ 6 รายละเอียดของวัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์	รายละเอียด
1. กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์	GI lining Cement ยี่ห้อ GC corporation ส่วนผงประกอบด้วย 100% fluoro-aluminosilicate glass Lot No. 0701151 ส่วนเหลวประกอบด้วย 40% polyacrylic acid Lot No. 0701091 โตเกียว ประเทศญี่ปุ่น
2. ไคโตซาน	ยี่ห้อ Fluka, 80% deacetylation น้ำหนักโมเลกุล 545 kDa Lot No.1138071 Steinhein ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
3. โปรตีนอัลบูมินจาก bovine serum	ยี่ห้อ Sigma น้ำหนักโมเลกุล 66 kDa pH 5.0-5.6 96% electrophoresis Cat No. A8022 St Louis ประเทศสหรัฐอเมริกา
4. ทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1	Recombinant Human TGF- β_1 จาก *CHO cells* น้ำหนักโมเลกุล 25 kDa Lot No. 0306S354 PeproTech Inc. New Jersey ประเทศสหรัฐอเมริกา
5. (3-(4,5-dimethylthaiazol-2-yl)-2,5-dimphenyltetrazolium bromide	บริษท Sigma Chemical Company St.Louis ประเทศสหรัฐอเมริกา
6. Dimethyl solfoxide (DMSO)	บริษท Sigma Chemical Company St.Louis ประเทศสหรัฐอเมริกา
7. (N-(2-Hydroxyelthyl) piperazine-N'-(2-ethanesulfonic Acid) (HEPES)	บริษท Sigma Chemical Company St.Louis ประเทศสหรัฐอเมริกา
8. Glycine	บริษท Sigma Chemical Company St.Louis ประเทศสหรัฐอเมริกา

ตารางที่ 6 (ต่อ)

วัสดุและอุปกรณ์	รายละเอียด
9. Reporter Lysis Buffer	บริษัท Promega Corporation Lot No. 241534 เมดิสัน ประเทศสหรัฐอเมริกา
10. BCA Protein assay kit	บริษัท Pierce Biotechnology Lot No. GJ98671 Rockford ประเทศสหรัฐอเมริกา
11. ชุดตรวจหาอัลคาไลน์แอตติวิตี	บริษัท Human Gesellschaft Für Biochemica und Diagnostica mbH Lot No.H080 Wiesbaden ประเทศเยอรมัน
12. Silver Nitrate ($AgNO_3$)	บริษัท VWR International Lot No. K36930038712 West Chester ประเทศสหรัฐอเมริกา
13. Nuclear Fast Red Solution	บริษัท Sigma-Aldrich Lot No. 087K4340 St.Louis ประเทศสหรัฐอเมริกา
14.Transwell® ชนิด 12 และ 6 wells	บริษัท Corning Incorporated 0.4µm Polycarbonate membrane Lot No. 08007033 นิวยอร์ค ประเทศสหรัฐอเมริกา
15.เครื่องชั่งทศนิยม 5 ตำแหน่ง	ยี่ห้อ Sartorius รุ่น MC 210s Goettingen ประเทศเยอรมัน
16. เครื่องปั่นอมัลกัม	ยี่ห้อ MikRo 22R ประเทศเยอรมัน
17. Incubator	ยี่ห้อMemmert ประเทศเยอรมัน
18. เครื่องนับเซลล์	ยี่ห้อ COULTER®Z™ นิวยอร์ค ประเทศสหรัฐอเมริกา

ตารางที่ 6 (ต่อ)

วัสดุและอุปกรณ์	รายละเอียด
19. Spectrophotometer งาน MTT และ BCA	ยี่ห้อ Titertek Multiscan Plus MK II บริษัท Flow Laboratories International Helsinki ประเทศฟินแลนด์
20. Spectrophotometer งานหาอัลคาไลน์ แอคติวิตี	ยี่ห้อ UV-1700 PhamaSpec บริษัท SHIMADZU เกียวโต ประเทศญี่ปุ่น
21. Transilluminater 312 nm ultraviolet	ยี่ห้อ Spectroline Model TS-312A บริษัท Spectronics corporation นิวยอร์ค ประเทศสหรัฐอเมริกา
22. เครื่อง sputter coate	ยี่ห้อ SPI-Module Sputter Coater บริษัท SPI Supplied Division of Structure Probe West Chester ประเทศสหรัฐอเมริกา
23. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่อง กราด	ยี่ห้อ JSM-5800 LV บริษัท JEOL โตเกียว ประเทศญี่ปุ่น
24. กล้องจุลทรรศน์ชนิด 3 ตา	ยี่ห้อ Axioskop 40 บริษัท Carl Zeiss MicroImaging GmbH ประเทศเยอรมัน
25. กล้องถ่ายรูปดิจิตอล	ยี่ห้อ Evolution™ LC Camera Kit version 4.5 บริษัท Media Cybernetics Inc Bethesda ประเทศสหรัฐอเมริกา

ตารางที่ 7 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเซลล์ สารเคมีและบริษัทผู้ผลิต

ส่วนประกอบและสารเคมี	รายละเอียด
1. alpha modified of Eagle's medium (α-MEM)	บริษัท Gibgo (Life Technologies) Lot No. 416522 นิวยอร์ค ประเทศสหรัฐอเมริกา
2. Fetal calf serum (FCS) 10, 15, 20%	บริษัท Seromed Klosterneuburg ประเทศเยอรมัน
3. 100µm L-ascorbic acid 2-phosphate ในงานเอ็มทีที และอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส 200µm L-ascorbic acid 2-phosphate ในงาน von Kossa	บริษัท Sigma Chemical Company St.Louis ประเทศสหรัฐอเมริกา
4. 2mM L-glutamine	บริษัท Gibgo (Life Technologies) นิวยอร์ค ประเทศสหรัฐอเมริกา
5. 100 unit/ml penicillin 100 mg/ml streptomycin	บริษัท Gibgo (Life Technologies) Calsbad ประเทศสหรัฐอเมริกา
6. Fungizone	บริษัท Gibgo (Life Technologies) Calsbad ประเทศสหรัฐอเมริกา
7. 10mM/l β-glycerophosphate (Glycerol-2-phosphate disodium salt hydrate)	บริษัท Sigma Chemical Company St.Louis ประเทศสหรัฐอเมริกา

บทที่ 3

ผลการวิจัย

ผลการวิจัยคุณสมบัติทางชีวภาพของทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 ที่ปลดปล่อยจากวัสดุประยุกต์กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ต่อเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันของมนุษย์ แบ่งออกเป็น ส่วนที่ 1 แสดงผลการตรวจหาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ส่วนที่ 2 แสดงผลการหาแอคติวิตีของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ส่วนที่ 3 แสดงผลการศึกษาการสร้างแคลซียมของเซลล์ด้วยวิธีย้อม von Kossa และส่วนที่ 4 แสดงผลของภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของชิ้นทดสอบ ดังมีรายละเอียดดังนี้

1. ผลการตรวจหาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วยวิธีเอ็มทีที

การตรวจหาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต รายงานฉบับนี้ ใช้คำว่า ค่าเฉลี่ยร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ ซึ่งจะแปรผันตามค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสง การรอดชีวิตของเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่ 8 คือ กลุ่มของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันที่เลี้ยงในทรานสเวลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ แอลฟา มอดิฟายด์ อีเกิลส ที่เติมซีรัมจากลูกวัวร้อยละ10 และไม่ได้วางชิ้นทดสอบ เมื่อทดสอบเอ็มทีที ในวันที่ 5 นับจากวันที่วางชิ้นทดสอบ คิดการรอดชีวิตของเซลล์เป็นค่าเฉลี่ยร้อยละ100 เมื่อนำค่าเฉลี่ยร้อยละของการรอดชีวิตของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันมาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มทดสอบ ดังตารางที่ 8 วิเคราะห์ความแตกต่างด้วยสถิติชนิดพหุแบบตูเก้ ดังตารางที่ 9 และสรุปผลค่าเฉลี่ยร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ ตามตารางที่ 10 พบว่ากลุ่มที่ไม่ได้วางชิ้นทดสอบและเลี้ยงด้วยอาหารที่เติม 1 นาโนกรัมทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 ต่อ 1 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเซลล์ มีการรอดชีวิตของเซลล์มากที่สุด แต่ไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ที่เติมโปรตีนอัลบลูมิน และทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 (G-A-TGF) แต่มีความแตกต่างจากกลุ่มอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนกลุ่มกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ที่เติมโปรตีนอัลบลูมิน และทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 (G-A-TGF) มีการรอดชีวิตของเซลล์ไม่ต่างจากกลุ่มกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ที่เติมโปรตีนอัลบลูมิน (G-10A) กลุ่มกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ที่เติมทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 (G-TGF) และกลุ่มกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ (G) โดยกลุ่มกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ที่เติมโปรตีนอัลบลูมิน และทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 (G-A-TGF) มีค่าเฉลี่ยร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์มากกว่ากลุ่มกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ที่เติมโปรตีนอัลบลูมิน และไคโตซาน (G-A-C) กลุ่มกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ที่เติมไคโตซาน (G-C) และกลุ่มกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ที่เติมโปรตีนอัลบลูมิน ไคโตซาน และทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 (G-A-C-TGF) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 8 แสดงค่านัยสำคัญทางสถิติทดสอบค่าเฉลี่ย ค่าเฉลี่ยร้อยละของการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยสถิติการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว

ANOVA table	df	Sum of squares	Mean square	F value	P value*
Between groups	7	14993.456	2141.922	14.222	0.000
Within groups	64	9638.920	150.608		
Total	71	24632.376			

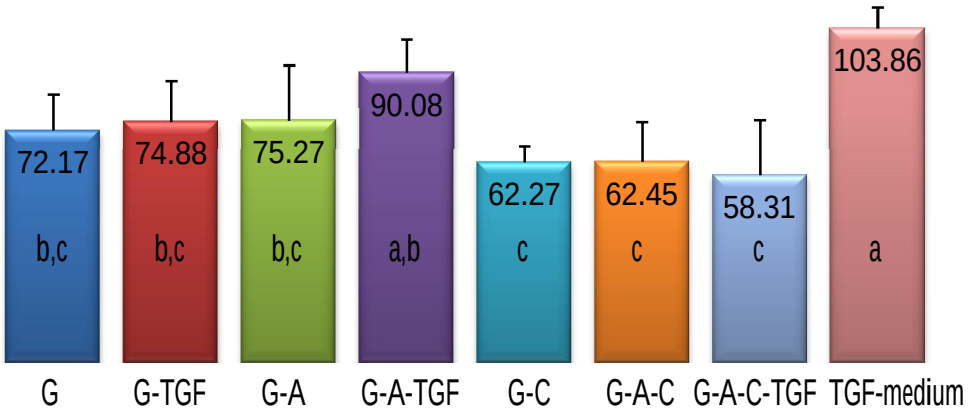
ตารางที่ 9 แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยร้อยละของการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยสถิติวิเคราะห์ชนิดพหุแบบตูเก้

กลุ่ม	ค่าเฉลี่ยร้อยละของการรอดชีวิตของเซลล์		
	Subset 1	Subset 2	Subset 3
1. G-A-C-TGF	58.31		
2. G-C	62.27		
3. G-A-C	62.45		
4. G	72.17	72.17	
5. G-TGF	74.88	74.88	
6. G-A	75.27	75.27	
7. G-A-TGF		90.08	90.08
8.10%FCS pulp medium with 1ng/mlTGF			103.86
P-value	.083	.055	.268

ตารางที่ 10 สรุปผลค่าเฉลี่ยร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ (ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ณ วันที่ 5 หลังการวางชิ้นทดสอบ

กลุ่ม	จำนวนชิ้นทดสอบ	ค่าเฉลี่ยร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม
1. G	9	72.17(11.21)[b,c]
2. G-TGF	9	74.88(12.74)[b,c]
3. G-A	9	75.27(17.17)[b,c]
4. G-A-TGF	9	90.08(10.47)[a,b]
5. G-C	9	62.27(4.95)[c]
6. G-A-C	9	62.45(12.39)[c]
7. G-A-C-TGF	9	58.31(17.08)[c]
8. 10%FCS pulp media with 1ng/mlTGF	9	103.86(6.53)[a]

หมายเหตุ ตัวอักษรยกภาษาอังกฤษที่ต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อทดสอบด้วยสถิติการวิเคราะห์ความแตกต่างชนิดพหุแบบตูเก้



รูปที่ 11 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ ณ วันที่ 5 หลังวางชิ้นทดสอบ
หมายเหตุ ตัวอักษรยกภาษาอังกฤษที่ต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อทดสอบด้วยสถิติการวิเคราะห์ความแตกต่างชนิดพหุแบบตูเก้

2. ผลการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์อัคคาไลน์ฟอสฟาเตส

จากข้อมูลของเอนไซม์อัคคาไลน์ฟอสฟาเตสแอคติวิตีของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันในกลุ่มทดสอบ ตามตารางที่ 11 และ 12 พบว่า เซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เติมซีรัมจากลูกวัวร้อยละ 10 และเติมทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 ความเข้มข้น 1 นาโนกรัมต่ออาหารเลี้ยงเซลล์ 1 มิลลิลิตรและไม่ได้วางชิ้นทดสอบมีการสร้างเอนไซม์อัคคาไลน์ฟอสฟาเตสสูงกว่ากลุ่มอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มที่ไม่ได้วางชิ้นทดสอบและเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์แอลฟามอดิฟายด์ อีเกิลส ที่เติมซีรัมจากลูกวัวร้อยละ10 ที่มีการสร้างเอนไซม์อัคคาไลน์ฟอสฟาเตสต่ำที่สุด แสดงว่า ทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 ที่ความเข้มข้น 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรมีผลให้เซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันมีเอนไซม์อัคคาไลน์ฟอสฟาเตสแอคติวิตีสูงขึ้น เซลล์ในกลุ่มที่ทดสอบด้วยชิ้นทดสอบกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ ที่เติมทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 (G-TGF) และชิ้นทดสอบกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ที่เติมโปรตีนอัลบลูมิน ไคโตซาน และทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 (G-A-C-TGF) ทั้ง 2 กลุ่มมีค่าเฉลี่ยเอนไซม์อัคคาไลน์ฟอสฟาเตสไม่แตกต่างกัน แต่สูงกว่ากลุ่มอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ค่าเฉลี่ยเอนไซม์อัคคาไลน์ฟอสฟาเตสในกลุ่มที่ทดสอบในชิ้นทดสอบกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ (G) และชิ้นทดสอบกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ที่เติมโปรตีนอัลบลูมิน และทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 (G-A-TGF) ไม่แตกต่างกัน แต่สูงกว่ากลุ่มที่ทดสอบในชิ้นทดสอบกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ที่เติมโปรตีนอัลบลูมิน (G-A) กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ที่เติมไคโตซาน (G-C) และกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ที่เติมโปรตีนอัลบลูมิน ไคโตซาน (G-A-C) อย่างไรก็ตามเซลล์ใน 3 กลุ่มสุดท้ายนี้ มีค่าเฉลี่ยเอนไซม์อัคคาไลน์ฟอสฟาเตสสูงกว่าเซลล์ในกลุ่มที่ไม่วางชิ้นทดสอบและเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เติมซีรัมจากลูกวัวร้อยละ 10 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

