



การศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพของอนุไวรัสจากใบยาสูบต่อเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์
BIOCOMPATIBILITY STUDY OF TOBACCO MOSAIC VIRUS NANOPARTICLES ON
HUMAN ALVEOLAR BONE CELLS

อัญจิดา ชวนะโรจนฤทธิ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2563

การศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพของอนุไวรัสจากไบยาสูบต่อเซลล์กระดูกงูเข้าฟันมนุษย์



ปริญญาานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการช่องปากและแม็กซิลโลเฟเชียล
คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2563
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

BIOCOMPATIBILITY STUDY OF TOBACCO MOSAIC VIRUS NANOPARTICLES ON
HUMAN ALVEOLAR BONE CELLS



AUNJIDA CHAWANAROJNARIT

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of MASTER OF SCIENCE
(Oral and Maxillofacial Sciences)

Faculty of Dentistry, Srinakharinwirot University

2020

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญาบัตร

เรื่อง

การศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพของอณูไวรัสจากใบยาสูบต่อเซลล์กระดูกเบาฟ้านมนุษย์

ของ

อัญจิดา ชวนะโรจนฤทธิ์

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการช่องปากและแม็กซ์ซิลโลเฟเชียล
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญาบัตร

..... ที่ปรึกษาหลัก ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร.สรศักดิ์ รังสิยานนท์) (รองศาสตราจารย์ ดร.เนืงชา สารชวนะกิจ)

..... ที่ปรึกษาร่วม กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.นิรดา ธเนศวร) (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรุณวรรณ หล้าอุบล)

..... ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตติมา ลักคานกุล)

ชื่อเรื่อง	การศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพของอนุไวรัสจากไบยาซูบต่อเซลล์กระดูก เบ้าฟันมนุษย์
ผู้วิจัย	อัญจิตา ชวนะโรจนฤทธิ์
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2563
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. สรศักดิ์ รังสิยานนท์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. นิรดา ธเนศวร
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิตติมา ลัคนากุล

ปัจจัยที่สัมพันธ์กับความสำเร็จของงานทันตกรรมรากเทียม ได้แก่การมีปริมาณกระดูกรองรับราก
เทียมที่เพียงพอ แต่เนื่องจากกระดูกทดแทนที่นำมาใช้นั้นยังพบมีข้อจำกัด จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าอนุ
ไวรัสจากไบยาซูบ มีคุณสมบัติสามารถเหนี่ยวนำการสร้างกระดูกได้ การศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อ
ศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพของอนุไวรัสจากไบยาซูบต่อเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ วิธีการศึกษาโดยใช้
เซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ที่เพาะเลี้ยง จำนวน 2 เซลล์ไลน์ มาทดสอบร่วมกับอนุไวรัสจากไบยาซูบ โดยประเมิน
ความมีชีวิตของเซลล์ การสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส การสะสมแคลเซียมในเมทริกซ์ระหว่างเซลล์ การ
สร้างโปรตีน Osteocalcin และการแสดงออกลักษณะสัญญาณวิทยาของเซลล์ด้วยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์
ผลการวิจัยพบว่า เซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ที่เลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงที่มีไวรัสจากไบยาซูบเคลือบอยู่ทั้งสอง
เซลล์ไลน์ มีค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ในวันที่ 1, 3, 7 และ 14 มากกว่ากลุ่มควบคุม และสามารถ
สร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส รวมทั้งพบการสะสมแคลเซียมในเมทริกซ์ระหว่างเซลล์มากกว่ากลุ่มควบคุม
ในวันที่ 14 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเฉพาะในกลุ่มที่เลี้ยงด้วย Osteogenic media นอกจากนี้ยังคงพบการ
สร้างโปรตีน Osteocalcin เกิดขึ้นด้วย ส่วนลักษณะทางสัญญาณวิทยาของเซลล์ ในกลุ่มที่เลี้ยงเซลล์ร่วมกับไวรัส
จากไบยาซูบ พบว่าเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นหลายเหลี่ยมและมีลักษณะเกาะกลุ่มกันเร็วกว่าเมื่อเทียบ
กับกลุ่มควบคุม การวิจัยนี้สรุปได้ว่าอนุไวรัสจากไบยาซูบมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์กระดูกเบ้าฟัน
มนุษย์และมีแนวโน้มในการเหนี่ยวนำเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ให้มีการเจริญได้เพิ่มมากขึ้น จึงมีความน่าสนใจ
ที่จะนำไปใช้พัฒนาต่อยอดสำหรับงานทันตกรรมเนื้อเยื่อแข็งต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ : ความเข้ากันได้ทางชีวภาพ, ไวรัสมิเมติกไบยาซูบ, เซลล์กระดูกเบ้าฟัน

Title	BIOCOMPATIBILITY STUDY OF TOBACCO MOSAIC VIRUS NANOPARTICLES ON HUMAN ALVEOLAR BONE CELLS
Author	AUNJIDA CHAWANAROJNARIT
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2020
Thesis Advisor	Associate Professor Dr. Sorasun Rungsiyanonte
Co Advisor	Associate Professor Dr. Nirada Dhanesuan
Co Advisor	Assistant Professor Dr. Jittima Luckanagul

The factor that is most associated with dental implant success is an adequate amount of supporting bone for the implant. However, there are still some limitations for the substitution of bone used. Many previous studies found that nanoparticles of the tobacco virus had the ability to induce bone formation. This study aimed to evaluate the biocompatibility of tobacco mosaic virus nanoparticles with two primary human alveolar bone cells. The cell culture on the primary cell lines of human alveolar bone and tobacco mosaic viral particles were also performed. In order to evaluate the cell viability, the alkaline phosphatase assay, calcium matrix mineralization test, and immunofluorescence test for osteocalcin synthesis and cell morphology were also assessed. The results showed that both cell lines were cultured on the tobacco viral coated plate had higher average proliferation rate than the control group at day 1, 3, 7 and 14. Moreover, the alkaline phosphatase enzyme assay was positive and calcium deposition was found significantly greater than the control group on day 14, especially in the group, which was treated with osteogenic media ($p < 0.05$). The osteocalcin protein synthesis was also found in both tested groups. The immunofluorescence study showed that in the tested group, the cells changed into polygonal shapes and aggregated more quickly than the control group. The present findings concluded that the tobacco mosaic virus was biocompatible with primary human alveolar bone cells and showed osteoinduction potential. Therefore, it is interesting for future study in the hard tissue engineering field.

Keyword : Biocompatibility, Tobacco mosaic virus, Alveolar bone cell

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาช่วยเหลือ ให้คำปรึกษาแนะนำ จากอาจารย์ที่ปรึกษาหลัก รองศาสตราจารย์ ทพ. ดร. สรสิทธิ์ รังสิยานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ ทพญ. ดร. นีรดา ฐเนศวร และ ภญ. ดร. จิตติมา ลักนากุล ผู้วิจัยกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณคณะเภสัชศาสตร์และศูนย์เครื่องมือวิจัยทางเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับความช่วยเหลือเพื่อสถานที่ วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ ที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณบริษัท แอลเอ็มเอส อินสทრูเมนต์ จำกัด สำหรับความช่วยเหลือและเชื้อเพื่อเครื่อง Nanosurf CoreAFM ที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาวิทยาการเภสัชและเภสัชอุตสาหกรรม คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับความช่วยเหลืออำนวยความสะดวก และให้คำแนะนำ

ขอขอบพระคุณคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒและบุคลากร สำหรับความช่วยเหลืออำนวยความสะดวก เครื่องมือวัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ ที่ใช้ในงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณน้องๆและเพื่อนๆในภาควิชาวิทยาการเภสัชและเภสัชอุตสาหกรรม คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำและกำลังใจแก่ผู้วิจัยด้วยดีตลอดมา

ขอบพระคุณครอบครัว เพื่อนๆของข้าพเจ้าที่คอยเป็นแรงผลักดัน เป็นกำลังใจสนับสนุน ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วง

สุดท้ายนี้ยังมีผู้ให้ความช่วยเหลืออีกหลายท่านที่ไม่อาจกล่าวนามได้หมด จึงขอขอบพระคุณทุกท่านไว้ ณ โอกาสนี้ด้วย

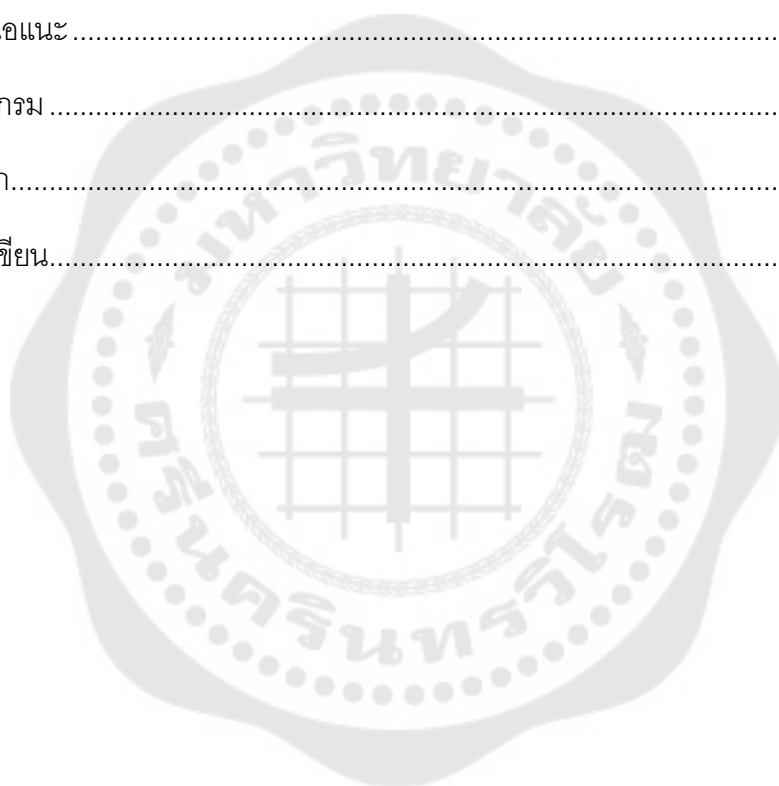
อัญจิตา ชวนะโรจนฤทธิ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูปภาพ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง	1
ความมุ่งหมายของงานวิจัย.....	4
ความสำคัญของงานวิจัย	4
ขอบเขตของการวิจัย	4
กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย.....	4
ตัวแปรที่ศึกษา	4
นิยามศัพท์เฉพาะ.....	4
กรอบแนวคิดงานวิจัย.....	5
สมมติฐานในการวิจัย.....	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
กระดูกมนุษย์ (Human bone)	6
วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissues engineering)	13
ไวรัส (Virus).....	16
ไวรัสจากพืช (Plant virus).....	17

ไวรัสจากใบยาสูบ (Tobacco Mosaic Virus ; TMV).....	19
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	26
การกำหนดประชากรและการสุ่มกลุ่มตัวอย่าง.....	26
ขั้นตอนการทดลอง.....	27
วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกเบ้าฟัน.....	27
การสกัด ไวรัสจากใบยาสูบ (Tobacco mosaic virus nanoparticle, TMV)	27
กระบวนการทดสอบคุณลักษณะโครงสร้างของไวรัสจากใบยาสูบ.....	28
กระบวนการนำไวรัสจากใบยาสูบเคลือบบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์.....	29
ทดสอบความมีชีวิตของเซลล์กระดูกเบ้าฟัน (cell viability)	29
ทดสอบระดับปฏิกิริยาอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของเซลล์กระดูกเบ้าฟัน (alkaline phosphatase, ALP activity assay).....	29
ทดสอบการสะสมแคลเซียมในเมทริกซ์ระหว่างเซลล์ โดยการย้อม Alizarin red	30
ทดสอบการแสดงออกของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ (cell morphology)และการสร้างโปรตีน Osteocalcin โดย Immunofluorescence	31
การเก็บรวบรวมข้อมูล	32
สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล.....	32
บทที่ 4.....	33
ผลการดำเนินงานวิจัย	33
ผลการทดสอบทดสอบคุณลักษณะโครงสร้างของไวรัสจากใบยาสูบ.....	33
ผลการเคลือบไวรัสจากใบยาสูบลงบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์.....	34
ผลการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์กระดูกเบ้าฟัน.....	35
ผลการทดสอบระดับปฏิกิริยาอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของเซลล์กระดูกเบ้าฟัน.....	37
ผลการทดสอบการสะสมแคลเซียมในเมทริกซ์ระหว่างเซลล์โดยการย้อม Alizarin red	38

ผลการทดสอบการสร้างโปรตีน Osteocalcin และการแสดงออกของลักษณะทางสัณฐานวิทยา ของเซลล์ โดย Immunofluorescence	40
บทที่ 5.....	43
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	43
สรุปผลการวิจัย.....	43
อภิปรายผลการวิจัย	43
ข้อเสนอแนะ	48
บรรณานุกรม	49
ภาคผนวก.....	53
ประวัติผู้เขียน.....	67



สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 ผลทางสถิติของการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ เพื่อประเมิน ความมีชีวิตของ cell line OB1 โดยใช้สถิติ Independent Sample T-test ที่กำหนดระดับความ เชื่อมั่น 95%.....	54
ตาราง 2 ผลทางสถิติของการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ เพื่อประเมิน ความมีชีวิตของ cell line OB2 โดยใช้สถิติ Independent Sample T-test ที่กำหนดระดับความ เชื่อมั่น 95%.....	56
ตาราง 3 ผลทางสถิติของการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยอัตราการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ใน cell line OB1 ภายใต้สภาวะอาหารเลี้ยงเซลล์ osteogenic media (OSM) โดยใช้สถิติ Independent Sample T-test ที่กำหนดระดับความเชื่อมั่น 95%.....	58
ตาราง 4 ผลทางสถิติของการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยอัตราการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ใน cell line OB1 ภายใต้สภาวะอาหารเลี้ยงเซลล์ non osteogenic media โดยใช้สถิติ Independent Sample T-test ที่กำหนดระดับความเชื่อมั่น 95%.....	60
ตาราง 5 ผลทางสถิติของการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยอัตราการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ใน cell line OB2 ภายใต้สภาวะอาหารเลี้ยงเซลล์ osteogenic media (OSM) โดยใช้สถิติ Independent Sample T-test ที่กำหนดระดับความเชื่อมั่น 95%.....	62
ตาราง 6 ผลทางสถิติของการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยอัตราการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ใน cell line OB2 ภายใต้สภาวะอาหารเลี้ยงเซลล์ non osteogenic media โดยใช้สถิติ Independent Sample T-test ที่กำหนดระดับความเชื่อมั่น 95%.....	64

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
ภาพประกอบ 1 กรอบแนวคิดงานวิจัย	5
ภาพประกอบ 2 ลักษณะการจัดเรียงคอลลาเจนในเนื้อกระดูก Woven bone/immature bone(W) osteoblasts(B) lamellar bone(L) Haversian canal(H).....	8
ภาพประกอบ 3 กระบวนการสร้างกระดูกแบบ Intramembranous ossification.....	9
ภาพประกอบ 4 กระบวนการสร้างกระดูกแบบ Endochondral ossification	10
ภาพประกอบ 5 แสดงกระบวนการหายของแคลคิออนพื้น	12
ภาพประกอบ 6 ความหลากหลาย ขนาด รูปร่าง พื้นผิวของไวรัสและการนำไปใช้	19
ภาพประกอบ 7 โครงสร้างของไวรัสจากใบยาสูบ (Tobacco Mosaic Virus, TMV)	20
ภาพประกอบ 8 กลไกของนาโนไวรัสต่อกระบวนการกระตุ้นการสร้างกระดูก	21
ภาพประกอบ 9 การวัดการแสดงออกของยีนส์ BMP-2 ในเซลล์ต้นกำเนิดการสร้างกระดูก (gene expression) ด้วยวิธี RT-qPCR ใน 2 ช่วงเวลา (the error bars denote ± 1 S.D.**and* represent $p < 0.05$ and $p < 0.1$, respectively)	23
ภาพประกอบ 10 ผลตรวจมวลโมเลกุลโปรตีนของไวรัส TMV ด้วย MALDI-TOF MS analysis ..	33
ภาพประกอบ 11 ผลการตรวจดูโครงสร้างของ TMV ด้วยวิธี Transmission electron microscopy (TEM) magnification 150,000x scale bar 200 nm	34
ภาพประกอบ 12 ผลการตรวจดูลักษณะพื้นผิวของไวรัสด้วยวิธี Atomic force microscopy (AFM) พื้นที่ $5 \times 5 \mu\text{m}$	35
ภาพประกอบ 13 แผนภูมิค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ เพื่อประเมินความมีชีวิตของเซลล์ (A) cell line OB1 (B) cell line OB2 โดยแสดงค่า Normalized fold fluorescence intensity 560/590 nm. ในวันที่ 1, 3, 7 และ 14 ภายใต้สภาวะอาหารเลี้ยง non osteogenic media โดยใช้สถิติ Independent Sample T-test ที่กำหนดระดับความเชื่อมั่น 95% โดย * $p < 0.05$	36
ภาพประกอบ 14 แผนภูมิแสดงค่าเฉลี่ยอัตราการสร้างเอนไซม์อัลคาไลด์ฟอสฟาเตส ใน cell line OB1 และ OB2 โดยแสดงค่า Normalized fold OD absorbance 405 nm. ในวันที่ 1, 3, 7 และ	

14 ภายใต้สภาวะอาหารเลี้ยงเซลล์ (A,C) osteogenic media และ (B,D) non osteogenic media โดยใช้สถิติ Independent Sample T-test โดยกำหนดระดับความเชื่อมั่น 95% โดย * $p < 0.05$ 38

ภาพประกอบ 15 ภาพการสะสมแคลเซียมในเมทริกซ์ระหว่างเซลล์ใน cell line OB2 โดยการย้อม Alizarin red ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (inverted microscope) ที่เลนส์วัตถุกำลังขยาย 4X ดูการสะสมแร่ธาตุในเมทริกซ์ระหว่างเซลล์โดยการย้อม Alizarin red ภายใต้สภาวะอาหารเลี้ยงเซลล์ osteogenic media (OSM) และ non osteogenic media ในวันที่ 7 และ 14 ของการทดลอง 39

ภาพประกอบ 16 ภาพแสดงรูปร่างของเซลล์จากการย้อม Immunofluorescence ใน cell lines OB1 และ OB 2 ที่เลนส์วัตถุกำลังขยาย 10X scale bar 500 nm. สีแดงแสดงสีเขียวแอนติบอดีของ Osteocalcin สีน้ำเงินแสดงการย้อมติดนิวเคลียสจากสีเขียวแสดงการย้อมติดแอกตินจากสีเขียว FITC-Phalloidin อาหารเลี้ยงเซลล์ osteogenic media (OSM) และ non osteogenic media ในวันที่ 7 และ 14 ของการทดลอง 42

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

ปัจจุบันรากฟันเทียมเป็นที่แพร่หลายและได้รับความนิยมจากผู้ป่วยและทันตแพทย์มากขึ้น เนื่องจากรากฟันเทียมเป็นวัสดุทดแทนฟันธรรมชาติแบบติดแน่นที่ดี ทั้งในกรณีผู้ป่วยมีช่องว่างบางส่วนและมีช่องว่างทั้งปาก แต่ทั้งนี้ผู้ป่วยหลายรายโดยเฉพาะผู้สูงอายุมีปริมาณกระดูกไม่เพียงพอต่อการฝังรากฟันเทียม ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องทำการปลูกกระดูก เพื่อให้รากฟันเทียมมีเสถียรภาพมากขึ้น (implant stability)⁽¹⁾ โดยกระดูกทดแทนที่นำมาใช้ในทางคลินิกมีความหลากหลาย

เนื้อเยื่อกระดูกตนเอง (autograft) เป็นเนื้อเยื่อปลูกถ่ายตัวเลือกแรกที่แนะนำ เนื่องจากไม่ก่อให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อต้าน สามารถสร้างเนื้อเยื่อกระดูกขึ้นได้เอง (osteogenic) มีคุณสมบัติเหนี่ยวนำการสร้างกระดูก (osteoinductive) และเป็นโครงร่างยึดเกาะของเนื้อเยื่อกระดูก (osteoconductive) แต่มีข้อเสียคือต้องผ่าตัดในตำแหน่งที่สองอาจเกิดภาวะแทรกซ้อนได้จากแผลผ่าตัดตำแหน่งที่ตัดกระดูกออกไป

เนื้อเยื่อปลูกถ่ายเอกพันธุ์ (allograft) เป็นเนื้อเยื่อปลูกถ่ายที่นิยมใช้เป็นอันดับที่สอง ซึ่งนำมาจากเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตสปีชีส์เดียวกัน แต่วัสดุชนิดนี้อาจก่อให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อต้านสิ่งแปลกปลอมของผู้รับ และมีโอกาสเป็นพาหะของเชื้อโรคได้

เนื้อเยื่อปลูกถ่ายวิวิธพันธุ์ (xenografts) เป็นเนื้อเยื่อที่ได้มาจากสัตว์ แต่มีข้อเสียคือ ไม่มีคุณสมบัติเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างกระดูกและอาจเกิดการต่อต้านจากระบบภูมิคุ้มกันของผู้รับได้

วัสดุปลูกถ่ายเฉื่อย (alloplastic materials) เป็นวัสดุสังเคราะห์ มีข้อดีคือ สามารถสังเคราะห์ได้ไม่จำกัด ไม่เป็นพาหะของเชื้อโรค แต่มีข้อเสียคือ ระยะเวลาการสลายตัวยังไม่แน่ชัด

ด้วยข้อจำกัดเหล่านี้จึงเกิดการพัฒนาวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (tissue engineering) ซึ่งเป็นการพัฒนาโครงสร้างค้ำยันของวัสดุ (scaffold) เช่น พื้นผิวของวัสดุ (topography) ลักษณะโครงสร้างโดยทั่วไป เพื่อเลียนแบบเมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix) ที่มีอิทธิพลต่อการเร่งการเจริญเติบโต และการแสดงออกของเซลล์ต้นกำเนิดการสร้างกระดูก (osteoinductive)⁽²⁾

ในด้านการใช้สารช่วยเร่งการเจริญของกระดูกหรือโกรทแฟคเตอร์ (growth factor) มีการนำมาใช้หลายชนิด เช่น Transforming growth factor beta (TGF- β), growth differentiation factors (GDF) โดยจากการศึกษาพบว่า bone morphologic protein-2 (BMP-2) เป็นโกรทแฟคเตอร์ที่มีความสำคัญต่อกระบวนการสร้างกระดูก ทั้งนี้ปัจจุบันสามารถผลิตขึ้นได้เองในรูปแบบ

recombinant bone morphologic protein-2 (rhBMP-2) แต่มีข้อเสียคือ มีราคาแพงและยังมีข้อสงสัยถึงผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้น เช่น การบวมของเนื้อเยื่อ การสร้างกระดูกผิดตำแหน่ง เป็นต้น⁽³⁾ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ไวรัสจากใบยาสูบ (Tobacco Mosaic Virus ; TMV) มีคุณสมบัติเร่งการแสดงออกของ BMP-2 ซึ่งส่งผลเหนี่ยวนำการสร้างกระดูกด้วย

ไวรัสจากพืช (Plant virus) ลักษณะโดยทั่วไป มีโครงสร้างในระดับนาโนโมเลกุล ไม่สามารถก่อให้เกิดโรคหรือเพิ่มจำนวนในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม⁽⁴⁾ สามารถสลายตัวได้เองเนื่องจากมีโครงสร้างเป็นโปรตีนทำให้ไม่เกิดสารตกค้าง มีความคงตัวสูง ไวรัสพืชสามารถนำมาใช้เป็นโครงร่างค้ำยัน (Scaffold) ในรูปแบบ 2 มิติ และ 3 มิติ เพื่อนำพาสารหรือยาที่ต้องการได้ นอกจากนี้ capsid protein ของไวรัสสามารถพัฒนาปรับปรุงให้มีคุณสมบัติที่ต้องการทั้งด้านเคมี (chemical conjugation) และพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) ได้^(2, 5, 6)

