

รายงานการวิจัยและนวัตกรรมฉบับสมบูรณ์

จีโนมิกส์เพื่อประชากรไทยที่มีความพิการทางช่องปากและฟัน

GENOMICS FOR THAI PEOPLE WITH ORO-DENTAL DISABILITY

รองศาตราจารย์ ทันตแพทย์หญิงฑัณฑริรา พรทวีทัศน์

คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยและนวัตกรรมฉบับสมบูรณ์จากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติประจำปี

งบประมาณ 2563

ปีที่พิมพ์ พ.ศ. 2564



รายงานการวิจัยและนวัตกรรมฉบับสมบูรณ์

จีโนมิกส์เพื่อประชากรไทยที่มีความพิการทางช่องปากและฟัน

GENOMICS FOR THAI PEOPLE WITH ORO-DENTAL DISABILITY

รองศาตราจารย์ ทันตแพทย์หญิงฑัณฑริรา พรทวีทัศน์

คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยและนวัตกรรมฉบับสมบูรณ์จากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติประจำปี

งบประมาณ 2563

ปีที่พิมพ์ พ.ศ. 2564

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยและนวัตกรรมฉบับสมบูรณ์จากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติประจำปีงบประมาณ 2563 และได้รับการสนับสนุนจากสถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข หน่วยปฏิบัติการวิจัยทางจีโนมิกส์และทันตกรรมแม่นยำ และคลัสเตอร์จีโนมิกส์การแพทย์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รองศาตราจารย์ ทันตแพทย์หญิงฑัณฑิรา พรทวีทัศน์ และคณะผู้วิจัย

บทสรุปผู้บริหาร

ผู้พิการทางร่างกายในประเทศไทยมีมากกว่า 2 ล้านคน โดยร้อยละ 52 หรือมากกว่า 1 ล้านรายไม่ทราบสาเหตุที่ทำให้เกิดความพิการ ซึ่งคาดว่าเป็นสาเหตุจากพันธุกรรม จากจำนวนผู้พิการทั้งประเทศพบความพิการบริเวณช่องปากและใบหน้ามากกว่าร้อยละ 7 หรือ มากกว่า 100 ประเภท อาทิ ปากแหว่งเพดานโหว่ มะเร็งช่องปาก ขากรรไกรเบี้ยว ฟันหายแต่กำเนิด ทำให้ผู้ป่วยเคี้ยวอาหารไม่ได้ พูดไม่ชัด ใบหน้าเบี้ยว ซึ่งนับเป็นความพิการที่กระทบต่อคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยเป็นอันมาก จากการสำรวจพบว่าการรักษาความพิการเหล่านี้มากกว่าร้อยละ 90 เป็นการรักษาเมื่อเกิดความพิการขึ้นแล้วและดูแลตามอาการ ซึ่งเป็นการรักษาที่ปลายเหตุ เกิดจากปัญหาหลัก คือ ผู้ป่วยไม่ได้รับการตรวจวินิจฉัยหาสาเหตุการเกิดความผิดปกติอย่างแท้จริง ทำให้ได้รับการรักษาที่ไม่เหมาะสม ไม่หายขาด สิ้นเปลืองทรัพยากรอย่างมหาศาล ในปัจจุบันการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสทั้งหมดของมนุษย์ถูกนำมาใช้ในการถอดรหัสพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับความพิการ ใช้ข้อมูลทางพันธุกรรมหรือข้อมูลในระดับโมเลกุลของบุคคลร่วมกับข้อมูลทางสุขภาพอื่น เช่น การดำเนินชีวิต และสิ่งแวดล้อม ใช้ข้อมูลขั้นสูงและฐานข้อมูลขนาดใหญ่ร่วมกับการวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศ เพื่อพัฒนาประสิทธิภาพของการรักษา ทำให้ได้ข้อมูลที่นำมาช่วยให้การวินิจฉัยสุดท้าย ทราบการพยากรณ์โรคอย่างแม่นยำ ลดผลข้างเคียงของการรักษา ลดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคชะลอความพิการในผู้สูงวัย ลดค่าใช้จ่ายในการรักษาไม่ตรงจุด และลดการเกิดความผิดปกติซ้ำ ดังนั้นวัตถุประสงค์โครงการ คือ

- เพื่อพัฒนาขีดความสามารถและคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยทางช่องปากและฟันและผู้สูงอายุให้เข้าถึงทรัพยากรและบริการสาธารณะของรัฐ
- ร่วมมือกับบุคลากรทางการแพทย์ และ สถานพยาบาลต่างๆ ให้บริการด้านการวินิจฉัยตรงจุดทางพันธุกรรมพยากรณ์และส่งเสริมการรักษาแก่ผู้ป่วยไทยที่มีความพิการทางช่องปากและฟันและผู้สูงอายุ ที่เข้าไม่ถึงเทคโนโลยีพันธุศาสตร์ที่ก้าวหน้า และให้คำปรึกษาทางพันธุศาสตร์แก่ครอบครัวผู้ป่วยเพื่อลดอุบัติการณ์การเกิดโรคซ้ำในประชากรไทย เพื่อไม่ให้ผู้ป่วยเป็นภาระการดูแลของผู้สูงอายุ และเพื่อไม่ให้เป็นผู้สูงอายุที่มีความพิการรุนแรงและเป็นภาระของสังคม
- สร้างผลงานทางการแพทย์ ทันตแพทย์ และวิทยาศาสตร์แขนงต่างๆ ด้านช่องปากและฟัน เพื่อนำไปสู่การค้นพบองค์ความรู้ใหม่ที่เป็นประโยชน์ต่อวงการวิจัยและวิชาการ
- สร้างความรู้ด้านพยาธิกำเนิดของความพิการ และค้นหาวิธีการรักษาความพิการทางช่องปากและฟัน จากต้นเหตุ เพื่อส่งเสริมคุณภาพชีวิตของผู้ป่วย ผู้สูงอายุและครอบครัว และป้องกันความพิการที่ยั่งยืน
- ผลิตบุคลากรทางทันตแพทย์เฉพาะทางด้านผู้สูงอายุและผู้ป่วยพิเศษ ที่ปรึกษาทางพันธุศาสตร์ และนักวิจัยเพื่อแก้ปัญหาทันตสาธารณสุขระดับชาติด้านสูงอายุและผู้พิการ

คณะผู้วิจัยเริ่มด้วยการศึกษาผู้ป่วยที่มีความพิการทางช่องปากและฟัน ที่เกิดจากความผิดปกติทางพันธุกรรม จากนั้นใช้ความเชี่ยวชาญด้านเวชศาสตร์ และทันตแพทยศาสตร์ตรวจลักษณะต่างๆ ทางคลินิก รังสี

ห้องปฏิบัติการให้ละเอียดที่สุด เพื่อกำหนดลักษณะฟีโนไทป์ แล้วนำตัวอย่างเลือด น้ำลาย มาวิเคราะห์หาการกลายพันธุ์ที่สารพันธุกรรมด้วยเทคโนโลยีวิเคราะห์ลำดับเบสทั้งหมด หรือเอ็กโซมทั้งหมด และ นำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศเพื่อระบุการกลายพันธุ์ทางพันธุกรรมที่ก่อให้เกิดความพิการ การค้นพบการกลายพันธุ์ของยีนใหม่จะได้รับการบันทึกไว้ในฐานข้อมูลออนไลน์ ที่นักวิทยาศาสตร์และผู้เชี่ยวชาญด้านการดูแลสุขภาพทั่วโลกสามารถเข้าถึงและนำไปใช้ได้ โดยเมื่อโครงการจีโนมิกส์ประเทศไทยเริ่มดำเนินการอย่างเป็นรูปธรรมส่วนของการวิเคราะห์จีโนมทั้งหมดของโครงการวิจัยจะส่งตัวอย่างเข้าสู่โครงการจีโนมิกส์ประเทศไทย หากพบการกลายพันธุ์ที่คาดว่าจะเป็นสาเหตุของโรคแต่ยังไม่มีการรายงานที่แน่ชัดจะนำไปศึกษากลไกของการเกิดโรค การวิเคราะห์เชิงหน้าที่รวมถึงอณูชีววิทยา ชีวเคมี อาทิ การวิเคราะห์ทรานสคริปโตม การวัดระดับโปรตีน การสังเคราะห์การกลายพันธุ์ในห้องทดลอง และการทดสอบทางเอนไซม์ เป็นต้น เพื่อยืนยันสาเหตุของความพิการ เป็นการสร้างองค์ความรู้ใหม่

นอกเหนือจากทางจีโนมิกส์ โครงการวิจัยดำเนินการศึกษาฟันเชิงโครงสร้างทางจุลภาค การวิเคราะห์เชิงโครงสร้างและองค์ประกอบของฟันและกระดูกขากรรไกรเพื่อทำความเข้าใจการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของฟันและกระดูกที่ผิดปกติหาวัสดุบูรณะที่เหมาะสม เพิ่มความสำเร็จทางการรักษา เซลล์จากฟันที่ถอนออก เนื้อเยื่อหรือกระดูกในช่องปากจะได้รับการเพาะเลี้ยงและตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับโมเลกุลที่เกิดขึ้น เพื่อศึกษาพยาธิสภาพของโรค และหาทางรักษาในระดับเซลล์ อีกทั้งวิเคราะห์ทรานสคริปโตมหรืออาร์เอ็นเอในน้ำลายและเซลล์จากช่องปากในผู้ป่วยที่มีการอักเสบช่องปากเรื้อรังและไม่ตอบสนองต่อการรักษาแบบดั้งเดิม โดยโครงการมีผลงาน ดังต่อไปนี้

1. สร้างผลงานทางการแพทย์ โครงการผลิตและเผยแพร่ผลงานตีพิมพ์ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ จำนวน 10 เรื่อง ใน 1 ปีที่ดำเนินการ ซึ่งเป็นองค์ความรู้ใหม่ทั้งในแง่สาเหตุ และพยาธิกำเนิดของความพิการทางช่องปากและฟัน เป็นองค์ความรู้ที่เป็นประโยชน์ต่อผู้ป่วย การแพทย์ การศึกษา และต่อยอดงานวิจัย
2. ด้านสาธารณสุข ส่งเสริมคุณภาพชีวิตและความสามารถของผู้ป่วยและครอบครัว : ให้การตรวจทางพันธุศาสตร์และคำปรึกษา ในผู้ป่วยที่มีปัญหาทางช่องปากและฟันและโรคทางพันธุกรรมป้องกันการเกิดความพิการซ้ำในครอบครัว ให้การวินิจฉัยตรงจุด ให้การพยากรณ์โรคที่ถูกต้อง ลดผลข้างเคียงของการรักษา และป้องกันหรือชะลอความพิการในผู้สูงอายุ ป้องกันการเสียชีวิตก่อนเวลาอันควร และลดการลดค่าใช้จ่ายในการรักษาที่แม่นยำ โดยในปีแรกได้ครอบคลุม ผู้ที่มีความผิดปกติของเคลือบฟัน เนื้อฟันไม่แข็งแรง มีการติดเชื้อในช่องปาก ผู้ที่มีฟันหาย ผู้ที่มีกล้ามเนื้ออ่อนแรง ผู้ป่วยที่มีกระดูกเปราะ และความผิดปกติทางเมตาบอลิซึม
3. ด้านการผลิตและพัฒนาบุคลากร

   3.1 พัฒนาบุคลากรทางทันตแพทย์ผู้เชี่ยวชาญด้านสูงอายุและผู้ป่วยพิเศษผ่านหลักสูตรทันตกรรมผู้สูงอายุและผู้ป่วยพิเศษ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 ร่างหลักสูตรผู้เชี่ยวชาญด้านพันธุศาสตร์ ร่วมกับเครือข่ายวิชาภาคีวิชาชีพสุขภาพ ได้แก่ การแพทย์ การพยาบาลทั นตแพทย์ เภสัชกรรมฯ และเทคนิคการแพทย์

3.3 พัฒนานักวิจัยที่มีความเชี่ยวชาญทางพันธุศาสตร์ เพื่อต่อยอดงานวิจัยด้านสูงอายุและผู้พิการด้วยเทคนิคทางพันธุศาสตร์ต่อไป

4. ด้านการเผยแพร่ความรู้

4.1 จัดประชุมนานาชาติเผยแพร่ความรู้ที่เป็นวิทยาการสมัยใหม่ เพื่อให้บุคลากรทางการแพทย์การศึกษาและบุคคลทั่วไปได้เข้าใจความสำคัญของช่องปากและฟัน ให้นักวิจัย นักศึกษา และนักเรียน มีเวทีแลกเปลี่ยนความรู้และสัมมนา

4.2 หลักสูตรฝึกอบรมระยะสั้นทันตแพทย์ผู้สนใจด้านผู้สูงอายุและผู้ป่วยพิเศษ เพิ่มสร้างความรู้และความเชี่ยวชาญ และนำกลับไปรักษาผู้สูงอายุและผู้ป่วยที่มีความพิการทางช่องปากและฟันในท้องที่

5. เครือข่ายการส่งต่อผู้ป่วย และสร้างความร่วมมือของบุคลากรทางการแพทย์ในศาสตร์ต่างๆ

5.1 ร่าง standard of operation การรับส่งต่อผู้ป่วยโดยตรงทางศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านพันธุศาสตร์และการแพทย์แม่นยำ และหน่วยปฏิบัติการวิจัยทางจีโนมิกส์และทันตกรรมแม่นยำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.2 คณะทำงานในเครือข่ายโรคหายาก เพื่อสร้างแนวทางในการส่งต่อผู้ป่วย การวิจัยและการประยุกต์ใช้การบริการ การวิเคราะห์ข้อมูลและการจัดการ จริยธรรมกฎหมาย และทางสังคม ผลิตและพัฒนาบุคลากร และการส่งเสริมการพัฒนาการอุตสาหกรรมใหม่ ภายใต้โครงการจีโนมิกส์ไทยแลนด์ อันประกอบด้วย โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ มหาวิทยาลัยขอนแก่น มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โรงพยาบาลเด็ก และโรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า

6. จัดทำคู่มือ การดูแลผู้ป่วยที่มีปัญหาทางพันธุกรรมและความพิการทางช่องปากและฟัน เริ่มจากผู้ป่วยพาร์กินสัน เนื่องจาก เป็นโรคพบบ่อยในผู้สูงอายุและมีผลกระทบต่อการดูแลสุขภาพช่องปาก ซึ่งคู่มือสามารถใช้ได้กับทางผู้ป่วย ผู้ดูแล คนในครอบครัว และบุคลากรทางการแพทย์ที่ดูแลผู้ป่วย มุ่งหวังให้ประชากรผู้สูงอายุมีสุขภาพที่ดีและพึ่งพาตัวเองได้ ตาม key result ของโปรแกรมสังคมผู้สูงวัย

โดยสรุป ผลการศึกษาของโครงการวิจัยเรื่องจีโนมิกส์เพื่อประชากรไทยที่มีความพิการทางช่องปากและฟันสอดคล้องกับวัตถุประสงค์ สร้างผลงานทางการแพทย์ สร้างความร่วมมือของบุคลากรทางการแพทย์ สร้างความรู้ด้านพยาธิกำเนิดของความพิการ การผลิตบุคลากรทางการแพทย์ และการพัฒนาเพิ่มขีดความสามารถและคุณภาพชีวิตของผู้สูงอายุและผู้ป่วยที่มีความพิการทางช่องปากและฟัน

หน่วยงานผู้ใช้ประโยชน์จากงานวิจัย ได้แก่ บุคลากรทางการแพทย์ ทันตแพทย์ ทันตบุคลากร นักวิจัย นักวิชาการ นักศึกษา นักเรียน และผู้ที่สนใจด้านพันธุศาสตร์และความพิการทางช่องปากและฟัน จากหน่วยงาน

ต่างๆ เช่น กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมการแพทย์ กรมควบคุมโรค กรมอนามัยกรมสุขภาพจิต คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล คณะแพทยศาสตร์และคณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี คณะแพทยศาสตร์และคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ มหาวิทยาลัยบูรพา มหาวิทยาลัยนเรศวร โรงพยาบาลเด็ก วิทยาลัยแพทย์ศาสตร์โรงพยาบาลพระมงกุฎ โรงพยาบาลราชวิถี โรงพยาบาลพระปกเกล้าจันทบุรี สถาบันมะเร็งแห่งชาติ สถาบันโรคทรวงอก สถาบันทันตกรรม สำนักงานทันตะสาธารณสุข แพทยสมาคมแห่งประเทศไทย ทันตแพทย์สมาคมแห่งประเทศไทย สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย สมาคมมนุษยพันธุศาสตร์ แพทยสภา สภาการพยาบาล สภาเภสัชกรรม สภาเทคนิคการแพทย์ และทันตแพทยสภา

บทคัดย่อ

ผู้พิการที่มีความพิการบริเวณช่องปากและใบหน้ามีมากกว่าร้อยละ 7 หรือ มากกว่า 100 ประเภท ซึ่งนับเป็นความพิการที่กระทบต่อคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยเป็นอันมาก การรักษาความพิการเหล่านี้มากกว่าร้อยละ 90 เป็นการรักษาเมื่อเกิดความพิการขึ้นแล้วและดูแลตามอาการ ผู้ป่วยไม่ได้รับการตรวจวินิจฉัยหาสาเหตุทำให้ได้รับการรักษาที่ไม่เหมาะสม ในปัจจุบันการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสทั้งหมดของมนุษย์ถูกนำมาใช้ในการถอดรหัสพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับความพิการร่วมกับข้อมูลทางสุขภาพและการวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศ เพื่อพัฒนาประสิทธิภาพของการรักษา ดังนั้นวัตถุประสงค์โครงการ คือ 1. เพื่อพัฒนาขีดความสามารถและคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยทางช่องปากและฟันและผู้สูงอาย 2. ร่วมมือกับบุคลากรทางการแพทย์ และสถานพยาบาลต่างๆ ให้บริการด้านการวินิจฉัยตรงจุด พยากรณ์ และส่งเสริมการรักษาแก่ผู้ป่วยไทยที่มีความพิการทางช่องปากและฟันและผู้สูงอายุ 3. สร้างผลงานทางการแพทย์ ทันตแพทย์ และวิทยาศาสตร์แขนงต่างๆ ด้านช่องปากและฟัน เพื่อนำไปสู่การค้นพบองค์ความรู้ใหม่ที่เป็นประโยชน์ต่อวงการวิจัยและวิชาการ 4. สร้างความรู้ด้านพยาธิกำเนิดของความพิการ 5. ผลิตบุคลากรทางทันตแพทย์เฉพาะทางด้านผู้สูงอายุและผู้ป่วยพิเศษ ที่ปรึกษาทางพันธุศาสตร์

ผลงานของโครงการในหนึ่งปีที่ผ่านมา ประกอบด้วย 1. ผลิตและเผยแพร่ผลงานตีพิมพ์ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ จำนวน 10 เรื่อง ซึ่งเป็นองค์ความรู้ใหม่ทั้งในแง่สาเหตุและพยาธิสภาพของความพิการทางช่องปากและฟัน เป็นประโยชน์ต่อผู้ป่วย การแพทย์ การศึกษา และต่อยอดงานวิจัย 2. ด้านสาธารณสุข ส่งเสริมคุณภาพชีวิตและความสามารถของผู้ป่วยและครอบครัว ให้การตรวจทางพันธุศาสตร์และคำปรึกษาแก่ผู้ป่วยเพื่อเฝ้าระวังความผิดปกติซ่อนเร้น ป้องกันการเกิดความพิการซ้ำในครอบครัว ครอบคลุมผู้ที่มีความผิดปกติของเคลือบฟัน เนื้อฟันไม่แข็งแรง ติดเชื้อในช่องปาก ผฟันหาย กล้ามเนื้ออ่อนแรง กระดูกเปราะ และความผิดปกติทางเมตาบอลิซึม 3. ด้านการผลิตและพัฒนาบุคลากรทางทันตแพทย์ อบรมทันตแพทย์ผู้เชี่ยวชาญด้านผู้สูงอายุและผู้ป่วยพิเศษ และร่างหลักสูตรผู้ให้คำปรึกษาทางพันธุศาสตร์เป็นครั้งแรกในประเทศไทย ร่วมกับภาคีเครือข่ายวิชาชีพด้านสุขภาพ และสร้างนักวิจัยที่มีความเชี่ยวชาญทางพันธุศาสตร์ 4. ด้านการเผยแพร่ความรู้ จัดประชุมนานาชาติและหลักสูตรฝึกอบรมระยะสั้นให้แก่ทันตแพทย์ผู้สนใจด้านผู้สูงอายุและผู้ป่วยพิเศษ 5. ร่างแนวทางการรับส่งต่อผู้ป่วยและเริ่มดำเนินการเครือข่ายการส่งต่อผู้ป่วยทั้งทางตรงและทางอ้อมโดยผ่านเครือข่ายโรคหายากแห่งประเทศไทย 6. จัดทำคู่มือการดูแลช่องปากผู้ป่วยที่มีปัญหาทางพันธุกรรมและความพิการทางช่องปากและฟัน

โดยสรุป ผลการศึกษาของโครงการวิจัยนี้สอดคล้องกับวัตถุประสงค์ สร้างผลงานทางการแพทย์ สร้างความร่วมมือของบุคลากรทางการแพทย์ สร้างความรู้ด้านพยาธิกำเนิดของความพิการ การผลิตบุคลากรทางการแพทย์และการพัฒนาเพิ่มขีดความสามารถและคุณภาพชีวิตของผู้สูงอายุและผู้ป่วยที่มีความพิการทางช่องปากและฟัน โดยมีหน่วยงานผู้ใช้ประโยชน์จากงานวิจัย ได้แก่ บุคลากรและหน่วยงานทางสาธารณสุข การศึกษา และการวิจัย

คำสำคัญ: ผู้สูงอายุ สุขภาพ ความพิการ ช่องปากและฟัน ประชากรไทย

Abstract

Orodental disabilities comprise more than 100 anomalies which affect mastication, speech, esthetics, and quality of life. Diagnosis of disabilities is complicated and could take up to 6 years. In recent years, the advancement in whole genome sequencing has been progressed tremendously. Analysis of genetic data and environmental factors using big data, bioinformatics, and artificial intelligence can enhance genetic diagnosis, leading to precise diagnosis and treatment of disabilities. The aims of this project were therefore to 1. improve capabilities, performance, and quality of life of the disabled and elderly affected with orodental anomalies, 2. collaborate with medical specialties and health care facilities to deliver precise diagnosis, prognosis, prevention, and better management to the orodental health disabled, 3. produce international research publications for worldwide knowledge distribution 4. discover novel knowledge about causes and pathogenesis of orodental disabilities 5. train dental professionals specialized in geriatric and patients with special needs and those who are expertise in genetics

The project outputs in the first year period comprised 1. publishing ten international research articles reporting novel knowledge of causes and pathologies of orodental disabilities benefiting academics, health care, and research, 2. delivering precise diagnosis and genetic counselling to the disabled patients and their families and minimizing the recurrent risk of disabilities in the families. Patients recruited in this project were those with tooth agenesis, weak tooth dentine, brittle teeth and bone, flaccid muscle, neurological problems, and abnormal metabolism, 3. traineing specialized dentists in geriatrics and patients with special needs at Chulalongkorn University and drafted the genetic counsellor program in collaboration with the Health Professional Associate, 4. organizing the international conference and being invited as speakers/presenters for knowledge dissemination, 5. developing network and guideline for patient referral (direct and indirect via Thailand Rare Disease Network), 6. formulating the oral care manual for the disabled, care takers, families, and health care professionals.

In conclusion, this project delivers outputs that fulfill the study objectives including international publication (above expected), medical collaboration, knowledge distribution, personnel development, and heath care improvement for the disabled and elderly. The organizations benefiting from this project are health, academic, and research sectors.

Keywords: Geriatrics, Health, Disabilities, Orodental, Thais

สารบัญเรื่อง

หน้า

ปกใน
กิตติกรรมประกาศ ก
บทสรุปผู้บริหาร ข
บทคัดย่อและคำสำคัญ ค
Abstract and keywords ง
บทที่ 1 1
บทนำ 1
1.1 หลักการและเหตุผล 1
1.2 วัตถุประสงค์ 4
บทที่ 2 5
ทบทวนวรรณกรรม 5
2.1 ความทุพพลภาพทางช่องปากและฟัน 5
2.2 โรคและความผิดปกติทางช่องปากและฟันและอิทธิพลทางพันธุกรรม 5
2.3 โรคปริทันต์อักเสบเรื้อรัง 5
2.4 โรคปริทันต์อักเสบรุนแรง 6
2.5 มะเร็งช่องปาก 6
2.6 ฟันหายกับพันธุกรรม และโรคทางระบบ 7
2.7 ภาวะฟันเกินกับพันธุกรรม และโรคทางระบบ 10
2.8 เคลือบฟันที่ผิดปกติกับพันธุกรรม และโรคทางระบบ 11
2.9 เนื้อฟันที่ผิดปกติกับพันธุกรรม และโรคทางระบบ 17
2.10 ภาวะทางช่องปาก โรคทางระบบและโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง 27
2.11 เซลล์มีเซนไคม์ 32
2.12 เทคโนโลยีการหาลำดับเบส 32

บทที่ 3 34
ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย 34
3.1 ขอบเขตของการวิจัย 34
3.2 การระบุตัวผู้ป่วยและสร้างเครือข่าย 35
3.3 การวิเคราะห์ลำดับเบสทั้งหมด การวิเคราะห์เอ็กโซมทั้งหมด และโอมิกส์ 35
3.4 การวิเคราะห์โครงสร้างฟันและกระดูกเบ้าฟัน 35
3.5 การเพาะเลี้ยงเซลล์และศึกษาพฤติกรรมของเซลล์ช่องปากและฟัน 35
3.6 การใช้ข้อมูลทางพันธุกรรม เพื่อเสริมสร้างสุขภาพของผู้สูงอายุ การเก็บฐานข้อมูล และพัฒนากำลังคน 36
บทที่ 4 38
ผลการวิจัย 38
4.1 ความผิดปกติของเคลือบฟันและการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างเคลือบฟันกับอายุ 38
4.2 ความผิดปกติของเนื้อฟันและกระดูกเปราะ 46
4.3 ภาวะฟันหายและการไม่มีฟัน 60
4.4 โครงสร้างใบหน้าและช่องปากกับภาวะทางสมองที่ผิดปกติ 66
4.5 ผลงานวิจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับช่องปากและฟันและภาวะทางพันธุกรรมที่เผยแพร่ในระดับนานาชาติ 69
4.6 ระบบสุขภาพ เพื่อส่งต่อผู้ป่วยที่มีความพิการทางช่องปากและฟัน 71
4.7 แผนการพัฒนาบุคลากรด้านพันธุศาสตร์ 80
4.8 การสร้างบุคลากรด้านการดูแลผู้สูงอายุและผู้ป่วยพิเศษ 94
4.9 การจัดบรรยายและสัมมนาเพื่อเป็นเวทีถ่ายทอดความรู้และอภิปราย 106
4.10 โครงการจัดอบรมระยะสั้นทันตกรรมผู้สูงอายุ 117
4.11 คู่มือการดูแลผู้ป่วย 120
บทที่ 5 121
อภิปรายและวิจารณ์ผล 121
บทที่ 6 126
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 126

บรรณานุกรม 129
ภาคผนวก 134
สรุปผลงานวิจัย/โครงการวิจัย 1 หน้ากระดาษ A4 (สำหรับประชาสัมพันธ์) 134
สรุปผลงานวิจัย/โครงการวิจัย 5 บรรทัด 137
สรุปงานวิจัยในรูปแบบ info graphic 139
แบบฟอร์มประเมินผลการวิจัยในการนำไปใช้ประโยชน์อย่างเป็นรูปธรรม 141
ผลงานตีพิมพ์ และเอกสารอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย 148
ส่วนประกอบตอนท้าย ประวัติคณะผู้วิจัย 260

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 โรคที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของเนื้อฟัน 26
ตารางที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนฟันที่เหลืออยู่และสุขภาพช่องปากต่อความรุนแรงของโรคอัลไซเมอร์ อย่างมีนัยสำคัญ 29
ตารางที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างสุขภาพช่องปากและความเสี่ยงในการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด 30
ตารางที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนฟันที่เหลืออยู่ กับการเข้าโรงพยาบาลเนื่องจากปัญหา โรคหัวใจและหลอดเลือด 31
ตารางที่ 5 ลักษณะฟันหายของผู้ป่วยทั้งหมด 64
ตารางที่ 6 ความถี่ของอัตราการเกิดการกลายพันธุ์ในแต่ละเชื้อชาติ 65

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1 แผนภูมิโครงการในปีที่ 1 3
รูปที่ 2 ลักษณะทางคลินิกและภาพถ่ายรังสีแสดงภาวะฟันหายในผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์โรค 9
รูปที่ 3 ลักษณะทางคลินิก ภาพถ่ายรังสี และพงศาวลีของครอบครัวที่แสดงภาวะฟันหายสัมพันธ์กับการกลายพันธุ์ของยีน PITX2 10
รูปที่ 4 ภาพถ่ายรังสี แสดงฟันเกินจำนวนมากในขากรรไกรของผู้ป่วยโรคที่มีกระดูกบกพร่อง 11
รูปที่ 5 ลักษณะทางคลินิกและภาพถ่ายรังสีของผู้ป่วยที่เคลือบฟันผิดปกติ สัมพันธ์กับการกลายพันธุ์ของยีน FAM83H 13
รูปที่ 6 ลักษณะทางคลินิกและภาพถ่ายรังสีของผู้ป่วยที่เคลือบฟันผิดปกติและมีเหงือกโต สัมพันธ์กับการกลายพันธุ์ของยีน FAM20A 14
รูปที่ 7 ลักษณะทางคลินิกและภาพถ่ายรังสีของผู้ป่วยที่มีเคลือบฟันบางสีกรุนแรง นิ้วมือมีการเชื่อมติดกัน สัมพันธ์กับการกลายพันธุ์ของยีน GJA1 17
รูปที่ 8 ภาพถ่ายช่องปากและภาพถ่ายรังสีของผู้ป่วยที่มีเนื้อฟันบกพร่อง 19
รูปที่ 9 ภาพถ่ายทางคลินิกและภาพรังสีของผู้ป่วยที่มีความพิการทางกระดูก 19
รูปที่ 10 ลักษณะของเนื้อฟันภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 21
รูปที่ 11 ภาพถ่ายรังสีแสดงฟันรากสั้น มีการติดเชื้อปลายรากฟัน และโพรงประสาทฟันตีบ 22
รูปที่ 12 ลักษณะผิวหนังของผู้ป่วย Ehlers-Danlos syndrome ที่มีความยืดหยุ่นมากกว่าปกติ 23
รูปที่ 13 รูปแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการสูญเสียฟันในผู้สูงอายุกับอัตราการตายจากโรคอัลไซเมอร์ อัตราการเกิดโรคอัลไซเมอร์ และความจำเสื่อม 28
รูปที่ 14 รูปแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสุขภาพช่องปากและอวัยวะปริทันต์กับอัตราการตายจากโรคอัลไซเมอร์ อัตราการเกิดโรคอัลไซเมอร์ และความจำเสื่อม 29
รูปที่ 15 เซลล์มีเซนไคม์จากฟัน 32
รูปที่ 16 รูปภาพแสดงภาพรวมวิธีการวิจัย 33
รูปที่ 17 ฟีโนไทป์และพงศาวลีของครอบครัวที่ 1 ที่เคลือบฟันผิดปกติ 40
รูปที่ 18 ฟีโนไทป์และพงศาวลีของครอบครัวที่ 2 และ 3 ที่เคลือบฟันผิดปกติ 41
รูปที่ 19 พงศาวลีและลักษณะการกลายพันธุ์ของครอบครัวที่เคลือบฟันผิดปกติ 42
รูปที่ 20 ลักษณะโครงสร้างฟันที่ผิดปกติ 43
รูปที่ 21 ลักษณะโครงสร้างฟันทางจุลภาค 44

รูปที่ 22 ภาพแสดงการเปลี่ยนแปลงของเคลือบฟันที่มีความบกพร่องในการสร้างเคลือบฟันจากการกลายพันธุ์ของสารพันธุกรรมตามช่วงอายุ 45
รูปที่ 23 ลักษณะฟันของผู้ป่วยทั้งสามรายที่มีเนื้อฟันผิดปกติ 47
รูปที่ 24 พงศาวลีครอบครัวและลักษณะการกลายพันธุ์ของสารพันธุกรรมที่มีเนื้อฟันไม่สมบูรณ์ 47
รูปที่ 25 ความแข็งไมโครของชั้นเคลือบฟันและเนื้อฟันในตัวอย่างฟันของผู้ป่วยที่มีเนื้อฟันไม่สมบูรณ์ 48
รูปที่ 26 ภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด 49
รูปที่ 27 ลักษณะพยาธิวิทยาของฟันผู้ป่วย ทั้ง 3 ราย ที่มีเนื้อฟันไม่สมบูรณ์ 49
รูปที่ 28 ลักษณะทางคลินิกและภาพถ่ายรังสีของผู้ป่วยที่มีเนื้อฟันไม่สมบูรณ์ 51
รูปที่ 29 ลักษณะทางคลินิกและภาพถ่ายของผู้ป่วยที่มีฟันไม่สมบูรณ์ 52
รูปที่ 30 พงศาวลี และการวิเคราะห์ทางพันธุกรรม 53
รูปที่ 31 ลักษณะเชิงลึกและลักษณะทางฟิสิกส์ของฟัน 54
รูปที่ 32 ลักษณะทางพยาธิวิทยา 55
รูปที่ 33 แผนภูมิแสดงการทำงานของเอนไซม์ S1P S2P 56
รูปที่ 34 รูปภาพแสดงลักษณะทางคลินิกและภาพถ่ายรังสีของผู้ป่วยที่เป็นโรค IFAP 57
รูปที่ 35 แสดงโครงสร้างของยีน MBTPS2 และโปรตีน S2P 58
รูปที่ 36 แผนภูมิแสดงการเกิดการกลายพันธุ์ในตำแหน่งต่างๆของยีนและทำให้เกิดโรคที่แตกต่างกัน 59
รูปที่ 37 ลักษณะทางคลินิกและภาพถ่ายรังสีของผู้ป่วยห้าที่แสดงภาวะฟันหายหลายซี่ 62
รูปที่ 38 ลักษณะพงศาวลีและแสดงการกลายพันธุ์ของผู้ป่วยและสมาชิกในครอบครัวทั้งห้าครอบครัว 63
รูปที่ 39 ลักษณะทางคลินิกและภาพถ่ายรังสีของผู้ป่วยที่มีกล้ามเนื้ออ่อนแรงและความผิดปกติทางสมอง 67
รูปที่ 40 รูปภาพแสดงโครงสร้างลักษณะยีนและโปรตีน PYCR2 และตำแหน่งที่มีการกลายพันธุ์ 68
รูปที่ 41 แผนที่เครือข่าย ของ T-RUN และ จีโนมิกส์ประเทศไทย 76
รูปที่ 42 โครงสร้างและแผนการทำงานของ T-RUN 77
รูปที่ 43 ขั้นตอนการทำงานการตรวจทางจีโนมิกส์ของโครงการจีโนมิกส์ประเทศไทย 78
รูปที่ 44 รายละเอียดการทำงานของโครงการจีโนมิกส์ประเทศไทย 78
รูปที่ 45 กระบวนการการทำงานด้านมาตรการต่างๆ สำหรับผู้ป่วยที่มีความพิการทางช่องปากและฟันผ่านโครงการจีโนมิกส์ประเทศไทย 79
รูปที่ 46 แผนภูมิแสดงประโยชน์ของการตรวจจีโนมิกส์ในประเทศไทย 79

บทที่ 1
บทนำ
1.1 หลักการและเหตุผล

ในยุคปัจจุบันโครงสร้างประชากรไทยที่มีเด็กเกิดน้อย และผู้สูงอายุเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง กำลังเข้าสู่สังคมผู้สูงอายุโดยสมบูรณ์ โดยมีการประเมินว่าประเทศไทยจะมีประชากรผู้สูงอายุ 20% ของประชากรทั้งหมดในปี 2561 ซึ่งมีจำนวนมากกว่าวัยเด็กหลายแสนคน ผู้สูงอายุเป็นกลุ่มที่มีความเสี่ยงสูงต่อการเกิดโรคต่างๆ ในผู้ที่มีอายุมากกว่า 65 ปี มีโอกาสป่วยเป็นโรคเรื้อรังหนึ่งโรคหรือมากกว่า สาเหตุมาจากความเสื่อมตามธรรมชาติและโรคประจำตัวเรื้อรัง โรคทางทันตกรรมนับเป็นปัญหาระดับต้นๆที่พบในผู้สูงอายุเกือบทุกราย ดังนั้นทันตกรรมผู้สูงอายุจึงไม่ใช่การทำฟันผู้ป่วยในคลินิกทันตกรรมเท่านั้น แต่เป็นการดูแลรักษาผู้ป่วยที่มีโรคและความพิการเรื้อรัง การมีระบบจัดการเพื่อส่งเสริมการป้องกันโรค อันรวมถึง โรคฟัน เนื้อฟันไม่แข็งแรง การสูญเสียฟัน โรคปริทันต์ มะเร็งช่องปาก และโรคทางระบบ ย่อมเป็นการส่งเสริมสุขภาพผู้สูงอายุที่ยั่งยืน มีสุขภาพฟันและร่างกายที่แข็งแรงและมีความสุข

ความพิการทางช่องปากและฟันมีมากกว่า 100 ประเภท อาทิ ปากแหว่งเพดานโหว่ มะเร็งช่องปาก ขากรรไกรเบี้ยว ฟันหายแต่กำเนิด ผู้ป่วยเคี้ยวอาหารไม่ได้ พูดไม่ชัด ใบหน้าเบี้ยว การรักษาความพิการเหล่านี้มากกว่าร้อยละ 90 เป็นการดูแลตามอาการ ซึ่งเป็นการรักษาที่ปลายเหตุ เนื่องจากผู้ป่วยไม่ได้รับการตรวจวินิจฉัยหาสาเหตุการเกิดโรคอย่างแท้จริง จึงทำให้ได้รับการรักษาที่ไม่เหมาะสม ทำให้โรคไม่หายขาด สิ้นเปลืองทรัพยากรอย่างมหาศาล จากรายงานข้อมูลสถานการณ์ด้านคนพิการในประเทศไทยของกระทรวงการพัฒนาสังคมและความมั่นคงของมนุษย์ ณ วันที่ 30 มิถุนายน 2562 พบผู้พิการทางร่างกายกว่า 2 ล้านคน ร้อยละ 52 หรือมากกว่า 1 ล้านรายไม่ระบุสาเหตุที่ทำให้เกิดความพิการ ซึ่งคาดว่าเป็นสาเหตุจากพันธุกรรม จากจำนวนผู้พิการทั้งประเทศพบความพิการช่องปากและฟันมากถึงร้อยละ 7 ความพิการบริเวณช่องปากและใบหน้านับเป็นความพิการที่กระทบต่อคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยเป็นอย่างมาก นอกจากส่งผลต่อร่างกาย จิตใจ พฤติกรรม และการเข้าสังคมแล้ว ยังส่งผลกระทบทางเศรษฐกิจและสังคมทั้งในระดับบุคคล ครอบครัว ชุมชนและประเทศชาติอีกด้วย

การมีสัดส่วนประชากรผู้สูงอายุที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ทำให้เห็นว่าประเทศไทยต้องเตรียมความพร้อมรองรับการเป็นสังคมผู้สูงอายุ โครงการวิจัยนี้เล็งเห็นความสำคัญของการวินิจฉัยอย่างแม่นยำในโรคผู้สูงอายุ อาทิ ภาวะกล้ามเนื้อเสื่อม (muscular dystrophy) ที่ส่งผลกระทบต่อการคิด พฤติกรรม และการดูแลตนเองและสุขภาพช่องปาก โรคกระดูกเปราะ (osteogenesis imperfecta) จะทำให้กระดูกแตกหักง่ายกว่าปกติ ความหนาแน่นของกระดูกในช่องปากลดลงส่งผลให้กระดูกเบ้าฟันไม่แข็งแรง เสี่ยงต่อการสูญเสียฟันมากกว่าผู้หญิงที่ไม่ได้เป็นโรคกระดูกพรุนถึง 3 เท่า โรคทางทันตกรรม ฟันหาย ภาวะเคลือบฟันสร้างไม่สมบูรณ์ (amelogenesis imperfecta) ภาวะเนื้อฟันสร้างไม่สมบูรณ์ (dentinogenesis imperfecta) และโรคมะเร็งในช่องปาก เป็นต้น

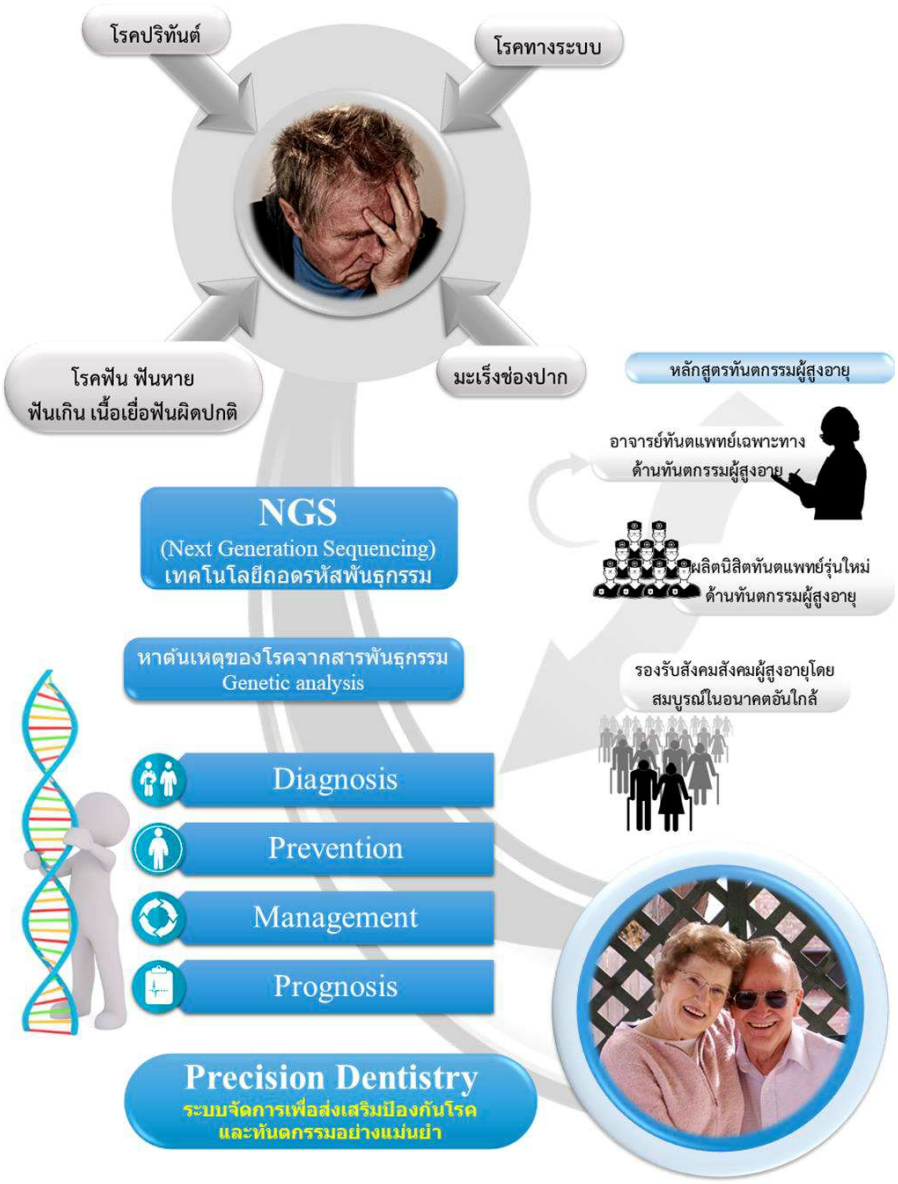
การพัฒนาเทคโนโลยีทางอณูพันธุศาสตร์ในปัจจุบันเป็นไปอย่างก้าวกระโดด ก่อให้เกิดเทคโนโลยีที่สามารถหาสาเหตุของความผิดปกติที่เกิดจากการกลายพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเทคโนโลยี next generation sequencing และ omics ได้แก่ whole genome sequencing (WGS) ที่สามารถตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสทั้งหมดของมนุษย์จำนวน พันล้านเบสได้ภายในเวลาไม่กี่วัน whole exome sequencing (WES) ที่ตรวจทุกเอ็กซอน และการการถอดรหัสพันธุกรรมแบบสายยาว (long-read sequencing) เมื่อนำมาใช้ในการถอดรหัสพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับความพิการ ทำให้ได้ข้อมูลที่นำมาช่วยให้การวินิจฉัยสุดท้าย (definite diagnosis) ทราบการพยากรณ์โรคอย่างแม่นยำ (prognosis of disease) และทำให้ทราบแนวทางการดูแลผู้ป่วยอย่างถูกต้องเหมาะสม (precision treatment) นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้ยังสามารถนำมาให้คำปรึกษาทางพันธุศาสตร์ (genetic counselling) เพื่อฟื้นฟูสุขภาพจิตใจ และลดการเกิดความผิดปกติซ้ำในครอบครัว อย่างมีประสิทธิภาพ

เทคโนโลยีโอมิกส์ (omics) เป็นการศึกษากระบวนการทางชีววิทยาในหลายระดับ รวมถึง ระดับยีนหรือสารพันธุกรรมที่เป็นแม่แบบ (จีโนมิกส์) ระดับโปรตีนที่เป็นตัวออกฤทธิ์การทำงาน (โปรตีโอมิกส์) ระดับอาร์เอ็นเอที่เป็นตัวกลาง (ทรานสคริปโตมิกส์) ระดับกระบวนการทางเคมีหรือการเผาผลาญ (เมตาบอโลมิกส์) และชีวนิเวศจุลชีพ (ไมโครไบโอม) จากการเชื่อมโยงความสัมพันธ์ของจีโนมิกส์ โปรตีโอมิกส์ ทรานสคริปโตมิกส์ เมตาบอโลมิกส์ และไมโครไบโอม จะนำไปสู่ความรู้ความเข้าใจกระบวนการทางสรีรวิทยาและชีววิทยาของความพิการได้อย่างลึกซึ้ง

เทคโนโลยี NGS แม้จะทรงประสิทธิภาพสูงมากแต่ก็ซับซ้อน เนื่องจากต้องการ 1) บุคลากรเชี่ยวชาญทางด้านเวชพันธุศาสตร์ ด้านคอมพิวเตอร์ ด้านการวิเคราะห์ข้อมูล (bioinformaticians) 2) ข้อมูลจีโนมของคนไทย 3) ความเชี่ยวชาญในศาสตร์โอมิกส์ ชีวโมเลกุล ทันตวัสดุศาสตร์และสัตว์ทดลอง เพื่อทดสอบพยาธิกำเนิดของความพิการ และศึกษาการรักษาที่ตรงเป้าหมายแบบเฉพาะเจาะจง (targeted therapy) ทีมงานคณะทันตแพทยศาสตร์ร่วมกับ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มีบุคลากร และโครงสร้างพื้นฐาน ได้แก่ เครื่อง sequencer, high performance computer, และฐานข้อมูล exome และ genome ดำเนินการโครงการ พร้อมกับสร้างเครือข่ายกับหน่วยบริการสาธารณสุขทั่วประเทศ ให้บริการตรวจวินิจฉัย และศึกษาความพิการทางช่องปากและฟันด้วยเทคโนโลยีที่ทันสมัย โดยมีจุดมุ่งหมายหลักเพื่อให้ผู้ที่มีความพิการทางใบหน้า ช่องปาก และฟัน ซึ่งอาจมีความผิดปกติทางพันธุกรรม ได้เข้าถึงบริการทางการแพทย์ที่ก้าวหน้า นำองค์ความรู้ทางพันธุศาสตร์ที่ก่อให้เกิดความพิการทางทันตกรรม เพื่อหาทางป้องกันการเกิดความพิการดังกล่าว และแนวทางการรักษากรณีที่ได้เกิดความพิการนั้น ส่งผลต่อพัฒนาทางด้านร่างกายเป็นไปตามปกติ ให้ผู้สูงอายุมีสุขภาพที่แข็งแรง และลดปัญหาการเกิดความพิการของประชาชนของประเทศไทยในอนาคต

ด้านการพัฒนาบุคลากร โครงการวางแผนการดำเนินการ 1) ผลิตบุคลากรทางทันตแพทย์เฉพาะทางด้านผู้สูงอายุและผู้ป่วยพิเศษ ด้วยความร่วมมือของจุฬาลงกรณ์หาวิทยาลัยและหลักสูตรพัฒนาทันตบุคลากรภายใต้

แผนงานทันตกรรมสุขภาพสำหรับผู้สูงอายุประเทศไทย กระทรวงสาธารณสุข จัดทำหลักสูตรปริญญาโทแบบเรียนทางไกล (distance learning) และการอบรมระยะสั้น 4 เดือน 2) จัดทำหลักสูตรที่ปรึกษาทางพันธุศาสตร์ (genetic counsellor) โดยภาคีวิชาชีพทั้งแพทยสภา ทันตแพทยสภา สภาเภสัชกรรม สภาการพยาบาล และสภาเทคนิคการแพทย์ และ 3) พัฒนานักวิจัย (postdoctoral fellowship) ที่มีความเชี่ยวชาญทางพันธุศาสตร์ เพื่อแก้ปัญหาทันตสาธารณสุขระดับชาติด้านสูงอายุและผู้พิการด้วยพันธุศาสตร์ต่อไป แผนภูมิโครงการในปีที่ 1 แสดงในรูปที่ 1.1



รูปที่ 1 แผนภูมิโครงการในปีที่

1.2 วัตถุประสงค์

- เพื่อพัฒนาขีดความสามารถและคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยทางช่องปากและฟันและผู้สูงอายุให้เข้าถึงทรัพยากรและบริการสาธารณะของรัฐ
- ร่วมมือกับบุคลากรทางการแพทย์ และ สถานพยาบาลต่างๆ ให้บริการด้านการวินิจฉัยตรงจุดทางพันธุกรรมพยากรณ์และส่งเสริมการรักษาแก่ผู้ป่วยไทยที่มีความพิการทางช่องปากและฟันและผู้สูงอายุ ที่เข้าไม่ถึงเทคโนโลยีพันธุศาสตร์ที่ก้าวหน้า และให้คำปรึกษาทางพันธุศาสตร์แก่ครอบครัวผู้ป่วยเพื่อลดอุบัติการณ์การเกิดโรคซ้ำในประชากรไทย เพื่อไม่ให้ผู้ป่วยเป็นภาระการดูแลของผู้สูงอายุ และเพื่อไม่ให้เป็นผู้สูงอายุที่มีความพิการรุนแรงและเป็นภาระของสังคม
- สร้างผลงานทางการแพทย์ ทันตแพทย์ และวิทยาศาสตร์แขนงต่างๆ ด้านช่องปากและฟัน เพื่อนำไปสู่การค้นพบองค์ความรู้ใหม่ที่เป็นประโยชน์ต่อวงการวิจัยและวิชาการ
- สร้างความรู้ด้านพยาธิกำเนิดของความพิการ และค้นหาวิธีการรักษาความพิการทางช่องปากและฟัน จากต้นเหตุ เพื่อส่งเสริมคุณภาพชีวิตของผู้ป่วย ผู้สูงอายุและครอบครัว และป้องกันความพิการที่ยั่งยืน
- ผลิตบุคลากรทางทันตแพทย์เฉพาะทางด้านผู้สูงอายุและผู้ป่วยพิเศษ ที่ปรึกษาทางพันธุศาสตร์ และนักวิจัยเพื่อแก้ปัญหาทันตสาธารณสุขระดับชาติด้านสูงอายุและผู้พิการ

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

2.1 ความทุพพลภาพทางช่องปากและฟัน

ฟันเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการบดเคี้ยว การพูด และความงาม ความพิการทางทันตกรรมมีทั้งปากแหว่งเพดานโหว่ มะเร็งในช่องปาก ฟันที่หายไป โรคปริทันต์ และขากรรไกรไม่สมรูป ส่งผลให้ไม่สามารถทานและกลืนอาหารได้อย่างปกติ นำไปสู่การเสื่อมสภาพของร่างกายและสุขภาพจิต มีผลต่อคุณภาพของชีวิต การเข้าสังคม และเป็นภาระค่าใช้จ่ายภาคครัวเรือนและสังคม