3. ผลการศึกษาการสร้างแคลซียมของเซลล์ด้วยวิธีย้อม von Kossa

การศึกษาผลการสร้างแคลเซียมของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันต่อชิ้นทดสอบนั้น มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาผลของทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 ที่ปลดปล่อยออกมาจากวัสดุไคโตซานประยุกต์กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ ในกระตุ้นการเปลี่ยนสภาพของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันไปเป็นเซลล์เสมือนเซลล์สร้างเนื้อฟันและเซลล์เสมือนเซลล์สร้างเนื้อฟันนั้นสร้างเนื้อฟันได้หรือไม่ และเนื่องจากการสร้างแคลเซียมเป็นองค์ประกอบหลักของเนื้อฟัน จึงได้ทำการย้อม von Kossa ดูการสร้างแคลเซียมของเซลล์ พบว่าบริเวณที่สร้างแคลเซียมจะย้อมติดสีดำดังรูปที่ 12 ผลการย้อม von Kossa และคำนวณพื้นที่ที่สร้างแคลเซียม ทุกกลุ่มสามารถสร้างแคลเซียมได้คิดเป็นร้อยละของพื้นที่ที่สร้างแคลเซียม ดังแสดงในตารางที่ 13 กลุ่มเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ และไม่ได้วางชิ้นทดสอบ ร่วมกับเติมทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 ความเข้มข้น 1 นาโนกรัมต่อ 1 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเซลล์ มีการสร้างแคลเซียมมากที่สุด (ร้อยละ72.94) และมากกว่าในกลุ่มที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่เติมทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 (ร้อยละ 49.03)

แสดงว่าทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 มีผลกระตุ้นให้เซลล์มีการเปลี่ยนสภาพ และสร้างแคลเซียมมากขึ้น พื้นที่ที่สร้างแคลเซียมของเซลล์ที่ทดสอบกับชิ้นทดสอบจากมากไปน้อยตามลำดับดังนี้ G-TGF (ร้อยละ 57.82) G-A-C-TGF (ร้อยละ 44.49) G (ร้อยละ 39.67) G-A-TGF (ร้อยละ 34.05) G-A-C (ร้อยละ 26.34) และ G-A (ร้อยละ 25.72)

ตารางที่ 11 ค่าเฉลี่ยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสแอคติวิตี (ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

กลุ่ม	จำนวนชิ้นทดสอบ	ค่าเฉลี่ยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสแอคติวิตี (ยูนิต* ต่อมิลลิกรัมโปรตีนของเซลล์ทั้งหมด)
1. G	3	0.21(0)[c]
2. G-TGF	3	0.23(0)[b]
3. G-A	3	0.18(0)[d]
4. G-A-TGF	3	0.21(0.01)[c]
5. G-C	3	0.18(0.01)[d]
6. G-A-C	3	0.18(0.01)[d]
7. G-A-C-TGF	3	0.23(0)[b]
8. 10%FCS pulp medium	3	0.15(0.02)[e]
9. 10%FCS pulp medium with 1ng/mlTGF	3	0.25(0)[a]

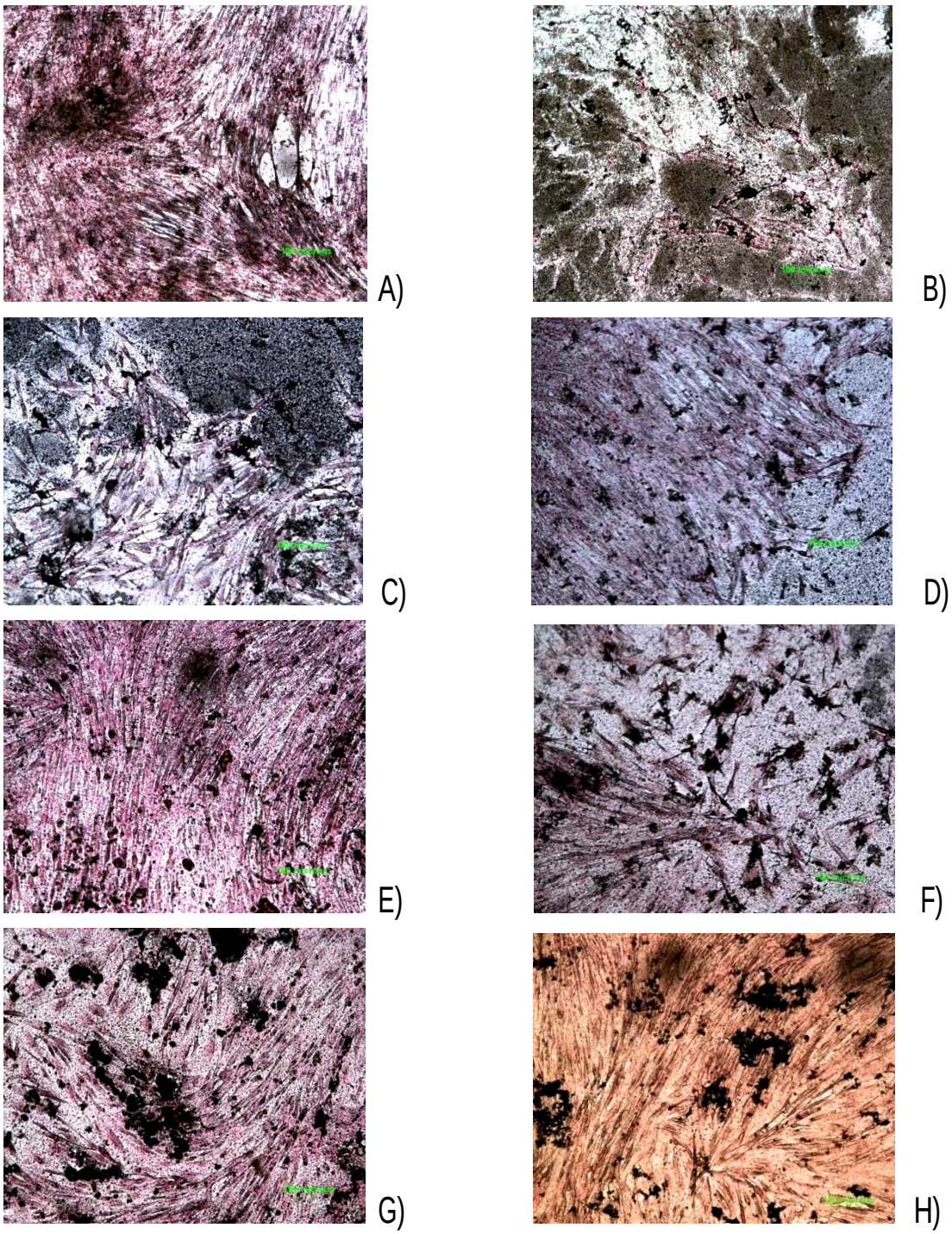
หมายเหตุ ตัวอักษรยกภาษาอังกฤษที่ต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อทดสอบด้วยสถิติการวิเคราะห์ความแตกต่างชนิดสติวเดนท์นิวแมนคูลส์ (Student Newman- Keuls test)[60] (* 1 ยูนิต = 16.67 nmol *p*-nitrophenol/min)

ตารางที่ 12 แสดงการทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเอนไซม์อัคคาไลน์ฟอสฟาเตสแอคติวิตีด้วยสถิติทดสอบชนิดสติวเดนท์นิวแมนคูลส์

กลุ่ม	ค่าเฉลี่ยเอนไซม์อัคคาไลน์ฟอสฟาเตสแอคติวิตีของเซลล์				
	Subset 1	Subset 2	Subset 3	Subset 4	Subset 5
1. 10%FCS pulp medium	0.153				
2. G-A		0.1767			
3. G-C		0.18			
4. G-A-C		0.18			
5. G			0.21		
6. G-A-TGF			0.21		
7. G-A-C-TGF				0.23	
8. G-TGF				0.233	
9. 10%FCS pulp medium with 1ng/mlTGF					0.25
p-value	1.000	0.872	1.000	0.623	1.000

ตารางที่ 13 แสดงพื้นที่ที่สร้างแคลเซียมจากการย้อม von Kossa คิดเป็นร้อยละ

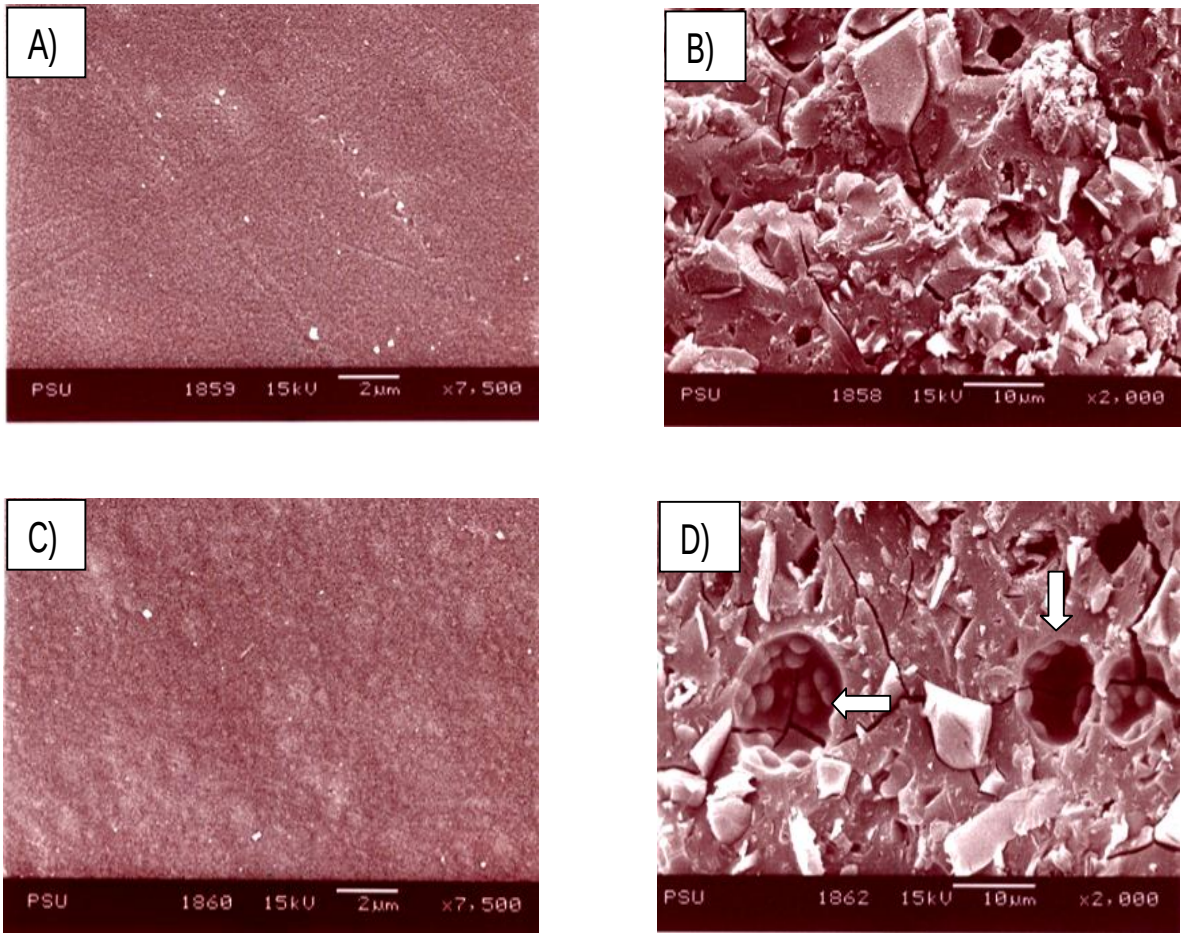
กลุ่ม	ร้อยละของพื้นที่ที่สร้างแคลเซียม
1. G	39.67
2. G-TGF	57.82
3. G-A	25.72
4. G-A-TGF	34.05
5. G-A-C	26.34
6. G-A-C-TGF	44.49
7. 15% FCS odontogenic induction medium	49.03
8. 15% FCS odontogenic induction media with 1ng/mlTGF	72.94