ไวรัสจากใบยาสูบ (Tobacco Mosaic Virus, TMV) ถูกค้นพบขึ้นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1892 มีรูปร่างเป็นแท่ง (rod like shape) มีความยาว 300 นาโนเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย 18 นาโนเมตร ในด้านความเป็นพิษ พบว่า 97% ของ TMV particles ถูกกำจัดได้จากระบบหมุนเวียนเลือดโดย reticuloendothelial system (RES) ที่พบในตับและม้าม โดยจากการศึกษาในหนูพบว่า เมื่อใช้ TMV ร่วมกับไฮโดรเจล ไม่พบการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน (Anti-TMV IgG) ไม่พบภาวะอักเสบเรื้อรังและรุนแรงต่อสัตว์ทดลอง (chronic/major inflammation)⁽⁷⁾

การศึกษาไวรัสจากใบยาสูบในรูปแบบ 2 มิติ ในปี 2012 ของ Pongkwan Sitasuwan และคณะ⁽⁸⁾ ได้ศึกษาในห้องปฏิบัติการถึงผลของ TMV ในเซลล์ต้นกำเนิดการสร้างกระดูก (bone marrow derived mesenchymal stem cells, BMSCs) จากหนูบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ (tissue culture plate ; TCP) พบว่า TMV มีผลต่อการเหนี่ยวนำการสร้างกระดูก (osteoinduction) และเร่งการแสดงออกของ bone morphologic protein-2 (BMP-2) ส่งผลให้เกิด early osteoblastic differentiation ที่ 8 ชั่วโมงแรกมากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ใส่ไวรัส

แต่เนื่องจากการเจริญเติบโตของเซลล์ตามธรรมชาติเป็นรูปแบบ 3 มิติ จึงได้มีการคิดค้นระบบนำส่งสารขึ้น เพื่อนำพาสารหรือยาและเป็นโครงร่างค้ำยัน (Biological scaffold) ให้เซลล์เจริญเติบโต จึงได้มีการศึกษาไวรัสจากใบยาสูบ โดยศึกษาร่วมกับไฮโดรเจลแบบต่างๆในรูปแบบ 3 มิติโดย ในปี 2012 Luckanagul J. และคณะ⁽⁹⁾ ได้ปรับปรุงคุณสมบัติของ TMV โดย mutant พื้นผิวของ TMV ในรูปแบบของ RGD-PAH (arginine-glycine-aspartic acid) ร่วมกับ porous alginate hydrogels scaffolds (PAH) ที่มีต่อ 0.1% W/V TMV ทำการศึกษาใน BMSCs จากหนูพบว่า ในวันที่ 3 กลุ่ม mutant TMV (RGD-PAH) ค่า Alkaline phosphatase activity (ALP) ซึ่ง

เป็น early osteoblastic marker ในการวัด cell differentiation มากกว่ากลุ่ม TMV และกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่ไวรัส นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่ม TMV-PAH และ RGD-PAH สามารถวัดค่าการย้อมติดสี Alizarin Red และ วัดค่า osteocalcin จาก immunostaining ซึ่งเป็นค่าจำเพาะของ mature osteoblast ในขั้นตอน calcium deposition ของกระดูก มากกว่ากลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่า TMV และ mutant TMV สามารถเร่งการเกิด bone differentiation และ mineralization ให้เร็วขึ้น

ในปี 2016 Maturavongsadit P. และคณะ⁽¹⁰⁾ ได้พัฒนาโครงสร้างชีวภาพในรูปแบบยาฉีดไฮโดรเจล จากกรดไฮยาลูโรนิก เกิดเป็น Methacrylated hyaluronic acid (MeHA) และมี crosslinker เป็น dithiotreitol (DTT) ร่วมกับ Cysteine-inserted Tobacco Mosaic Virus (TMV1cys) ซึ่งเป็น mutant TMV ใน BMSCs จากหนู พบว่าไฮโดรเจล ที่ก่อตัวจาก MeHA-TMV1cys ส่งเสริมการเหนี่ยวนำการสร้างกระดูกอ่อน (Chondrogenesis) โดยกระตุ้นการสร้าง BMP-2 (early stage chondrogenic marker) และ collagen type II (late stage chondrogenic marker) ได้ดีกว่า ไฮโดรเจล ที่ก่อตัวจาก MeHA-DTT เพียงอย่างเดียว

นอกจากนี้ Liu T. และคณะในปี 2019⁽¹¹⁾ ได้ศึกษาผลของไวรัสจากใบยาสูบต่อกระบวนการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกมนุษย์ (Human bone marrow stem cells) ที่ได้มาจากไขกระดูกต้นขา (femoral medullary cavity) บนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ (TCP) พบว่า TMV-RGD1 ซึ่งเป็น mutant TMV พบแสดงออกของ gene osteocalcin, Runx2, BMP-2 และ TGF- β ส่งเสริมการเกิด cell differentiation จากการวัดค่า ALP และ calcium deposition มากกว่าในกลุ่ม TMV และกลุ่มควบคุม

จากการศึกษาทั้งหมดที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่า TMV มีคุณสมบัติเหนี่ยวนำการสร้างกระดูก (osteoinduction) โดยมีการศึกษาผลของ TMV กับเซลล์ต้นกำเนิดการสร้างกระดูกของหนู และเซลล์ต้นกำเนิดการสร้างกระดูกมนุษย์ที่มาจากไขกระดูกต้นขาแต่ยังไม่เคยมีการศึกษาในเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ ทั้งนี้เพื่อนำข้อดีของ TMV ไปประยุกต์ใช้ทางทันตกรรมในกระตุ้นการสร้างกระดูกทดแทนในช่องปาก การศึกษานี้จึงมุ่งศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatibility) ของ nanoparticle ของไวรัสจากใบยาสูบ (Tobacco Mosaic Virus, TMV) ที่มีต่อเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ (human alveolar bone cells)

ความมุ่งหมายของงานวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้ตั้งความมุ่งหมายไว้ดังนี้ คือ

เพื่อทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatibility) ของ Tobacco mosaic virus nanoparticles ที่มีต่อ Human alveolar bone cells

โดยประเมินผล 3 ด้าน คือ

1. การมีชีวิตของเซลล์ (cell viability)
2. คุณสมบัติเหนียวทำให้เกิดการสร้างกระดูก (osteoinductivity)
3. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ (cell morphology)

ความสำคัญของงานวิจัย

เพื่อให้ได้อัญไวรัสจากใบยาสูบที่มีคุณสมบัติทางชีวภาพที่เหมาะสมต่อเซลล์กระดูกเบาพื้นมนุษย์ สามารถเหนียวนำการสร้างกระดูกได้และสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดร่วมกับระบบโครงร่างทางชีวภาพเพื่อใช้สำหรับงานพันธุวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกต่อไป

ขอบเขตของการวิจัย

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย

เซลล์กระดูกเบาพื้นมนุษย์ Human alveolar bone cells (Primary cells)

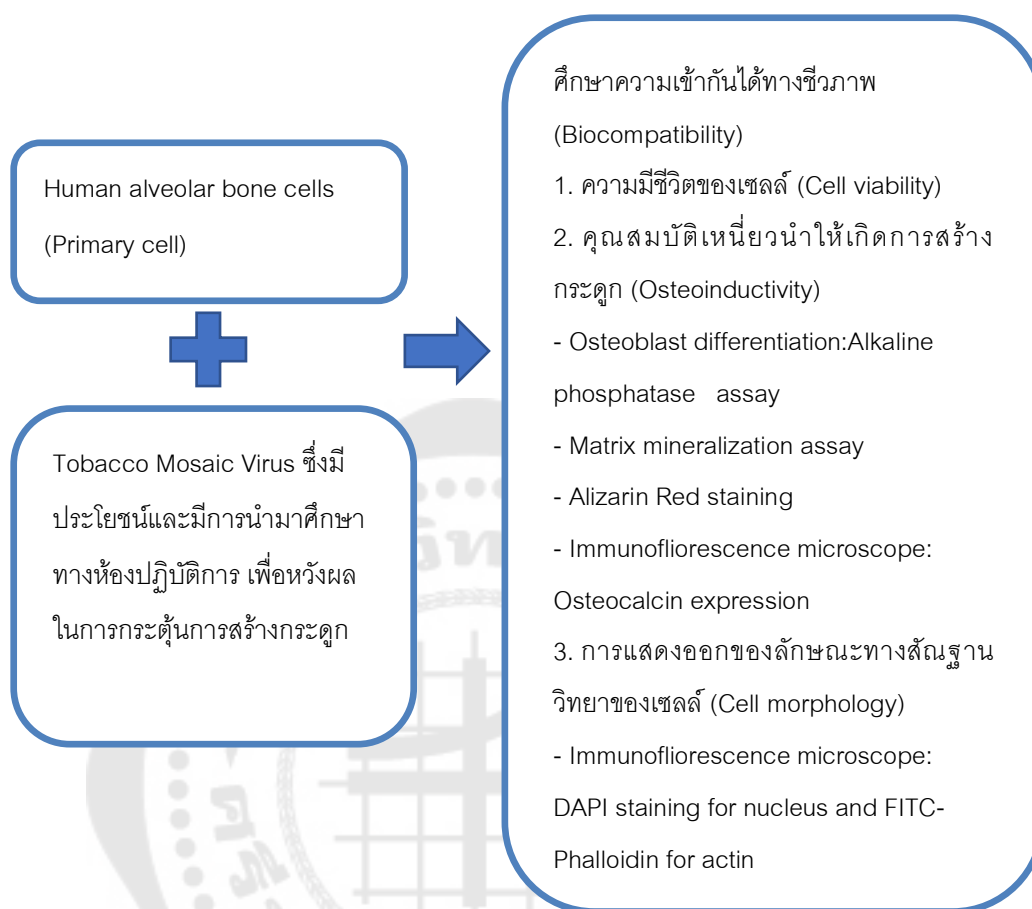
ตัวแปรที่ศึกษา

1. ตัวแปรอิสระ
 - 1.1 ไวรัสจากใบยาสูบ (Tobacco mosaic virus, TMV)
2. ตัวแปรตาม ได้แก่
 - 2.1 ความมีชีวิตของเซลล์ (cell viability)
 - 2.2 การแสดงออกของเอนไซม์ที่ควบคุมการสร้างกระดูก (osteoblast differentiation)
 - 2.3 การสะสมแร่ธาตุในเมทริกซ์ระหว่างเซลล์ (matrix mineralization assay)
 - 2.4 การแสดงออกของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ (cell morphology)

นิยามศัพท์เฉพาะ

Human alveolar bone cells (Primary cells) หมายถึง เซลล์กระดูกเบาพื้นมนุษย์ที่ได้รับการเก็บเกี่ยวจากบริเวณขากรรไกรมนุษย์ มีคุณสมบัติในการเพิ่มจำนวนและสามารถสร้างเนื้อเยื่อกระดูกได้

กรอบแนวคิดงานวิจัย



ภาพประกอบ 1 กรอบแนวคิดงานวิจัย

สมมติฐานในการวิจัย

ไวรัสจากใบยาสูบ (Tobacco mosaic virus nanoparticles, TMV) มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ (Human alveolar bone cells)

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และได้นำเสนอตามหัวข้อต่อไปนี้

1. กระดูกมนุษย์ (human bone)
2. วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (tissue engineering)
3. ไวรัส (virus); ไวรัสจากใบยาสูบ (Tobacco Mosaic Virus, TMV)

กระดูกมนุษย์ (Human bone)

กระดูกเป็นโครงสร้างของร่างกาย ทำหน้าที่ป้องกันอวัยวะภายในร่างกายและเป็นที่สร้างเม็ดเลือด แหล่งสะสมไขมัน และเป็นที่รักษาสมดุลของแคลเซียม โกรทแฟคเตอร์ และ ไซโตไคน์ต่างๆในร่างกาย

องค์ประกอบของกระดูก (bone component)

ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ

1. ส่วนกระดูกทึบ (cortical bone) เป็นส่วนที่แข็งและอยู่รอบๆไขกระดูก ประกอบด้วยเยื่อหุ้มกระดูก 2 ชั้น ได้แก่

-ชั้นนอก เรียกว่า periosteal surface เป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (fibrous connective tissue) ประกอบด้วยหลอดเลือด เส้นประสาท เซลล์ออสติโอเบลาสต์ (osteoblast) เซลล์ออสติโอคลาสต์ (osteoclast)

-ชั้นด้านใน เรียกว่า endosteal surface เป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันด้านใน ประกอบด้วย กระดูกฟองน้ำ (cancellous bone) มีช่องเชื่อมต่อกกระดูกที่เรียกว่า Volkman's canals

กระดูกทึบของมนุษย์ มีรูพรุน ประมาณน้อยกว่า 5% ขึ้นอยู่กับการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของกระดูก (bone remodeling)

2. ส่วนกระดูกโปร่ง (trabecular bone) เป็นร่างแหของกระดูก อยู่ในส่วนของไขกระดูก มีรูพรุนประมาณ 30-90% ขึ้นอยู่กับตำแหน่งของกระดูก แต่ละรูพรุนมีทางเชื่อมต่อกัน โดยรูพรุนมีขนาดตั้งแต่ระดับนาโนไปจนถึงมาโครสเกล

ซึ่งขนาดของรูพรุนมีผลต่อการไหลเวียนของของเหลว (fluid circulation) การเกาะกลุ่มของเนื้อเยื่อเซลล์กระดูก (bone cell colonization) การเจริญเติบโตของเซลล์ (cell growth) การสร้างเส้นเลือดใหม่ (neovascularization)

ลักษณะกายวิภาคของกระดูก (physiology of bone formation)

กระดูกประกอบด้วยเซลล์หลักๆ คือ เซลล์ออสติโอบลาสต์ (osteoblast) เซลล์ออสติโอไซต์ (osteocyte) เซลล์ออสติโอคลาสต์ (osteoclast) คอลลาเจน (collagen) ออสติออยด์ (osteoid) ซึ่งจะมีสารอนินทรีย์มาสะสมและกลายเป็นเนื้อกระดูก⁽¹²⁾

เนื้อกระดูก (bone matrix) ประกอบด้วยส่วนสำคัญ 3 ส่วน คือ

1. สารอนินทรีย์ (inorganic) สัดส่วน 69% โดยมีไฮดรอกซีอะพาไทท์ (hydroxyapatite) เป็นองค์ประกอบอยู่ 99%
2. สารอินทรีย์ (organic) สัดส่วน 22% โดยมีคอลลาเจน (collagen) 90% ซึ่งโดยส่วนใหญ่เป็นคอลลาเจน ชนิดที่ 1 90-95% ที่สร้างโดยเซลล์ออสติโอบลาสต์
3. น้ำ 5-8% และองค์ประกอบอื่นซึ่งส่วนใหญ่ประกอบด้วย ออสทีโอแคลซิน (osteocalcin) โปรตีโอไกลแคน (proteoglycan) ไสอะโลโปรตีน (sialoprotein) ฟอสโฟโปรตีน (phosphoprotein) ไกลโคโปรตีน (glycoprotein) โดยส่วนที่ทำงานเกี่ยวข้องกับการทำหน้าที่กระดูก เช่น โกรทแฟคเตอร์ (growth factors) ไซโตไคน์ (cytokine) ออสทีโอแคลซิน (osteocalcin) โปรตีโอไกลแคน (proteoglycan)⁽¹²⁾

เซลล์กระดูก (bone cell) ประกอบด้วย

1. เซลล์ออสติโอบลาสต์ (osteoblast): มาจากเซลล์ชนิดมีเซนไคม์ (mesenchymal cells) ซึ่งเป็นเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์กระดูก (osteoprogenitor cells) ที่อยู่ในไขกระดูก เซลล์ออสติโอบลาสต์เป็นเซลล์ที่มี 1 นิวเคลียส (mononucleated) มักจะอยู่ตามขอบของเนื้อกระดูก และสร้างโปรตีนที่เรียกว่า ออสติออยด์ (osteoid) ซึ่งเป็น โปรตีนเมทริกซ์ (protein Matrix) ที่ยังไม่มีการสะสมเกลือแร่ มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นคอลลาเจน
2. เซลล์ออสติโอไซต์ (osteocyte): เป็นเซลล์ที่เจริญต่อมาจากออสติโอบลาสต์ที่ได้สร้างเนื้อกระดูกจนล้อมรอบตัวเซลล์ และเป็นเซลล์กระดูกที่เจริญเต็มที่แล้ว รอบๆเซลล์จะเป็นช่องที่เรียกว่า ลากูนา (lacuna) และแต่ละลากูนาจะติดต่อกันด้วยช่องทางผ่านเล็กๆที่เรียกว่า คานาลิคูล (canaliculi) ซึ่งทำให้แต่ละออสติโอไซต์มีการติดต่อสื่อสารกันได้ ออกซิเจนและสารอาหารก็จะถูกส่งจากหลอดเลือดภายในช่องฮาเวอร์เซียน (Haversian canal) เข้ามายังแต่ละเซลล์ผ่านทางช่องดังกล่าว

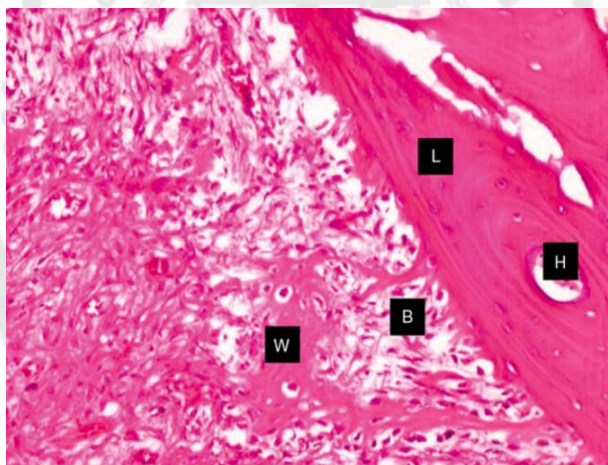
3. เซลล์ออสติโอคลาสต์ (osteoclast) : เป็นเซลล์ขนาดใหญ่ที่มีหลายนิวเคลียส (multinucleated) และเจริญมาจากเซลล์ต้นกำเนิดโมโนไซต์ (mononuclear monocyte macrophage precursor cells) ในไขกระดูก เซลล์นี้มีหน้าที่สำคัญในกระบวนการก่อรูปกระดูก (bone remodeling) โดยอาศัยการผลิตเอนไซม์แอซิด ฟอสฟาเทส (acid phosphatase) ในการกร่อนเนื้อกระดูก และทำให้กระดูกมีลักษณะที่เหมาะสม นอกจากนี้ กระบวนการดังกล่าวยังทำให้มีการนำแคลเซียมออกสู่กระแสเลือดอีกด้วย⁽¹³⁾

การสร้างคอลลาเจนลงในเนื้อกระดูก

แบ่งออกเป็น 2 รูปแบบ

1. Woven bone เป็นกระดูกที่สร้างจากเซลล์ออสติโอบลาสต์ (osteoblast) อย่างรวดเร็ว ทำให้มีการจัดเรียงคอลลาเจนไฟเบอร์ไม่เป็นระเบียบ

2. Lamellar bone เป็นการจัดเรียงคอลลาเจนแบบเป็นระเบียบ อาจเกิดขึ้นจากกระบวนการก่อรูปกระดูก (bone remodeling) ของ Woven bone⁽¹⁴⁾



ภาพประกอบ 2 ลักษณะการจัดเรียงคอลลาเจนในเนื้อกระดูก Woven bone/immature bone(W)
osteoblasts(B) lamellar bone(L) Haversian canal(H)

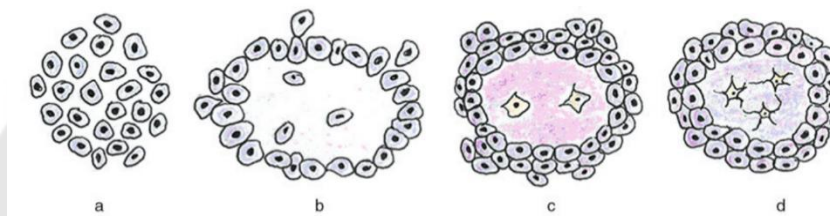
ที่มา: Kini U, Nandeesh BN. Physiology of Bone Formation, Remodeling, and Metabolism. Radionuclide and Hybrid Bone Imaging 2012. p. 29-57.

กระบวนการสร้างกระดูก (Ossification)

มี 2 วิธี

1. Intramembranous ossification

เป็นการสร้างเนื้อกระดูก (a)จากการรวมตัวของกลุ่มเซลล์ชนิดมีเซนไคม์ (mesenchymal cells) (b)มีการสร้างสารออสติอาน (amorphous ground substance) คอลลาเจนบริเวณกลางเซลล์และระหว่างเซลล์ (c)เซลล์มีเซนไคม์ (mesenchymal cells) เจริญไปเป็นเซลล์ออสติโอเบลาสต์ (osteoblast) มีการผลิตออสติอยด์ (osteoid) และ(d)เกิดการสะสมแร่ธาตุกลายเป็นออสติโอไซต์ (osteocyte) พบการสร้างกระดูกแบบนี้ใน กระโหลกศีรษะ (flat bone of skull) ขากรรไกรล่าง (mandible) ขากรรไกรบน (maxilla) กระดูกไหปลาร้า (clavicles) กระดูกแตกหักแบบเปิด (compound fractures) ที่รักษาโดยการผ่าตัดแบบเปิด (open reduction)



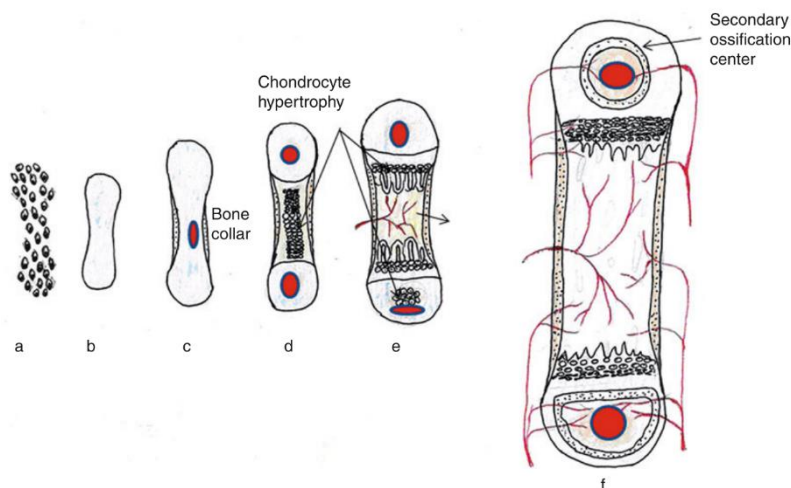
ภาพประกอบ 3 กระบวนการสร้างกระดูกแบบ Intramembranous ossification

ที่มา: Kini U, Nandeesh BN. Physiology of Bone Formation, Remodeling, and Metabolism. Radionuclide and Hybrid Bone Imaging 2012. p. 29-57.

2. Endochondral ossification

เป็นการสร้างเนื้อกระดูกที่มีแบบมาจากกระดูกอ่อน (cartilage) ที่มีการเจริญมาก่อนแล้ว โดยที่ กลุ่มเซลล์มีเซนไคม์(a) จะเข้าไปแทนที่เซลล์กระดูกอ่อน(b)ผ่านทางหลอดเลือด เริ่มจากส่วนกลางของกระดูกซึ่งเป็นจุดการสร้างกระดูกปฐมภูมิ (primary ossification center)(c) เมื่อเซลล์มีเซนไคม์ (mesenchymal cells) มีการพัฒนาไปเป็นเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์กระดูก (osteoprogenitor cells) จึงมีการสะสมของเนื้อกระดูกมากขึ้น พบในการพัฒนาของทารกในครรภ์ (fetal) ตำแหน่ง diaphysis นอกจากนี้ มักพบว่าจะมีจุดการสร้างกระดูกแบบทุติยภูมิ (secondary ossification center)(d) ที่บริเวณปลายกระดูก epiphysis(e) โดยการสร้างกระดูกในจุดนี้จะเริ่มหลังจากคลอด การสร้างกระดูกในทั้งสองจุดจะดำเนินต่อไปจนกระทั่งมาบรรจบกัน

ที่แนวแผ่นอีพิไฟเซียล (epiphysial plate)(f) ซึ่งเป็นแนวของกระดูกอ่อนที่ยังสามารถทำให้เกิดการยืดของกระดูกได้ จนกระทั่งเข้าสู่วัยผู้ใหญ่ แนวดังกล่าวนี้จะถูกแทนที่ด้วยกระดูกทั้งหมด พบการสร้างกระดูกแบบนี้ในกระดูกยาว เช่น กระดูกแขน ขา การหายของกระดูกในกรณีทำการจำกัดการเคลื่อนไหวกระดูก (immobilizations)⁽¹⁵⁾



ภาพประกอบ 4 กระบวนการสร้างกระดูกแบบ Endochondral ossification

ที่มา: Kini U, Nandeesh BN. Physiology of Bone Formation, Remodeling, and Metabolism. Radionuclide and Hybrid Bone Imaging 2012. p. 29-57.