2.2 โรคและความผิดปกติทางช่องปากและฟันและอิทธิพลทางพันธุกรรม

2.3 โรคปริทันต์อักเสบเรื้อรัง

โรคปริทันต์อักเสบเรื้อรัง เป็นโรคที่พบบ่อยในผู้สูงอายุ มีลักษณะอาการอักเสบเรื้อรังที่เกิดจากการติดเชื้อจุลินทรีย์ที่นำไปสู่การทำลายอวัยวะปริทันต์ รวมถึงเหงือก เอ็นยึดปริทันต์ และกระดูก ตามหลักแล้ว โรคปริทันต์อักเสบเกิดจากการตอบสนองของเนื้อเยื่อปริทันต์ ซึ่งประกอบด้วยโพลีมอร์โฟนิวเคลียส ลิวโคไซต์ แมคโครฟาจ และลิมโฟไซต์ ต่อคราบจุลินทรีย์และไซโตไคน์ที่ปล่อยออกมาจากแบคทีเรียก่อโรค ปัจจัยอื่นๆ อาทิ การสูบบุหรี่ พฤติกรรมการบริโภค โรคเบาหวาน และปัจจัยทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย อาทิ โรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง ภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ เป็นต้น ที่ส่งผลต่อสภาพแวดล้อมในช่องปากหรือการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกายสามารถนำไปสู่การลุกลามของโรคและการตอบสนองต่อการรักษาที่ไม่ดี การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างซิงเกิลนิวคลีโอไทด์โพลีมอร์ฟิซึม หรือความแตกต่างทางพันธุกรรมที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบนสายโพลีนิวคลีโอไทด์เพียงตำแหน่งเดียวและโรคปริทันต์อักเสบ แสดงให้เห็นว่า การตอบสนองต่อการอักเสบสูงขึ้นในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบรุนแรงที่มีอัลลีลที่กลายพันธุ์ในยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ โดยพบว่าจีโนไทป์ของ interleukin (IL)-1A หรือ IL-6 มีความเกี่ยวข้องกับระดับซีรั่ม IL-6 และซีรั่ม C-reactive protein ที่สูงขึ้น ซึ่งสัมพันธ์กับความเสี่ยงที่เพิ่มขึ้นของโรคปริทันต์อักเสบ โรคหัวใจ โรคหลอดเลือดสมอง โรคหลอดเลือดหัวใจตีบ และโรคข้ออักเสบจากภูมิต้านตนเอง (1) การแสดงออกของยีน IL-8 และระดับโปรตีน IL-8 พบในเนื้อเยื่อเหงือกของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังสูงขึ้น อัลลีลซีของ Vascular Endothelial Growth Facto rอัลลีลเอของ Interleukin 10 และ GG จีโนไทป์ ของ Tumor Necrosis Factor-α สัมพันธ์กับโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรัง การปรากฏตัวของตัวบ่งชี้ทางพันธุกรรมทั้งสามนี้สามารถมีบทบาทเสริมฤทธิ์กันและความเสี่ยงที่เพิ่มขึ้นของโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรัง (2-4)

2.4 โรคปริทันต์อักเสบรุนแรง

โรคปริทันต์อักเสบรุนแรง เป็นภาวะที่มีการทำลายปริทันต์อย่างรวดเร็ว โดยทั่วไปจะเกิดขึ้นในบุคคลที่มีสุขภาพดี ผู้ป่วยต้องทนทุกข์ทรมานกับการสูญเสียฟันแท้แต่เนิ่นๆ โรคปริทันต์อักเสบรุนแรงส่งผลกระทบอย่างรุนแรงต่อสุขภาพช่องปากและร่างกายของผู้ป่วย มีการศึกษาหลายชิ้นที่พยายามประเมินซิงเกิลนิวคลีโอไทด์โพลีมอร์ฟิซึม (SNP) ที่อาจเกี่ยวข้องกับโรคปริทันต์อักเสบรุนแรงทั้งแบบเฉพาะที่และแบบทั่วไป เช่น IL-1, FCGR3B, FPR1, LTF, CYBA, GLT6D1 และ TLR4 (5) การศึกษาการเชื่อมโยงทั่วทั้งจีโนมเมื่อเร็วๆ นี้ได้เน้นว่าความแปรผันของยีน 4 ตัว ได้แก่ ANRIL/CDKN2B-AS1, PLG และ CAMTA1/VAMP3 แสดงความสัมพันธ์ที่มีนัยสำคัญกับโรคปริทันต์อักเสบรุนแรง และ/หรือ โรคปริทันต์อักเสบเรื้อรัง (6, 7) สิ่งเหล่านี้บอกถึงความคืบหน้าล่าสุดในการระบุตัวบ่งชี้ทางพันธุกรรมและตัวแปรที่เกี่ยวข้องกับโรคปริทันต์ จนถึงปัจจุบัน มีหลักฐานมากมายที่สนับสนุนว่าจีโนไทป์ของไซโตไคน์ เป็นตัวกำหนดที่สำคัญของการตอบสนองต่อการอักเสบทั่วร่างกายในโรคปริทันต์อักเสบ ความหลากหลายทางพันธุกรรมจึงมีบทบาทสำคัญในการอธิบายความเสี่ยง อาการแสดง การวินิจฉัย การพยากรณ์โรค และการรักษาโรคปริทันต์ในผู้ป่วยแต่ละราย โดยเฉพาะในผู้สูงอายุที่ส่วนใหญ่เป็นโรคปริทันต์เรื้อรัง ความผันแปรทางพันธุกรรมของตัวบ่งชี้การอักเสบ ยังสามารถทำนายความเสี่ยงของความผิดปกติของการอักเสบทางระบบ เช่น โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคข้ออักเสบ และโรคเบาหวานในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ ดังนั้น โรคปริทันต์สามารถระบุและให้การรักษาได้โดยรักษาปัจจัยทางพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อมร่วมกัน

2.5 มะเร็งช่องปาก

มะเร็งช่องปากมีส่วนทำให้เกิดมะเร็งของโลกในสัดส่วน 2.1% โดยเห็นได้ชัดในประเทศแถบเอเชียใต้ มากกว่า 90% ของมะเร็งในช่องปาก เป็นมะเร็งแบบเซลล์สความัส (Oral squamous cell carcinoma) พบได้ในช่องปาก ริมฝีปาก และลิ้น โดยการก่อมะเร็งเป็นกระบวนการที่ซับซ้อน เกี่ยวข้องกับการสะสมของการเปลี่ยนแปลงทั้งทางพันธุกรรมและพันธุศาสตร์ด้านกระบวนการเหนือพันธุกรรม หรือ อีพีเจเนติกส์ ที่มีการเปลี่ยนแปลงในยีนก่อมะเร็งและ/หรือยีนต้านมะเร็ง ปัจจัยเสี่ยงที่เป็นที่ทราบสำหรับมะเร็งในช่องปาก ได้แก่ การซ่อมแซมความเสียหายของดีเอ็นเอ การสูญเสียเฮเทอโรไซโกซิตี ความคงตัวของเทโลเมียร์ (ส่วนปลายของโครโมโซม เป็นส่วนลำดับเบสที่ไม่มีความหมายในการแปลรหัส แต่มีหน้าที่ปกป้องโครโมโซมไม่ให้ถูกทำลาย และจะสั้นลงเรื่อยๆ เมื่อมีการแบ่งเซลล์และตามเวลาที่ผ่านไป) และการเปลี่ยนแปลงของยีนและการส่งสัญญาณ รวมถึงยีนยับยั้งมะเร็ง (APC, p53), โปรทออนโคยีน (Myc), ออนโคยีน (Ras) และสัญญาณนอช (8-10) โดยทั่วไปมะเร็งแบบเซลล์สความัส จะเกิดข้องกับการ สูญเสียการทำงานของยีน TP53 โดยผู้ป่วยที่เป็นกลุ่มอาการ Li-Fraumeni จากการการกลายพันธุ์ TP53 ในเจิร์มไลน์ มักมีแนวโน้มที่จะเป็นมะเร็งช่องปาก ผู้ป่วยที่เป็นโรคโลหิตจาง Fanconi มีความเกี่ยวข้องกับมะเร็งช่องปากที่ลุกลาม ผู้ป่วยโรค dyskeratosis congenita มีความเสี่ยงเพิ่มขึ้นอย่างมากในการเป็นมะเร็งในช่องปากก่อนหน้านี้ การวิเคราะห์ในการศึกษาหลายชิ้นแสดงให้เห็นว่านิวคลีโอไทด์โพลีมอร์ฟิซึมเกี่ยวข้องกับความเสี่ยง

ของมะเร็งในช่องปาก ซึ่งพบในยีนที่เกี่ยวข้องกับการทำงานที่สำคัญ ได้แก่ การเพิ่มจำนวนเซลล์ ระบบภูมิคุ้มกัน การอักเสบ และการซ่อมแซมแอ็นเอ การวิเคราะห์เพิ่มเติมเผยให้เห็นว่าตัวอย่างมะเร็งแบบเซลล์สความัส มีการปรับเพิ่มของยีนในการส่งสัญญาณของนอช ได้แก่ JAG1, JAG2, ADAM17, NCSTN, PSEN1, NCOR2, NUMB, DVL3, HDAC1 และ HDAC2 (11, 12) ข้อมูลเหล่านี้ยืนยันว่ากลไกสาเหตุของมะเร็งในช่องปากสัมพันธ์กับพันธุกรรม ดังนั้น ข้อมูลการวิเคราะห์ทางพันธุกรรมจะที่ซับซ้อนจะมีความหมายทางคลินิก ช่วยให้เข้าใจเกี่ยวกับมะเร็งในช่องปากได้อย่างมาก

ในมนุษย์ ความผิดปกติในโครงสร้างช่องปากและฟันที่มาจากสาเหตุทาพันธุกรรมมีความหลากหลาย ซึ่งส่งผลต่อจำนวน ขนาด รูปร่าง โครงสร้าง ตำแหน่ง และการบดเคี้ยว ความผิดปกติเหล่านี้อาจเป็นองค์ประกอบสำคัญของกลุ่มอาการต่างๆ ที่ส่งผลต่อระบบและการทำงานของอวัยวะต่างๆของร่างกาย

2.6 ฟันหายกับพันธุกรรม และโรคทางระบบ

ภาวะการหายไปของฟันตั้งแต่ 1 ซี่แต่ไม่เกิน 6 ซี่ เรียกว่า hypodontia ถ้าฟันหายมากกว่า 6 ซี่ เรียกว่า oligodontia และในกรณีที่ฟันหายหมดทั้งปากเรียกว่า anodontia ภาวะฟันหาย หรือ tooth agenesis เป็นความผิดปกติของฟันที่พบบ่อยที่สุด เกิดขึ้นประมาณร้อยละ 2-9 ของจำนวนประชากร (13, 14) มีรายงานในผู้หญิงมากกว่าผู้ชายประมาณ 1.37 เท่า โดยที่ฟันที่หายบ่อยที่สุดถึงร้อยละ 9-30 ของฟันหายทั้งหมด คือ ฟันกรามซี่ที่ 3 ตามด้วยฟันกรามน้อยล่างซี่ที่ 2 พบร้อยละ 3-4 และ ฟันตัดซี่ข้างด้านบน ร้อยละ 2.2 แต่การหายของฟันกรามซี่ที่ 1 ฟันกรามซี่ที่ 2 ฟันตัดซี่กลาง และฟันเขี้ยว ค่อนข้างพบได้น้อย อาการฟันหายด้านใดด้านหนึ่ง (unilateral) พบได้มากกว่าอาการฟันหายทั้งสองด้าน (bilateral) (15)

ฟันหายที่เกิดจากความผิดปกติทางพันธุกรรม สามารถจำแนกได้เป็นแบบกระจัดกระจาย (sporadic) หรือแบบครอบครัว (familial) มีรายงานการถ่ายทอดหลายแบบ ได้แก่ แบบลักษณะเด่นบนออโตโซม (autosomal dominant) แบบลักษณะด้อยบนออโตโซม (autosomal recessive) และแบบโครโมโซมเอ็กซ์ (X-linked) โดยภาวะฟันหายอาจพบร่วมกับสภาวะอื่นๆ ในช่องปากที่เกี่ยวข้องกับกสรกลายพันธุ์ของสารพันธุกรรม อาทิ ขนาดและรูปร่างฟันผิดปกติ การพัฒนาของเคลือบฟันไม่สมบูรณ์ (amelogenesis imperfecta) เนื้อเยื่อช่องปากหลุดลอก ปากแหว่ง (cleft lip) เพดานโหว่ (cleft palate) และการเจริญของรูปหน้าผิดปกติ ภาวะฟันหายมมีการรายงานในหลายรูปแบบ ได้แก่

Tooth agenesis, selective, 1 (STHAG1, OMIM #106600) เป็นกลุ่มอาการที่ประกอบไปด้วย ปากแหว่ง เพดานโหว่ และฟันหาย โดยที่มีการหายทั้งแบบ hypodontia หรือ oligodontia เกิดจากการชะงักระหว่างการสร้างฟัน โดยมักพบว่าฟันกรามน้อยซี่ที่ 2 และฟันกรามซี่ที่ 3 ทั้งด้านบนและด้านล่างหายไป เกี่ยวข้องกับการ

กลายพันธุ์ของยีน muscle segment homeobox, homolog 1 (MSX1, OMIM *142983) บนโครโมโซม 4p16 มักพบการถ่ายทอดแบบเด่นบนออโตโซม (16)

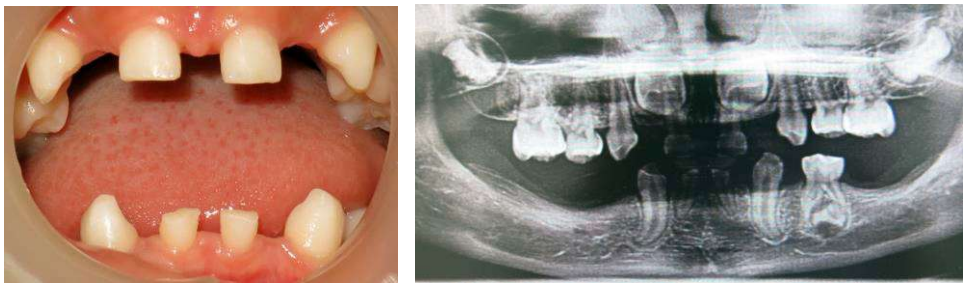
Tooth agenesis, selective, 3 (STHAG3 OMIM #604625) เป็นกลุ่มอาการที่มีฟันน้ำนมปกติ แต่มีอาการฟันแท้หายในหลายรูปแบบ เกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของยีน paired box gene 9 (PAX9, OMIM *167416) บนโครโมโซม 14q13 ซึ่งเป็นยีนที่แสดงออกในมีเซนไคม์ของเนื้อเยื่อฟันและกะโหลกศีรษะ ตั้งแต่ระยะต้นของกระบวนการสร้างฟัน ซึ่งเป็นยีนที่มีความสำคัญต่อการสร้างฟันอย่างมาก พบการถ่ายทอดแบบเด่นบนออโตโซม จากการศึกษาในหนูที่มีการกลายพันธุ์ที่ยีนนี้ พบการสร้างฟันผิดปกติในระยะสร้างหน่อฟันทำให้เกิดอาการฟันหายแบบ oligodontia ไปจนถึง anodontia และอาจมีอาการเพดานโหว่ กระดูกแขนขาและกะโหลกผิดปกติร่วมด้วย (17)

Oligodontia-colorectal cancer syndrome (ODCRCS, OMIM #608615) คือโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ และมีอาการฟันแท้หาย เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน axis Inhibitor 2 (AXIN2, OMIM *604025) บนโครโมโซม 17q24.1 มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งหลายชนิดในมนุษย์ เช่น มะเร็งผิวหนัง ระบบทางเดินอาหาร ตับ และรังไข่ นอกจากนี้จากการศึกษาในตัวอ่อนหนูพบว่า Axin2 มีความเกี่ยวข้องกับการสร้างฟันในระยะเริ่มจ้น การผิดปกติของยีนนี้ทำให้เกิดอาการฟันหายแบบ oligodontia (13) มักมีฟันตัดหายอย่างน้อย 1 ซี่ และมีการถ่ายทอดแบบเด่นบนออโตโซม (18)

Ectodermal dysplasia 1, hypohidrotic, X-linked (XHED, OMIM #305100) คือกลุ่มอาการที่เกิดความผิดปกติของการสร้างอวัยวะของเนื้อเยื่อชั้นนอก (ectoderm) เช่น ผิวหนัง ผม เล็บ และฟัน (15) มีอาการฟันหายในระดับ hypodontia ถึง oligodontia มักเกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของยีน ectodysplasin A (EDA, OMIM *300451) บนโครโมโซม Xq13.1 ความผิดปกติของยีนนี้มีการถ่ายทอดทั้งแบบเด่นและแบบด้อยบนโครโมโซม X มีการรายงานว่าการกลายพันธุ์ของยีน EDA อาจทำให้เกิดฟันหายโดยที่ไม่มีความผิดปกติของเนื้อเยื่อชั้นนอกอื่นร่วมด้วยได้ (19)

ยีนอื่นที่เกี่ยวข้องกับยีน EDA ที่มีผลทำให้เกิดความผิดปกติของ ectoderm ได้เช่นกัน ได้แก่ ยีน ectodysplasin A receptor (EDAR, OMIM *604095) และยีน edar-associated death domain (EDARADD, OMIM *606603) โดยที่โปรตีน EDAR จะจับกับโปรตีน EDA แล้วส่งสัญญาณต่อไปที่โปรตีน EDARADD จากนั้นส่งสัญญาณต่อไปยังยีนและสัญญาณอื่นๆ เพื่อสร้างอวัยวะในเนื้อเยื่อชั้นนอก (18) ดังนั้นการกลายพันธุ์ของยีนทั้งสามตัวนี้ หรือที่เรียกว่าสัญญาณ EDA (EDA signaling) จึงมีอาการแสดงออกที่คล้ายกันได้

นอกจากการกลายพันธุ์ของสัญญาณ EDA ที่ทำให้เกิดโรค ectodermal dysplasia แล้ว ยังมียีนอีกมากที่ทำให้เกิดอาการกลุ่มนี้ อาทิ WNT10A, KREMEN1, NECTIN1, IKBKG เป็นต้น (รูปที่ 2) (20)



รูปที่ 2 ลักษณะทางคลินิกและภาพถ่ายรังสีแสดงภาวะฟันหายในผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์โรค

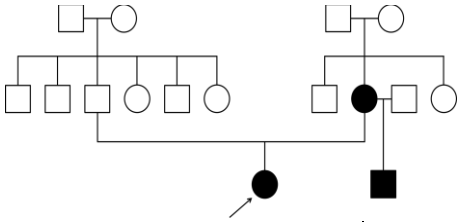
Odontoonychodermal dysplasia (OODD, OMIM #257980) มีลักษณะเล็บและฟันผิดปกติ oligodontia และฝ่ามือฝ่าเท้าหนา เกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของยีน wingless-type MMTV integration site family, member 10A (WNT10A, OMIM *606268) บนโครโมโซม 2q35 พบการถ่ายทอดแบบด้อยบนออโตโซม (20) การกลายพันธุ์ของยีน WNT10A พบได้ทั้งแบบอัลลีลเดี่ยว (monoallelic) และอัลลีลคู่ (biallelic) โดยในรูปแบบของ monoallelic มักสัมพันธ์กับการหายของฟันตัดและฟันกรามน้อย โดยเฉพาะฟันกรามน้อย ส่วนรูปแบบ biallelic มักพบฟันหน้าและฟันกรามหาย (21)

Dental anomalies and short stature (DASS, OMIM #601216) ผู้ป่วยมีภาวะตัวสั้น (short stature) ลิ้นหัวใจไมตรัลหย่อน (mitral valve prolapse) ฟันน้ำนมเล็ก ผุกร่อน และมีฟันแท้หาย เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน latent transforming growth factor β-binding protein 3 (LTBP3, OMIM *602090) บนโครโมโซม 11q13.1 จากอาการเหล่านี้ทำให้คาดได้ว่า LTBP3 มีผลต่อการพัฒนาของฟันและกระดูกแกนกลางของมนุษย์ โดยที่ยีนนี้จะมีการถ่ายทอดแบบด้อยบนออโตโซม (22)

Dentin dysplasia, type I (DTDP1, OMIM #125400) มีลักษณะรูปร่างและสีของฟันผิดปกติ สีเหลือบน้ำตาล ฟันโยกและหลุดได้ง่ายเนื่องจากรากฟันไม่สมบูรณ์ พบรากฟันสั้นกว่าฟันปกติ โพรงประสาทฟันและโพรงรากฟันตีบ ฟันหาย และ ฟันเล็ก (microdontia) มีอาการได้ทั้งในฟันน้ำนมและฟันแท้ เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน SPARC-related modular calcium-binding protein 2 (SMOC2, OMIM *607223) ซึ่งเป็นยีนที่อยู่ในระยะต้นของการพัฒนาฟันในมนุษย์ พบการถ่ายทอดแบบด้อยบนออโตโซม (23)

Axenfeld-Rieger syndrome type 1 (ARS, OMIM #180500) เป็นโรคที่เกิดการผิดปกติของ ตา กะโหลก ฟัน และ ผิวหนัง มีอาการฟันหายแบบ oligodontia เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน paired-like homeodomain transcription factor 2 (PITX2, OMIM *601542) เป็นยีนที่มีผลต่อการพัฒนาของอวัยวะหลายชนิด เช่น ตา หัวใจ สมอง ตับ แขนขา สะดือ และฟัน โดยมีการถ่ายทอดแบบเด่นบนออโตโซม (24) (รูปที่ 3)





รูปที่ 3 ลักษณะทางคลินิก ภาพถ่ายรังสี และพงศาวลีของครอบครัวที่แสดงภาวะฟันหายสัมพันธ์กับการกลายพันธุ์ของยีน PITX2

2.7 ภาวะฟันเกินกับพันธุกรรม และโรคทางระบบ

ความผิดปกติทางพันธุกรรมที่มีผลต่อฟันนอกจากทำให้เกิดอาการฟันหายแล้วยังทำให้เกิดมีฟันเพิ่มมากกว่าปกติได้อีกด้วย ฟันเกิน คือ การที่มีจำนวนฟันมากกว่าชุดฟันปกติทั้งในฟันน้ำนมและฟันแท้ อาจมีฟันเพิ่มขึ้นหนึ่งซี่หรือหลายซี่ เกิดขึ้นได้ทั้งทางด้านซ้ายและด้านขวา ขากรรไกรบนและขากรรไกรล่าง ฟันอาจจะขึ้นในตำแหน่งขากรรไกร ไม่ตรงตำแหน่งแนวฟันปกติ หรือไม่ขึ้นเลยก็ได้ โดยสามารถจำแนกได้ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาของฟันหรือตำแหน่งที่ตั้ง ในฟันน้ำนมฟันที่เกินมักมีรูปร่างลักษณะปกติ แต่ลักษณะของฟันเกินในฟันแท้มีหลากหลายแบบ อุบัติการณ์ของการเกิดฟันเกินอยู่ระหว่างร้อยละ 0.1 ถึง 3.6 ของจำนวนประชากร มีรายงานพบในเพศชายมากกว่าเพศหญิงในอัตรา 2:1 โดยที่ฟันที่เกินมักจะขึ้นในตำแหน่งฟันตัดด้านบน อย่างไรก็ตาม การเพิ่มขึ้นของจำนวนฟันอาจเป็นอาการของการพัฒนาผิดปกติต่างๆ เช่น ปากแหว่งเพดานโหว่ (cleft lip and palate), cleidocranial dysplasia และ familial adenomatous polyposis

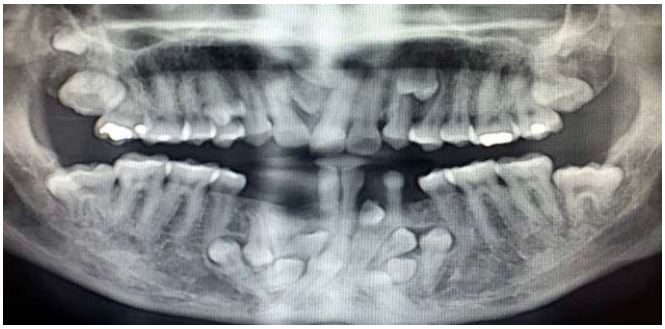
รายงานโรคทางพันธุกรรมที่ส่งผลให้จำนวนฟันเพิ่มขึ้น ได้แก่

โรค #OMIM	**ยีนที่เกี่ยวข้อง *OMIM**
Cleidocranial dysplasia	*RUNX2* *600211
Ehlers-Danlos Type IV #225400	*PLOD* *153454
Ellis-Van Creveld #225500	*EVC* *604831
Fabry disease #301500	*GLA* *300644
Familial adenomatous polyposis (Fardner) #175100	*APC* *611731
Incontinentia pigmenti #308300	*NEMO* *300248

Nance-Horan syndrome (NHS, OMIM #02350) มีอาการ ฟันผิดปกติ ฟันเพิ่มขึ้นในตำแหน่งใกล้กับฟันตัด ลักษณะรูปหน้าผิดปกติ และบางกรณีผู้ป่วยมีพัฒนาการช้าร่วมด้วย เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน NHS gene (NHS, OMIM *300457) โดยมีการถ่ายทอดผ่านทางโครโมโซม X (25)

Cleidocranial dysplasia (CCD, OMIM #119600) มีอาการ แคระแกร็น ตัวสั้น กระดูกไหปลาร้าผิดปกติ กระดูกนิ่ม รูปร่างฟันผิดปกติ และฟันเกิน เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน runt-related transcription factor 2

(RUNX2, OMIM *600211) หรืออีกชื่อหนึ่งคือ Core-binding factor, runt domain, alpha subunit 1 (CBFA1) โดยมีการถ่ายทอดแบบยีนเด่นผ่านออโตโซม (26) (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 ภาพถ่ายรังสี แสดงฟันเกินจำนวนมากในขากรรไกรของผู้ป่วยโรคที่มีกระดูกบกพร่อง

Familial adenomatous polyposis 1 (FAP1, OMIM #175100) อาการ คือ มีติ่งเนื้อที่ลำไส้ใหญ่ซึ่งสามารถพัฒนาไปเป็นมะเร็งได้ถ้าไม่ได้รับการรักษา มีกระดูกงอกที่ขากรรไกร และพบฟันเกิน เกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของยีน APC (OMIM *611731) โดยมีการถ่ายทอดแบบยีนเด่นบนออโตโซม

จะเห็นได้ว่าภาวะจำนวนฟันผิดปกติสามารถเกิดได้จากปัจจัยทางพันธุกรรมที่หลากหลาย มีการถ่ายทอดทางกรรมพันธุ์ได้หลายแบบ การกลายพันธุ์แบบเดียวกันก็อาจมีลักษณะการแสดงออกที่ต่างกันไปได้บ้าง อย่างไรก็ตาม ภาวะฟันหาย และฟันเกินมักเกี่ยวข้องกับยีนที่มีการแสดงออกในช่วงต้นของการสร้างฟัน ทั้งในเนื้อเยื่อบุผิวและมีเซนไคม์ โดยเฉพาะยีน หรือสัญญาณที่มีการทำงานร่วมกัน หากยีนนั้นทำหน้าที่ในการพัฒนาอวัยวะอื่นๆในร่างกาย ย่อมพบภาวะจำนวนฟันเกินหรือฟันขาดที่เป็นส่วนหนึ่งของกลุ่มอาการ และมีความผิดปกติอื่นทางร่างกายร่วมด้วย ดังนั้น ความเข้าใจทางพันธุศาสตร์ ทำให้สามารถศึกษายีนและตำแหน่งของการกลายพันธ์ในยีนที่มีผลต่อการพัฒนาการของฟัน เพื่อเพิ่มความรู้ความเข้าใจในกระบวนการสร้างฟัน ทราบสาเหตุของจำนวนฟันผิดปกติที่สารพันธุกรรม รวมไปถึงใช้เพื่อตรวจสอบโรคกลุ่มอาการที่มีฟันเกินหรือฟันหาย เพื่อ ป้องกันภาวะซ้อนเร้นทางระบบได้อีกทางหนึ่ง

2.8 เคลือบฟันที่ผิดปกติกับพันธุกรรม และโรคทางระบบ

เคลือบฟัน เป็นเนื้อเยื่อมีความแข็งแรงที่สุดของร่างกาย มีสีขาวถึงขาวนวล มีแร่ธาตุและสารอนินทรีย์สูง โดยมีแคลเซียมและฟอสเฟตเป็นแร่ธาตุหลัก และแร่ธาตุอื่นๆปะปน อาทิ โซเดียม แมกนีเซียม โปแตสเซียม คาร์บอเนต และคลอไรด์ มีโปรตีนในปริมาณที่ต่ำ ทำหน้าที่ห่อหุ้มและปกป้องเนื้อฟันและส่วนที่อยู่ข้างใน

ความผิดปกติในการสร้างเคลือบฟัน คือ ภาวะที่มีการเปลี่ยนแปลงของเคลือบฟัน มีการสร้างเคลือบฟันไม่สมบูรณ์ (enamel deficiencies) เกิดได้ทั้งภาวะเคลือบฟันสะสมแร่ธาตุน้อยกว่าปกติ (hypomineralization) การสร้างเคลือบฟันปริมาณน้อยเกินไป (hypoplasia) ไปจนถึงการไม่มีเคลือบฟัน (aplasia) (2) ซึ่งมีสาเหตุมาจากปัจจัยทั้งทางด้านสิ่งแวดล้อมหรือปัจจัยภายนอก และปัจจัยด้านภายในหรือปัจจัยด้านพันธุกรรม

ภาวะการสร้างเคลือบฟันไม่สมบูรณ์ หรือ amelogenesis imperfecta (AI) เป็นความผิดปกติที่เกี่ยวข้องกับช่วงการเจริญของเคลือบฟัน ที่ส่งผลให้เกิดความบกพร่องของการสร้างชั้นเคลือบฟัน เกิดจากความผิดพลาดในการถอดรหัสโปรตีนของเคลือบฟัน การวินิจฉัยโรค ควรครอบคลุมการตรวจทางคลินิก ภาพถ่ายรังสี ประวัติการรักษา ความเป็นไปได้ของปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อม ประวัติครอบครัว และการตรวจหาการกลายพันธุ์ของสารพันธุกรรม เพื่อจำแนกและให้การวินิจฉัยโรคที่ถูกต้อง

Type I หรือ hypoplastic AI

เกิดจากความผิดปกติของการสร้างเคลือบฟันในระยะ secretory ตัวฟันจะมีผิวเคลือบฟันที่บางมากกว่าปกติ อาจมีหลุมร่อง หรือมีลักษณะเป็นคลื่นได้ แต่จะมีการสะสมแร่ธาตุที่เป็นปกติ ส่งผลให้ตัวฟันมีขนาดเล็ก ไม่มี proximal contact สีของฟันอาจมีได้ตั้งแต่สีขาวขุ่นไปจนถึงสีเหลืองปนน้ำตาล ขึ้นกับความหนาของเคลือบฟันที่ผิดปกติ

Type II หรือ hypomatured AI

เกิดจากความผิดปกติของการสลายโปรตีนจากโครงสร้างเคลือบฟัน AI ประเภทนี้มักมีความหนาของชั้นเคลือบฟันที่ปกติ แต่ความหนาแน่นลดลง โครงสร้างเปราะ จึงทำให้ฟันเมื่อขึ้นสู่ช่องปากระยะแรกมีขนาดปกติ แต่จะเกิดการสึกและแตกของชั้นเคลือบฟันได้ง่ายโดยเฉพาะบริเวณด้านบดเคี้ยว เนื่องจากเคลือบฟันไม่แข็งแรง หลังจากฟันผ่านการใช้งาน จะพื้นผิวฟันมีขรุขระ และนิ่ม อาจนำไปสู่อาการเสียวฟันได้หลังจากมีการเผยของชั้นเนื้อฟัน มักพบฟันหน้าสบเปิดร่วมด้วย สีของฟันมักแตกต่างกันไปเป็นผลมาจากคราบจากสิ่งแวดล้อมภายในช่องปาก มีสีขาวขุ่นไปจนถึงสีเหลืองอมน้ำตาลหรือแดงอมน้ำตาล

Type III หรือ hypocalcified AI

เป็นชนิดที่มีความผิดปกติของกระบวนการสะสมแร่ธาตุ โดยเฉพาะแคลเซียม ทำให้เคลือบฟันนิ่ม ขณะที่โครงสร้างพัฒนาได้ตามปกติ มีการแตกหักของเคลือบฟันได้รวดเร็ว สีของเคลือบฟันมักจะมีสีเข้มกว่าชนิดอื่นๆ ในส่วนของเนื้อฟันเองจะเผยออกมามากหรือน้อยนั้นก็ขึ้นอยู่กับการสูญเสียเคลือบฟัน

Type IV หรือ mixed hypomaturation and hypoplastic incombination with taurodontism

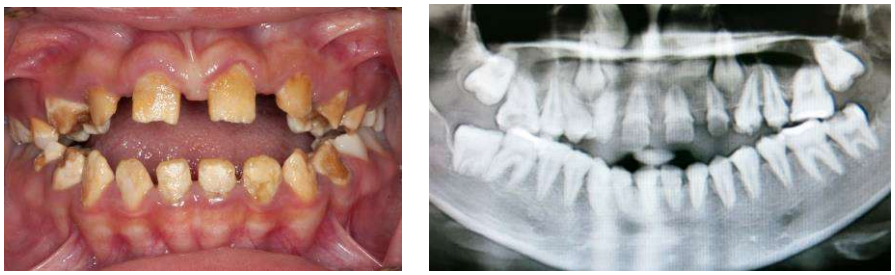
ชนิดนี้เป็นชนิดที่มีความผิดปกติทั้งแบบ hypomaturation และ hypoplastic ผสมกัน ร่วมกับฟันกรามที่มีลักษณะ taurodontism คือ ฟันจะมีโพรงฟันขนาดใหญ่ และมีพื้นโพรงในตัวฟันกับช่องรากฟันอยู่ต่ำไปทางปลายรากฟัน ผิวเคลือบฟันเป็นรูพรุน

การจำแนก AI มีการปรับแก้มาอย่างต่อเนื่อง อย่างไรก็ตามแม้ว่าระบบนี้จะสามารถจำแนกประเภทของโรคความผิดปกติในการสร้างเคลือบฟันออกจากกันได้ค่อนข้างชัดเจน แต่ในทางปฏิบัติแล้วการนำระบบของ Witkop มาใช้ยังมีข้อจำกัด เนื่องจากความหลากหลายของลักษณะการแสดงออกของโรคความผิดปกติ ในการสร้างเคลือบฟันภายในครอบครัว (intrafamilial variability) การจำแนกขึ้นอยู่กับลักษณะของเคลือบฟันที่ปรากฏและความ

ผิดปกติของการพัฒนาเคลือบฟัน แต่ยังขาดความสัมพันธ์ระหว่างประเภทของความผิดปกติของการสร้างเคลือบฟันและความผิดปกติของอณูพันธุศาสตร์ (molecular defect)

มีจากการศึกษาที่หลากหลายเกี่ยวกับ AI อาทิ ในเด็กนักเรียนชาวอิสราเอลจำนวนกว่า 70,000 คน พบว่า AI แบบลักษณะด้อยบนออโตโซมเป็นโรคความผิดปกติในการสร้างเคลือบฟันแบบที่พบมากที่สุด และจากการศึกษาทางระบาดวิทยาของครอบครัวชาวสวีเดนจำนวน 51 ราย พบความผิดปกติในการสร้างเคลือบฟันในผู้ป่วยร้อยละ 6 มีรูปแบบในการถ่ายทอดเป็นแบบยีนด้อยบนโครโมโซม X ขณะที่ร้อยละ 63 เป็นการถ่ายทอดแบบลักษณะเด่นบนออโตโซม และร้อยละ 12 แบบลักษณะด้อยบนออโตโซม ที่เหลืออีกร้อยละ 19 พบในบางรุ่นของครอบครัวที่มีประวัติของการถ่ายทอดที่ไม่ชัดเจน (27)

ในช่วงหลายปีที่ผ่านมามีการศึกษาพบว่า AI มีความเกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ในยีนต่างๆ โดยเฉพาะยีนที่มีการแสดงออกในระยะการสร้างเคลือบฟัน พบ่า ยีนที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของการสร้างเคลือบฟันที่มีการถ่ายทอดลักษณะเด่นบนออโตโซม ได้แก่ ยีน tuftelin (TUFT1, OMIM *600087, 1q21) ยีน ameloblastin (AMBN, OMIM *601259, 4q21) amelotin (AMTN, OMIM *610912, 4q13.3) และยีน family with sequence similarity 83 member H (FAM83H, OMIM *611927) (27) เป็นต้น (รูปที่ 5) (28)



รูปที่ 5 ลักษณะทางคลินิกและภาพถ่ายรังสีของผู้ป่วยที่เคลือบฟันผิดปกติ สัมพันธ์กับการกลายพันธุ์ของยีน FAM83H

นอกจากนี้ ยังพบการกลายพันธุ์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับ protease ซึ่งมีหน้าที่สำคัญในการพัฒนาเคลือบฟัน ได้แก่ ยีน kallikrein-related peptidase 4 (KLK4, OMIM *603767, 19q13.4) และยีน enamelysin หรือ matrix metalloproteinase 20 (MMP20, OMIM *604629, 11q22.3-q23) ซึ่งจะถ่ายทอดลักษณะด้อยบนออโตโซม ทำให้เกิดความผิดปกติในการสร้างเคลือบฟันชนิด hypomatured AI

มีการรายงานความผิดปกติของการสร้างเคลือบฟันชนิด hypoplastic-hypomaturation ร่วมกับโพรงในฟันโต (taurodontism) และถ่ายทอดผ่านออโตโซมหรือ ที่เรียกว่า AIHHT (OMIM #104510) พบการกลายพันธุ์เกิดขึ้นใน homeodomain ของยีน distal-less homeobox 3 (DLX3, OMIM *600525, 17q21) แต่จากการศึกษาก่อนหน้านี้ได้แสดงให้เห็นว่าการกลายพันธุ์ของ homeodomain นอกยีน DLX3 นั้นเกี่ยวข้องกับ tricho-dento-osseous syndrome (TDO, OMIM #190320) ซึ่งชี้ให้เห็นว่ายีนที่ก่อให้เกิดโรค TDO และ AIHHT เป็น allelic คือโรคสองโรคที่มียีนก่อโรคยีนเดียวกันและมีการถ่ายทอดลักษณะเด่นบนออโตโซม (29)

ยีน amelogenin (AMELX, OMIM *00391) อยู่บนโครโมโซม X การกลายพันธุ์ของยีน AMELX ทำให้เกิด AI ชนิด hypomaturation ที่มีการถ่ายทอดแบบ X-linked พบมีรายงานเพียงร้อยละ 5 ของจำนวนผู้ป่วยโรค AI (2) ลักษณะทางคลินิกของฟันนั้นมีการแสดงออกที่หลากหลายตั้งแต่ฟันสีเหลืองไปจนถึงสีน้ำตาล ทั้งขุ่นและใส ขนาดของฟันก็มีขนาดที่แตกต่างกัน อาจพบฟันขนาดเล็ก (microdontia) ผิวฟันมีทั้งเรียบและขรุขระ อาจพบร่องในแนวตั้ง (vertical grooving) สะท้อนให้ความผิดปกติของการทำงานของ เซลล์สร้างเคลือบฟัน (30)

การกลายพันธุ์ของยีน enamelin (ENAM, 4q21, OMIM *606585) (15) มีความเกี่ยวข้องกับ hypoplastic AI ที่มีการถ่ายทอดทั้งแบบลักษณะเด่นและลักษณะด้อยบนออโตโซม โดยที่การถ่ายทอดแบบลักษณะเด่นจะแสดงอาการเฉพาะ hypoplastic (OMIM #104500)(17) ขณะที่การถ่ายทอดลักษณะด้อยบนออโตโซม จะพบว่า คนไข้มีอาการ hypoplastic AI ร่วมกับ ฟันสบเปิด (open-bite) (OMIM #204650) (31)

กลุ่มอาการที่มีความผิดปกติของเคลือบฟัน

ภาวะเคลือบฟันสร้างไม่สมบรณ์อาจพบร่วมกับความผิดปกติอื่นๆ ของร่างกาย

โรคความผิดปกติในการสร้างเคลือบฟันกับหินปูนเกาะในเนื้อไต (enamel - renal syndrome, ERS)

โรค ERS หรือเรียกว่า amelogenesis imperfecta, type IG (OMIM #204690) คือกลุ่มอาการที่พบได้น้อยมาก ลักษณะทั่วไปที่พบได้ คือ เคลือบฟันบางและผิดปกติชนิด hypoplastic เกิดการสะสมแคลเซียมภายในโพรงประสาทฟัน (intrapulpal calcifications) การงอกของฟันช้ากว่าปกติ (delayed tooth eruption) ภาวะเหงือกโต (gingival hypertrophy) พบนิ่วในไตทั้งสองข้าง (bilateral nephrocalcinosis) การทำงานของไตบกพร่อง (Impaired renal function) จากการวิเคราะห์ทางพันธุกรรมพบว่าการกลายพันธุ์ของยีน family with sequence similarity 20, member A (FAM20A, OMIM *611062) โดยมีการถ่ายทอดแบบด้อยบนออโตโซม (32) (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 ลักษณะทางคลินิกและภาพถ่ายรังสีของผู้ป่วยที่เคลือบฟันผิดปกติและมีเหงือกโต สัมพันธ์กับการกลายพันธุ์ของยีน FAM20A

ไตรโคเดนโตออสเซียส ซินโดรม (Tricho-dento-osseous syndromes, TDO)

กลุ่มอาการ TDO (OMIM #190320) เป็นกลุ่มอาการผิดปกติทางพันธุกรรมที่มีการถ่ายทอดแบบเด่นโดยเกิดร่วมกับกลุ่มอาการ ectodermal dysplasias โดยที่อาการของ ectodermal dysplasias จะส่งผลต่อ ผม ฟัน

เล็บ และ/หรือ ผิวหนัง กลุ่มอาการ ไตรโคเดนโต-ออสเชียส ซินโดรม สามารถจำแนกได้โดย ผมขดหรือหยักศก การสร้างเคลือบฟันไม่ดี และมีความหนา และ/หรือ ความหนาแน่นผิดปกติ (sclerosis) ของกะโหลกส่วนบน และ/หรือ กระดูกแขนขาอาจพบความผิดปกติเฉพาะ เช่น การเชื่อมต่อระหว่างกระดูกกะโหลกศีรษะ (craniosynostosis) ทำให้หัวมีลักษณะยาวและเล็กผิดปกติ (dolicocephaly)

มากกว่าร้อยละ 90 ของคนที่มีภาวะของกลุ่มอาการนี้จะมีความหนาของกะโหลกศีรษะลดลง ลักษณะช่องปากและฟันแสดงลักษณะเคลือบฟันบางมีจุดหลุม (pitted hard enamel) โพรงประสาทฟันโต (enlarged pulp chambers) และภาวะโพรงในตัวฟันยืดขยายสู่ปลายราก (taurodontism) เกิดทั้งในฟันน้ำนมและฟันแท้ ความผิดปกติของฟันในกลุ่มอาการไตรโคเดนโตออสเชียส ซินโดรมมีความคล้ายคลึงกับโรคความผิดปกติในการสร้างเคลือบฟันชนิด AIHHT (OMIM #104510) ซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์ในยีน DLX3 โดยทั่วไปแล้วกลุ่มอาการ ไตรโคเดนโตออสเชียส ซินโดรมมีสาเหตุมาจากการขาดหายของเบสในยีน DLX3 (23) ทำให้เกิดความผิดปกติของเส้นผมและกระดูก เกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของยีน DLX3 ภายนอก homeodomain ซึ่งลักษณะการกลายพันธุ์ต่างจาก AIHHT ตรงที่ AIHHT จะพบการกลายพันธุ์ของยีน DLX3 ใน homeodomain ทำให้ functional domain ของโปรตีน DLX3 เปลี่ยนไป จนเกิดความผิดปกติในการสร้างเคลือบฟันและภาวะโพรงในตัวฟันยืดขยายสู่ปลายราก (33)

Cone-rod dystrophy and amelogenesis imperfecta

ความสัมพันธ์ระหว่างโรคจอประสาทตาเสื่อม และโรคความผิดปกติในการสร้างเคลือบฟัน (OMIM #217080) มีรายงานในตระกูลขนาดใหญ่ของชาวอาหรับ และในโคโซโว คนที่ยังมีชีวิตอยู่นั้นในช่วงแรกของชีวิตจะเป็นโรคตากลัวแสง (photophobia) ตากระตุก (horizontal nystagmus) และทำให้การมองเห็นลดลง โดยเฉพาะการมองเห็นในที่มีแสงจ้า (hemeralopia) นอกจากความผิดปกติของตาพบว่าความผิดปกติในการสร้างเคลือบฟันชนิด hypoplastic หรือ hypomineralized ซึ่งความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับฟันได้แก่ ฟันมีสีเหลืองหรือน้ำตาล และเคลือบฟันจะบางจนแทบจะสามารถมองเห็นเนื้อฟัน (26) โดยการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ได้ระบุตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่ยีน cyclic nucleotide-gated channel, alpha-3 (CNGA3, OMIM *600053) บนโครโมโซม 2q11 (34)

Kohlschuttere-Tonz syndrome

กลุ่มอาการ Kohlschuttere-Tonz syndrome (KTZS, OMIM #226750) คือกลุ่มโรคที่เกี่ยวกับความเสื่อมของเซลล์ประสาท (neuro-degenerative) ที่ประกอบกับโรคความผิดปกติในการสร้างเคลือบฟันแบบ hypomineralized ผู้ป่วยมีอาการชัก (seizures) กล้ามเนื้อหดเกร็ง (spasticity) เดินเซ (ataxia) และพัฒนาการช้า อาการมักจะเริ่มในช่วงระหว่าง 1 ถึง 2 ปี ซึ่งอาจมีอันตรายถึงชีวิต ภาวะแทรกซ้อนอื่นๆ ได้แก่ ภาวะสายตาสั้น

(myopia) ภาวะหัวใจห้องล่างโต (cardiac ventricular enlargement) ผิวหนังแห้ง นิ้วหัวแม่มือหัวแม่เท้าใหญ่ เป็นต้น (28) มีรายงานว่ากลุ่มอาการ KTZS มีสาเหตุจากการกลายพันธุ์ของยีน drosophila, homolog of ROGDI (ROGDI, OMIM *614574) โดยมีการถ่ายทอดแบบด้อยบนออโตโซม (35)

Vitamin D-dependent rickets

โรคกระดูกอ่อนที่ต้องพึ่งวิตามินดีชนิดที่ 1 (Vitamin D-dependent rickets, VDDRI, OMIM #264700) คือ ความผิดปกติที่ถ่ายทอดผ่านลักษณะด้อยบนออโตโซม พบความผิดปกติในการเผาผลาญวิตามินดี การเจริญเติบโตลดลง กล้ามเนื้ออ่อนแรง กระดูกอ่อน โรคปริทันต์ (periodontal disease) และภาวะเคลือบฟันบาง ฟันแท้มีเคลือบฟันสีเหลืองไปจนถึงสีน้ำตาล โพรงประสาทฟันมีขนาดใหญ่ และรากฟันสั้น พบความสัมพันธ์ของโรคกับการกลายพันธุ์ของยีนหลายยีนเช่น cytochrome P450, subfamily IIR, polypeptide 1 (CYP2R1, OMIM *608713) และยีน vitamin d receptor (VDR, OMIM *601769) (36) เป็นต้น

Autoimmune polyendocrinopathy

โรคภูมิคุ้มกันทำลายตนเอง (Autoimmune polyendocrinopathy, APS) คือลักษณะภาวะการขาดฮอร์โมนจากต่อมไร้ท่อหลายชนิด โดย APS ชนิดที่ 1 (Autoimmune polyendocrine syndrome type I, with or without reversible metaphyseal dysplasia; APS1, OMIM #240300) เกิดจากความผิดปกติของต่อมไร้ท่อ (multiple autoimmune endocrinopathies) ทำให้มีอาการของโรคแอดดิสัน (Addison disease) มีความผิดปกติของต่อมไธรอยด์แบบ hypoparathyroidism และมีลักษณะการติดเชื้อแคนดิดา (candidiasis) นอกจากนี้ยังพบโรคเบาหวาน ด่างขาว ผมร่วง และเคลือบฟันไม่สมบูรณ์ (8) สาเหตุของโรคเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน autoimmune regulator (AIRE, OMIM *607358) ที่อยู่บนโครโมโซม 21q22.3 และมีลักษณะการถ่ายทอดพันธุกรรมทั้งแบบลักษณะเด่น และลักษณะด้อยบนออโตโซม ความผิดปกติที่สังเกตได้มากที่สุดคือภาวะเคลือบฟันไม่สมบูรณ์ของฟันแท้ (permanent teeth) ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อผู้ป่วยถึงร้อยละ 75 (37)

Oculodentodigital dysplasia

Oculodentodigital dysplasia (ODDD, OMIM #164200) เป็นความผิดปกติทางพันธุกรรมตั้งแต่กำเนิด ที่เกิดความผิดปกติที่ดวงตา มือ เท้า โครงสร้างใบหน้าและฟัน มีการศึกษาลักษณะที่แสดงออกและหาสาเหตุทางพันธุกรรมในผู้ป่วยโรค ODDD โดยทำการตรวจด้วยเทคนิคการตรวจหาลำดับเอ็กโซมทั้งหมด (Whole-Exome Sequencing) เพื่อระบุตำแหน่งการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสที่ก่อให้เกิดโรค ODDD และยืนยันผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอแบบ Sanger sequencing การวิจัยนี้ตรวจพบผู้ป่วย ODDD ที่มีกระดูกนิ้วมือคด นิ้วเกินและเชื่อมติดกัน ตาเล็ก โครงสร้างใบหน้าผิดปกติ ผม คิ้วและขนตาบาง ขากรรไกรเล็ก ริมฝีปาก

บนยุบ และมีฟันที่มีความบกพร่องของเคลือบฟันอย่างมาก พบได้ตั้งแต่ฟันเริ่มขึ้น ทำให้ฟันแตกหักง่าย การวิเคราะห์ทางพันธุกรรมพบตำแหน่งการกลายพันธุ์ใหม่ที่ทำให้รหัสพันธุกรรมเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม (missense mutation) ณ ตำแหน่งเบสที่ 31 ทำให้กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 11 เปลี่ยนจากลิวซีนเป็นไอโซลิวซีน (c. 31C>A, p.L11I) ในยีน gap junction alpha 1 (GJA1; OMIM *1210154) ซึ่งเป็นยีนที่ถอดรหัสเป็นโปรตีนคอนเน็กซิน 43 (connexin 43) มีหน้าที่สำคัญในการสื่อสารระหว่างเซลล์ จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและคงความสมดุลของเซลล์ จากการวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศ และการวิเคราะห์โครงสร้างโปรตีน พบว่าตำแหน่งการกลายพันธุ์ดังกล่าวเป็นจุดที่ก่อให้เกิดโรค ซึ่งผลการวิเคราะห์ในพ่อแม่ไม่พบการกลายพันธุ์ในบริเวณดังกล่าว ดังนั้นการวิจัยนี้เป็นการค้นพบใหม่ ในตำแหน่งยีน GJA1 ที่เกิดการกลายพันธุ์ อันเกี่ยวข้องกับความผิดปกติของฟันในระดับรุนแรง ซึ่งผลการวิจัยเพิ่มข้อมูลกลายพันธุ์ของสารพันธุกรรมในฐานข้อมูลสากลและเสริมสร้างความเข้าใจถึงความผิดปกติของฟันที่เกี่ยวข้องกับโรค ODDD (33) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าความผิดปกติในการสร้างเคลือบฟันเกิดจากองค์ประกอบหลายๆอย่างซึ่งต้องได้รับการพิจารณาโดยละเอียดรอบคอบเนื่องจากเป็นเรื่องที่วินิจฉัยผิดพลาดได้ง่าย โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีความเกี่ยวข้องกับปัจจัยทางระบบ หรือปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้อง (รูปที่ 7) (38)



รูปที่ 7 ลักษณะทางคลินิกและภาพถ่ายรังสีของผู้ป่วยที่มีเคลือบฟันบางสึกรุนแรง นิ้วมือมีการเชื่อมติดกัน สัมพันธ์กับการกลายพันธุ์ของยีน GJA1

การสร้างเคลือบฟัน ถูกควบคุมด้วยยีนหลายชนิด ที่มีบทบาทต่างๆกันในระยะการพัฒนาเคลือบฟัน เมื่อมีการกลายพันธุ์ของยีนเหล่านี้ ย่อมทำให้เกิดความผิดปกติของเคลือบฟัน เคลือบฟันมีการเปลี่ยนสี บาง และแตกหักง่าย ทำให้สูญเสียเคลือบฟันก่อนเวลาอันควร นอกจากนั้นยีนบางตัวที่เกี่ยวกับการสร้างคลือบฟันยังมีหน้าที่สำคัญอื่นๆ ในการทำหน้าที่ของอวัยวะต่างๆในร่างกาย การตรวจพบลักษณะทางคลินิก ภาพถ้ายรังสี เพื่อในการวินิจฉัยการสร้างเคลือบฟันไม่สมบูรณ์ ร่วมกับการตรวจทางพันธุกรรมย่อมมีประโยชน์ไม่เพียงแต่ให้การรักษาทันตกรรมที่ถูกต้องและเหมาะสม ยังช่วยพยากรณ์โรคและระบุปัจจัยเสี่ยงต่อภาวะโรคแทรกซ้อนทางระบบอื่นๆได้อีกด้วย

2.9 เนื้อฟันที่ผิดปกติกับพันธุกรรม และโรคทางระบบ

เนื้อฟัน (dentin หรือ dentine) คือ เนื้อเยื่อแข็งที่เป็นส่วนประกอบหลักของฟัน มีความแข็งน้อยกว่าเคลือบฟัน มีสีออกเหลือง เนื้อฟันประกอบด้วยท่อเนื้อฟัน (dentinal tubules) เล็กๆจำนวนมากที่เชื่อมต่อโดยตรงไปที่ยังโพรงประสาทฟัน เนื้อฟันในส่วนตัวฟันถูกคลุมด้วยชั้นเคลือบฟัน ขณะที่เนื้อฟันส่วนรากฟันปกคลุมด้วยเคลือบรากฟัน