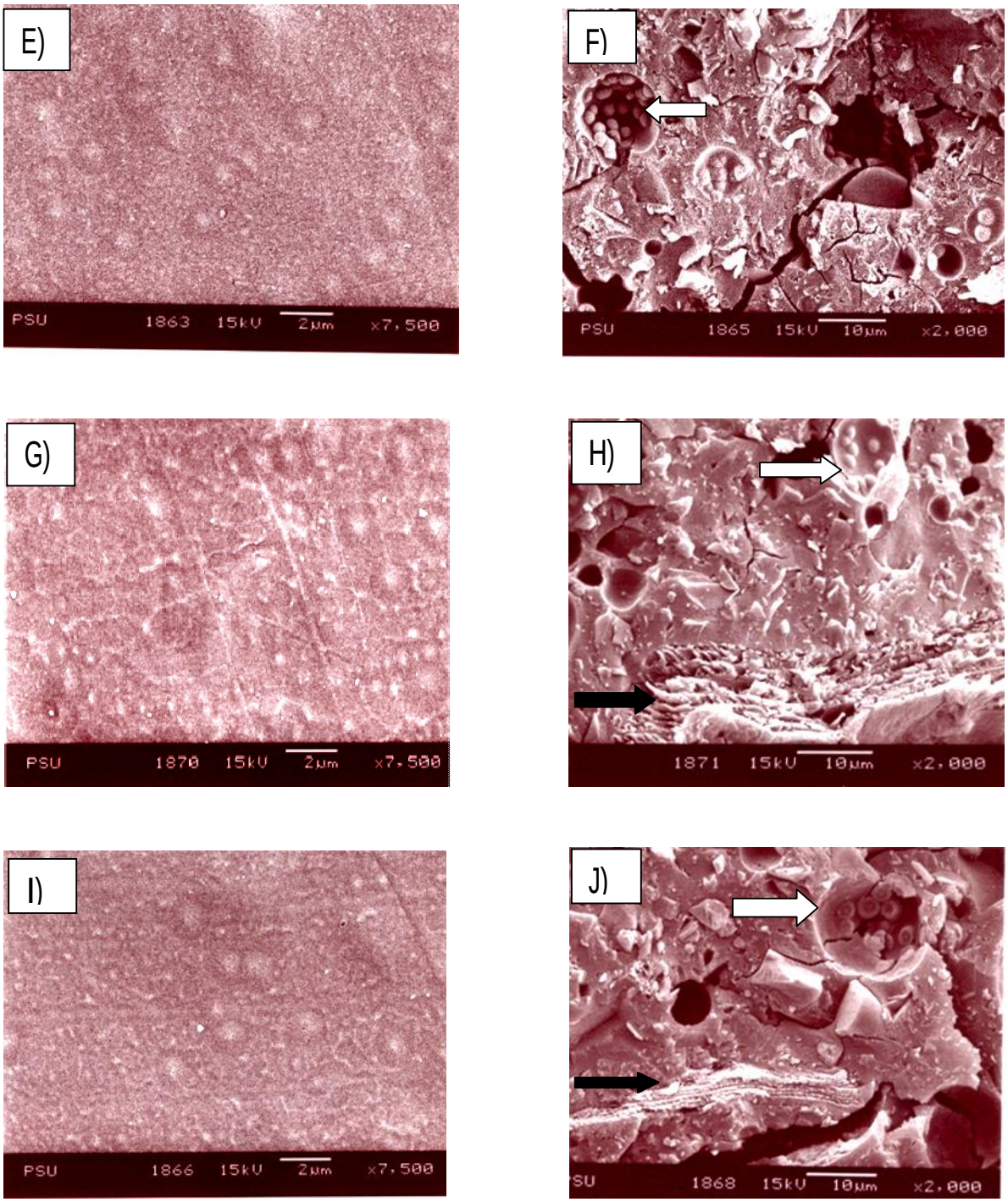
รูปที่ 12 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน กำลังขยาย 5 เท่า แสดงการย้อมด้วยวิธี von Kossa บริเวณที่เป็นสีดำเป็นบริเวณที่มีการสร้างแคลเซียม A): odontogenic inductive medium B): 1ng /ml TGF odontogenic inductive medium C): G D): G- TGF E): G-A F): G-A-TGF G): G-A-C H): G-A-C-TGF (เส้นสีเขียว แสดงช่วง 100 ไมโครเมตร)

4. แสดงผลของภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของชิ้นทดสอบ

ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่า พื้นผิวของชิ้นทดสอบทุกกลุ่ม รวมทั้งกลุ่ม G-C-TGF มีลักษณะค่อนข้างเรียบ และพื้นผิวด้านหักขวางมีลักษณะดังรูป 13 ภาพของพื้นผิวด้านหักขวางจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ชิ้นงานกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ มีลักษณะเป็นผลึก มีช่องว่าง พบรูพรุนและรอยแตกเล็กๆหลายตำแหน่ง ชิ้นทดสอบที่มีการเติมโปรตีนอัลบูมิน หรือทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 จะพบว่ามีก้อนกลมแทรกอยู่ในเนื้อของชิ้นทดสอบ ชิ้นทดสอบที่เติมไคโตซานร่วมกับโปรตีนทั้ง 2 ชนิด จะพบทั้งลักษณะก้อนกลม (globule) ร่วมกับมีรอยคล้ายรอยพับเป็นชั้นๆแทรกอยู่ในชิ้นทดสอบ ก้อนกลมที่พบ น่าจะเป็นโปรตีนที่เติมลงไป ลักษณะเส้นใยคล้ายรอยพับน่าจะเป็นไคโตซานที่ละลายในกรดพอลีอคริลิกและแทรกตัวอยู่ภายในก้อนซีเมนต์



รูปที่13 ภาพทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงผิวด้านเรียบและภาคหักขวางของชิ้นทดสอบหลังแช่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 21 วัน A) B):G C) D):G-TGF และลูกศรสีขาวชี้ลักษณะก้อนกลมในชิ้นทดสอบที่เติมโปรตีนและทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1



รูปที่ 13 ภาพทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงผิวด้านเรียบและภาคหักขวางของชิ้นทดสอบหลังแช่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 21 วัน E) F): G-A G) H): G-A-C I) J): G-A-C-TGF ลูกศรสีขาวชี้ลักษณะก้อนกลมในชิ้นทดสอบที่เติมโปรตีนและทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 และลูกศรสีดำแสดงลักษณะของเส้นใยพับไปมาหลายชั้นในชิ้นทดสอบที่เติมไคโตซาน

บทที่ 4

บทวิจารณ์

ส่วนของบทวิจารณ์ในการศึกษานี้ ประกอบด้วยบทวิจารณ์ในส่วนของผลการวิจัย วิธีการวิจัยและข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคตดังต่อไปนี้

บทวิจารณ์ผลการวิจัย

การตรวจหาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในงานวิจัยนี้ ได้เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์หลังจาก 24 ชั่วโมงที่วางชิ้นทดสอบ เพื่อชะล้างความเป็นพิษต่อเซลล์ของชิ้นทดสอบ เนื่องจากการทดลองนำร่อง พบว่าเซลล์ในกลุ่มที่วางชิ้นทดสอบทุกหลุมตายหมดเมื่อทดสอบเอ็มทีทีในวันที่ 3 ซึ่งไม่ได้เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เลย การเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใน 24 ชั่วโมงแรกเป็นการกำจัดสิ่งที่เป็นพิษต่อเซลล์ออกไปค่อนข้างมาก เนื่องจากกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์จะมีความเป็นพิษสูงสุดในช่วง 24 ชั่วโมงแรก เพราะค่าความเป็นกรดที่สูงของซีเมนต์[51, 68] นอกจากจะกำจัดความเป็นพิษของกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์แล้ว สารอื่น ๆ ที่ปลดปล่อยแบบเบิซทใน 24 ชั่วโมงแรกก็ถูกชะออกไปด้วย เนื่องจากผู้วิจัยต้องการศึกษาผลที่นานกว่า 24 ชั่วโมง

หากเปรียบเทียบกลุ่มของกลาสไอโอโนเมอร์ (G) กับกลุ่มกลาสไอโอโนเมอร์ที่เติมโปรตีนอัลบลูมิน (G-A) ค่าเฉลี่ยร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ทั้ง 2 กลุ่มไม่แตกต่างกัน แสดงว่า การเติมโปรตีนอัลบลูมินในกลาสไอโอโนเมอร์ไม่ได้เพิ่มความเป็นพิษต่อเซลล์ ส่วนกลุ่มที่เติมทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 ในกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์โดยไม่เติมโปรตีนอัลบลูมิน (G-TGF) มีค่าเฉลี่ยร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ใกล้เคียงกับกลุ่มกลาสไอโอโนเมอร์ (G) และกลุ่มกลาสไอโอโนเมอร์ที่มีโปรตีนอัลบลูมิน (G-A) เป็นไปได้ว่า ทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 ถูกกักอยู่ในชิ้นทดสอบและในช่วง 5 วันแรกไม่ถูกปลดปล่อยออกมา จึงไม่ได้ทำให้การรอดชีวิตของเซลล์แตกต่างจากกลุ่มที่กล่าวมา หากทำการศึกษานานกว่านี้ อาจพบว่า จำนวนเซลล์อาจเพิ่มมากขึ้นได้ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ที่เติมโปรตีนอัลบลูมิน และทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 (G-A-TGF) พบว่า กลุ่มกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ที่เติมโปรตีนอัลบลูมิน และทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 (G-A-TGF) มีค่าเฉลี่ยร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ (ร้อยละ 90.08) มากกว่ากลุ่มกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ที่เติมทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 อย่างเดียว (G-TGF) (ร้อยละ 74.88) แม้ว่าจะไม่มีความแตกต่างทางสถิติ น่าจะเกิดจากการเติมอัลบลูมินในกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ช่วยให้ปลดปล่อยทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 ได้ดีขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาของ Murray และคณะ[69] ที่พบว่า การเติมโปรตีนอัลบลูมิน มีส่วนช่วยการปลดปล่อยโกรว์ทแฟกเตอร์ และกล่าวได้ว่า การเติมทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1

ร่วมกับการเติมโปรตีนอัลบูมินลงในกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ไม่ได้ทำให้คุณสมบัติทางชีวภาพของทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 ในแง่การกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันเสียไป

เมื่อพิจารณากลุ่มของกลาสไอโอโนเมอร์ที่เติมไคโตซาน (G-C, G-A-C, G-A-C-TGF) ทุกชิ้นทดสอบ กลับพบว่ามีค่าเฉลี่ยร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ต่ำที่สุด เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่เติมไคโตซาน อาจเป็นไปได้ว่าความเป็นพิษต่อเซลล์ของชิ้นทดสอบที่เติมไคโตซานจะค่อย ๆ เกิดขึ้น หรือค่อย ๆ ปลดปล่อยสารที่มีพิษนานกว่าในกลุ่มที่ไม่เติมไคโตซาน หรือการเติมไคโตซานลงในผงกลาสไอโอโนเมอร์ เมื่อผสมกับส่วนเหลวของกรดพอลีอคริลิก ความเป็นกรดของชิ้นซีเมนต์หลังการแข็งตัวอาจคงอยู่นานกว่า หรือรูปแบบการปลดปล่อยไอออนอาจเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม จึงทำให้การรอดชีวิตของเซลล์ต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่เติมไคโตซาน โดยที่ความเป็นพิษต่อเซลล์นั้นไม่น่าจะเกิดจากไคโตซานเอง เนื่องจากการศึกษาต่าง ๆ ที่ผ่านมา พบว่า ไคโตซานไม่เป็นพิษต่อเซลล์[11, 56] รวมทั้งการศึกษาของอารยาก็พบว่า ไคโตซานไม่ได้เพิ่มความเป็นพิษต่อเซลล์ของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟัน เซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันสามารถเจริญเติบโตมาเกาะติดกับชิ้นทดสอบกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ที่เติมไคโตซาน แต่ในส่วนของการหาอัคคาไลน์ฟอสฟาเตสแอคติวิตีและย้อม von Kossa ที่เลี้ยงเซลล์ไว้นาน 14 และ 21 นั้น กลุ่มกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ที่เติมอัลบูมิน ไคโตซาน และทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 (G-A-C-TGF) ให้ผลสูงใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมที่เติมทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ แสดงว่า ทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 ที่เติมลงไปในชิ้นทดสอบได้ถูกปลดปล่อยออกมาและคงฤทธิ์ทางชีวภาพได้ เวลาที่เพิ่มขึ้นอาจมีส่วนให้เกิดการเสื่อมสลายของซีเมนต์และปลดปล่อยสารชีวภาพที่มีฤทธิ์กระตุ้นเซลล์ออกมามากขึ้น และการเติมไคโตซานลงในกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์มีแนวโน้มที่จะกระตุ้นให้เซลล์เนื้อเยื่อในมีอัคคาไลน์ฟอสฟาเตสแอคติวิตีและสะสมแคลเซียมมากขึ้นในช่วงเวลาที่ยาวขึ้น

จากการศึกษาความเข้ากันได้ของกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์เนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต ทั้งนอกกาย (*in vitro*) และในกาย (*in vivo*)[5, 45 70-73] กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ได้รับการยอมรับว่า มีความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต เช่น การศึกษาของ Kawahara และคณะ ในปี ค.ศ. 1979[43] พบว่า กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์มีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำเมื่อทดสอบในสภาวะที่กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ก่อตัวแล้ว 24 ชั่วโมง แต่ถ้านำซีเมนต์ที่ผสมแล้วมาทดสอบทันทีหลังผสม พบว่า เซลล์มีการรอดชีวิตต่ำกว่าซีเมนต์ที่แข็งตัว 24 ชั่วโมง แต่เซลล์จะค่อยๆเพิ่มจำนวนมากขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 4 วัน ความเป็นพิษต่อเซลล์ในระยะแรกน่าจะมาจากความเป็นกรดของซีเมนต์ในช่วงที่ผสมใหม่ เนื่องจากพันธะไฮโดรเจนในกรดที่ค่อนข้างแข็งแรงและยังไม่ได้ทำปฏิกิริยาทำให้ในช่วงแรกซีเมนต์จึงค่อนข้างเป็นกรด (pH ต่ำกว่า 3)[74, 75, 76] สอดคล้องกับงานวิจัยนี้ที่พบว่าใน 72 ชั่วโมงแรก หากไม่เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ เซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันจะตายหมด แต่เมื่อทดสอบกับสิ่งมีชีวิตหรือสัตว์ทดลอง อาจมีผลแตกต่างไปจากการศึกษาจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ คณะของ Kawahara ทำการปิดแผลเนื้อเยื่อในฟันโดยตรง (direct pulp capping) ในฟันลิงด้วยกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ เมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์หลังการทำ การปิดแผลเนื้อเยื่อในฟันโดยตรงนาน 2 เดือน พบว่า บริเวณที่ติดหรือใกล้กับ

ซีเมนต์มีเซลล์อักเสบเล็กน้อยในเนื้อเยื่อใน จำนวนเซลล์สร้างเนื้อฟันลดลง แต่บริเวณที่ห่างจากซีเมนต์เซลล์สร้างเนื้อฟันมีลักษณะและจำนวนที่ปกติ[43] ในปี ค.ศ. 1997 คณะของ Kan ทดสอบความเป็นพิษของกลาสไอโอโนเมอร์ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนูด้วยเอ็มทีที โดยนำสารละลายที่แช่กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์มาทดสอบ พบว่า มีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ คือ จำนวนเซลล์ที่ตายไปไม่เกินร้อยละ 30 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม[77]