กระบวนการหายของบาดแผลในกระดูก (bone fracture healing)

หลังจากเกิดบาดแผลที่กระดูก การซ่อมสร้างกระดูกมักจะเกิดขึ้นใน 2 ลักษณะ คือ การหายของกระดูกทางตรง (direct fracture healing) ต้องอาศัยการยึดตรึงจากภายนอก หรือ ผ่าตัดเพื่อจัดเรียงกระดูกและยึดให้ใหม่ และการหายของกระดูกทางอ้อม (indirect fracture healing) ซึ่งเป็นการซ่อมสร้างที่เกิดขึ้นเป็นส่วนใหญ่ การซ่อมสร้างกระดูกประกอบด้วยการสร้างกระดูกแบบ intramembranous ossification และการสร้างกระดูกแบบ endochondral ossification

กระดูกขากรรไกรนั้นถือเป็นเนื้อเยื่อกระดูกที่มีลักษณะโดดเด่น คือมีการปรับรูปร่างกระดูกที่รวดเร็วและต่อเนื่องเพื่อตอบสนองต่อแรงบิดเคี้ยว แรงจากการกลืนที่มากระทำตลอดเวลา ในภาวะที่ไม่มีสิ่งกระตุ้น กระดูกขากรรไกรจะเข้าสู่กระบวนการละลายตัว และเซลล์ที่อยู่โดยรอบกระดูกขากรรไกรมีความแตกต่างจากกระดูกในบริเวณอื่น ส่งผลต่อการหายของบาดแผล

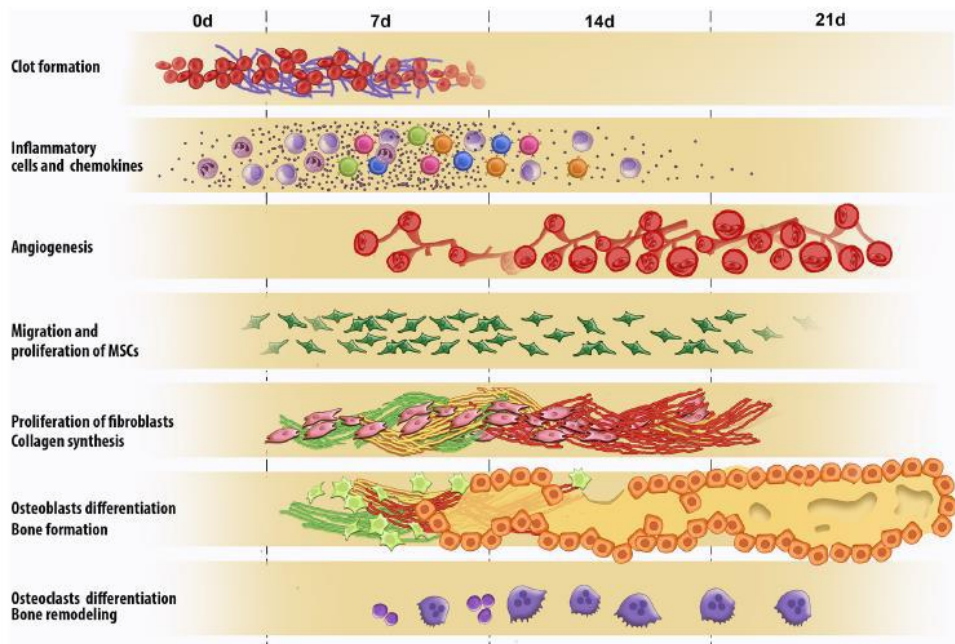
ในขากรรไกรซึ่งจะเกิดขึ้นโดยไม่มีการสร้างกระดูกอ่อนร่วมด้วย นอกจากนี้การเกิดกระดูกหักบริเวณอื่น ๆ มักอยู่ในภาวะที่ปลอดภัย แต่กระดูกขากรรไกรนั้นแวดล้อมด้วยเนื้อเยื่อในช่องปากที่มีเชื้อโรคต่างๆมากมาย ซึ่งส่งผลต่อการเกิดการหายของแผลที่ไม่ดีได้⁽¹⁶⁾

กระบวนการหายของแผลถอนฟัน

เริ่มต้นจากการเกิดลิ่มเลือดแข็งตัว โดยเกร็ดเลือดจะเป็นตัวนำพา โกรทแฟคเตอร์ชนิดต่างๆเข้ามา จากนั้นเกิดการละลายของลิ่มเลือดและแทนที่ด้วยเนื้อเยื่อแกรนูเลชัน ซึ่งประกอบด้วยเซลล์อักเสบ เซลล์สร้างเส้นใย (fibroblasts) เซลล์เอ็นโดทีเรียล (endothelial cells) จำนวนมาก

ในช่วงแรกของกระบวนการหายของบาดแผลในกระดูกจะสามารถพบเหตุการณ์ดังนี้

1. มีการกระตุ้นจากโกรทแฟคเตอร์ชนิดต่างๆ เช่น
 - 1.1 Vitronectin (VTN) และ ITGA4 ช่วยกระตุ้นให้เซลล์เกิดการเคลื่อนที่ ยึดเกาะ และกระจายตัว
 - 1.2 TGF- β 1 และ FGF-2 กระตุ้นเซลล์สร้างเส้นใยให้เกิดการแบ่งตัว และสร้าง โปรตีนในเนื้อเยื่อแกรนูเลชัน
2. ตรวจพบตัวชี้วัดกระดูก (bone marker) ในเมทริกซ์นอกเซลล์ เช่น COL1A1, COL1A2
3. พบการแสดงออกของ matrix remodeling enzymes เช่น MMPs ช่วยในการเคลื่อน ย้ายเซลล์อักเสบ สลาย และปรับรูปร่างของโปรตีนในเมทริกซ์นอกเซลล์
4. มีการแสดงออกของไซโตไคน์ที่เป็นสารก่อการอักเสบ (pro-inflammatory cytokine) ชนิด TNF α ซึ่งมีปริมาณสูงสุดในวันที่ 7 หลังจากถอนฟัน เป็นปัจจัยสำคัญที่ช่วยกระตุ้นให้เกิดการเคลื่อนย้ายเซลล์อักเสบ ทำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวสามารถเข้ามาใน เนื้อเยื่อแกรนูเลชันได้ นอกจากนี้ยังพบการแสดงออก IL-10 ซึ่งต่อต้านกระบวนการ อักเสบ ทำงานตรงกันข้ามกับ TNF- α ทำให้เกิดสมดุลไซโตไคน์ในการควบคุมการ อักเสบขึ้น
5. กระบวนการสร้างเส้นเลือด โดยการแสดงออกของ VEGF-A ซึ่งเป็นปัจจัยที่มีบทบาท สำคัญในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์เอ็นโดทีเรียล



ภาพประกอบ 5 แสดงกระบวนการหายของแผลถอนฟัน

ที่มา: Vieira AE, Repeke CE, Ferreira Junior Sde B, Colavite PM, Bigueti CC, Oliveira RC, et al. Intramembranous bone healing process subsequent to tooth extraction in mice: micro-computed tomography, histomorphometric and molecular characterization. PLoS One. 2015;10(5):e0128021.

หลังจากนั้นกระบวนการอักเสบที่เกิดขึ้นจะลดลงโดยการแทนที่เนื้อเยื่อแกรนูเลชันด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่เจริญเต็มที่แล้ว (mature connective tissue) โดยลักษณะที่สำคัญที่พบได้คือมีการทำงานของเซลล์สร้างเส้นใยในการสังเคราะห์เมทริกซ์นอกเซลล์มากขึ้น ส่งผลต่อการมีเส้นใยคอลลาเจนปริมาณมากร่วมกับมีความหนาแน่นของเส้นเลือดมากขึ้นด้วย ในช่วงวันที่ 7-14 พบว่าเซลล์สร้างเส้นใยมีปริมาณลดลงในขณะที่ปริมาณเซลล์สร้างกระดูกยังคงเดิม⁽¹³⁾

ในขณะที่กระบวนการสร้างกระดูกเริ่มขึ้นในช่วงวันที่ 7 จะสามารถพบการแสดงออกของ โกรทแฟคเตอร์ในกลุ่ม BMPs เช่น BMP-2, BMP-4 และ BMP-7 สูงที่สุด ซึ่งโกรทแฟคเตอร์เหล่านี้มีความสำคัญกับการเปลี่ยนแปลงไปของเซลล์สร้างกระดูกทั้งในช่วงเวลาปกติและช่วงเวลาที่กระดูกมีการซ่อมแซมจากการบาดเจ็บ และยังเป็นตัวเริ่มต้นในการกระตุ้นให้เกิดการพัฒนาการสะสมแร่ธาตุในเนื้อเยื่อกระดูกอีกด้วย กระดูกที่สร้างใหม่จะเริ่มสร้างจากผนังของกระดูกเบ้าฟันค่อยๆ สร้างจนเต็มเต็มกระดูกเบ้าฟันและมีการเรียงตัวกันที่หนาแน่นจนเสร็จสิ้นกระบวนการ

ในช่วงวันที่ 21 เมื่อกระบวนการซ่อมสร้างกระดูกในแผลถอนฟันเสร็จสิ้นแล้ว จะเกิดกระบวนการปรับรูปร่างกระดูกตามมาโดยเป็นการทำงานร่วมกันระหว่างเซลล์สร้างกระดูกและเซลล์สลายกระดูกเพื่อเสริมสร้างความแข็งแรงต่อไป⁽¹⁴⁾

โมเลกุลตัวชี้วัดที่บ่งบอกกระบวนการสร้างกระดูก (Markers of Bone Formation)

1. Alkaline Phosphatase (ALP)

สามารถพบได้ทั่วไปใน กระดูก ตับ ลำไส้ เอนไซม์ในระบบหมุนเวียนเลือดมีค่าครึ่งชีวิต 1-3 วัน Alkaline Phosphatase เป็นเอนไซม์ภายนอกที่จับกับพื้นผิวของ osteoblast cells, fibroblast, odontoblast ดังนั้นจึงสามารถบ่งบอกถึงเมตาบอลิซึมในเซลล์กระดูกได้แต่ไม่เฉพาะเจาะจง โดยในเซลล์กระดูกมักพบมากในระยะ osteoblast differentiation ที่มีการหลั่ง extracellular matrix

2. Osteocalcin

เป็น calcium binding protein ที่ไม่ใช่คอลลาเจน ถูกสร้างจากเซลล์สร้างกระดูก และถูกควบคุมโดย 1,25-dihydroxyvitamin D และ vitamin K โดยกระบวนการ carboxylation ที่ glutamic acid มีความจำเพาะต่อ mature osteoblast cells ในขั้นตอนการสะสมแร่ธาตุ (mineralization) และ extracellular matrix remodeling ของกระดูก จึงมีความสำคัญต่อการเกิด calcium deposition

3. Procollagen Peptides

โปรตีนคอลลาเจนเป็นโครงสร้างหลัก 90% ของสารอินทรีย์เมทริกซ์ในกระดูก ดังนั้นคอลลาเจนจึงเป็นโครงสร้างความแข็งแรงหลักของเมทริกซ์กระดูก บ่งบอกถึงความสามารถในการเจริญเติบโตของเซลล์กระดูก โดยในเซลล์กระดูก 90% มักพบ collagen type I⁽¹⁷⁾

วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissues engineering)

วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue engineering) ถูกสร้างขึ้นมาเพื่อให้ทดแทนเนื้อเยื่อต่างๆ เช่น บริเวณที่เกิดพยาธิสภาพของกระดูก เกิดเนื้องอก ถุงน้ำ จนไม่สามารถฟื้นฟูสภาพกระดูกให้หายได้ด้วยตนเอง จึงจำเป็นต้องได้รับการรักษาซ่อมแซมด้วยการเสริมวัสดุทดแทน

วิศวกรรมเนื้อเยื่อ มี 3 องค์ประกอบหลัก ได้แก่

1. Biomaterial scaffold โครงร่างค้ำยันทางชีวภาพ
2. Stem cells เซลล์ต้นกำเนิด
3. Signaling molecules โมเลกุลส่งสัญญาณ

1. Biomaterial scaffold

โครงร่างค้ำยันทางชีวภาพ ควรมีคุณสมบัติ สามารถใช้งานได้ง่าย รูปทรงภายในโครงร่างค้ำยันมีขนาด รูปร่างเหมาะสมแก่การแทรกซึม ยึดเกาะของเซลล์ โกรธแฟคเตอร์ สารอาหาร การเจริญเติบโต การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ สามารถกำจัดของเสียออกจากเซลล์ มีการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันต่ำ (low immunogenicity) สามารถสลายได้โดยไม่เป็นพิษ (biodegradability) เชื้อต่อการแทรกซึมของหลอดเลือด มีคุณสมบัติทางกายภาพที่ดี โดยลักษณะของโครงร่างค้ำยันมีทั้งแบบแข็ง (rigid) และแบบนิ่ม (soft) ผลิตจากสารธรรมชาติหรือสังเคราะห์ มีหลากหลายขนาด รูปร่างขึ้นกับตำแหน่งที่นำไปทดแทนและสภาวะที่ใส่

2. Stem cell

เซลล์ต้นกำเนิดที่ใช้ทางทันตกรรม ขึ้นอยู่กับตำแหน่งเนื้อเยื่อเป้าหมายที่ต้องการปลูกทดแทน

2.1 เซลล์ต้นกำเนิดจากฟันและอวัยวะปริทันต์ (dental and periodontal origin) เช่น Mesenchyme origin: จากโพรงประสาทฟันแท้ (adult dental pulp stem cells, DPSC) จากฟันน้ำนมที่ถูกถอน (deciduous teeth exfoliated teeth, SHED) จากปลายรากฟัน (stem cell from apical papilla, SCAP) จากหน่อฟัน (dental follicle stem cells, DFSC) จากเส้นใยปริทันต์รอบรากฟัน (periodontal ligament stem cells, PDLSC)

2.2 เซลล์ต้นกำเนิดไม่ได้มาจากฟัน (nondental origin): ใช้เซลล์ต้นกำเนิดปลูกถ่ายในตำแหน่งไม่มีฟัน เช่น มาจากไขกระดูก (bone marrow), เนื้อเยื่อไขมัน (adipose tissue)

3. Signaling molecules

โกรธแฟคเตอร์เป็นโมเลกุลส่งสัญญาณที่สร้างมาจากเซลล์ โดยควบคุมการตอบสนองของเซลล์เป้าหมายผ่านทาง Receptors ที่ผิวเซลล์ มักเป็นตัวเลือกที่ใช้เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโต มีหลายชนิด เช่น ไฟโบรบลาสต์โกรธแฟคเตอร์ 2,9 (FGFs 2,9) ทรานส์ฟอมมิ่งโกรธแฟคเตอร์ β 1 (TGF- β 1), วาสคูลาร์เอนโดทีเรียลโกรธแฟคเตอร์ (VEGFs), bone morphologic proteins (BMPs)⁽¹⁵⁾ เป็นต้น

โดยโกรธแฟคเตอร์ที่สำคัญต่อการสร้างกระดูก คือ bone morphologic protein (BMP) อยู่ในตระกูล ทรานส์ฟอมมิ่งโกรธแฟคเตอร์ β (TGF- β) มีคุณสมบัติเด่นด้านการกระตุ้นการสร้าง การเจริญเติบโตของเซลล์กระดูกและการสร้างเมทริกซ์นอกเซลล์ มีการนำมาใช้ทางคลินิกช่วยกระบวนการหายของกระดูกแบบไม่เป็นระเบียบ (non-union fracture) เช่น แผลถอนฟัน การเชื่อมข้อกระดูกสันหลัง (spinal fusions) ใช้ร่วมกับการฝังรากเทียม (dental implants)⁽¹⁶⁾

ทั้งนี้การเลือกโครงร่างค้ำยัน (scaffold) และโมเลกุลส่งสัญญาณ (signaling molecules) ในการควบคุมการแสดงออกของเซลล์ต้นกำเนิด (stem cells) มีความสำคัญทำให้เกิดข้อดีหรือข้อเสียต่อเซลล์เป้าหมายได้

Bone graft (เนื้อเยื่อปลูกถ่ายกระดูก)

Bone graft เป็นเนื้อเยื่อปลูกถ่ายกระดูก เพื่อทดแทนปริมาณกระดูกที่หายไป ในการฝังรากฟันเทียมการปลูกกระดูกช่วยให้รากฟันเทียมมีเสถียรภาพมากขึ้น

เนื้อเยื่อกระดูกตนเอง (autograft) เป็นเนื้อเยื่อปลูกถ่ายตัวเลือกแรกที่เหมาะสม เนื่องจากเป็นกระดูกของผู้ป่วยเอง จึงเข้ากับเนื้อเยื่อในร่างกายได้ ไม่ก่อให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อต้าน และไม่นำพาเชื้อโรค ข้อดีที่สำคัญคือ สามารถสร้างเนื้อเยื่อกระดูกขึ้นได้เอง (osteogenic) มีคุณสมบัติเหนี่ยวนำการสร้างกระดูก (osteoinductive) และเป็นโครงร่างยึดเกาะของเนื้อเยื่อกระดูก (osteoconductive) แต่มีข้อเสียคือ ต้องผ่าตัดในตำแหน่งที่สอง ทำให้ผู้ป่วยมีบาดแผลเพิ่ม ใช้เวลาผ่าตัดนานขึ้น มีโอกาสเกิดการติดเชื้อจากแผลผ่าตัด โดยเฉพาะผู้ป่วยส่วนใหญ่นั้นต้องการปริมาณกระดูกทดแทนมักเป็นผู้สูงอายุอาจเกิดภาวะแทรกซ้อนได้ง่ายจากแผลผ่าตัดตำแหน่งที่ตัดกระดูกออกไป

เนื้อเยื่อปลูกถ่ายเอกพันธุ์ (allograft) เป็นเนื้อเยื่อปลูกถ่ายที่นิยมใช้เป็นอันดับที่สอง นำมาจากเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตสปีชีส์เดียวกัน มีคุณสมบัติเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างกระดูก (osteoinductive) และเป็นโครงร่างยึดเกาะของเนื้อเยื่อกระดูก (osteoconductive) แต่ไวรัสชนิดนี้อาจก่อให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อต้านสิ่งแปลกปลอมของผู้รับ และมีโอกาสเป็นพาหะของเชื้อโรคได้

ด้วยข้อจำกัดเหล่านี้จึงเกิดการพัฒนาวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (tissue engineering) โดยมีคุณสมบัติหลักเป็นโครงร่างยึดเกาะของเนื้อเยื่อกระดูก (osteoconductive) แต่คุณสมบัติของเนื้อเยื่อปลูกถ่ายกระดูกที่ดี ควรมีคุณสมบัติเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างกระดูกด้วย (osteoinductive) ซึ่งจากการศึกษาพบว่า ไวรัสจากใบยาสูบ (Tobacco Mosaic Virus) มีคุณสมบัติเด่นทางด้านนี้^(3, 15, 16)

ไวรัส (Virus)

ไวรัสเป็นสิ่งมีชีวิตที่เล็กที่สุดในโลก การดำรงชีวิตของมันต้องพึ่งพาอาศัยอยู่ภายในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงกว่ามัน โดยที่มันไม่สามารถที่จะแพร่พันธุ์ภายนอกตัวของสิ่งมีชีวิตที่มันอาศัยอยู่ได้ ไวรัสมีรากศัพท์มาจากภาษาละติน ซึ่งมีความหมายว่า “เป็นพิษ” (poison/toxic) เนื่องจากไวรัสเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีขนาดเล็กมาก ที่ก่อโรคในมนุษย์ และเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ทั้งที่เป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม สัตว์ปีก แมลง พืช หรือแม้แต่แบคทีเรีย

มนุษย์เริ่มศึกษาเรียนรู้เกี่ยวกับไวรัสเบื้องต้นในช่วงปี 1886-1892 ที่มีการค้นพบไวรัสใบด่างในยาสูบ (Tobacco Mosaic Virus, TMV) ซึ่งนับได้ว่าเป็นไวรัสชนิดแรกที่มนุษย์เราสังเกตเห็น หลังจากนั้นมีการศึกษาอีกมากมาย และพบไวรัสชนิดแรกที่ทำให้แบคทีเรียตายในปี 1917 เรียกไวรัสกลุ่มนี้ว่าฟาจ (Phage หรือ Bacteriophage) ในปี ค.ศ. 1935 Wendell M. Stanley นักเคมีชาวอเมริกัน สามารถแยกเชื้อ Tobacco Mosaic Virus ได้เป็นครั้งแรก และเป็นครั้งแรกที่มนุษย์เราสามารถศึกษาโครงสร้างทางเคมีของไวรัสได้ นักวิทยาศาสตร์ต่างให้ความสนใจกับไวรัสมากขึ้นจนเกิดเป็นสาขาวิชา ไวรัสวิทยา (Virology) ขึ้น

ไวรัสเป็นสิ่งมีชีวิตที่แตกต่างจากสิ่งมีชีวิตอื่นทั่วไปตรงที่ไวรัสไม่มีส่วนที่เป็นเยื่อหุ้มเซลล์ของตัวเอง ไม่มีเมตาบอลิซึมเมื่ออยู่นอกเซลล์เจ้าบ้าน ไวรัสจัดเป็นปรสิตภายในเซลล์อย่างแท้จริง (Obligatory intracellular parasite) จึงจำเป็นต้องอาศัยเซลล์เจ้าบ้านในการดำรงเผ่าพันธุ์ การสืบพันธุ์เพิ่มจำนวนไวรัสเกิดขึ้นภายในเซลล์ที่มีชีวิตเสมอ และยังสามารถถ่ายทอดสารพันธุกรรมไปยังเซลล์อื่น ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ไวรัสยังสามารถควบคุมกลไกของเซลล์เจ้าบ้านให้ทำการสร้างส่วนประกอบของไวรัสใหม่ได้ ดังนั้นการมีชีวิตของไวรัสจึงเป็นเพียง “อนุภาคที่มีชีวิต” (Living particle หรือ Virion) เท่านั้น ความแตกต่างจากสิ่งมีชีวิตอื่นอีกประการของไวรัสคือ ในการจัดจำแนกไวรัสโดย International Committee on Taxonomy of Virus (ICTV) จะแบ่งไวรัสเป็นเพียง 1 order 71 families 11 subfamilies 164 genera นอกจากนี้นักไวรัสวิทยาส่วนใหญ่จะเรียกชื่อไวรัสตามสิ่งมีชีวิตเจ้าบ้านหรือลักษณะของโรคมากกว่าจะเรียกเป็นชื่อวิทยาศาสตร์ตามหลัก Binomial อย่างสิ่งมีชีวิตอื่น^(18, 19)

ลักษณะทั่วไปของไวรัส

ไวรัสจัดเป็นจุลชีพขนาดเล็ก 20 - 400 นาโนเมตร อนุภาคไวรัสที่สมบูรณ์เรียกว่า virion

ส่วนประกอบของไวรัส

1. ส่วนที่ทำหน้าที่เป็นสารพันธุกรรมหรือจีโนม (genome) อาจอยู่ในสภาพที่เป็นวงแหวนหรือเส้นตรง อาจมีขนาดใหญ่เพียง 1 ชิ้น หรือมีลักษณะเป็นท่อน ๆ หลายชิ้น

นอกจากความแตกต่างในรูปร่างของจีโนม ยังมีความแตกต่างในระดับองค์ประกอบของจีโนมด้วย จีโนมของไวรัสบางชนิดมีลักษณะเป็น DNA สายคู่ (double strand DNA) บางชนิดเป็น DNA สายเดี่ยว (single stranded DNA) บางชนิดเป็น RNA สายคู่ (double strand RNA) และบางชนิดเป็น RNA สายเดี่ยว (single stranded RNA)