โดยเซลล์สร้างเนื้อฟัน (odonoblasts) มีการสร้างคอลลาเจน และฟอสโฟโปรตีนเนื้อฟัน (dentine phosphoprotien)

ส่วนประกอบของเนื้อฟัน

เนื้อฟันจะมีส่วนประกอบร้อยละ 70 เป็นแร่ธาตุ ร้อยละ 20 เป็นอินทรีย์วัตถุ และร้อยละ 10 เป็นน้ำ ส่วนประกอบอินทรีย์ของฟัน ประกอบด้วย คอลลาเจน โดยเฉพาะคอลลาเจนชนิดที่ 1 (collagen type I) เป็นสัดส่วนมากกว่าร้อยละ 90 และเป็นโครงสร้างสำหรับให้แร่ธาตุมาสะสม เพื่อสร้างเป็น ไฮดรอกซีแอปาไทต์ (hydroxyapatite) (162) นอกจากคอลลาเจนแล้ว เนื้อฟันประกอบด้วย ฟอสโฟโปรตีน phosphoproteins โปรตีโอไกลแคน (proteoglycans) และ ไกลโคโปรตีน (glycoproteins) โดยส่วนโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจน (non-collagenous proteins (NCPs) จะเป็น dentin sialophosphoprotein (DSPP) เป็นหลัก โดย DSPP จะผ่านกระบวนการสังเคราะห์ต่อไปเป็นโปรตีน dentin sialoprotein (DSP) และ dentin phosphaprotein (DPP) โดย DSP มีหน้าที่ควบคุมการสะสมแร่ธาตุของชั้นเนื้อฟัน จากนั้น DPP มีบทบาทในการเติบโตและขยายขนาดของเนื้อฟัน (3) นอกจากนี้ยังพบโปรตีนอื่นๆ อาทิ

- Dentin matrix protein 1 (DMP1) พบในชั้นเนื้อฟัน (dentine) และชั้นพรีเดนทีน (predentine) มีบทบาทให้เกิดการสร้างโครงสร้างแอปาไทต์ (apatite)
- Bone sialoproteins มักพบใน predentine และพบมากขึ้นในเนื้อฟันตติยภูมิ (tertiary dentine) เชื่อว่ามีบทบาทในการก่อตัวและการขยายขนาดของผลึกแอปาไทต์
- Osteopontin พบปริมาณน้อยในชั้นเนื้อฟัน มักพบปริมาณมากขึ้นในเนื้อฟันตติยภูมิ

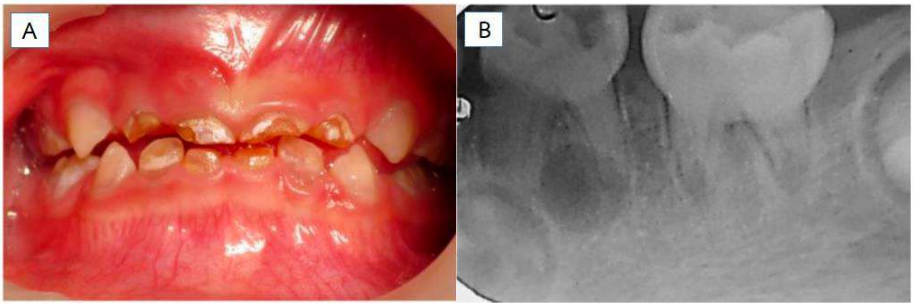
ความผิดปกติของเนื้อฟัน มีสาเหตุจากหลายปัจจัย ได้แก่ การกลายพันธุ์ของสารพันธุกรรม ซึ่งเป็นได้ทั้งจากกรรมพันธุ์และไม่ใช่กรรมพันธุ์ หรือจากปัจจัยภายนอกซึ่งเป็นได้ทั้งจากปัจจัยทางระบบ อาทิ การขาดสารอาหาร ยาบางชนิด หรือโรคทางเมตาบอลิซึม และปัจจัยเฉพาะที่ เช่น การได้รับการฉายรังสีเฉพาะที่ อุบัติเหตุต่อฟัน หรือการติดเชื้อเฉพาะที่ ทำให้เกิดความผิดปกติเฉพาะเนื้อฟัน หรือมีความผิดปกติทั้งเคลือบฟันและเนื้อฟันร่วมกัน

ความผิดปกติของการสร้างเนื้อฟันที่มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรม เป็นโรคที่เกิดจากความผิดปกติของการสร้างหรือการสะสมแร่ธาตุของโครงสร้างเนื้อฟัน พบได้ทั้งในฟันแท้และฟันน้ำนม ในปี ค.ศ. 1973 Shields และคณะ ได้ทำการจำแนกความผิดปกติของการสร้างเนื้อฟันที่มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรม ออกเป็น dentinogenesis imperfecta (DGI) ชนิดที่ 1 2 และ 3 และ dentin dysplasia (DD) ชนิดที่ 1 และ 2 (39)

Dentinogenesis imperfecta

DGI มีอุบัติการณ์การเกิด ประมาณ 1 ใน 6000 - 8000 คน ลักษณะทางคลินิก ได้แก่ ฟันมีสีน้ำตาลอ่อน มีแสงสะท้อนเหมือนโอปอล (opalescent dentin) เคลือบฟันมีแนวโน้มที่จะแตกหักได้ง่าย เนื่องจากความผิดปกติของเนื้อฟัน ท่อเนื้อฟัน และรอยต่อเนื้อฟันและเคลือบฟัน การสึกกร่อนของเคลือบฟันและเนื้อฟันทำให้ฟันสึกสั้น และ

แตกง่าย พบได้ตั้งแต่การสึกกร่อนเล็กน้อยไปจนสึกเหลือแต่รากฟัน ผู้ป่วยมักมีอาการเสียวฟัน ฟันผุ และติดเชื้อในประสาทฟันและปลายรากฟัน ลักษณะทางภาพถ่ายรังสี ตัวฟันมีรูปร่างโค้งมน คอฟันคอด (bulbous tooth) รากฟันสั้นและบาง ในระยะแรกที่ฟันขึ้นมักพบโพรงประสาทฟันมีขนาดใหญ่กว่าปกติ จากนั้นจะค่อยๆ เล็กลงจนเกือบจะหายไป (รูปที่ 8) (40)



รูปที่ 8 ภาพถ่ายช่องปากและภาพถ่ายรังสีของผู้ป่วยที่มีเนื้อฟันบกพร่อง

Dentinogenesis imperfecta, Shields Type I (DGI I)

มีความผิดปกติของการสร้างเนื้อฟัน ขณะที่เคลือบฟันพัฒนาปกติ ฟันมีสีน้ำตาลเหลือบ พบได้ทั้งในฟันน้ำนมและฟันแท้ เนื้อฟันเปราะ พบร่วมกับโรคกระดูกเปราะกรรมพันธุ์ (osteogenesis imperfecta, OI) ซึ่ง OI เป็นโรคที่มีความผิดปกติแต่กำเนิด โรคกลุ่มนี้เกิดจากความผิดปกติของยีนเดี่ยว เกิดการเปลี่ยนแปลงของยีนที่ผลิตสารที่เป็นส่วนสำคัญในการสร้างกระดูก ทำให้เกิดอาการกระดูกเปราะหักง่าย ซึ่งอาจหักได้เองหรือด้วยสาเหตุเพียงเล็กน้อย ผู้ป่วยตัวเตี้ยกว่ามาตรฐาน ตาขาวมักมีสีฟ้าอ่อน (blue sclera) ข้อหลวม เท้าแบน (flat feet) ขาและแขนโก่ง กระดูกสันหลังคดงอ (scoliosis) แขนขาสั้น และมักพบปัญหาการได้ยิน (รูปที่ 9) ผู้ป่วยมักได้รับการรักษาด้วยกลุ่มยาบิสฟอสโฟเนต (Bisphosphonate) เพื่อยับยังการทำงานของเซลล์ ยับยั้งการทำงานของเซลล์ออสทิโอคลาส (osteoclast) ซึ่งเมีหน้าที่ในการสลายเซลล์กระดูก ทำให้การสลายเซลล์กระดูกลดลง (41)



รูปที่ 9 ภาพถ่ายทางคลินิกและภาพรังสีของผู้ป่วยที่มีความพิการทางกระดูก
ภาพถ่ายรังสีการเชื่อมติดกันของกระดูกต้นขา ที่หักตั้งแต่แรกเกิด และลักษณะฟันของผู้ป่วยที่มีเนื้อฟันไม่สมบูรณ์

มากกว่าร้อยละ 80 ของผู้ที่เป็น OI มีสาเหตุมาจากความบกพร่องแบบยีนเด่น (dominant mutation) โดยคนที่เป็นโรค OI ลักษณะนี้จะมีโอกาสในการถ่ายทอดยีนและโรคไปยังลูกได้ในอัตราร้อยละ 50 อย่างไรก็ตาม ผู้ป่วยที่เป็นโรค OI บางคนไม่มีประวัติคนในครอบครัวเป็นโรคนี้ แต่เป็นการกลายพันธุ์ใหม่ที่เกิดขึ้นเองโดย

ธรรมชาติ (de novo mutation) และประมาณร้อยละ 10 ของผู้ที่เป็นโรค OI มีสาเหตุมาจากการกลายพันธุ์แบบยีนด้อย (recessive mutation) ในกรณีนี้พ่อแม่ไม่ได้เป็นโรค OI แต่เป็นพาหะของการกลายพันธุ์ทั้งคู่ ซึ่งพ่อแม่เหล่านี้จะมีโอกาสร้อยละ 25 ในแต่ละครั้งที่ตั้งครรภ์ที่จะให้กำเนิดบุตรที่เป็นโรค OI

ในปี ค.ศ.1979 Silence ได้ทำการจำแนก OI ตามความรุนแรงได้เป็น 4 ชนิด (10) ได้แก่

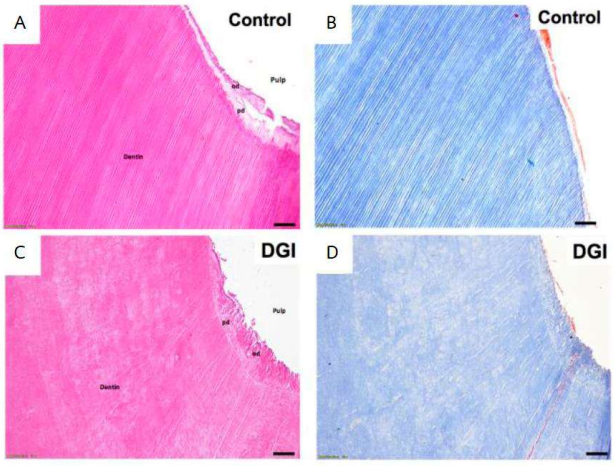
I. Osteogenesis imperfecta, type I (OI1, OMIM #166200) เป็นชนิดที่พบมากที่สุด มีความรุนแรงของโรคน้อยที่สุด ผู้ป่วยมักมีตาขาวเป็นสีฟ้า กระดูกหักได้ตั้งแต่หลังคลอด อาจมีความผิดปกติของฟัน dentinogenesis imperfecta ร่วมด้วย มักเกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์แบบยีนเด่นในยีนที่สร้างคอลลาเจนชนิดที่ 1 หรือ collagen, type I, alpha-1 (COL1A1, OMIM *120150) ซึ่งเป็นยีนที่อยู่บนตำแหน่งโครโมโซม17q21 เกี่ยวข้องกับการสร้างสายเปปไทด์ของคอลลาเจนชนิดที่ 1 โดยมีการถ่ายทอดแบบเด่นบนออโตโซม (8) ทำหน้าที่ในการสร้างกระดูก ผิวหนัง เละเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน

II. Osteogenesis imperfecta type II หรือ osteogenesis imperfect congenita, perinatal lethal form (OI2, OMIM #166210) พบสัมพันธ์กัลการกลายพันธุ์ของยีน COL1A1 และ COL1A2 (OMIM *120160) บนโครโมโซม 7q21.1 เป็นชนิดมีอาการรุนแรงที่สุด พบกระดูกหักตั้งแต่ทารกอยู่ในครรภ์มารดา หรือตั้งแต่แรกเกิด ผู้ป่วยมักเสียชีวิตขณะคลอด หรือ ช่วงเวลาก่อนคลอดจากปัญหาทางระบบทางเดินหายใจ พบกระดูกท่อนยาวแตกหักหลายตำแหน่ง มีลักษณะยับยู่ยี่เหมือนถูกขยำ (crumpled long bones) กระดูกซี่โครงหักเป็นซี่เล็กๆ และพบความผิดปกติของกระดูกที่ภาพรังสีของกะโหลกศีรษะ

III. Osteogenesis imperfecta type III (OI3, OMIM #259420) เกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์แบบเด่นของยีน COL1A1 และ COL1A2 มักเป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดที่ตัวผู้ป่วยเอง ไม่พบความผิดปกติในพ่อแม่ ผู้ป่วยส่วนใหญ่มีกระดูกหักตั้งแต่เกิด และค่อยๆมีการโค้งงอของกระดูกแขน ขา และกระดูกสันหลังเพิ่มมากขึ้น หลังคลอด

IV. Osteogenesis imperfecta type IV (OI4, OMIM #166220) เกิดจากการกลายพันธุ์แบบเด่น มีความรุนแรงปานกลาง พบการผิดรูปของกระดูกท่อนยาวได้หลากหลาย ตาขาวมักมีสีปกติ

Dentinogenesis imperfecta, Shields Type II (DGI II, OMIM #125490) มีอาการเฉพาะที่ฟันโดยไม่มีอาการกระดูกเปราะแตกต่างจาก Shields Type I อาการทางคลินิกคล้ายกับชนิดที่ 1 พบฟันมีการลดลงของความสว่าง มีสีเหลือบเทาน้ำตาล มีการศึกษาพบว่า เนื้อฟันมีปริมาณแร่ธาตุลดลง ลักษณะทางภาพถ่ายรังสีพบตัวฟันโป่งกลม คอฟันคอด รากฟันสั้นและแคบ โพรงประสาทฟันเล็กกว่าปกติหรือหายไป การเรียงตัวของท่อเนื้อฟันไม่ต่อเนื่อง หรือตีบ (รูปที่ 10) เซลล์ที่สกัดจากเนื้อเยื่อในโพรงฟันของผู้ป่วยชนิดนี้มีความสามารถในการเจริญลดลง เกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของยีน dentin sialophosphoprotein (DSPP, OMIM *125485) ซึ่งส่งผลต่อการสร้างโปรตีน DSP และ DPP พบการถ่ายทอดแบบเด่นบนออโตโซม นอกจากนี้ผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ของยีน DSPP ยังพบความผิดปกติของเนื้อเยื่อปริทันต์ร่วมด้วย (42)



รูปที่ 10 ลักษณะของเนื้อฟันภายใต้กล้องจุลทรรศน์

(A, B) ภาพตัดขวางเนื้อฟันปกติ (C, D) ภาพตัดขวางเนื้อฟันของผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น dentinogenesis imperfecta, Shields Type II แสดงให้เห็นท่อเนื้อฟันผิดปกติ มีรูปร่าง สั้น ไม่สม่ำเสมอ และมีปริมาณลดลง (A, B) ย้อมสีด้วย hematoxylin และ eosin (C, D) ย้อมสีด้วย masson's trichrome

Dentinogenesis imperfecta, Shields Type III (DGI III, OMIM #125500 หรือ Brandywine Type) ค้นพบครั้งแรกในประชากรทางตอนใต้ของเมืองแมรี่เลนด์ ประเทศสหรัฐอเมริกา หรือรู้จักกันในชื่อของ Brandywine isolate มีอุบัติการณ์การเกิดโรคต่ำ ไม่มีผลกระทบต่อกระดูก พบฟันมีสีและรูปร่างเหมือนกับ ชนิดที่ 1 หรือ ชนิดที่ 2 แต่ส่วนที่แตกต่างกันคือจะพบรูทะลุประสาทฟันหลายตำแหน่งในฟันน้ำนม ลักษณะทางภาพรังสีของฟันมีความหลากหลายมากแม้กระทั่งในบุคคลเดียวกัน พบได้ทั้งที่มีลักษณะเหมือนฟันปกติไปจนถึงคล้ายเปลือกฟัน หรือ "shell teeth" คือ ฟันมีโพรงประสาทขนาดใหญ่ เคลือบฟันและเนื้อฟันเป็นเพียงเปลือกบางๆ หุ้มอยู่ จากการศึกษาวิจัยมากขึ้น พบว่า DGI, Shields Type II และ III อาจจะเป็นโรคชนิดเดียวกัน แต่มีลักษณะการแสดงออกที่ต่างกัน หรือมีความรุนแรงของโรคต่างกัน

Dentin dysplasia

Dentin dysplasia เป็นความผิดปกติของการสร้างเนื้อฟันที่มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่พบได้ตั้งแต่กำเนิด มีอุบัติการณ์การเกิดโรคต่ำ พบลักษณะ circumpulpal dentin และ รูปร่างรากฟันผิดปกติ จำแนกเป็น 2 ชนิด คือ ชนิดที่ 1 มักพบความผิดปกติในส่วนรากฟัน (radicular part) และ ชนิดที่ 2 มักพบว่าความผิดปกติอยู่ที่ส่วนตัวฟัน (coronal part)

1. Dentin dysplasia, type I (DTDP1 OMIM #125400) หรือ radicular dentin dysplasia พบอุบัติการณ์การเกิดโรคที่ 1 ใน 100,000 ประชากร มีความผิดปกติที่ส่วนรากฟัน ฟันรากสั้นหรือไม่มีรากฟัน (rootless tooth) พบได้ทั้งในฟันน้ำนมและฟันแท้ โดยทั่วไปสีของฟันและลักษณะของตัวฟันปกติ มีบางกรณีอาจพบตัวฟันมี

สีเหลือบน้ำตาลเล็กน้อย ฟันจะโยกหรือหลุดได้ง่าย เนื่องจากรากสั้น ส่วนมากจะไม่ปรากฏโพรงประสาทฟันและโพรงรากฟันในภาพถ่ายรังสี และมักเกิดการติดเชื้อปลายรากฟันได้ง่าย มีรายงานการกลายพันธุ์ของยีน sparc-related modular calcium-binding protein 2 (SMOC2, OMIM *607223) บนโครโมโซม 6q27 ที่มีการถ่ายทอดแบบด้อยบนออโตโซม (43) (รูปที่ 11)



รูปที่ 11 ภาพถ่ายรังสีแสดงฟันรากสั้น มีการติดเชื้อปลายรากฟัน และโพรงประสาทฟันตีบ

2. Dentin dysplasia, type II (DTDP 2 OMIM #125420) พบความผิดปกติอยู่ที่ส่วนตัวฟัน รูปร่างรากฟันปกติ ฟันแท้ปกติแต่ฟันน้ำนมมีสีเหลือบโอปอลคล้าย DGI โพรงประสาทฟันและคลองรากฟันของฟันหน้าและฟันกรามน้อยมีรูปร่างคล้ายกรวย (thistle tubes) เนื่องจากมีการยื่นยาวของโพรงประสาทฟัน (16) และพบก้อนหินปูนในโพรงเนื้อเยื่อฟัน (pulp stones) พบว่าเกี่ยวข้องกับกลายพันธุ์ของยีน DSPP ที่มีการถ่ายทอดแบบเด่นบนออโตโซม

โรคทางระบบอื่นๆ ที่มีความเกี่ยวข้องกับความผิดปกติของเนื้อฟัน

โรคหนังยื่นผิดปกติ (Ehlers-Danlos syndrome, EDS)

Ehlers-Danlos syndrome ตั้งชื่อตามของแพทย์สองท่านนามว่า Edward Ehlers ชาวเดนมาร์ก และ Henri-Alexandre Danlos ชาวฝรั่งเศสที่ค้นพบโรคนี้ EDS เป็นกลุ่มโรคทางพันธุกรรมที่เกี่ยวกับความบกพร่องของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) ร่างกายไม่สามารถสร้างคอลลาเจนได้ตามปกติ ทำให้เนื้อเยื่อเกี่ยวพันทั่วร่างกาย อาทิ ผิวหนัง เส้นเลือด กล้ามเนื้อ เอ็นและกระดูก ผิดปกติหรือหย่อนแต่กำเนิด ผู้ป่วยอาจมีอาการได้ตั้งแต่มีผิวหนังยืดหยุ่น (รูปที่ 12) ข้อหย่อนมากกว่าปกติ (hypermobility) กล้ามเนื้ออ่อนแรง ผนังหลอดเลือดบกพร่องทำให้เกิดอาการเลือดออกง่าย มีรอยโรคที่ผิวหนังซ้ำๆ เป็นสีน้ำตาลคล้ำเป็นจ้ำช้ำได้ง่าย พบบ่อยที่บริเวณข้อศอกและหัวเข่า ข้อต่อร่างกายสามารถหักงอได้มากกว่าปกติ มีอาการเมื่อยล้าง่าย พัฒนาการด้านการสั่งงานกล้ามเนื้อช้า ในกรณีของผู้ป่วยที่มีอาการหนัก อาจทำให้เส้นเลือดแตกไปจนถึงเป็นอันตรายถึงชีวิต (41)



รูปที่ 12 ลักษณะผิวหนังของผู้ป่วย Ehlers-Danlos syndrome ที่มีความยืดหยุ่นมากกว่าปกติ

ในปี 2017 มีการจำแนกโรค EDS ออกเป็น 13 ชนิด โดยมีความเกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของยีน 19 ยีน อาทิ COL1A1, COL1A2, COL3A1 (OMIM *120180), COL5A1 (OMIM *120215), COL5A2 (OMIM *120190), COL12A1 (OMIM *120320), a disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 2 (ADAMTS2, OMIM *604539), beta-1,3-galactosyltransferase 6 (B3GALT6, OMIM *615291), beta-1,4-galactosyltransferase 7 (B4GALT7, OMIM *604327), complement component 1, r subcomponent (C1R, OMIM *613785), complement component 1, s subcomponent (C1S, OMIM *120580), carbohydrate sulfotransferase 14 (CHST14, OMIM *608429), dermatan sulfate epimerase (DSE, OMIM *605942), FK506-binding protein 14 (FKBP14, OMIM *614505), procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase (PLOD1, OMIM *153454), PR domain-containing protein 5 (PRDM5, OMIM *614161), solute carrier family 39 (zinc transporter), member 13 (SLC39A13, OMIM *608735), tenascin XB (TNXB, OMIM *600985) และ zinc finger protein 469 (ZNF469, OMIM *612078) โดยยีน COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL5A1 และ COL5A2 มีส่วนเกี่ยวข้องกับการสร้างคอลลาเจนหลายชนิด ซึ่งทำหน้าที่เป็นโครงร่างและเพิ่มความแข็งแรงของชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในร่างกาย ยีน ADAMTS2, FKBP14, PLOD1 และ TNXB ทำหน้าที่สร้างโปรตีนที่เกี่ยวกับการสร้างหรือการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของคอลลาเจน ดังนั้นการกลายพันธุ์ของยีนเหล่านี้ทำให้คอลลาเจนประกอบกันไม่สมบูรณ์ ส่งผลให้ชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในผิวหนัง กระดูก และส่วนอื่นของร่างกายอ่อนแอ ซึ่งเป็นลักษณะที่พบใน EDS (41) นอกจากนี้ยังพบยีนที่เกี่ยวข้องกับ EDS แต่ไม่มีหน้าที่เกี่ยวกับคอลลาเจน ซึ่งยังไม่เป็นที่แน่ชัดว่าถึงสาเหตุที่การกลายพันธุ์ที่ยีนเหล่านั้นส่งผลต่อการเกิดข้อหลวม ผิวหนังหย่อน และลักษณะอื่นๆของโรค EDS

โดยส่วนใหญ่แล้วผู้ป่วยโรค EDS ไม่มีอาการเนื้อฟันผิดปกติ แต่มีการรายงานว่าพบผู้ป่วยที่มีอาการ EDS, type VIIB (OMIM #617821) เกิดจากการเพิ่มเบสของยีน COL1A2 มีลักษณะเนื้อฟันสีเหลือง และผู้ป่วย EDS, type VII หรือชนิด dermatosparaxis (OMIM #225410) มีภาวะฟันหาย โครงสร้างเนื้อฟัน และการเจริญของรากฟันผิดปกติ มีความเกี่ยวข้องกับความผิดปกติแบบเด่นของยีน ADAMTS2 ที่เป็นเอนไซม์ในการสร้างโปรคอลลาเจน (procollagens)

Schimke immunoosseous dysplasia

Schimke immunoosseous dysplasia (SIOD, OMIM #242900) คือ กลุ่มอาการที่เกิดจากความผิดปกติทางพันธุกรรมแบบด้อยบนออโตโซม ซึ่งประกอบไปด้วยอาการตัวเตี้ย กระดูกสันหลังเคลื่อน (spondyloepiphyseal dysplasia) ไตผิดปกติ และ เม็ดเลือดขาวชนิด T cell บกพร่อง (T-cell immunodeficiency) มักทำให้ติดเชื้อได้ง่าย อาการร่วมอื่นๆ ที่พบ ได้แก่ หลังโค้ง ผิวหนังที่หน้าอกและหลังมีสีเข้ม และสันจมูกกว้าง ประมาณร้อยละ 50 ของผู้ป่วย SIOD พบการกลายพันธุ์ที่ยีน SWI/SNF-related, matrix-associated, actin-dependent regulator of chromatin, subfamily A-like protein 1 (SMARCAL1, OMIM *606622) ซึ่งทำหน้าที่ในการแสดงออกของยีนอื่นที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างโครมาติน (chromatin) มีรายงานลักษณะฟันใน SIOD อาจพบฟันมีสีเหลืองอมเทา ตัวฟันป่อง คอฟันคอด ทั้งในฟันกรามของฟันน้ำนมและฟันแท้ โพรงเนื้อเยื่อประสาทฟันมีขนาดเล็กหรือตีบ รากฟันบาง ชั้นเคลือบฟันและเนื้อฟันอ่อนกว่าฟันปกติ มีลักษณะคล้ายฟันที่เป็น DGI (44)

Hyperphosphatemic familial tumoral calcinosis

Hyperphosphatemic familial tumoral calcinosis (HFTC, OMIM #211900) เป็นโรคที่มีการสะสมแคลเซียมในช่องว่างของร่างกาย ตามเนื้อเยื่ออ่อนและกระดูก อาการหลักที่พบ คือ ภาวะฟอสเฟตในเลือดสูง (hyperphosphatemia) จากการดูดกลับฟอสเฟตที่ไตเพิ่มขึ้น พบความผิดปกติของยีน UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3 (GALNT3, OMIM *601756) ในตำแหน่ง 2q24-q31 เป็นความผิดปกติทางพันธุกรรมแบบด้อยบนออโตโซม นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงการกลายพันธุ์ของยีน fibroblast growth factor 23 (FGF23, OMIM *605380) ตำแหน่ง 12p13.3 ในผู้ป่วย HFTC อีกด้วย ผู้ป่วยโรค HFTC ที่เกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของยีน GALNT3 มีความผิดปกติของเนื้อฟัน โดยรากฟันมีลักษณะโป่งสั้น และพบก้อนหินปูนในโพรงประสาทฟัน ในขณะที่ผู้ป่วยที่พบการกลายพันธุ์ของยีน FGF23 พบว่ามีการขึ้นของฟันแท้ช้า และรากฟันสั้นกว่าปกติ นอกจากยีนทั้ง 2 ชนิดที่กล่าวมาข้างต้น HFTC ยังสามารถเกิดการกลายพันธุ์ของยีน KLOTHO (KL, OMIM *604824) แต่การกลายพันธุ์ที่ยีนนี้ไม่มีการรายงานความผิดปกติของฟัน (45)

X-linked dominant hypophosphatemia

X-linked dominant hypophosphatemia หรือ X-linked vitamin D-resistant rickets (XLHR, OMIM #307800) มีอาการกระดูกอ่อนและกระดูกเจริญเติบโตช้า ตัวเตี้ย ฟอสเฟสในเลือดต่ำ (hypophosphatemia) ไตบกพร่องในการดูดซับฟอสเฟส อาจพบระดับวิตามินดีในเลือดต่ำหรือปกติ ระดับอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในเลือดสูง และปัญหาด้านฟัน ผู้ป่วยมักมีหนองที่ฟันหลายตำแหน่งโดยไม่มีฟันผุ โรคปริทันต์ หรือการบาดเจ็บที่ฟัน ภาพถ่ายรังสีของฟันแสดงให้เห็นว่ามีรากฟันผิดปกติและมีโพรงเนื้อเยื่อประสาทฟันใหญ่ จากการวินิจฉัยด้วยกล้อง

จุลทรรศน์พบชั้นพรีเดนทีนกว้าง และช่องว่างในเนื้อฟันรอบๆ โพรงประสาทฟัน ซึ่งคาดว่าเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในเนื้อเยื่อประสาทฟัน จากการบุกรุกของแบคทีเรียผ่านช่องว่างในเนื้อฟันที่สร้างไม่สมบูรณ์ โรค XLH เกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของยีน phosphate-refulating endopeptidase gene (PHEX, OMIM *300550) ที่โครโมโซมบริเวณ Xp22.11 ซึ่งพบการแสดงออกของยีนนี้ในเซลล์สร้างเนื้อฟันโอดอนโตบลาสต์ (odontoblasts) และเซลล์สร้างกระดูกออสตีโอบลาสต์ (osteoblasts)

Seckel syndrome 1

Seckel syndrome 1 (SCKL 1, OMIM #210600) เป็นความผิดปกติที่แบบยีนด้อยบนออโตโซม ผู้ป่วยมีลำตัวสั้น ศีรษะเล็ก มีอาการบกพร่องทางสติปัญญา และ มีลักษณะรูปหน้าคล้ายนก ‘‘bird-headed’’ ความผิดปกติทางช่องปากและฟันที่พบในรค SCKL1 ประกอบไปด้วย ความผิดปกติของเนื้อฟัน เคลือบฟันไม่สมบูรณ์ ฟันขึ้นช้า ซี่ฟันเล็ก และฟันหาย มีรายงานเกี่ยวกับผู้ป่วยโรค SCKL ในผู้ป่วย 4 คนที่เป็นพี่น้องกัน พบการขาดหายไปของฟันจำนวน 2 ซี่ หรือมากกว่าในเด็กทั้ง 4 คน โดยที่เด็กทั้งหมดไม่มีฟันเขี้ยวด้านบน มีรากฟันสั้นและโพรงประสาทฟันใหญ่ การพัฒนาของฟันปกติ ขณะที่กระดูกมีการพัฒนาช้า นอกจากนั้นยังมีรายงานเพิ่มเติมที่พบความผิดปกติของฟันและช่องปากในผู้ป่วย SCKL ได้แก่ ฟันตัดหน้าบละล่างหาย เพดานโหว่ กระดูกเบ้าฟันเปราะ ฟันสีเหลือง และฟันกรามไม่มีราก ลักษณะข้างต้นเกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของยีน Ataxia-telangiectasia and rad3-related gene (ATR, OMIM *601215) ที่ตำแหน่งบนโครโมโซม 3q23 ซึ่งมีหน้าที่สำคัญในการแบ่งตัวและการซ่อมแซมของดีเอ็นเอและเซลล์ (46)

Microcephalic osteodysplastic primordial dwarfism

Microcephalic osteodysplastic primordial dwarfism แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ microcephalic osteodysplastic primordial dwarfism, type I (MOPD1, OMIM #210710) และ microcephalic osteodysplastic primordial dwarfism, type II (MOPD2, OMIM #210720) ผู้ป่วยมีตัวแคระ กะโหลกศีรษะเล็ก ผู้ป่วย MOPD1 มีอาการระบบประสาทผิดปกติและส่วนใหญ่มักเสียชีวิตตั้งแต่อายุยังน้อย มีความรุนแรงมากกว่า MOPD2 ชนิดที่มีอาการทางฟัน คือ MOPD2 พบลกษณะฟันเล็ก ฟันหาย เนื้อฟันผิดปกติ และรากฟันสั้น (14) ลักษณะข้างต้นของ MOPD2 เกิดจากการกลายพันธุ์แบบด้อยบนออโตโซม ของยีน pericentrin (PCNT, OMIM *605925) (47)

ตารางที่ 1 โรคที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของเนื้อฟัน

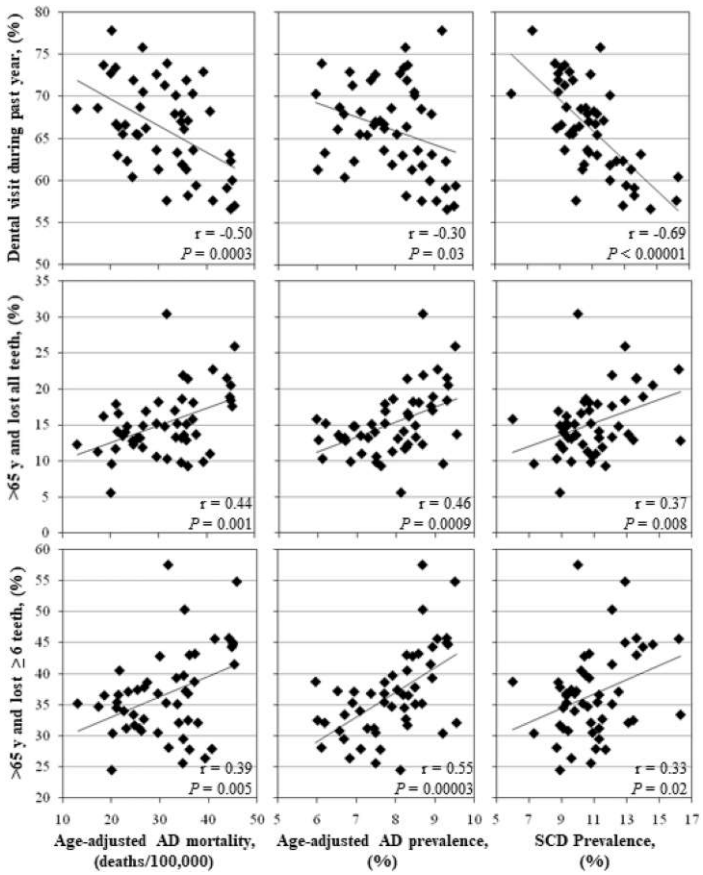
Syndrome	Inheritance	Dentin defects	Gene
OI type IB,	AD	DGI	*COL1A1, COL1A2*
OI type IIIB	AD	DGI	*COL1A1, COL1A2*
OI type IVB	AD	DGI	*COL1A1, COL1A2*
Goldblatt syndrome	AD	DD II	*COL2A1*
Hyperphosphatemic familial tumoral calcinosis	AR	DD I	*GALNT3, FGF23*
Familial hypophosphatemic vitamin D-resistant rickets	XD	DD I	*PHEX*
Microcephalic osteodysplastic primordial dwarfism, type II	AR	DD I/ DD II	*PCNT2*
Schimke immunoosseous dysplasia	AR	DGI	*SMARCAL1*
Seckel syndrome 1	AR	ไม่มีลักษณะเฉพาะ	*ATR*
Singleton-Merten syndrome,	AD	DD I	ไม่ทราบแน่ชัด
EDS, classical type	AD	DGI/ DD I	*COL5A1*
Rothmund-Thompson syndrome	AR	ไม่มีลักษณะเฉพาะ	*RECQL4*

ความผิดปกติของเนื้อฟันมีสาเหตุทั้งมาจากความผิดปกติของสารพันธุกรรม และที่ไม่เกี่ยวข้องกับพันธุกรรมหรือกรรมพันธุ์ อาจเกิดความผิดปกติเฉพาะเนื้อฟัน หรือมีความผิดปกติทั้งเคลือบฟันและเนื้อฟันพร้อมกันก็ได้ เนื้อฟันที่ผิดปกติ ส่งผลให้ฟันแตกหักได้ง่าย เกิดการติดเชื้อปลายรากฟันโดยไม่มีสาเหตุแน่ชัด อีกทั้งการแสดงออกของเนื้อฟันผิดปกติอาจเป็นส่วนหนึ่งของความผิดปกติอื่นๆ ของร่างกาย นอกจากนี้ผู้ป่วยอาจได้รับยาที่มีผลต่อการรักษาทางทันตกรรม อาทิ ยากลุ่มบิสฟอสโฟเนต ซึ่งจะเพิ่มโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดภาวะการตายของกระดูกขากรรไกร (Osteonecrosis of the jaw) ภายหลังการผ่าตัดทางทันตกรรม โดยเฉพาะผู้ที่ได้รับยาทางเส้นเลือดและผู้ป่วยที่มีอายุมาก ดังนั้นความเข้าใจโรคของผู้ป่วย ไม่ใช่เพียงแต่ลักษณะทางช่องปากและฟัน แต่รวมถึงภาวะ

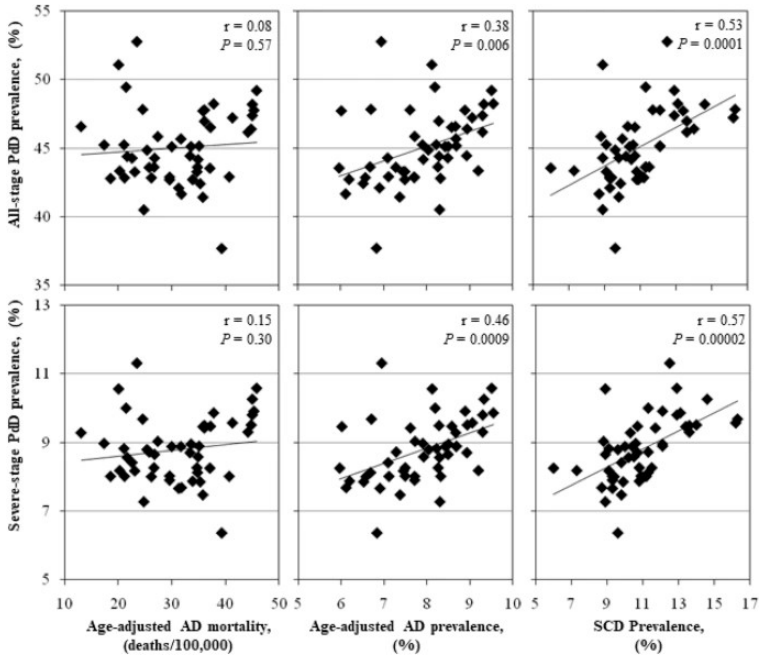
ทางระบบ ยาที่ได้รับ และการตรวจวินิจฉัยทางพันธุศาสตร์จึงมีความสำคัญ เพื่อการวินิจฉัยอาการที่รวดเร็วและแม่นยำ อันนำไปสู่วิธีป้องกันและรักษาที่เหมาะสมต่อตัวผู้ป่วยมากที่สุด

2.10 ภาวะทางช่องปาก โรคทางระบบและโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง

ผู้สูงอายุมากถึงเจ็ดสิบเปอร์เซ็นต์มีโรคทางระบบอย่างน้อยหนึ่งโรค มีหลักฐานสนับสนุนชัดเจนว่าโรคทางระบบที่ทำให้เกิดการเจ็บป่วยและมีปัญหาในช่องปากและฟัน คือ โรคเบาหวาน (Diabetes Mellitus) ซึ่งเป็นภาวะเรื้อรังตลอดชีวิตที่เกี่ยวข้องกับระดับน้ำตาลในเลือดสูงผิดปกติ การผลิตอินซูลินไม่เพียงพอหรือความสามารถของร่างกายในการใช้อินซูลินลดลงทำให้เกิดโรคเบาหวาน โรคเบาหวานจำแนกเป็นสามประเภท ได้แก่ เบาหวานชนิดที่ 1 ชนิดที่ 2 และเบาหวานขณะตั้งครรภ์ สาเหตุของโรคเบาหวานแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับภูมิหลังทางพันธุกรรมของบุคคล ประวัติครอบครัว เชื้อชาติ สุขภาพ และปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อม มีหลักฐานหลายอย่างที่แสดงให้เห็นว่าความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันมีบทบาทสำคัญในการพัฒนาของโรคเบาหวาน ชนิดที่ 2 และยีนพหุสัณฐานที่เข้ารหัสเอนไซม์ป้องกันสารต้านอนุมูลอิสระมีรายงานว่า เกี่ยวข้องกับความเสี่ยงต่อโรคเบาหวาน ชนิดที่ 2 ในประชากรต่างๆ Glutathione S-transferases (GSTs) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระและเอนไซม์เปลี่ยนรูปทางชีวภาพ การศึกษาล่าสุดได้แสดงให้เห็นว่ายีนที่เข้ารหัสกลูตาไธโอน S-transferases รวมทั้งกลูตาไธโอน S-transferase M1 (GSTM1), T1 (GSTT1) และ P1 (GSTP1) มีส่วนทำให้เกิดความเสี่ยงต่อโรคเบาหวาน ชนิดที่ 2 (48, 49) นอกจากโรคเบาหวานแล้ว ปัจจัยทางช่องปากหรือสุขภาพทางช่องปากยังมีผลกระทบต่อความดันโลหิต ระดับไขมันในเลือด โรคหัวใจ และความจำเสื่อม (อัลไซเมอร์ และ ดีเมนเชีย) ซึ่งเป็นโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง ที่พบได้สูงในประชากรไทย (50) จากการศึกษาพบว่า ผู้ที่มีสุขภาพช่องปากไม่ดีจะมีความสัมพันธ์ กับอัตราการเกิดโรคอัลไซเมอร์ อัตราการเสียชีวิต และความจำเสื่อมเพิ่มมากขึ้น โดยผู้สูงอายุที่มีการสูญเสียฟัน และมีสุขภาพช่องปากอวัยวะปริทันต์ที่ไม่ดี หรือเป็นโรคปริทันต์ จะมีความรุนแรงของโรคอัลไซเมอร์ อัตราการเกิดโรคและอัตราการตายจากโรคอัลไซเมอร์ และภาวะความจำเสื่อมสูงกว่าผู้ที่มีฟันครบอย่างมีนัยสำคัญ (51) (รูปที่ 13, 14) (ตารางที่ 2) ดังนั้นการดูแลให้มีสุขภาพช่องปากที่ดีจึงเป็นการส่งเสริมการดูแลรักษาโรคอัลไซเมอร์อีกทางหนึ่ง (52)



รูปที่ 13 รูปแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการสูญเสียฟันในผู้สูงอายุกับอัตราการตายจากโรคอัลไซเมอร์ อัตราการเกิดโรคอัลไซเมอร์ และความจำเสื่อม



รูปที่ 14 รูปแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสุขภาพช่องปากและอวัยวะปริทันต์กับอัตราการตายจากโรคอัลไซเมอร์ อัตราการเกิดโรคอัลไซเมอร์ และความจำเสื่อม

ตารางที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนฟันที่เหลืออยู่และสุขภาพช่องปากต่อความรุนแรงของโรคอัลไซเมอร์ อย่างมีนัยสำคัญ

		AD			*p*
	Control group	Mild	Moderate	Severe	value
GOHAI	32.0 (17.0-36.0) A	33.0 (22.0-36.0) A	32.5 (25.0-36.0) A	34.0 (25.0-34.0) A	.4135
Number of teeth	13.5 (0.0-28.0) A	4.0 (0.0-22.0) AB	0.0 (0.0-10.0) B	0.0 (0.0-14.0) B	.0223
DMTF	25.5 (12.0-28.0) B	27.0 (22.0-28.0) AB	28.0 (23.0-28.0) A	28.0 (24.0-28.0) A	.0191
OHI	2.2 (0.3-8.0) B	4.0 (1.9-10.0)AB	5.0 (1.7-5.3) AB	7.5 (5.0-10.0) A	.0042
Biofilm on the prosthesis	2.5 (1.0-4.0) A	2.9 (2.2-4.0) A	2.4 (0.06-4.0) A	3.2 (1.7-3.9) A	.0857
Time of use of maxillary prosthesis, years	2.0 (0.6-22.0) A	12.5 (0.5-40.0) A	5.0 (0.1-64.0) A	6.5 (1.0-40.0) A	.2001
Time of use of mandibular prosthesis, years	2.0 (0.6-22.0) A	12.5 (5.0-30.0) A	4.0 (0.1-40.0) A	6.5 (1.0-40.0) A	.2631

Data are represented as the median (minimum–maximum). Distinct letters indicate statistical differences ($P < .05$).

AD, Alzheimer's disease; DMTF, decayed, missing, and filled teeth; GOHAI, General Oral Health Assessment Index; OHI, oral health index.

การศึกษาโรคหัวใจและหลอดเลือดพบว่า ผู้ที่มีการอักเสบของอวัยวะปริทันต์จะส่งเสริมความรุนแรงของโรคหัวใจและหลอดเลือด โดยพบว่าผู้ป่วยที่มีโรคปริทันต์อักเสบ จะเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดมากถึง 25 เปอร์เซ็นต์ และพบว่า 85 เปอร์เซ็นต์ของผู้ป่วยที่มีโรคหัวใจและหลอดเลือดจะมีโรคปริทันต์อักเสบเมื่อเปรียบเทียบกับคนทั่วไปที่ไม่มีโรคหัวใจและหลอดเลือดซึ่งพบโรคปริทันต์อักเสบเพียง 23 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้สุขภาพช่องปากที่ไม่ดีและโรคปริทันต์อักเสบ ยังพบว่าเป็นปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดสภาพของโรคหัวใจและหลอดเลือด (53, 54) (ตารางที่ 3) นอกจากนี้การสูญเสียฟัน หรือการมีฟันไม่ครบในการบดเคี้ยวอาหาร ยังเป็นตัวชี้วัดความเสี่ยงในการเกิดโรคหัวใจขาดเลือด การทำงานของหัวใจล้มเหลว ภาวะเส้นเลือดอุดตันในสมอง และภาวะเส้นเลือดฝอยอุดตันอีกด้วย (55) (ตารางที่ 4

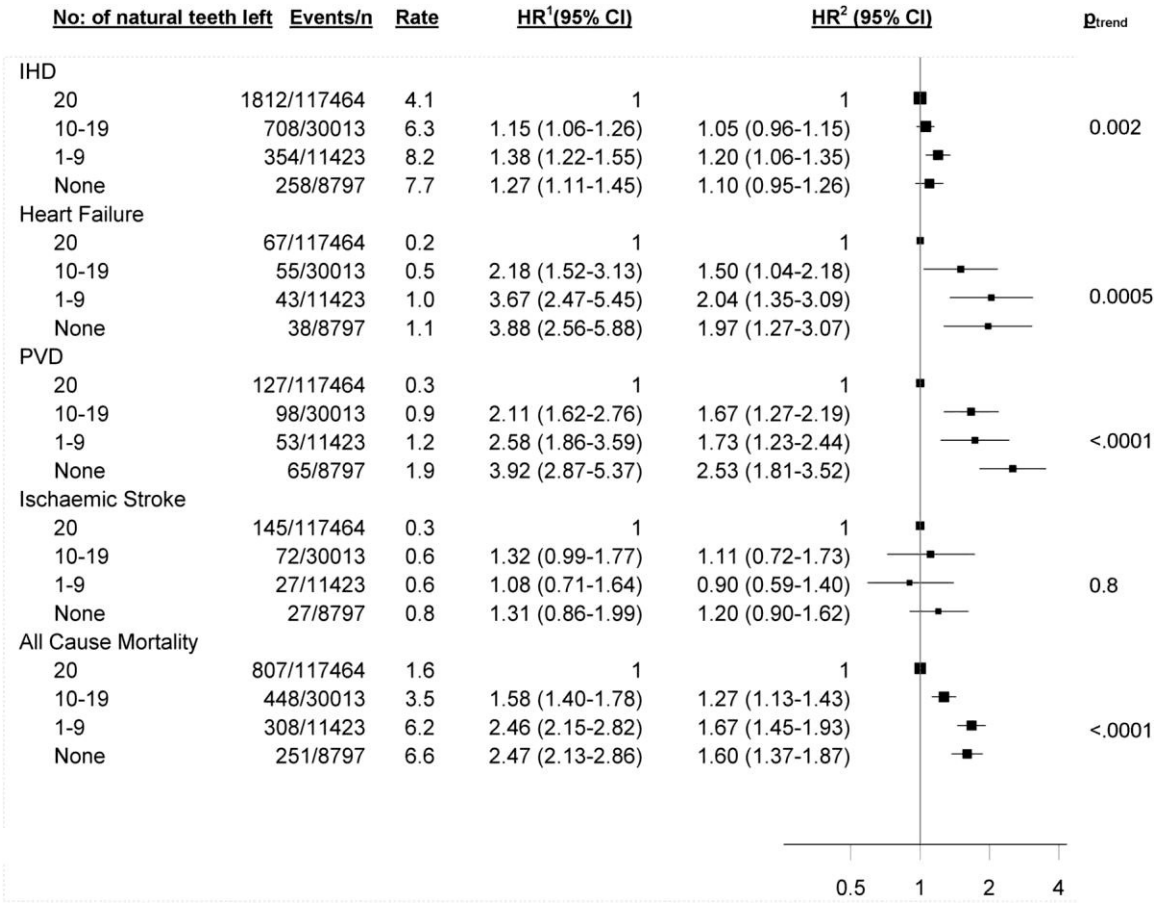
ตารางที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างสุขภาพช่องปากและความเสี่ยงในการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด

Association of oral health indicators with other CVD risk factors using multivariate adjusted regression.

CVD risk factors	Oral health indicators					
	Presence of plaque		GI scores (moderate and severe)		CPI scores (3 and 4)	
	Crude RR *P* value	Adjusted RR[ð] (95% CL) *P* value	Crude RR *P* value	Adjusted RR[∞] (95% CL) *P* value	Crude RR *P* value	Adjusted RR[§] (95% CL) *P* value
Male*	1.0	1.0 (0.99–1.00)	0.96	0.93	1.06	1.05
Female	0.9	0.9	0.02	0.001	0.6	0.8
Age 15–24*						
25–34	0.99 0.08	0.99 (0.98–1.00) 0.09	1.54 <0.0001	1.54 (1.40–1.7) <0.0001	1.26 0.5	1.27 (0.51–3.15) 0.6
35–44	0.99 0.2	0.99 (0.98–1.00) 0.3	1.81 <0.0001	1.80 (1.64–1.97) <0.0001	3.10 <0.0001	2.7 (1.16–6.65) 0.02
45–54	0.98 0.001	0.98 (0.97–0.99) 0.00	1.85 <0.0001	1.83 (1.67–2.01) <0.0001	2.90 0.001	2.42 (1.00–5.85) 0.04
55–64	0.99 0.04	0.99 (0.98–1.00) 0.13	1.91 <0.0001	1.89 (1.73–2.07) <0.0001	4.81 <0.0001	3.88 (1.60–9.38) 0.003
65–74	0.99 0.2	0.99 (0.97–1.01) 0.5	1.92 <0.0001	1.87 (1.69–2.07) <0.0001	4.13 <0.0001	3.25 (1.25–8.40) 0.01

*Reference group. ðAdjustment for age, nutrition, education, and addiction status. ∞Adjustment for age, sex, smoking and addiction status, and nutrition. §Adjustment for age, job, education, addiction, BMI, FBS, and lipid status.N/A: not available.