การปลดปล่อยไอออนต่าง ๆ จากซีเมนต์[78] เช่น ฟลูออไรด์ไอออน อะลูมิเนียมไอออน ซิลิกาไอออน แคลเซียมไอออน ไอร์ออน(III) (Fe^{3+}) เนื่องจากช่วงแรกของการก่อตัว กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์จะไวต่อน้ำหรือความชื้น[43] จึงมีการปลดปล่อยออกมาของไอออนดังกล่าว การศึกษาฟลูออไรด์ไอออนที่ออกมาจากกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ที่มีต่อเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันพบว่า ฟลูออไรด์ไอออนที่ความเข้มข้น 5 ส่วนในล้านส่วน (ppm) มีผลให้เซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันเพิ่มจำนวนและมีอัคคาไลน์ฟอสฟาเตสแอคติวิตีสูงที่สุดที่ 48 ชั่วโมง และที่ความเข้มข้น 40 ส่วนในล้านส่วน จะยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์และมีอัคคาไลน์ฟอสฟาเตสแอคติวิตีต่ำ[79] และที่ความเข้มข้นมากกว่า $2.5x10^{-4}$ มิลลิโมลต่อลิตรจะเริ่มเป็นพิษต่อเซลล์ ฟลูออไรด์ไอออนที่ความเข้มข้น $20x10^{-4}$ มิลลิโมลต่อลิตรจะทำให้การสังเคราะห์ของดีเอ็นเอ (DNA) ถูกยับยั้งโดยสมบูรณ์[80] ดังนั้นปริมาณฟลูออไรด์ไอออนที่พอเหมาะเท่านั้นจึงจะส่งเสริมให้เซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันมีการเจริญเติบโต และเปลี่ยนแปลงสภาพได้

ในงานวิทยานิพนธ์ของนริศาและคณะปี พ.ศ. 2551[59] วัดปริมาณฟลูออไรด์ไอออนที่ปลดปล่อยออกมาจากชิ้นทดสอบกลุ่มต่างๆในช่วงวันแรก มีค่าเฉลี่ย 69 -110 ส่วนในล้านส่วนต่อกรัมซีเมนต์ ทำให้ประมาณได้ว่า กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ที่แข็งตัว 1 ชั่วโมงทดสอบกับเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันนั้นในงานวิจัยนี้ (น้ำหนักเฉลี่ยของชิ้นทดสอบ 40 มิลลิกรัม) ในวันแรก น่าจะมีฟลูออไรด์ไอออนปลดปล่อยออกมาอยู่ในช่วง 2.8-4.4 ส่วนในล้านส่วน ซึ่งฟลูออไรด์ไอออนความเข้มข้นนี้น่าจะกระตุ้นเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันให้เปลี่ยนสภาพเป็นเซลล์เสมือนเซลล์สร้างเนื้อฟันและเพิ่มอัคคาไลน์ฟอสฟาเตสแอคติวิตี อย่างไรก็ตามฟลูออไรด์ไอออนที่ปลดปล่อยออกมานี้เป็นค่าที่ได้จากการศึกษานอกกาย และชิ้นซีเมนต์แช่ในน้ำชนิดขจัดไอออน ต่างจาการงานวิจัยนี้ที่ก้อนซีเมนต์แช่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ดังนั้นรูปแบบการปลดปล่อยฟลูออไรด์ไอออนในทางงานวิจัยนี้ อาจแตกต่างออกไป เป็นประเด็นที่น่าศึกษา นอกจากความเป็นกรดของของซีเมนต์ประยุกต์ชนิดนี้ขณะก่อตัวอาจแตกต่างจากกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ดั้งเดิมแล้ว สัดส่วนของผงกลาสไอโอโนเมอร์ที่ลดลงในชิ้นทดสอบที่เติมโปรตีนอัลบูมินร้อยละ 10 และไคโตซานร้อยละ 15 มีผลต่อรูปแบบของไอออนและสารชีวโมเลกุลที่ปลดปล่อยออกมาอย่างไร และไอออนและสารชีวโมเลกุลเหล่านั้นมีผลต่อเซลล์อย่างไร

นอกจากนั้นอะลูมิเนียมไอออนจากกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์เป็นอีกปัจจัยที่ได้รับการถกเถียงกัน แม้ว่ารายงานของ Kawahara และคณะ[43] จะพบว่าอะลูมิเนียมไอออนในกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ไม่ได้เป็นพิษ

ต่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิตหรือเนื้อเยื่อ และการศึกษาอะลูมิเนียมไอออนต่อเซลล์กระดูก พบว่า อะลูมิเนียมไอออนที่ความเข้มข้นระดับไมโครโมลา มีผลกระตุ้นการสร้างกระดูก[81] และการศึกษาในเซลล์ไขกระดูก พบว่า อะลูมิเนียมไอออนที่ความเข้มข้นน้อย ๆ มีผลกระตุ้นการสร้างเซลล์กระดูก[82] แต่อะลูมิเนียมไอออนที่ความเข้มข้นสูงจะมีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตได้ เช่น Andersson และคณะ ปี ค.ศ.1994 รายงานว่า อะลูมิเนียมไอออนที่ออกมาจากกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์จะไปยับยั้งการสะสมแร่ธาตุของกระดูก[83] Delvin และคณะ ค.ศ. 1998 ได้รายงานความเป็นพิษต่อเซลล์ของอะลูมิเนียมไอออนที่ปล่อยจากกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ที่มีอะลูมิเนียมผสมอยู่ในส่วนผง ต่อไขกระดูกว่ามีความเป็นพิษมากกว่าซีเมนต์ผสมอะลูมิเนียมไอออนที่ต่ำกว่า[82] อย่างไรก็ตาม การศึกษาผลของอะลูมิเนียมไอออนต่อเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันนอกกายยังมีไม่มากนัก และแม้ผลของอะลูมิเนียมไอออนต่อเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการจะไม่มีผลเสีย[71] หรือใช้เป็นซีเมนต์ยึดกระดูกในกระต่าย[72] และคน[5]ได้ แต่ในการใช้จริงในบางตำแหน่งของร่างกายอาจมีอันตราย

ทางการแพทย์ได้ใช้กลาสไอโอโนเมอร์เป็นซีเมนต์ในงานศัลยกรรมกระดูก[5, 45] โดยเฉพาะในบริเวณที่ไม่ต้องรับน้ำหนัก[45] คือ ใช้เป็นซีเมนต์หรือกาวยึดกระดูกบริเวณหู คอ จมูก และใบหน้า รวมทั้งใช้ซ่อมแซมความเสียหายของกะโหลกศีรษะมานานแล้ว แต่ก็มีข้อพึงระวังที่สำคัญคือ ไม่ควรให้กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์สัมผัสกับเนื้อเยื่ออ่อน และเนื้อเยื่อประสาท[45] รายงานทางการแพทย์ พบว่า มีผู้ป่วยเสียชีวิต หลังจากที่ได้รับการซ่อมแซมกระดูกบริเวณกะโหลกศีรษะด้วยกลาสไอโอเมอร์ซีเมนต์ที่มีอะลูมิเนียมเป็นส่วนประกอบ ซึ่งผู้ป่วยเหล่านั้นมีการรั่วออกมาของน้ำเลี้ยงไขสันหลัง (CFS) ร่วมด้วยอยู่แล้ว หลังการผ่าตัดผู้ป่วยมีอาการของเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (Encephalopathy) และเสียชีวิตภายหลัง จากการชันสูตรศพ ได้ตรวจพบอะลูมิเนียมในสมอง น้ำเลี้ยงไขสันหลัง ปัสสาวะ และเลือดสูงกว่าปกติในผู้ป่วยทุกราย[84, 85, 86]

รายงานการศึกษาซิลิคอนต่อเซลล์กระดูกต่าง ๆ พบว่า ซิลิคอนส่งเสริมให้มีการเพิ่มจำนวนเซลล์และเปลี่ยนสภาพเซลล์ เพิ่มอัคคาไลน์ฟอสฟาเตสแอคติวิตี แต่มีรายงานที่ขัดแย้งของ Ellis และคณะ เรื่อง ซิลิคอนต่อเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันมนุษย์ พบว่าที่ความเข้มข้น 50 และ 100 ส่วนในล้านส่วน เซลล์มีอัตราการเพิ่มจำนวนต่ำ และอัคคาไลน์ฟอสฟาเตสแอคติวิตีต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ[87]

อัคคาไลน์ฟอสฟาเตสแอคติวิตีเป็นสัญลักษณ์ที่บ่งชี้ถึงการเปลี่ยนสภาพของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันไปเป็นเซลล์เสมือนเซลล์เนื้อเยื่อที่สร้างเนื้อฟันให้สร้างเมทริกซ์ที่มีการสะสมแร่ธาตุ และการสร้างก้อนแคลเซียม (calcified nodules) เป็นอีกสัญลักษณ์หนึ่งที่ยืนยันว่าเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันมีการเปลี่ยนสภาพไปสร้างเนื้อฟันได้ ในงานวิจัยนี้ กลุ่มเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เติมซีรัมลูกวัวร้อยละ10 ค่าเฉลี่ยเอนไซม์อัคคาไลน์ฟอสฟาเตสแอคติวิตีที่ 14 วันมีค่าน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่น ๆ รวมทั้งจากการทดลองนำร่องเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันในอาหารดังกล่าวเป็นเวลา 28 วัน ไม่พบการสร้างก้อนแคลเซียมแต่อย่างใด แสดงว่า หากเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันไม่ได้รับสื่อหรือสารส่งสัญญาณที่เหมาะสมก็ไม่สามารถเปลี่ยนไปเป็นเซลล์เสมือนเซลล์สร้างเนื้อฟัน สอดคล้องกับผลการศึกษาเซลล์ที่เลี้ยงในอาหาร

เลี้ยงเซลล์ที่เติมทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 ความเข้มข้น 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่มีค่าเฉลี่ยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสแอคติวิตีสูงที่สุด และพื้นที่ที่สร้างแคลเซียมมากที่สุด (72.94%) เนื่องจากทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 สามารถกระตุ้นให้สร้างเดนทินเมทริกซ์ สร้างคอลลาเจน และสร้างเนื้อฟันได้[37] แต่ความเข้มข้นของทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 ยังเป็นที่ถกเถียงกันอยู่บ้าง เช่น การศึกษาของ Shirakawa และคณะ[88] ปี ค.ศ. 1994 ที่พบว่า การเติมทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 ที่ความเข้มข้น 0.1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มีเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสแอคติวิตีและการสร้างก้อนแคลเซียมของเซลล์สูงสุด แต่กลับพบว่าที่ความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสแอคติวิตีและการสร้างก้อนแคลเซียมลดลง ซึ่งตรงกันข้ามกับการศึกษาของ Nie และคณะ[39] ที่พบว่า การเติมทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 ความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสแอคติวิตีและการสร้างก้อนแคลเซียมของเซลล์สูงกว่ากลุ่มควบคุม

การเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ (G) กลุ่มกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ที่เติมโปรตีนอัลบลูมิน และเติมทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 (G-A-TGF) กลุ่มกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ที่เติมทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 (G-TGF) พบว่า กลุ่มกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ที่เติมโปรตีนอัลบลูมิน และเติมทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 (G-A- TGF) และกลุ่มกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ที่เติมทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 (G- TGF) อัตราการรอดชีวิตของเซลล์และอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสแอคติวิตีสูงกว่ากลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ (G) รวมทั้งมีการสร้างแคลเซียมก็สูงกว่า นั่นแสดงว่าทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 ที่เติมลงไปในกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ หรือในกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ที่มีโปรตีนอัลบลูมิน ไม่ได้ถูกทำลายฤทธิ์ทางชีวภาพของทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 ไป และในกลุ่มที่เติมโปรตีนอัลบลูมิน อาจทำให้มีช่องว่างหรือรูพรุนในชิ้นกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์มากขึ้น ส่งผลให้ปลดปล่อยทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 ได้มากขึ้น[69] รวมทั้งโปรตีนอัลบลูมิน อาจช่วยให้โกรว์ทแฟกเตอร์มีความเสถียร (stabilized) ป้องการสูญเสียแอคติวิตี และเพิ่มค่าครึ่งชีวิตของโปรตีน (extended biological half lives)[89, 90]

ชิ้นทดสอบกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ (G) เมื่อเปรียบเทียบกับชิ้นทดสอบที่เติมโปรตีนอัลบลูมิน (G-A) หรือชิ้นทดสอบที่เติมอัลบลูมินร่วมกับไคโตซาน (G-A-C) หรือชิ้นทดสอบที่เติมไคโตซาน (G-C) หรือชิ้นทดสอบที่เติมอัลบลูมินร่วมกับไคโตซาน และทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 (G-A-C-TGF) พบว่า การรอดชีวิตและการเพิ่มจำนวนเซลล์ไม่แตกต่างกัน ส่วนอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสแอคติวิตีและการสร้างแคลเซียมกลุ่มกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ที่เติมอัลบลูมินร่วมกับไคโตซานและทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 (G-A-C-TGF) มีค่าสูงกว่ากลุ่มกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ (G) กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ที่เติมอัลบลูมิน (G–A) กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ที่เติม โปรตีนอัลบลูมิน และไคโตซาน (G-A-C) แต่อย่างไรก็ตามชิ้นทดสอบกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ที่เติมทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 (G-TGF) มีค่าอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสแอคติวิตีและสร้างแคลเซียมมากกว่ากลุ่มอื่น ๆ เมื่อพิจารณาจากข้อมูลโดยรวม พบว่าตัวกลาสไอโอโน

เมอร์ซีเมนต์เองเป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่อเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟัน ในแง่การกระตุ้นการสร้างแร่ธาตุพอสมควร ดังนั้น อาจไม่จำเป็นเติมสารอื่นลงไป แต่หากต้องการพัฒนากลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ให้สามารถกระตุ้นเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟัน เซลล์เนื้อเยื่อปริทันต์ หรือเซลล์อื่น ๆ การเติมโมเลกุลชีวภาพชนิดอื่น เช่น โกรว์ทแฟกเตอร์ หรือสารอื่น ๆ ที่มีผลในการเพิ่มจำนวนเซลล์ หรือช่วยลดการตายของเซลล์ลงไปอาจจะเป็นทางเลือกที่ดีในการพัฒนาทันตวัสดุตามแนวทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อในอนาคตได้