2. ส่วนที่ทำหน้าที่เป็นโปรตีนห่อหุ้ม (Protein coat หรือ Capsid) ซึ่งมีลักษณะเป็นก้อนโปรตีนที่มีลักษณะแบบเดียวกันหลาย ๆ ก้อนมาประกอบกัน แต่ละก้อนโปรตีนประกอบขึ้นจากสายโพลีเปปไทด์ที่ขดพับจนดูคล้ายเป็นก้อน แต่ละก้อนเรียกว่า แคปไซเมอร์ (Capsomere) แคปไซเมอร์ไม่ได้ทำหน้าที่เพียงเป็นโปรตีนห่อหุ้มเท่านั้น แต่ยังทำหน้าที่เป็นส่วนยึดเกาะของสารพันธุกรรมอีกด้วย

3. ส่วนประกอบอื่น ๆ ได้แก่ ไขมัน (lipid) และคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) รวมถึงโปรตีนอื่น ๆ ที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ต่าง ๆ ซึ่งมีมาตั้งแต่ตอนที่ไวรัสประกอบตัวใหม่ในเซลล์เจ้าบ้าน ไขมันที่พบในไวรัสเป็นสารพวกฟอสโฟลิพิด (phospholipid) ไกลโคลิพิด (glycolipid) และโคเลสเตอรอล (cholesterol) ซึ่งโดยทั่วไปมีลักษณะแบบเดียวกับเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เจ้าบ้าน สำหรับคาร์โบไฮเดรตนอกจากจะพบว่าเป็นส่วนหนึ่งในกรดนิวคลีอิก (น้ำตาลไรโบสหรือน้ำตาลดีออกซีไรโบส) ยังพบคาร์โบไฮเดรตในรูปไกลโคโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นแอนติเจน (antigen) ที่สำคัญของไวรัส

ไวรัสจากพืช (Plant virus)

ลักษณะโดยทั่วไป

- มีโครงสร้าง 3 มิติในระดับนาโนโมเลกุล
- ไม่สามารถก่อให้เกิดโรคหรือเพิ่มจำนวนในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเนื่องจากไวรัสพืชไม่มี receptor ที่จำเพาะกับเซลล์สัตว์
- สามารถสลายตัวได้เองเนื่องจากมีโครงสร้างเป็นโปรตีน ทำให้ไม่เกิดสารตกค้าง (biodegradability)
- ด้วยโครงสร้างที่มีขนาดเล็กระดับนาโนของไวรัส (viral nanoparticles, VNPs) ทำให้ยาหรือสารนำส่งที่นำพามีความคงตัวมากขึ้น มีเภสัชจลศาสตร์ที่ดีขึ้น ความเป็นพิษน้อยลง เนื่องจากยามีขนาดเล็กการกระจายตัวของยาดีขึ้น^(4, 20)

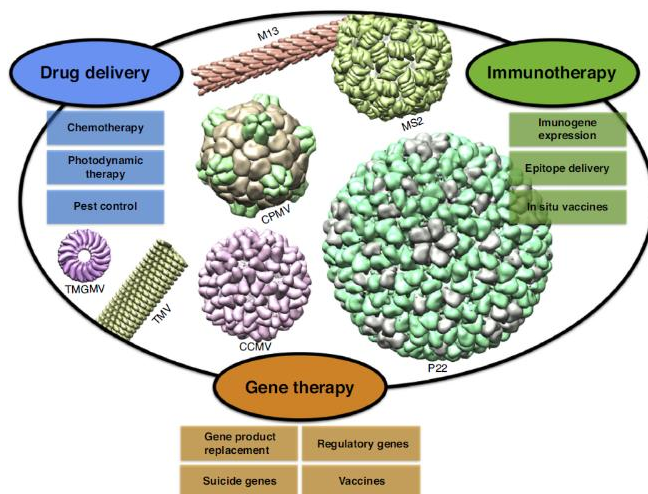
รูปร่างของไวรัสพืช

ไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคพืชแต่ละชนิดย่อมจะมีรูปร่างของอนุภาคตลอดจนขนาดที่แตกต่างกัน สามารถจัดแบ่งประเภทรูปร่างของไวรัสโรคพืชได้ดังต่อไปนี้

1. ไวรัสที่มีรูปร่างเป็นท่อนตรง (Stiff rod) ไวรัสแบบนี้มักมีความกว้างของอนุภาคไม่เกิน 25 nm และความยาว 130-300 nm
2. ไวรัสที่มีรูปร่างเป็นแท่งคด (Flexuous or Filamentous particle) อนุภาคไวรัสแบบนี้มักมีความกว้างไม่เกิน 13 nm และมีความยาวตั้งแต่ 480-2,000 nm
3. ไวรัสที่มีรูปร่างหลายเหลี่ยม (Icosahedron) ไวรัสมีรูปร่างหลายเหลี่ยมที่มีด้าน 20 หน้า ประกอบขึ้นเป็นรูปร่างหลายเหลี่ยม แต่ละหน้าจะมีโปรตีนหน่วยย่อย (Protein subunit) เรียงกันอย่างสม่ำเสมอ มีโพรงแกนกลางของกรดนิวคลีอิก อนุภาคของไวรัสจำพวกนี้มีขนาดอนุภาค 20-80 nm
4. ไวรัสที่มีรูปร่างแบบกระสุนปืน (Bullet-shape) อนุภาคที่มีรูปร่างแบบนี้จะเป็นแท่งตรง หัวท้ายมน ไม่ตัดตรงแบบท่อนตรง (Stiff rod) มักจะมีความกว้างไม่น้อยกว่า 1/3 ของความยาวไวรัส
5. นอกจากนั้นรูปร่างของไวรัสยังขึ้นอยู่กับการไม่มีหรือมี Envelope หุ้มด้วย (Naked virus หรือ non-enveloped virus และ enveloped virus)⁽²¹⁾

ประโยชน์นาโนไวรัสจากพืชและการนำไปประยุกต์ใช้

1. มี capsid protein เป็นองค์ประกอบ ซึ่งมีโครงสร้าง ขนาด รูปร่างเสถียร
2. ไวรัสจากพืชมีความคงตัวสูง มีความปลอดภัย สามารถนำมาใช้เป็นโครงร่างค้ำยัน (Scaffold) ในรูปแบบ 2 มิติ และ 3 มิติได้
3. สามารถพัฒนา ปรับปรุง capsid protein ให้มีคุณสมบัติที่ต้องการทั้งด้านเคมี (chemical conjugation) และพันธุวิศวกรรมได้ (genetic engineering)
4. ประยุกต์ใช้ในทางคลินิก เช่น Photodynamic therapy, Gene deliver, Vaccine development, Drug delivery, Medical imaging เป็นต้น^(2, 5, 22, 23)



ภาพประกอบ 6 ความหลากหลาย ขนาด รูปร่าง พื้นผิวของไวรัสและการนำไปใช้

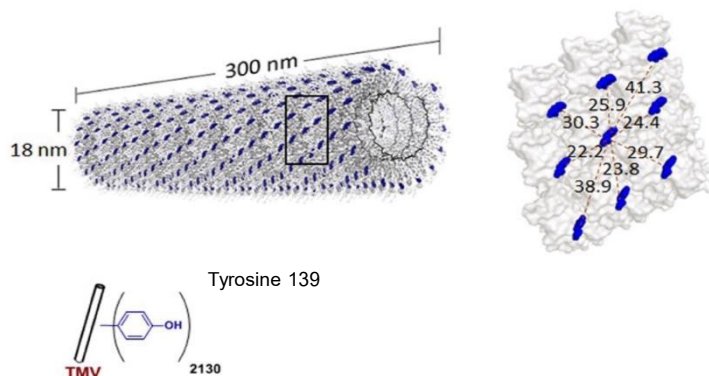
ที่มา: Czapar AE, Steinmetz NF. Plant viruses and bacteriophages for drug delivery in medicine and biotechnology. Current opinion in chemical biology. 2017;38:108-16.

ไวรัสจากใบยาสูบ (Tobacco Mosaic Virus ; TMV)

ลักษณะโครงสร้าง

TMV ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1892 TMV มีรูปร่างเป็นแท่ง (rod like shape) มีความยาว 300 nm เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 18 nm ประกอบด้วย 2,130 protein cuspid ที่มีรูปร่างขด (helical) รอบๆ RNA สายเดี่ยว โดยยึดกันด้วย Hydrophobic reaction Hydrogen bond โดยโปรตีนที่ผิวของ TMV สามารถปรับแต่ง (mutant virus) ให้ได้คุณสมบัติที่ต้องการเพื่อเป็นสารชีววัสดุได้⁽²⁴⁾

ต้นใบยาสูบมีข้อดีคือ สามารถปลูกได้ง่าย มีความทนทาน มีราคาถูกสามารถเพาะเชื้อไวรัสในต้นยาสูบเพียงครั้งเดียวแต่ส่งผลต่อใบยาสูบที่ออกขึ้นใหม่ด้วย (systemic infection)⁽²⁰⁾

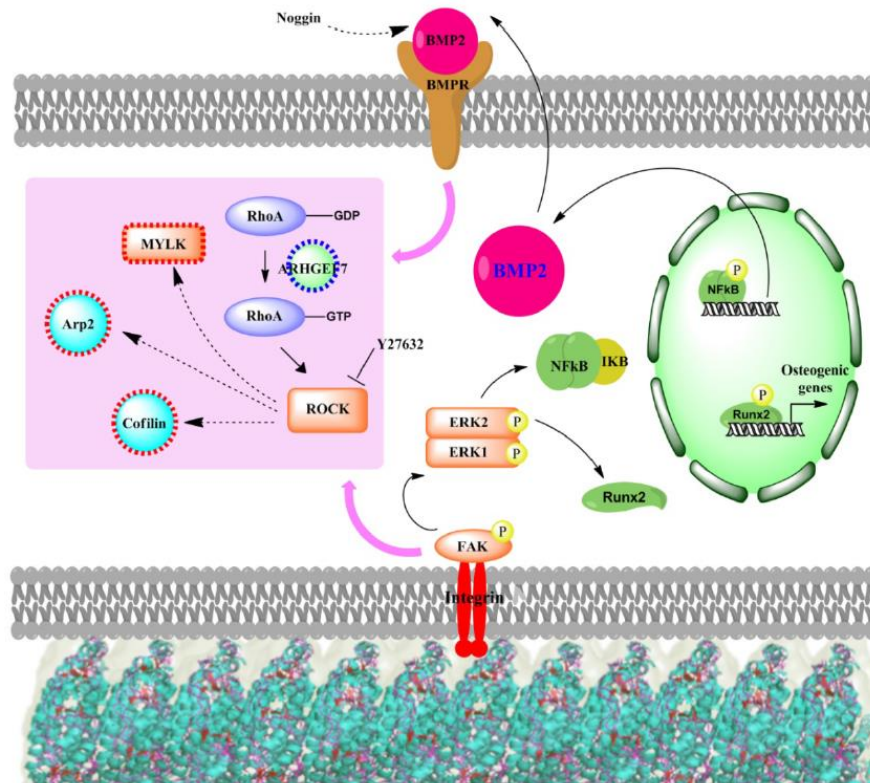


ภาพประกอบ 7 โครงสร้างของไวรัสจากใบยาสูบ (Tobacco Mosaic Virus, TMV)

ที่มา: Sitasuwan P, Lee LA, Li K, Nguyen HG, Wang Q. RGD-conjugated rod-like viral nanoparticles on 2D scaffold improve bone differentiation of mesenchymal stem cells. *Front Chem.* 2014;2:31.

กลไกของนาโนไวรัสจากใบยาสูบต่อกระบวนการกระตุ้นการสร้างกระดูก

พื้นผิวของไวรัสที่ขรุขระ มีผลต่อการจับกันของ FAK (focal adhesion kinase) กับ โปรตีน integrin ที่อยู่ในชั้นผนังเซลล์ (มีหน้าที่จับกับโปรตีน extracellular matrix เช่น collagen, fibronectin, laminin, vitronectin) ผ่านทาง MAPK/ERK pathway (46 mitogen-activated protein kinases/extracellular signal regulated kinase) ซึ่งเป็นโมเลกุลส่งสัญญาณสู่นิวเคลียส โดยเกิดการกระตุ้น ERK1/2 ด้วยการเติมหมู่ฟอสเฟต ส่งผลต่อการผลิต BMP-2 มากขึ้นผ่านทาง Smad pathway นำไปสู่การแสดงออกของยีนส์ที่มีผลต่อการสร้างกระดูกตัวอื่นๆ เช่น Runx2 นอกจากนี้นาโนไวรัสยังมีผลต่อการเกิด actinomyosin contractility ของเซลล์ ซึ่งมีผลต่อการแพร่กระจายตัวของเซลล์ (cell spreading) และการเกิดความเครียด (stress) ในชั้นผนังเซลล์ ส่งผลต่อการเกิด early osteogenesis ผ่านทาง RhoA/ROCK pathway (Rho-associated kinase)



ภาพประกอบ 8 กลไกของนาโนไวรัสต่อกระบวนการกระตุ้นการสร้างกระดูก

ที่มา: Nguyen HG, Metavarayuth K, Wang Q. Upregulation of osteogenesis of mesenchymal stem cells with virus-based thin films. *Nanotheranostics*. 2018;2(1):42-58.

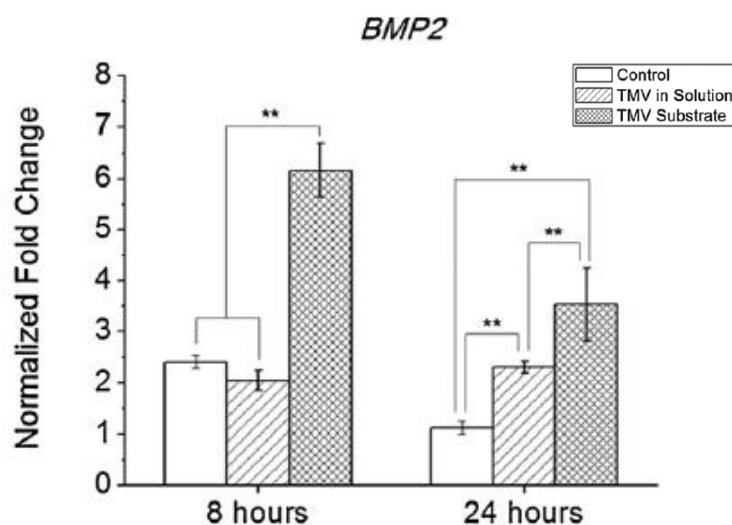
ความเป็นพิษของ TMV (Toxicity)

จากการศึกษาพบว่า 97% ของ TMV particles ถูกกำจัดจากระบบหมุนเวียนเลือดโดย reticuloendothelial system (RES) ในตับและม้าม ด้วยวิธี Phagocyte system จากเซลล์เม็ดเลือดขาว (mononuclear cells) โดยกระบวนการกำจัดจะเกิดภายใน 40 นาที หลังได้รับ TMV 1 µg เข้าทางเส้นเลือดดำในสัตว์ทดลอง⁽⁷⁾

Luckanagul J, และคณะในปี 2014⁽⁷⁾ ถึงความเข้ากันได้ (biocompatibility) ความเป็นพิษ (toxicity) และการละลาย (biodegradability) ของ porous alginate hydrogels scaffolds (PAH) ในรูปแบบ 3 มิติ ที่มีต่อ 0.1% WV TMV และ RGD-PAH (arginine-glycine-aspartic acid) ซึ่งเป็น mutant TMV เมื่อทำการฝังที่หลังของหนูในชั้น subcutaneous pocket พบว่า ที่ 4 สัปดาห์ หลังจากฝัง ผลของ ELISA ในกลุ่มที่ใช้ TMV , RGD-PAH ร่วมกับ hydrogel ไม่พบการตอบสนอง

ของระบบภูมิคุ้มกัน (Anti-TMV IgG) ในซีรัมหนูเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ฉีด native TMV 11 µg/ml (ปริมาณเทียบเท่า TMV 0.1% W/V ใน hydrogel) ในชั้นกล้ามเนื้อโดยตรง โดยพบการปลดปล่อย TMV จาก PAH อย่างช้าๆ ตลอดการคงอยู่ของ hydrogel ซึ่งพบว่า porous alginate hydrogels มีการสลายประมาณ 50% ภายในระยะเวลา 8 สัปดาห์ ในด้าน toxicity จากการตรวจเลือด (CBC) ที่ 2 และ 4 สัปดาห์ กลุ่มทดลอง porous alginate hydrogels ทุกกลุ่ม ไม่พบการอักเสบแบบเรื้อรังและรุนแรง (chronic/major inflammation) และไม่พบความเป็นพิษต่อม้ามซึ่งแสดงได้จากน้ำหนักของม้ามไม่เปลี่ยนแปลง

จากการศึกษาของ Sitasuwan P. และคณะในปี 2012⁽⁸⁾ ศึกษาการกระตุ้นการสร้าง BMP-2 ในเซลล์ต้นกำเนิดการสร้างกระดูก (bone marrow derived mesenchymal stem cells, BMSCs) จากหนูโดยใช้สารละลาย TMV ที่ความเข้มข้น 0.2 mg/ml ในน้ำและเลี้ยงเซลล์ใน osteogenic media ทำการศึกษาบนจานเลี้ยงเซลล์ แบบ 2 มิติ เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ใช้ media ธรรมดา และกลุ่มที่ไม่ได้ใส่ไวรัส พบว่า bone morphologic protein-2 (BMP-2) ที่มีความสำคัญต่อ osteoblast differentiation และ bone formation โดยปกติจะพบมากในช่วง 24 ชั่วโมงแรก โดยจากการศึกษาพบว่า ที่ 8 ชั่วโมง พบค่าการแสดงออกของยีนส์ BMP-2 ขึ้นสูงสุด (peak) ในกลุ่มที่มีไวรัสโดยมีปริมาณมากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ใส่ไวรัส และพบว่า osteogenic media ที่มี dexamethasone มีผลต่อค่า BMP-2 โดยมีค่ามากกว่าการใช้ media ธรรมดาประมาณ 3 เท่า และยังพบ BMP-2 อย่างต่อเนื่องหลัง 24 ชั่วโมง นอกจากนี้จาก การทดสอบ ELISA และ Immunofluorescent assays ยังพบว่า BMP-2 มักพบมากในตำแหน่ง bone cell aggregation โดยเฉพาะกลุ่มที่มีไวรัส เนื่องจากการใส่ TMV มีผลต่อลักษณะพื้นผิว (topographical feature) ทำให้ขรุขระมากขึ้น (roughness) ส่งเสริมการสะสมของโปรตีนเมทริกซ์ระหว่างเซลล์ (extracellular matrix protein) และการเกาะกลุ่มของเซลล์ ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่า TMV มีผลต่อ osteoinduction และเร่งการแสดงออกของ BMP-2 ส่งผลทำให้เกิด early osteoblastic differentiation



ภาพประกอบ 9 การวัดการแสดงออกของยีนส์ BMP-2 ในเซลล์ต้นกำเนิดการสร้างกระดูก (gene expression) ด้วยวิธี RT-qPCR ใน 2 ช่วงเวลา (the error bars denote ± 1 S.D. **and* represent $p < 0.05$ and $p < 0.1$, respectively)

ที่มา: Sitasuwan P, Andrew Lee L, Bo P, Davis EN, Lin Y, Wang Q. A plant virus substrate induces early upregulation of BMP2 for rapid bone formation. Integrative Biology. 2012;4(6):651-60.

นอกจากนี้ ในปี 2015 Metavarayuth K. และคณะ⁽²¹⁾ ได้ศึกษานาโนไวรัสจากพืชชนิดต่างๆ เช่น จากใบยาสูบ จากต้นมันส้มปะหลัง จากต้นเทอร์นิพ ทำการศึกษาบน poly d-lysine (PDL) scaffold แบบ 2 มิติ ร่วมกับเซลล์ต้นกำเนิดการสร้างกระดูกจากหนู (BMSCs) พบว่าพืชทั้งหมดดังกล่าวสามารถเร่งการเกิด osteogenesis ของเซลล์ BMSCs จากหนู โดยพบการเพิ่มขึ้นของ osteogenic marker : BMP-2 ภายในระยะเวลา 6 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกของ gene osteocalcin, osteopontin เพิ่มขึ้น และพบเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกระดูก Alkaline phosphatase activity (ALP) มากในวันที่ 4 และเกิด calcium mineralization ที่เพิ่มขึ้นมากในวันที่ 7 เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้ใส่ไวรัส โดยพบว่านาโนไวรัส มีผลต่อลักษณะพื้นผิวของสาร (topography) ส่งเสริมการเกิด osteogenesis แสดงให้เห็นว่า ไวรัสจากพืชมีคุณสมบัติเป็น osteoinduction

ในปี 2012 Luckanagul J.⁽⁹⁾ และคณะ ได้ปรับปรุงคุณสมบัติของ TMV โดย mutant พื้นผิวของ TMV ในรูปแบบของ RGD-PAH (arginine-glycine-aspartic acid) เพื่อดูผลของ bone differentiation โดยใช้ porous alginate hydrogels scaffolds (PAH) ในรูปแบบ 3 มิติร่วมกับ 0.1% W/V TMV ทำการศึกษาใน BMSCs จากหนูพบว่า ค่า Alkaline phosphatase activity (ALP) เป็นเอนไซม์ที่พบระหว่างกระบวนการสังเคราะห์ extracellular matrix ซึ่งเป็น early osteoblastic marker ในการวัด cell differentiation โดยทั่วไปมักพบได้มากในวันที่ 7 แต่จากการศึกษาพบว่า ในวันที่ 3 กลุ่ม mutant TMV (RGD-PAH) มีค่า ALP มากกว่ากลุ่ม TMV และกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่ไวรัส นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่ม TMV-PAH และ RGD-PAH สามารถวัดค่าการย้อมติดสี Alizarin Red และ วัดค่า osteocalcin จาก immunostaining ซึ่งเป็นค่าจำเพาะของ mature osteoblast ในขั้นตอน calcium deposition ของกระดูก มากกว่ากลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่า TMV และ mutant TMV สามารถเร่งการเกิด bone differentiation และ mineralization ให้เร็วขึ้น

ต่อมาในปี 2016 Luckanagul J. และคณะ⁽²³⁾ ได้นำ 0.1% W/V โดยมีโครงสร้างของ RGD-PAH มาทำการทดลองฝังในกะโหลกศีรษะหนู (in vivo) เปรียบเทียบกับกลุ่ม TMV-PAH และกลุ่ม PAH (กลุ่มควบคุม) พบว่า ที่ 10 สัปดาห์หลังการฝัง เกิด bone regeneration จากการตรวจทาง histopathological analysis พบ bone density ในกลุ่ม RGD-PAH มากกว่ากลุ่ม TMV-PAH และกลุ่ม PAH (กลุ่มควบคุม) ตามลำดับ กลุ่มที่ใส่ไวรัส พบปฏิกิริยาอักเสบ (inflammation) ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ใส่ไวรัสและไม่พบ systemic inflammatory reaction หรือ severe immunogenic adverse effect จากการตรวจเลือด (CBC) และซึ่งน้ำหนักของม้ามที่ไม่เปลี่ยนแปลง แสดงให้เห็นว่า TMV มีความปลอดภัยไม่เกิดพิษต่อสิ่งมีชีวิตเลี้ยงลูกด้วยนมและสามารถนำมาประยุกต์ใช้ร่วมกับไฮโดรเจลในรูปแบบ 3 มิติได้

ในปีเดียวกันนี้ Maturavongsadit P. และคณะ⁽¹⁰⁾ ได้พัฒนาโครงร่างชีวภาพในรูปแบบยาฉีดไฮโดรเจล จากกรดไฮยาลูโรนิก โดยใช้ methacrylic anhydride เกิดเป็น Methacrylated hyaluronic acid (MeHA) และมี crosslinker เป็น dithiotreitol (DTT) (DTT เป็นสารที่มักจะใช้เป็นตัวเชื่อมโพลีเมอร์ที่นิยมนำมาใช้ในการสร้างโครงร่างชีวภาพในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ) ร่วมกับ Cysteine-inserted Tobacco Mosaic Virus (TMV1cys) ซึ่งเป็น mutant TMV เปรียบเทียบกับ MeHA ที่ crosslink ด้วย DTT เพียงอย่างเดียว โดยศึกษาการเหนี่ยวนำการสร้างกระดูกอ่อน (Chondrogenesis) ใน BMSCs จากหนู พบว่าไฮโดรเจล ที่ก่อตัวจาก MeHA-TMV1cys ส่งเสริมการเหนี่ยวนำการสร้างกระดูกอ่อน (Chondrogenesis)