ตารางที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนฟันที่เหลืออยู่ กับการเข้าโรงพยาบาลเนื่องจากปัญหา โรคหัวใจและหลอดเลือด

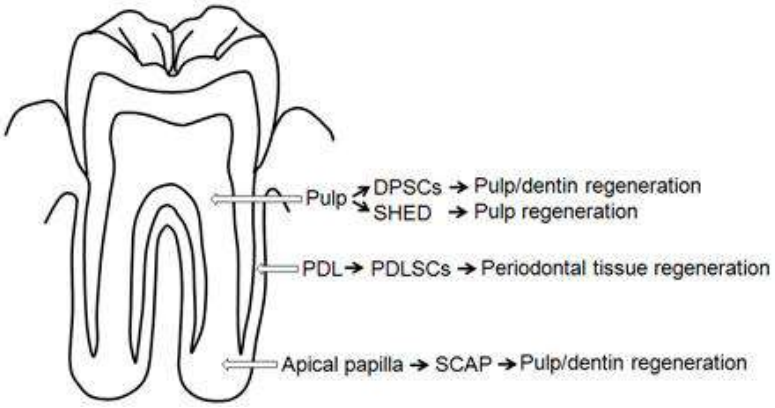


No: of natural teeth left	Events/n	Rate	HR[1](95% CI)	HR[2] (95% CI)	p_{trend}
IHD					
20	1812/117464	4.1	1	1	
10-19	708/30013	6.3	1.15 (1.06-1.26)	1.05 (0.96-1.15)	0.002
1-9	354/11423	8.2	1.38 (1.22-1.55)	1.20 (1.06-1.35)	
None	258/8797	7.7	1.27 (1.11-1.45)	1.10 (0.95-1.26)	
Heart Failure					
20	67/117464	0.2	1	1	
10-19	55/30013	0.5	2.18 (1.52-3.13)	1.50 (1.04-2.18)	
1-9	43/11423	1.0	3.67 (2.47-5.45)	2.04 (1.35-3.09)	0.0005
None	38/8797	1.1	3.88 (2.56-5.88)	1.97 (1.27-3.07)	
PVD					
20	127/117464	0.3	1	1	
10-19	98/30013	0.9	2.11 (1.62-2.76)	1.67 (1.27-2.19)	
1-9	53/11423	1.2	2.58 (1.86-3.59)	1.73 (1.23-2.44)	<.0001
None	65/8797	1.9	3.92 (2.87-5.37)	2.53 (1.81-3.52)	
Ischaemic Stroke					
20	145/117464	0.3	1	1	
10-19	72/30013	0.6	1.32 (0.99-1.77)	1.11 (0.72-1.73)	
1-9	27/11423	0.6	1.08 (0.71-1.64)	0.90 (0.59-1.40)	0.8
None	27/8797	0.8	1.31 (0.86-1.99)	1.20 (0.90-1.62)	
All Cause Mortality					
20	807/117464	1.6	1	1	
10-19	448/30013	3.5	1.58 (1.40-1.78)	1.27 (1.13-1.43)	
1-9	308/11423	6.2	2.46 (2.15-2.82)	1.67 (1.45-1.93)	<.0001
None	251/8797	6.6	2.47 (2.13-2.86)	1.60 (1.37-1.87)	

Events, number of events; rate, crude rate per 1000 person years; CVD, cardiovascular disease; IHD, ischaemic heart disease; PVD, peripheral vascular disease. HR1, adjusted for age and sex; HR2, additionally adjusted for tobacco smoking, alcohol consumption, Australian born status, region of residence, education, health insurance, physical activity and body mass index, with missing values in covariates were coded as a separate categories (0.3%, 1.7%, 0%, 0.03%, 1.3%, 0%, 4% and 7%, respectively) (55)

2.11 เซลล์มีเซนไคม์

เซลล์มีเซนไคม์ในช่องปาก พบได้จากเนื้อเยื่อในโพรงฟันจากฟันแท้และฟันน้ำนม เหงือก เอ็นยึดปริทันต์ และกระดูกขากรรไกร เป็นเซลล์ศักยภาพในการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูก เซลล์กระดูกอ่อน เซลล์ไขมัน และเซลล์ประสาม เป็นต้น (56, 57) (รูปที่ 15) เซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันมีความสามารถในการสมานแผลและการงอกใหม่ของเนื้อเยื่อในโพรงฟัน จากรายงานก่อนหน้าที่ศึกษาเซลล์เยื่อโพรงฟันจากผู้ป่วยที่มีเนื้อฟันไม่สมบูรณ์ พบว่าเซลล์ผู้ป่วยมีความสามารถในการงอกขยายจำนวน การสร้างโคโลนี ศักยภาพในการสร้างเนื้อเยื่อแข็ง และรูปแบบการแสดงออกของยีนต่างจากเซลล์ปกติ สิ่งเหล่านี้จะอธิบายว่าการเปลี่ยนแปลงในเซลล์โพรงฟัน จากความผิดปกติของสารพันธุกรรมทำให้เข้าใจถึงพยาธิกำเนิดของความผิดปกติและสามารถแก้ไขความผิดปกติได้ในระดับแซลล์



รูปที่ 15 เซลล์มีเซนไคม์จากฟัน

SCAP: เซลล์มีเซนไคม์จากปลายรากฟัน; DPSCs: เซลล์มีเซนไคม์จากโพรงฟัน; SHED: เซลล์มีเซนไคม์จากฟันน้ำนม; PDLSCs: เซลล์มีเซนไคม์เอ็นปริทันต์

2.12 เทคโนโลยีการหาลำดับเบส

เทคโนโลยีการอ่านลำดับเบสเปลี่ยนแปลงวงการวิทยาศาสตร์และวงการแพทย์อย่างมาก ทำให้สามารถหาการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมของมนุษย์ต่อการแสดงออก รวมถึงสุขภาพของแต่ละบุคคล นำไปสู่การวินิจฉัยโรคแม่นยำ และการรักษาโรคเฉพาะบุคคล (personalized medicine) (58) การอ่านลำดับเบสในปัจจุบันแบ่งเป็นการอ่านโดยอาศัยการตรวจจับปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น (reporter) อาทิ แสง ความต่างศักย์ของไฟฟ้าหรือกระแส ในยุคแรกของการอ่านลำดับเบสด้วยเทคนิคแซงเกอร์ (Sanger's sequencing technique) อาศัยหลักการสุ่มของความยาวของชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกสร้างขึ้นมาไม่เท่ากันจากกลไก dye termination อย่างไรก็ตามความสามารถในการอ่านลำดับเบสด้วยวิธีดังกล่าวจำกัดอยู่ประมาณ 1,000 นิวคลีโอไทด์ การที่จะตรวจสอบลำดับเบสทั่วจีโนมในสมัยก่อนจึงเป็นไปได้ยากมาก ในช่วงสิบปีที่ผ่านมาได้มีการพัฒนาความสามารถให้การอ่านลำดับเบสมีประมาณมากขึ้นจนสามารถดูได้ทั้งจีโนมโดยอาศัยการอ่านลำเบสทั้งหมดบน"ชิพ" (massively parallel sequencing) และทำการ"ตรึง" (immobilize) ลำดับเบสที่ต้องการอ่านอยู่บนชิพได้ทั้งหมด ปฏิกิริยาเคมีเกิดขึ้นอยู่บนชิพนี้

พร้อมกัน แต่สิ่งที่แตกต่างคือสัญญาณที่ส่งออกมาจากแต่ละจุด หรือ ดีเอ็นเอที่ถูกตรึงอยู่บนชิพนี้ ซึ่งเป็นที่มาของเทคโนโลยีเอ็นจีเอส (next generation sequencing technology; NGS) (59)

เทคโนโลยีในกลุ่ม NGS นี้ประกอบไปด้วยไพโรซีเควนซิ่ง (pyrosequencing) ของบริษัท Roche ที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาการเปล่งแสงของ ATP เมื่อนิวคลีโอไทด์ถูกดึงไปต่อกับสายดีเอ็นเอต้นแบบที่ติดอยู่บนลูกปัดขนาดเล็กที่ใส่อยู่ในถาด picotiter plate และมีการขยายจำนวนด้วยหลักการ emulsion PCR (emPCR) แต่เนื่องจาก pyrosequencing ทดสอบการต่อด้วยนิวคลีโอไทด์ A T G และ C แยกทีละรอบเพื่อตรวจจับสัญญาณแสงจาก ATP ทำให้กระบวนการอ่านล่าช้า และถ้าใช้เทคนิคนี้อ่านบริเวณที่มีความซ้ำของลำดับเบส (polynucleotide) ทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนของการอ่านได้ เทคนิคการขยายจำนวนดีเอ็นเอด้วย emPCR บน picotiter plate ได้ถูกใช้ในเครื่องอ่านลำดับเบสที่ตรวจจับสัญญาณไฟฟ้าเมื่อลำดับเบสเข้าคู่กัน เช่น ion Proton จากบริษัท Thermo Fisher Scientific ส่วนบริษัท illumina และ BGI จะใช้เทคนิคการถอดรหัสพันธุกรรมทั่วจีโนมแบบสายสั้น และทำการเพิ่มจำนวน (amplification) ของลำดับเบสเหล่านี้ด้วยการตรึงไว้กับฐานผ่านกระบวนการแตกต่างกัน illumina ใช้เทคนิคชื่อว่า bridge amplification โดยตรึงสายดีเอ็นเอที่ตัดมาจำนวนมากทั่วจีโนมกับแผ่น flow cell และเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอเหล่านี้ด้วยการต่อนิวคลีโอไทด์และโค้งตัวลงเพื่อตรึงกับแผ่น flow cell โดยทำเช่นนี้ไปเรื่อย ๆ จนทำให้ได้ปริมาณของดีเอ็นเอเพียงพอสร้างเป็นกลุ่ม cluster บน flow cell เพื่อนำไปใช้ในการถอดรหัสพันธุกรรมด้วยกระบวนการ sequence by synthesis (SBS) ต่อไป (60) ในขณะที่เครื่องของบริษัท BGI ใช้กลไกขยายจำนวนของดีเอ็นเอตั้งต้นตัวเดิมแยกเกลียวและสร้างสายดีเอ็นเอจากต้นแบบขดตัวเป็น nanoball ซึ่งก่อนการถอดรหัสพันธุกรรม nanoball หลาย ๆ ตัวจะถูกตรึงอยู่บน flow cell เพื่อทำการถอดรหัส ทั้ง illumina และ BGI เป็นเทคโนโลยีที่ให้บริการถอดรหัสพันธุกรรมของมนุษย์ทั่วจีโนมแบบสายสั้น (61) ซึ่งเหมาะกับการหาตำแหน่งการกลายพันธุ์ขนาดเล็กพวก SNV และ short/small INDEL บนจีโนม

บทที่ 3
ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย
3.1 ขอบเขตของการวิจัย

คณะผู้วิจัยเริ่มด้วยการศึกษาผู้ป่วยที่มีความพิการทางช่องปากและฟัน ที่เกิดจากความผิดปกติทางพันธุกรรม จากนั้นใช้ความเชี่ยวชาญด้านเวชศาสตร์ และทันตแพทยศาสตร์ตรวจลักษณะต่างๆ ทางคลินิก รังสี ห้องปฏิบัติการให้ละเอียดที่สุด เพื่อกำหนดลักษณะฟีโนไทป์ แล้วนำตัวอย่างเลือด น้ำลาย มาศึกษาหาการกลายพันธุ์ที่สารพันธุกรรมด้วยเทคโนโลยีวิเคราะห์ลำดับเบสทั้งหมด หรือเอ็กโซมทั้งหมด และนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศเพื่อระบุการกลายพันธุ์ทางพันธุกรรมที่ก่อให้เกิดความพิการ การค้นพบการกลายพันธุ์ของยีนใหม่จะได้รับการบันทึกไว้ในฐานข้อมูลออนไลน์ ที่นักวิทยาศาสตร์และผู้เชี่ยวชาญด้านการดูแลสุขภาพทั่วโลกสามารถเข้าถึงและนำไปใช้ได้ โดยเมื่อโครงการจีโนมิกส์ประเทศไทยเริ่มดำเนินการอย่างเป็นรูปธรรมส่วนของการวิเคราะห์จีโนมทั้งหมดของโครงการวิจัยจะส่งตัวอย่างเข้าสู่โครงการจีโนมิกส์ประเทศไทย การกลายพันธุ์ที่คาดว่าจะเป็นสาเหตุของโรคแต่ยังไม่มีการรายงานที่แน่ชัดจะนำไปศึกษากลไกของการเกิดโรค การวิเคราะห์เชิงหน้าที่รวมถึงอณูชีววิทยา ชีวเคมี อาทิ การวิเคราะห์ทรานสคริปโตม การวัดระดับโปรตีน การสังเคราะห์การกลายพันธุ์ในห้องทดลอง และการทดสอบทางเอนไซม์ เป็นต้น จะใช้เพื่อยืนยันสาเหตุของความพิการ เป็นการสร้างองค์ความรู้ใหม่

นอกเหนือจากทางจีโนมิกส์ โครงการวิจัยดำเนินการศึกษาฟันเชิงโครงสร้างทางจุลภาค การวิเคราะห์เชิงโครงสร้างและองค์ประกอบของฟันและกระดูกขากรรไกรเพื่อทำความเข้าใจการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของฟันและกระดูกที่ผิดปกติหาวัสดุบูรณะที่เหมาะสม เพิ่มความสำเร็จทางการรักษา เซลล์จากฟันที่ถอนออก เนื้อเยื่อหรือกระดูกในช่องปากจะได้รับการเพาะเลี้ยงและตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับโมเลกุลที่เกิดขึ้น เพื่อศึกษาพยาธิสภาพของโรค และหาทางรักษาในระดับเซลล์ อีกทั้งวิเคราะห์ทรานสคริปโตมหรืออาร์เอ็นเอในน้ำลายและเซลล์จากช่องปากในผู้ป่วยที่มีการอักเสบช่องปากเรื้อรังและไม่ตอบสนองต่อการรักษาแบบดั้งเดิม

โครงการมุ่งสร้างองค์ความรู้เชิงลึกด้านวิจัยและวิชาการ โดยความร่วมมือระหว่างคณะทันตแพทยศาสตร์และคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และสร้างเครือข่ายกับสถานพยาบาลและสถานศึกษาต่างๆ ด้านการแพทย์เพื่อการวินิจฉัย และดูแลความพิการทางช่องปากและฟัน ให้คำปรึกษาทางพันธุศาสตร์แก่ครอบครัวผู้ป่วยเพื่อลดอุบัติการณ์การเกิดโรคซ้ำในประชากรไทย โดยมีจุดมุ่งหมายหลักเพื่อให้ผู้ที่มีความพิการทางใบหน้า ช่องปาก และฟัน จากความผิดปกติทางพันธุกรรม ได้เข้าถึงบริการทางการแพทย์ที่ก้าวหน้าอย่างเสมอภาค และนำการบริการทางการแพทย์มาสู่การวิจัย และการศึกษา เพื่อหาองค์ความรู้ใหม่ ค้นพบวิธีการป้องกันและการรักษาที่ตรงจุด รวมทั้งผลิตบุคลากรทางทันตแพทย์เฉพาะทางเพื่อแก้ปัญหาทันตสาธารณสุขระดับชาติ เพื่อส่งเสริมคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยและครอบครัว และป้องกันความพิการที่ยั่งยืน

3.2 การระบุตัวผู้ป่วยและสร้างเครือข่าย

ผู้ป่วยที่มีความพิการทางช่องปากและฟัน และผู้ป่วยสูงอายุที่มีอายุมากกว่า 60 ปี และมีปัญหาทางช่องปากและฟัน เช่น สูญเสียฟัน โรคปริทันต์ ฟันติดเชื้อ และมะเร็งช่องปาก ที่ได้รับการตรวจเบื้องต้นจากสถานพยาบาลต่างๆ และสถานศึกษาทางการแพทย์ ได้แก่ มหาวิทยาลัยมหิดล มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร มหาวิทยาลัยศรีนครินทราวิโรฒ มหาวิทยาลัยรังสิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ มหาวิทยาลัยสงขลา มหาวิทยาลัยนเรศวร และโรงพยาบาลเอกชนในเครือข่าย โดยผู้ป่วยจะได้รับการตรวจทางคลินิก ภาพถ่ายรังสี และห้องปฏิบัติการอย่างละเอียดที่คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผู้ป่วยทุกรายจะได้รับการอธิบายโครงการและเซ็นใบยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย โดยจำนวนตัวอย่างผู้ป่วยที่เกี่ยวข้องกับโครงการ ได้แก่ ผู้ป่วย 13 รายและบิดามารดา รวมเป็น 39 ราย

3.3 การวิเคราะห์ลำดับเบสทั้งหมด การวิเคราะห์เอ็กโซมทั้งหมด และโอมิกส์

การวิเคราะห์ลำดับเบสทั้งหมด การวิเคราะห์เอ็กโซมทั้งหมด และโอมิกส์ จะเริ่มจากนำตัวอย่างเลือด หรือน้ำลายของผู้ป่วย และสมาชิกในครอบครัว มาสกัดสารดีเอ็นเอ และทำการวิเคราะห์ลำดับเบส ที่ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางจีโนมิกส์และการแพทย์แม่นยำ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย และบริษัทเอกชนที่มีความเชี่ยวชาญทางโอมิกส์ เพื่อศึกษาทางจีโนมิกส์ อาร์เอ็นเอ โปรตีน และ ไมโครไบโอม

3.4 การวิเคราะห์โครงสร้างฟันและกระดูกเบ้าฟัน

ตัวอย่างฟัน ที่หลุดหรือถอนจากผู้ป่วย หรือกระดูกที่ได้มาจากกระบวนการรักษาทางทันตกรรมจะนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Micro CT ที่คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จากนั้นทำการขึ้นรูป 3 มิติ และตัดขวาง เพื่อดูขนาดของฟัน ความเข้มข้นของแร่ธาตุ จากนั้นตัวอย่างจะผ่านการวิเคราะห์ด้วยเครื่องอิเล็กตรอนแบบส่องกราด ตรวจสอบพื้นผิว โครงสร้างเชิงลึก ส่วนประกอบของแร่ธาตุ และทางจุลพยาธิวิทยาเพื่อหาความผิดปกติทางจุลภาคที่เกิดขึ้นและการเปลี่ยนแปลงของส่วนประกอบทางเคมี ซึ่งจะนำไปสู่การเลือกวัสดุทางทันตกรรมที่เหมาะสมต่อโครงสร้างที่ผิดปกติ ทำให้การรักษาประสบผลสำเร็จในระยะยาว

3.5 การเพาะเลี้ยงเซลล์และศึกษาพฤติกรรมของเซลล์ช่องปากและฟัน

เซลล์ที่ได้จากฟัน เหงือก หรือกระดูก จะทำการแยกและเพาะเลี้ยง เพื่อทำการศึกษาความสามารถในการเพิ่มจำนวน การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติ การสร้างโคโลนี การหายของแผล การแสดงออกของยีนและโปรตีน ความสามารถในการสร้างแร่ธาตุ ด้วยเทคนิคศึกษาด้วยเทคนิคต่างๆ อาทิ polymerase chain reaction, flow cytometry, และ RNA sequencing.

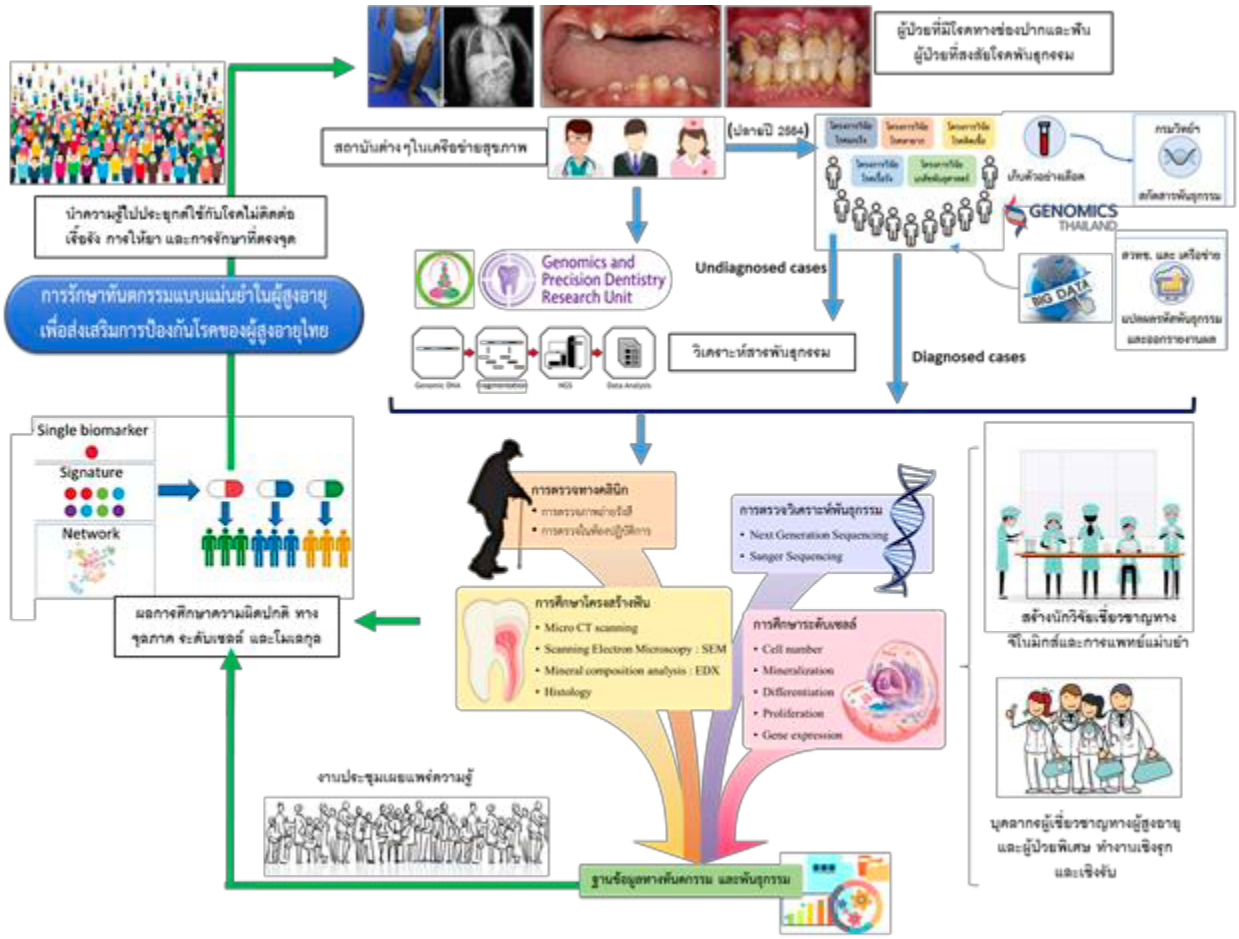
การศึกษากลไกพยาธิสภาพ ดำเนินการโดยเทคนิคต่างๆ อาทิ luciferase studies, biochemical assay, และ enzymatic assay เพื่อสร้างความเข้าใจการเปลี่ยนแปลงในระดับเซลล์ และทำการวิเคราะห์กลไกพยาธิสภาพของสารพันธุกรรมที่ทำให้เกิดความผิดปกติ

3.6 การใช้ข้อมูลทางพันธุกรรม เพื่อเสริมสร้างสุขภาพของผู้สูงอายุ การเก็บฐานข้อมูล และพัฒนากำลังคน

โรคทางพันธุกรรม อาจไม่ใช่โรค ที่เกิดจากยีนเดียวและกระทบต่ออวัยวะเดียว แต่มันยังเพิ่มความเสี่ยง ต่อการเกิดโรคทางระบบและโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง ได้แก่ โรคความจำเสื่อม โรคหัวใจและหลอดเลือด เบาหวาน มะเร็งช่องปาก และโรคปริทันต์อักเสบซึ่ งกระทบต่อผู้ป่วยจำนวนหลายล้านคนทั่วโลก จนถึงปัจจุบันสาธารณสุขยังให้ความสำคัญที่ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม เช่น การสูบบุหรี่ อาหาร ยา และการดำรงชีวิต แต่อย่างไรก็ตามบทบาทของพันธุศาสตร์ทางด้านสาธารณสุขได้เพิ่มความสำคัญอย่างมากขึ้นในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมา ดังนั้นในการวิจัยนี้จะเป็นการค้นพบข้อมูลทางพันธุศาสตร์ มีคุณค่าต่อสาธารณสุขและผู้สูงอายุ ในหลายๆด้านได้แก่

1. สร้างฐานข้อมูลทางพันธุศาสตร์ซึ่งสามารถนำไปรวมเข้ากับ ฐานข้อมูลพันธุศาสตร์ของคนไทยที่มีอยู่ เพื่อเป็นการเพิ่มในส่วนของโรคทางช่องปากและฟัน และนำไปประยุกต์เข้ากับข้อมูลทางคลินิก
2. ใช้ในการเฝ้าระวังสุขภาพ ของผู้ป่วยและคนในชุมชน
3. ให้การวินิจฉัยที่ถูกต้อง ทำการวิเคราะห์ อุบัติการณ์การเกิดโรค ความเสี่ยง และ อัตราการเสียชีวิต จากปัจจัยเสี่ยงทางพันธุกรรม เพื่อลดการเกิดโรคในรุ่นต่อไป
4. ดำเนินการหลักสูตรบัณฑิตศึกษาทางสูงอายุและผู้ป่วยพิเศษ สำหรับ แพทย์ ทันตแพทย์ พยาบาลและนักวิจัย ที่มีความเชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านสูงอายุและพันธุศาสตร์

ดังนั้นความเข้าใจด้านพันธุศาสตร์และสภาพของช่องปาก จะทำให้สามารถเฝ้าระวัง การเกิดโรคหรือให้การรักษาโรคได้ตั้งแต่เบื้องต้น ให้การรักษาที่เหมาะสมต่อคนไข้และชุมชนมากที่สุด ที่สำคัญข้อมูลนี้ยังมีประโยชน์มหาศาลต่อบุคลากรทางการแพทย์ที่ให้การรักษาทางการแพทย์แม่นยำ เป็นประโยชน์ต่อการออกนโยบายหรือโปรแกรมที่เหมาะกับชุมชน ประชากรไทย ทำให้ระบบบริการสุขภาพ เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นการป้องกันและรักษาความพิการของช่องปากและฟันตั้งแต่แรกเริ่ม จะเป็นการเพิ่มคุณภาพชีวิต ส่งเสริมสุขภาพที่ดีของผู้สูงอายุในระยะยาว



รูปที่ 16 รูปภาพแสดงภาพรวมวิธีการวิจัย

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 ความผิดปกติของเคลือบฟันและการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างเคลือบฟันกับอายุ

การสร้างเคลือบฟันไม่สมบูรณ์ ซึ่งเป็นความผิดปกติของเคลือบฟัน ทำให้เคลือบฟันแตกเปราะได้ง่าย เพิ่มความเสี่ยงของการติดเชื้อฟันและกระดูกขากรรไกร พบได้ทั้งฟันน้ำนมและฟันแท้ โดยโรคนี้มีลักษณะฟีโนไทป์และจีโนไทป์ที่หลากหลาย มีการจำแนกโรคทางลักษณะทางคลินิก ออกเป็นสี่ประเภท คือ hypoplastic, hypomaturation, hypocalcification และ hypomaturation-hypoplastic with taurodontism และเกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ในยีนมากถึง 28 ตัว ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเคลือบฟัน เช่น ยีน AMELX, ENAM และ AMBN ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างโครงสร้างของเคลือบฟัน ยีน MMP20 and KLK4 เกี่ยวข้องกับเอนไซม์โปรตีเอส ยีน FAM83H, ITGB6, LAMA3 และ LAMB3 เกี่ยวข้องกับการทำงานระหว่างเซลล์และเซลล์ในเคลือบฟัน และ ยีน WDR72 และ SLC24A4 เกี่ยวข้องกับการขนถ่ายไอออน

ยีน FAM83H ทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมระหว่างเอนไซม์ casein kinase 1α และเคราติน พบการแสดงออกของยีนนี้จำนวนมากในเซลล์ที่มีการสร้างเคลือบฟัน การกลายพันธุ์ในยีน FAM83H เกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะเคลือบฟันไม่สมบูรณ์แบบที่มีการสะสมแร่ธาตุไม่เต็มที่ และมีการถ่ายทอดแบบยีนเด่น ซึ่งเป็นประเภทที่มีความรุนแรงมากที่สุด จากการรายงานที่ผ่านมาพบว่าโรคนี้มีความหลากหลายในลักษณะการแสดงออก ทำให้ไม่สามารถวินิจฉัยได้ด้วยลักษณะทางคลินิกหรือภาพถ่ายรังสีเท่านั้น อีกทั้งยังขาดความรู้เกี่ยวกับลักษณะฟันที่บกพร่องอยู่มาก ทำให้ไม่สามารถให้การรักษาทางทันตกรรมที่เหมาะสมได้ ทำให้ผู้ป่วยมีปัญหาการติดเชื้อฟันและกระดูกขากรรไกรบ่อยครั้ง ฟันแตกหักง่าย และการบูรณะฟันประสบความล้มเหลว ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อระบุลักษณะทางฟีโนไทป์ จีโนไทป์ ลักษณะฟันทั้งทางฟิสิกส์ เชิงกลและโครงสร้างทางจุลภาคที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเครือบฟันไม่สมบูรณ์แบบยีนเด่น เพื่อช่วยในการวินิจฉัยพยากรณ์ และป้องกันการเกิดซ้ำและให้การรักษาที่เหมาะสมที่สุด และสามารถนำความรู้ไปประยุกต์ใช้รักษาผู้ที่มีเคลือบฟันบกพร่องจากปัจจัยอื่นๆ

วิธีการศึกษาวิจัย ทำการศึกษาในผู้ป่วยไทยสามครอบครัว ซึ่งมีสมาชิกในครอบครัวมากกว่าหกสิบราย โดยในการศึกษานี้ คัดเลือกผู้ป่วยมาสามสิบเอ็ดราย เพื่อทำการตรวจละเอียดทางพันธุกรรมจำนวนสิบราย ได้รับใบยินยอมในการร่วมโครงการวิจัย โดยผู้ป่วยส่งมาจากจังหวัดต่างๆและรับการตรวจละเอียดที่คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

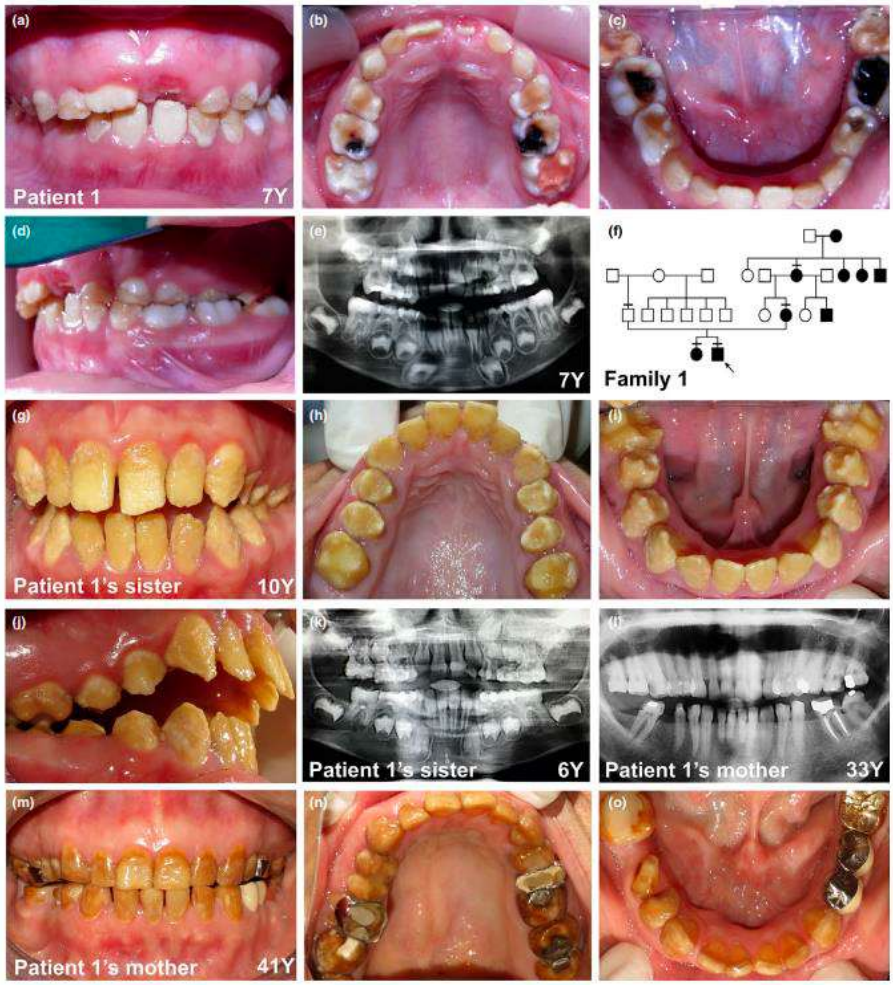
การตรวจหาความผิดปกติทางพันธุกรรม ใช้เทคนิคการตรวจลำดับเอ็กโซมทั้งหมด และการตรวจลำดับเบสด้วยแซงเกอร์ ทำการเจาะเลือดผู้ป่วยจำนวน 3 มิลลิลิตร และทำการสกัดสารดีเอ็นเอ เพื่อตรวจลำดับเบส ข้อมูลที่ได้ทำการคัดกรองโดยเทคนิคขีวสารสนเทศตามผลงานการวิจัยที่ผ่านมา (24) จากนั้นทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางเครือญาติระหว่างสามครอบครัว ด้วยเทคนิค array sequencing

การวิเคราะห์โครงสร้างฟันน้ำนมและฟันแท้ของตัวอย่างฟันผู้ป่วย ทำการวัดสีฟันด้วย VITA Easyshade® V วัดความหนาแน่นของเนื้อฟันด้วยเครื่องไมโครซีที พื้นผิวความขรุขระของฟันด้วยเครื่อง surface topography parameter, Talyscan 150 และ TalyMap Universal program วัดความแข็งระดับนาโนของฟันด้วย Micro-Indentation System, UMIS II, CSIRO และทำการตัดฟัน เคลือบด้วยทอง และตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด จากนั้นผลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติ independent t test ($P < .05$)

ผลการศึกษา ลักษณะผู้ป่วยรายที่หนึ่ง มาด้วยอาการเสียวฟัน ฟันมีลักษณะพรุน สีเหลืองเข้ม มีการสูญเสียเคลือบฟันอย่างรุนแรง ภาพถ่ายรังสี พบความแตกต่างระหว่างความทึบแสงของเคลือบฟันและเนื้อฟันน้อยลดลง เคลือบฟันบาง ฟันหน้าเปิด พี่สาวของผู้ป่วย มีเนื้อฟันอ่อน และ มีการแตกหักรุนแรง พบเคลือบฟันปกติเล็กน้อยอยู่ตามคอฟัน และยอดฟัน มารดาของผู้ป่วยมีฟันสีเหลืองเข้ม และภาพถ่ายรังสีแสดงถึงการลดลงของความทึบแสงของเคลือบฟัน (รูปที่ 17)

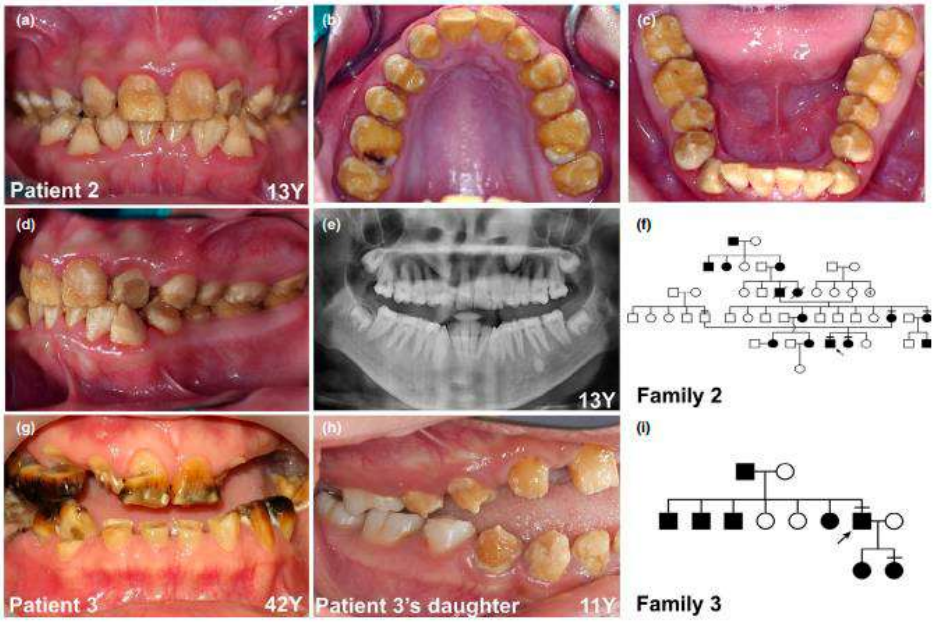
ผู้ป่วยรายที่สอง มาด้วยอาการฟันเหลืองและเสียวฟัน พบฟันเหลือง ขรุขระ พันหน้าซ้อนเก และมีการสูญเสียเคลือบฟันรุนแรง พบเคลือบฟันปกติตามคอฟันและตามยอดฟัน

ผู้ป่วยรายที่สาม มาด้วยอาการ ฟันสีน้ำตาลเข้มถึงดำ ฟันผุ และแต่หักเหลือแต่รากฟัน ลูกสาวมีผิวฟันนิ่มพรุนและเหลือง และฟันหน้าเปิด (รูปที่ 18)



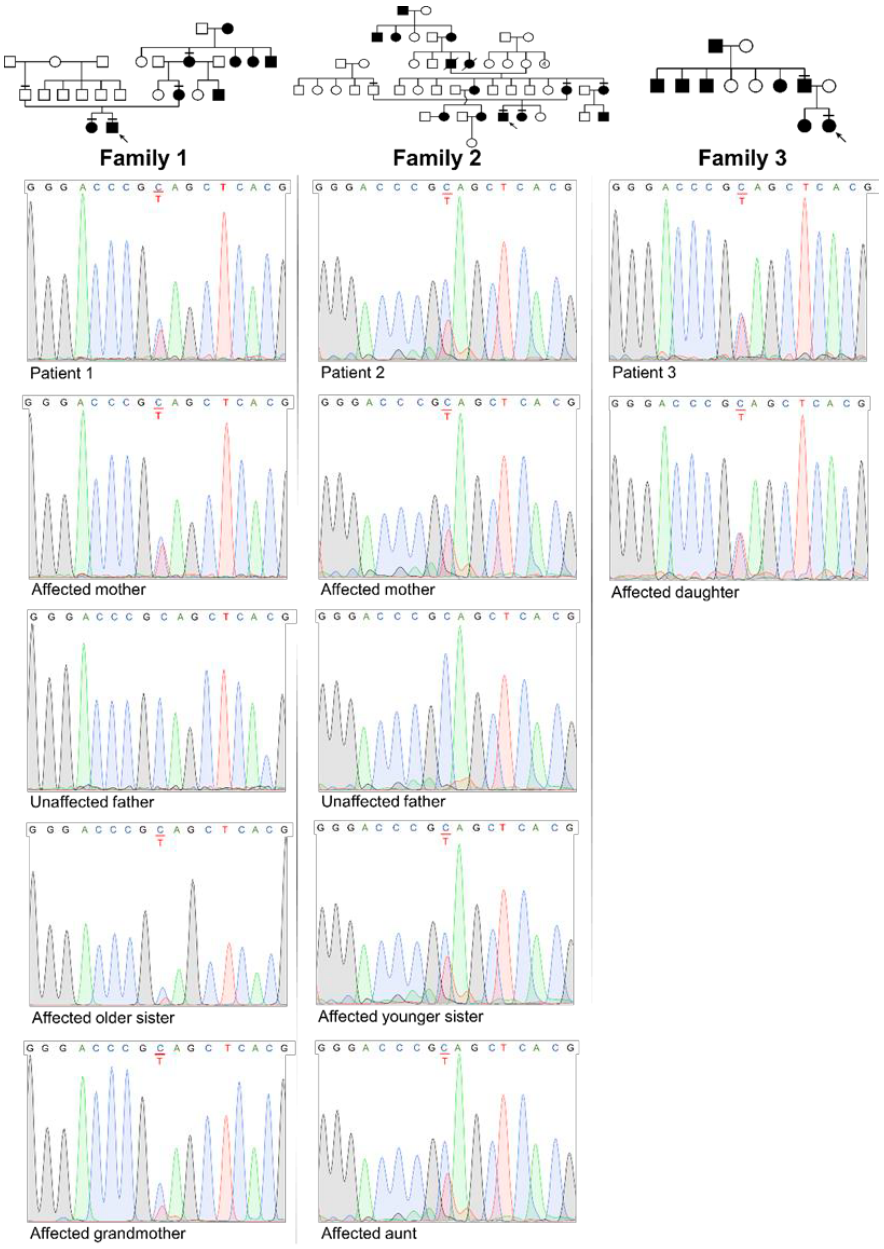
รูปที่ 17 ฟีโนไทป์และพงศาวลีของครอบครัวที่ 1 ที่เคลือบฟันผิดปกติ

(a–d) ลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยรายที่ 1 แสดงลักษณะฟันพรุนและเหลือง พบเคลือบฟันปกติตามคอฟันและปุ่มยอดฟัน (e) ภาพถ่ายรังสีแสดงการเสียเคลือบฟันในฟันที่ขึ้นมาแล้ว และความหนาของเคลือบฟันปกติในฟันที่ยังไม่ขึ้น แต่มีความทึบแสงลดลง (f) พงศาวลีของครอบครัวที่หนึ่ง สัญลักษณ์สีดำหมายถึงผู้ที่เป็นโรค ลูกศรแสดงผู้ป่วยที่มาตรวจเป็นคนแรก เพศชายเป็นสี่เหลี่ยม เพศหญิงเป็นวงกลม (g–j) ลักษณะทางคลินิกของพี่สาว แสดงลักษณะฟันนิ่มและฟันหน้าเปิด (k) ภาพถ่ายรังสีของพี่สาว (l–o) ลักษณะฟันของมารดามีสีน้ำตาลเงาและมีจุดขาวเล็กๆทั่วไป



รูปที่ 18 ฟีโนไทป์และพงศาวลีของครอบครัวที่ 2 และ 3 ที่เคลือบฟันผิดปกติ
(a–e) ลักษณะทางคลินิกและภาพถ่ายรังสีของผู้ป่วยรายที่สอง แสดงลักษณะฟันเหลืองเปลี่ยนสีเข้ม ขรุขระ และนิ่ม ภาพถ่ายรังสีแสดงถึงการลดลงของความแตกต่างของความทึบแสงระหว่างเคลือบฟันและเนื้อฟัน (f) พงศาวลีของครอบครัวที่สอง (g) ผู้ป่วยรายที่สามมีฟันผิวนิ่ม และสีน้ำตาลเข้มดำ (h) ลูกสาวมีลักษณะฟันขรุขระและเหลืองพบ พบเคลือบฟันปกติบริเวณด้านข้างแก้มของฟันหลัง (i) พงศาวลีของครอบครัวที่สาม รูปแสดงเพศชายเป็นสี่เหลี่ยม เพศหญิงเป็นวงกลม สัญลักษณ์ทึบคือผู้ป่วยที่มีที่เป็นโรค ลูกศรชี้ผู้ป่วยคนแรกที่ได้รับการตรวจ

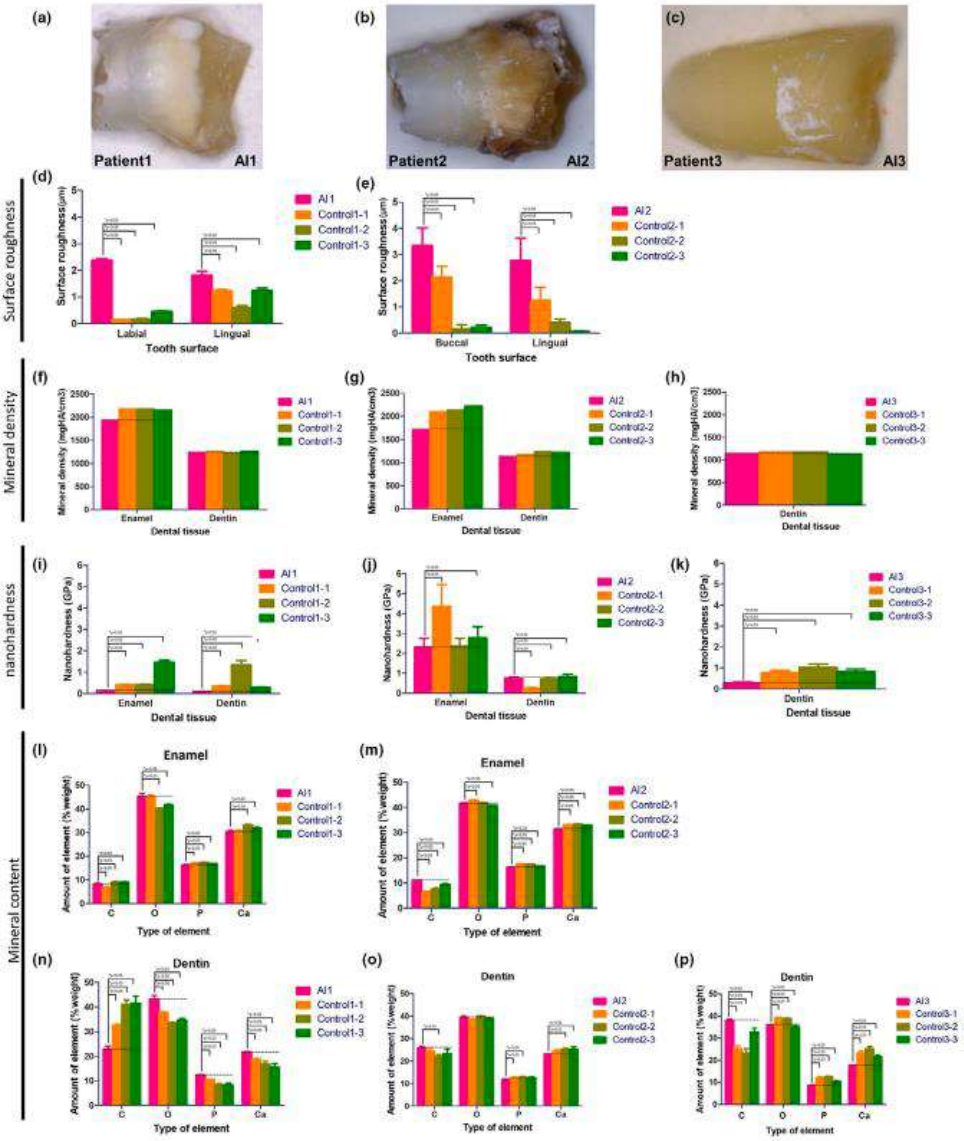
จากการวิเคราะห์สารพันธุกรรมในผู้ป่วยทั้งสามครอบครัวพบว่ามีการกลายพันธุ์แบบเดียวกัน คือ heterozygous nonsense mutation, c.1387C>T, p.Gln463*, ในเอ็กซอน 5 ของยีน FAM83H ซึ่งเป็นการกลายพันธุ์ที่รุนแรงและคาดว่าเป็นสาเหตุของความผิดปกติ จากการตรวจสอบเพิ่มเติมพบว่าทั้งสามครอบครัว มีส่วนทางพันธุกรรมที่สืบทอดจะบรรพบุรุษเดียวกันที่มีขนาด 3.41 Mbp ระหว่างตำแหน่ง coordinates 142,862,278 และ 146,293,414 จากการตรวจสอบตำแหน่งนี้ด้วยโปรแกรม Genetic Mutation Age Estimator program (https://shiny.wehi.edu.au/rafehi.h/mutationdating) พบว่าการกลายพันธุ์นี้มีอายุประมาณ 23.8 รุ่น หรือประมาณหกร้อยปีที่แล้ว (โดยคาดว่าหนึ่งรุ่น ประมาณยี่สิบห้าปี) ที่ความเชื่อมั่นเก้าสิบห้าเปอร์เซ็นต์ ระหว่าง 7.4 (175 ปี) และ 84.3 (2,100 ปี) รุ่น (รูปที่ 19)



รูปที่ 19 พงศาวลีและลักษณะการกลายพันธุ์ของครอบครัวที่เคลือบฟันผิดปกติ
ตรวจพบการกลายพันธุ์แบบยีนเด่น nonsense mutation, c.1387C>T, p.Gln463*, ในยีน FAM83H

จากการวิเคราะห์ลักษณะฟัน พบว่า เคลือบฟันและเนื้อฟันของฟันผู้ป่วยมีความหนาแน่นแตกต่างจากฟันปกติอย่างมีนัยสำคัญ ผลการวิเคราะห์ลักษณะทางกลไก พบว่า ความแข็งของเคลือบฟันของตัวอย่างซี่ที่หนึ่งและสองและเนื้อฟันซี่ที่หนึ่งและสามน้อยลงอย่างมีนัยสำคัญ จากการวิเคราะห์ลักษณะทางแร่ธาตุ พบว่า ฟันซี่ที่หนึ่งและสองมีการลดลงของฟอสฟอรัสและแคลเซียมอย่างมีนัยสำคัญในเคลือบฟัน ฟันซี่ที่สองและสามมีแคลเซียมและ

ฟอสฟอรัสในเนื้อฟันลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่ฟันซี่ที่หนึ่งมีแคลเซียมและฟอสฟอรัสเพิ่มมากขึ้นในเนื้อฟัน (รูปที่ 20)

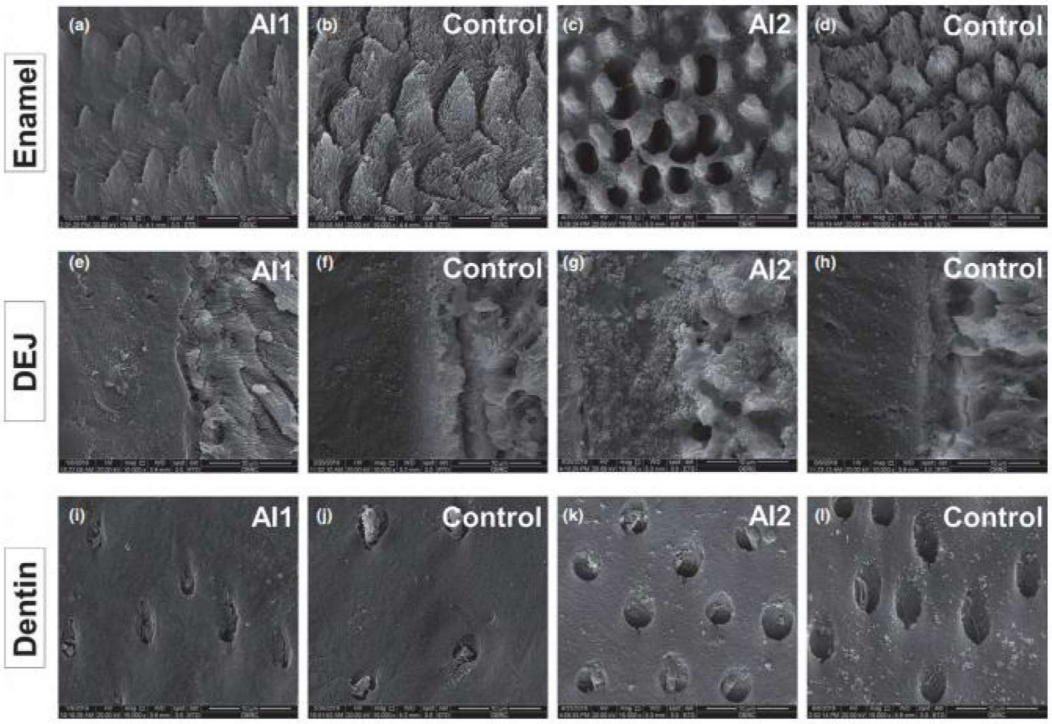


รูปที่ 20 ลักษณะโครงสร้างฟันที่ผิดปกติ

(a) ลักษณะทางจุลภาพของฟันซี่ที่หนึ่งจากผู้ป่วยรายที่หนึ่งมีลักษณะเหลืองและสึกกร่อน (b) ฟันซี่ที่สองจากผู้ป่วยรายที่สองมีลักษณะเหลืองเข้มและผิวขรุขระ (c) ฟันซี่ที่สามจากผู้ป่วยรายที่สามมีลักษณะเรียบและรากฟันสีเหลืองเข้ม (d, e) ค่าความขรุขระของผิวฟันซี่ที่หนึ่งและสองมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < .05$) (f–h) ค่าความหนาแน่นของเคลือบฟันและเนื้อฟันระหว่างผู้ป่วยและกลุ่มควบคุมไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (i–k) ค่าความแข็งระดับนาโนของเคลือบฟันซี่ที่หนึ่งและสองลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และในชั้นเนื้อฟันของฟันซี่ที่หนึ่งและสามลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < .05$) (l–m) ฟันซี่ที่หนึ่งและสองมีส่วนประกอบของ

แคลเซียมและฟอสฟอรัสลดลงอย่างมีนัยสำคัญในชั้นเคลือบฟัน C, carbon; O, oxygen; P, phosphorus; Ca, calcium

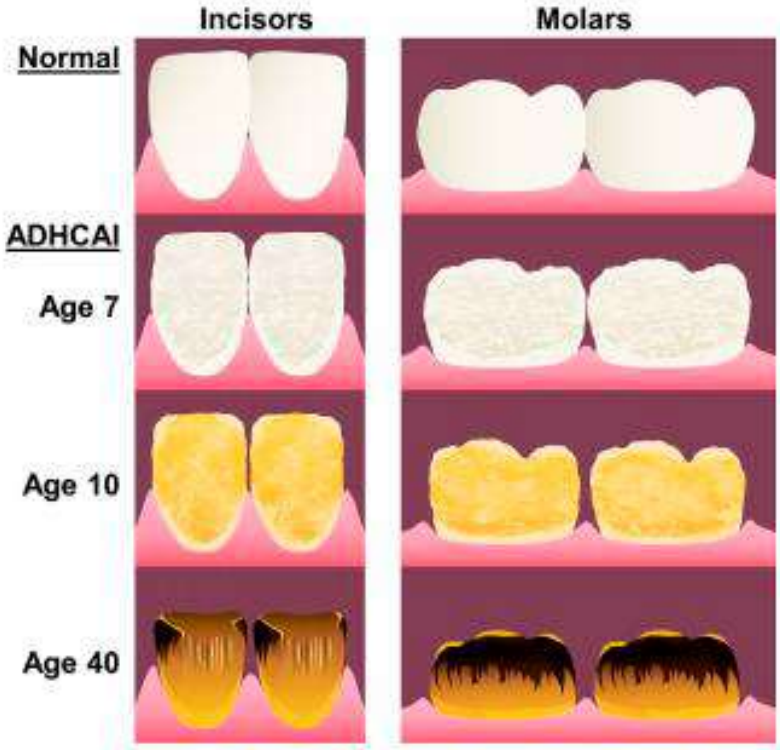
จากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดพบว่าตัวอย่างฟันที่หนึ่งและสองมีแท่งเคลือบฟันสั้นและกลม และมีช่องว่างระหว่างแท่งเคลือบฟันมากกว่าปกติ ตัวอย่างฟันซี่ที่สองมีการทำลายของโครงสร้างเคลือบฟันอย่างรุนแรงและมีช่องว่างจำนวนมาก ตัวอย่างฟันซี่ที่หนึ่งและสองมีโครงสร้างระหว่างรอยต่อของเคลือบฟันและเนื้อฟันไม่สมบูรณ์ (รูปที่ 21)



รูปที่ 21 ลักษณะโครงสร้างฟันทางจุลภาค
(a–d) กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดแสดงภาพของฟันซี่ที่หนึ่งและสองในชั้นเคลือบฟัน ที่มีลักษณะโครงสร้างแท่งเคลือบฟันกลมและมนมากกว่าปกติ และมีช่องว่างระหว่างแท่งเคลือบฟันกว้าง พบรูพรุนในฟันซี่ที่สองจำนวนมาก (e–h) รอยต่อระหว่างเคลือบฟันและเนื้อฟันมีความขรุขระและผิดปกติ (i–l) ชั้นเนื้อฟันไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ. SEM images at 10,000× magnification

จุดเด่นของการศึกษานี้เนื่องจากผู้ป่วยทั้งหมด เป็นผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ชนิดเดียวกันดังนั้นจึงทำให้สามารถระบุลักษณะการเปลี่ยนแปลงของฟันในแต่ละช่วงวัยได้อย่างชัดเจน โดยการศึกษา พบว่าลักษณะทางคลินิกของเคลือบฟันที่เปลี่ยนแปลงไปสัมพันธ์กับอายุ โดยฟันขึ้นมาใหม่จะมีลักษณะพรุน นิ่ม สีขาวเข้มและเหลืองอ่อน จากนั้นเมื่อผู้ป่วยมีอายุมากขึ้น เคลือบฟันจะค่อยๆแตกออก จากนั้นฟันจะมีรูพรุนมากขึ้น สีเข้มขึ้น แต่ยังสามารถพบเคลือบ

ฟันปกติได้ในบริเวณคอฟันและปุ่มยอดฟัน จากนั้นเมื่ออยู่ในวัยกลางคนและเข้าสู่วัยสูงอายุ ฟันจะเริ่มมีสีเข้มขึ้น จนกระทั่งมีสีดำ ผิวฟันจะมีลักษณะเรียบแสดงให้เห็นว่ามีการสึกกร่อนของฟันจากช่วงวัย (รูปที่ 22)



รูปที่ 22 ภาพแสดงการเปลี่ยนแปลงของเคลือบฟันที่มีความบกพร่องในการสร้างเคลือบฟันจากการกลายพันธุ์ของสารพันธุกรรมตามช่วงอายุ

สรุป งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาผู้ป่วยที่มีการสร้างเคลือบฟันไม่สมบูรณ์จากพันธุกรรม ซึ่งโดยปกติ มีลักษณะการแสดงออกที่หลากหลาย และไม่ชัดเจนทำให้การวินิจฉัยโรคไม่แน่ชัด จากการศึกษานี้ทำให้พบว่า การกลายพันธุ์ในยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเคลือบฟันจะทำให้ผู้ป่วยมีฟันที่เปราะแตกง่ายมีการเปลี่ยนแปลงทั้งในระดับคลินิก ภาพถ่ายรังสีและลักษณะทางจุลภาค อันรวมถึง คุณสมบัติเชิงกลและส่วนประกอบทางแร่ธาตุ โดยการศึกษานี้เป็นการบ่งบอกเป็นครั้งแรกว่าในผู้ป่วยสูงอายุจะสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงที่สามารถให้การพยากรณ์ล่วงหน้าและป้องกันการสูญเสียเคลือบฟันและฟันอักเสบที่จะเกิดตามมาได้ ดังนั้น หากสามารถให้การวินิจฉัยได้ถูกต้องและให้การรักษาที่เหมาะสมแต่ละช่วงวัย จะสามารถป้องกันการสูญเสียของฟันในผู้สูงวัยได้

ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่ระดับนานาชาติ

Sriwattanapong K, Nitayavardhana I, Theerapanon T, Thaweesapphithak S, Chantarawaratit PO, Garuyakich R, Phokaew C, Porntaveetus T*, Shotelersuk V. 2021. Age-related dental phenotypes and tooth characteristics of FAM83H-associated hypocalcified amelogenesis imperfecta. Oral Dis. doi: 10.1111/odi.13780.