บทวิจารณ์วิธีการวิจัย

การเตรียมชิ้นทดสอบที่มีการผสมส่วนผงของกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ โปรตีนอัลบลูมิน ไคโตซานเข้าด้วยกันโดยปั่นในแคปซูลอมัลกัม ทำให้ส่วนผงต่าง ๆ เข้ากันได้ดี ทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 อยู่ในรูปของผง ต้องละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เติมโปรตีนอัลบลูมิน ให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ ดังนั้นในขณะผสมชิ้นทดสอบในกลุ่มที่ไม่ได้เติมทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 จะหยดสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เติมโปรตีนอัลบลูมิน ปริมาตรเท่ากันทุกชิ้น และหยดสารละลายดังกล่าวในขณะที่ผสมส่วนผงและส่วนเหลวเข้ากัน จากนั้นจึงนำใส่แบบพิมพ์เทฟล่อนที่เตรียมไว้ เก็บชิ้นทดสอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้ชิ้นทดสอบสามารถก่อตัวได้เพียงพอ (maturation) ก่อนที่จะสัมผัสกับน้ำจากอาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งเป็นการควบคุมสมดุลของน้ำในชิ้นทดสอบ (water balance) เนื่องจากจะมีผลต่อปฏิกิริยาการก่อตัวและส่งผลต่อคุณสมบัติเชิงเคมีของวัสดุ สัดส่วนโดยน้ำหนักของผงกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์กับไคโตซานร้อยละ15 ที่ใช้ในการศึกษานี้ วิธีผสมจะยาก มีความหนืดมาก ไม่ค่อยเหมาะกับการใช้งานจริงในคลินิกอย่างไรก็ตาม การใช้งานทางคลินิกอาจต้องมีการเปลี่ยนแปลงหรือจัดเตรียมในลักษณะแบบฉีดแทนและการใช้เป็นซีเมนต์ทางทันตกรรมหรือทางการแพทย์ ส่วนใหญ่จะใช้ในขณะที่ซีเมนต์ที่ยังไม่ก่อตัวเต็มที่ จึงต้องระวังความเป็นพิษจากซีเมนต์ในขณะที่ยังก่อตัวไม่เต็มที่ด้วย

การเลือกใช้สัดส่วนของทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 ที่ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อชิ้นงาน จากรายงานของ Hu และคณะ ในปี ค.ศ. 1998 กล่าวถึงความเข้มข้นต่ำสุดที่มีผลกระตุ้นเซลล์ของทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 คือ 0.5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร[37] และจากการศึกษาของอารยา พ.ศ. 2549 พบว่า กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์กลุ่มที่เติมไคโตซานร้อยละ 20 และเติมโปรตีนอัลบลูมินร้อยละ 1.5 มีการปลดปล่อยโปรตีนอัลบลูมินออกมาประมาณร้อยละ 1.19 และกลุ่มกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ที่เติมโปรตีนอัลบลูมินร้อยละ 1.5 มีการปลดปล่อยโปรตีนออกมาร้อยละ 0.26[58] และดังนั้นผู้วิจัยจึงได้เลือกใช้ความเข้มข้นของทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 ที่ 1 นาโนกรัมต่อ 1 ชิ้นทดสอบ ส่วนในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้วางชิ้นทดสอบใช้ความเข้มข้นของทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 ที่ 1 นาโนกรัมต่อ 1 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเซลล์

การศึกษานี้ได้เลือกใช้สัดส่วนของไคโตซานที่ร้อยละ15 ของน้ำหนักชิ้นทดสอบ เนื่องจากการศึกษานำร่องเพื่อดูการปลดปล่อยโปรตีนจากชิ้นทดสอบกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ที่ประยุกต์ไคโตซานร้อยละ 15 ด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอเบนท์ (Enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA) พบว่าสามารถปลดปล่อยโปรตีนได้มากกว่ากลุ่มที่ใช้สัดส่วนต่ำกว่านี้ แต่ในสัดส่วนของไคโตซานและโปรตีนที่มากขึ้นอาจมีส่วนทำให้น้ำหนักผงกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์น้อยลง ทำให้คุณสมบัติเชิงกลเปลี่ยนแปลงไป รวมทั้งรูปแบบการปลดปล่อยฟลูออไรด์อาจต่างออกไป โดยเฉพาะโปรตีนที่เติมเข้าไปในส่วนผงของกลาสไอโอโนเมอร์ของงานวิจัยนี้มากกว่าที่ใช้ในการศึกษาของอารยาและคณะ และงานวิจัยของนริศาและคณะ เกือบ 10 เท่า การเติมโปรตีนลงไปในชิ้นทดสอบวัตถุประสงค์เพื่อให้ชิ้นทดสอบมีรูพรุน (pores) มากขึ้น และทำให้โมเลกุลขนาดเล็กของโกรว์ทแฟกเตอร์ที่อยู่ในเมทริกซ์ มีโอกาสถูกปลดปล่อยออกมาได้มากขึ้น เนื่องจากการศึกษาของ Murray และคณะ ปี ค.ศ.1983 ได้เติมโปรตีนร้อยละ 20 โดยน้ำหนักของพอลิเมอร์ร่วมของเอทิลีน ไวนิล อะซิเตท (ethylene vinyl acetate) พบว่า สามารถปลดปล่อยอิฟีเดอร์มอลโกรว์ทแฟกเตอร์ (epidermal growth factor (EGF))ได้ร้อยละ 30 เปรียบเทียบกับการไม่เติมโปรตีน การปลดปล่อยอิฟีเดอร์มอลโกรว์ทแฟกเตอร์มีเพียงร้อยละ 5 เท่านั้น และการปลดปล่อยอิฟีเดอร์มอลโกรว์ทแฟกเตอร์ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของโปรตีนที่เติมเข้าไป [69] ดังนั้น งานวิจัยชิ้นนี้จึงได้ออกแบบโดยเติมโปรตีนอัลบลูมิน (66 กิโลดัลตัน) ที่ร้อยละ 10 ของน้ำหนักรวมเพื่อคาดหวังให้ โปรตีนอัลบลูมินในชิ้นทดสอบสอบช่วยเป็นตัวนำ (carriers) ทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 ซึ่งเป็นโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลเพียง 25 กิโลดัลตัน ให้ออกจากชิ้นทดสอบได้

การทดสอบชิ้นทดสอบต่อเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันได้เลือกภาชนะชนิดทรานสเวลล์ เพื่อไม่ให้ชิ้นทดสอบขยับเคลื่อนที่ไปมาไปทับเซลล์และมีผลให้เซลล์ตาย รวมทั้งเลียนแบบการแพร่ของสารต่าง ๆ จากชิ้นทดสอบไปยังเซลล์เนื้อเยื่อในโดยไม่สัมผัสโดยตรง ในการทดสอบการสร้างแคลเซียมของเซลล์จำเป็นต้องใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่เป็นโอดอนโตเจนนิก อินดักชัน ซึ่งเติมเบต้า กลีเซอโรฟอสเฟต 10 มิลลิโมลต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค 0.2 มิลลิโมลต่อลิตร เพื่อกระตุ้นให้เซลล์มีการสร้างแคลเซียม[64] การทดลองเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันในอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารที่ไม่ได้เติมสารดังกล่าว เซลล์จะเพิ่มจำนวนแต่ไม่มีการสร้างแคลเซียมเกิดขึ้น

จากภาพถ่ายทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ชิ้นทดสอบจะมีพื้นผิวที่เรียบใกล้เคียงกันทุกกลุ่ม แต่ภาพด้านหักขวางในชิ้นทดสอบที่มีการเติมโปรตีนอัลบลูมิน ทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 พบก้อนกลมแทรกอยู่ในชิ้นทดสอบกระจายเป็นจุด ๆ และอยู่ภายในก้อนซีเมนต์ลักษณะที่เป็นโพรงข้างในชิ้นทดสอบ ซึ่งน่าจะมีส่วนทำให้ชิ้นทดสอบที่เติมโปรตีนมีรูพรุนมากขึ้น และมีโอกาสที่จะปลดปล่อยโปรตีนดังกล่าวได้ แม้จะมีโปรตีนอีกมากที่ยังถูกกักอยู่ในชิ้นซีเมนต์ ซึ่งการปลดปล่อยโปรตีนอาจเกิดจากรูพรุน รอยแตกบนซีเมนต์แล้ว ยังอาจเกิดจากการเสื่อมสลายตัวของไคโตซาน[7, 11]

การวิเคราะห์ผลการทดลองในส่วนของการหาจำนวนเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันด้วยเอ็มทีที แม้ข้อมูลบางกลุ่มมีความแตกต่างของค่าความแปรปรวน แต่ Shouki และ Edge เสนอว่าสามารถใช้สถิติการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวได้ เพราะมีผลกระทบน้อย และใช้การเปรียบเทียบความแตกต่างชนิดพหุแบบตูเก้ เนื่องจากมีความสามารถในการแยกแยะความแตกต่างระหว่างกลุ่มได้มาก ส่วนการตรวจหาเอนไซม์อัคคาไลน์ฟอสฟาเตสแอคติวิตี้ ได้ใช้สถิติชนิดไม่ใช่พารามิเตอร์และเปรียบเทียบความแตกต่างของแต่ละกลุ่มด้วยสถิติชนิดพหุแบบสติวเดนท์นิวแมนคูลส์[67]

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

แม้ว่าการศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพของของทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 ที่ปลดปล่อยออกมาจากวัสดุประยุกต์กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันมนุษย์ โดยดูจากผล เอ็มทีที อัคคาไลน์ฟอสฟาเตสแอคติวิตี และการย้อม von Kossa โดยรวมแล้วฤทธิ์ทางชีวภาพของของทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 ไม่ได้ถูกทำลายจากความเป็นกรด หรือส่วนประกอบต่าง ๆ ที่เพิ่มเติมเข้าไปในกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ แต่ผลงานวิจัยนี้ยังเป็นแค่การศึกษานำร่องในงานพัฒนากลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ร่วมกับไคโตซานให้สามารถปลดปล่อยสารชีวโมเลกุลหรือโปรตีนตัวอื่น ที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์และทางทันตกรรม เช่น ใช้ในงานศัลยกรรมกระดูก[45] หรือในงานบูรณะเดนทินพัลพ์คอมเพลกซ์[1, 2, 3] โดยให้สารที่ออกฤทธิ์ชีวโมเลกุลที่ปลดปล่อย ออกมา กระตุ้นให้เซลล์ของเจ้าของเคลื่อนเข้ามารวมกัน และเริ่มการซ่อมแซมตนเองได้เร็วขึ้น ช่วยให้กระบวนการหายตามปกติของร่างกายที่เกิดตามเกิดได้เร็วขึ้น การศึกษาความเข้มข้นของสารชีวภาพที่ปลดปล่อยออกมาจากวัสดุประยุกต์นี้มีปริมาณและรูปแบบใดในอาหารเลี้ยงเซลล์มีความสำคัญที่จะต้องศึกษา เนื่องจากโกรว์ทแฟกเตอร์หรือสารต่างๆต้องมีขนาดความเข้มข้นที่พอเหมาะถึงจะมีผลต่อเซลล์ รวมทั้งการปลดปล่อยไอออนหรือสารของกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ในสารละลายต่างชนิดจะแตกต่างกัน[84] ดังนั้นการตรวจวัดปริมาณโกรว์ทแฟกเตอร์หรือสารที่ปลดปล่อยจากชิ้นทดสอบด้วยเทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอเบนท์ เพื่อความแม่นยำ และสามารถเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมของโกรว์ทแฟกเตอร์ที่จะเติมลงไปได้ ผลการศึกษาเอนไซม์อัคคาไลน์ฟอสฟาเตสแอคติวิตี และการย้อม von Kossa น่าจะชี้ว่า หากต้องการให้กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์กระตุ้นเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันให้สร้างแร่ธาตุในระยะแรกๆ อาจไม่จำเป็นต้องเติมไคโตซานลงไป การเติมโปรตีนชีวภาพหรือสารต้านการตายของเซลล์ที่เหมาะสมในกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์อย่างเดียวก็เพียงพอต่อการกระตุ้นเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันให้สร้างเนื้อเยื่อที่มีการสะสมแร่ธาตุได้แล้ว เนื่องจากการปลดปล่อยของสารเหล่านี้จะเกิดอย่างรวดเร็วในระยะแรก[59] แต่ถ้าต้องการให้กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ปลดปล่อยสารชีวโมเลกุลได้นาน ๆ หรือควบคุมการปลดปล่อยอย่างช้า ๆ จะต้องปรับปรุงกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ให้เสื่อมสลายได้ง่ายขึ้น เพื่อให้ชีวโมเลกุลที่ถูกกักไว้ในซีเมนต์ออกมาได้ ในห้องปฏิบัติการกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์และไคโตซานเสื่อมสลายได้เมื่อแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์[46, 92] แต่ในทางคลินิก การบูรณะเดนทินพัลพ์คอมเพลกซ์ วัสดุจะอยู่ด้านในและมีวัสดุบูรณะอีกชั้นอยู่ด้านนอก วัสดุนี้จึงไม่สัมผัสความเปียกชื้นในช่องปาก อาจสัมผัสเพียงสารละลายในท่อ