จากการกระตุ้นการสร้าง BMP-2 (early stage chondrogenic marker) และ collagen type II (late stage chondrogenic marker) ได้ดีกว่า ไฮโดรเจล ที่ก่อตัวจาก MeHA-DTT เพียงอย่างเดียว

ในปี 2019 Metavarayuth K. และคณะ⁽²⁵⁾ ได้ศึกษาผลของนาโนไวรัสต่อการกระตุ้นการสร้างกระดูกในเซลล์ต้นกำเนิดการสร้างกระดูกจากหนูโดยผ่าน BMP-2 ในรูปแบบ 2 มิติ พบว่าการปรับปรุงโครงสร้างของพื้นผิวนาโนไวรัสจากไบยาสูบทางกายภาพ (topographical feature) โดยการเคลือบด้วย gold nanorod (TMV-GNRs) ทำให้พื้นผิวของไวรัสมีความขรุขระมากกว่าไวรัสกลุ่มที่ไม่ได้เคลือบ (TMV-wild type, TMV-wt) แต่พบว่า TMV-wt มีผลกระตุ้นการแสดงออกของ gene BMP-2, ALP, Calcium mineralization ที่มีผลต่อ osteogenic differentiation มากกว่ากลุ่ม TMV-GNRs แสดงให้เห็นว่า TMV มีผลต่อการกระตุ้นการสร้างกระดูกผ่าน BMP-2

นอกจากนี้ Liu T. และคณะในปี 2019⁽¹¹⁾ ได้ศึกษาผลของไวรัสจากไบยาสูบต่อกระบวนการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกมนุษย์ (Human bone marrow stem cells) ที่ได้มาจากไขกระดูกต้นขา (femoral medullary cavity) ในคนไข้ที่ได้รับการเปลี่ยนกระดูกสะโพกและหัวเข่า โดยนำ TMV 1 mg/ml ในน้ำ เลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ แบบ 2 มิติ พบว่า TMV-RGD1 ซึ่งเป็น mutant TMV ส่งเสริมการแสดงออกของยีนส์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกระดูก จากการพบแสดงออกของ gene osteocalcin, Runx2, BMP-2 และ TGF- β มากกว่าในกลุ่ม TMV และกลุ่มควบคุม โดยในการศึกษานี้ยังพบว่า TMV มีผลต่อ cell differentiation จากการวัดค่า ALP และมีผลต่อ calcium deposition จากการย้อมติดสี Alizarin red มากกว่ากลุ่มควบคุม แต่น้อยกว่ากลุ่ม TMV-RGD1

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้ดำเนินการตามขั้นตอนดังนี้

1. การกำหนดประชากรและการสุ่มกลุ่มตัวอย่าง
2. ขั้นตอนการทดลอง
3. การเก็บรวบรวมข้อมูล
4. สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

การกำหนดประชากรและการสุ่มกลุ่มตัวอย่าง

เซลล์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ใช้เซลล์ที่เก็บเกี่ยวจากงานวิจัยของชวัญหทัย อารีวิจิตร ในปี 2019⁽²⁶⁾ ซึ่งผ่านกระบวนการทดสอบยืนยันคุณสมบัติของเซลล์กระดูกเข้าฟัน แล้ว 2 cell lines โดยให้ cell line ที่ 1 แทนด้วย OB1 (Osteoblast; OB) และ cell line ที่ 2 แทนด้วย OB2 โดยเก็บเกี่ยวมาจากกลุ่มประชากร ดังนี้

ประชากร

เซลล์กระดูกเข้าฟัน (Human alveolar bone cells) ที่คัดแยกมาจากกระดูกขณะกรอกระดูกเพื่อผ่าตัดฟันกรามซี่ที่สามที่ฝังคุดของผู้ยินยอมตน ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์และเก็บไว้ในคลังเซลล์ ซึ่งได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมในการวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เลขที่ SWUEC-087/2562E

การเลือกกลุ่มตัวอย่าง

เลือกเซลล์กระดูกเข้าฟัน โดยเก็บเกี่ยวเซลล์จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาโดยการผ่าตัดฟันกรามซี่ที่สามที่ฝังคุดโดยการสุ่มจำนวน 2 คน ที่ผ่านเกณฑ์การรับเข้า เพื่อใช้เป็นเซลล์ปฐมภูมิ (primary cells) โดยนำเซลล์เพาะเลี้ยงรุ่นที่ 3-8 มาใช้ในการทดลอง

เกณฑ์การรับเข้า

ผู้ป่วยเพศชายหรือหญิง มีช่วงอายุระหว่าง 20-50 ปี สุขภาพแข็งแรง ไม่มีโรคประจำตัว ไม่สูบบุหรี่และดื่มแอลกอฮอล์

เกณฑ์การคัดออก

บริเวณกระดูกที่เก็บเกี่ยวมีการอักเสบหรือติดเชื้อ

ขั้นตอนการทดลอง

วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกเบาฟัน

อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้คือ ดีเอ็มอีเอ็มเอฟ 12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium-F12 Advance : DMEM-F12 Advance) ที่ประกอบด้วย 10% fetal bovine serum (FBS), 1% L-glutamine 200 mM, penicillin 10,000 U/ml, streptomycin 10,000 µg/ml, 1% amphotericin B 25 µg/ml จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกเบาฟันในตู้เลี้ยงเซลล์ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงสัปดาห์ละ 2 ครั้ง

รอเซลล์สร้างกระดูกรวมกลุ่มประมาณ 80% จึงถ่ายเซลล์ออกไปเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ใหม่ และเริ่มนับเป็นเซลล์รุ่นที่ 1 หลังจากนั้นเซลล์จะถูกหว่านใหม่ในอัตราส่วน 1:3 (หว่านเซลล์ 1 ใน 3 ของเซลล์ทั้งหมดต่อจานเลี้ยงเซลล์ใหม่ 1 จาน) นำ Passage 3-8 มาใช้ทดลอง^(12, 23)

การสกัด ไวรัสจากใบยาสูบ (Tobacco mosaic virus nanoparticle, TMV)

ทำการสกัด Tobacco mosaic virus nanoparticle ตามขั้นตอนของ Metavarayuth K. และคณะในปี 2015⁽²¹⁾

กระบวนการสกัดไวรัส (Extraction)

ซึ่งใบไม้ที่มีรอยโรคของไวรัสหนัก เติม 0.1 M Potassium phosphate buffer คิดเป็นสามเท่าของปริมาณใบ เติม 2-mercaptoethanol 0.1-0.3% ของปริมาณ buffer ใส่ทุกอย่างรวมกันในเครื่องปั่น หลังจากปั่นเสร็จแล้วให้เทส่วนปั่นผสมลงบนผ้าขาวบางสำหรับกรอง แล้วบีบผ้าไล่จากบนลงล่างจนแห้ง เพื่อให้ได้ไวรัสมากที่สุดจากนั้นนำ filtrate ไปปั่นเหวี่ยงในหลอด centrifuge 250 ml SLA-1500 ที่ 4 องศาเซลเซียส 10500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำบีกเกอร์ขนาด 1000 ml มาตั้งไว้บนน้ำแข็ง วางบนเครื่องปั่นแกนแม่เหล็ก (stirrer) และกรองด้วย kimwipe 2 ชั้น ขนาดใหญ่เกินปากบีกเกอร์ หลังจากปั่นเหวี่ยงให้เท solution ลงในบีกเกอร์โดยกรองผ่าน kimwipe

กระบวนการทำให้ใส (Clarifications)

เตรียมผสม n-butyl alcohol และ Chloroform ในปริมาณเท่ากัน (50:50) ผสมให้เข้ากับสารละลายไวรัสเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง โดยใช้ SLC-4000 ที่ 4 องศาเซลเซียส 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที หลังปั่นเสร็จจะได้สารละลาย เป็น 3 ชั้น ชั้นล่างเป็นสาร

organic และส่วนบนจะเป็น aqueous solution ใช้ pipette gun เก็บส่วน aqueous phase แล้วนำไปใส่ปิเปตเตอร์ 1000 ml ที่สะอาด วางบนน้ำแข็งบนเครื่องปั่นแกนแม่เหล็ก (stirrer)

กระบวนการทำให้สารเข้มข้นขึ้น (Concentration)

เติม PEG 8000 ปริมาณ 8% ของสารละลายไวรัส แล้วเติม 0.2 M โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ปั่นผสมบนเครื่องปั่นแกนแม่เหล็ก (stirrer) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง บนน้ำแข็ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ SLA-1500 ที่ 4 องศาเซลเซียส 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนของเหลวทิ้ง แล้วเติม Potassium phosphate buffer 0.01M pH 7.8 ลงในแต่ละหลอด re-suspend ตะกอนจนหมด แล้วเทใส่หลอด 15ml เพื่อนำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ SLA-1500 ที่ 4 องศาเซลเซียส 9500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บของเหลวไว้ในหลอด 15 ml หลอดใหม่ทันที หลังปั่นเสร็จ ขั้นตอนนี้สามารถเก็บในน้ำแข็งหรือตู้เย็น 4 องศาเซลเซียสก่อนทำขั้นตอนถัดไป

กระบวนการตกตะกอนขั้นสุดท้าย (Final Pelleting)

เทสารละลายไวรัสลงใน ultracentrifuge tube สูงประมาณ 2-3 เซนติเมตร จากด้านบน จากนั้นฉีด sucrose solution ซึ่งเตรียมได้จาก สารละลาย sucrose 20% ใน Potassium phosphate buffer โดยฉีด sucrose ที่ด้านล่างสูงประมาณ 1 เซนติเมตร จากก้นหลอด จากนั้นเติม buffer ลงไปจนถึง maximum นำไปปั่นเหวี่ยงแบบ ultracentrifuge ด้วย 50.2 Ti rotor ที่ 42000 รอบต่อนาที หรือ 70.1 Ti rotor ที่ 45000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง หลังจากปั่นเสร็จ ให้เทของเหลวทั้งหมดออก และเติม Potassium phosphate buffer 2-3 ml เพื่อละลายตะกอน 1 คืน (overnight) ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นปั่นเหวี่ยงโดยใช้ SLA-1500 ที่ 4 องศาเซลเซียส 9500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที หลังจากปั่นเสร็จให้เก็บส่วนของเหลวไว้ในหลอด conical ที่สะอาด หลังจากนั้นเก็บหลอดไว้ในตู้เย็น ใช้ UV absorbance (260 nm, 280 nm) เพื่อเช็คความเข้มข้น

กระบวนการทดสอบคุณลักษณะโครงสร้างของไวรัสจากไบยาซูบ

- Mass Spectrometry Analysis เพื่อหามวลโมเลกุลของโปรตีน โดยนำสารละลายไวรัส 1 μ l ผสม 9 μ l matrix solution (Sinapic acid in 70% acetonitrile, 0.1% TFA) จากนั้นนำส่วนผสมที่ได้ 1 μ l หยดลงบน MALDI plate ปล่อยให้แห้ง จากนั้นทำการวัดผลด้วย MALDI-TOF mass spectrometry (autoflex speed, Bruker[®])

- Transmission electron microscopy (TEM) analysis โดยหยด TMV ความเข้มข้น 1mg/ml 20 μ l ลงบน grids ทำการย้อมด้วย 1% Uranyl Acetate ส่องด้วยเครื่อง JEM-2100/HR (200 kV, JEOL Japan) microscope

กระบวนการนำไวรัสจากไบยาซูบเคลือบบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์

เคลือบจานเพาะเลี้ยงขนาด 24 หลุม ด้วยสารละลาย Poly-d-lysine (PDL) โดยหยด PDL ความเข้มข้น 0.1 mg/ml ปริมาณ 500 μ l ต่อหลุม ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการล้างด้วยน้ำ 18.2 m Ω จากนั้นปล่อยให้แห้ง หยด TMV ความเข้มข้น 0.1 mg/ml ในน้ำ ปริมาณ 500 μ l ต่อหลุม เคลือบที่ก้นหลุม ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 คืน ภายใต้ sterile cell culture hood ล้างด้วยน้ำ 18.2 m Ω ปล่อยให้แห้ง แล้วนำไปทดสอบคุณลักษณะพื้นผิวของไวรัสที่เกาะบนก้นหลุมจานเพาะเลี้ยง (Surface characterization) ด้วย Atomic force microscopy (AFM) โดยใช้เครื่อง Nanosurf CoreAFM (dynamic mode : Trapping mode, Contact mode with Dyn190AI)⁽²¹⁾

ทดสอบความมีชีวิตของเซลล์กระดูกเบ้าฟัน (cell viability)

ทดสอบความมีชีวิตของเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ โดยเลี้ยงเซลล์ 20,000 เซลล์ ต่อหลุมในจานเพาะเลี้ยงขนาด 24 หลุม ที่มี TMV เคลือบตรงก้นหลุม ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วย DMEM-F12 Advance ที่ประกอบด้วย 10% fetal bovine serum (FBS), 1% L-glutamine 200 mM, penicillin 10,000 U/ml, streptomycin 10,000 μ g/ml, 1% amphotericin B 25 μ g/ml ใส่ 500 μ l ต่อหลุม เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1, 3, 7 และ 14 วัน ทำการทดสอบโดยเติมสารละลาย Resazurin (Prestoblue™ cell viability reagent, Invitrogen, ThermoFisher Scientific) ต่ อ DMEM-F12 Advance อัตราส่วน 1:10 ใส่สาร 500 μ l ต่อหลุม นำเข้าตู้อบที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 1 ชั่วโมง บันทึกผลโดยดูค่าการละลายทดสอบออก แล้วนำมาวัดค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence intensity) ที่ความยาวคลื่น 560/590 nm เพื่อประเมินปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตโดยใช้เครื่อง Microplate reader (CLARIOSTAR, BMG Labtech, USA) ทำการเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ที่ไม่ได้ใส่ TMV^(10, 26)

ทดสอบระดับปฏิกิริยาอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของเซลล์กระดูกเบ้าฟัน (alkaline phosphatase, ALP activity assay)

เพื่อตรวจดูลักษณะเอนไซม์ที่ควบคุมการสร้างกระดูก (osteoblast differentiation) โดยเลี้ยงเซลล์ 20,000 เซลล์ ต่อหลุมในจานเพาะเลี้ยงขนาด 24 หลุม ที่มี TMV เคลือบตรงก้นหลุม ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วย DMEM-F12 Advance เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์ยึดเกาะกับจานเลี้ยงเซลล์ จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นชนิดที่เหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างกระดูก (osteogenic media) ซึ่งประกอบด้วย 10% fetal bovine serum (FBS), 1% L-glutamine 200 mM, penicillin 10,000 U/ml, streptomycin 10,000 μ g/ml, 1% amphotericin B 25 μ g/ml,

ascorbic acid 50 µg/ml, β-glycerophosphate 5 mM และ dexamethasone 250 nM เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 1, 3, 7 และ 14 วัน ล้างด้วย Tris-buffer saline 1x (TBS) แล้วเติมสารละลาย p-nitrophenylphosphate (alkaline phosphatase yellow (pNPP), Sigma Aldrich®, USA) ความเข้มข้น 1.5 g/l ปริมาณ 500 µl ต่อหลุมที่อุณหภูมิห้อง ปิดทับด้วยกระดาษฟอยล์แล้วบ่มนาน 1 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารออกมาเพื่อวัดปริมาณการดูดกลืนแสง (absorbance, O.D.) ที่ค่าความยาวคลื่น 405 nm ด้วยเครื่อง Microplate reader (CLARIOSTAR, BMG Labtech, USA) ทำการเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ที่ไม่ได้ใส่ TMV และกลุ่มที่ไม่ได้เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น osteogenic media

การคำนวณ enzyme activity ด้วย Beer-Lambert law ดังนี้⁽⁶⁾

$$\text{enzyme activity}(\mu\text{moles}/\text{min}/\mu\text{g}) = \frac{V(\mu\text{l}) \times \text{OD}_{405 \text{ nm}}(\text{cm}^{-1})}{\epsilon \times \text{incubation time}(\text{min}) \times \text{enzyme}(\mu\text{g})}$$

V = ปริมาตรโดยรวมของสารทดสอบ (ในการทดลองนี้เท่ากับ 120 µl)

OD_{405 nm} (cm⁻¹) = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm ทหารด้วยค่าระยะทางที่แสงส่องผ่านในหน่วยเซนติเมตร

ε = ค่าสัมประสิทธิ์การดูดแสงของสาร (molar extinction coefficient, M⁻¹×cm⁻¹)

สำหรับ pNPP, ε = 1.78×10⁴ M⁻¹×cm⁻¹

ทดสอบการสะสมแคลเซียมในเมทริกซ์ระหว่างเซลล์ โดยการย้อม Alizarin red

เลี้ยงเซลล์ 20,000 เซลล์ ต่อหลุมในจานเพาะเลี้ยงขนาด 24 หลุม ที่มี TMV เคลือบตรงกันหลุม ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วย DMEM-F12 Advance เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์ยึดเกาะกับจานเลี้ยงเซลล์ จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นชนิดที่เหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างกระดูก (osteogenic media) ซึ่งประกอบด้วย 10% fetal bovine serum (FBS), 1% L-glutamine 200 mM, penicillin 10,000 U/ml, streptomycin 10,000 µg/ml, 1% amphotericin B 25 µg/ml, ascorbic acid 50 µg/ml, β-glycerophosphate 5 mM และ dexamethasone 250 nM เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7 และ 14 วัน ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก ล้างด้วย phosphate buffer saline (PBS) แล้วตรึงเซลล์ด้วยสารละลาย 10% formalin เป็นเวลา 20 นาที

ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แล้วย้อมด้วยสารละลาย Alizarin red (Sigma Aldrich, USA) ความเข้มข้น 40 mM pH 4.1-4.3 ปิดจานเลี้ยงเซลล์ด้วยกระดาษฟอยล์ บ่มนาน 30 นาที บนเครื่องเขย่า จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 4 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที วางทิ้งไว้ให้แห้ง ทำการบันทึกผลเก็บข้อมูลเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ใส่ TMV และกลุ่มที่ไม่ได้เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น osteogenic media

ทดสอบการแสดงออกของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ (cell morphology) และการสร้างโปรตีน Osteocalcin โดย Immunofluorescence

เลี้ยงเซลล์ 20,000 เซลล์ ต่อหลุมในจานเพาะเลี้ยงขนาด 24 หลุม ที่มี TMV เคลือบ ตรงกันหลุม ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วย DMEM-F12 Advance 100 μ l ต่อหลุม เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2-3 วัน เลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก ล้างด้วย PBS 2 ครั้ง แล้วตรึงเซลล์ด้วยสารละลาย formalin ความเข้มข้น 10% เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วยสารละลาย PBS 2 ครั้ง ทำการ permeabilized เซลล์ด้วยสารละลาย TRITON[®] X-100 (AMRESCO, Ohio) ความเข้มข้น 0.1% เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วยสารละลาย Tween[®] 20 อีก 2 ครั้ง บล็อกโปรตีนด้วยสารละลายโปรตีน BSA ความเข้มข้น 1% เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างออกด้วยสารละลาย PBS ใส่สาร Rabbit anti human osteocalcin (Primary antibody)(Thermo scientific[™], USA) ความเข้มข้น 1.51 mg/ml ใช้งานในอัตราส่วนเจือจาง 1 ต่อ 200 ในสารละลาย PBS เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ล้างออกด้วยสารละลาย PBS จากนั้นใส่สาร Goat anti rabbit antibody-AF546 (Secondary antibody)(Thermo scientific[™], USA) ความเข้มข้น 4 μ g/ml เป็นเวลา 45 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วยสารละลาย PBS จากนั้นย้อมสีของนิวเคลียส ด้วยสารเรืองแสง (fluorescence dye) DAPI (4,6'-diamidino-2-phenylindole, Thermo scientific[™], USA) ความเข้มข้น 1 mg/ml ใช้งานในอัตราส่วนที่เจือจาง 1 ต่อ 100 ในสารละลาย PBS บ่มนาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใส่สารละลาย FITC-Phalloidine (Thermo scientific[™], USA) ความเข้มข้น 6.6 μ M ในอัตราส่วนที่เจือจาง 1 ต่อ 40 ในสารละลาย PBS บ่มนาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ตามที่ผู้ผลิตแนะนำ ล้างด้วย PBS 2 ครั้ง บันทึกผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence microscope) ที่เลนส์วัตถุกำลังขยาย 10 เท่า และโปรแกรม Image J เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มี TMV และกลุ่มที่ไม่ได้เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น osteogenic media ^(11, 26)

การเก็บรวบรวมข้อมูล

1. ประเมินความเข้ากันได้ทางชีวภาพโดยดูความมีชีวิตของเซลล์กระดูกเบาพันธ์ และ TMV จากการวัดความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 560/590 nm โดยใช้เครื่อง Microplate reader (CLARIOSTAR, BMG Labtech, USA) ในการทดสอบ Resazurin เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ใส่ TMV

2. ประเมินลักษณะเอนไซม์ที่ควบคุมการสร้างกระดูก โดยดูระดับปฏิกิริยา ALP activity assay วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm ด้วยเครื่อง Microplate reader (CLARIOSTAR, BMG Labtech, USA) ในกลุ่มเซลล์กระดูกเบาพันธ์ที่ใส่ TMV เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ใส่ TMV และกลุ่มที่ไม่ได้เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น osteogenic media

3. ประเมินความสามารถในการสะสมแร่ธาตุในเมทริกซ์ระหว่างเซลล์ด้วยการย้อม Alizarin red บันทึกผลโดยการถ่ายภาพ เปรียบเทียบการเกิด Calcium deposition กับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ใส่ TMV และกลุ่มที่ไม่ได้เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น osteogenic media

4. ประเมินลักษณะรูปร่างเซลล์และดูการสร้างโปรตีน Osteocalcin จาก immunofluorescence assay ภายใต้เครื่อง Fluorescence microscope โดยย้อม DAPI (4,6 diamidino-2-phenylindole, 100 ng/ml) เพื่อดู nucleus และย้อม FITC-Phalloidin เพื่อดู actin และย้อม Antibody ต่อ Osteocalcin เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ใส่ TMV และกลุ่มที่ไม่ได้เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น osteogenic media

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 4 ครั้ง ต่อ primary cells จำนวน 2 cell lines เพื่อแสดงถึงความสามารถในการทำซ้ำได้ (Reproducibility) และความถูกต้องในการแปลผลการทดลอง ใช้โปรแกรม SPSS ในการวิเคราะห์ข้อมูล โดยใช้สถิติ Independent Sample T-test สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม โดยกำหนดระดับความเชื่อมั่น 95%

บทที่ 4

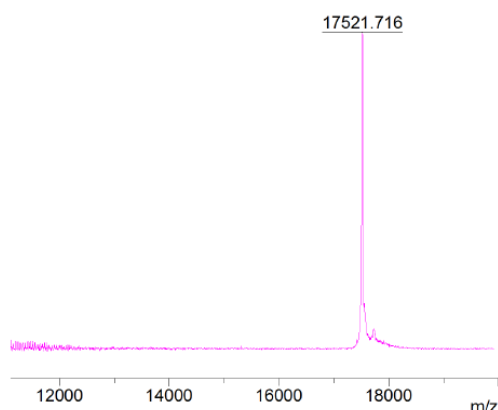
ผลการดำเนินงานวิจัย

จากงานวิจัยนี้ได้ศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพของอนุไวรัสจากไบยาสูบต่อเซลล์กระดูกเบาพันธ์ ซึ่งผู้วิจัยได้ดำเนินการวิจัยตามขั้นตอนดังที่ได้อธิบาย เพื่อให้ผลวิจัยสอดคล้องตามวัตถุประสงค์ที่ได้กำหนดไว้ดังนี้

1. ผลการทดสอบคุณลักษณะโครงสร้างของไวรัสจากไบยาสูบ
2. ผลการเคลือบไวรัสจากไบยาสูบลงบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์
3. ผลการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์กระดูกเบาพันธ์
4. ผลการทดสอบระดับปฏิกิริยาอัลคาไลด์ฟอสฟาเตสของเซลล์กระดูกเบาพันธ์
5. ผลการทดสอบการสะสมแคลเซียมในเมทริกซ์ระหว่างเซลล์โดยการย้อม Alizarin red
6. ผลการทดสอบการสร้างโปรตีน Osteocalcin และการแสดงออกของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ โดย Immunofluorescence