4.2 ความผิดปกติของเนื้อฟันและกระดูกเปราะ

ภาวะการเนื้อฟันบกพร่องเกิดจากการกลายพันธุ์ของสารพันธุกรรม ทำให้เนื้อฟันอ่อนแอ มีผลต่อทั้งฟันแท้และฟันน้ำนม โดยสามารถแบ่งประเภททางคลินิกใหญ่ได้เป็นสามประเภท ประเภทที่หนึ่งเป็นแบบที่เกี่ยวข้องกับโรคกระดูกเปราะ เกิดจากยีนที่สร้างคอลลาเจน ผู้ป่วยจะมีกระดูกเปราะแตกหักง่ายแต่กำเนิด หากไม่ได้รักษาจะทำให้เกิดความพิการแต่เด็ก ประเภทที่สองและสามไม่มีโรคทางระบบเกิดจากยีนที่ทำหน้าที่สร้างเนื้อฟัน โดยลักษณะฟันส่วนใหญ่ของผู้ป่วยที่มีภาวะเนื้อฟันไม่สมบูรณ์จะมีลักษณะสีเทาเข้ม ตัวฟันโปง คอฟันแคบ โพรงฟันอุดตัน มีการติดเชื้อ ในตัวฟันและปลายรากบ่อยครั้ง

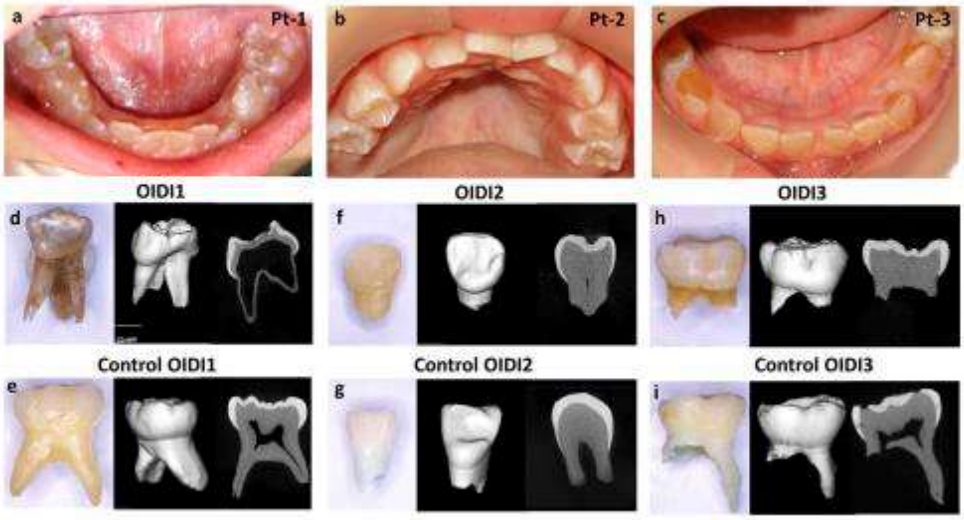
ปัญหาทางทันตกรรมที่พบในผู้ป่วยกลุ่มนี้ คือ วัสดุบูรณะสีเหมือนฟันที่ต้องอาศัยการยึดติดกับชั้นเนื้อฟันที่ปกติ จะไม่สามารถยึดติดได้อย่างสมบูรณ์ในผู้ป่วยกลุ่มนี้ มีการแตกหักหรือหลุดบ่อยครั้งทำให้ผู้ป่วยต้องเสียค่าใช้จ่ายซ้ำซ้อนเพื่อเดินทางมารับการรักษาทางทันตกรรม ดังนั้นการศึกษานี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลักษณะความผิดปกติ และสร้างความเข้าใจถึงความผิดปกติที่เกิดขึ้น เพื่อหาหนทางการรักษาที่เหมาะสม รวมถึงการวินิจฉัยและการพยากรณ์ความผิดปกติที่แม่นยำมากที่สุด เป็นการเพิ่มความสำเร็จในการรักษา สร้างความรู้ความเข้าใจทางการแพทย์ และลดค่าใช้จ่ายผู้ป่วย ครัวเรือนและระบบสาธารณสุข

วิธีการศึกษาวิจัย ทำการศึกษาในผู้ป่วยไทยที่มีโรคกระดูกเปราะทางพันธุกรรม และมีฟันที่มีการสร้างเนื้อฟันไม่สมบูรณ์จำนวนสามราย ผู้ป่วยได้รับการส่งต่อมาจากสถานพยาบาลจังหวัดต่างๆ ได้รับใบยินยอมในการร่วมโครงการวิจัยและทำการตรวจละเอียดที่คณะทันตแพทยศาสตร์ และคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การตรวจหาความผิดปกติทางพันธุกรรม ใช้เทคนิคการตรวจลำดับเอ็กโซมทั้งหมด และการตรวจลำดับเบสด้วยแซงเกอร์ ทำการเจาะเลือดผู้ป่วยจำนวนสามมิลลิลิตร และทำการสกัดสารดีเอ็นเอ เพื่อตรวจลำดับเบส ข้อมูลที่ได้ทำการคัดกรองโดยเทคนิคขีวสารสนเทศ

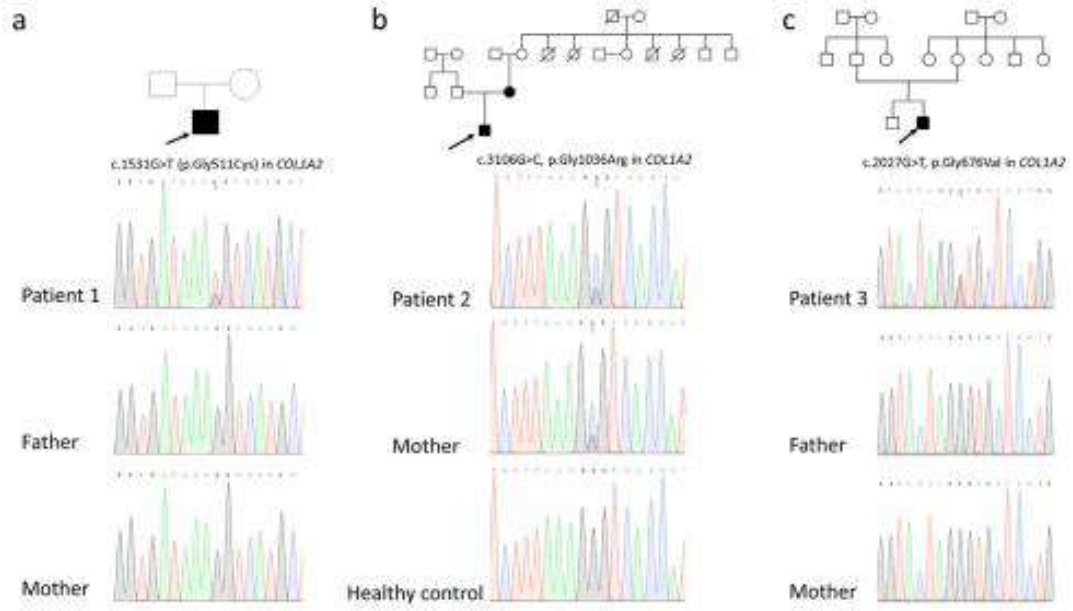
การวิเคราะห์โครงสร้างฟันทั้งในฟันน้ำนมและฟันแท้ของตัวอย่างฟันผู้ป่วย ทำการวัดสีฟันด้วย VITA Easyshade® V วัดความหนาแน่นของเนื้อฟันด้วยเครื่องไมโครซีที พื้นผิวความขาวของฟันด้วยเครื่อง surface topography parameter, Talyscan 150 และ TalyMap Universal program วัดความแข็งระดับนาโนของฟันด้วย Micro-Indentation System, UMIS II, CSIRO และทำการตัดฟัน เคลือบด้วยทอง และตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด จากนั้นผลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติ independent t test ($P < .05$)

ผลการศึกษา ฟันสามซี่จากผู้ป่วยสามรายที่มีกระดูกเปราะทางพันธุกรรมจากการกลายพันธุ์ของยีนที่สร้างคอลลาเจน และเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ผู้ป่วยทั้งสามรายได้รับยาทางเส้นเลือด เพื่อป้องกันกระดูกแตกหักง่าย ตรวจพบลักษณะฟันมีสีโอปอลน้ำตาล คอฟันแคบ จากการสแกนไมโครซีทีพบว่าฟันตัวอย่างฟันซี่ที่หนึ่งมีโพรงฟันขนาดใหญ่ ตัวอย่างฟันซี่ที่สองและสามมีโพรงฟันแคบ (รูปที่ 23)



รูปที่ 23 ลักษณะฟันของผู้ป่วยทั้งสามรายที่มีเนื้อฟันผิดปกติ
รูปแสดงให้เห็นว่าฟันผู้ป่วยสามเราย OIDI1-3 มีสีเข้ม และมีลักษณะโพรงฟันที่แตกต่างจากฟันปกติ

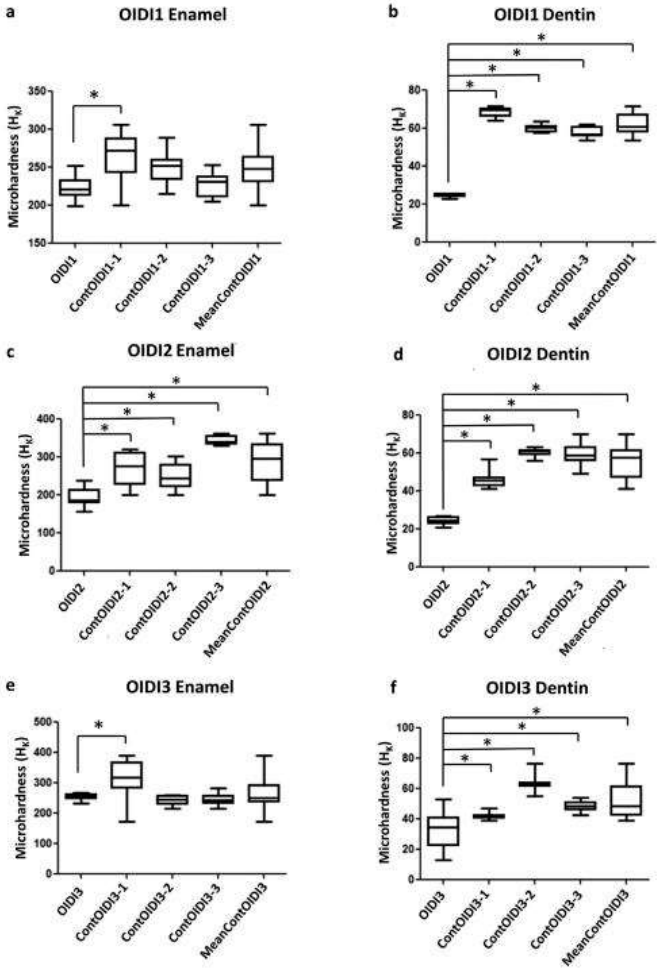
จากการศึกษาทางพันธุกรรมพบว่าผู้ป่วยรายที่หนึ่งมีการกลายพันธุ์แบบ de novo heterozygous missense mutation, c.1531G>T (p.Gly511 Cys), ในยีน COL1A2 ผู้ป่วยรายที่สองมีการกลายพันธุ์แบบ heterozygous missense mutation, c.3106G>C (p.Gly1036 Arg), ในเอ็กซอน 47 ของ COL1A2 ผู้ป่วยรายที่สามมี de novo heterozygous missense mutation, c.2027G>T (p.Gly676 Val), ในเอ็กซอน 34 of COL1A2 (รูปที่ 24)



รูปที่ 24 พงศาวลีครอบครัวและลักษณะการกลายพันธุ์ของสารพันธุกรรมที่มีเนื้อฟันไม่สมบูรณ์

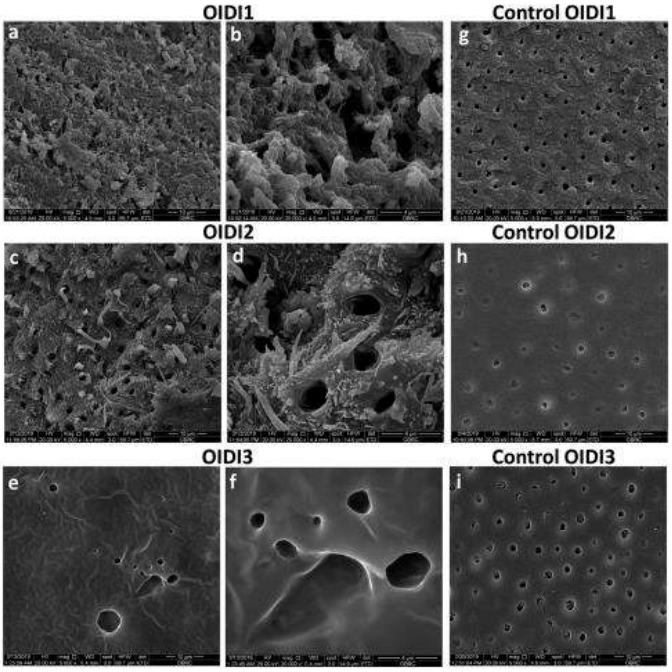
สัญลักษณ์สีทึบแสดงผู้ที่เป็นโรค สี่เหลี่ยมแสดงผู้ชาย วงกลมแสดงผู้หญิง ลูกศรแสดงถึงผู้ป่วยคนแรกที่ได้รับการตรวจวินิจฉัย

จากการวิเคราะห์โครงสร้างฟัน พบว่าสีฟันหรือความสว่างของฟันทั้งสามซี่น้อยกว่าฟันปกติอย่างมีนัยสำคัญ จากการสแกนไมโครซีที พบว่าฟันซี่ที่หนึ่งมีโพรงประสาทฟันกว้างมาก ความแข็งระดับไมโครของฟันซี่ที่หนึ่ง สองและสามในชั้นเนื้อฟันน้อยกว่าฟันปกติอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนประกอบของแร่ธาตุฟันซี่ที่หนึ่งมีการเพิ่มขึ้นของคาร์บอนและการลดลงของฟอสฟอรัสและแคลเซียมเมื่อเปรียบเทียบกับฟันปกติ ฟันซี่ที่สอง ในชั้นเนื้อฟันมีการเพิ่มขึ้นของคาร์บอนอย่างมาก ในชั้นเคลือบฟันของฟันซี่ที่หนึ่งและสามมีจำนวนคาร์บอนเพิ่มมากขึ้น ขณะที่ปริมาณออกซิเจน ฟอสฟอรัสและแคลเซียมลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 25)



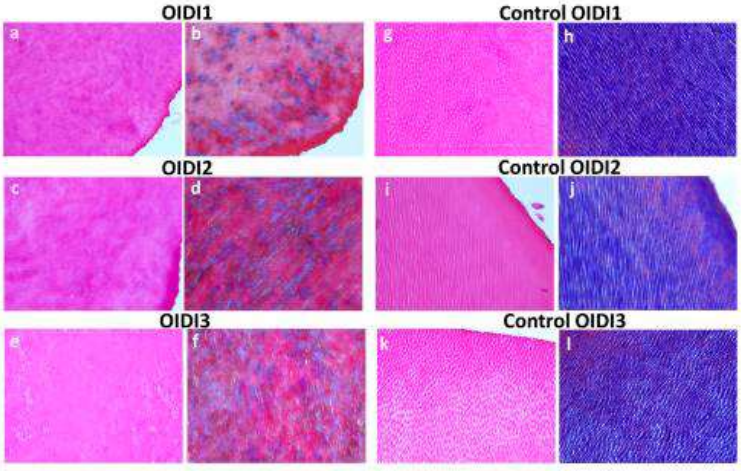
รูปที่ 25 ความแข็งไมโครของชั้นเคลือบฟันและเนื้อฟันในตัวอย่างฟันของผู้ป่วยที่มีเนื้อฟันไม่สมบูรณ์ ความแข็งในชั้นเนื้อฟันลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม *Significant at $P < 0.05$. Cont, control.

จากการส่องกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด พบความผิดปกติอย่างรุนแรงในชั้นเนื้อฟันของฟันผู้ป่วย รูท่อเนื้อฟันมีการเรียงตัวอย่างไม่เป็นระเบียบ และมีช่องว่างจำนวนมาก มีจุดหินปูนก่อตัวขึ้น (รูปที่ 26)



รูปที่ 26 ภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด
ตัวอย่างฟันซี่ที่หนึ่งและสองมีผิวเนื้อฟันที่ขรุขระอย่างมากมีช่องว่างขนาดใหญ่ และมีจุดหินปูนเกาะผิดปกติ ฟันซี่ที่สามเนื้อฟันมีลักษณะเป็นคลื่นและมีหลุมจำนวนมาก กำลังขยาย 5,000x; b, d, f: 20,000x.

ลักษณะทางพยาธิวิทยา พบว่าการเรียงตัวของท่อเนื้อฟันในฟันผู้ป่วยทั้งสามรายไม่เป็นระเบียบ มีการขาดหายไปของท่อเนื้อฟัน มีรูในเนื้อฟัน ซึ่งแตกต่างจากฟันปกติที่มีการเรียงตัวของท่อเนื้อฟันอย่างเป็นระเบียบ (รูปที่ 27)



รูปที่ 27 ลักษณะพยาธิวิทยาของฟันผู้ป่วย ทั้ง 3 ราย ที่มีเนื้อฟันไม่สมบูรณ์

ท่อเนื้อฟันมีการเรียงตัวไม่เป็นระเบียบและขาดหาย a, c, ,e, g, i, k: hematoxylin and eosin staining; b, d, f, h, j, l: Masson's trichrome staining. Microscopic magnification at 40x.

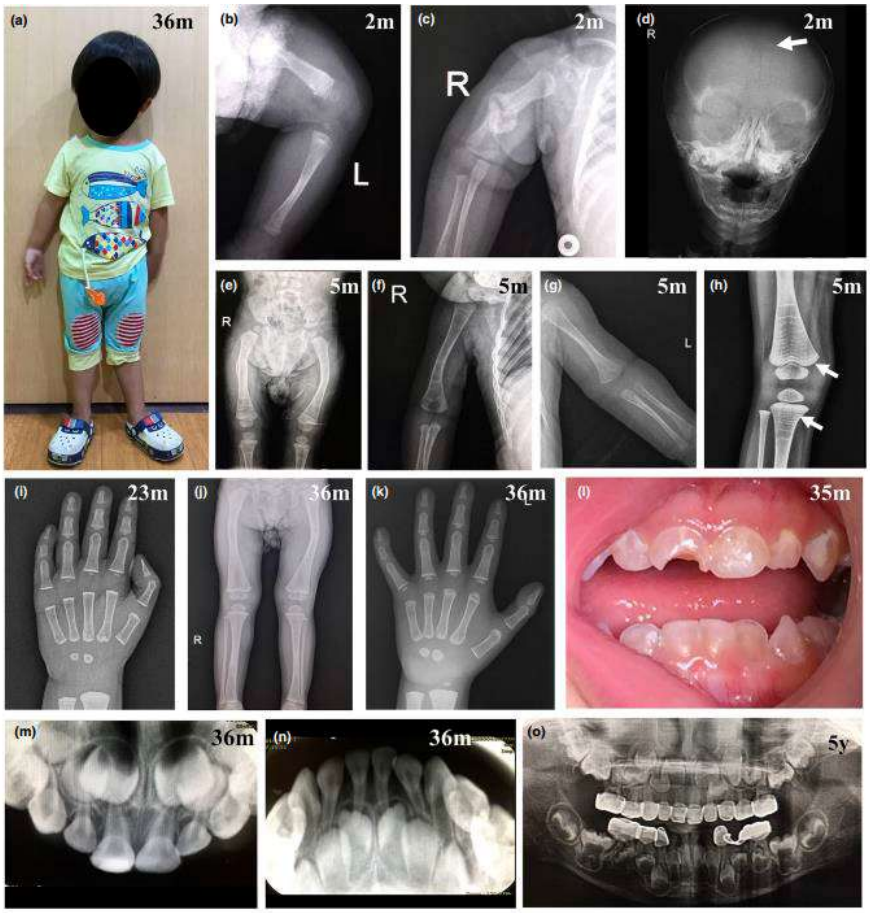
โดยสรุป การศึกษาวิจัยนี้เป็นการชี้ให้เห็นและสร้างความเข้าใจถึงลักษณะโครงสร้างทางจุลภาค ลักษณะทางฟิสิกส์เชิงกลของฟันที่มีการสร้างเนื้อฟันไม่สมบูรณ์ในผู้ป่วยที่มีกระดูกเปราะทางพันธุกรรม โดยพบว่าฟันจะมีสีเข้ม ลักษณะทางโพรงฟันผิดปกติไป เนื้อฟันมีความแข็งแรงลดลง และมีส่วนประกอบในชั้นเนื้อฟันผิดปกติ แสดงถึงความผิดปกติอย่างรุนแรงในระดับจุลภาค ซึ่งเป็นการอธิบายว่าทำไมการรักษาทางทันตกรรมถึงไม่ประสบผลสำเร็จในผู้ป่วยกลุ่มนี้ ดังนั้นบุคลากรทางการแพทย์จึงควรให้การวินิจฉัยและการพยากรณ์โรค อย่างเหมาะสมในผู้ป่วยกลุ่มนี้เพื่อเป็นการลดค่าใช้จ่ายของผู้ป่วยและภาคสาธารณสุข และหาวิธีการรักษาหรือเลือกวัสดุทางทันตกรรมที่เหมาะสมโดยที่ไม่จำเป็นต้องพึ่งพาโครงสร้างของชั้นเนื้อฟันในการยึดอยู่ เพื่อให้ผู้ป่วยเป็นผู้สูงอายุที่มีฟันครบและแข็งแรง

การศึกษาในอีกครอบครัวหนึ่งที่มีกระดูกเปราะทางกรรมพันธุ์ พบว่าผู้ป่วยมีกระดูกโค้งงอแตกหักง่าย เดินไม่สะดวก เนื้อฟันเป็นสีน้ำตาลและเปราะ ซึ่งกรณีนี้เป็นการถ่ายทอดในครอบครัวจากพ่อสู่ลูก จากการตรวจผู้ป่วยชายไทยอายุสี่สิบสามปีพบว่ามีกระดูกหักได้เองบ่อยครั้งโดยไม่ได้รับอุบัติเหตุ ซี่โครงและกระดูกไหปลาร้าหักตอนอายุสามเดือน ขาขวาหักตอนอายุสิบสองปี จากการตรวจร่างกายเมื่อพบว่ามีความสูงเพียง 156 เซนติเมตร และโครงสร้างลำตัวผิดรูป ลักษณทางภาพถ่ายรังสีพบว่ามวลกระดูกต่ำ กระดูกระยางมีความบางและโค้ง และมีรอยหักแฝงอยู่ การตรวจทางมวลกระดูกพบว่าผู้ป่วยมีมวลกระดูกน้อยกว่าคนทั่วไปถึงสามเท่า มีลักษณะทางโครงสร้างใบหน้า กระดูกศีรษะ และการสบฟันผิดปกติ ฟันมีการสึกอย่างรุนแรงและมีภาวะตีบตัน ผู้ป่วยไม่เคยได้รับยาบิสฟอตโฟเนตเพื่อป้องกันกระดูกหัก บุตรชายอายุสามเดือน มาด้วยอาการ กระดูกขาซ้ายหักตั้งแต่แรกเกิด อายุหนึ่งปีกระดูกแขนขวาหัก มีรูเปิดกะโหลกศีรษะกว้าง ผู้ป่วยได้รับยาบิสฟอตโฟเนตตั้งแต่อายุสี่เดือนและได้รับทุกสองเดือนทางเส้นเลือด จากการตรวจเมื่ออายุสามปีพบว่าผู้ป่วยมีมวลกระดูกต่ำและมีรอยหักทางภาพถ่ายรังสี (รูปที่ 28, 29)



รูปที่ 28 ลักษณะทางคลินิกและภาพถ่ายรังสีของผู้ป่วยที่มีเนื้อฟันไม่สมบูรณ์

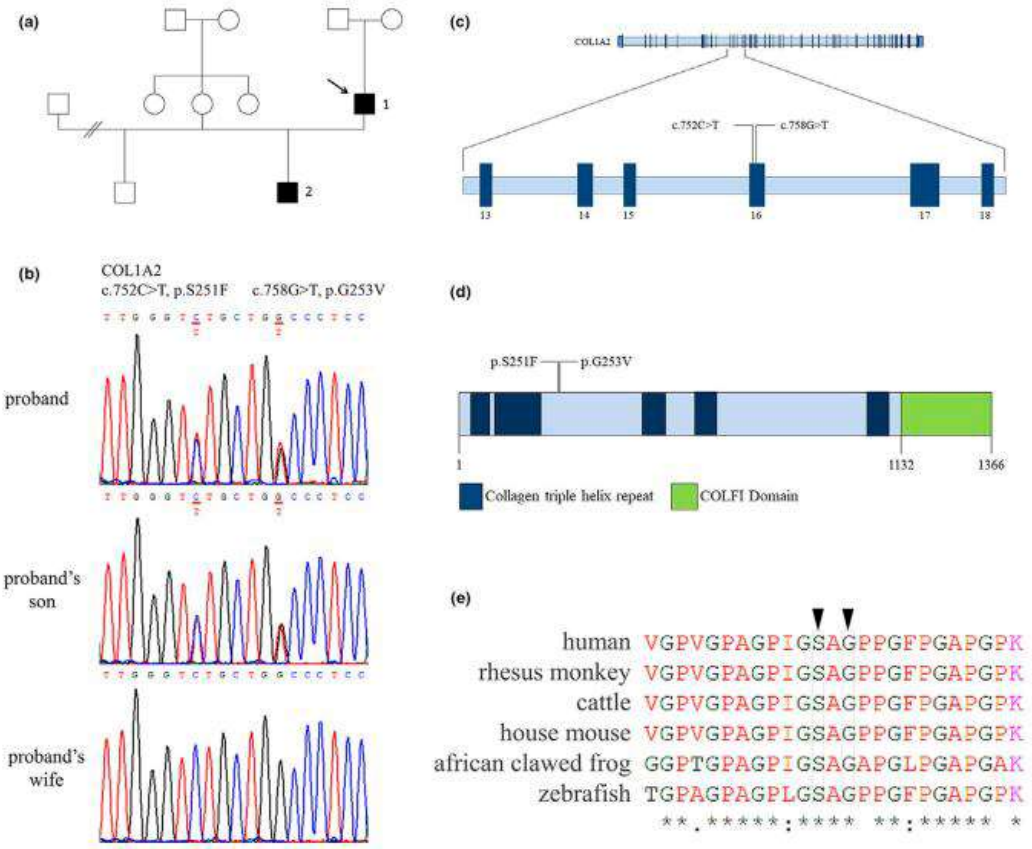
(a–c) ตัวเตี้ยและมีแขนขาโค้งผิดรูป (d, f) กระดูกเปราะ มวลกระดูกต่ำที่แขนและขา (g) มีรอยแตกกดทับที่กระดูกคอและสะโพก (h) Wormian bones (i) ฟันสีโอปอลและมีการสร้างเนื้อฟันไม่สมบูรณ์ (j) คอฟันโป่งและโพรงฟันตีบ



รูปที่ 29 ลักษณะทางคลินิกและภาพถ่ายของผู้ป่วยที่มีฟันไม่สมบูรณ์

(a) เด็กอายุสามปีมีใบหน้าแหลมและมีแขนขาผิดรูป (b, c) พบการสร้างแคลลัสในขาซ้ายและแขนขวา (d) มวลกระดูกต่ำและพบ wormian bones ในกะโหลกศีรษะ (e - g) แขนขาผิดรูป (h) ร่องรอยการให้ยา Zebra stripe sign (i) อายุกระดูกสามถึงหกเดือนเมื่อเปรียบเทียบกับอายุจริงคือ 23 เดือน (j) ขาผิดรูป (k) อายุกระดูก 24 เดือนเมื่อเทียบกับอายุจริง 36 เดือน (l) เนื้อฟันสร้างผิดปกติ (m, n) โพรงฟันกว้าง (o) คอฟันโป่ง

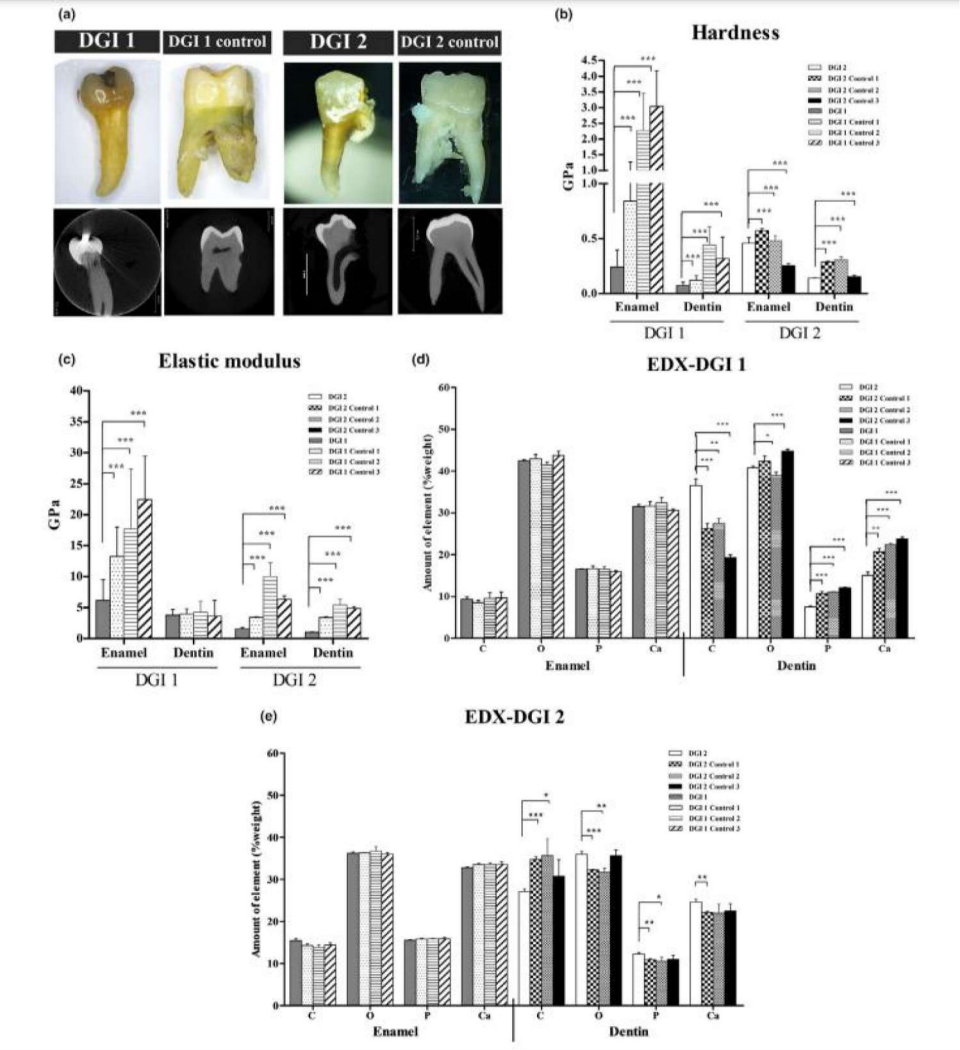
จากการตรวจทางพันธุกรรม พบว่า ผู้ป่วยมีการกลายพันธุ์แบบ novel missense mutations, c.752C > T (p.Ser251Phe) และ c.758G > T (p.Gly253Val) ในยีน COL1A2 ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางคลินิกคือผู้ป่วยเป็นกระดูกเปราะกรรมพันธุ์ชนิดที่สี่ โดยพบการกลายพันธุ์ในบิดาและบุตรชาย และไม่พบในคนอื่นของครอบครัว จากการวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศ พบว่าการกลายพันธุ์ในตำแหน่งสองตำแหน่งนี้ มีโอกาสทำให้เกิดความผิดปกติโดยเฉพาะตำแหน่ง p.Gly253Val เนื่องจากเป็นการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนไกลซีน ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่เล็กที่สุดในสายคอลลาเจน โดยการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนี้จะทำให้การบิดเกลียวของสายคอลลาเจนผิดปกติและทำให้การสร้างกระดูกหรือเนื้อเยื่อเกี่ยวพันผิดปกติไป (รูปที่ 30)



รูปที่ 30 พงศาวลี และการวิเคราะห์ทางพันธุกรรม

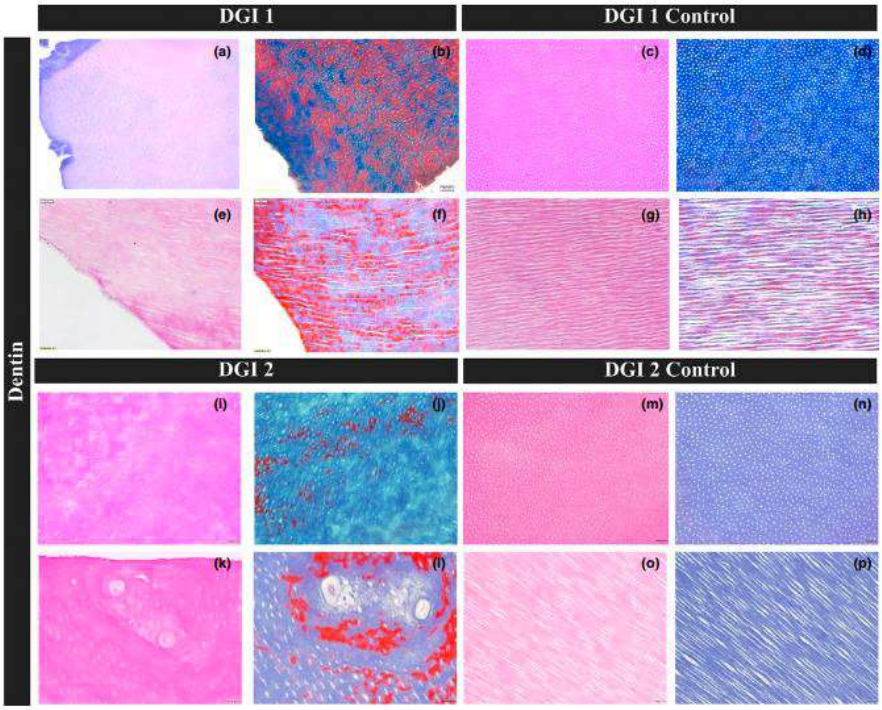
(a) ผู้ป่วยที่เป็นโรคระบายด้วยสีทึบ ลูกศรแสดงผู้ป่วยคนแรกที่ได้รับการตรวจ (c, d) การเรียงตัวของยีน COL1A2 และโปรตีนแสดงให้เห็นถึงจุดที่มีการกลายพันธุ์ (e) ความสำคัญของตำแหน่ง p.Ser251 and p.Gly253 ในแต่ละสปีชีส์

จากการตรวจเชิงลึกของโครงสร้างฟันพบว่าฟันของผู้ป่วยและบุตรชายมีความเข้มของสีฟันเพิ่มขึ้นอย่างมาก ไมโครซีทีแสดงให้เห็นถึงความหนาแน่นฟันที่เปลี่ยนแปลงไปจากปกติ โดยเฉพาะความแข็งของชั้นเนื้อฟันที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าที่แสดงให้เห็นว่าผู้ป่วยที่มีการสร้างเนื้อฟันไม่สมบูรณ์สัมพันธ์กับโรคกระดูกเปราะทางกรรมพันธุ์จะมีความแข็งแรงของชั้นเนื้อฟันน้อยกว่าปกติ นอกจากนี้ยังพบส่วนประกอบของแคลเซียมและฟอสฟอรัสลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับฟันปกติ เมื่อศึกษาทางพยาธิวิทยา พบว่า การเรียงตัวของท่อเนื้อฟันผิดรูปไปและมีปริมาณคอลลาเจนน้อยกว่าปกติ (รูปที่ 31, 32) ดังนั้นการศึกษานี้ซึ่งเป็นการตรวจพบการถ่ายทอดในครอบครัวให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้า และเป็นการยืนยันว่าภาวะหรือความผิดปกติของการสร้างเนื้อฟันส่งผลต่อความแข็งแรงของชั้นเนื้อฟันอย่างมีนัยสำคัญ อันส่งผลต่อผลสำเร็จของการรักษาทางทันตกรรมและความแข็งแรงของเนื้อฟันต่อไปในผู้สูงอายุ ดังนั้นผู้ป่วยกลุ่มนี้จึงควรได้รับการดูแลตั้งแต่แรกเริ่มและป้องกันก่อนที่ปัญหาการแตกหักของฟันจะเริ่มขึ้น



รูปที่ 31 ลักษณะเชิงลึกและลักษณะทางฟิสิกส์ของฟัน

(a) รูปและไมโครซีทีของฟันผู้ป่วยและบุตรชายเปรียบเทียบกับฟันปกติ (b) ความแข็งแรงของชั้นเนื้อฟันของฟันผู้ป่วยน้อยกว่าฟันปกติอย่างมีนัยสำคัญ (c) ความยืดหยุ่นของฟันผู้ป่วยลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (d, e) ส่วนประกอบของแคลเซียมและฟอสฟอรัสในชั้นเนื้อฟันของฟันผู้ป่วยน้อยลงกว่าฟันปกติ *p value ≤ .05, **p value ≤ .01, ***p value ≤ .001



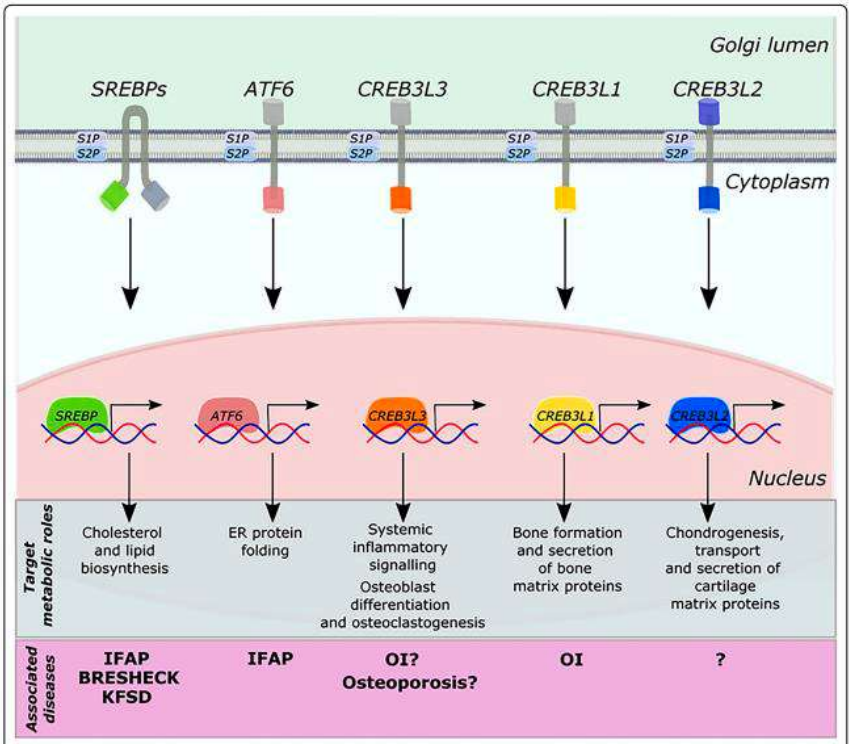
รูปที่ 32 ลักษณะทางพยาธิวิทยา

ชั้นเนื้อฟันของฟันผู้ป่วยมีการเรียงตัวของท่อเนื้อฟันผิดปกติ H&E staining (x40), a, c, e, g, i, k, m, o; Masson's Trichrome (x40), b, d, f, j, l, n, p; cross sections, a, b, e, f,i, j, m, n; longitudinal sections, c, d, g, h, k, l, o, p

โดยสรุปจากการศึกษานี้ในผู้ป่วยที่มีเนื้อฟันผิดปกติ พบว่าท่อเนื้อฟันมีการเรียงตัวผิดไปและมีการอุดตัน ซึ่งมีลักษณะคล้ายคลึงกับผู้สูงอายุที่โพรงฟันจะตีบและเนื้อฟันมีการสร้างเนื้อฟันมาทดแทนจนปิดรูท่อเนื้อฟัน ดังนั้นความรู้ในส่วนนี้จะทำให้การวินิจฉัยโรคในผู้ป่วยได้ถูกต้องแม่นยำมากขึ้น และสร้างความเข้าใจว่าการเปลี่ยนแปลงของคอลลาเจนอาจเป็นสาเหตุทำให้ฟันผู้สูงอายุทั่วๆไปมีการแตกหักง่าย เช่นเดียวกับผู้ป่วยที่มีการสร้างเนื้อฟันไม่สมบูรณ์จากสาเหตุทางพันธุกรรม

คณะผู้วิจัยยังทำการศึกษา ผลของการกลายพันธุ์ในยีนที่สร้างเอนไซม์ Membrane-Bound Transcription factor Protease Site-2 gene (MBTPS2) ที่สร้าง site-2 protease (S2P) ที่ทำหน้าที่สำคัญในกระดูกและผิวหนัง โดยพบว่าการกลายพันธุ์ในยีนเดียวกันแต่คนละตำแหน่งจะทำให้เกิดโรคทางพันธุกรรมที่แตกต่างกันอย่างสิ้นเชิง โดยส่วนหนึ่งทำให้เกิดโรคกระดูกกรรมพันธ์ชนิดที่ 19 ที่มีกระดูกคดงอตั้งแต่กำเนิด ขณะที่ตำแหน่งการกลายพันธุ์ในตำแหน่งอื่นของยีนจะทำให้เกิดโรคอื่นๆ ประกอบด้วย Ichthyosis Follicularis, Atrichia and Photophobia syndrome (IFAP) with or without BRESHECK syndrome, Keratosis Follicularis

Spinulosa Decalvans (KFSD) และ Olmsted syndrome ซึ่งผู้ป่วยจะมีปัญหาทางผิวหนังมีแห้งกร้านสะเก็ดเกิดแผลบ่อยครั้ง รวมถึงปัญหาทางสายตาที่จะพร่ามัวและอาจถึงตาบอดได้ (รูปที่ 33, 34)



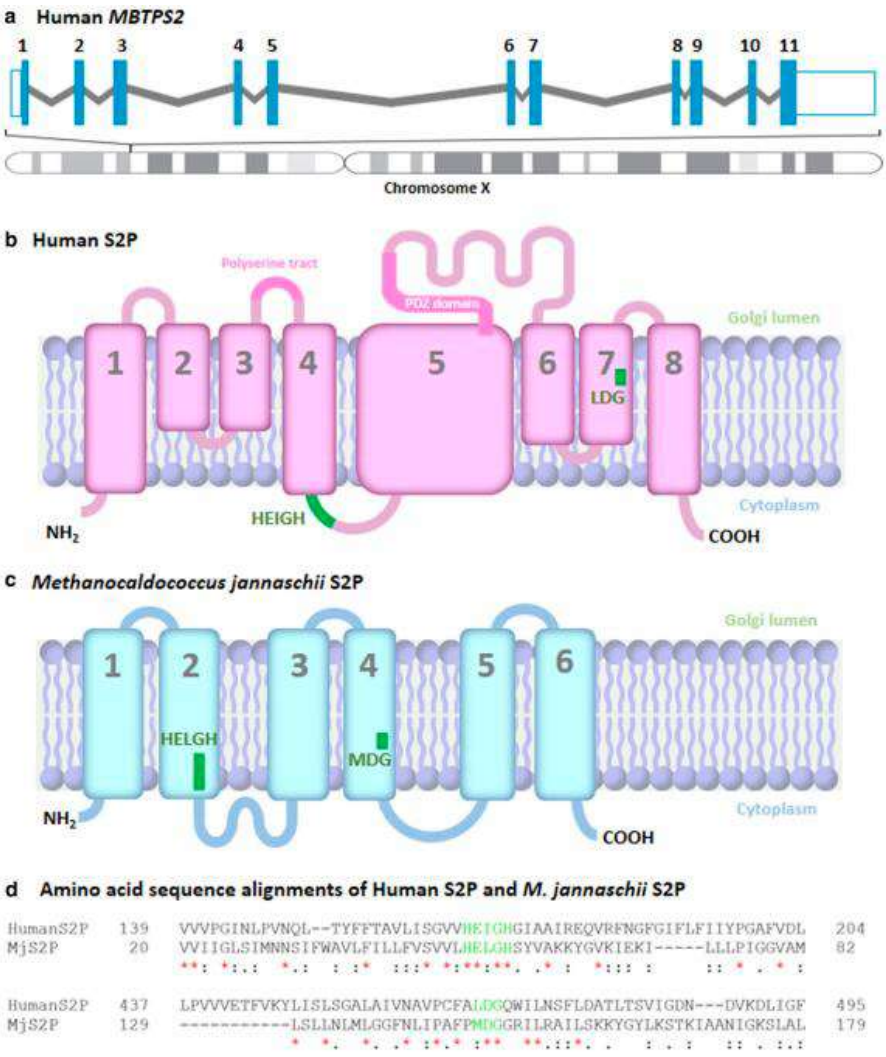
รูปที่ 33 แผนภูมิแสดงการทำงานของเอนไซม์ S1P S2P

หลังจากถูกกระตุ้นด้วยสารตั้งต้น เอนไซม์ S1P S2P จะเคลื่อนที่เข้าภายในเซลล์และทำหน้าที่ตัดเอนไซม์อื่นๆ กระตุ้นการทำงานของยีนในนิวเคลียสต่อไป ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ไขมัน การสร้างโปรตีนและกระดูก การอักเสบ การสลายตัวของกระดูก การสร้างกระดูกอ่อน และการสร้างโครงสร้างโปรตีนนอกเซลล์ โดยความผิดปกติของ S2P ทำให้เกิดโรค IFAP syndrome with or without BRESHECK, KFSD, OS and OI



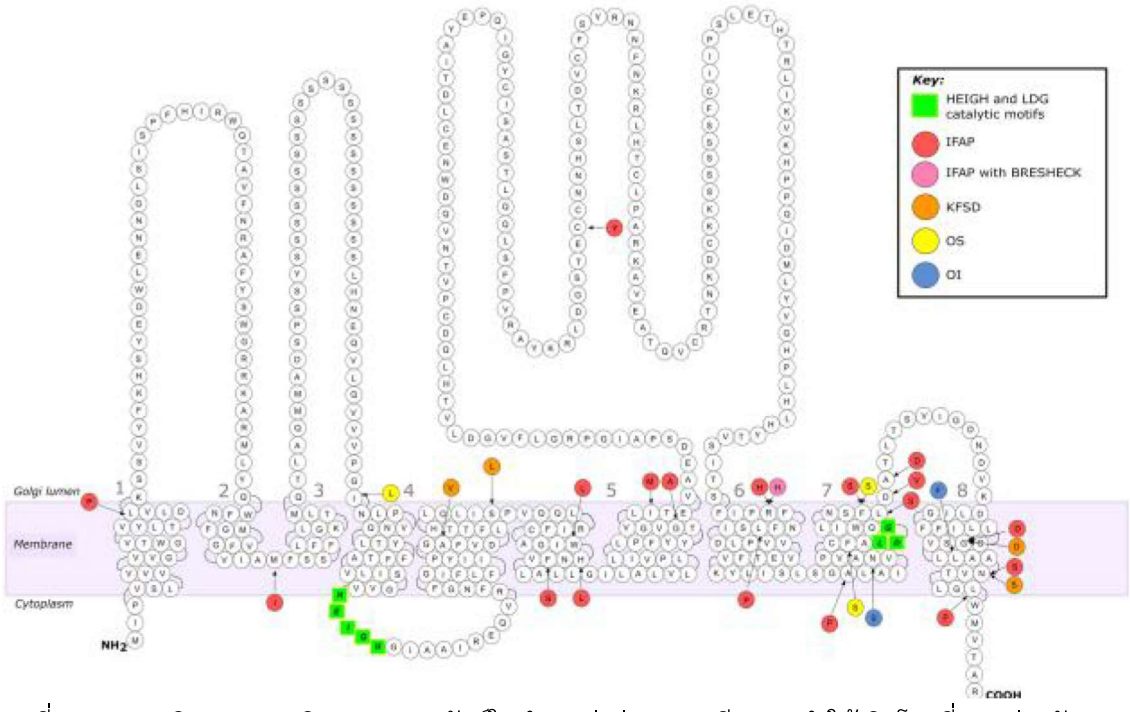
รูปที่ 34 รูปภาพแสดงลักษณะทางคลินิกและภาพถ่ายรังสีของผู้ป่วยที่เป็นโรค IFAP
ผู้ป่วยมีผิวหนังแห้งกร้าน ผมร่วง ผิวเป็นสะเก็ด และมีปัญหาทางสายตา ขณะที่ผู้ป่วย OI ที่เป็นโรคกระดูกเปราะกรรมพันธ์มีกระดูกคดงออย่างรุนแรงทำให้ไม่สามารถเดินได้