เนื้อฟันเท่านั้น การเสื่อมสลายจึงเกิดขึ้นได้ยาก แต่หากใช้วัดุบูรณะทั้งชิ้นที่เป็นกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ที่ประยุกต์กับไคโตซาน จะมีการสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมในช่องปากที่มีลักษณะไดนามิกซ์ การเสื่อมสลายของวัสดุอาจเกิดอย่างรวดเร็ว มีผลให้วัสดุเสื่อมทางกายภาพ ขาดความแข็งแรงทนทานไป ดังนั้นจึงอาจไม่เหมาะที่ใช้เป็นวัสดุบูรณะในช่องปาก แต่น่าจะเหมาะกับงานวิศกรรมเนื้อเยื่อของกระดูกซึ่งสัมผัสกับเนื้อเยื่อและสารที่เป็นส่วนเหลวของร่ายกายโดยตรง การปลดปล่อยสารชีวภาพจากวัสดุกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ที่สามารถกระตุ้นการซ่อมสร้างและการสลายตัวไปได้เองของวัสดุ โดยส่วนที่สลายไปได้รับการซ่อมสร้างทดแทนด้วยเนื้อเยื่อปกติของร่างกายเจ้าของได้นั้นเป็นเป้าหมายของงานวิจัยในอนาคต ดังนั้นจึงน่าจะศึกษาถึงการเสื่อมสลายของไคโตซานประยุกต์กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ในเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตว่าเกิดขึ้นได้หรือไม่ มีรูปแบบอย่างไร อย่างไรก็ตามงานศัลยกรรมกระดูก หรือการปิดแผลในโพรงฟันที่สัมผัสกับเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันโดยตรงด้วยกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ต้องคำนึงไอออนที่ปล่อยออกมา เช่น อะลูมิเนียมไอออน ฟลูออไรด์ไอออน หากมีปริมาณมากเกินไป จะเป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตได้[80, 84, 86, 93] รูปแบบของไคโตซานที่จะนำมาเติมในกลาสไอโอเมอร์ซีเมนต์เพื่อช่วยในการปลดปล่อยสาร หรือช่วยเร่งการหายของแผลก็เป็นส่วนที่ต้องคำนึงถึง ในแง่การปลดปล่อยสารของไคโตซานจะขึ้นอยู่กับค่าดีกรีของดีอะเซตทิเลชัน และน้ำหนักโมเลกุลที่มาก เนื่องจากมีหมู่ฟังก์ชันมากขึ้น จับกับสารอื่นๆในลักษณะสารประกอบเชิงซ้อนดีกว่าไคโตซานที่มีดีกรีของดีอะเซตทิเลชัน และน้ำหนักโมเลกุลน้อย ทำให้การเก็บกักสารภายในแคปซูล (encapsulation)ได้ดีแต่การปลดปล่อยจะลดลง[94] ดังนั้นหากคาดหวังให้วัสดุไคโตซานประยุกต์กลาสอโอโนเมอร์ซีเมนต์ปลดปล่อยสารได้นาน ควรจะเลือกไคโตซานที่มีดีกรีดีอะเซตทิเลชัน และน้ำหนักโมเลกุลสูง Mutsunaga และคณะ รายงานว่า ไคโตซานโมโนเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อย ส่งเสริมการหายของแผลดีกว่าไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง โดยพบว่าไคโตซานโมโนเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 215.6 ดัลตัน เมื่อทดสอบกับเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันมนุษย์ ช่วยลดการหลั่งอินเตอลิวคิน 8 (IL-8) ซึ่งเป็นไซโตไคน์ของการอักเสบ (inflammatory cytokine) ทำให้แผลหายเร็วกว่าไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุล 10 กิโลดัลตัน และใช้ไคโตซานตัวนี้ปิดแผลโดยตรงบนเนื้อเยื่อในโพรงฟันของฟันหนู ผลการตรวจเนื้อเยื่อหลังปิดแผล 7 วันพบว่ามีการสร้างเนื้อเยื่อที่มีการสะสมแร่ธาตุ[56] ดังนั้นในงานศัลยกรรม เช่น ศัลยกรรมปริทันต์ควรเลือกใช้ไคโตซานน้ำหนักโมเลกุลเล็กมากกว่าโมเลกุลขนาดใหญ่

การหาสัดส่วนของส่วนผงกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ ส่วนเหลว และไคโตซานที่เหมาะสมโดยไม่ทำให้คุณสมบัติทางกายภาพของวัสดุเสียไป เช่น ความทนต่อแรงอัด (compressive strength) ความต้านแรงดึง (tensile strength) เวลาในการทำงาน เวลาก่อตัว หรือการผสมที่ยากขึ้นสามารถผสมได้ง่ายในคลินิก หรือพัฒนาในรูปของแคปซูลสำเร็จรูปพร้อมใช้ เป็นงานที่ต้องพัฒนาต่อไป นอกจากการเติมสารชีวโมเลกุลหรือสารต้านการตายของเซลล์แล้ว อาจเติมสารต้านจุลชีพที่เหมาะสมให้แก่กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์เพื่อป้องกันการก่อไบโอฟิล์ม (biofilm) ของจุลชีพที่อาจทำให้สิ่งแวดล้อมนั้นเสียสมดุล รวมทั้งควรศึกษาในสัตว์ทดลองต่อไป

บทที่ 5

บทสรุป

จากผลการวิจัยในเรื่องคุณสมบัติทางชีวภาพของทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 ที่ปลดปล่อยจากวัสดุไคโตซานประยุกต์กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ต่อเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟัน สามารถสรุปได้ว่า

1. ความเข้มข้นของทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 ที่ 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเซลล์ และความเข้มข้นของทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 ที่ 100 นาโนกรัมต่อชิ้นทดสอบส่งเสริมให้จำนวนของเซลล์เพิ่มขึ้น กระตุ้นเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันให้มีอัคคาไลน์ฟอสฟาเตสแอคติวิติสูงขึ้น สามารถสร้างก้อนแคลเซียมเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เติมสารกระตุ้นการสร้างแร่ธาตุ
2. ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันมนุษย์ เมื่อทดสอบที่ 5 วัน ชิ้นทดสอบที่เติมไคโตซานร้อยละ 15 มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ต่ำที่สุด
3. ระยะเวลาทดสอบที่นานขึ้นที่ 14 และ 21 วัน กลุ่มที่เติมไคโตซานและทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 ลงในชิ้นทดสอบต่อเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันมนุษย์ ส่งเสริมการเพิ่มอัคคาไลน์ฟอสฟาเตสแอคติวิตี และส่งเสริมการสร้างแคลเซียมใกล้เคียงกับกลุ่มที่เติมทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 อย่างเดียว ดังนั้น การเติมไคโตซานลงในกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์อาจนำมาสู่การพัฒนากลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ในแง่ของการควบคุมการปลดปล่อยสารที่ต้องการให้เป็นการปลดปล่อยในระดับต่ำ ๆ แต่ปลดปล่อยได้นาน ๆ ได้
4. อาจไม่จำเป็นต้องเติมโปรตีนอัลบูมินลงในชิ้นทดสอบ เนื่องจากชิ้นทดสอบสามารถปลดปล่อยทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 ออกมา ส่งเสริมให้มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ กระตุ้นอัคคาไลน์ฟอสฟาเตสแอคติวิตี ส่งเสริมมีการสร้างแคลเซียมของเซลล์ได้ใกล้เคียงกับกลุ่มที่ไม่ได้เติมโปรตีนอัลบูมิน
5. คุณสมบัติทางชีวภาพของทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 ที่ปลดปล่อยจากวัสดุไคโตซานประยุกต์กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ไม่ได้ถูกทำลายไปจากการผสมสารหรือจากกรดของส่วนเหลวในกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์
6. ภาพทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงให้เห็นโพรง ซึ่งเป็นที่อยู่ของโปรตีนทั้ง 2 ตัว และไคโตซานที่ประสานกันเป็นเส้นใยในกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ แสดงว่า ยังมีโปรตีนอีกจำนวนหนึ่งที่ยังอยู่ในซีเมนต์ และอาจถูกปลดปล่อยออกมาได้เมื่อชิ้นซีเมนต์มีการเสื่อมสลายไป

เอกสารอ้างอิง

1. Murray PE, Windsor LJ. Analysis of pulpal reactions to restorative procedures, materials, pulp capping, and future therapies. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13: 509-20.
2. Tziafas D. The future role of a molecular approach to pulp-dentinal regeneration. *Caries Res* 2004; 38: 314-20.
3. Tziafas D, Smith AJ, Lesot H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. *J Dent* 2000; 28: 77-92.
4. Zhao S, Sloan AJ, Murray P, Lumley P, Smith AJ. Utrastructural localisation of TGF-β exposure in dentine by chemical treatment. *Histoch* 2000; 32: 489-94.
5. Hatton PV, Hurrell-Gillingham K, Brook IM. Biocompatibility of glass-ionomer bone cements. *J Dent* 2006; 34: 598-601.
6. Radhakumary C, Nair P, Mathew S, Nair C. Biopolymer composite of chitosan and methacrylate for medical applications. *Trends Biomater Artif Organs* 2005; 18: 117-24.
7. Mi FL, Tan YC, Liang HF, Sung HW. In vivo biocompatibility and degradability of a novel injectable-chitosan-based implant. *Biomaterials* 2002; 23: 181-91.
8. Jayakumar R, Prabaharan M, Reis RL, Mano JF. Graft copolymerized chitosan-present status and applications. *Carbohydrate polymers* 2005; 62: 142-58.
9. Chung LY, Schmidt RJ, Hamlyn PF, Sagar BF, Andrews AM, Turner TD. Biocompatibility of potential wound management products: fungal mycelia as a source of chitin/chitosan and their effect on the proliferation of human F1000 fibroblasts in culture. *J Biomed Mater Res* 1994; 28: 463-9.
10. Ueno H, Yamada H, Tanaka I, Kaba N, Matsuura M, Okumura M, et al. Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs. *Biomaterials* 1999; 20: 1407-14.
11. Shin SY, Park HN, Kim KH, Lee MH, Choi YS, Park YJ, et al. Biological evaluation of chitosan nanofiber membrane for guided bone regeneration. *J Periodontol* 2005; 76: 1778-84.
12. Zhao F, Yin Y, Lu WW, Chiyan Leong J, Zhang W, Zhang J, et al. Preparation and histological evaluation of biomimetic three-dimensional hydroxyapatite/chitosan-gelatin network composite scaffolds. *Biomaterials* 2002; 23: 3227-34.
13. Peng L, Cheng X, Zhuo R, Lan J, Wang Y, Shi B, et al. Novel gene-activated matrix with embedded chitosan/plasmid DNA nanoparticles encoding PDGF for periodontal tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* Published Online: 18 Jun 2008.

14. Chavasit V, Kienzle-Sterzer C, Torres J. Formation and characterization of an insoluble polyelectrolyte complex: chitosan-poly acrylic acid. *Pol Bull* 1988; 19: 223-30.
15. He P, Davis SS, Illum L. In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres. *Inter J Pharma*1998; 166: 75-88.
16. Ahn J, Choi H, Chun M, Ryu J, Jung J, Kim Y. Release of triamcinolone acetonide from mucoadhesive polymer composed of chitosan and poly(acrylic acid) in vitro. *Biomaterials* 2002;23:1411-6.
17. de la Torre P, Torrado S, Torrrado S. Interpolymer complexes of poly(acrylic acid) and chitosan:influence of the ionic hydrogel-forming medium. *Biomaterials* 2003; 24: 1459-68.
18. de la Torre PM, Torrado G, Torrado S. Poly (acrylic acid) chitosan interpolymer complexes for stomach controlled antibiotic delivery. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005; 72: 191-7.
19. Hemant Yadav K, Satish C, Shivakumar H. Preparation and evaluation of chitosan-poly (acrylic acid) hydrogels as stomach specific delivery for amoxicillin and metronidazole. *Ind J Pharma Sci* 2007; 69: 91-5.
20. Tabata Y. The importance of drug delivery systems in tissue engineering. *Pharm Sci Technol Today* 2000; 3: 80-9.
21. Dard M, Sewing A, Meyer J, Verrier S, Roessler S, Scharnweber D. Tools for tissue engineering of mineralized oral structures. *Clin Oral Invest* 2000; 4: 126-9.
22. Nakashima M, Akamine A. The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics. *J Endod* 2005; 31: 711-8.
23. Okiji T. Pulp as a connective tissue. In: Hargreaves KM, Goodis HE, editors. *The dental pulp* 6th ed: Quintessence Publishing Co, Inc; 2002. p. 95-122.
24. 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: 13625-30.
25. Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res* 2002; 81: 531-5.
26. 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: 5807-12.
27. Tziafas D. Mechanisms controlling secondary initiation of dentinogenesis: a review. *Int Endod J* 1994; 27: 61-74.
28. Goldberg M, Smith AJ. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004; 15: 13-27

29. Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res* 2003; 18: 696-704.
30. Sloan AJ, Smith AJ. Stem cells and the dental pulp: potential roles in dentine regeneration and repair. *Oral Dis* 2007; 13: 151-7.
31. Zhang YD, Chen Z, Song YQ, Liu C, Chen YP. Making a tooth: growth factors transcription factors, and stem cells. *Cell Res* 2005; 15: 301-16.
32. Sloan AJ, Smith AJ. Stimulation of the dentine-pulp complex of rat incisor teeth by transforming growth factor-beta isoforms 1-3 in vitro. *Arch Oral Biol* 1999; 44: 149-56.
33. Chai Y, Mah A, Crohin C, Groff S, Bringas PJ, Le T, et al. Specific transforming growth factor-beta subtypes regulate embryonic mouse Meckel's cartilage and tooth development. *Dev Biol* 1994; 162: 85-103.
34. Huojia M, Muraoka N, Yoshizaki K, Fukumoto S, Nakashima M, Akamine A, et al. TGF-beta3 induces ectopic mineralization in fetal mouse dental pulp during tooth germ development. *Dev Growth Differ* 2005; 47: 141-52.
35 Smith AJ. Vitality of the dentin-pulp complex in health and disease: growth factors as key mediators. *J Dent Educ* 2003; 67: 678-89.
36. Smith AJ, Matthews JB, Hall RC. Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) in dentine matrix. Ligand activation and receptor expression. *Eur J Oral Sci* 1998; 106 Suppl 1: 179-84.
37. Hu CC, Zhang C, Qian Q, Tatum NB. Reparative dentin formation in rat molars after direct pulp capping with growth factors. *J Endod* 1998; 24: 744-51.
38. Shiba H, Fujita T, Doi N, Nakamura S, Nakanishi K, Takemoto T, et al. Differential effects of various growth factors and cytokines on the syntheses of DNA, type I collagen, laminin, fibronectin, osteonectin/secreted protein, acidic and rich in cysteine (SPARC), and alkaline phosphatase by human pulp cells in culture. *J Cell Physiol* 1998; 174: 194-205.
39. Nie X, Tian W, Zhang Y, Chen X, Dong R, Jiang M, et al. Induction of transforming growth factor-beta 1 on dentine pulp cells in different culture patterns. *Cell Biol Int* 2006; 30: 295-300.
40. Melin M, Joffre-Romeas A, Farges JC, Couble ML, Magloire H, Bleicher F. Effects of TGF beta 1 on dental pulp cells in cultured human tooth slices. *J Dent Res* 2000; 79 : 1689-96.
41. Kuo MY, Lan WH, Lin SK, Tsai KS, Hahn LJ. Collagen gene expression in human dental pulp cell cultures. *Arch Oral Biol* 1992; 37: 945-52.