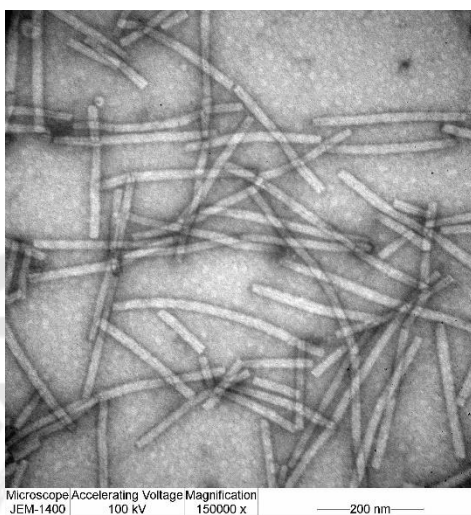
ผลการทดสอบทดสอบคุณลักษณะโครงสร้างของไวรัสจากไบยาสูบ

ผลการตรวจมวลโมเลกุลโปรตีนของไวรัส TMV ด้วย MALDI-TOF MS analysis พบว่ามีค่าสูงในช่วง 17521.716 m/z ซึ่งสอดคล้องกับมวลโมเลกุลของไวรัส TMV โดยทั่วไปคือ 17534 m/z⁽²⁰⁾



ภาพประกอบ 10 ผลตรวจมวลโมเลกุลโปรตีนของไวรัส TMV ด้วย MALDI-TOF MS analysis

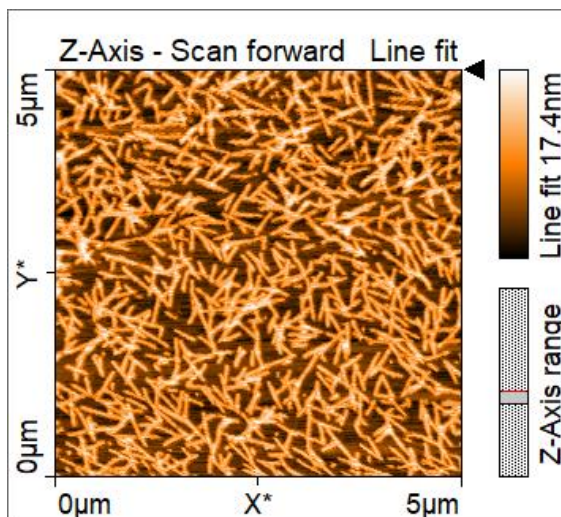
ผลการตรวจดูลักษณะโครงสร้างของ TMV ด้วยวิธี Transmission electron microscopy (TEM) analysis โดยใช้เครื่อง JEM-2100/HR (200 kV, JEOL Japan) microscope และนำมาวัดค่าด้วยโปรแกรม Image J พบว่า TMV มีลักษณะรูปร่างเป็นแท่ง มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 15-18 nm ความยาวประมาณ 280-350 nm



ภาพประกอบ 11 ผลการตรวจดูโครงสร้างของ TMV ด้วยวิธี Transmission electron microscopy (TEM) magnification 150,000x scale bar 200 nm

ผลการเคลือบไวรัสจากไบยาสูบลงบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์

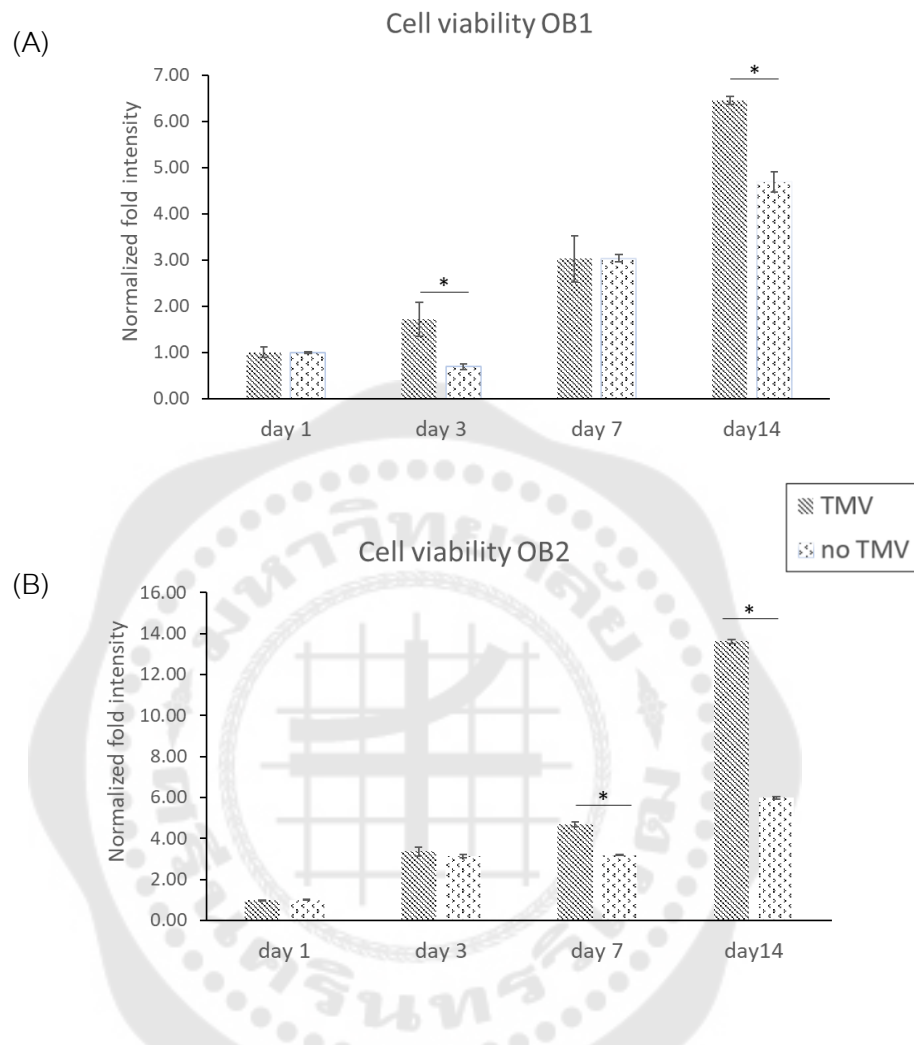
ผลการดูลักษณะพื้นผิวของไวรัสที่เคลือบลงบนจานเพาะเลี้ยง จากผลการทดสอบด้วยวิธี Atomic force microscopy (AFM) โดยใช้เครื่อง Nanosurf CoreAFM ที่ความเข้มข้นไวรัส 0.1 mg/ml พบว่าจานเพาะเลี้ยงถูกปกคลุมด้วยไวรัสเกือบเต็มพื้นที่ โดยเมื่อคำนวณหาค่าเฉลี่ยพื้นที่ผิวที่ปกคลุมกันหลุมจานเพาะเลี้ยง พื้นที่ $5 \times 5 \mu\text{m}$ 4 ตำแหน่ง ด้วยโปรแกรม Image J พบว่ามีไวรัสปกคลุมเฉลี่ย $47.92 \pm 4.63\%$ และเมื่อตรวจดูลักษณะพื้นผิวของไวรัสที่อ่านจากเครื่อง Nanosurf CoreAFM พบค่าความสูงของไวรัสเฉลี่ย ในพื้นที่ $5 \times 5 \mu\text{m}$ 4 ตำแหน่งบนจานเพาะเลี้ยง $23.37 \pm 4.87 \text{ nm}$ ซึ่งขนาดใกล้เคียงกับเส้นผ่านศูนย์กลางของไวรัส คือ 18 nm



ภาพประกอบ 12 ผลการตรวจดูลักษณะพื้นผิวของไวรัสด้วยวิธี Atomic force microscopy (AFM) พื้นที่ 5x5 µm

ผลการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์กระดูกเบาพันธ์

การทดสอบความมีชีวิตของเซลล์กระดูกเบาพันธ์ 2 cell lines OB1 และ OB2 (Osteoblast; OB) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีสารเหนี่ยวนำการสร้างกระดูก non osteogenic media โดยพบว่าในวันที่ 1 กลุ่มทดลองที่มี TMV และกลุ่มควบคุมที่ไม่มี TMV สามารถเกิดกระบวนการเมตาบอลิซึม ต่อสาร Resazurin ตั้งแต่วันที่ 1 และทำการติดตามผลต่อในวันที่ 3, 7 และ 14 ทำการปรับค่า (normalized) ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 560/590 nm โดยใช้ผลของวันที่ 1 เป็นบรรทัดฐาน (baseline) พบว่า (ภาพประกอบ 13) ใน cell line OB1 กลุ่มทดลองที่มี TMV มีแนวโน้มค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้น ตั้งแต่วันที่ 3, 7, 14 มากกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่มี TMV โดยเฉพาะในวันที่ 3 และ 14 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เช่นเดียวกับ cell lines OB2 กลุ่มทดลองที่มี TMV มีแนวโน้มค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้น ตั้งแต่วันที่ 3, 7, 14 มากกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่มี TMV โดยเฉพาะในวันที่ 7 และ 14 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



ภาพประกอบ 13 แผนภูมิค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ เพื่อประเมินความมีชีวิตของเซลล์ (A) cell line OB1 (B) cell line OB2 โดยแสดงค่า Normalized fold fluorescence intensity 560/590 nm. ในวันที่ 1, 3, 7 และ 14 ภายใต้สภาวะอาหารเลี้ยง non osteogenic media โดยใช้สถิติ Independent Sample T-test ที่กำหนดระดับความเชื่อมั่น 95% โดย * $p < 0.05$

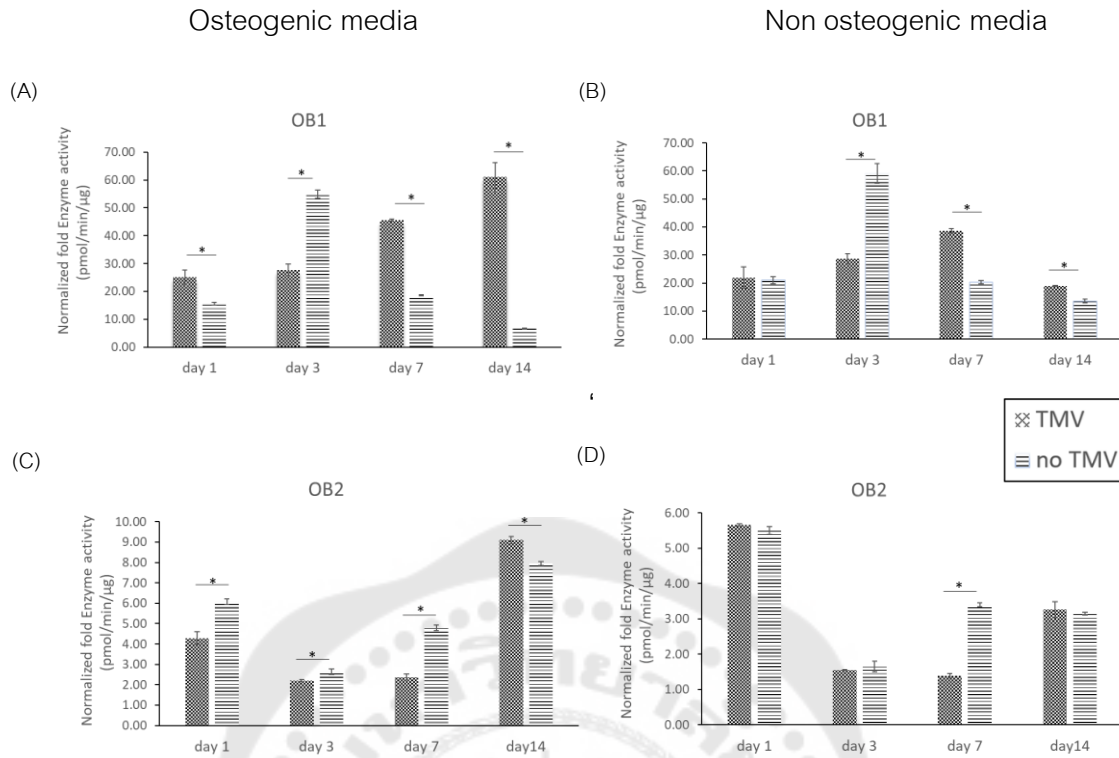
ผลการทดสอบระดับปฏิบัติการอัลคาไลด์ฟอสฟาเตสของเซลล์กระดูกเบ้าฟัน

ระดับปฏิบัติการเอนไซม์อัลคาไลด์ฟอสฟาเตสที่ควบคุมการสร้างกระดูกโดยส่งผลกระทบต่อ osteoblast differentiation พบว่าเซลล์กลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมทุกกลุ่มสามารถสร้างเอนไซม์ได้ตั้งแต่วันที่ 1 และทำการติดตามผลต่อในวันที่ 3, 7 และ 14 ทำการปรับค่า (normalized) ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm โดยใช้ผลการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ในแต่ละวันเป็นบรรทัดฐาน (baseline) พบว่า (ภาพประกอบ 14)

ใน cell line OB1 กลุ่มทดลองที่มี TMV เซลล์ที่เลี้ยงใน non osteogenic media มีแนวโน้มค่าเฉลี่ยอัตราการสร้างเอนไซม์อัลคาไลด์ฟอสฟาเตสเพิ่มขึ้นใน วันที่ 1, 3, 7 และลดลงในวันที่ 14 โดยในกลุ่มทดลองที่มี TMV มีอัตราการสร้างเอนไซม์น้อยกว่ากลุ่มควบคุมในวันที่ 3 แต่มีค่ามากกว่ากลุ่มควบคุมในวันที่ 7 และ 14 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนเซลล์ในสภาวะ osteogenic media พบว่าอาหารเลี้ยงเซลล์มีผลเร่งให้กลุ่มทดลองที่มี TMV แนวโน้มค่าเฉลี่ยอัตราการสร้างเอนไซม์อัลคาไลด์ฟอสฟาเตสเพิ่มขึ้นในทุกช่วงวันที่ 1, 3, 7, 14 โดยมีอัตราการสร้างเอนไซม์มากกว่ากลุ่มควบคุมในวันที่ 7 และ 14 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เช่นเดียวเซลล์ที่เลี้ยงใน non osteogenic media

ส่วน cell line OB2 กลุ่มทดลองที่มี TMV เซลล์ที่เลี้ยงใน osteogenic media และ non osteogenic media มีแนวโน้มค่าเฉลี่ยอัตราการสร้างเอนไซม์ในช่วงแรกน้อยกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่มี TMV โดยเฉพาะในวันที่ 7 แต่ยังเห็นแนวโน้มการสร้างเอนไซม์ในกลุ่มทดลองเพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่มควบคุมในวันที่ 14 โดยเฉพาะในสภาวะ osteogenic media ที่กลุ่มทดลองมีระดับเอนไซม์มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

โดยหากลองเปรียบเทียบกราฟพบว่า เซลล์ OB1 มีพฤติกรรมการสร้างเอนไซม์อัลคาไลด์ฟอสฟาเตสเร็วกว่า OB2 โดยเฉพาะในช่วง 3 วันแรก

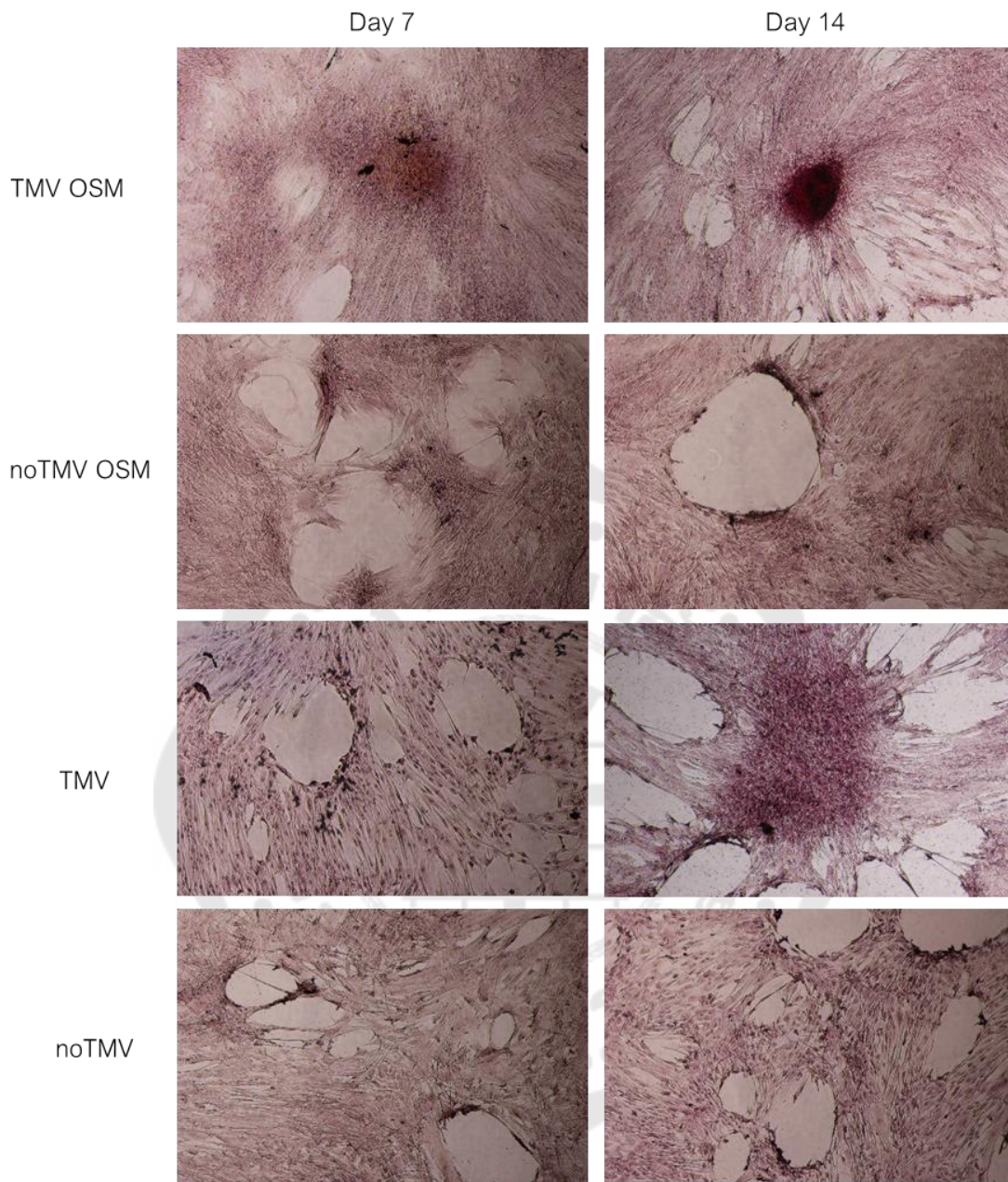


ภาพประกอบ 14 แผนภูมิแสดงค่าเฉลี่ยอัตราการสร้างเอนไซม์อัลคาไลด์ฟอสฟาเตส ใน cell line OB1 และ OB2 โดยแสดงค่า Normalized fold OD absorbance 405 nm. ในวันที่ 1, 3, 7 และ 14 ภายใต้สภาวะอาหารเลี้ยงเซลล์ (A,C) osteogenic media และ (B,D) non osteogenic media โดยใช้สถิติ Independent Sample T-test โดยกำหนดระดับความเชื่อมั่น 95% โดย * $p < 0.05$

ผลการทดสอบการสะสมแคลเซียมในเมทริกซ์ระหว่างเซลล์โดยการย้อม Alizarin red

ในการทดสอบการสะสมแคลเซียมในเมทริกซ์ระหว่างเซลล์ ผู้วิจัยได้เลือก cell line OB2 มาใช้ทดสอบ เนื่องจากเมื่อสังเกตการเกิด osteoblast differentiation จากกราฟการสร้างเอนไซม์อัลคาไลด์ฟอสฟาเตสของทั้ง 2 cell lines พบว่า OB2 มีปริมาณค่อยๆเพิ่มขึ้น ส่วน OB1 มีการสร้างเอนไซม์เร็วมากในช่วง 1-3 วันแรก และงานวิจัยที่ผ่านมาการย้อม Alizarin red จะทำการทดสอบในช่วงวันที่ 7-14 เพื่อดูการสะสมแคลเซียมในเมทริกซ์ระหว่างเซลล์ ดังนั้นพฤติกรรมการเจริญเติบโตของ OB2 จึงเหมาะนำมาใช้สำหรับการทดสอบวิธีการนี้

ความสามารถในการสะสมแร่ธาตุในเมทริกซ์ระหว่างเซลล์ OB2 ด้วยการย้อม Alizarin red และบันทึกผลโดยการถ่ายภาพ พบว่า ในสภาวะ osteogenic media และ non osteogenic media ให้ผลการทดลองคล้ายกัน คือ พบการสะสมแคลเซียมตั้งแต่วันที่ 7 จากการย้อมติดสีแดงของ Alizarin red ทั้งในกลุ่มทดลองที่มี TMV และกลุ่มควบคุม โดยในวันที่ 14 กลุ่มทดลองพบติดสีแดงเข้มขึ้นมีลักษณะ nodule ชัดเจนโดยเฉพาะในสภาวะ Osteogenic media ในขณะที่กลุ่มควบคุมไม่พบความเปลี่ยนแปลง (ภาพประกอบ 15)



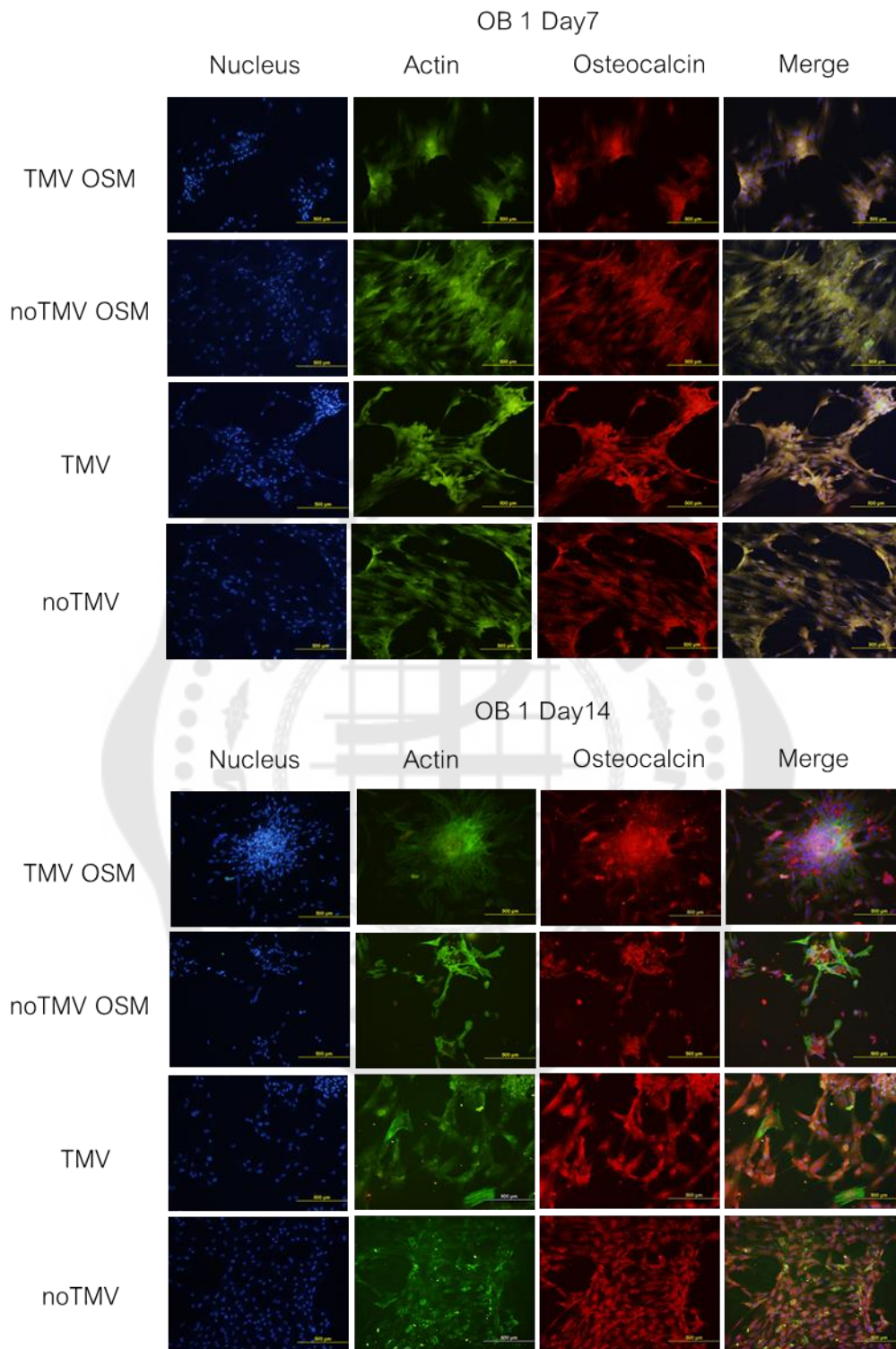
ภาพประกอบ 15 ภาพการสะสมแคลเซียมในเมทริกซ์ระหว่างเซลล์ ใน cell line OB2 โดยการย้อม Alizarin red ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (inverted microscope) ที่เลนส์วัตถุกำลังขยาย 4X ดูการสะสมแร่ธาตุในเมทริกซ์ระหว่างเซลล์โดยการย้อม Alizarin red ภายใต้สภาวะอาหารเลี้ยงเซลล์ osteogenic media (OSM) และ non osteogenic media ในวันที่ 7 และ 14 ของการทดลอง