จากการศึกษาพบว่า ยีนมีส่วนประกอบทั้งหมด 11 อ็กซอน โครงสร้างของโปรตีนประกอบด้วย 8 transmembrane domains, a polyserine tract, a PDZ domain, and catalytic active motifs, HEIGH และ LDG และตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์ในแต่ละตำแหน่งยีนและโปรตีนที่แตกต่างกันจะส่งผลให้เกิดความผิดปกติที่แตกต่างกัน เป็นการแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์และฟีโนไทป์ของ MBTPS2 (รูปที่ 35, 36)



รูปที่ 35 แสดงโครงสร้างของยีน MBTPS2 และโปรตีน S2P

A. โครงสร้างของยีนในมนุษย์ประกอบด้วย 11 เอ็กซอนอยู่บนโครโมโซมเอ็กซ์ B – C. โครงสร้างของโปรตีน S2P ประกอบด้วย 8 โครงสร้างในชั้นเนื้อเยื่อ, polyserine tract, PDZ domain, และ catalytic active motifs, HEIGH and LDG. D. การเรียงตัวของกรดอะมิโนโปรตีน S2P and MjS2P. catalytic active motifs (ตัวอักษรสีเขียว) ดอกจันทร์ (*) บอกตำแหน่ง ที่มีการคงอยู่ของโปรตีนในมนุษย์กับแมลง



รูปที่ 36 แผนภูมิแสดงการเกิดการกลายพันธุ์ในตำแหน่งต่างๆของยีนและทำให้เกิดโรคที่แตกต่างกัน ได้แก่ โรค IFAP syndrome with or without BRESHECK, KFSD, OS and OI

โดยสรุป การศึกษาวิเคราะห์ในการวิจัยนี้ทำให้เข้าใจ ถึงความแตกต่างของการกลายพันธุ์ในแต่ละตำแหน่งของยีนที่ส่งผลให้เกิดลักษณะความผิดปกติ ที่แตกต่างกันอย่างสิ้นเชิง โดยผู้ป่วยจะมีโครงสร้างใบหน้าและกระดูกขากรรไกรที่ผิดปกติร่วมด้วย ดังนั้นหากทำการศึกษาต่อไปและเข้าใจถึงกระบวนการของเอนไซน์ในการทำหน้าที่และทำให้เกิดความผิดปกติที่แตกต่างกันนี้ ย่อมสามารถให้การวินิจฉัยที่ถูกต้อง โดยเฉพาะผู้ป่วยที่เป็น IFAP อาจต้องส่งผู้ป่วยทำการตรวจตาอย่างละเอียด เพื่อป้องกันภาวะจอตาเสื่อมจนถึงตาบอดได้ ส่วนผู้ป่วยที่เป็นโรคกระดูกเปราะ ควรป้องกันกระดูกหักและความพิการถาวร และมุ่งเป้างานวิจัยไปสู่การรักษาที่จำเพาะเจาะจง เช่น การปรับเปลี่ยนสารพันธุกรรม เพื่อให้ผู้ป่วยสามารถเดินได้และใช้ชีวิตได้อย่างคนทั่วไป ไม่เป็นผู้สูงอายุที่เป็นภาระต่อครอบครัวและสังคม

<u>ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่ระดับนานาชาติ</u>

- Nutchoey O, Intarak N, Theerapanon T, Thaweesapphithak S, Boonprakong L, Srijunbarl S, Porntaveetus T*, Shotelersuk V. 2021. Phenotypic features of dentinogenesis imperfecta associated with osteogenesis imperfecta and COL1A2 mutations. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 131:694-701

- Intarak N, Budsamongkol T, Theerapanon T, Chanamuangkon T, Srijunbarl A, Boonprakong L, Porntaveetus T*, Shotelersuk V. 2020. Tooth ultrastructure of a novel COL1A2 mutation expanding its genotypic and phenotypic spectra. Oral Dis. 27:1257-1267.
- Caengprasath N, Theerapanon T, Porntaveetus T*, Shotelersuk V. 2021. MBTPS2, a membrane bound protease, underlying several distinct skin and bone disorders. J Transl Med. 19:114.
-

4.3 ภาวะฟันหายและการไม่มีฟัน

ภาวะฟันหายเป็นภาวะความผิดปกติ ในการพัฒนาการของมนุษย์ที่พบได้มากที่สุดซึ่งสามารถพบได้ถึง 2.5 - 7% ของประชากร และเกี่ยวข้องกับการทำงานของหลายยีนและหลายสัญญาณ ได้แก่ bone morphogenic protein, fibroblast growth factor, sonic hedgehog, และ wingless (WNT) มีการศึกษาจำนวนมากชี้ให้เห็นว่าผู้ป่วยที่มีฟันไม่ครบในการเคี้ยวอาหารจะส่งผลให้เกิดภาวะความจำเสื่อมได้มากกว่าคนที่มีฟันครบ ดังนั้นการมีจำนวนฟันครบ จนเข้าสู่วัยสูงอายุจึงเป็นสิ่งจำเป็นไม่ใช่เพียงแค่เพื่อการบดเคี้ยวอาหารและสุขภาพที่ดี แต่ยังส่งผลต่อระบบประสาทและความจำอีกด้วย

จากรายงานการศึกษาพบว่ามีการกลายพันธุ์ในยีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะฟันหายจำนวนมาก และมีหลากหลายการกลายพันธุ์ทางพันธุกรรม ทีสามารถบ่งบอกถึงลักษณะภาวะซ่อนเร้นความผิดปกติทางระบบหรือโรคทางระบบที่ยังไม่เกิดขึ้น ณ ช่วงอายุนั้นๆได้ เช่นโรคมะเร็งลำไส้ โรคไต ภาวะตาบอด และ โรคหัวใจ ดังนั้นหากมีการวิเคราะห์ศึกษาในผู้ป่วยประชากรไทย ระบุอุบัติการณ์การเกิดความผิดปกติและยีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะฟันหายในประชากรไทย จะสามารถให้การวินิจฉัยและหาภาวะซ่อนเร้น ให้การป้องกันและเฝ้าระวังความเสี่ยงของโรคทางระบบที่ยังไม่เกิดขึ้นต่อผู้ป่วยและคนในครอบครัว ลดปัญหาแทรกซ้อนทางสุขภาพที่อาจจะเกิดขึ้นในอนาคต อันส่งผลต่อชีวิตความเป็นอยู่ในช่วงสูงอายุ

วิธีการศึกษาวิจัย การศึกษานี้ได้รับการส่งต่อผู้ป่วยจากสถานพยาบาลต่างๆทั้งในกรุงเทพฯและต่างจังหวัดจำนวนสิบสามรายเพื่อมาทำต้านตรวจวินิจฉัยเชิงลึกทางพันธุศาสตร์ที่คณะทันตแพทยศาสตร์ และคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยผู้ป่วยได้รับการตรวจทางคลินิกและภาพถ่ายรังสีเพื่อยืนยันว่าเป็นภาวะฟันหาย จากนั้นทำการตรวจทางพันธุกรรม สกัดสารดีเอ็นเอจากเม็ดเลือดขาวและตรวจลำดับเบสทั้งหมดด้วยวิธีการตรวจเอ็กโซมทั้งหมด และนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศ วิเคราะห์ความถี่ของสารพันธุกรรมที่ตรวจพบทำการตรวจสอบกับฐานข้อมูลต่างๆทั่วโลก ได้แก่ Genome Aggregation Database (gnomAD), GenomeAsia100K consortium, Northeast Asian Reference Database (NARD), Han Chinese genome project (PGG.Han), 4 . 7 K Japanese individual genome variation (4 . 7 KJPN), Human Genetic Variation Database (HGVD), Korean Variant Archive (KOVA), และ in-house database

ผลการศึกษา พบว่าจากผู้ป่วยสิบสามรายและจากสิบสามครอบครัวของประชากรไทย ตรวจพบการกลายพันธุ์ของสารพันธุกรรมในห้าครอบครัว จากนั้นทำการตรวจสอบผู้ป่วยเพิ่มมากขึ้นอีกสิบแปดสมาชิกในครอบครัว รวมทั้งหมด คือ สามสิบเอ็ดราย

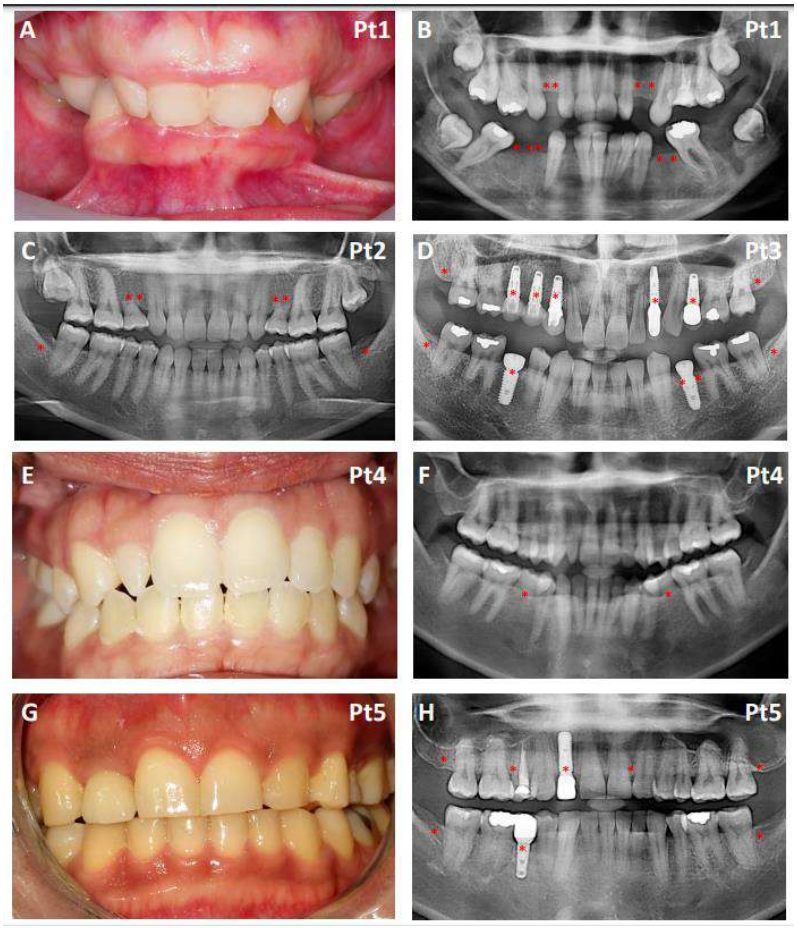
ผู้ป่วยรายที่หนึ่งเป็นหญิงไทย มีฟันหายเก้าซี่ รวมถึงฟันกรามน้อยทั้งหมดและฟันกรามล่างขวา และมีฟันสบลึก จากการตรวจสอบพบว่ามีการกลายพันธุ์แบบ novel heterozygous duplication, c.916_918dupAAC (p.Asn306dup), ใน WNT10A และตรวจพบในมารดา และยายที่มีฟันหายเช่นกันแต่ไม่พบในน้า

ผู้ป่วยรายที่สองเป็นหญิงไทย มีฟันหายหกซี่ ได้แก่ฟันกรามน้อยบน 4 ซี่และฟันกรามล่างซี่ที่สาม 2 ซี่ พบการกลายพันธุ์แบบ known heterozygous missense mutation, c.637G > A (p.Gly213Ser), ใน WNT10A โดยตรวจพบในผู้ป่วยบิดาของผู้ป่วย พี่สาวและน้องสาวซึ่งไม่มีภาวะฟันหาย ส่วนแม่ไม่พบการกลายพันธุ์

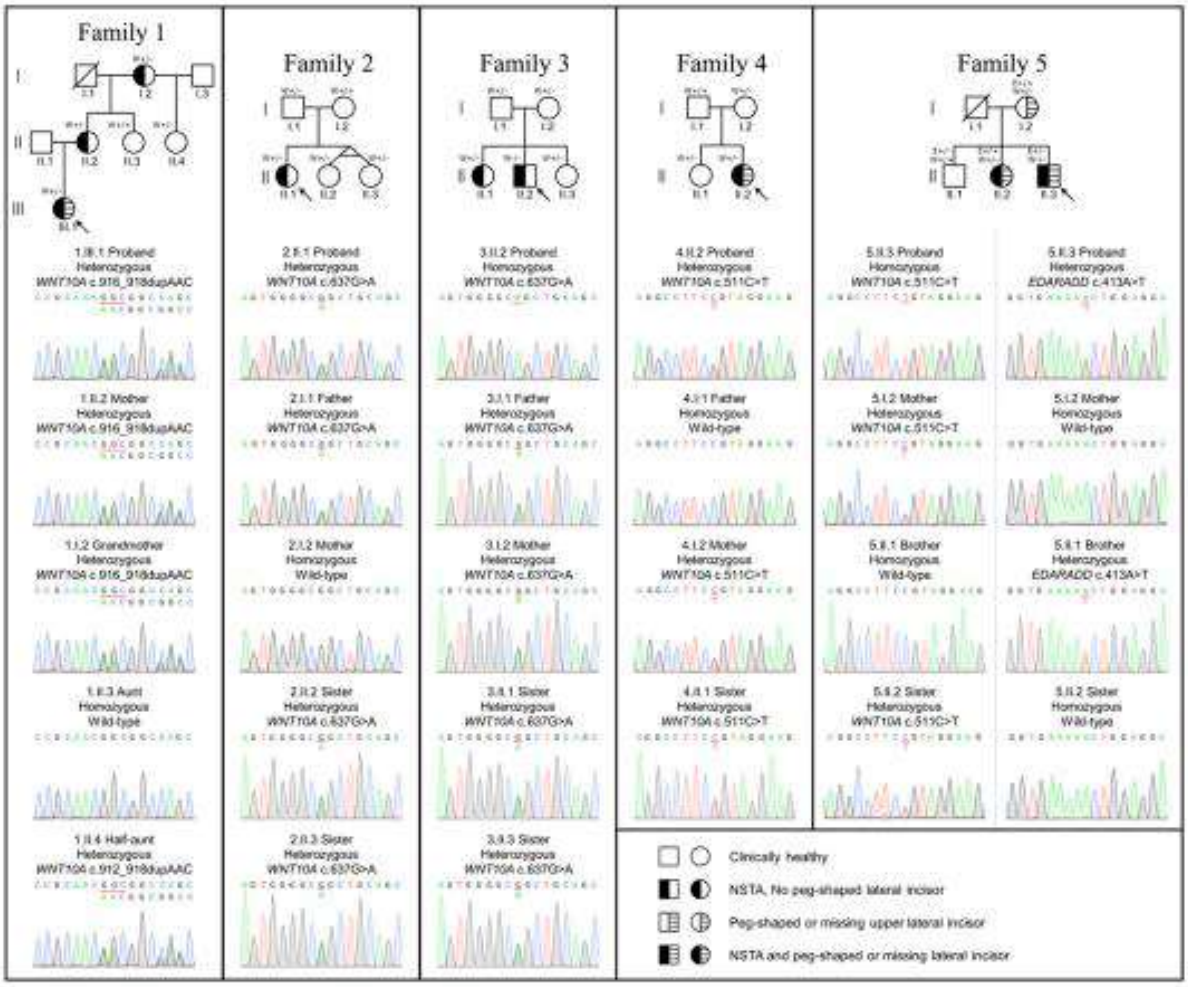
ผู้ป่วยรายที่สาม เพศชายมีฟันหายสิบสองซี่ ได้แก่ ฟันเขี้ยวบนขวา ฟันกรามน้อยซี่แรกสามซี่ ฟันกรามน้อยซี่ที่สองซี่และฟันกรามซี่ที่สามสี่ซี่ พบการกลายพันธุ์แบบ homozygous mutation, c.637G > A (p.Gly213Ser), ใน WNT10A ในผู้ป่วย และแบบ WNT10A heterozygous c.637G > A (p.Gly213Ser) variant ในพี่สาวซึ่งมีฟันหายสี่ซี่ และ พบในน้องสาว บิดา และมารดาซึ่งไม่มีภาวะฟันหาย

ผู้ป่วยรายที่สี่ อายุสามสิบเอ็ดปี มีฟันกรามน้อยล้างหาย 2 ซี่และมีฟันตัดข้างซี่เล็กกว่าปกติ มีฟันน้ำนมค้างอยู่ในช่องปาก พบการกลายพันธุ์แบบ known heterozygous missense variant, c.511C > T (p.Arg171Cys), in WNT10A ในผู้ป่วย พี่สาวและแม่ ซึ่งไม่มีฟันหาย ไม่พบการกลายพันธุ์ในบิดา

ผู้ป่วยรายที่ห้า มีฟันหาย 8 ซี่ ได้แก่ ฟันตัดข้างบน 2 ซี่ ฟันกรามน้อยซี่ที่สอง และฟันกรามซี่ที่สาม 4 ซี่ ผู้ป่วยได้รับการฝังรากเทียม ตรวจพบการกลายพันธุ์แบบ homozygous missense variant, c.511C > T (p.Arg171Cys)ใน WNT10A และ novel heterozygous missense variant, c.413A > T (p.Asn138Ile), ใน EDARADD ในผู้ป่วย โดยในพี่สาวพบ heterozygous WNT10A c.511C > T variant ซึ่งมีฟันหายที่ตำแหน่งฟันตัดข้างบน 2 ซี่และฟันกรามซี่ที่สาม 4 ซี่ และพบในมารดาซึ่งมีฟันตัดข้างด้านบนซี่เล็กกว่าปกติ (รูปที่ 37, 38 และตารางที่ 5)



รูปที่ 37 ลักษณะทางคลินิกและภาพถ่ายรังสีของผู้ป่วยห้าที่แสดงภาวะฟันหายหลายซี่



รูปที่ 38 ลักษณะพงศาวลีและแสดงการกลายพันธุ์ของผู้ป่วยและสมาชิกในครอบครัวทั้งห้าครอบครัว ลูกศรแสดงผู้ป่วยที่ได้รับการตรวจอย่างละเอียดเป็นคนแรก เครื่องหมายสีทึบแสดงผู้ที่มีภาวะฟันหาย เส้นแถบแสดงภาวะที่มีซี่ฟันเล็กกว่าปกติ วงกลมแสดงผู้หญิง สี่เหลี่ยมแสดงผู้ชาย

ตารางที่ 5 ลักษณะฟันหายของผู้ป่วยทั้งหมด

Patients	Jaws	Tooth																Number of missing teeth (excluding 3rd molars)	Mode	Mutation	Amino acid change
		8	7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7	8				
Patient 1	Upper				•	•		P			P		•	•							
	Lower			•	•	•							•	•		x		9	Het	c.916_918dup	p.Asn360dup
Patient 1's aunt	Upper																				
	Lower																	**0**	Het	c.916_918dup	p.Asn360dup
Patient 2	Upper				•	•							•	•							
	Lower	•															•	6 (4)	Het	c.637G>A	p.Gly213Ser
Patient 2's father	Upper																				
	Lower																	**0**	Het	c.637G>A	p.Gly213Ser
Patient 3	Upper	•			•	•	•						•	•			•				
	Lower	•			•								•	•			•	12 (8)	Homo	c.637G>A	p.Gly213Ser
Patient 4	Upper							P			P										
	Lower				•									•				2	Het	c.511C>T	p.Arg171Cys
Patient 4's mother	Upper																				
	Lower																	**0**	Het	c.511C>T	p.Arg171Cys
Patient 5[a]	Upper	•			•			•			•						•				
	Lower	•			•												•	8 (4)	Homo	c.511C>T	p.Arg171Cys
Patient 5's sister	Upper							•			•										
	Lower	•															•	4 (2)	Het	c.511C>T	p.Arg171Cys
Patient 5's mother	Upper																				
	Lower																	**0**	Het	c.511C>T	p.Arg171Cys

วงกลมทึบแสดงตำแหน่งที่ฟันหาย P แสดงลักษณะฟันที่เล็กกว่าปกติ

ทำการวิเคราะห์ผลการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้น พบว่า การกลายพันธุ์ WNT10A c.511C > T (p.Arg171Cys) มีความรุนแรงและทำให้เกิดโรค (CADD: 25.6), deleterious (SIFT: 0.0), possibly damaging (PolyPhen-2: 0.93), และ disease causing (MutationTaster) การกลายพันธุ์ WNT10A c.637G > A (p.Gly213Ser) วิเคราะห์ให้ผลว่ามีความรุนแรง (CADD: 27.2), deleterious (SIFT: 0.0), probably damaging (PolyPhen-2: 1.0), และ disease causing (MutationTaster) และ การกลายพันธุ์ EDARADD c.413A > T (p.Asn138Ile) ให้ผลการวิเคราะห์เป็น deleterious (CADD: 27.3), deleterious (SIFT: 0.0), possibly damaging (PolyPhen: 1.0), และ disease causing (MutationTaster)

การวิเคราะห์ความถี่ของการกลายพันธุ์ในฐานข้อมูลต่างๆ ได้แก่ Genome Aggregation Database (gnomAD), GenomeAsia1 0 0 K consortium, Northeast Asian Reference Database (NARD), Han Chinese genome project (PGG.Han), 4.7K Japanese individual genome variation (4.7KJPN), Human Genetic Variation Database (HGVD), Korean Variant Archive (KOVA), และ our in-house database พบว่า ความถี่ของ WNT10A c.511C > T and c.637G > A ในประชากรชาวเอเชียอยู่ระหว่าง 0.005 - 0.033 และระหว่าง 0.004 and 0.029 ตามลำดับ ในฐานข้อมูลของคณะผู้วิจัยที่ครอบคลุม 1,876 ประชากรไทยพบ

ความถี่ของ c.511C > T variant อยู่ที่ 0.016 และของ c.637G > A variant ที่ 0.016 ซึ่งอยู่ในประมาณการของคนเอเชีย ขณะที่กลุ่มคนที่ไม่ใช่เอเชีย พบความถี่ของ c.511C > T variant ที่ 0.001 และความถี่ของ c.637G > A variant ที่ 0.000 (ตารางที่ 6) การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการกลายพันธุ์ แบบ WNT10A c.511C > T และ c.637G > A variants พบได้บ่อยในประชากรชาวเอเชียและคนไทยมากกว่าชาติตะวันตกหรือประชากรที่ไม่ใช่เอเชีย

ตารางที่ 6 ความถี่ของอัตราการเกิดการกลายพันธุ์ในแต่ละเชื้อชาติ

	rs116998555 c.511C > T (p.Arg171Cys)				rs147680216 c.637G > A (p.Gly213Ser)			
Database	**Allele count**	**Allele number**	**Number of homozygotes**	**Allele frequency**	**Allele count**	**Allele number**	**Number of homozygotes**	**Allele frequency**
gnomAD (v2.1.1 and v3)								
East Asian	370	23084	3	0.016	657	22960	16	**0.029**
Non-East Asian	335	402864	1	0.001	22	400838	0	0.000
South Asian	51	33652	1	0.002	4	33616	0	0.000
African	32	67004	0	0.001	3	66550	0	0.000
Ashkenazi Jewish	0	13692	0	0.000	0	13646	0	0.000
European (Finnish)	13	35558	0	0.000	0	35046	0	0.000
European (non-Finnish)	223	193594	0	0.001	4	192768	0	0.000
Latino	6	49094	0	0.000	3	48994	0	0.000
Other	10	10270	0	0.001	8	10218	0	0.001
Total	705	425948	4	0.002	679	423798	16	0.002
GenomeAsia 100K								
Southeast Asia	4	692	0	0.006	3	692	0	**0.004**
Northeast Asia	5	702	0	0.007	10	702	0	0.014
South Asia	7	1448	0	**0.005**	0	1448	0	0.000
Other	0	636	0	0.000	0	636	0	0.000
Total	16	3478	0	0.005	13	3478	0	0.004
Northeast Asian Reference Database (NARD)	35	3558	NA	0.010	51	3558	NA	0.014
Han Chinese genome project (PGG.Han)	3596	107232	NA	**0.033**	1161	108146	NA	0.011
4.7K JPN (4,773 Japanese individuals)	NA	NA	NA	0.010	NA	NA	NA	0.015
HGVD (3,248 Japanese individuals)	36	2412	0	0.015	35	2388	0	0.015
Korean Variant Archive (KOVA) (1,055 healthy Korean individuals)	NA	NA	NA	0.019	NA	NA	NA	0.019
ThWES 1876 (In-house database of 1,876 Thai individuals)	58	3752	4	0.016	59	3752	0	0.016

JPN, Japanese individual genome variation; genomAD, Genome Aggregation Database; HGVD, Human Genetic Variation Database; NA, not available. Bold numbers indicate maximum and minimum allele frequencies in the column.

แสดงให้เห็นว่า ในผู้ป่วยประชากรไทยและในเอเชียมีความถี่ของการกลายพันธุ์ c.511C > T and c.637G > A สูงกว่าชาติตะวันตก

โดยสรุป การศึกษาวิจัยนี้ค้นพบการกลายพันธุ์ใหม่ ที่ทำให้เกิดภาวะฟันหายและพบว่าการกลายพันธุ์ในยีน WNT10A พบได้บ่อยในประชากรไทย โดยการกลายพันธุ์นี้สัมพันธ์กับภาวะฟันหายของฟันกรามน้อยซี่ที่สองและเกี่ยวข้องกับขนาดฟันตัดข้างเล็กผิดปกติ โดยผลการค้นพบนี้สามารถช่วยให้แพทย์ให้การวินิจฉัยเบื้องต้นในผู้ป่วยที่พบภาวะฟันหายที่มีลักษณะทางคลินิกดังที่กล่าวมาว่ามีโอกาสเกิดจากการกลายพันธุ์ในยีน WNT10A และมักจะไม่พบความผิดปกติของโรคทางระบบร่วมด้วย แต่หากเป็นลักษณะฟันหายในรูปแบบอื่น มีข้อแนะนำว่าควรตรวจทางพันธุกรรมให้ชี้ชัด เนื่องจากอาจมีภาวะซ่อนเร้นทางระบบ เช่น โรคมะเร็งลำไส้ โรคนิ่วในไต และโรคหัวใจ ซึ่งพบร่วมกับการกลายพันธุ์ในยีนที่ทำให้เกิดภาวะฟันหายได้ เพื่อป้องกันโรคแทรกซ้อนที่เกิดขึ้นอันส่งผลเสียในระยะยาวเมื่อเข้าสู่สูงอายุ

ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่ระดับนานาชาติ

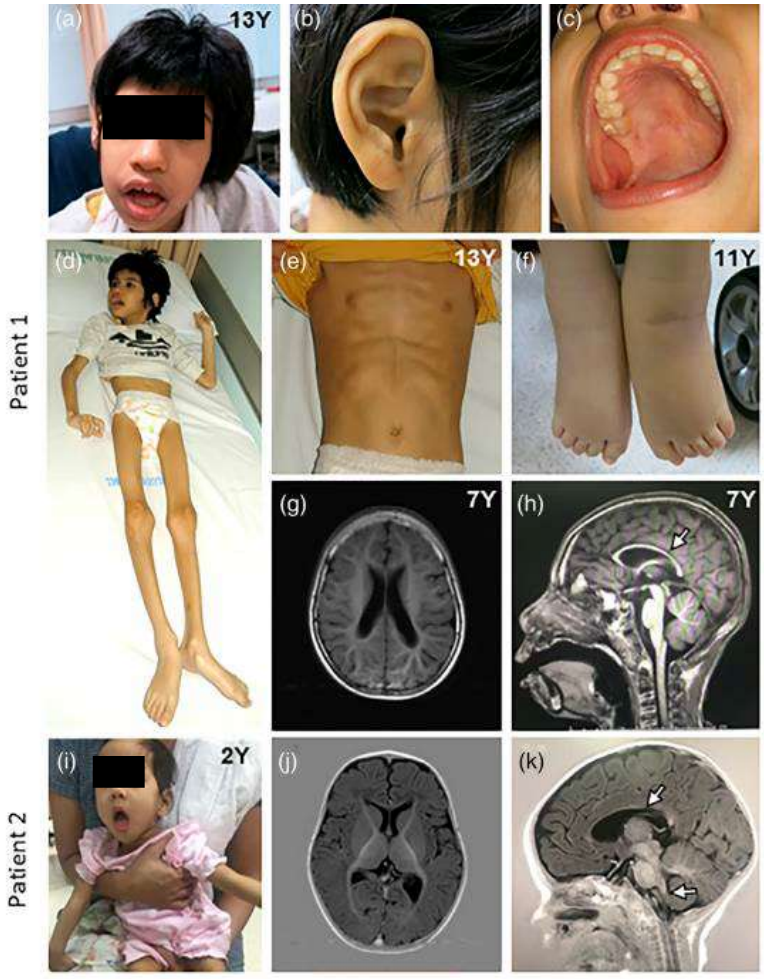
Kanchanasevee C, Sriwattanapong K, Theerapanon T, Thaweesapphithak S, Chetruengchai W, Porntaveetus T*, Shotelersuk V. 2020. Phenotypic and genotypic features of Thai patients with nonsyndromic tooth agenesis and WNT10A variants. Front Physiol. 11: 573214.

4.4 โครงสร้างใบหน้าและช่องปากกับภาวะทางสมองที่ผิดปกติ

Hypomyelinating leukodystrophy 10 (HLD10) เป็นโรคที่เกี่ยวกับยีนด้อย ทำให้ผู้ป่วยมีปัญหาทางสมอง กะโหลกศีรษะเล็ก เคลื่อนไหวไม่สะดวก ซึ่งเกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ในยีนที่สร้างเอนไซม์ในไมโตคอนเดรียในกระบวนการสังเคราะห์โปรลีน ในปัจจุบันมีผู้ป่วยที่เป็นโรคนี้ยังไม่มีการรายงานในประเทศไทย ทำให้ขาดความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับสาเหตุ และลักษณะทางช่องปากและฟันของผู้ป่วย โดยผู้ป่วยถูกส่งตัวมาจาก โรงพยาบาลธรรมศาสตร์ และตรวจพบที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์สภากาชาดไทย

ผู้ป่วยรายที่หนึ่ง มีพัฒนาการช้า พบมีภาวะชัก มีการกระตุกของลำตัวบ่อยครั้ง จากการตรวจร่างกายพบว่ากล้ามเนื้ออ่อนแรงอย่างรุนแรง และมีรีเฟล็กซ์มากกว่าปกติ จากการสแกนสมองพบว่า การสร้างมัยยีลินในสมองไม่ปกติ มีการสูญเสียเนื้อสมองอย่างมาก การตรวจคลื่นไฟฟ้าในสมอง แสดงให้เห็นถึงภาวะ multifocal epileptic disorder

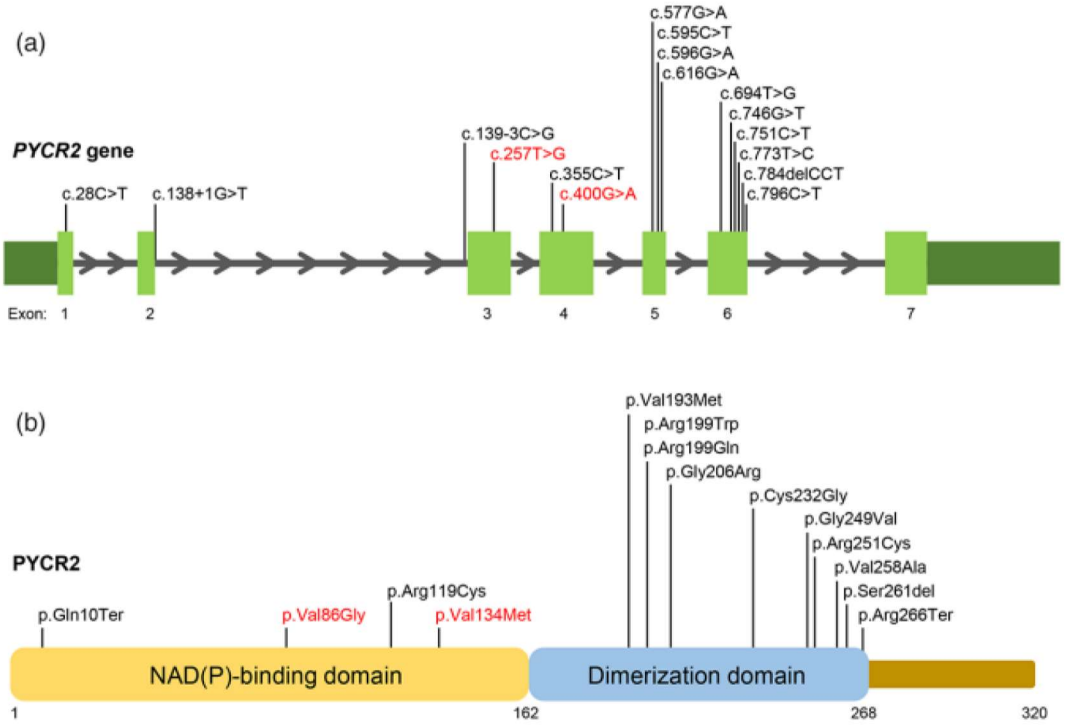
ผู้ป่วยรายที่สอง ไม่สามารถทานอาหารได้ มีภาวะพัฒนาการช้า ศีรษะเล็ก ใบหน้าผิดรูป ไม่สามารถหยิบจับสิ่งของได้ และกล้ามเนื้ออ่อนแรง การสแกนสมองพบมัยยีลินลดน้อยลง และก้านสมองเล็ก (รูปที่ 39)



รูปที่ 39 ลักษณะทางคลินิกและภาพถ่ายรังสีของผู้ป่วยที่มีกล้ามเนื้ออ่อนแรงและความผิดปกติทางสมอง (a–e) ผู้ป่วยรายที่หนึ่ง แสดงลักษณะโครงสร้างใบหน้าและช่องปากที่ผิดปกติ มีผมหนา ริมฝีปากโอม หูมีขนาดใหญ่ และเพดานปากสูง (f) ขาบวม (g, h) T2 weighted images (T2WI) ของสมองแสดงถึงการไม่สมบูรณ์ของมัยยีลิน การสูญเสียเนื้อสมอง และ corpus callosum มีขนาดเล็ก (i - k) ผู้ป่วยรายที่สองมีศีรษะขนาดเล็ก การสแกนสมองแสดงให้เห็นถึงการสูญเสียมัยยีลิน

จากการวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของสารพันธุกรรม พบว่าผู้ป่วยรายที่หนึ่งมีการกลายพันธุ์แบบ novel compound heterozygous variants ในยีน PYCR2 ประกอบด้วย c.400G>A, p.Val134Met และ a novel missense variant c.257T>G, p.Val86Gly ผู้ป่วยรายที่สองมีการกลายพันธุ์แบบ homozygous missense variant, c.400G>A, p.Val134Met ในยีน PYCR2 ซึ่งการกลายพันธุ์ทั้งสองนี้ไม่พบในฐานข้อมูลนานาชาติ แสดงให้เห็นว่าเป็นการกลายพันธุ์ใหม่ โดยตำแหน่งของการกลายพันธุ์อยู่ในตำแหน่งที่ใช้จับกับโปรตีนอื่นและเป็นตำแหน่งที่สำคัญ จากการวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศพบว่าเป็นการกลายพันธุ์ที่ส่งผลรุนแรง และเป็นสาเหตุของความผิดปกติ Hypomyelinating leukodystrophy 10

เนื่องจากผู้ป่วยทั้งสองรายซึ่งเป็นผู้ป่วยสองคนแรกในประเทศไทย มีการกลายพันธุ์ในตำแหน่งที่คล้ายคลึงกัน จากการวิเคราะห์เพิ่มเติมทางพันธุกรรมด้วย Microarray genotyping ใช้ Infinium OmniZhongHua-8 Kit พบว่าผู้ป่วยทั้งสองรายมีส่วนที่ทับซ้อนกันของสารพันธุกรรม แสดงให้เห็นว่ามีความเกี่ยวข้องกันทางบรรพบุรุษ โดยคาดว่า การกลายพันธุ์นี้เกิดขึ้นเมื่อประมาณห้าสิบแปดรุ่นหรือประมาณหนึ่งพันสี่ร้อยห้าสิบปีที่แล้ว (รูปที่ 40)



รูปที่ 40 รูปภาพแสดงโครงสร้างลักษณะยีนและโปรตีน PYCR2 และตำแหน่งที่มีการกลายพันธุ์

โดยสรุปงานวิจัยนี้เป็นการรายงานผู้ป่วยไทยสองรายแรกที่การกลายพันธุ์ในยีน PYCR2 และทำให้เกิดโรค HLD10 เป็นการขยายความเข้าใจทางจีโนไทป์และฟีโนไทป์และแสดงให้เห็นว่าการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง c.400G>A เป็นตำแหน่งที่พบจำเพาะเจาะจงในคนไทย ดังนั้น ความรู้จากการศึกษาในสองเคสผู้ป่วยนี้จะเป็นแนวทางในการรักษาและดูแลผู้ป่วยไทย ที่มีภาวะบกพร่องชองมัยยีลินในสมอง และความผิดปกติของโครงสร้างใบหน้าช่องปากและฟันต่อไป เพื่อลดความพิการถาวรในผู้สูงอายุ

<u>ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่ระดับนานาชาติ</u>

Manaspon C, Boonsimma P, Phokaew C, Theerapanon T, Sriwattanapong K, Porntaveetus T*, Shotelersuk V. Expanding the genotypic spectrum of PYCR2 and a common ancestry in Thai patients with hypomyelinating leukodystrophy 10. Am J Med Genet A. 2021. doi: 10.1002/ajmg.a.62365.

4.5 ผลงานวิจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับช่องปากและฟันและภาวะทางพันธุกรรมที่เผยแพร่ในระดับนานาชาติ

- Sriwattanapong K, Rojnueangnit K, Theerapanon T, Srichomthong C, Porntaveetus T*, Shotelersuk V. 2021. Compound heterozygosity for a novel frameshift variant causing fatal infantile liver failure and genotype-phenotype correlation of POLG c.3286C>T variant. Int J Neonatal Screen. 7: 9.

การศึกษาโรคทางเมแทบอลิซึมที่มีผลต่อภูมิคุ้มกันร่างกาย มีรายงานชัดเจนถึงความแปรปรวนในยีน POLG ว่าเป็นสาเหตุสำคัญของกลุ่มโรคไมโทคอนเดรีย ซึ่งในปัจจุบันยังไม่มีการรักษาที่แน่ชัด การตรวจคัดกรองก่อนคลอดและการตรวจทารกแรกเกิดมีศักยภาพในการปรับปรุงผลลัพธ์ทางคลินิกของผู้ป่วยที่ได้รับผลกระทบจากความผิดปกติทางไมโทคอนเดรีย ทีมวิจัยให้การดูแลและศึกษาผู้ป่วยอายุ 4 เดือน ที่มีพัฒนาการล่าช้า มีไข้ และท้องเสีย ภายในสองสัปดาห์หลังเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลผู้ป่วยมีอาการตับวายและเสียชีวิตฉับพลัน การตรวจทางพยาธิวิทยาเนื้อตับแสดงให้เห็นถึงการสูญเสียของเซลล์ตับและการแพร่กระจายของท่อน้ำดีอย่างกว้างขวาง การตรวจเอ็กโซมซีเควนซิงผู้ป่วยและบิดา มารดา ระบุว่าผู้ป่วยมี การกลายพันธุ์แบบ compound heterozygous frameshift mutation ประกอบด้วย c.3102delG, p.Lys1035Serfs*59 ที่เป็นการกลายพันธุ์แบบใหม่ และ c.3286C> T, p.Arg1096Cys ในยีน POLG (NM_002693.3) ที่สืบทอดมาจากบิดาและมารดาตามลำดับ จากการตรวจคัดกรองทางพันธุกรรมก่อนคลอดด้วยเอ็กโซมซีเควนซิงอย่างรวดเร็ว พบว่าบุตรคนถัดมาเป็นพาหะ หรือ มีรหัสพันธุกรรมแบบ heterozygous c.3286C> T นอกจากนี้ ยังทำการตรวจการตั้งครรภ์บุตรคนถัดไป และพบว่าทารกมีอัลลีลปกติ ซึ่งปัจจุบันเด็กทั้งสองมีสุขภาพแข็งแรง งานวิจัยได้สืบค้นพบว่ามีผู้ป่วยที่รายงานมาก่อนหน้าอีก 34 รายที่มีตัวแปร c.3286C> T ในยีน POLG และพบว่ามี 15 รายที่เป็น compound heterozygous variants โดยผู้ป่วยเป็นรายที่มี variant ที่รุนแรงที่สุด เป็นผู้ป่วยที่เริ่มมีอาการของโรคอายุน้อยที่สุด มีการดำเนินของโรคที่รุนแรงอย่างรวดเร็ว และทำให้เสียชีวิตที่อายุน้อยที่สุด นอกจากนี้จากการรวบรวมข้อมูล พบว่าทุกรายที่เป็น homozygous variants เริ่มมีอาการของโรคก่อนอายุ 2 ขวบและมีอาการชัก ดังนั้น การศึกษานี้รายงานการกลายพันธุ์ของยีน POLG แบบใหม่ เป็นการขยายสเปกตรัมของยีนและโรคทางพันธุกรรม แสดงให้เห็นถึงความสำเร็จในการใช้เอ็กโซมซีเควนซิงสำหรับการตรวจคัดกรองความผิดปกติที่เกี่ยวข้องกับโรคทางไมโทคอนเดรียก่อนคลอดและทารกแรกเกิด และแสดงความสัมพันธ์ของจีโนไทป์และฟีโนไทป์ของรหัสพันธุกรรม c.3286C> T และที่สำคัญเป็นการแสดงให้เห็นว่าการตรวจพบการกลายพันธุ์แบบยีนด้อยในผู้ป่วยกลุ่มนี้ ควรได้รับการเฝ้าระวังและให้การพยากรณ์โรคเพื่อป้องกันการเสียชีวิตฉับพลันในตัวผู้ป่วยและป้องกันการเกิดความผิดปกติซ้ำในครอบครัว

- Rojnueangnit K, Maneechai P, Thaweekul P, Piriyanon P, Khositseth S, Ittiwut C, Chetruengchai W, Kamolvisit W, Theerapanon T, Suphapeetiporn K, Porntaveetus T*, Shotelersuk V. 2020.

Expanding phenotypic and mutational spectra of mitochondrial HMG-CoA synthase deficiency. Eur J Med Genet. 63: 104086.

โรคไมโตคอนเดรียที่มีการขาดของเอนไซม์ HMG-CoA synthase หรือ Mitochondrial 3-hydroxy-3 methylglutaryl-CoA synthase-2 deficiency (HMGCS2D) เป็นโรคที่เกิดจากความผิดปกติของกระบวนการเกิดคีโตเจเนซิสในตับ ซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์แบบด้อยในยีน HMGCS2 เนื่องจากอาการทางคลินิกและทางห้องปฏิบัติการมีลักษณะคล้ายกับความผิดปกติของการเผาผลาญอื่นๆ การวินิจฉัยที่ชัดเจนของโรค HMGCS2D จึงเป็นความท้าทายซึ่งมักต้องได้รับการทดสอบระดับโมเลกุล ก่อนหน้านี้มีผู้ป่วยเพียง 26 รายที่มีการกลายพันธุ์ของยีน HMGCS2 งานวิจัยนี้ทำการศึกษาผู้ป่วย 2 รายแรกในไทย เป็นชายอายุ 9 เดือนและหญิงอายุ 8 เดือนที่มีอาการ HMGCS2D โดยในช่วงที่มีอาการเฉียบพลันพบภาวะอุจจาระมีไขมันออกมาก (steatorrhea) และไขมันในเลือดผิดปกติ (dyslipidemia) พบระดับไตรกลีเซอไรด์ในซีรัมเพิ่มขึ้น ไลโปโปรตีนความหนาแน่นต่ำมาก (VLDL) ไลโปโปรตีนความหนาแน่นต่ำ (LDL) และระดับ HDL ในซีรัมลดลง ผู้ป่วยทั้งสองรายมีภาวะสมองเสื่อม ฟอสเฟตต่ำ และผู้ป่วยหญิงมีภาวะเลือดเป็นกรด โดยไม่มีภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำ จากการวิเคราะห์เอ็กโซมทั้งหมด เปิดเผยการกลายพันธุ์ของ HMGCS2 โดยผู้ป่วยชายเป็น c.1480C>T (p.Arg494 *) และ c.1502G>C (p.Arg501Pro) ขณะที่ผู้ป่วยหญิงมี c.1502G>C (p.Arg501Pro) และ c.520T>C (p.Phe174Leu) ที่น่าสนใจคือ c.1502G>C (p.Arg501Pro) ที่ไม่เพียงแต่พบในผู้ป่วยทั้งสองรายของเราเท่านั้น แต่ยังตรวจพบ heterozygous ใน 9 รายจาก 1081 รายที่ไม่เกี่ยวข้องกัน (ความถี่อัลลีล 9/2162; 0.42%) ในฐานข้อมูลเอ็กโซมไทย การค้นพบการกลายพันธุ์ที่พบบ่อยนี้ชี้ให้เห็นว่าอาจมีทารกประมาณ 14 คนที่มี HMGCS2D ในเด็กแรกเกิดในประเทศไทย 800,000 คนต่อปี ดังนั้นจึงควรสร้างความตระหนักเรื่อง HMGCS2D ให้กับบุคลากรทางการแพทย์ในประเทศไทย และควรให้การป้องกันก่อนที่จะเกิดความผิดปกติของเอนไซม์จนทำให้เกิดความพิการถาวร

- Manaspon C, Jongwannasiri C, Chumprasert S, Sa-Ard-Iam N, Mahanonda R, Pavasant P, Porntaveetus T, Osathanon T. Human dental pulp stem cell responses to different dental pulp capping materials. 2021. BMC Oral Health. 21:209.

การรักษาความมีชีวิตของประสาทฟัน มีความสำคัญอย่างยิ่งในการคงอยู่ของฟันจนกระทั่งเข้าสู่วัยผู้สูงอายุ การใช้วัสดุปิดโพรงประสาทฟัน ในกรณีที่มีการทะลุโพรงประสาทฟันจะทำให้เกิดการสร้างเนื้อฟันและปกป้องมีชีวิตของฟันดั งนั้นการศึกษานี้จึงทำการเปรียบเทียบผลของวัสดุทางทันตกรรม 4 ชนิดที่จะช่วยรักษาความมีชีวิตของฟันให้คงอยู่ ได้แก่ DyCal®, ProRoot® MTA, Biodentine™, และ TheraCal™ LC ในห้องปฏิบัติการโดยการศึกษาในเซลล์ที่ได้มาจากประสาทฟัน และทำการเลี้ยงทดสอบความเป็นพิษ ความสามารถในการแบ่งตัว การขยายจำนวน รวมถึงความสามารถในการสร้างเนื้อเยื่อแข็ง โดยการวัดระดับเอนไซม์ และวัดระดับอาร์เอ็นเอ ผลการศึกษาพบว่า ProRoot® MTA and Biodentine™ มีความเป็นพิษน้อยกว่า DyCal® และTheraCal™ LC.

เซลล์ประสาทฟันสามารถแบ่งเพิ่มจำนวนได้และสามารถยึดเกาะได้ดีเมื่อเลี้ยงในสารละลายของวัสดุ ProRoot® MTA and Biodentine™ โดยพบว่าเซลล์ที่เลี้ยงในสารละลายของ DyCal® และ TheraCal™ มีการลดลงของการเคลื่อนที่ของเซลล์ นอกจากนี้ยังพบว่า ProRoot® MTA และ Biodentine™เพิ่มประสิทธิภาพในการสร้างเนื้อเยื่อแข็งของเซลล์ได้ โดยสรุปการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงความเข้ากันทางชีววิทยา และความสามารถในการกระตุ้นทางชีวโมเลกุล ของ ProRoot® MTA และ Biodentine™ ต่อเซลล์ประสาทฟัน ที่เหนือกว่า DyCal® และ TheraCal™ ผลการศึกษาจึงเป็นประโยชน์ต่อการคัดเลือกวัสดุทางทันตกรรมที่ใช้ในการรักษาความมีชีวิตของประสาทฟัน เพื่อรักษาความมีชีวิตของฟัน ให้สามารถใช้งานและบดเคี้ยวได้อย่างมีประสิทธิภาพจนกระทั่งเข้าสู่วัยสูงอายุ

- Faruangsaeng T, Thaweesapphitak S, Boonchoo K, Porntaveetus T*. 2021. Gene expression in human dental pulp cells of mandibular second premolar teeth. Proceedings of RSU Research Conference. 330-341.