42. Wilson AD, McLean JW. Glass-Ionomer cement. Chicago: Quintessence Publishing; 1998.
43. Kawahara H, Imanishi Y, Oshima H. Biological Evaluation on Glass Ionomer Cement. *J Dent Res* 1979; 58: 1080-6.
44. Six N, Lasfargues JJ, Goldberg M. In vivo study of the pulp reaction to Fuji IX, a glass ionomer cement *J Dent* 2000; 28: 413-22.
45. Brook IM, Hatton PV. Glass-ionomers: bioactive implant materials. *Biomaterials* 1998; 19: 565-71.
46. Lindsjo MC, Ekman KB, Nasman JH. Glass-ionomer cements based on poly(acrylic acid-co-vinyl alcohol) in drug release model formulations. *Biomaterials* 1996; 17: 913-9.
47. Palmer G, Jones FH, Billington RW, Pearson GJ. Chlorhexidine release from an experimental glass ionomer cement. *Biomaterials* 2004; 25: 5423-31.
48. Mazzaoui SA, Burrow MF, Tyas MJ, Dashper SG, Eakins D, Reynolds EC. Incorporation of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate into a glass-ionomer cement. *J Dent Res* 2003; 82: 914-8.
49. De Bruyne MA, De Moor RJ. The use of glass ionomer cements in both conventional and surgical endodontics. *Int Endod J* 2004; 37: 91-104.
50. Botelho MG. Inhibitory Effects on Selected Oral Bacteria of Antibacterial Agents Incorporated in a Glass Ionomer Cement. *Caries Res* 2003; 37: 108-14.
51. Crisp S, Wilson AD. Reactions in glass ionomer cements: III. The precipitation reaction. *J Dent Res* 1974; 53: 1420-4.
52. Wittwer C, Delvlin AJ, Hatton PV, Brook IM. The release of serum proteins and dye from glass ionomer (polyalkenoate) and acrylic cements: a pilot study. *J Mater Sci Mater Med* 1994; 5: 711-4.
53. สุวบุญ จิรชาญชัย, รังรอง ยกส้าน, โกสุม สมัครรัตน์. สมบัติทางเคมีและกายภาพของไคติน-ไคโตซาน. Paper presented at: การประชุมวิชาการไคตินและไคโตซานจากวัตถุดิบธรรมชาติสู่การประยุกต์ใช้, 2544; จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร.
54. Sun L, Du Y, Fan L, Chen X, Yang J. Preparation, characterization and antimicrobial activity of quaternized carboxymethyl chitosan and application as pulp-cap. *Polymer* 2006; 47: 1796-804.
55. van der Lubben IM, Verhoef JC, Borchard G, Junginger HE. Chitosan and its derivatives in mucosal drug and vaccine delivery. *Eur J Pharm Sci* 2001; 14: 201-7.
56. Matsunaga T, Yanagiguchi K, Yamada S, Ohara N, Ikeda T, Hayashi Y. Chitosan monomer promotes tissue regeneration on dental pulp wounds. *J Biomed Mater Res A* 2006; 76: 711-20.
57. Petri DF, Donega J, Benassi AM, Bocangel JA. Preliminary study on chitosan modified glass ionomer restoratives. *Dent Mater* 2007; 23: 1004-10.

58. อารยา ลิมาภรณ์วณิชย์. การปลดปล่อยโปรตีนจากไคโตซานที่ผสมอยู่ในกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ [วิทยานิพนธ์]. สงขลา:มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์; 2549.

59. นริศา แซ่เตียว. การปลดปล่อยฟลูออไรด์และโปรตีนจากวัสดุไคโตซานประยุกต์กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ [วิทยานิพนธ์]. สงขลา:มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์; 2551.

60. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63.

61. Bessey O, Lowry O, Brock M. A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J Biol Chem* 1946;164:321-9.

62. Goseki M, Oida S, Nifuji A, Sasaki S. Properties of alkaline phosphatase of the human dental pulp. *J Dent Res* 1990; 69: 909-12.

63. Shiba H, Nakamura S, Shirakawa M, Nakanishi K, Okamoto H, Satakeda H, et al. Effects of basic fibroblast growth factor on proliferation, the expression of osteonectin (SPARC) and alkaline phosphatase, and calcification in cultures of human pulp cells. *Develop Biol* 1995; 170: 457-66.

64. Wei X, Ling J, Wu L, Liu L, Xiao Y. Expression of mineralization markers in dental pulp cells. *J Endod* 2007; 33: 703-8.

65. Nakamura H, Saruwatari L, Aita H, Takeuchi K, Ogawa T. Molecular and biomechanical characterization of mineralized tissue by dental pulp cells on titanium; *J Dent Res* 2005; 84: 515-20.

66. www.1stkc.go.th [homepage on the internet}. ศูนย์ความรู้วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. กล้องจุลทรรศน์; 2008. Available from http://www.stkc.go.th/stportalDocument/stportal_1170654028.doc.

67. Zar JH. Biostatistical Analysis. 2nd ed: New Jersey: Prentice-Hall Inc.; 1984.

68. McComb D, Ericson D. Antimicrobial action of new, proprietary lining cements. *J Dent Res* 1987; 66: 1025-8.

69. Murray JB, Brown L, Langer R, Klagsburn M. A micro sustained release system for epidermal growth factor. *In Vitro* 1983; 19: 743-8.

70. Brook IM, Craig GT, Lamb DJ. *In vitro* interaction between primary bone organ cultures, glass-ionomer cements and hydroxyapatite/tricalcium phosphate ceramics. *Biomaterials* 1991; 12: 179-86.

71. Meyer U, Szulczewski DH, Barckhaus RH, Atkinson M, Jones DB. Biological evaluation of an ionomeric bone cement by osteoblast cell culture methods. *Biomaterials* 1993; 14: 917-23.

72. Reusche E, Rohwer J, Forth W, Helms J, Geyer G. Ionomeric cement and aluminium encephalopathy. *The Lancet* 1995; 345: 1633-4.

73. Oliva A, Della Ragione F, Salerno A, Riccio V, Tartaro G, Cozzolino A, et al. Biocompatibility studies on glass ionomer cements by primary cultures of human osteoblasts. *Biomaterials* 1996; 17: 1351-6.

74. Crisp S, Pringuer MA, Wardleworth D, Wilson AD. Reactions in glass ionomer cements: II. An infrared spectroscopic study. *J Dent Res* 1974; 53: 1414-9.

75. Bapna M, Mueller H. Leaching from glass ionomer cements. *J Oral Rehabil* 1994; 21: 577-83.

76. Wasson EA, Nicholson JW. New aspects of the setting of glass-ionomer cements. *J Dent Res* 1993; 72: 481-3.

77. Kan KC, Messer LB, Messer HH. Variability in cytotoxicity and fluoride release of resin-modified glass-ionomer cements. *J Dent Res* 1997; 76: 1502-7.

78. Soheili Majd E, Goldberg M, Stanislawski L. In vitro effects of ascorbate and Trolox on the biocompatibility of dental restorative materials. *Biomaterials* 2003; 24: 3-9.

79. Thaweboon S, Thaweboon B, Chunhabundit P, Suppukpatana P. Effect of fluoride on human dental pulp cells *in vitro*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2003; 34: 915-8.

80. Chang YC, Chou MY. Cytotoxicity of fluoride on human pulp cell cultures in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 91: 230-4.

81. Lau KH, Yoo A, Wang SP. Aluminum stimulates the proliferation and differentiation of osteoblasts in vitro by a mechanism that is different from fluoride. *Mol Cell Biochem* 1991; 105: 93-105.

82. Devlin AJ, Hatton PV, Brook IM. Dependence of in vitro biocompatibility of ionomeric cements on ion release. *J Mater Sci Mater Med* 1998; 9: 737-41.

83. Andersson OH, Dahl JE. Aluminium release from glass ionomer cements during early water exposure in vitro. *Biomaterials* 1994; 15: 882-8.

84. Renard JL, Felten D, Be q, D. Post-otoneurosurgery aluminium encephalophathy. *The Lancet* 1994;344:63-4.

85. Hantson P, Mahieu P, Gersdorff M, Sindic JM, Lauwerys R. Encephalophaty with seizures after use of aluminium-containing bone cement. *The Lancet* 1994; 344: 1647.

86. Reusche E, Pilz P, Oberascher G, Linder B, Egensperger R, Gloeckner K, et al. Subacute fatal aluminum encephalopathy after reconstructive otoneurosurgery: a case report. *Human Pathol* 2001; 32: 1136-40.

87. Ellis G, Hutter J, Abeijon C, Chou L. Effects of silicon on human dental pulp tissue.2003. Available from: http://www.iadr.confex.com/iadr/2003SanAnton/techprogram/abstract.

88. Shirakawa M, Shiba H, Nakanishi K, Ogawa T, Okamoto H, Nakashima K, et al. Transforming growth factor-beta-1 reduces alkaline phosphatase mRNA and activity and stimulates cell proliferation in cultures of human pulp cells. *J Dent Res* 1994; 73: 1509-14.

89. Mier JW, Gallo RC. Purification and some characteristics of human T-cell growth factor from phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte-conditioned media. *Mel Sci* 1980; 77: 6134-8.

90. Jette L, Leger R, Thibaudeau K, Benquet C, Robitaille M, Pellerin I, et al. Human growth hormone-releasing factor $(hGRF)_{1-29}$ albumin bioconjugates activate the GRF receptor on the anterior pituitary in rats: identification of CJC-1295 as a long-lasting GRF analog *Endocrinol* 2005; 146: 3052-8.

91. Hayacibara MF, Ambrozano GM, Cury JA. Simultaneous release of fluoride and aluminum from dental materials in various immersion media. *Oper Dent* 2004; 29: 16-22.

92. Sezer A, Akbuga J. Fucosphere—new microsphere carriers for peptide and protein delivery: Preparation and in vitro characterization. *J Microencapsul* 2006; 23: 1113-20.

93. Consiglio R, Rengo S, Liguoro D, Riccitiello F, Formisano S, Palumbo G, et al. Inhibition by glass-ionomer cements of protein synthesis by human gingival fibroblasts in continuous culture. *Arch Oral Biol* 1998; 43: 65-71.

94. Xu Y, Du Y. Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. *Int J Pharm* 2003; 250: 215-26.

ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1

เอกสารรับรองความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมในการวิจัย

ที่ ศธ 0521.1.03/ 647

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

หนังสือฉบับนี้ให้ไว้เพื่อรับรองว่า

โครงการวิจัยเรื่อง "คุณสมบัติทางชีวภาพของทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า1 ที่ปลดปล่อยจากวัสดุไคโตซานประยุกต์กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ต่อเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟัน"

หัวหน้าโครงการ ทันตแพทย์หญิงนิตรา รักษ์เกียรติวงศ์

สังกัดหน่วยงาน นักศึกษาหลังปริญญา ภาควิชาทันตกรรมอนุรักษ์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ได้ผ่านการพิจารณาและได้รับความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมในการวิจัย (Ethics Committee)
ซึ่งเป็นคณะกรรมการพิจารณาศึกษาการวิจัยในคนของคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ แล้ว

ให้ไว้ ณ วันที่ 14 ส.ค. 2550

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุทธิพงศ์ เชาวนาดิศัย)
ทำหน้าที่แทนประธานคณะกรรมการ

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์วิลาศ สัตยสัณห์สกุล)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สรียา ศรีสินทร)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์พรชัย สถิรปัญญา)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อังคณา เธียรมนตรี)

ไม่ได้เข้าประชุม.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วรพงษ์ ปัญญายงค์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุรพงษ์ วงศ์วัชรานนท์)

ภาคผนวกที่ 2

แบบเสนอโครงการวิจัยเพื่อการพิจารณารับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมในการวิจัย
คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

1. ชื่อโครงการวิจัย

(ภาษาไทย) คุณสมบัติทางชีวภาพของทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 ที่ปลดปล่อยจากวัสดุไคโตซานประยุกต์กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ต่อเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟัน

(ภาษาอังกฤษ) Biological Properties of Transforming Growth Factor beta-1 Released from Chitosan Modified Glass-Ionomer Cement on Pulp Cells

1.1 ประเภทของโครงการวิจัย

☐ Drug trial ☒ Non-drug trial

1.2 จำนวนสถานพยาบาลที่ร่วมวิจัย

☐ Multicenters (ในประเทศ) ☐ Multicenters (ร่วมกับต่างประเทศ)

☒ Single center

2. ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยและที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก

ชื่อหัวหน้าโครงการ (ภาษาไทย) นางสาวนิตรา รักษ์เกียรติวงศ์

(ภาษาอังกฤษ) Miss Nitra Rakkiettiwong

คุณวุฒิ ทันตแพทยศาสตรบัณฑิต ตำแหน่งทางวิชาการ -

ภาควิชาทันตกรรมอนุรักษ์ โทรศัพท์ 074429877, 074429873

3. แหล่งทุนสนับสนุนการวิจัย บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

4. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพของทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 ที่ปลดปล่อยออกมาจากไคโตซานประยุกต์กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์โดยศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์และการเพิ่มจำนวนเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันของชิ้นทดสอบด้วยวิธี MTT ศึกษาผลของทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 ต่อการ

แปรเปลี่ยนสภาพของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟัน โดยวัดจากอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส และผลของทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 ต่อเนื้อเยื่อในโพรงฟันในการสร้างเนื้อเยื่อที่มีการสร้างแคลเซียม ด้วยเทคนิค von Kossa staining

