INDUCTION OF MINERALIZATION BY NACREOUS WATER-SOLUBLE MATRIX OF *Pinctada maxima* IN CULTURED HUMAN DENTAL PULPAL CELLS

TITIKAN LAOTHUMTHUT

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY (ORAL BIOLOGY) FACULTY OF DENTISTRY MAHIDOL UNIVERSITY 2010

Copyright by Mahidol University

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

INDUCTION OF MINERALIZATION BY NACREOUS WATER-SOLUBLE MATRIX OF *Pinctada maxima* IN CULTURED HUMAN DENTAL PULPAL CELLS

TITIKAN LAOTHUMTHUT 4336166DTOB/D

Ph.D. (ORAL BIOLOGY)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: PANJIT CHUNHABUNDIT, Ph.D. (ANATOMY), SITTIRUK ROYTRAKUL, Ph.D. (PHYTOCHEMISTRY), JEERAPHAT JANTARAT, Ph.D. (DENTAL SCIENCES)

ABSTRACT

For dental treatment, dentin regeneration is required after a tooth injury with dental pulp exposure. During the reparative process of pulp injury in post natal teeth, the pulpal progenitor cells can differentiate into odontoblast-like cells which are mineralized tissue-forming cells. The finding of a potential substance that can induce mineralization is challenging and useful for clinical application. Though nacre, mother of pearl, has been shown to be a good osteoinductive biomaterial for bone cells, the information of its effect on other cell types is very limited. Therefore, it is of interest to study the effects of the water-soluble matrix (WSM) extracted from the nacreous layer of the bivalve *Pinctada maxima* on human dental pulpal cells *in vitro*.

WSM was obtained by extraction of fresh nacreous powder in double distilled water. Characterization of proteins in WSM were performed using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS- PAGE), reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) and matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). The biological activity of the cultured human dental pulp cell in response to WSM compared to Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) as a normal control and the DMEM supplemented with β glycerophosphate (BGP) as a positive control were investigated. The cell survival rate was analyzed by MTT assay. The induction of a mineralized matrix was observed after staining with Alizarin Red S and Von Kossa. Proteomic profiles among inducers and non inducers with time-dependency were compared by using SDS-PAGE combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry (GeLC-MS/MS).

WSM consisted of very hydrophobic proteins with diverse sizes. The highest cell survival rate was in WSM whereas the lowest rate was in BGP. Strong positive staining for mineralized nodules was found in the matrix of cells exposed to BGP, WSM, and DMEM, respectively. Many expressed proteins related induction of calcium deposition, inhibition of calcium deposition, and inhibition of cell growth were identified.

These results indicate that WSM of *Pinctada maxima* has the ability to induce mineralized nodule formation *in vitro* using human dental pulpal cells. This finding initiated the study to evaluate the suitability of nacre as biomaterial for Dentistry.

Copyright by Mahidol University

KEYWORDS: HUMAN DENTAL PULPAL CELL / MINERALIZATION/NACRE / *Pinctada maxima*

65 pages

การเหนี่ยวนำการเกิดแร่สะสมโดยเมทริกซ์ที่ละลายน้ำได้จากเปลือกหอยมุกจานในเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันมนุษย์เพาะเลี้ยง

INDUCTION OF MINERALIZATION BY NACREOUS WATER-SOLUBLE MATRIX OF *Pinctada maxima* IN CULTURED HUMAN DENTAL PULPAL CELLS

ฐิติกานต์ เหล่าธรรมทัศน์ 4336166DTOB/D

ปร.ด. (ชีววิทยาช่องปาก)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: ปานจิตต์ ชุณหบัณฑิต, Ph.D. (ANATOMY), สิทธิรักษ์ รอยตระกูล, Ph.D. (PHYTOCHEMISTRY), จีรภัทร จันทรัตน์, Ph.D. (DENTAL SCIENCES)

บทคัดย่อ

ในการรักษาทางทันตกรรมของฟันที่ขึ้นในช่องปากที่มีการบาดเจ็บชนิดลุกลามเนื้อเยื่อในนั้นมีความต้องการเนื้อฟันซ่อมเสริมที่สร้างจากเซลล์สร้างเนื้อฟันทุติยภูมิ ซึ่งเซลล์สร้างเนื้อฟันทุติยภูมินี้เจริญมาจากจากเซลล์ต้นกำเนิดที่พบได้บริเวณเนื้อเยื่อในโพรงฟันและสามารถเหนี่ยวนำการเกิดแร่สะสมเพื่อสร้างเนื้อฟันซ่อมเสริม ดั้งนั้นการศึกษาวัสดุทางชีวภาพที่มีความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาเป็นทันตวัสดุที่เหนี่ยวนำการเกิดแร่สะสมจึงเป็นสิ่งที่สำคัญ มีการศึกษาบทบาทเปลือกหอยมุกจานที่สามารถเหนี่ยวนำเซลล์กระดูกให้เกิดแร่สะสม ซึ่งการศึกษาถึงการเหนี่ยวนำนี้ในเซลล์ชนิดอื่นที่สามารถสร้างเนื้อเยื่อที่มีแร่สะสมนอกเหนือจากเซลล์กระดูกยังค่อนข้างจำกัด การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาบทบาทของเมทริกซ์ที่ละลายน้ำได้จากเปลือกหอยมุกจานในเซลล์เนื้อเ ยื่อในโพรงฟันมนุษย์เพาะเลี้ยง โดยวิธีการศึกษาประกอบด้วยการสกัดเมทริกซ์ที่ละลายน้ำได้จากเปลือกหอย มุกจานและการวิเคราะห์ทางเคมีของเมทริกซ์ที่สกัดได้โดยวิธี sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) และวิธี matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) นอกจากนี้วิธีการศึกษายังเปรียบเทียบผลการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันมนุษย์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ชนิด Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ปกติกับในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่เติมเมทริกซ์ที่ละลายน้ำได้จากเปลือกหอยมุกจาน (WSM) และอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่เติม β glycerophosphate (BGP) ซึ่งมีรายงานว่าสามารถกระตุ้นการเกิดแร่สะสม ในที่นี้ทำการศึกษาบทบาทของเมทริกซ์ที่ละลายน้ำได้ที่มีต่อเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันมนุษย์เพาะเลี้ยงจากอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์โดยวิธี MTT assay และบทบาทของเมทริกซ์ที่ละลายน้ำได้ในการเหนี่ยวนำการเกิดแร่สะสมโดยวิธีย้อมสี Alizarin Red S และ Von Kossa ร่วมกับศึกษาโปรตีนที่มีความเกี่ยวข้องที่แสดงออกในเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันมนุษย์เพาะเลี้ยงโดยวิธี SDS-PAGE และ liquid chromatography-tandem mass spectrometry (GeLC-MS/MS)

ผลจากการศึกษาพบว่าเมทริกซ์ที่ละลายน้ำได้จากเปลือกหอยมุกจานประกอบด้วยโปรตีนที่หลากหลายและมีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ ซึ่งสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตและเหนี่ยวนำการเกิดแร่สะสมในในเซลล์เนื้อเ ยื่อในโพรงฟันมนุษย์เพาะเลี้ยง เมทริกซ์นี้มีแนวโน้มที่น่าสนใจในการพัฒนาเป็นทันตวัสดุ จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

Copyright by Mahidol University

65 หน้า