ยีนและสัญญาณการควบคุมการทำงานของฟันเป็นสิ่งที่มีความจำเป็นในการทำหน้าที่ของฟัน เซลล์ฟันมีความสามารถหลากหลาย สามารถเพิ่มจำนวนได้มหาศาล และเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติไปสร้างเนื้อเยื่อทดแทน ไม่ว่าจะเป็นเนื้อเยื่อฟัน สมอง กระดูกและผิวหนัง ดังนั้นการศึกษานี้ทำการวิจัยเซลล์ประสาทฟันจากฟันกรามน้อยในมนุษย์ โดยใช้เทคนิคทรานสคริปโตม ผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่า มีการแสดงออกของยีนและสัญญาณที่เกี่ยวข้องการทำหน้าที่ของฟันมากกว่า 17,986 ยีน โดย FN1, COL1A2, ACTB, COL1A1, EEF1A1 เป็นยีนที่แสดงออกสูงสุด และสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างภายนอกเซลล์เป็นสัญญาณที่สำคัญ อีกทั้งยังพบว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างฟัน ได้แก่ BMP2, BMP4, MSX1, MSX2, TBX2 ยังพบในเซลล์ประสาทฟันของผู้ใหญ่ แสดงให้เห็นถึงการคงอยู่ของวิวัฒนาการและความสำคัญของยีนเหล่านี้ตั้งแต่การสร้างฟันจนกระทั่งฟันทำหน้าที่สมบูรณ์ และอาจคงอยู่จนถึงวัยผู้สูงอายุ ดังนั้นการศึกษานี้ เป็นการสร้างองค์ความรู้ใหม่ทางชีวโมเลกุลของฟันผู้ใหญ่และอาจนำไปสู่การคงสภาพยีนและอาร์เอ็นเอเพื่อรักษาความมีชีวิตและความสามารถในการทำหน้าที่ของฟันจนถึงวัยสูงอายุ

[ผลงานแสดงในภาคผนวก]

4.6 ระบบสุขภาพ เพื่อส่งต่อผู้ป่วยที่มีความพิการทางช่องปากและฟัน

4.6.1 การส่งต่อผู้ป่วยผ่านมาตรวจทางพันธุกรรมที่ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางเวชพันธุศาสตร์และการแพทย์แม่นยำและหน่วยปฏิบัติการวิจัยทางจีโนมิกส์และทันตกรรมแม่นยำ

ระบบการส่งตัวและข้อมูลต่างๆอยู่ในหน้าเว็บไซต์ของศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทาง ในกรณีที่ผู้ป่วยมีปัญหาทาง oral-dental disability แพทย์ผู้ส่งสามารถระบุรายละเอียดผู้ป่วย และปัญหาที่ต้องการได้รับ การวิเคราะห์ได้ทาง

ช่องทาง dental genetics test บนเว็บไซต์ (http://medicalgenomics.md.chula.ac.th/) และมีรายละเอียดดังนี้

คู่มือการปฏิบัติงานการส่งตรวจพันธุศาสตร์

1. วัตถุประสงค์

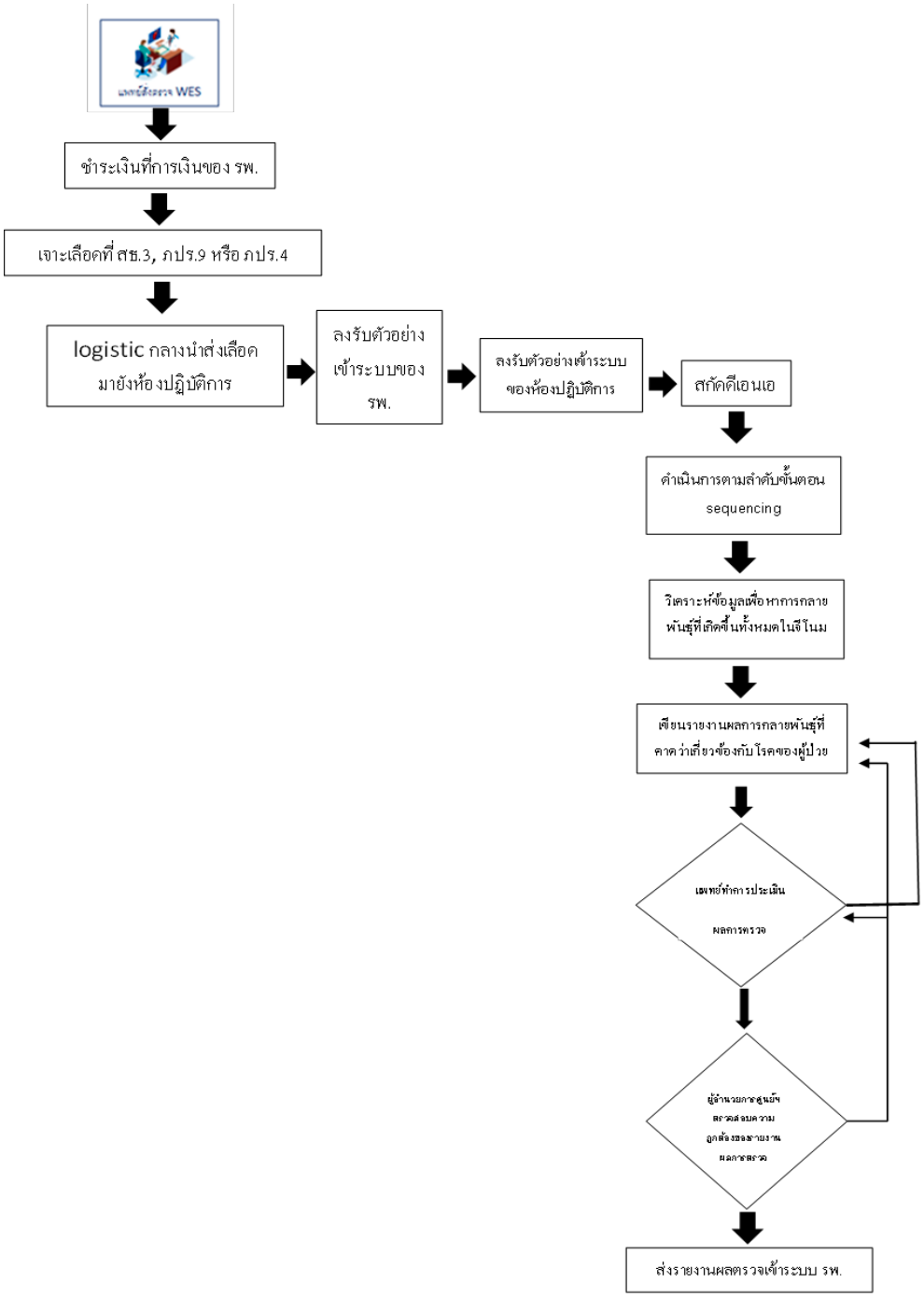
เพื่อใช้เป็นแนวทางในการปฏิบัติงานที่เป็นมาตรฐานเดียวกัน ผู้ปฏิบัติงานสามารถใช้เป็นเอกสารอ้างอิงในการทำงาน ทราบว่าควรปฏิบัติงานอย่างไร เป็นประโยชน์ในการติดตามงานได้ทุกขั้นตอน ลดความผิดพลาดในการทำงาน

2. รายละเอียดและขั้นตอนการปฏิบัติงาน

	กระบวนการ	ระยะเวลา	ตัวชี้วัดคุณภาพงาน
1	แพทย์สั่งตรวจผ่านระบบออนไลน์ของ รพ. และแนบแบบฟอร์มการส่งตรวจ พร้อมลายเซ็นผู้ป่วยในการยินยอมให้ตรวจ	วันที่ตรวจ 30 นาที	- เลือกรหัสตรวจถูกต้อง - เอกสารครบถ้วน
2	ผู้ป่วยดำเนินการชำระเงินตามเคาน์เตอร์การเงินของ	30 นาที	ชำระเงินถูกต้องตามรหัสตรวจและสิทธิเบิกจ่ายของผู้ป่วย
3	ผู้ป่วยเจาะเลือดปริมาตร 3 มิลลิลิตร บรรจุในหลอด EDTA (จุกสีม่วง) จำนวน 1 หลอด	1 ชั่วโมง	บรรจุหลอดเลือดถูกต้องและได้ปริมาณคุณภาพเลือดตามที่ต้องการ
4	นำส่งเลือดมายังห้องปฏิบัติการโดยหน่วยงานกลางของ รพ.	2 ชั่วโมง	นำส่งถูกห้องปฏิบัติการ และตัวอย่างอยู่ในสภาพดี
5	ลงรับตัวอย่างเข้าระบบ รพ. โดยใช้ HN และรหัสการตรวจที่แพทย์เป็นผู้สั่งตรวจ	30 นาที	ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยและชนิดการตรวจถูกต้อง
6	ลงรับตัวอย่างเข้าระบบของห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์	1 วัน	ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยและชนิดการตรวจถูกต้อง
7	สกัดดีเอนเอด้วยเครื่อง Chemagic 360	3 วัน	ดีเอนเอมีคุณภาพดี (A260/A280 ratio of 1.7–2.0)
8	เตรียมตัวอย่างและดำเนินการซีเควนซ์ซิ่ง ตามขั้นตอนที่ผู้ผลิตเครื่องแนะนำ	2 เดือน	จำนวนข้อมูลลำดับเบส raw data (fastq file) ต้องมีจำนวนลำดับเบสประมาณ 100X ของ exome targeted bases และคุณภาพของลำดับเบส ที่ Q30 ต้องไม่น้อยกว่า 85% ของลำดับเบสทั้งหมด

9	วิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบส raw data (fastq file) ให้เป็นข้อมูล DNA variant (vcf file)	1 วัน	ข้อมูล DNA variants ที่ได้ต้องมีค่า coverage อย่างน้อย 10X และครอบคลุมไม่น้อยกว่า 90% ของ exome targeted bases
10	วิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหาการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นทั้งหมดในจีโนม	2 วัน	การกลายพันธุ์ของยีนที่รายงานทั้งหมดผ่านการกรองด้วย 5 ข้อ*
11	ทบทวนบทความทางวิทยาศาสตร์ทั้งหมดที่เกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ที่พบและอาจเกี่ยวข้องกับโรคในผู้ป่วยแต่ละคน	7 วัน	บทความทางวิทยาศาสตร์ที่นำมาอ้างอิงต้องอยู่ในระดับนานาชาติ
12	เขียนรายงานผลการกลายพันธุ์ที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับโรคของผู้ป่วย	1 วัน	1. ระบุตัวตนถูกต้อง 2. ข้อมูลของยีนที่รายงานถูกต้องตามระบบสากล HGVS 3. รายงานผลตามมาตรฐาน ACMG guidelines
13	แพทย์ทำการประเมินผลการกลายพันธุ์กับลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยและตรวจสอบ	7 วัน	1. ระบุตัวตนถูกต้อง 2. ข้อมูลของยีนที่รายงานถูกต้องตามระบบสากล HGVS 3. รายงานผลตามมาตรฐาน ACMG guidelines
14	ผู้อำนวยการศูนย์ฯตรวจสอบความถูกต้องของรายงานผลการตรวจ	7 วัน	1. ระบุตัวตนถูกต้อง 2. ข้อมูลของยีนที่รายงานถูกต้องตามระบบสากล HGVS 3. รายงานผลตามมาตรฐาน ACMG guidelines
15	ส่งรายงานผลตรวจเข้าระบบ รพ. จุฬาฯ แบบปกปิด (เฉพาะแพทย์ผู้ส่งตรวจดูผลได้)	1 วัน	มาตรฐานตาม SOP ระบบ IT ของ รพ.

3. **แผนภูมิการทำงาน**



4.6.2 การส่งต่อผู้ป่วย และตรวจพันธุกรรมทางเครือข่าย Thailand's Rare & Undiagnosed Disease Network (T-RUN)

จัดตั้งคณะทำงาน และเครือข่ายโรคหายาก Thailand's Rare & Undiagnosed Disease Network (T-RUN) และแผนปฏิบัติการ บูรณาการจีโนมิกส์ประเทศไทย ภายใต้ยุทธศาสตร์ชาติ พ.ศ. 2563-2567 ด้านการ

สร้างความสามารถในการแข่งขัน ระบุว่าอุตสาหกรรมและบริการการแพทย์ครบวงจรเป็นหนึ่งในอุตสาหกรรมแห่งอนาคตที่ประเทศไทยจะต้องพร้อมรับมือและสร้างโอกาสจากความท้าทายที่เกิดขึ้น ที่เป็นผลของการหลอมเทคโนโลยี่ดิจิทัล เทคโนโลยีชีวภาพ และเทคโนโลยีทางกายภาพเข้าด้วยกัน และยังต้องสั่งสมความเชี่ยวชาญด้านบริการทางการแพทย์ด้วยนวัตกรรมของไทย เพื่อรองรับความต้องการใช้บริการทางการแพทย์ที่เพิ่มมากขึ้นจากสังคมผู้สูงอายุและความต้องการการแพทย์ที่เพิ่มขึ้นทั้งในประเทศและต่างประเทศเพื่อไปสู่การเป็นผู้นำทางศูนย์กลางอุตสาหกรรมและบริการทางการแพทย์ ภายใต้ยุทธศาสตร์ความเชี่ยวชาญขั้นสูงของการบริการทางการแพทย์นวัตกรรมครอบคลุมถึงการแพทย์แม่นยำ การแพทย์จีโนมิกส์ โดยมุ่งเป้า เพื่อให้การดูแลรักษาสุขภาพของประชาชนดีขึ้นลดภาวะแทรกซ้อนของการเจ็บป่วยป้องกันการเสียชีวิตก่อนเวลาอันควร และลดค่าใช้จ่ายในการรักษาที่ไม่แม่นยำ เพื่อชะลอความพิการที่จะกระทบต่อคุณภาพชีวิตของผู้สูงอายุ (รูปที่ 41, 42)

T-RUN CORE Team

อ.วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์ คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์สภากาชาดไทย

อ.ดวงฤดี วัฒนศิริชัยกุล คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี ม.มหิดล

อ.อัจฉรา เสถียรกิจการชัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ม.มหิดล

อ.พิมพ์ลักษณ์ เจริญขวัญ คณะแพทยศาสตร์ ม.เชียงใหม่

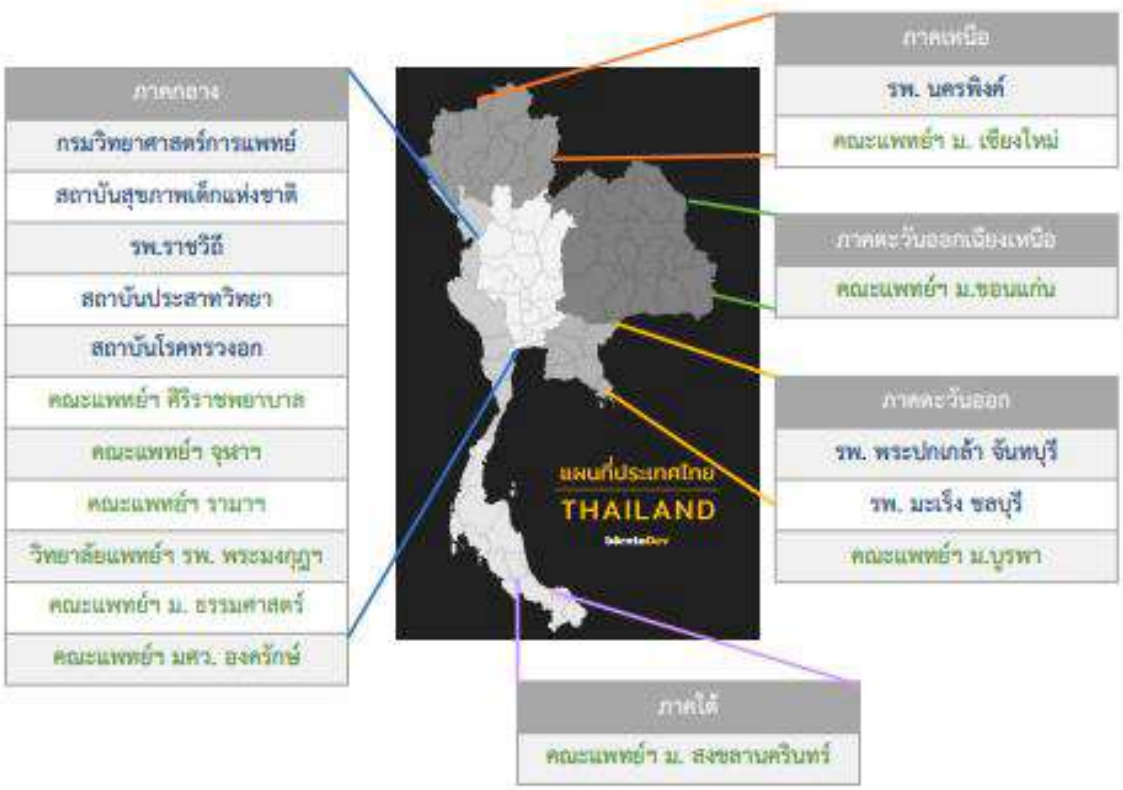
อ.กุณฑล วิชาจารย์ คณะแพทยศาสตร์ ม.ขอนแก่น

อ.กิติวรรณ โรจนเนืองนิตย์ คณะแพทยศาสตร์ ม.ธรรมศาสตร์

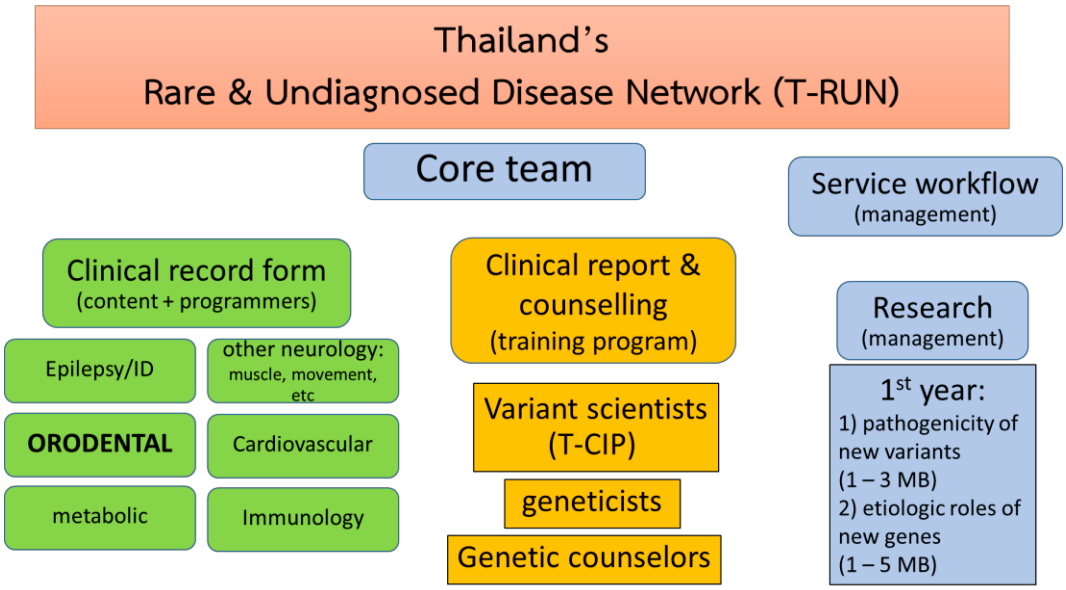
อ.จุฬาลักษณ์ คุปตานนท์ โรงพยาบาลเด็ก

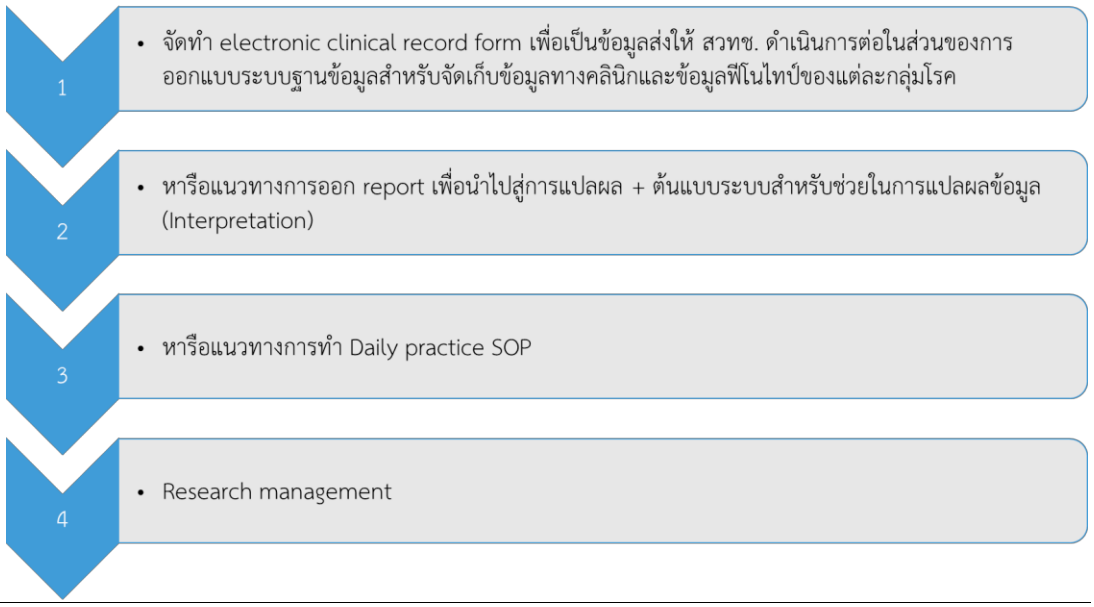
อ.บุญชัย บุญวัฒน์ โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า

อ.ฑัณฑริรา พรทวีทัศน์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลขานุการ



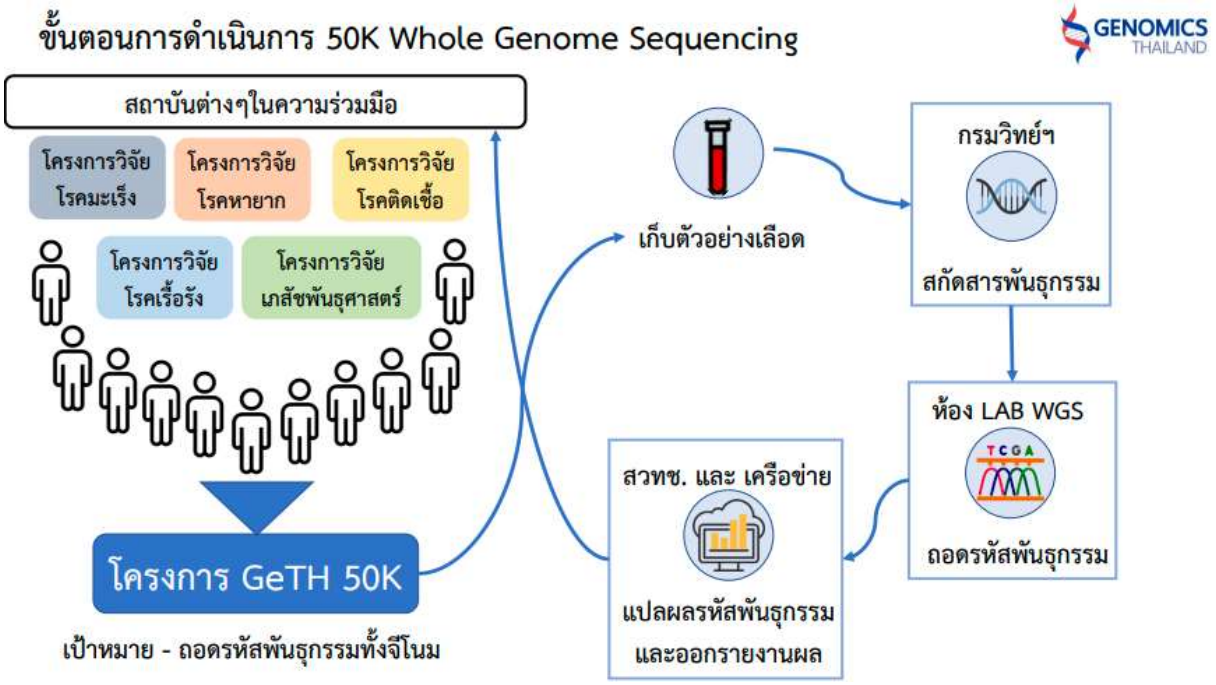
รูปที่ 41 แผนที่เครือข่าย ของ T-RUN และ จีโนมิกส์ประเทศไทย



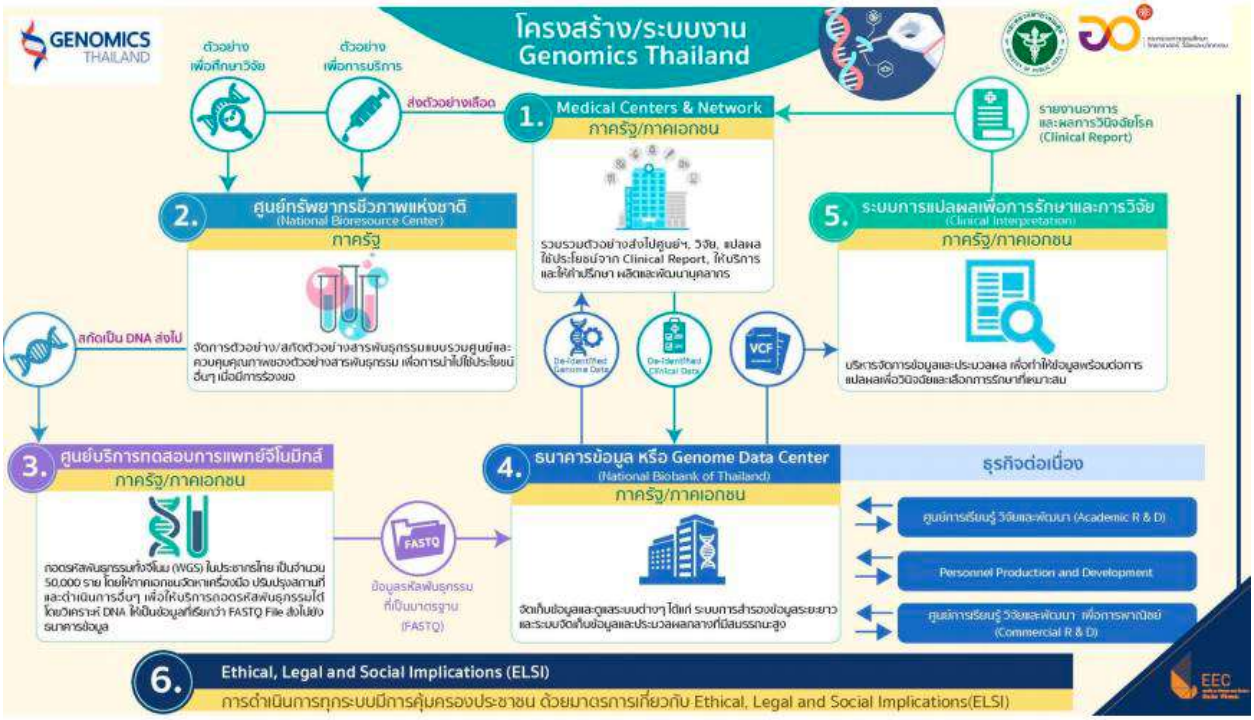


รูปที่ 42 โครงสร้างและแผนการทำงานของ T-RUN

โดยเครือข่ายในการส่งต่อผู้ป่วยที่มีมีความพิการทางช่องปากและฟัน (T-RUN) ในแง่การส่งต่อผู้ป่วยและการวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ลำดับเบสทั้งหมดจะผ่านโครงการจีโนมิกส์ประเทศไทย (รูปที่ 43, 44) ในแง่ของการวิเคราะห์พยาธิสภาพเชิงลึก และกระบวนการรักษา หรือการวิจัยที่มีความซับซ้อนที่ไม่อยู่ในโครงการจีโนมิกส์ประเทศไทย จะดำเนินการโดยคณะทีมผู้วิจัย

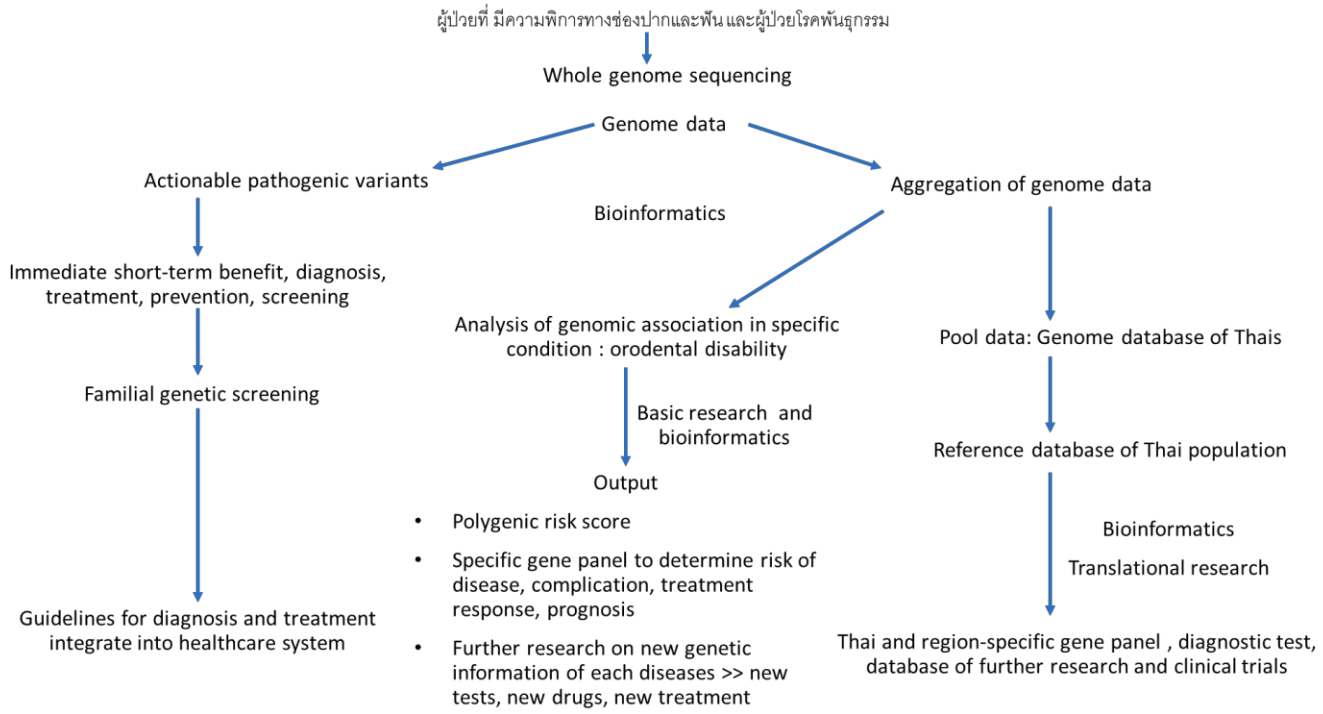


รูปที่ 43 ขั้นตอนการทำงานการตรวจทางจีโนมิกส์ของโครงการจีโนมิกส์ประเทศไทย

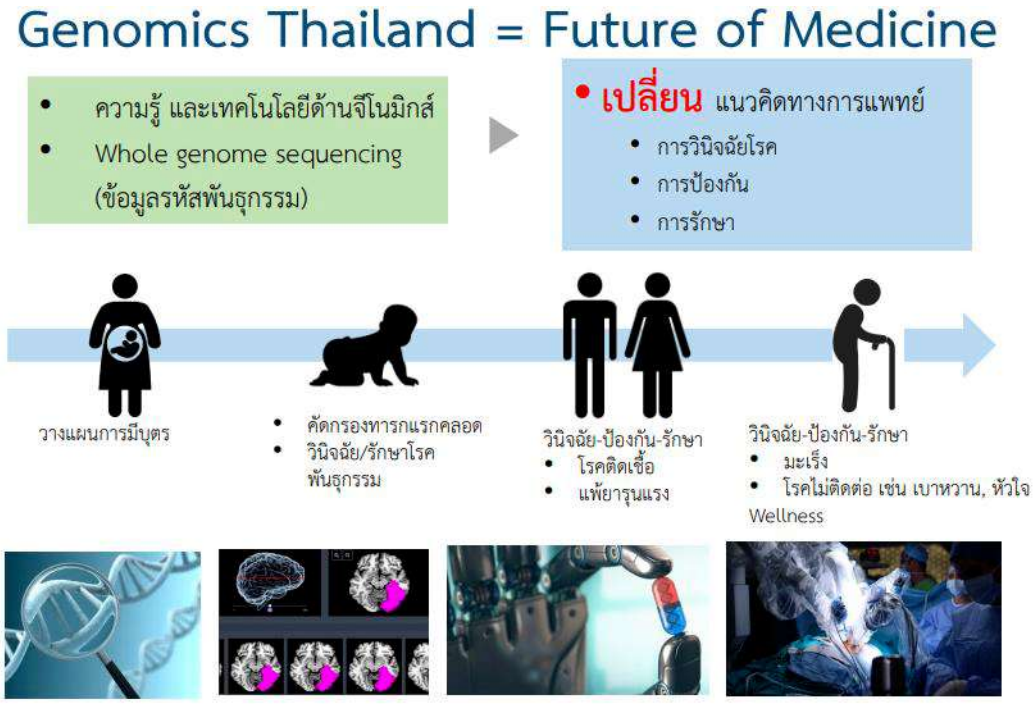


รูปที่ 44 รายละเอียดการทำงานของโครงการจีโนมิกส์ประเทศไทย

การแพทย์จีโนมิกส์มีการนำมาใช้อย่างกว้างขวาง ได้แก่ การตรวจทางพันธุกรรม การตรวจความเสี่ยงจากมะเร็งแบบถ่ายทอดทางพันธุกรรม การตรวจยีนมะเร็งเพื่อเลือกยารักษาแบบมุ่งเป้า การตรวจยีนเสี่ยงแพ้รุนแรง ซึ่งจะก่อให้เกิดประโยชน์สามด้านหลักได้แก่ 1. ด้านการแพทย์และสาธารณสุขเพื่อการดูแลรักษาสุขภาพของประชาชนให้ดีขึ้น ลดภาวะแทรกซ้อนการเจ็บป่วย ป้องกันการเสียชีวิตก่อนเวลาอันควร และลดค่าใช้จ่ายในการรักษาที่ไม่แม่นยำ 2. ด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมีเทคโนโลยีระดับสูงไว้บริการ 3. ด้านเศรษฐกิจและสังคมส่งเสริมอุตสาหกรรมการแพทย์ครบวงจรในประเทศ สร้างความเจริญทางเศรษฐกิจและเพิ่มตำแหน่งงานระดับผู้เชี่ยวชาญผู้ปฏิบัติงานรวมถึงผู้วิจัย โดยการจัดการ ประกอบด้วยมาตรการได้แก่ 1. การวิจัยและการประยุกต์ใช้ 2. การบริการ 3. การวิเคราะห์และจัดการข้อมูล 4. จริยธรรม กฎหมาย และการใช้ทางสังคม 5. การผลิตและพัฒนาบุคลากรและ 6. การส่งเสริมและพัฒนาอุตสาหกรรมใหม่เพื่อขับเคลื่อนแนวทางการพัฒนาการแพทย์จีโนมิกส์ในประเทศไทย (รูปที่ 45, 46)



รูปที่ 45 กระบวนการการทำงานด้านมาตรการต่างๆ สำหรับผู้ป่วยที่มีความพิการทางช่องปากและฟันผ่านโครงการจีโนมิกส์ประเทศไทย



รูปที่ 46 แผนภูมิแสดงประโยชน์ของการตรวจจีโนมิกส์ในประเทศไทย

4.7 แผนการพัฒนาบุคลากรด้านพันธุศาสตร์

จัดทำร่างหลักสูตรการฝึกอบรมการให้คำปรึกษาทางพันธุศาสตร์

จัดตั้งหลักสูตรการฝึกอบรมการให้คำปรึกษาทางพันธุศาสตร์ ด้วยความร่วมมือของภาคีสภาวิชาชีพด้านสุขภาพ พ.ศ. ๒๕๖๔ (Training Curriculum in Genetic Counseling) เป็นประกาศนียบัตรการให้คำปรึกษาทางพันธุศาสตร์ (Certificate of Genetic Counseling) โดยเป็นการทำงานร่วมกันระหว่าง สมาคมเวชพันธุศาสตร์และจีโนมิกซ์ทางการแพทย์ในกำกับดูแลของภาคีสภาวิชาชีพด้านสุขภาพ แพทยสภา ทันตแพทยสภา สภาเภสัชกรรม สภาการพยาบาล สภาเทคนิคการแพทย์

1. ชื่อหลักสูตร

(ภาษาไทย) หลักสูตรการฝึกอบรมการให้คำปรึกษาทางพันธุศาสตร์

(ภาษาอังกฤษ) Training Curriculum in Genetic Counseling

2. ชื่อประกาศนียบัตร

ชื่อเต็ม (ภาษาไทย) ประกาศนียบัตรการให้คำปรึกษาทางพันธุศาสตร์

ชื่อเต็ม (ภาษาอังกฤษ) Certificate of Genetic Counseling

ชื่อย่อ (ภาษาไทย) ป. การให้คำปรึกษาทางพันธุศาสตร์

ชื่อย่อ (ภาษาอังกฤษ) Cert. Genetic Counseling

3. หน่วยงานที่รับผิดชอบ

สมาคมเวชพันธุศาสตร์และจีโนมิกซ์ทางการแพทย์ในกำกับดูแลของภาคีสภาวิชาชีพด้านสุขภาพ

แพทยสภา

ทันตแพทยสภา

สภาเภสัชกรรม

สภาการพยาบาล

สภาเทคนิคการแพทย์

4. พันธกิจและวัตถุประสงค์ของหลักสูตร

พันธกิจ

เป็นการส่งเสริมการศึกษาต่อเนื่อง ในการประกอบวิชาชีพเวชกรรมของแพทย์ ใบอนุญาตเป็นผู้ประกอบวิชาชีพเภสัชกรรม ใบอนุญาตการประกอบวิชาชีพทันตกรรม ใบประกอบวิชาชีพการพยาบาล (ชั้น 1) และใบอนุญาตประกอบวิชาชีพเทคนิคการแพทย์ ด้านการให้คำปรึกษาแนะนำทางพันธุศาสตร์ให้แก่ผู้เข้ารับการอบรมที่ปฏิบัติงานในโรงพยาบาลทุกระดับให้มีสมรรถนะ สามารถเป็นผู้ให้คำปรึกษาแนะนำข้อมูลทางพันธุกรรม (Genetic Counselor) เบื้องต้น แก่กลุ่มเป้าหมาย คือ ผู้ป่วยและครอบครัว หญิงตั้งครรภ์และคู่สามีภรรยาที่ทารกในครรภ์มีความเสี่ยงในการเกิดโรคพันธุกรรม (Pregnant and Couple at risk) หรือ ชุมชน เพื่อประโยชน์ต่อ

การดูแลรักษาผู้ป่วย บุคคลในครอบครัว การวางแผนครอบครัวและชุมชน รวมถึงบุคลากรทางการแพทย์อื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องและส่งเสริมการนำเทคโนโลยีการตรวจทางพันธุกรรมและจีโนมซึ่งนำไปสู่การแพทย์แม่นยำ (Precision Medicine) มาใช้ให้เกิดประโยชน์อย่างสูงสุด ต่อระบบการรักษาพยาบาลและสาธารณสุขของประเทศ
เพื่อเป็นการส่งเสริมให้มีการฝึกอบรมหลักสูตรดังกล่าวได้อย่างแพร่หลายมากขึ้น จึงแบ่งการฝึกอบรมออกเป็น สอง Module ซึ่งจะเพิ่มความคล่องตัวในการบริหารเวลาในการฝึกอบรมแก่ผู้เข้าฝึกการอบรม

4.2 วัตถุประสงค์ของหลักสูตร เพื่อให้ผู้เข้าฝึกอบรมมีความรู้ความสามารถดังนี้

4.2.1 มีความรู้ ความเข้าใจและนำหลักการของมนุษย์พันธุศาสตร์ (Human Genetics) พันธุศาสตร์ทางคลินิก (Clinical Genetics) และเภสัชพันธุศาสตร์ (Pharmacogenomics) เบื้องต้นไปประยุกต์ใช้ในการวางแผนและให้คำปรึกษาทางพันธุศาสตร์ (Genetic Counseling) แก่กลุ่มเป้าหมาย ในระยะเวลา 16 อาทิตย์

4.2.2 สื่อสารและปฏิสัมพันธ์กับกลุ่มเป้าหมาย โดยบูรณาการกับความรู้เรื่องโรคหรือภาวะพันธุกรรมของผู้มารับคำปรึกษาหรือผู้ป่วย ให้เป็นคำปรึกษาแนะนำทางพันธุศาสตร์ (Genetic Counseling) ที่เหมาะสมและมีประสิทธิผลโดยมีการวางขั้นตอนและคำนึงถึงสภาวะทางจิตใจ สังคม วัฒนธรรมของผู้มารับคำปรึกษาหรือผู้ป่วย

4.2.3 เลือกใช้และแปลผลการทดสอบทางห้องปฏิบัติการการตรวจทางพันธุกรรมและจีโนม (Genetics and Genomic testing) เบื้องต้นได้ โดยเฉพาะในโรคพันธุกรรมที่พบบ่อย เช่น โรคโลหิตจางธาลัสซีเมีย (Thalassemia) โรคสติปัญญาบกพร่องในครอบครัว (Intellectual Disability) โรคกล้ามเนื้ออ่อนแรง (Muscular Dystrophy) ดาวน์ซินโดรม (Down Syndrome) หญิงตั้งครรภ์ที่มีความเสี่ยงเกิดโรคพันธุกรรมในทารก (Pregnancy at risk for genetic diseases) โรคมะเร็งพันธุกรรม (Cancer Genetic) การตรวจทางเภสัชพันธุศาสตร์ (Pharmacogenomics) เป็นต้น

4.2.4 บอกลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรม (Pattern of Inheritance) เช่น โรคถ่ายทอดแบบพันธุ์เด่น (Autosomal Dominant transmission) โรคถ่ายทอดแบบพันธุ์ด้อย (Autosomal Recessive transmission) ความเสี่ยงในการเกิดโรค (Probability) และเกิดโรคซ้ำของโรคพันธุกรรมนั้น ๆ รวมทั้งให้คำแนะนำที่ให้อิสระในการเลือก (Optional Counseling) วิธีการการตรวจเพิ่มเติม แนวทางการรักษา หรือการวางแผนการมีบุตรได้

4.2.5 ให้ข้อมูลพื้นฐานที่ถูกต้องเพื่อช่วยให้ผู้มารับการปรึกษาตัดสินใจเลือกข้อเสนอที่มีอยู่ได้อย่างเหมาะสมกับสภาวะและการดำเนินชีวิต (Facilitate decision making)

4.2.6 ให้คำแนะนำเบื้องต้นเกี่ยวกับแนวทางการรักษา การปฏิบัติตัวที่ถูกต้อง การป้องกันภาวะแทรกซ้อน (General care and prevention of complication) แก่ผู้ป่วยโรคพันธุกรรมและครอบครัว หญิงตั้งครรภ์และคู่สามีภรรยาที่ทารกในครรภ์มีความเสี่ยงในการเกิดโรคพันธุกรรม (Pregnant and Couple at risk) รวมทั้งชุมชนหรือบุคลากรทางการแพทย์รอบข้างได้

4.2.7 ส่งต่อผู้ป่วยไปยังผู้เชี่ยวชาญได้อย่างถูกต้องในกรณีที่มีข้อสงสัย

4.2.8 นำองค์ความรู้ในวารสารทางการแพทย์ที่เกี่ยวข้องกับเวชศาสตร์จีโนม นำไปวิเคราะห์เพื่อใช้ประโยชน์ต่อการเลือกใช้เทคโนโลยีการตรวจทางพันธุกรรมและจีโนมเพื่อประโยชน์ต่อการดูแลรักษาและการให้คำปรึกษาแนะนำแก่ผู้ป่วย บุคคลในครอบครัว การวางแผนครอบครัวและชุมชน รวมทั้งมีแนวทางการเก็บข้อมูลซึ่งจะนำมาสู่งานวิจัยจากงานที่ทำอยู่ (Evidence -based evaluation and Research planning)

5. ผลการเรียนรู้ของหลักสูตร

เมื่อสิ้นสุดการฝึกอบรมผู้เข้าอบรมต้องมีคุณสมบัติเป็นผู้ให้คำปรึกษาแนะนำทางพันธุศาสตร์ (Genetic Counselor) ที่มีประสิทธิภาพ และความรู้ความสามารถขั้นต่ำตามสมรรถนะดังต่อไปนี้

5.1 การดูแลรักษาผู้ป่วย (Patient care)

5.1.1 ซักประวัติการเจ็บป่วยและประวัติครอบครัว (Family history taking) โดยนำ ความรู้ทางเวชพันธุศาสตร์มาประยุกต์เพื่อให้เข้าถึงความเจ็บป่วย ความพิการ ที่เกิดขึ้นในครอบครัว ลำดับความเจ็บป่วยที่เกิดในคู่สมรส การแต่งงานกันในครอบครัว ลำดับพี่น้องในแต่ละรุ่น ตำแหน่ง และเพศ ได้อย่างถูกต้อง

5.1.2 บันทึกรายงานผู้ป่วยและเขียนพงศาวลี (Pedigree) ได้อย่างสมบูรณ์และถูกต้อง

5.1.3 รวบรวมปัญหาข้อมูล และวิเคราะห์ความผิดปกติทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้น ว่าตรงกับโรคใดหรือกลุ่มโรค รวมทั้งบอกลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรม (Pattern of Inheritance) เช่น โรคพันธุ์เด่น (Autosomal Dominant) พันธุ์ด้อย (Autosomal Recessive) ได้

5.1.4 บอกความเสี่ยงในการเกิดโรค (Probability) และอธิบายการเกิดโรคซ้ำของโรคพันธุกรรมนั้น ๆ ได้

5.1.5 ส่งตรวจหรือให้ข้อเสนอแนะในการส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการได้ถูกต้องและอย่างสมเหตุผล รวบรวมข้อมูลสำหรับนำมาคิดวิเคราะห์อย่างเป็นเหตุเป็นผลเพื่อนำไปสู่การวินิจฉัยโรค วางแผนให้การดูแลรักษาผู้ป่วยและครอบครัวอย่างเหมาะสม

5.1.6 ให้คำแนะนำที่ให้อิสระในการเลือก (Optional Counseling) วิธีการตรวจเพิ่มเติม การรักษา หรือการวางแผนการมีบุตรได้ โดยให้คำแนะนำปรึกษาเพื่อให้ผู้มารับการปรึกษาตัดสินใจเลือกข้อเสนอได้ (Facilitate decision making) รวมทั้งการส่งต่อหญิงตั้งครรภ์ไปยังสูติแพทย์ในกรณีที่เลือกยุติการตั้งครรภ์ (Termination of Pregnancy)

5.1.7 บอกหลักการป้องกันและลดความรุนแรงจากภาวะแทรกซ้อนของโรคแก่ผู้ป่วยและครอบครัว รวมทั้งหลักการการส่งต่อไปยังบุคลากรที่เหมาะสม

5.1.8 ให้คำปรึกษาทางเภสัชพันธุศาสตร์และการแพทย์แม่นยำได้อย่างถูกต้องและเหมาะสม

5.2 ความรู้และความสามารถในการนำความรู้ทางเวชพันธุศาสตร์ไปแก้ปัญหาของผู้ป่วยโรคพันธุกรรมและครอบครัว (Approach and solving genetics problems)

5.2.1 อธิบายวิทยาศาสตร์การแพทย์พื้นฐานที่เกี่ยวข้องกับมนุษย์พันธุศาสตร์ (Human Genetics) และหลักการใช้เทคโนโลยีทางพันธุศาสตร์และจีโนม(Genetics and Genomic technology for investigation and management) ได้

5.2.2 บอกลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรม (Pattern of Inheritance) เช่น โรคพันธ์เด่น (Autosomal Dominant) พันธ์ด้อย (Autosomal Recessive) ได้

5.2.3 บอกความเสี่ยงในการเกิดโรค (Probability) และอธิบายการเกิดโรคซ้ำของโรคพันธุกรรมได้

5.2.4 อธิบายการทดสอบสารทางพันธุกรรม (specimens for genetic testing) และการเลือกวิธีการทดสอบทางพันธุกรรมและจีโนม (Genetic and genomic testing) ได้

5.2.5 บอกขั้นตอนพัฒนาการของทารกในครรภ์ (Fetal Medicine) และ การตรวจสอบสารพันธุกรรมจากทารก (Fetal DNA sampling) เช่น chorionic villi sampling, fetal blood sampling

5.2.6 บอกเทคโนโลยีการเจริญพันธุ์ (Reproductive Technology and Assisted Reproductive Technology) ครอบคลุมการใช้เทคโนโลยีในการสืบพันธุ์ของมนุษย์ในปัจจุบันรวมถึงเทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์ การคุมกำเนิดและอื่น ๆ ที่ใช้เป็นส่วนใหญ่ได้

5.2.7 ให้คำปรึกษาแนะนำทางพันธุกรรม (Genetics Counseling) แก่ผู้มารับการปรึกษา
โดยใช้ทักษะการสื่อสารที่เหมาะสม

5.3 การเรียนรู้จากการปฏิบัติและการพัฒนาตนเอง (Practice-based Learning and Improvement)

5.3.1 จัดระบบการประเมินตนเอง การให้คำปรึกษาแนะนำทางพันธุกรรม (Genetics Counseling) จากผู้มารับบริการและผู้ร่วมงาน แล้วนำมาปรับปรุง พัฒนาการปฏิบัติงาน

5.3.2 วิพากษ์บทความและงานวิจัยทางการแพทย์ที่เกี่ยวข้อง กับการให้คำปรึกษาแนะนำทางพันธุกรรม (Genetics Counseling)

5.3.3 เรียนรู้และเพิ่มประสบการณ์ได้ด้วยตนเองจากการปฏิบัติของผู้ร่วมงาน

5.4 ทักษะปฏิสัมพันธ์และการสื่อสาร (Interpersonal and Communication Skills)

5.4.1 ให้คำปรึกษาแนะนำทางพันธุศาสตร์ที่ดีและเหมาะสม (Good Genetic Counselor) โดยใช้ทักษะในการทำความรู้จักกับผู้ป่วย/ครอบครัว และสื่อสารระหว่างการให้คำปรึกษาแนะนำทางพันธุกรรม (Relationship building and Therapeutic professional relationship / Genetic Counseling skill)

5.4.2 นำเสนอข้อมูลแก่ผู้ป่วยและอภิปรายปัญหากับผู้ป่วยและผู้ร่วมงาน (Providing Information and Facilitating the problems of patient skill)

5.4.3 ถ่ายทอดความรู้เกี่ยวกับโรคหรือปัญหาทางพันธุกรรมลักษณะการถ่ายทอด (Pattern of Inheritance) อัตราส่วนการเกิดความผิดปกติ (Probability) แก่ผู้ป่วยหรือผู้มารับการปรึกษา และบุคลากรทางการแพทย์ที่ร่วมงาน เช่น เจ้าหน้าที่สาธารณสุข พยาบาล นักศึกษาแพทย์ แพทย์ประจำบ้านให้เข้าใจได้

5.4.4 ทำงานเป็นทีมและมีมนุษย์สัมพันธ์ที่ดี

5.5 ความเป็นมืออาชีพ (Professionalism)

5.5.1 มีคุณธรรม จริยธรรมและเจตคติที่ดีต่อผู้ป่วย ครอบครัว ญาติ ผู้ร่วมงาน เพื่อนร่วมวิชาชีพและชุมชน

5.5.2 ปฏิบัติโดยใช้วิชาการเป็นพื้นฐาน สอดคล้องกับมาตรฐานวิชาชีพ

5.5.3 มีความสนใจใฝ่รู้และสามารถพัฒนาไปสู่ความเป็นผู้เรียนรู้ต่อเนื่องตลอดชีวิต (Continuous professional development)

5.6 การปฏิบัติงานให้เข้ากับระบบ (System-based practice)

5.6.1 อธิบายระบบสุขภาพและระบบยาของประเทศไทยที่เกี่ยวข้องกับการตรวจวินิจฉัยเพิ่มเติมทางพันธุกรรมและการใช้ยารักษาโรคพันธุกรรมได้

5.6.2 อธิบายสิทธิผู้ป่วย การส่งต่อผู้ป่วยและครอบครัวไปยังหน่วยบริการการแพทย์ที่เหมาะสมได้

5.6.3 อธิบายการใช้ทรัพยากรสุขภาพอย่างเหมาะสม (Cost Consciousness Medicine) ที่เกี่ยวกับการส่งตรวจทางพันธุกรรมที่ใช้เทคโนโลยีที่มีราคาแพง (High cost investigation)

5.6.4 ปรับเปลี่ยนการดูแลรักษาผู้ป่วยให้เข้ากับบริบทของการบริการสาธารณสุขได้ตามมาตรฐานวิชาชีพ

6. คุณสมบัติของผู้เข้าอบรม วิชาชีพทางสุขภาพที่ได้รับใบอนุญาตประกอบวิชีพจากสภาวิชาชีพ ดังนี้

6.1 แพทย์ ได้รับใบอนุญาต ประกอบวิชาชีพเวชกรรมของแพทยสภา

6.2 พยาบาล ได้รับใบอนุญาตประกอบวิชาชีพการพยาบาล ชั้น 1

6.3 เภสัชกร ได้รับใบอนุญาตเป็นผู้ประกอบวิชาชีพเภสัชกรรม

6.4 ทันตแพทย์ ได้รับใบอนุญาตการประกอบวิชาชีพทันตกรรม

6.5 เทคนิคการแพทย์ ได้รับใบอนุญาตประกอบวิชาชีพเทคนิคการแพทย์

ทั้งนี้สำหรับผู้เข้ารับการฝึกอบรมที่มีต้นสังกัด ต้องได้รับการอนุมัติให้ลาอบรมเต็มเวลาจากต้นสังกัดและหากไม่เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด ให้ขึ้นอยู่กับดุลยพินิจของคณะกรรมการผู้รับผิดชอบในการจัดหลักสูตร

7. หลักสูตร

หลักสูตรการฝึกอบรม จัดการศึกษาโดยผ่านการเห็นชอบของ 5 ภาคีวิชาชีพด้านสุขภาพ ได้แก่ แพทยสภา ทันตแพทยสภา สภาเภสัชกรรม สภาการพยาบาล และ สภาเทคนิคการแพทย์

7.1 **จำนวนหน่วยกิต** รวมทั้งหมด 16 หน่วยกิต (1 หน่วยกิต = 15-16 ชม)

7.2 **ระยะเวลาการอบรม** 4 เดือน

7.3 **โครงสร้างหลักสูตร** มี 2 Module (ชุดการเรียนรู้) และวิชาเลือก 1 รายวิชา โดยมีรายวิชาดังนี้

Module I ความรู้พื้นฐานทางพันธุศาสตร์และจีโนมิก (8 หน่วยกิต) ประกอบด้วย 7 รายวิชาดังนี้

1) Introduction to clinical genetics	1 credit
2) Clinical and dental genetics	2 credits

3) Cancer genomics 1 credit

4) Genetics in prevention, public health, and ethical-legal issues 1 credit

5) Pharmacogenomics and precision medicine 1 credit

6) Evidence based in genetics 1 credit

7) Genetic testing and bioinformatics 1 credit

Module II การสื่อสารและการให้คำปรึกษา (7 หน่วยกิต) ประกอบด้วย 3 รายวิชาดังนี้

8) Communication and genetic counseling 3 credits

9) Practicum in genetic and genomic counseling I 2 credits

10) Practicum in genetic and genomic counseling II 2 credits

วิชาเลือก (Selective course) 1 credit

(ผู้เข้าอบรมสามารถเลือกเรียนรายวิชาเลือกที่เกี่ยวข้องกับสาขาวิชาชีพของผู้เข้าอบรม 1 รายวิชา)

8. แผนการฝึกอบรม/หลักสูตร

8.1 แผนการฝึกอบรมแบ่งเป็น

8.1.1 Module I ความรู้พื้นฐานทางพันธุศาสตร์และจีโนมิก (จำนวน 8 สัปดาห์)

สัปดาห์ที่ 1-8 เรียนรายวิชาที่ 1-7

กิจกรรมในห้องเรียน (Lecture, Seminar, Journal club, Simulated patients and simulated environment for communication skills, workshop)

การประเมินผล การสอบ ประเมินความรู้ MCQ และการเข้ากิจกรรม Seminar

8.1.2 Module II การสื่อสารและการให้คำปรึกษา (จำนวน 8 สัปดาห์)

สัปดาห์ที่ 9-11 เรียนรายวิชาที่ 8

กิจกรรมการฝึกอบรม

การสื่อสารในรูปแบบต่าง ๆ องค์ประกอบสำคัญของการสื่อสารที่มีความสำคัญต่อรูปแบบการทำ Genetic Counseling

ฝึกการสื่อสารแต่ละรูปแบบในกลุ่ม และการแสดงทักษะ Genetic Counseling ในสถานการณ์จำลอง

การประเมินผล การนำเสนอ การมีส่วนร่วมในการเรียน และรายงาน

สัปดาห์ ที่ 12-15 เรียนรายวิชาที่ 9-10

สังเกตการณ์และเก็บรายละเอียดการทำ Genetic Counseling หมุนเวียนไปตามคลินิก ให้คำปรึกษาทางพันธุกรรม และสังเกตการณ์การทำงานห้องปฏิบัติการ Bioinformatics

Clinical Counseling in; Medicine, Oncology, Pediatrics, Obstetrics, Pharmacogenomics, Dental clinic, Bioinformatics Lab)

การประเมินผลรายวิชาปฏิบัติ

-รายงานข้อมูลผู้ป่วยและครอบครัวที่ได้สังเกตการณ์ในคลินิกให้คำปรึกษาแนะนำทางพันธุกรรม (Genetic Counseling) ใน Log Book จำนวน 10 ราย

-ประเมินการปฏิบัติการให้คำปรึกษาทางคลินิกในทุกคลินิกโดยอาจารย์ผู้สอนตามแบบประเมินผลรายวิชา

8.1.3 รายวิชาเลือก สัปดาห์ ที่ 16

ผู้เข้ารับการฝึกอบรมจะมีกิจกรรมตามรายวิชาเลือกซึ่งจะไปในคลินิกหรือห้องปฏิบัติการใดก็ได้ตามความประสงค์