5. การดำเนินการวิจัย

5.1 ประชากรที่เข้ารับการศึกษา

- เกณฑ์การคัดเลือก (Inclusion criteria): ประชากรที่มีสุขภาพแข็งแรง ในกลุ่มอายุ 18 – 24 ปีที่มารับบริการถอนฟัน หรือผ่าตัดฟันออก เนื่องจากฟันคุด หรือถอนเพื่อการจัดฟัน ในคลินิกศัลยศาสตร์ช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ โดยที่ฟันเป็นฟันที่ไม่ผุและนำเอาเนื้อเยื่อในโพรงฟันมาศึกษา
- เกณฑ์การคัดออก (Exclusion Criteria) ประชากร: ประชากรที่ไม่เข้าหลักเกณฑ์การคัดเลือกข้างต้น
- จำนวนประชากร: 10 ซี่ฟัน

5.2 สถานที่ทำการวิจัย

ภาควิชาชีววิทยาช่องปากและระบบการบดเคี้ยว คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

5.3 สิ่งที่ผู้วิจัยต้องการศึกษา (Intervention) และจะให้ (Administer) กับประชากรที่เข้าร่วมการศึกษา: ไม่มี

5.4 สิ่งที่ประชากรที่ศึกษาจะได้รับหรือจะต้องปฏิบัตินอกเหนือไปจากข้อ 5.3: ไม่มี

5.4 ระยะเวลาการวิจัย 17 เดือน

6. ข้อพิจารณาด้านจริยธรรม

6.1 เหตุผลและความจำเป็นที่ต้องวิจัยในคน

การพัฒนาวัสดุทันตกรรมบูรณะจากวัสดุไคโตซานประยุกต์กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์และทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์ วัตถุประสงค์เพื่อนำมาใช้ในฟันมนุษย์ จึงมีความจำเป็นต้องทดสอบความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อในโพรงฟัน และทดสอบประสิทธิภาพในการกระตุ้นการแปรปลี่ยนเป็นเซลล์คล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟัน การสร้างแคลเซียมของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟัน

6.2 ประโยชน์ที่จะได้รับจากการวิจัยนี้ รวมทั้งประโยชน์ต่อประชากรที่เข้าร่วมในโครงการวิจัย

เป็นการศึกษานำร่องเพื่อพัฒนาวัสดุทันตกรรมที่มีคุณสมบัติปลดปล่อยโมเลกุลที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ที่สามารถใช้เพื่อการบูรณะ รักษาโรคของฟัน กระดูกรองรับฟัน โดยใช้ไคโตซานซึ่งเป็นวัตถุดิบที่มีมากในประเทศไทยมาใช้ให้เกิดประโยชน์ และเพิ่มคุณสมบัติที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพแก่กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ โดยใช้โกรว์ทแฟกเตอร์

6.3 ความเสี่ยงที่ประชากรที่เข้าร่วมการศึกษาจะได้รับ ต้องระบุทั้งโอกาสที่จะเกิด รายละเอียดของความเสี่ยงที่อาจจะเกิด และมาตรการป้องกันและรักษารวมทั้งการชดเชยที่ผู้วิจัยได้เตรียมไว้
การศึกษานี้เป็นการศึกษานอกกาย โดยนำเนื้อเยื่อในโพรงฟันที่ได้รับอนุญาตจากผู้ป่วยที่มารับการผ่าตัดฟันคุด ซึ่งฟันเหล่านั้นจะถูกทิ้งในภายหลังอยู่แล้ว ดังนั้นจึงไม่มีความเสี่ยงต่อประชากรที่เข้าร่วมการศึกษา
6.4 แบบหนังสือยินยอมเข้าร่วมการศึกษาของประชากรที่เข้าร่วมในการวิจัยที่ระบุข้อมูลต่าง ๆ ตามแบบที่คณะกรรมการฯ กำหนด ตามเอกสารแนบท้าย

7. รายชื่อ ที่อยู่และคุณวุฒิของผู้ร่วมวิจัยทุกคน

อารจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.ทพญ.อุรีพร เล็กกัต (D.D.S., Ph.D.)
ผศ.ดร.ทพญ.ชโณทัย เฮงตระกูล (D.D.S., Ph.D.)
ดร.ทพญ.เกวลิน ธรรมสิทธิ์บูรณ์ (D.D.S., Ph.D.)
นักศึกษาผู้ทำการวิจัย ทพญ.นิตรา รักษ์เกียรติวงศ์ (D.D.S.)

8. ให้เติมข้อความต่อไปนี้ พร้อมลงลายมือชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยและผู้ร่วมวิจัยทุกคนผู้เสนอโครงการวิจัยสัญญาว่าคณะผู้วิจัยจะดำเนินการวิจัยตามรายละเอียดที่ระบุไว้ในข้อเสนอโครงการวิจัยอย่างเคร่งครัด หากมีการแก้ไขข้อเสนอโครงการวิจัย ผู้เสนอโครงการจะแจ้งให้คณะกรรมการฯ ทราบโดยเร็ว เพื่อการพิจารณาอนุมัติ นอกจากนี้หากประชากรที่รับไว้ในโครงการวิจัยนี้เกิดผลข้างเคียงหรืออันตรายจากการวิจัย หรือหากมีข้อมูลองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับประโยชน์หรือโทษจากแหล่งอื่นในระหว่างทำการศึกษา หัวหน้าโครงการวิจัยจะรายงานให้คณะกรรมการจริยธรรมในการวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ ทราบโดยเร็ว และจะส่งรายงานการวิจัยจำนวน 1 ชุด ให้คณะกรรมการ ฯ ภายใน 6 เดือน เมื่อการวิจัยสิ้นสุดลงหรือเมื่อการวิจัยถูกยกเลิก

9. ลงลายมือชื่อของหัวหน้าหน่วยงานของหัวหน้าโครงการวิจัยที่อนุมัติให้ดำเนินการวิจัยได้ กรณีที่เป็นโครงการวิจัยที่เป็นวิทยานิพนธ์ จะต้องมีชื่อ พร้อมลายมือชื่อของผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ด้วย

ลงชื่อ.....นักศึกษาผู้วิจัย
(ทพญ.นิตรา รักษ์เกียรติวงศ์)
ลงชื่อ.....อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ
(รศ.ดร.ทพญ.อุรีพร เล็กกัต)

ลงชื่อ.....อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ
(ผศ.ดร.ทพญ.ชโณทัย เฮงตระกูล)

ลงชื่อ.....อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ
(ดร.ทพญ.เกวลิน ธรรมสิทธิ์บูรณ์)

ลงชื่อ.....หัวหน้าภาควิชาทันตกรรมอนุรักษ์
(ผศ.ดร.ทพญ.ชโณทัย เฮงตระกูล)

ภาคผนวกที่ 3

ใบเชิญชวน

ขอเชิญชวนเข้าร่วมโครงการวิจัยเรื่อง คุณสมบัติทางชีวภาพของทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 ที่ปลดปล่อยจากวัสดุประยุกต์กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ต่อเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟัน

เรียน ท่านผู้อ่านที่นับถือ

ข้าพเจ้า ทพญ.นิตรา รักษ์เกียรติวงศ์ ใคร่ขอเล่าถึงโครงการวิจัยที่กำลังทำอยู่ และขอเชิญชวนท่านเข้าร่วมโครงการนี้ กล่าวคือ โครงการนี้เป็นโครงการนำร่องเพื่อพัฒนาวัสดุทันตกรรมที่มีคุณสมบัติในการนำส่งโมเลกุลที่สามารถส่งสัญญาณให้เกิดการหายและการซ่อมแซมของเนื้อฟัน โดยทำการศึกษานอกร่างกาย คือ การนำเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันของมนุษย์มาทำการศึกษาผลของทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์ที่ปลดปล่อยออกมาจากวัสดุไคโตซานประยุกต์กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์

ในโครงการวิจัยนี้ ผู้วิจัยจะขอใช้เนื้อเยื่อในโพรงฟันของฟันที่ถูกถอนหรือผ่าตัดออกแล้วของผู้ป่วยที่มารับการถอนฟัน หรือผ่าตัดฟันออก เนื่องจากฟันคุด หรือถอนเพื่อการจัดฟัน ในคลินิกศัลยศาสตร์ช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ โดยไม่ได้ทำกระทำการใดๆนอกเหนือจากนั้นกับร่างกายผู้ป่วย จึงไม่ได้มีความเสี่ยงเพิ่มเติมจากการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ เนื้อเยื่อในโพรงฟันที่ได้จะนำไปเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ก่อนจะนำไปทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพ การเหนี่ยวนำให้เกิดการแปรสภาพเป็นเซลล์คล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟัน และการสร้างแคลเซียมของเซลล์กับวัสดุที่นำมาวิจัย

หากท่านมีข้อสงสัยเกี่ยวกับโครงการวิจัยนี้ประการใด กรุณาติดต่อข้าพเจ้า ทพญ. นิตรา รักษ์เกียรติวงศ์ สาขาวิชาวิทยาเอ็นโดดอนต์ ภาควิชาทันตกรรมอนุรักษ์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โทรศัพท์ 074429877, 0868201929

ไม่ว่าท่านจะเข้าร่วมในโครงการหรือไม่ ท่านจะยังได้รับการรักษาที่ดีเช่นเดียวกับผู้ป่วยท่านอื่นๆ และถ้าท่านต้องการถอนตัวออกจากการศึกษานี้เมื่อใด ท่านสามารถกระทำได้อย่างอิสระ

หากท่านมีคำถามใดๆก่อนที่จะตัดสินใจเข้าร่วมในโครงการนี้โปรดซักถามคณะวิจัยได้อย่างเต็มที่

ขอขอบคุณอย่างสูง

ลงชื่อ……..นักศึกษาผู้วิจัย

(ทพญ.นิตรา รักษ์เกียรติวงศ์)

ลงชื่อ……..อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

(รศ.ดร.ทพญ.อุรีพร เล็กกัต)

หมายเหตุ :- กรุณาอ่านข้อความให้เข้าใจก่อนเซ็นชื่อยินยอมเข้าร่วมโครงการ

ภาคผนวกที่ 4

แบบยินยอมเข้าร่วมการศึกษา
โครงการวิจัยเรื่อง คุณสมบัติทางชีวภาพของทรานสฟอร์มมิงโกรว์ทแฟกเตอร์เบต้า 1 ที่ปลดปล่อยจากวัสดุประยุกต์กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ต่อเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟัน

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้า(นาย, นาง, นางสาว) .....อายุ.....ปี

ที่อยู่บ้านเลขที่.....ถนน.....ตำบล.....อำเภอ.....

จังหวัด.....รหัสไปรษณีย์.....

ได้อ่าน/ได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีวิจัย อันตรายหรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัยนี้ รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดจากการวิจัยอย่างละเอียดและมีความเข้าใจดีแล้ว โดยผู้รับผิดชอบโครงการวิจัยนี้คือ ทพญ.นิตรา รักษ์เกียรติวงศ์ สถานที่ติดต่อ สาขาวิทยาเอ็นโดดอนต์ ภาควิชาทันตกรรมอนุรักษ์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หมายเลขโทรศัพท์ 074429877, 0868201929 หรือเมื่อมีปัญหาใด ๆ เกิดขึ้น เนื่องจากการทำวิจัยในเรื่องนี้ ข้าพเจ้าสามารถร้องเรียนไปที่คณะบดีคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112 โทรศัพท์ 074287510

หากผู้วิจัยมีข้อมูลเพิ่มเติมทั้งด้านประโยชน์และโทษที่เกี่ยวข้องกับการวิจัยนี้ ผู้วิจัยจะแจ้งให้ข้าพเจ้าทราบอย่างรวดเร็ว โดยไม่ปิดบัง

ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะของดการเข้าร่วมโครงการวิจัยโดยมิต้องแจ้งให้ทราบล่วงหน้าโดยงดการเข้าร่วมการวิจัยนี้ จะไม่มีผลกระทบต่อการได้รับบริการหรือการรักษาที่ข้าพเจ้าจะได้รับแต่ประการใด

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลเฉพาะที่เกี่ยวกับตัวข้าพเจ้าเป็นความลับ จะไม่เปิดเผยข้อมูลหรือผลการวิจัยของข้าพเจ้าเป็นรายบุคคลต่อสาธารณชน จะเปิดเผยได้เฉพาะในรูปที่เป็นสรุปผลการวิจัย หรือการเปิดเผยข้อมูลต่อผู้มีหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับการสนับสนุนและกำกับดูแลการวิจัย

ข้าพเจ้าได้อ่าน/ได้รับการอธิบายข้อความข้างต้นแล้ว และมีความเข้าใจดีทุกประการ จึงได้ลงนามในใบยินยอมนี้ด้วยความเต็มใจ โดยนักวิจัยได้ให้สำเนาแบบยินยอมที่ลงนามแล้วกับข้าพเจ้าเพื่อเก็บไว้เป็นหลักฐาน จำนวน 1 ชุด

ลงชื่อ.....ผู้ยินยอม

ลงชื่อ.....นักศึกษาผู้ทำการวิจัย

ลงชื่อ.....อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

ลงชื่อ.....พยาน

ลงชื่อ.....พยาน

<u>หรือ</u>ในกรณีผู้ยินยอมเข้าร่วมโครงการฯยังไม่บรรลุนิติภาวะ จะต้องได้รับการยินยอมจากผู้ปกครอง

<u>ให้ผู้เกี่ยวข้องเซ็นชื่อ ดังนี้</u>

ลงชื่อ.....ผู้ยินยอม

ลงชื่อ.....บิดา/ผู้ใช้อำนาจปกครอง

ลงชื่อ.....มารดา/ผู้ใช้อำนาจปกครอง

ลงชื่อ.....นักศึกษาผู้ทำการวิจัย

ลงชื่อ.....อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

ลงชื่อ.....พยาน

ลงชื่อ.....พยาน

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวนิตรา รักษ์เกียรติวงศ์

รหัสประจำตัวนักศึกษา 4910820003

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
ทันตแพทยศาสตรบัณฑิต	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2538

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

ทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาภายในประเทศ โรงพยาบาลนราธิวาสราชนครินทร์ อ. เมือง จ. นราธิวาส ปีการศึกษา 2549 - 2551

ตำแหน่งและสถานที่ทำงาน

ทันตแพทย์ 8 กลุ่มงานทันตกรรม โรงพยาบาลนราธิวาสราชนครินทร์ อ. เมือง จ. นราธิวาส