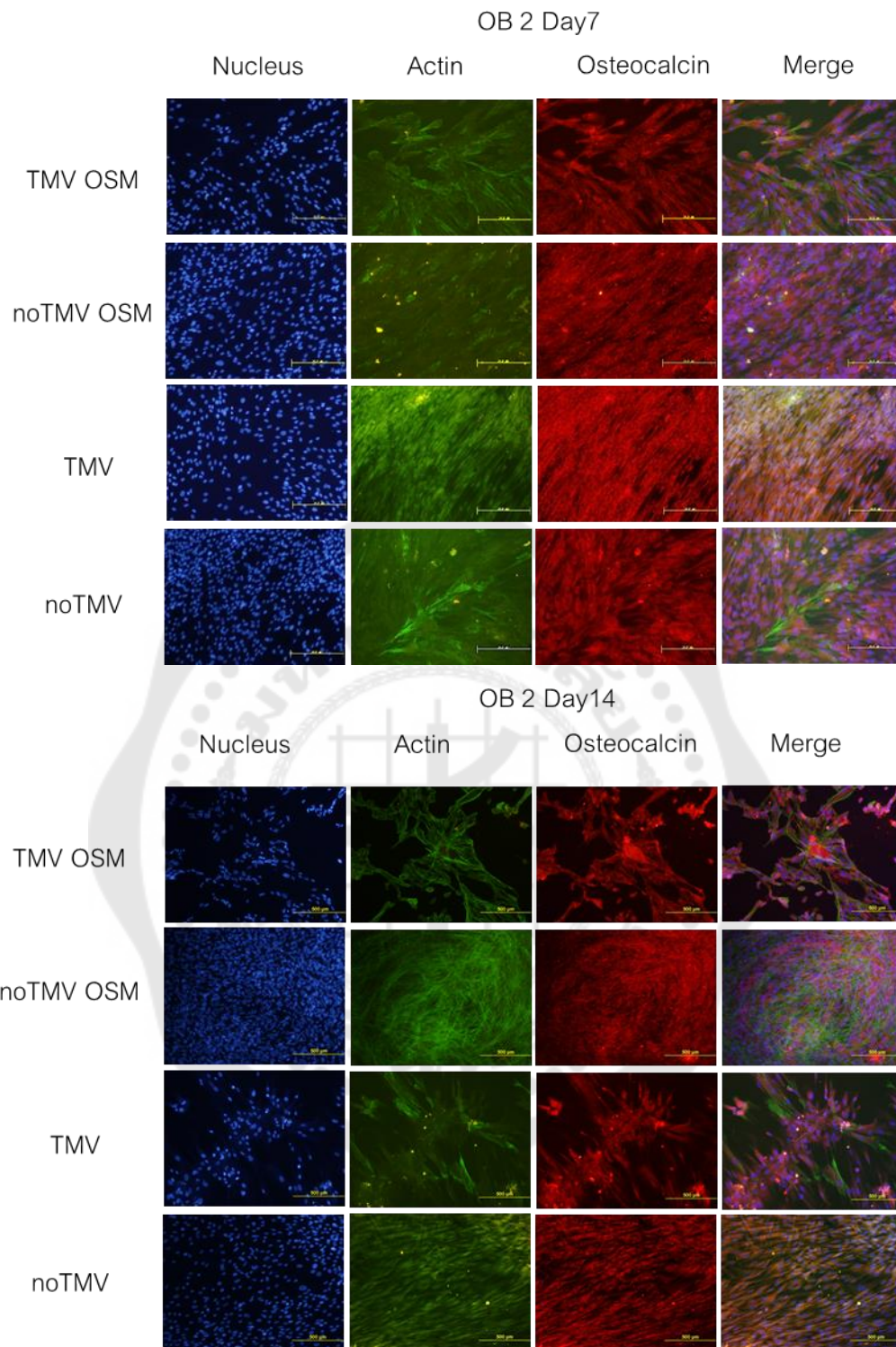
ผลการทดสอบการสร้างโปรตีน Osteocalcin และการแสดงออกของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ โดย Immunofluorescence

ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะ osteogenic media และ non osteogenic media สามารถพบการสร้างโปรตีน Osteocalcin จากการย้อมติดสีแดงของแอนติบอดีของ Osteocalcin สีน้ำเงินแสดงการย้อมติดนิวเคลียสจากสีย้อม DAPI และสีเขียวแสดงการย้อมติดแอกตินจากสีย้อม FITC-Phalloidin ภายใต้กล้อง Immunofluorescence microscope ที่เลนส์วัตถุกำลังขยาย 10X ทั้งในวันที่ 7 และ 14 พบว่าให้ผลการย้อมติดสีในกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมไม่แตกต่างกัน ในอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้ง 2 สภาวะโดยพบการย้อมติดสี Osteocalcin ในวันที่ 7 และ 14 เหมือนกัน คือ มีลักษณะติดสีแดงสด อยู่รอบๆนิวเคลียส ตามรูปร่างของเซลล์ ส่วนนิวเคลียสจะย้อมติดสีฟ้าสว่าง รูปร่างกลม 1 อัน ตรงกลางเซลล์ และแอกติน ย้อมติดสีเขียวมีลักษณะเป็นแถบเส้น กระจายตัวทั่วเซลล์รอบนิวเคลียส

ในด้านลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์ cell lines OB1 พบว่าทั้งในสภาวะ osteogenic media และ non osteogenic media เซลล์มีลักษณะเหมือนกันคือ กลุ่มทดลองที่มี TMV พบเซลล์ลักษณะเกาะกลุ่มกัน (aggregation) ตั้งแต่วันที่ 7 และมีรูปร่างหลายเหลี่ยม (polygonal shape) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มี TMV เซลล์มีรูปร่างกระสวยยาวคล้ายเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (long narrow fibroblast like cell) และอยู่กระจายไม่ค่อยเกาะกลุ่ม ส่วนในวันที่ 14 พบเซลล์ทั้งกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม มีลักษณะเกาะกลุ่มกันและมีรูปร่างหลายเหลี่ยม

ส่วน cell lines OB2 พบว่าทั้งในสภาวะ osteogenic media และ non osteogenic media เซลล์มีลักษณะเหมือนกันคือ ในวันที่ 7 ทั้งกลุ่มทดลองที่มี TMV และกลุ่มควบคุม เซลล์มีรูปร่างกระสวยยาวคล้ายเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ไม่พบการเกาะกลุ่มของเซลล์ แต่ในวันที่ 14 กลุ่มทดลองที่มี TMV พบเซลล์มีรูปร่างหลายเหลี่ยม (polygonal shape) และมีลักษณะเกาะกลุ่มกัน (aggregation) ในขณะที่กลุ่มควบคุมไม่พบความเปลี่ยนแปลง





ภาพประกอบ 16 ภาพแสดงรูปร่างของเซลล์จากการย้อม Immunofluorescence ใน cell lines OB1 และ OB 2 ที่เลนส์วัตถุกำลังขยาย 10X scale bar 500 nm. สีแดงแสดงสีย้อมแอนติบอดีของ Osteocalcin สีน้ำเงินแสดงการย้อมติดนิวเคลียสจากสีย้อม DAPI และสีเขียวแสดงการย้อมติดแอกตินจากสีย้อม FITC-Phalloidin อาหารเลี้ยงเซลล์ osteogenic media (OSM) และ non osteogenic media ในวันที่ 7 และ 14 ของการทดลอง

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

จากการทำการศึกษาร่วมกันเรื่องความเข้ากันได้ทางชีวภาพของอนุไวรัสจากไบยาซูบต่อเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ และได้ผลการดำเนินงานแล้ว สามารถสรุปผลการดำเนินงาน โดยแบ่งหัวข้อสรุปผลได้ดังนี้

1. สรุปผลการวิจัย
2. อภิปรายผลการวิจัย
3. ข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

ไวรัสจากไบยาซูบมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ โดยเซลล์มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น มีคุณสมบัติเหนียวทำให้เกิดการสร้างกระดูกได้ทั้ง Osteoblast differentiation และ matrix mineralization ซึ่งคาดหวังว่าไวรัสจากไบยาซูบสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดร่วมกับระบบโครงร่างทางชีวภาพ เพื่อใช้สำหรับงานพันธุวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกต่อไป

อภิปรายผลการวิจัย

เซลล์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์จากผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าฟันคุดจำนวน 2 ราย ที่ได้ผ่านการเพาะเลี้ยงและตรวจสอบคุณลักษณะของการเป็นเซลล์สร้างกระดูกจากงานวิจัยของ อารีวิจิตร ข. ในปี 2019⁽²⁶⁾ ส่วนไวรัสจากไบยาซูบที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้มาจากการสกัดไวรัสจากต้นไบยาซูบที่ได้ทำการปลูกและผ่านการติดเชื้อไวรัสแล้ว โดยนำสารที่ได้ไปตรวจสอบมวลโมเลกุลและโครงสร้างของโปรตีนไวรัส พบมวลโมเลกุลอยู่ในช่วง 17521.716 m/z โดย TMV มีลักษณะรูปร่างเป็นแท่ง เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 15-18 nm ความยาวประมาณ 280-350 nm ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาไวรัสจากไบยาซูบที่ผ่านมามีเส้นผ่าศูนย์กลาง 18 nm ยาว 300 nm และมีมวลโมเลกุล 17534 m/z^(20, 24, 27) และจากการทดสอบ Atomic force microscopy (AFM) พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมในงานวิจัยนี้ที่สามารถเคลือบไวรัสได้ครอบคลุมพื้นที่ของกันหุ้มจานเพาะเลี้ยงเซลล์คือ 0.1 mg/ml

ในการศึกษาไวรัสต่อความมีชีวิตของเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ ในวันที่ 1, 3, 7 และ 14 โดยใช้สารละลาย Resazurin ซึ่งสามารถบอกถึงการเกิดเมตาบอลิซึมของเซลล์ และการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้⁽⁹⁾ โดยในงานวิจัยพบว่า เซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ในกลุ่มทดลองที่มี TMV มีแนวโน้มค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้นตลอด 14 วัน มากกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่มี TMV ทั้งใน cell line OB1 และ OB2 (ภาพประกอบ 13) แสดงให้เห็นว่าไวรัสมีผลเพิ่มการเจริญเติบโตและเร่งการเกิดเมตาบอลิซึมของเซลล์ได้ ในขณะที่งานวิจัยของ Lee LA. และคณะปี 2012⁽²⁰⁾ ที่พบว่า TMV 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ไม่มีผลเป็นพิษต่อเซลล์ต้นกำเนิดการสร้างกระดูกจากหนู (rat bone marrow mesenchymal stem cells ; rBMSC) โดยมีอัตราการเกิดเมตาบอลิซึมไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม และในงานวิจัยนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Liu T. และคณะในปี 2019⁽¹¹⁾ พบว่าผลของไวรัสจากใบยาสูบที่ความเข้มข้น 1 mg/ml ที่เคลือบบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ กับอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดการสร้างกระดูกมนุษย์จากไขกระดูกต้นขา (Human Bone bone mesenchymal stem cells ; hBMSC) พบว่าเซลล์กลุ่มทดลองและควบคุมมีการเจริญเติบโตมากขึ้นตามเวลาที่เพิ่มขึ้นโดยไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม

การทดสอบคุณสมบัติเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างกระดูก โดยดูจากระดับปฏิกิริยาอัลคาไลด์ฟอสฟาเตสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เริ่มพบตั้งแต่ช่วงเซลล์มีการเจริญเติบโต (Proliferation) มีค่าสูงในช่วง early marker osteoblast differentiation ในระหว่างการสังเคราะห์ extracellular matrix และเอนไซม์จะลดลงในช่วงที่เข้าสู่กระบวนการ mineralization⁽²¹⁾ จากงานวิจัยนี้พบว่า ในเซลล์ OB1 เซลล์ในกลุ่มทดลองที่มี TMV ในสภาวะ non osteogenic media มีแนวโน้มสร้างเอนไซม์ปฏิกิริยาอัลคาไลด์ฟอสฟาเตสเพิ่มมากขึ้นในวันที่ 1, 3, 7 ตามลำดับ ส่วนในสภาวะ osteogenic media มีการสร้างเอนไซม์เพิ่มขึ้นในวันที่ 1, 3, 7 และ 14 ตามลำดับ โดยเซลล์ทั้ง 2 กลุ่มมีค่ามากกว่ากลุ่มควบคุมในวันที่ 7 และ 14 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้ง 2 สภาวะ ส่วนในเซลล์ OB 2 กลุ่มทดลองมีแนวโน้มการสร้างเอนไซม์ในช่วงแรกน้อยกว่ากลุ่มควบคุม ทั้งในสภาวะ non osteogenic media และ osteogenic media แต่ในวันที่ 14 กลุ่มทดลองมีแนวโน้มการสร้างเอนไซม์มากกว่ากลุ่มควบคุมโดยเฉพาะในสภาวะ osteogenic media (ภาพประกอบ 14) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Liu T. และคณะในปี 2019⁽¹¹⁾ ที่พบว่า TMV ส่งผลต่อเซลล์ hBMSC สามารถสร้างเอนไซม์เพิ่มขึ้นตามระยะเวลา ในวันที่ 4, 7, 14 ตามลำดับมากกว่ากลุ่มควบคุมในสภาวะ osteogenic media และยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sitasuwan P. และคณะในปี 2012⁽⁸⁾ ที่พบว่าในสภาวะ osteogenic media เซลล์ rBMSC ที่มี TMV 0.2 mg/ml เคลือบบนจาน

เพราะเลี้ยงเซลล์ สามารถสร้างเอนไซม์เพิ่มขึ้น และมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในวันที่ 7 และ 14 ตามลำดับ และพบการสร้างเอนไซม์จะลดลงในวันที่ 21 ทั้งกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม แต่ในสภาวะ non osteogenic media เซลล์ในกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมมีการสร้างเอนไซม์ไม่แตกต่างกัน

ข้อสังเกต ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์ไลน์ทั้งสองมีการเจริญเติบโตและการตอบสนองต่อสารทดสอบไม่เท่ากัน ดังเห็นได้จากใน cell line OB2 จากกราฟ ALP activity ในวันที่ 1 มีค่าสูงมาก และลดลงในวันถัดมา อาจเนื่องมาจากการคำนวณค่า normalized enzyme activity ใช้ผลของ cell viability มาคำนวณ ซึ่งพฤติกรรมของเซลล์ OB2 มีการเจริญเติบโตช้าในช่วงแรก ดังนั้นเมื่อนำผลมาคำนวณจึงมีค่าสูง และเมื่อเปรียบเทียบกับพฤติกรรมการสร้างเอนไซม์อัลคาไลด์ฟอสฟาเตส พบว่าเซลล์ OB1 มีการสร้างเอนไซม์เร็วกว่า OB2 โดยเฉพาะในวันที่ 3 เซลล์ OB1 ในกลุ่มควบคุมที่ไม่มี TMV พบการสร้างเอนไซม์สูงสุด ส่วนเซลล์ OB2 ในกลุ่มควบคุมมีแนวโน้มการสร้างเอนไซม์ค่อยๆเพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 14 ซึ่งสอดคล้องกับโมเดลการเจริญเติบโตของเซลล์กระดูกมนุษย์ (Primary human osteoblast) ของ Wrobel E. และคณะในปี 2016⁽²⁸⁾ พบเซลล์กระดูกมีการสร้างเอนไซม์ปฏิกิริยาอัลคาไลด์ฟอสฟาเตสตั้งแต่ 24 ชั่วโมงแรกและค่อยๆเพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 21 ภายใต้สภาวะ osteogenic media โดยพบปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 14 เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Czekanska EM. และคณะในปี 2013⁽²⁹⁾ ที่พบการสร้างเอนไซม์ปฏิกิริยาอัลคาไลด์ฟอสฟาเตสของเซลล์กระดูกมนุษย์ (Primary human osteoblast) ตั้งแต่วันที่ 1 สูงสุดในวันที่ 14 และลดลงในวันที่ 21 ในสภาวะ osteogenic media

ดังนั้นในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงเลือกเซลล์ OB2 มาใช้ทดสอบการสะสมแคลเซียมในเมทริกซ์ระหว่างเซลล์ในกระบวนการ mineralization ของเซลล์ ทำการทดสอบเชิงคุณภาพ (Qualitative) โดยการย้อม Alizarin Red ซึ่งพบการย้อมติดสีแดงตั้งแต่วันที่ 7 ในทุกกลุ่มทดลองและควบคุม โดยวันที่ 14 ในกลุ่มทดลองที่มี TMV เซลล์ติดสีแดงเข้มขึ้นมีลักษณะ nodule มากกว่ากลุ่มควบคุม โดยเฉพาะในสภาวะ osteogenic media (ภาพประกอบ 15) แสดงให้เห็นว่า TMV ส่งเสริมการสะสมแคลเซียมในเมทริกซ์ระหว่างเซลล์ สอดคล้องกับการศึกษาของงานวิจัย Kaur G. และคณะในปี 2010⁽³⁰⁾ ที่พบว่าผลการตอบสนองของเซลล์ปฐมภูมิในเซลล์ต้นกำเนิดการสร้างกระดูกจากหนู (rBMSC) ที่มี TMV 0.033 mg/cm² เคลือบบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะ osteogenic media ติดสีย้อม Alizarin red ในวันที่ 7 และติดสีเข้มขึ้นในวันที่ 14 โดยเฉพาะตำแหน่งที่เซลล์มีการเกาะกลุ่มกันแบบ sheet like structure และจากการศึกษาของ Metavarayuth K. และคณะในปี 2015⁽²¹⁾ ที่พบว่าผลการตอบสนองของการย้อมเซลล์ rBMSC

ที่มี TMV ความเข้มข้น 1 mg/ml เคลือบบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะ osteogenic media ด้วย Alizarin red ในวันที่ 7 มีลักษณะติดสีเข้ม (deep red color) เป็นกลุ่มก้อนขนาดใหญ่ (large nodule) มากกว่ากลุ่มควบคุม และยังคงคล้องกับงานวิจัยของ Liu T. และคณะในปี 2019⁽¹¹⁾ ที่พบว่าเซลล์ rBMSC ที่มี TMV 1 mg/ml ในสภาวะ osteogenic media ในวันที่ 14 มีการสะสมแคลเซียมจากการติดสี Alizarin red เข้มมากกว่ากลุ่มควบคุม นอกจากนี้งานวิจัยของ Sitasuwan P. และคณะในปี 2012⁽⁶⁾ พบว่าในวันที่ 14 เซลล์ rBMSC ที่มี TMV ในสภาวะ osteogenic media ติดสี Alizarin red สีแดงเข้มในตำแหน่ง large nodule มากกว่ากลุ่มควบคุมที่เป็น small nodule ในสภาวะ media ธรรมดา โดยเมื่อวัดการสะสมแคลเซียมในเมทริกซ์ระหว่างเซลล์จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงของ Alizarin red พบว่า TMV ในสภาวะ osteogenic media มีค่ามากกว่ากลุ่มควบคุมในสภาวะ media ธรรมดา 2 เท่า

และจากการทดลองในงานวิจัยนี้พบว่า osteogenic media มีผลระดับปฏิบัติการเอนไซม์อัลคาไลด์ฟอสฟาเตสและการสะสมแคลเซียมในเมทริกซ์ระหว่างเซลล์ที่เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะเซลล์ในกลุ่มทดลองที่มี TMV ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก osteogenic media มีส่วนประกอบของ

Dexamethasone ซึ่งช่วยส่งเสริมการเกิด actin depolymerization มีผลเพิ่มระดับปฏิบัติการเอนไซม์อัลคาไลด์ฟอสฟาเตสของเซลล์ การสร้างโปรตีน Osteocalcin และส่งเสริมการสะสมแคลเซียมในเมทริกซ์ระหว่างเซลล์ β -glycerophosphate เป็นตัวเติมฟอสเฟต ในกระบวนการสะสมแคลเซียมในเมทริกซ์ระหว่างเซลล์ มีผลต่อการเพิ่มระดับปฏิบัติการเอนไซม์อัลคาไลด์ฟอสฟาเตสของเซลล์ และ Ascorbic acid เป็นแหล่งสร้างคอลลาเจนที่เป็นองค์ประกอบหลักของเมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix)^(8, 28, 31)

การสร้างโปรตีน Osteocalcin และการแสดงออกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์กระดูกบ่าฟันมนุษย์ โดย Osteocalcin เป็นโปรตีนที่จับกับแคลเซียม และการสะสมของไฮดรอกซีอะพาไทต์ พบมากในช่วง late osteoblast differentiation และพบโปรตีนสูงสุดในช่วง mineralization ซึ่งแสดงออกในเซลล์กระดูกที่เจริญเติบโตเต็มที่ (mature osteoblast and osteocyte)^(21, 32) โดยจากการศึกษา cell OB1 และ OB2 พบการย้อมติดสีแดงของโปรตีน Osteocalcin รอบนิวเคลียสภายใต้กล้อง Immunofluorescence ทั้งในวันที่ 7 และ 14 ของการทดลอง โดยกลุ่มทดลองที่มี TMV ให้การติดสีไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ทั้งใน สภาวะ osteogenic media และ non osteogenic media แสดงให้เห็นว่าในวันที่ 7 เซลล์มีการสะสมแร่ธาตุเกิดขึ้นแล้ว สอดคล้องกับการศึกษาของ Kaur G. และคณะในปี 2010⁽³⁰⁾ พบโปรตีน

Osteocalcin ตั้งแต่วันที่ 7 ของกลุ่มทดลองและติดสีเข้มขึ้นในวันที่ 14 โดยเฉพาะตำแหน่งที่เซลล์มีการเกาะกลุ่มกันแบบ sheet like structure

และจากการสังเกตลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์ โดยการติดสีย้อมของนิวเคลียสและ แอคติน ในสภาวะ osteogenic media และ non osteogenic media พบว่าทั้ง 2 สภาวะ เซลล์ OB1 ในกลุ่มทดลองมีลักษณะรูปร่างหลายเหลี่ยม (polygonal shape) เกาะกลุ่มกัน (aggregation) ตั้งแต่วันที่ 7 เร็วกว่า OB2 ที่เริ่มพบเซลล์เกาะกลุ่มกันในวันที่ 14 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีลักษณะยาวรีคล้ายเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (long narrow fibroblast like cell) และอยู่กระจ่ายกัน แสดงให้เห็นว่า TMV มีผลเร่งการเกาะกลุ่มของเซลล์กระดูกให้เร็วขึ้น โดยเซลล์ OB1 สอดคล้องกับการศึกษาของ Metavarayuth K. และคณะในปี 2015⁽²¹⁾ พบว่าเซลล์ rBMSC ที่มี TMV ในวันที่ 7 มีการแสดงออกของโปรตีน Osteocalcin ในตำแหน่ง cell aggregation โดยมีลักษณะเกาะกลุ่มกันเป็นก้อน nodules เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มี TMV ไม่แสดงการเกาะกลุ่มกันของเซลล์ ส่วนเซลล์ OB2 สอดคล้องกับการศึกษาของ Kaur G. และคณะในปี 2010⁽³⁰⁾ ที่พบว่าเซลล์ rBMSC กลุ่มทดลองที่มี TMV ในวันที่ 7 เซลล์มีลักษณะกระจ่ายตัวไม่เกาะกลุ่ม ส่วนวันที่ 14 พบเซลล์เปลี่ยนแลกรูปร่างเป็นเซลล์หลายเหลี่ยม (polygonal shape) และเกาะกลุ่มกันเป็นลักษณะ sheet like structure ทั้งนี้ลักษณะของเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างปลงมีการเกาะกลุ่มของเซลล์ (cell aggregation) เป็นการเปลี่ยนแปลง cytoskeletal ของเซลล์ที่แสดงการเกิดภาวะ cell differentiation⁽²⁸⁾

จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า การตอบสนองของของ Pluripotent stem cell เช่น Bone mesenchymal stem cell (BMSC) จากสัตว์ที่นิยมนำมาใช้ในงานวิจัย แตกต่างจาก Human bone mesenchymal stem cell (hBMSC) ที่มาจากมนุษย์ เนื่องจากเป็นคนละสปีชีส์ โดยเซลล์มนุษย์มีความสำคัญต่อการศึกษาทางคลินิกเนื่องจากไม่มีความแตกต่างทางสปีชีส์ แต่มีข้อเสียคือ มีหลายปัจจัยที่ทำให้การแสดงออกทาง Phenotype หลากหลาย เซลล์มีจำนวนจำกัด ยากต่อการควบคุมแหล่งที่มา⁽³³⁾ อีกทั้งการตอบสนองของ hBMSC ยังแตกต่างจาก Human osteoblast ดังเช่นในงานวิจัยของ Paino F. และคณะในปี 2013⁽³⁴⁾ ศึกษาผลของ Valproic acid ในระดับความเข้มข้นต่ำที่มีผลยับยั้งกระบวนการ Histone deacetylases (HDAC) ของเซลล์กระดูก ทำให้ช่วยส่งเสริมกระบวนการ Osteoblast differentiation โดยทำการศึกษาใน Dental pulp stem cell (DPSC) เปรียบเทียบกับ Osteoblast ที่ 48 ชั่วโมง พบการแสดงออกของยีนส์ Osteopontin (OPN) และ Bone Sialoprotein (BSP) ซึ่งเป็น Bone marker onset matrix mineralization ใน Dental pulp stem cell มากกว่า เซลล์ Osteoblast ทั้งนี้เนื่องจาก Dental pulp stem cell

ยังเป็น Pluripotent stem cell ที่ยังไม่เจริญเต็มที่ (Immature cell) เมื่อเทียบกับเซลล์ Osteoblast ทำให้ Dental pulp stem cell มีการตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นในกระบวนการสร้างกระดูก (Osteogenesis) ได้มากกว่า นอกจากนี้ยังพบว่ารูปแบบการตอบสนองของเซลล์มนุษย์ด้าน Phenotype และ Potential ยังขึ้นกับหลายปัจจัย เช่น แหล่งที่มาของเซลล์ อายุ เพศ ตำแหน่งที่รับมา กระบวนการเพาะเลี้ยงเซลล์ เป็นต้น⁽²⁸⁾

ดังนั้นงานวิจัยเกี่ยวกับไวรัสจากไบยาสูบต่อการกระตุ้นการสร้างกระดูก ที่ผ่านมา พบว่ามีการศึกษากับเซลล์ต้นกำเนิด (Stem cell) แต่ยังไม่มีการวิจัยไหนที่ศึกษาเซลล์ Osteoblast จากกระดูกเบ้าฟันมาก่อน (Human alveolar bone cells) งานวิจัยนี้คาดหวังว่าจะเป็นประโยชน์ในการต่อยอดงานวิจัยเพื่อพัฒนางานวิจัยทางคลินิกให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากในงานศึกษาวิจัยครั้งนี้พบว่าไวรัสจากไบยาสูบมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ ในการศึกษาครั้งต่อไปอาจทำการศึกษาเพิ่มเติมถึงประสิทธิภาพการยึดเกาะของเซลล์ต่อไวรัส และเพิ่มระยะเวลาการติดตามผลให้นานขึ้น นอกจากนี้อาจศึกษาไวรัสในรูปแบบ 3 มิติ เพื่อเลียนแบบโครงสร้างตามธรรมชาติโดยพัฒนาร่วมกับระบบนำส่งสารในรูปแบบต่างๆ เพื่อนำไปใช้งานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกทางทันตกรรมต่อไป

บรรณานุกรม

1. Bowler D, Dym H. Bone morphogenic protein: application in implant dentistry. *Dent Clin North Am.* 2015;59(2):493-503.
2. Nguyen HG, Metavarayuth K, Wang Q. Upregulation of osteogenesis of mesenchymal stem cells with virus-based thin films. *Nanotheranostics.* 2018;2(1):42-58.
3. Lo KW, Ulery BD, Ashe KM, Laurencin CT. Studies of bone morphogenetic protein-based surgical repair. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012;64(12):1277-91.
4. Steinmetz NF. Viral nanoparticles as platforms for next-generation therapeutics and imaging devices. *Nanomedicine.* 2010;6(5):634-41.
5. Zhao X, Lin Y, Wang Q. Virus-based scaffolds for tissue engineering applications. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2015;7(4):534-47.
6. Czapar AE, Steinmetz NF. Plant viruses and bacteriophages for drug delivery in medicine and biotechnology. *Curr Opin Chem Biol.* 2017;38:108-16.
7. Luckanagul JA, Lee LA, You S, Yang X, Wang Q. Plant virus incorporated hydrogels as scaffolds for tissue engineering possess low immunogenicity in vivo. *J Biomed Mater Res A.* 2014;103(3):887-95.
8. Sitasuwan P, Lee LA, Bo P, Davis EN, Lin Y, Wang Q. A plant virus substrate induces early upregulation of BMP2 for rapid bone formation. *Integr Biol (Camb).* 2012;4(6):651-60.
9. Luckanagul J, Lee LA, Nguyen QL, Sitasuwan P, Yang X, Shazly T, et al. Porous alginate hydrogel functionalized with virus as three-dimensional scaffolds for bone differentiation. *Biomacromolecules.* 2012;13(12):3949-58.
10. Maturavongsadit P, Luckanagul JA, Metavarayuth K, Zhao X, Chen L, Lin Y, et al. Promotion of In Vitro Chondrogenesis of Mesenchymal Stem Cells Using In Situ Hyaluronic Hydrogel Functionalized with Rod-Like Viral Nanoparticles. *Biomacromolecules.* 2016;17(6):1930-8.
11. Liu T, Zhao X, Wang L, Yang J, Metavarayuth K, Lin Y, et al. Using Plant Virus Based Nanorods to Modulate the Differentiation of Human Bone Marrow Stem Cells. *J*

Biomed Nanotechnol. 2019;15(2):363-72.

12. Kini U, Nandeesh BN. Physiology of Bone Formation, Remodeling, and Metabolism. 2012:29-57.
13. Vieira AE, Repeke CE, Ferreira Junior Sde B, Colavite PM, Bigueti CC, Oliveira RC, et al. Intramembranous bone healing process subsequent to tooth extraction in mice: micro-computed tomography, histomorphometric and molecular characterization. PLoS One. 2015;10(5):e0128021.
14. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. Injury. 2011;42(6):551-5.
15. Lee EJ, Kasper FK, Mikos AG. Biomaterials for tissue engineering. Ann Biomed Eng. 2014;42(2):323-37.
16. Chieruzzi M, Pagano S, Moretti S, Pinna R, Milia E, Torre L, et al. Nanomaterials for Tissue Engineering In Dentistry. Nanomaterials (Basel). 2016;6(7).
17. Hull R. Introduction. Plant Virology. 5 ed: ELSEVIER; 2014. p. 3-14.
18. Thomas D. Pollard WCE, ... Graham T. Johnson. Macromolecular Assembly. sciencedirect. 2017:63-74.
19. Ratnatilaka Na Bhuket P, Luckanagul JA, Rojsitthisak P, Wang Q. Chemical modification of enveloped viruses for biomedical applications. Integr Biol (Camb). 2018;10(11):666-79.
20. Lee LA, Nguyen QL, Wu L, Horvath G, Nelson RS, Wang Q. Mutant plant viruses with cell binding motifs provide differential adhesion strengths and morphologies. Biomacromolecules. 2012;13(2):422-31.
21. Metavarayuth K, Sitasuwan P, Luckanagul JA, Feng S, Wang Q. Virus Nanoparticles Mediated Osteogenic Differentiation of Bone Derived Mesenchymal Stem Cells. Adv Sci (Weinh). 2015;2(10):1500026.
22. Koch C, Eber FJ, Azucena C, Forste A, Walheim S, Schimmel T, et al. Novel roles for well-known players: from tobacco mosaic virus pests to enzymatically active assemblies. Beilstein J Nanotechnol. 2016;7:613-29.
23. Luckanagul JA, Metavarayuth K, Feng S, Maneesaay P, Clark AY, Yang X, et al. Tobacco Mosaic Virus Functionalized Alginate Hydrogel Scaffolds for Bone Regeneration

in Rats with Cranial Defect. ACS Biomaterials Science & Engineering. 2016;2(4):606-15.

24. Sitasuwan P, Lee LA, Li K, Nguyen HG, Wang Q. RGD-conjugated rod-like viral nanoparticles on 2D scaffold improve bone differentiation of mesenchymal stem cells. Front Chem. 2014;2:31.

25. Metavarayuth K, Maturavongsadit P, Chen X, Sitasuwan P, Lu L, Su J, et al. Nanotopographical Cues Mediate Osteogenesis of Stem Cells on Virus Substrates through BMP-2 Intermediate. Nano Lett. 2019;19(12):8372-80.

26. อารวีจิตร ข. การศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพของไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกแบบฉีดที่ดัดแปลงแล้วร่วมกับสารแมนนิทอลและบีเอสเอต่อเซลล์กระดูกเข้าพื้น เพื่อพัฒนาเป็นระบบนำส่งยา[ปริญญาานิพนธ์ วท.บ. สาขาวิทยาการช่องปากและแม็กซิลโลเฟเชียล].

27. Bruckman MA, Kaur G, Lee LA, Xie F, Sepulveda J, Breitenkamp R, et al. Surface modification of tobacco mosaic virus with "click" chemistry. ChemBiochem. 2008;9(4):519-23.

28. Wrobel E, Leszczynska J, Brzoska E. The Characteristics Of Human Bone-Derived Cells (HBDCS) during osteogenesis in vitro. Cell Mol Biol Lett. 2016;21:26.

29. Czekanska EM, Stoddart MJ, Ralphs JR, Richards RG, Hayes JS. A phenotypic comparison of osteoblast cell lines versus human primary osteoblasts for biomaterials testing. J Biomed Mater Res A. 2014;102(8):2636-43.

30. Kaur G, Valarmathi MT, Potts JD, Jabbari E, Sabo-Attwood T, Wang Q. Regulation of osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells on 2D nanorod substrates. Biomaterials. 2010;31(7):1732-41.

31. Coelho MJ, Fernandes MH. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, β -glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation. Biomaterials. 2000;21: 1095-102.

32. R. F, Tamura M. Acidic bone matrix proteins and their roles in calcification. Frontiers in Bioscience. 2012;17:1891-903.

33. Czekanska EM, Stoddart MJ, Richards RG, Hayes JS. In search of an osteoblast cell model for in vitro research. Eur Cell Mater. 2012;24:1-17.

34. Paino F, La Noce M, Tirino V, Naddeo P, Desiderio V, Pirozzi G, et al. Histone deacetylase inhibition with valproic acid downregulates osteocalcin gene expression in

human dental pulp stem cells and osteoblasts: evidence for HDAC2 involvement. *Stem Cells*. 2014;32(1):279-89.





ภาคผนวก

ตาราง 1 ผลทางสถิติของการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ เพื่อประเมินความมีชีวิตของ cell line OB1 โดยใช้สถิติ Independent Sample T-test ที่กำหนดระดับความเชื่อมั่น 95%

Group Statistics					
	gr	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
day1	noTMV	4	1.0000	.02160	.01080
	TMV	4	1.0000	.11225	.05612
day3	noTMV	4	.6925	.05852	.02926
	TMV	4	1.7175	.36436	.18218
day7	noTMV	4	3.0375	.07365	.03683
	TMV	4	3.0250	.50507	.25254
day14	noTMV	4	4.6850	.22752	.11376
	TMV	4	6.4475	.08302	.04151

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
day1	Equal variances assumed	3.992	.093	.000	6	1.000	.00000	.05715	-.13985	.13985
	Equal variances not assumed			.000	3.222	1.000	.00000	.05715	-.17501	.17501
day3	Equal variances assumed	5.310	.061	-5.555	6	.001	-1.02500	.18452	-1.47649	-.57351
	Equal variances not assumed			-5.555	3.155	.010	-1.02500	.18452	-1.59625	-.45375
day7	Equal variances assumed	3.753	.101	.049	6	.963	.01250	.25521	-.61197	.63697
	Equal variances not assumed			.049	3.128	.964	.01250	.25521	-.78127	.80627

day14	Equal variances assumed	1.340	.291	-	14.554	6	.000	-1.76250	.12110	-2.05881	-1.46619
	Equal variances not assumed			-	14.554	3.785	.000	-1.76250	.12110	-2.10639	-1.41861

ตาราง 2 ผลทางสถิติของการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ เพื่อประเมินความมีชีวิตของ cell line OB2 โดยใช้สถิติ Independent Sample T-test ที่กำหนดระดับความเชื่อมั่น 95%

	gr	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
d1	control	4	1.0000	.01826	.00913
	test	4	1.0025	.00500	.00250
d3	control	4	3.1325	.07455	.03728
	test	4	3.3550	.22219	.11109
d7	control	4	3.1875	.02630	.01315
	test	4	4.6800	.11015	.05508
d14	control	4	5.9800	.05715	.02858
	test	4	13.6150	.09747	.04873

 Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
d1	Equal variances assumed	12.789	.012	-.264	6	.801	-.00250	.00946	-.02566	.02066
	Equal variances not assumed			-.264	3.447	.807	-.00250	.00946	-.03053	.02553
d3	Equal variances assumed	8.098	.029	-1.899	6	.106	-.22250	.11718	-.50923	.06423
	Equal variances not assumed			-1.899	3.667	.137	-.22250	.11718	-.55983	.11483
d7	Equal variances assumed	13.500	.010	-26.358	6	.000	-1.49250	.05662	-1.63105	-1.35395

	Equal variances not assumed			- 26.35 8	3.341	.000	-1.49250	.05662	-1.66273	-1.32227
d14	Equal variances assumed	3.196	.124	- 135.1 45	6	.000	-7.63500	.05649	-7.77324	-7.49676
	Equal variances not assumed			- 135.1 45	4.845	.000	-7.63500	.05649	-7.78163	-7.48837

ตาราง 3 ผลทางสถิติของการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยอัตราการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ใน cell line OB1 ภายใต้สภาวะอาหารเลี้ยงเซลล์ osteogenic media (OSM) โดยใช้สถิติ Independent Sample T-test ที่กำหนดระดับความเชื่อมั่น 95%

Group Statistics

	gr	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
d1	control	4	15.5425	.48342	.24171
	test	4	25.1025	2.50456	1.25228
d3	control	4	54.8375	1.47717	.73858
	test	4	27.7350	2.04151	1.02076
d7	control	4	18.6275	.18482	.09241
	test	4	45.5525	.41572	.20786
d14	control	4	6.6075	.14614	.07307
	test	4	61.0750	5.23008	2.61504

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
d1	Equal variances assumed	8.826	.025	-7.496	6	.000	-9.56000	1.27539	-12.68078	-6.43922
	Equal variances not assumed			-7.496	3.223	.004	-9.56000	1.27539	-13.46440	-5.65560
d3	Equal variances assumed	.300	.604	21.511	6	.000	27.10250	1.25994	24.01954	30.18546
	Equal variances not assumed			21.511	5.465	.000	27.10250	1.25994	23.94496	30.26004
d7	Equal variances assumed	1.741	.235	-118.364	6	.000	-26.92500	.22748	-27.48162	-26.36838
	Equal variances not assumed			-118.364	4.141	.000	-26.92500	.22748	-27.54817	-26.30183
d14	Equal variances assumed	3.412	.114	-20.820	6	.000	-54.46750	2.61606	-60.86877	-48.06623
	Equal variances not assumed			-20.820	3.005	.000	-54.46750	2.61606	-62.78563	-46.14937

ตาราง 4 ผลทางสถิติของการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยอัตราการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ใน cell line OB1 ภายใต้สภาวะอาหารเลี้ยงเซลล์ non osteogenic media โดยใช้สถิติ Independent Sample T-test ที่กำหนดระดับความเชื่อมั่น 95%

Group Statistics					
	gr	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
d1	control	4	21.0775	1.27283	.63641
	test	4	21.9075	3.83020	1.91510
d3	control	4	59.0625	3.50742	1.75371
	test	4	28.7375	1.79071	.89535
d7	control	4	20.3075	.67643	.33822
	test	4	38.6050	.79232	.39616
d14	control	4	13.5600	.71633	.35817
	test	4	18.9850	.15264	.07632

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
d1	Equal variances assumed	2.660	.154	-.411	6	.695	-.83000	2.01808	-5.76805	4.10805
	Equal variances not assumed			-.411	3.655	.704	-.83000	2.01808	-6.64822	4.98822
d3	Equal variances assumed	1.303	.297	15.401	6	.000	30.32500	1.96905	25.50691	35.14309
	Equal variances not assumed			15.401	4.464	.000	30.32500	1.96905	25.07520	35.57480
d7	Equal variances assumed	.025	.880	-35.127	6	.000	-18.29750	.52089	-19.57208	-17.02292
	Equal variances not assumed			-35.127	5.856	.000	-18.29750	.52089	-19.57972	-17.01528
d14	Equal variances assumed	146.651	.000	-14.814	6	.000	-5.42500	.36621	-6.32108	-4.52892
	Equal variances not assumed			-14.814	3.272	.000	-5.42500	.36621	-6.53752	-4.31248

ตาราง 5 ผลทางสถิติของการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยอัตราการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ใน cell line OB2 ภายใต้สภาวะอาหารเลี้ยงเซลล์ osteogenic media (OSM) โดยใช้สถิติ Independent Sample T-test ที่กำหนดระดับความเชื่อมั่น 95%

Group Statistics					
	gr	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
d1	control	4	6.0850	.14154	.07077
	test	4	4.2875	.30248	.15124
d3	control	4	2.6325	.12553	.06277
	test	4	2.2050	.06191	.03096
d7	control	4	4.7850	.14201	.07100
	test	4	2.3700	.14652	.07326
d14	control	4	7.9575	.09323	.04661
	test	4	9.0975	.17289	.08645

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
d1	Equal variances assumed	3.226	.123	10.765	6	.000	1.79750	.16698	1.38892	2.20608
	Equal variances not assumed			10.765	4.254	.000	1.79750	.16698	1.34460	2.25040
d3	Equal variances assumed	2.615	.157	6.108	6	.001	.42750	.06999	.25625	.59875
	Equal variances not assumed			6.108	4.378	.003	.42750	.06999	.23963	.61537
d7	Equal variances assumed	.002	.966	23.672	6	.000	2.41500	.10202	2.16536	2.66464
	Equal variances not assumed			23.672	5.994	.000	2.41500	.10202	2.16530	2.66470
d14	Equal variances assumed	.794	.407	11.607	6	.000	-1.14000	.09821	-1.38032	-.89968
	Equal variances not assumed			11.607	4.609	.000	-1.14000	.09821	-1.39905	-.88095

ตาราง 6 ผลทางสถิติของการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยอัตราการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ใน cell line OB2 ภายใต้สภาวะอาหารเลี้ยงเซลล์ non osteogenic media โดยใช้สถิติ Independent Sample T-test ที่กำหนดระดับความเชื่อมั่น 95%

Group Statistics					
	gr	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
d1	control	4	5.5000	.10646	.05323
	test	4	5.6625	.02872	.01436
d3	control	4	1.6475	.15435	.07718
	test	4	1.5475	.02217	.01109
d7	control	4	3.3975	.06131	.03065
	test	4	1.3925	.06397	.03198
d14	control	4	3.1475	.03594	.01797
	test	4	3.2550	.23231	.11615

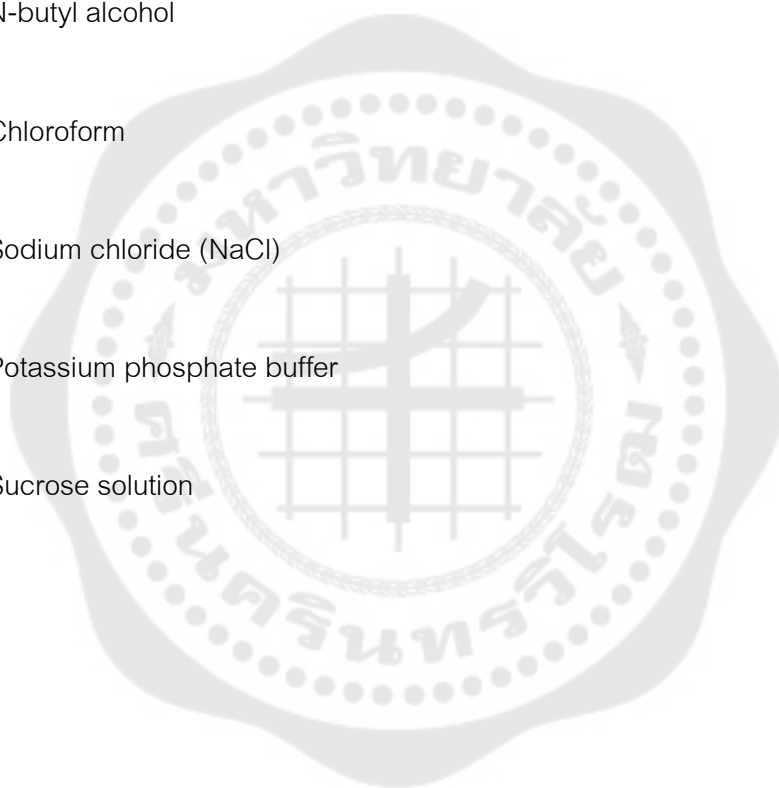
Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
d1	Equal variances assumed	22.827	.003	-2.947	6	.026	-.16250	.05513	-.29740	-.02760
	Equal variances not assumed			-2.947	3.434	.051	-.16250	.05513	-.32604	.00104
d3	Equal variances assumed	105.800	.000	1.283	6	.247	.10000	.07797	-.09078	.29078
	Equal variances not assumed			1.283	3.124	.287	.10000	.07797	-.14266	.34266
d7	Equal variances assumed	.025	.881	45.259	6	.000	2.00500	.04430	1.89660	2.11340
	Equal variances not assumed			45.259	5.989	.000	2.00500	.04430	1.89655	2.11345
d14	Equal variances assumed	5.770	.053	-.915	6	.396	-.10750	.11754	-.39510	.18010
	Equal variances not assumed			-.915	3.144	.425	-.10750	.11754	-.47207	.25707

รายการสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการสกัดไวรัสจากใบยาสูบ

1. 2-mercaptoethanol
2. N-butyl alcohol
3. Chloroform
4. Sodium chloride (NaCl)
5. Potassium phosphate buffer
6. Sucrose solution



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	อัญจิตา ชวนะโรจนฤทธิ์
วัน เดือน ปี เกิด	6 ธันวาคม 2531
สถานที่เกิด	อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2557 ระดับปริญญาตรี ทันตแพทยศาสตรบัณฑิต (ท.บ.) (เกียรตินิยมอันดับ 2) มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ พ.ศ. 2563 กำลังศึกษาปริญญาโท วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วท.ม.) มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ที่อยู่ปัจจุบัน	เลขที่ 8/208 โครงการศุภาลักษณ์การ์เด้นวิลล์ ถ.พัฒนาชนบท 3 แขวงคลอง สองต้นนุ่น เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร 10520