9 สถาบันที่จัดการฝึกอบรม ต้องมีความพร้อมของสถานที่และบุคลากร ดังต่อนี้

9.1 สถานที่

9.1.1 ห้องเรียนที่มีความพร้อมในการจัดกิจกรรมการเรียนการสอน (Lecture, Seminar, Journal club, Simulated patients and simulated environment for communication skills, workshop)

9.1.2 ห้องปฏิบัติการ สำหรับฝึกอบรมปฏิบัติ/การตรวจทางห้องปฏิบัติการ การให้คำปรึกษาแนะนำทางพันธุกรรมแก่ผู้ป่วยและครอบครัว (Patient care and Genetic Counseling) โดยสามารถมีการจัดการเรียนการสอนที่สามารถสังเกตการณ์การให้คำปรึกษาทางพันธุกรรมได้ เป็นแบบผู้ป่วยนอก เช่น ในคลินิกดังต่อไปนี้

9.1.2.1 คลินิกโรคพันธุกรรมที่ห้องตรวจผู้ป่วยนอก (Out-patient Adult Genetics clinic)

9.1.2.2 คลินิกโรคธาลัสซีเมีย (Thalassemia clinic)

9.1.2.3 คลินิกผู้ที่มีประวัติโรคมะเร็งในครอบครัว (Familial Cancer Genetics clinic)

9.1.2.4 คลินิกโรคพันธุกรรมในเด็ก (Pediatric Genetics clinic)

9.1.2.5 คลินิกฝากครรภ์ผู้มีประวัติเสี่ยงโรคพันธุกรรมในครอบครัว (Maternal-Fetal clinic)

9.1.2.6 คลินิกเภสัชพันธุศาสตร์และการแพทย์แม่นยำ (Pharmacogenomics and Precision Medicine)

9.1.3 หอผู้ป่วย ได้แก่ หอผู้ป่วยอายุรกรรม ศัลยกรรม สูตินรีเวชกรรม กุมารเวชกรรม

9.2 บุคลากร

9.2.1 แพทย์เวชพันธุศาสตร์ผู้ให้การฝึกอบรม 2 คน

9.2.2 อาจารย์พยาบาลหรือพยาบาลวิชาชีพที่ให้คำปรึกษา 2 คน

9.2.3 เภสัชกรผู้มีความชำนาญการด้านเภสัชพันธุศาสตร์ 2 คน

10 แผนการรับผู้เข้าอบรม จำนวนผู้เข้าอบรมมีแผนรับเข้าตามความพร้อมของสถานศึกษา การให้บริการคำปรึกษาทางพันธุกรรมและจำนวนบุคลากรผู้ให้การฝึกอบรม ดังนี้

ตารางที่แสดงแผนรับจำนวนผู้เข้าการอบรมตามสัดส่วนของบุคลากรสุขภาพและคลินิกที่ให้บริการ

สิ่งสนับสนุนการอบรม	**จำนวน (คน/คลินิก/ครั้ง)**					
จำนวนผู้เข้ารับการฝึกอบรม (คน)	**10**	**15**	**20**	**25**	**30**	**35**

สิ่งสนับสนุนการอบรม	จำนวน (คน/คลินิก/ครั้ง)					
จำนวนแพทย์เวชพันธุศาสตร์ผู้ให้การฝึกอบรม (คน)	2	2	2	2	2	2
จำนวนอาจารย์พยาบาล/พยาบาลวิชาชีพที่ให้การปรึกษา	2	2	2	2	2	2
จำนวนเภสัชกรผู้มีความชำนาญการด้านเภสัชพันธุศาสตร์	1	1	1	1	1	1
การส่งตรวจ Genetic testing/Genomic testing (ครั้ง/ปี)	100	100	200	200	300	300
จำนวนผู้ป่วยนอก ที่เกี่ยวข้องกับการฝึกอบรม / เดือน	100	200	300	300	300	300
จำนวนผู้ป่วยใน ที่เกี่ยวข้องกับการฝึกอบรม /เดือน	10	20	30	30	30	30
จำนวนคลินิกให้คำปรึกษาแนะนำแก่ผู้ป่วยและครอบครัว (Genetic counseling clinic) (คลินิกที่ทำการสอน Medical/Pediatrics/Cancer/FMN/Pharmacogenomics)	3	3	4	4	4	4
การให้คำปรึกษาแนะนำแก่ผู้ป่วยและครอบครัว (Genetic counseling clinic) (ครั้ง/เดือน/คลินิก)	10	10	20	20	30	30

11 การวัดและประเมินผล

เมื่อกรรมการผู้ให้การฝึกอบรมตรวจสอบว่า “ผ่าน” จึงจะถือว่าผ่าน การฝึกอบรมถือว่าเสร็จสมบูรณ์เมื่อสอบผ่านทั้งสอง Modules มีการแจ้งกระบวนการการวัดและประเมินผลให้ผู้เข้าร่วมการฝึกอบรมได้รับทราบ โดยสามารถตรวจสอบและอุทธรณ์ได้เมื่อต้องการตามกติกาที่สถาบันกำหนดไว้

11.1 การวัดและประเมินผลระหว่างการฝึกอบรม การยุติการฝึกอบรม

11.1.1 การประเมินระหว่างการฝึกอบรม จาก

ก. การให้ข้อมูลป้อนกลับจากอาจารย์ที่สังเกตการณ์โดยตรง (Direct observation and Immediate feedback) ในห้องเรียน หลังจากการฝึกปฏิบัติ ฝึกการสื่อสารที่จะนำไปสู่การเป็นผู้ให้คำปรึกษาแนะนำทางพันธุกรรม (Genetic Counselor) โดยการฝึกสื่อสารในสถานการณ์จำลองเสมือนจริง Simulated patients and

simulated environment for effective communication skills) 10 สถานการณ์ และที่ Genetic Counseling Clinics ที่ตรวจโรคผู้ป่วยนอก (5 clinics) และผู้ป่วยใน เมื่อจบการสังเกตการณ์ในแต่ละครั้ง

ข. ตรวจสอบความก้าวหน้าของ Log Book ระหว่างการหมุนเวียนไปแต่ละคลินิกที่สังเกตการณ์ (4 สัปดาห์) กรรมการจะให้คำติชม/วิเคราะห์/อภิปรายผลการดูแลผู้ป่วยและครอบครัว (Direct feedback) หลังจากได้ตรวจสอบ Log Book ในสัปดาห์ ที่ 9-11

ค. การสอบ

1) เมื่อสิ้นสุดสัปดาห์ ที่ 8 (Module I)

- เนื้อหาความรู้ Medical Genetics/ Pharmacology/Genetic testing / Genome testing Lab interpretation (Cytogenetics/ Molecular lab interpretation/ Microarrays interpretation)
- โดยทำคะแนนได้ตามเกณฑ์ (MPL)

2) เมื่อสิ้นสุดการฝึกอบรมสัปดาห์ที่ 16 (Module II)

- ผ่านการประเมิน EPA 1(Level 4/5 standard EPA level) Genetic Counseling ในสถานการณ์จำลอง 1 case ในสัปดาห์ที่ 11

ง. ผลการประเมิน Log Book ข & ง รวมกันได้

11.1.2 การประเมินเพื่อประกาศนียบัตร

ก. ผู้เข้าอบรมจะมีสิทธิ์เข้ารับการประเมินเพื่อสำเร็จการฝึกอบรมเมื่อมีคุณสมบัติดังนี้

1) ผ่านการประเมิน ตาม 6.7.1 (ผ่าน module I และ module II)

2) วันลา/ขาด รวมระยะเวลาแล้วต้องไม่เกิน 5 วันทำการ (ในแต่ละ module)

ข. ผู้เข้าฝึกอบรมสามารถเก็บผลการประเมินผ่าน Module ใด Module หนึ่ง ได้เป็นเวลาหนึ่งปี (12 เดือน) เพื่อมารวมให้ครบสอง Modules เพื่อประกาศนียบัตร

11.1.3 การลา มีการกำหนดการลาพัก เช่น การเจ็บป่วย ลากิจ เป็นต้น แต่รวมระยะเวลาแล้วต้อง ไม่เกิน 5 วันทำการ (ในแต่ละ module)

11.1.4 แนวทางการดำเนินการกรณีสอบไม่ผ่านเกณฑ์

ถ้าสอบไม่ผ่านส่วนใดส่วนหนึ่งใน **6.7.1 ค. และ ง.** ให้สอบแก้ตัวได้ไม่เกิน 2 ครั้ง ภายใน 1 ปี (ถ้าไม่ผ่านก็ต้องเริ่มเรียนใหม่)

11.1.5 การดำเนินการสำหรับผู้ที่ไม่ผ่านการประเมินการฝึกอบรม

ก. แจ้งผลการประเมินให้ผู้เข้าอบรมรับทราบเป็นลายลักษณ์อักษร พร้อมทั้งแจ้งสมาคมเวชพันธุศาสตร์ฯ และภาคีสภาวิชาชีพด้านสุขภาพ พร้อมแนวทางการพัฒนา รายละเอียดการปฏิบัติงานเพิ่มเติม การกำกับดูแล และการประเมินผลซ้ำ

ข. ให้ผู้เข้าอบรมปฏิบัติงานเพิ่มเติมในคลินิกให้การปรึกษาและแนะนำทางพันธุกรรมระยะเวลาตามที่กรรมการเสนอในข้อ 1 ไม่เกิน 3 อาทิตย์ (ระยะเวลาการฝึกอบรม) ภายใต้การกำกับดูแล และประเมินผลซ้ำจนผ่านการประเมิน

11.1.6 การดำเนินการเพื่อยุติการฝึกอบรม

ก. การลาออก ผู้เข้าอบรมต้องทำเรื่องชี้แจงเหตุผลก่อนพักการปฏิบัติงานล่วงหน้าอย่างน้อย 1 สัปดาห์ เพื่อให้คณะกรรมการเห็นชอบ และแจ้งต่อสถาบันที่จัดการศึกษาและสมาคมเวชพันธุศาสตร์ ฯ/ภาคีสภาวิชาชีพด้านสุขภาพ

ข. การให้ออก

1) ปฏิบัติงานโดยขาดความรับผิดชอบหรือประพฤติตนเสื่อมเสียร้ายแรงจนก่อให้เกิดผลเสียต่อผู้ป่วยหรือต่อชื่อเสียงของสถาบันฝึกอบรม

2) ปฏิบัติงานโดยขาดความรับผิดชอบหรือประพฤติตนเสื่อมเสีย ไม่มีการปรับปรุงพฤติกรรมหลังการตักเตือน และกระทำซ้ำภายหลังการภาคทัณฑ์

เมื่อสถาบันฝึกอบรมเห็นสมควรให้ออก ให้ทำการแจ้งผู้เข้าอบรมรับทราบพร้อมทั้งให้พักการปฏิบัติงาน แล้วทำเรื่องแจ้งต่อสภาวิชาชีพที่สังกัด คณะกรรมการผู้รับผิดชอบในการจัดหลักสูตร และสมาคมเวชพันธุศาสตร์ ฯ ถ้าสมควรให้ออกจึงแจ้งภาคีสภาวิชาชีพด้านสุขภาพ จนเมื่อได้รับอนุมัติจึงถือว่าการให้ออกสมบูรณ์ ถ้าเห็นว่ายังไม่สมควรให้ออกจึงส่งเรื่องคืนให้สถาบันจัดการฝึกอบรมพร้อมคำแนะนำ

12. คณะกรรมการและอาจารย์ผู้ให้การฝึกอบรม

12.1 มีคณะกรรมการการศึกษาหลังปริญญาของสถาบันที่จัดฝึกอบรม หรือกรรมการผู้รับผิดชอบที่มีสถานะเทียบเท่าเป็นคณะกรรมการ และคณะกรรมการผู้รับผิดชอบในการจัดหลักสูตรการให้คำปรึกษาทางพันธุศาสตร์โดยเฉพาะ ประกอบด้วยแพทย์ที่เชี่ยวชาญเวชพันธุศาสตร์ ผู้เชี่ยวชาญด้านเภสัชพันธุศาสตร์ และอาจารย์พยาบาลหรือพยาบาลวิชาชีพที่มีประสบการณ์ด้านการให้การปรึกษาหรือมีประสบการณ์จัดการฝึกอบรมหลักสูตรเฉพาะทาง มีหน้าที่ ดูแล กำกับ ประเมินให้เป็นไปตามแผนการฝึกอบรม/หลักสูตร

12.2 มีเจ้าหน้าที่ที่ทำหน้าที่ดูแล อำนวยความสะดวกในการฝึกอบรม/หลักสูตร

12.3 อาจารย์ผู้ให้การฝึกอบรมในหลักสูตรนี้ประกอบด้วย อายุรแพทย์เวชพันธุศาสตร์ กุมารแพทย์เวชพันธุศาสตร์ สูตินรีแพทย์เวชพันธุศาสตร์ อายุรแพทย์มะเร็งวิทยา และสาขาอื่น ๆ ที่มีความเชี่ยวชาญด้านเวชพันธุศาสตร์ในแต่ละสาขา คือ ทันตแพทย์ เภสัชกร (ผู้มีความรู้ความชำนาญในการประกอบวิชาชีพเภสัชกรรม สาขาเภสัชพันธุศาสตร์และการแพทย์แม่นยำ) พยาบาลที่สามารถสอนให้ได้ตามเนื้อหาของหลักสูตร อาจารย์เทคนิคการแพทย์ นักเทคนิคการแพทย์ซึ่งเป็นผู้ประกอบวิชาชีพที่มีความเชี่ยวชาญและมีประสบการณ์ปฏิบัติงานในหน่วยบริการด้านการแพทย์แม่นยำ ซึ่งคณาจารย์อาจจะมาจากในสถาบันหรือสามารถหาวิทยากรภายนอกสถาบันที่มีการปฏิบัติงานบริการด้านคลินิกให้การปรึกษาแนะนำทางพันธุกรรมด้านต่าง ๆ เป็นประจำและมีองค์ประกอบดังนี้

12.3.1 คุณสมบัติของอาจารย์แพทย์

สถาบันฝึกอบรมต้องมีแพทย์ซึ่งได้รับหนังสืออนุมัติหรือวุฒิบัตร/ประกาศนียบัตรสาขาอายุรเวชพันธุศาสตร์ (Medical Genetics/ Clinical Genetics) ของแพทยสภาและเป็นสมาชิกสมาคมเวชพันธุศาสตร์ฯ จำนวนอย่างน้อย 2 คน ทั้งนี้ต้องมีงานบริการในสถาบันที่จัดการศึกษาตามที่กำหนดในตารางที่ 1

12.3.2 คุณสมบัติของอาจารย์พยาบาล

<u>ภาคทฤษฎี</u>

1) สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาโท สาขาการพยาบาลจิตเวชและสุขภาพจิต หรือ การให้คำปรึกษาทางสุขภาพ และสาขาอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องทำหน้าที่สอน หรือ ปฏิบัติงานในสาขาที่จัดการฝึกอบรมไม่น้อยกว่า 3 ปี
2) สำเร็จการศึกษาปริญญาโทและเอก สาขาอื่นทำหน้าที่สอนหรือปฏิบัติงานในสาขาที่จัดอบรมไม่น้อยกว่า 5 ปี

<u>ภาคปฏิบัติ</u>

2) มีคุณสมบัติเหมือน ภาคทฤษฎี แต่ต้องผ่านการฝึกอบรมเฉพาะทางในสาขาที่ฝึกอบรมที่มีระยะเวลา ไม่น้อยกว่า 16 สัปดาห์ หรือมีประสบการณ์ในการทำหน้าที่ในการให้คำปรึกษาด้านพันธุศาสตร์อย่างต่อเนื่อง เป็นเวลา 5 ปี
3) ถ้าเป็นอาจารย์ประจำในสถาบันการศึกษา มีการพัฒนาเพื่อการปฏิบัติงานในคลินิกให้คำปรึกษาด้านพันธุศาสตร์อย่างต่อเนื่อง (faculty practice) อย่างน้อย 80 ชม./ ปี
4) สำหรับผู้ช่วยสอนภาคปฏิบัติเป็นพยาบาลวิชาชีพที่ทำหน้าที่ให้คำปรึกษาด้านพันธุศาสตร์อย่างต่อเนื่องอย่างน้อย 3 ปี และสอนภายใต้การกำกับของอาจารย์ผู้สอนภาคปฏิบัติตามข้อ 1 และ 2

12.3.3 คุณสมบัติของอาจารย์เทคนิคการแพทย์

<u>ภาคทฤษฎี</u>

1) เป็นผู้ประกอบวิชาชีพเทคนิคการแพทย์สำเร็จการศึกษาในระดับไม่ต่ำกว่าปริญญาโทในสาขาที่เปิดสอน และมีความเชี่ยวชาญหรือปฏิบัติงานสาขานั้น ๆ หรือ
2) สำเร็จการศึกษาในระดับไม่ต่ำกว่าปริญญาโทในสาขาอื่นและทำหน้าที่สอนหรือปฏิบัติงานในสาขาที่เปิดสอน โดยมีประสบการณ์ไม่น้อยกว่า 5 ปี

<u>ภาคปฏิบัติ</u>

1) เป็นผู้ประกอบวิชาชีพเทคนิคการแพทย์มีความเชี่ยวชาญและปฏิบัติงานสาขานั้น ๆ และทำหน้าที่สอน หรือปฏิบัติงานในสาขาที่เปิดสอนโดยมีประสบการณ์ไม่น้อยกว่า 5 ปี หรือ

2) เป็นผู้เชี่ยวชาญและปฏิบัติงานในสาขานั้นโดยมีประสบการณ์ไม่น้อยกว่า 5 ปี มีหนังสือรับรองการ ปฏิบัติงานจริงในห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์และมีหนังสือรับรองคุณวุฒิและประสบการณ์จากผู้บังคับบัญชาต้นสังกัด
3) ผู้ทรงคุณวุฒิ ได้แก่ ผู้ที่มีความรู้และความเชี่ยวชาญในสาขาที่เกี่ยวข้อง เช่นแพทย์
4) พยาบาล ทันตแพทย์ เภสัชกร นักเทคนิคการแพทย์

12.3.4 คุณสมบัติของอาจารย์เภสัชกร (ผู้สอนเภสัชพันธุศาสตร์ฯ)

ภาคทฤษฎี

1) เป็นผู้มีความรู้ความชำนาญในการประกอบวิชาชีพเภสัชกรรมสาขาเภสัชพันธุศาสตร์และการแพทย์แม่นยำตามประกาศฯของสภาเภสัชกรรม หรือ
2) สำเร็จการศึกษาในระดับปริญญาเอกในสาขาที่เกี่ยวข้องและได้ทำหน้าที่สอนหรือปฏิบัติงานด้านเภสัชพันธุศาสตร์และการแพทย์แม่นยำโดยมีประสบการณ์ไม่น้อยกว่า 10 ปี

ภาคปฏิบัติ

1) เป็นผู้มีความรู้ความชำนาญในการประกอบวิชาชีพเภสัชกรรม สาขาเภสัชพันธุศาสตร์และการแพทย์แม่นยำตามประกาศฯของสภาเภสัชกรรม หรือ
2) เป็นเภสัชกรผู้ปฏิบัติงานด้านเภสัชพันธุศาสตร์ ตามประกาศฯของสภาเภสัชกรรม หรือเภสัชกรที่มีประสบการณ์ทำงานด้านเภสัชพันธุศาสตร์ไม่น้อยกว่า 5 ปี โดยมีหนังสือรับรองจากผู้บังคับบัญชาต้นสังกัด หรือ
3) ผู้ทรงคุณวุฒิ ได้แก่ อาจารย์ประจำในสถาบันการศึกษาที่ได้ทำหน้าที่สอนหรือปฏิบัติงานด้านเภสัชพันธุศาสตร์และการแพทย์แม่นยำ โดยมีประสบการณ์ไม่น้อยกว่า 5 ปี

12.3.5 คุณสมบัติของอาจารย์ทันตแพทย์

ภาคทฤษฎี

เป็นผู้ประกอบวิชาชีพทันตแพทย์ ผู้เชี่ยวชาญ หรือผู้ทรงคุณวุฒิในสาขาอื่นที่เกี่ยวข้อง สำเร็จการศึกษาในระดับไม่ต่ำกว่าปริญญาโท มีมีความเชี่ยวชาญ ทำหน้าที่สอน ปฏิบัติงาน หรือมีผลงานในสาขาที่จัดการฝึกอบรมไม่น้อยกว่า 3 ปี

ภาคปฏิบัติ

เป็นผู้ประกอบวิชาชีพทันตแพทย์ ผู้เชี่ยวชาญ หรือผู้ทรงคุณวุฒิในสาขาอื่นที่เกี่ยวข้อง สำเร็จการศึกษาในระดับไม่ต่ำกว่าปริญญาโท มีความเชี่ยวชาญ ปฏิบัติงาน มีผลงาน หรือประสบการณ์ภาคปฏิบัติในสาขาที่จัดการฝึกอบรมไม่น้อยกว่า 3 ปี

12.4 **จำนวนอาจารย์ผู้ให้การฝึกอบรม** ต้องมีอาจารย์ปฏิบัติงานเต็มเวลาอย่างน้อย 2 คนขึ้นไป

ก. ผู้ฝึกอบรมเต็มเวลา หมายถึง ข้าราชการ พนักงานมหาวิทยาลัย ลูกจ้างประจำ รวมทั้งอาจารย์เกษียณอายุราชการ ที่ปฏิบัติงานในโรงพยาบาล หรือหน่วยงานที่ปฏิบัติงานเต็มเวลา และได้รับอัตราเงินเดือนในอัตราเต็มเวลา

ข. ผู้ฝึกอบรมไม่เต็มเวลา แบ่งเป็น 2 ประเภท

1) พนักงานมหาวิทยาลัยหรือลูกจ้างประเภทบางเวลา อย่างน้อยครึ่งเวลา และได้รับเงินเดือนตามสัดส่วนงาน ให้นับเวลาปฏิบัติงานตามสัญญาจ้าง
2) ผู้ที่ปฏิบัติงานอยู่ที่สถาบันอื่น หรืออาจารย์เกษียณอายุราชการ หรืออาจารย์แผนกอื่นมาช่วยสอนบางเวลา โดยไม่ได้มีสัญญาจ้างจากหน่วยงาน หรือปฏิบัติงานน้อยกว่าครึ่งเวลา ให้คิดเวลาปฏิบัติงานเฉพาะเวลาที่มาปฏิบัติงานสำหรับการเรียนการสอนโดยไม่นับเวลาที่มาทำงานวิจัย ทำงานบริการ เช่น ตรวจผู้ป่วยหรือทำหัตถการ

12.5 สถาบันฯ ต้องกำหนดและดำเนินนโยบายการสรรหาและคัดเลือกอาจารย์ผู้ให้การฝึกอบรมให้สอดคล้องกับพันธกิจของแผนการฝึกอบรม/หลักสูตร ระบุคุณสมบัติของอาจารย์ผู้ให้การฝึกอบรมที่ชัดเจน โดยครอบคลุมความชำนาญที่ต้องการ ได้แก่ คุณสมบัติทางวิชาการ ความเป็นครู และความชำนาญทางคลินิกสถาบันฯ ต้องระบุหน้าที่ความรับผิดชอบ ภาระงานของอาจารย์ และสมดุลระหว่างงานด้านการศึกษา การวิจัย อาจารย์ต่อผู้เข้ารับการฝึกอบรมให้เป็นไปตามเกณฑ์ที่ภาคีวิชาชีพกำหนดไว้ อาจารย์จะต้องมีเวลาเพียงพอสำหรับการให้การฝึกอบรม ให้คำปรึกษา และกำกับดูแล นอกจากนั้นอาจารย์ยังต้องมีการพัฒนาตนเองอย่างต่อเนื่องทั้งทางด้านเวชพันธุศาสตร์หรือการให้แนะนำปรึกษา โดยสถาบันฯ ต้องจัดให้มีการพัฒนาอาจารย์อย่างเป็นระบบ และมีการประเมินอาจารย์เป็นระยะ

13. ทรัพยากรทางการศึกษา

สถาบันผู้รับผิดชอบในการจัดหลักสูตรฯ ต้องกำหนดและดำเนินนโยบายเกี่ยวกับทรัพยากรการศึกษาให้ครอบคลุมประเด็นต่อไปนี้

13.1 สถานที่และโอกาสในการเรียนรู้ทั้งภาคทฤษฎีและภาคปฏิบัติ การเข้าถึงแหล่งข้อมูลทางวิชาการที่ทันสมัย สามารถใช้ระบบเทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสารได้อย่างเพียงพอ มีอุปกรณ์สำหรับฝึกอบรมภาคปฏิบัติและมีสิ่งแวดล้อมทางการศึกษาที่ปลอดภัย โดยเฉพาะการมีคลินิกการให้คำปรึกษาทางพันธุกรรมที่หลากหลาย

13.2 สื่ออิเล็กทรอนิกส์สำหรับการเรียนรู้ ที่ผู้เข้ารับการฝึกอบรมสามารถเข้าถึงได้ มีการใช้เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสารให้เป็นส่วนหนึ่งของการฝึกอบรมอย่างมีประสิทธิภาพและถูกหลักจริยธรรม

13.3 การจัดประสบการณ์ในการปฏิบัติงานเป็นทีมร่วมกับผู้ร่วมงานและบุคลากรวิชาชีพอื่น

13.4 ความรู้และการประยุกต์ความรู้พื้นฐานและกระบวนการทางวิทยาศาสตร์ในสาขาวิชาที่ฝึกอบรม มีการบูรณาการ และสมดุลระหว่างการฝึกอบรมกับการวิจัยอย่างเพียงพอ

13.5 การนำความเชี่ยวชาญทางด้านการเรียนการสอนในการจัดทำแผนการฝึกอบรม การดำเนินการฝึกอบรม การประเมินผลการฝึกอบรม

13.6 การฝึกอบรมในสถาบันอื่น สามารถจัดทำได้เพื่อทำให้ได้ตามเกณฑ์มาตรฐานของหลักสูตร

13.7 บุคลากรสนับสนุนการจัดการศึกษา และเจ้าหน้าที่อำนวยความสะดวกในการจัดฝึกอบรม

14. การประเมินการฝึกอบรม/หลักสูตร

14.1 สถาบันฯ ต้องกำกับดูแลการฝึกอบรมให้เป็นไปตามแผนการฝึกอบรม/หลักสูตรเป็นประจำ มีกลไกสำหรับการประเมินหลักสูตรและนำไปใช้จริง การประเมินแผนการฝึกอบรม/หลักสูตร ต้องครอบคลุม ได้แก่

14.1.1 พันธกิจของแผนการฝึกอบรม/หลักสูตร

14.1.2 ผลลัพธ์การเรียนรู้ที่พึงประสงค์

14.1.3 แผนการฝึกอบรม

14.1.4 ขั้นตอนการดำเนินงานของแผนการฝึกอบรม

14.1.5 การวัดและประเมินผล

14.1.6 พัฒนาการของผู้เข้ารับการฝึกอบรม

14.1.7 ทรัพยากรทางการศึกษา

14.1.8 คุณสมบัติของอาจารย์ผู้ให้การฝึกอบรม

14.1.9 ความสัมพันธ์ระหว่างนโยบายการรับสมัครผู้รับการฝึกอบรมและความต้องการของระบบสุขภาพ

14.1.10 สถาบันร่วมในการจัดการฝึกอบรม (ถ้ามี)

14.1.11 ข้อควรปรับปรุง ที่ได้ข้อมูลป้อนกลับจากผู้มีส่วนได้ส่วนเสีย (stakeholders)

14.2 สถาบันฯ ต้องแสวงหาข้อมูลป้อนกลับเกี่ยวกับการฝึกอบรม/หลักสูตร จากผู้ให้การฝึกอบรม ผู้เข้ารับการฝึกอบรม นายจ้างหรือผู้ใช้บัณฑิต และผู้มีส่วนได้ส่วนเสียหลัก รวมถึงการใช้ข้อมูลป้อนกลับเกี่ยวกับความสามารถ ในการปฏิบัติงานของผู้สำเร็จการฝึกอบรม ในการประเมินการฝึกอบรม/หลักสูตร

15. การทบทวน / พัฒนาหลักสูตรการฝึกอบรม

ให้ทุกสถาบันที่จัดอบรมส่งผลการประเมินให้ ภาควิชาชีพ และสมาคมเวชพันธุศาสตร์ ฯ จัดการปรับปรุงหลักสูตรเป็นระยะ สถาบันฯ ต้องจัดให้มีการทบทวนและพัฒนาคุณภาพของหลักสูตรฝึกอบรมเป็นระยะ ๆ หรืออย่างน้อย**ทุก 5 ปี** ปรับปรุงกระบวนการ โครงสร้าง เนื้อหา ผลลัพธ์ และสมรรถนะของผู้สำเร็จการฝึกอบรม รวมถึงการวัดและการประเมินผล และสภาพแวดล้อมในการฝึกอบรม ให้ทันสมัยอยู่เสมอปรับปรุงแก้ข้อบกพร่องที่ตรวจพบ มีข้อมูลอ้างอิง และแจ้งผลการทบทวนแผนการพัฒนาให้สมาคมเวชพันธุศาสตร์ ฯ /ภาคีสภาวิชาชีพด้านสุขภาพ ซึ่งเป็นผู้รับผิดชอบดูแลการฝึกอบรมให้รับทราบ

16. ธรรมาภิบาลและการบริหารจัดการ

16.1 สถาบันที่จัดการฝึกอบรม ฯ ต้องขอความเห็นชอบจากสภาวิชาชีพและภาคีวิชาชีพ และบริหารจัดการหลักสูตรให้สอดคล้องกับกฎระเบียบที่กำหนดไว้ในด้านต่าง ๆ ได้แก่ การรับสมัครผู้เข้ารับการฝึกอบรม (เกณฑ์การ

คัดเลือกและจำนวนที่รับ) กระบวนการฝึกอบรม การวัดและประเมินผล และผลลัพธ์ของการฝึกอบรมที่พึงประสงค์ การออกเอกสารที่แสดงถึงการสำเร็จการฝึกอบรมในแต่ละระดับ หรือหลักฐานอย่างเป็นทางการอื่น ๆ ที่สามารถใช้เป็นหลักฐานแสดงการผ่านการฝึกอบรมในระดับนั้นได้ทั้ง ในประเทศและต่างประเทศ

16.2 แผนการฝึกอบรม/หลักสูตรให้สอดคล้องกับความจำเป็นด้านการฝึกอบรม

สถาบันฯ ต้องมีบุคลากรที่ปฏิบัติงานและมีความเชี่ยวชาญที่เหมาะสม เพื่อสนับสนุนการดำเนินการของการฝึกอบรมและกิจกรรมอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง มีการบริหารจัดการที่ดีและใช้ทรัพยากรได้อย่างเหมาะสม สอดคล้องกับข้อบังคับและประกาศของภาคีสภาวิชาชีพด้านสุขภาพในการเปิดการฝึกอบรม

17. การกำกับติดตามการฝึกอบรม

สมาคมเวชพันธุศาสตร์และจีโนมิกซ์แห่งประเทศไทย/ภาคีสภาวิชาชีพด้านสุขภาพกำหนดให้สถาบันฝึกอบรมที่ได้รับการอนุมัติให้จัดการฝึกอบรม จะต้องผ่านการประเมินความพร้อมในการเป็นสถาบันฝึกอบรมผ่านทางสมาคม และสถาบันที่จัดการฝึกอบรมจะต้องมีระบบการกำกับติดตามการฝึกอบรมอย่างต่อเนื่องดังนี้

17.1 การกำกับติดตามคุณภาพหลักสูตรการฝึกอบรม ฯ ภายใน สถาบันจัดการฝึกอบรมจะต้องจัดให้มีระบบและกลไกการติดตามคุณภาพการฝึกอบรมภายใน อย่างน้อยทุก 2 ปี

17.2 การกำกับติดตามคุณภาพหลักสูตรการฝึกอบรม ฯ ภายนอก สถาบันจัดการฝึกอบรมจะต้องจัดให้มีระบบและกลไกการกำกับติดตามคุณภาพการฝึกอบรมจากสมาคมเวชพันธุศาสตร์ ฯ และภาคีวิชาชีพด้านสุขภาพอย่างน้อยทุก 5 ปี

18. การพัฒนาหลักสูตรและคุณภาพการฝึกอบรม อย่างต่อเนื่อง

เนื่องจากสาขาการฝึกอบรมนี้มีการพัฒนาความรู้อย่างรวดเร็ว ดังนั้นสมาคมเวชพันธุศาสตร์ ฯ และภาคีวิชาชีพด้านสุขภาพจึงจำเป็นต้องมีการพิจารณาหลักสูตร อย่างสม่ำเสมอและต่อเนื่อง

19. การรับใบประกาศนียบัตร

เมื่อผู้เข้าอบรมที่จบหลักสูตรจะได้รับประกาศนียบัตรที่ได้รับการรับรองจากสถาบันที่จัดการศึกษา และภาคีวิชาชีพด้านสุขภาพ และสมาคมเวชพันธุศาสตร์ ฯ โดยมีค่าธรรมเนียมการออกใบประกาศนียบัตรตามสภาวิชาชีพกำหนด

4.8 การสร้างบุคลากรด้านการดูแลผู้สูงอายุและผู้ป่วยพิเศษ

หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาทันตกรรมผู้สูงอายุและการดูแลผู้ป่วยพิเศษ (หลักสูตรนานาชาติ)

หลักสูตรใหม่

ชื่อสถาบันอุดมศึกษา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย คณะทันตแพทยศาสตร์

หมวดที่ 1. ข้อมูลทั่วไป

1. ชื่อหลักสูตร

(ภาษาไทย) หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาทันตกรรมผู้สูงอายุและการดูแลผู้ป่วยพิเศษ (หลักสูตรนานาชาติ)

(ภาษาอังกฤษ) Master of Science Program in Geriatric Dentistry and Special Patients Care (International Program)

2. ชื่อปริญญาและสาขาวิชา

2.1 ชื่อปริญญา

(ภาษาไทย : ชื่อเต็ม) วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

(ภาษาไทย : อักษรย่อ) วท.ม.

(ภาษาอังกฤษ : ชื่อเต็ม) Master of Science

(ภาษาอังกฤษ : อักษรย่อ) M.Sc.

***2.2 ชื่อสาขาวิชาที่ระบุใน TRANSCRIPT**

FIELD OF STUDY: Geriatric Dentistry and Special Patients Care

***3. ลักษณะและประเภทของหลักสูตร**

ประเภทของหลักสูตร

เชิงการจัดการ ☐ หลักสูตรปกติ ■ หลักสูตรนานาชาติ ☐ หลักสูตรภาษาอังกฤษ

เชิงการจัดเก็บเงิน ☐ หลักสูตรปกติ ■ หลักสูตรพิเศษ

4. จำนวนหน่วยกิตที่เรียนตลอดหลักสูตร 40 หน่วยกิต

5. รูปแบบของหลักสูตร

5.1 รูปแบบ ☐ ปริญญาตรี ☐ ประกาศนียบัตรบัณฑิต ■ ปริญญาโท ประกาศนียบัตรบัณฑิตชั้นสูง ปริญญาเอก ☐

5.2 ภาษาที่ใช้ ☐ ภาษาไทย ☐ ภาษาอังกฤษ ■ ภาษาไทยและภาษาอังกฤษ

5.3 การรับเข้าศึกษา ☐ นิสิตไทย ☐ นิสิตต่างชาติ ■ รับทั้งสองกลุ่ม

***5.4 ความร่วมมือกับสถาบันอื่นทั้งภายในและภายนอกมหาวิทยาลัย**

5.4.1 ในจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้แก่ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาฯ
รพ.จุฬาฯ สภากาชาดไทย

ร่วมมือในลักษณะ - มีคลินิกที่จะเปิดรับผู้ป่วยจากในโรงพยาบาลจุฬาฯ
- มีอาจารย์จากคณะแพทยศาสตร์ มาสอนบรรยายประจำรายวิชา หรือให้คำปรึกษากรณีดูแลผู้ป่วยทางทันตกรรมที่มีโรคทางระบบ

5.4.2 ภายนอกจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
สถาบันการศึกษาในประเทศ ไม่มี

สถาบันการศึกษาต่างประเทศ ได้แก่ Tokyo Medical and Dental University, Japan

ร่วมมือในลักษณะ - ทำการวิจัยร่วม

- ร่วมสอนสัมมนา สอนบรรยายในรายวิชาของหลักสูตร
- การดูงานด้านทันตกรรมผู้สูงอายุและปรึกษางานด้านวิจัย (ที่ต่างประเทศ)

5.5 การให้ปริญญาแก่ผู้สำเร็จการศึกษา

ปริญญาเดียว

6. สถานภาพของหลักสูตรและการพิจารณาอนุมัติ/เห็นชอบหลักสูตร

6.1 สถานภาพหลักสูตร

หลักสูตรใหม่

กำหนดเปิดสอน ระบบทวิภาค ภาคการศึกษาต้น ภาคการศึกษาปลาย

7. ความพร้อมในการเผยแพร่หลักสูตรที่มีคุณภาพและมาตรฐาน

ปี พ.ศ. 2560

8. อาชีพที่สามารถประกอบได้หลังสำเร็จการศึกษา

1. อาจารย์/นักวิชาการในสถาบันการศึกษา หรือหน่วยงานทางสาธารณสุขที่เกี่ยวข้องกับงานทันตกรรม โดยเฉพาะสาขาวิชาทันตกรรมผู้สูงอายุและการดูแลผู้ป่วยพิเศษ
2. นักวิจัยสาขาวิชาทันตกรรมผู้สูงอายุและการดูแลผู้ป่วยพิเศษ ในสถาบันวิจัยหรือหน่วยงานสาธารณสุข ทั้งในภาครัฐและเอกชน
3. ทันตแพทย์เฉพาะทาง สาขาทันตกรรมผู้สูงอายุและการดูแลผู้ป่วยพิเศษ

9. อาจารย์ประจำหลักสูตร

ลำดับที่	ชื่อ – นามสกุล เลขประจำตัวประชาชน	ตำแหน่งทางวิชาการ	คุณวุฒิ	สาขาวิชา
1	ทญ.ดร.อรพินท์ โคมิน* 3100701075264	ผศ.	อ.ท. Ph.D. ท.บ.	ทันตกรรมประดิษฐ์ Maxillofacial Prosthodontics ทันตแพทยศาสตร์
2	ทญ.ดร.ปิยมาศ สำเร็จกาญจนกิจ* 3100800616352	รศ.	Ph.D. ท.บ.	Developmental Biology ทันตแพทยศาสตร์
3	ทญ.ดร.อัญชลี วัชรักษะ*	อ.	Ph.D. วท.ม.	Oral Biology ทันตกรรมประดิษฐ์

	3101800551553		ท.บ.	ทันตแพทยศาสตร์
4	ทญ.ดร. พนิดา ธัญญศรีสังข์ 5101200117069	อ.	Ph.D. ท.บ.	Dental Science ทันตแพทยศาสตร์
5	ทญ.ดร. ฑัณฑิรา พรทวีทัศน์ 3102100405431	อ.	Ph.D. M.Sc. ป.บัณฑิต ท.บ.	Pre-Clinical Dentistry Research Paediatric Dentistry ทันตกรรมประดิษฐ์ ทันตแพทยศาสตร์

10. สถานที่จัดการเรียนการสอน

■ ภายในมหาวิทยาลัย คณะทันตแพทยศาสตร์

☐ ภายนอกมหาวิทยาลัย หน่วยงาน.....

11. สถานการณ์ภายนอกหรือการพัฒนาที่จำเป็นต้องนำมาพิจารณาในการวางแผนหลักสูตร

11.1 สถานการณ์หรือการพัฒนาทางเศรษฐกิจ

แนวโน้มจำนวนประชากรผู้สูงอายุในประเทศจะมีการเพิ่มขึ้นจากปัจจุบันไปอย่างรวดเร็ว จากเดิมที่เคยมีสัดส่วนจำนวนผู้สูงอายุที่มีอายุเกินกว่า 60 ปีขึ้นไปเพียงร้อยละ 5 ของจำนวนประชากรทั้งประเทศ จะเพิ่มขึ้นถึงประมาณร้อยละ 25 ของจำนวนประชากรทั้งหมดในอีกราว 20 ปีข้างหน้า ทั้งนี้ผู้สูงอายุ จะมีปัญหาทั้งทางด้านสุขภาพร่างกาย ช่องปากและทางด้านจิตใจ ทำให้การเจ็บป่วยในผู้สูงอายุจำเป็นต้องพิจารณาให้ครอบคลุมหลายด้าน เพื่อให้ได้การรักษาที่ดีส่งผลถึงคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น ปัญหาที่สำคัญไม่ได้อยู่ที่มีจำนวนเพิ่มเพียงอย่างเดียว หากแต่เป็นการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว สมควรมีการเตรียมพร้อมในการรับมือ ในการนี้ประเทศไทยยังขาดแคลนบุคลากรที่มีความรู้ความสามารถในสาขาวิชาทันตกรรมผู้สูงอายุและการดูแลผู้ป่วยพิเศษ โดยเฉพาะบุคลากรในสังกัดกระทรวงสาธารณสุข คณาจารย์ผู้ทำหน้าที่รับผิดชอบทางด้านการเรียนการสอนและการวิจัยเป็นหลัก นอกจากนี้หน่วยราชการต่างๆ ยังมีความต้องการบุคลากรผู้มีความรู้ความสามารถในด้านนี้โดยเฉพาะ เพื่อรองรับสังคมผู้สูงอายุที่จะเกิดขึ้นในอนาคต

ดังนั้นเพื่อให้มีการบริการงานทันตกรรมในผู้สูงอายุเต็มรูปแบบที่คณะทันตแพทยศาสตร์ทุกสถาบันหรือหน่วยราชการต่างๆ จึงต้องส่งบุคลากรไปศึกษาต่อ ณ ต่างประเทศ ในระดับมหาบัณฑิต ซึ่งต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงและใช้เวลาในการศึกษานาน ประกอบกับหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาทันตกรรมผู้สูงอายุและการดูแลผู้ป่วยพิเศษ ยังไม่เคยมีการเปิดสอนในมหาวิทยาลัยในประเทศไทยมาก่อน จึงเห็นควรที่คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อันเป็นสถานศึกษาที่มีศักยภาพในการเป็นผู้นำทางด้าน

การศึกษาและการบริการต่อสังคมผู้สูงอายุและการดูแลผู้ป่วยพิเศษ มีความพร้อมทั้งด้านบุคลากรผู้สอน สถานที่ และความสัมพันธ์อันดีทั้งในระดับคณะ ระดับมหาวิทยาลัย และระดับนานาชาติ ควรที่จะเปิดหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตขึ้นเป็นครั้งแรกในประเทศไทย

ปัจจุบันมีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วมาก ทั้งทางด้านเศรษฐกิจ สังคม และเทคโนโลยี ที่มีผลกระทบต่อสภาวะความเป็นอยู่และสุขภาพของประชาชน ตลอดจนมีการเปลี่ยนแปลงองค์ความรู้ใหม่ เพื่อให้สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของวิชาการ และการเปลี่ยนแปลงของสังคมในยุคโลกาภิวัตน์นี้ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งมีภาระหน้าที่ส่วนหนึ่งต่อสังคมในการผลิตผู้มีความรู้ความชำนาญในด้านวิทยาการและการให้บริการสาขาวิชาทันตกรรมผู้สูงอายุและการดูแลผู้ป่วยพิเศษ และเพื่อตอบสนองความต้องการของหน่วยงานต่างๆ จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องเปิดหลักสูตรหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาทันตกรรมผู้สูงอายุและวางแผนการดูแลผู้ป่วยพิเศษ และยกระดับมาตรฐานการรักษาด้านทันตกรรมผู้สูงอายุให้ทัดเทียมกับมาตรฐานสากล โดยมีเป้าหมายสำคัญในการผลิตทันตแพทย์ที่มีทักษะ ความรู้ความชำนาญเฉพาะทางด้านทันตกรรมผู้สูงอายุและการดูแลผู้ป่วยพิเศษ ให้มีจำนวนเพิ่มมากขึ้น มุ่งเน้นให้นิสิตในหลักสูตรฯ ได้รับการฝึกฝนและพัฒนา ให้สามารถวางแผนและทำการรักษา รู้จักค้นคว้าหาความรู้ทางวิชาการด้วยตนเอง มีศักยภาพในการทำวิจัยเพื่อองค์ความรู้ใหม่และพัฒนาสู่นวัตกรรมทางด้านทันตกรรมผู้สูงอายุและการดูแลผู้ป่วยพิเศษ ทั้งนี้เมื่อสำเร็จการศึกษาแล้วสามารถพึ่งพาตนเองในการติดตามความก้าวหน้าทางวิชาการที่เป็นไปอย่างรวดเร็วความจำกัดของจำนวนทันตแพทย์สาขาทันตกรรมผู้สูงอายุและการดูแลผู้ป่วยพิเศษและจำนวนผู้ป่วยสูงอายุที่ต้องได้รับการดูแลมีจำนวนเพิ่มขึ้นมาก เนื่องจากผู้สูงอายุที่มีโรคทางระบบร่วมด้วย มีความจำเป็นที่จะต้องได้รับการรักษาจากทันตแพทย์เฉพาะทางที่มีความชำนาญ ตลอดจนขั้นตอนการรักษามีความซับซ้อน ต้องการความละเอียดและเอาใจใส่ที่มากขึ้นร่วมกับการวางแผนของการรักษาโรคทางระบบ

11.2 สถานการณ์หรือการพัฒนาทางสังคมและวัฒนธรรม

1. การให้บริการด้านทันตกรรมผู้สูงอายุและการดูแลผู้ป่วยพิเศษภายในประเทศไม่กระจายอย่างทั่วถึง
2. ความสามารถของทันตแพทย์ทั่วไปในการให้บริการด้านทันตกรรมผู้สูงอายุและการดูแลผู้ป่วยพิเศษยังไม่เพียงพอ
3. ผู้ป่วยผู้สูงอายุที่ต้องการรับการรักษาดูแลทางทันตกรรมมีจำนวนเพิ่มขึ้น และส่วนมากมีปัญหาเรื่องค่าใช้จ่ายและการเดินทาง เนื่องจากอยู่ในวัยเกษียณและอาจมีภาวะพึ่งพิงประกอบกับเป็นวัยที่มีโรคทางระบบที่ต้องพิจารณาร่วมด้วย นำไปสู่การวางแผนการรักษาซับซ้อนขึ้น

12. ผลกระทบจาก ข้อ 11.1 และ 11.2 ต่อการพัฒนาหลักสูตรและความเกี่ยวข้องกับพันธกิจของสถาบัน

12.1 การพัฒนาหลักสูตร

จากสถานการณ์ในปัจจุบันที่จำนวนผู้สูงอายุมีจำนวนมากขึ้นหากแต่ขาดทันตแพทย์ที่มีความสามารถในการดูแลรักษาทางทันตกรรมอย่างเป็นระบบ ประกอบกับองค์ความรู้ และเทคโนโลยีต่างๆที่เกิดขึ้นมีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว ทำให้ต้องเร่งผลิตทันตแพทย์ สาขาวิชาทันตกรรมผู้สูงอายุและการดูแลผู้ป่วยพิเศษ ให้มีจำนวนมากเพียงพอ เพื่อสามารถให้การรักษาผู้ป่วยสูงอายุในรายที่ซับซ้อนต้องการการดูแลอย่างละเอียด และพิถีพิถันได้อย่างทั่วถึง อันเป็นเหตุให้จำต้องเปิดและพัฒนาหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาทันตกรรมผู้สูงอายุและการดูแลผู้ป่วยพิเศษขึ้น และมีการพัฒนาองค์ความรู้ใหม่เพื่อผู้สูงอายุไทยและผู้ป่วยพิเศษ

12.2 ความเกี่ยวข้องกับพันธกิจของสถาบัน

เพื่อเป็นผู้นำด้านวิชาการและเป็นต้นแบบของสถานพยาบาลที่ให้การรักษาตลอดจนงานวิจัยในสาขาทันตกรรมผู้สูงอายุ ที่สามารถนำมาประยุกต์ในการรักษาผู้ป่วย และการผลิตนวัตกรรมทางทันตกรรมเพื่อใช้ในประเทศ เพื่อให้ผู้ป่วยสูงอายุและผู้ป่วยที่มีความต้องการพิเศษสามารถใช้ชีวิตอยู่อย่างมีคุณภาพชีวิตที่เหมาะสมได้

13. ความสัมพันธ์กับหลักสูตรอื่นที่เปิดสอนในคณะ/ภาควิชาอื่นของสถาบัน

13.1 รายวิชาของหลักสูตรอื่นที่นำมาบรรจุในหลักสูตรนี้

รายวิชาเลือก

3200711	ชีวเวชศาสตร์ 1
3200712	ชีวเวชศาสตร์ 2
3200713	วิธีวิทยาการวิจัยทางทันตแพทยศาสตร์
3200714	สถิติทางทันตแพทยศาสตร์
3211701	เวชศาสตร์ช่องปาก 1
3215781	ปริทันตวิทยาขั้นสูง 1
3215784	ปริทันตวิทยาขั้นสูง 4

13.2 รายวิชาของหลักสูตรนี้ที่หลักสูตรอื่นนำไปใช้ ไม่มี

***14. หลักสูตรที่นำมาใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาหลักสูตร**

14.1 หลักสูตรที่เสนอมีลักษณะคล้ายคลึงกับหลักสูตรอื่นที่เปิดสอนอยู่แล้วในจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

-ไม่มี-

14.2 หลักสูตรลักษณะนี้มีเปิดสอนอยู่แล้วที่มหาวิทยาลัยอื่นในประเทศ

-ไม่มี-

14.3 หลักสูตรของมหาวิทยาลัยในต่างประเทศที่ใช้ประกอบการพัฒนาหลักสูตรนี้ ได้แก่

Gerodontology and Oral Rehabilitation, Department of Gerontology and Gerodontology, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University

หมวดที่ 2. ข้อมูลเฉพาะของหลักสูตร

1. ปรัชญา ความสำคัญ วัตถุประสงค์ของหลักสูตร และคุณลักษณะบัณฑิตที่พึงประสงค์

1.1 ปรัชญาของหลักสูตร

สร้างบัณฑิตที่มีความชำนาญขั้นสูง และความรู้เหมาะสมที่จะเป็นอาจารย์ หรือวิทยากร ผู้ให้บริการทางวิชาการด้านทันตกรรมผู้สูงอายุและการดูแลผู้ป่วยพิเศษต่อสังคม และสามารถเพิ่มพูนความรู้ถึงระดับดุษฎีบัณฑิต หรือผู้เชี่ยวชาญ มีคุณธรรม จริยธรรม มีทัศนคติที่ดีต่อผู้สูงอายุและผู้ป่วยที่มีความต้องการพิเศษ เพื่อรองรับการให้การรักษาทางทันตกรรมแก่ผู้สูงอายุที่มีความยุ่งยากและซับซ้อนของปัญหาสุขภาพช่องปากและฟันร่วมกับปัญหาสุขภาพร่างกาย

1.2 ความสำคัญของหลักสูตร

เป็นหลักสูตรที่ผลิตบัณฑิตให้มีความสามารถในระดับที่สูงขึ้นทางสาขาวิชาทันตกรรมผู้สูงอายุและการดูแลผู้ป่วยพิเศษ ทั้งในด้านการดูแลรักษาผู้ป่วยและการทำวิจัย

1.3 วัตถุประสงค์ของหลักสูตร

1.3.1. เพื่อผลิตบัณฑิตสาขาวิชาทันตกรรมผู้สูงอายุและการดูแลผู้ป่วยพิเศษ ที่สามารถวางแผนและ ให้การรักษาสุขภาพในช่องปากของผู้สูงอายุในรายที่มีปัญหาซับซ้อนร่วมกับโรคทางระบบ

1.3.2. เพื่อสร้างองค์ความรู้ใหม่สาขาวิชาทันตกรรมผู้สูงอายุและการดูแลผู้ป่วยพิเศษ ทางด้านการรักษาและนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุดกับผู้ป่วย

*1.4 คุณลักษณะบัณฑิตที่พึงประสงค์

คุณลักษณะบัณฑิตที่พึงประสงค์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย คือ บัณฑิตจุฬาฯ เป็นผู้ที่มีคุณค่าของสังคมโลก ซึ่งประกอบด้วย 9 องค์ประกอบ 14 ประเด็น ดังนี้ 1. มีความรู้ (รู้รอบ รู้ลึก) 2. มีคุณธรรม (มีคุณธรรมและจริยธรรม มีจรรยาบรรณ) 3. คิดเป็น (สามารถคิดอย่างมีวิจารณญาณ สามารถคิดริเริ่มสร้างสรรค์ มีทักษะในการคิดแก้ปัญหา) 4. ทำเป็น (มีทักษะทางวิชาชีพ มีทักษะทางการสื่อสาร มีทักษะทางเทคโนโลยีสารสนเทศ มีทักษะทางคณิตศาสตร์และสถิติ มีทักษะการบริหารจัดการ) 5. ใฝ่รู้และรู้จักวิธีการเรียนรู้ (ใฝ่รู้ รู้จักวิธีการเรียนรู้) 6. มีภาวะผู้นำ 7. มีสุขภาวะ 8. มีจิตอาสาและสำนึกสาธารณะ 9. ดำรงความเป็นไทยในกระแสโลกาภิวัตน์

สำหรับคุณลักษณะบัณฑิตที่พึงประสงค์ของหลักสูตรมีลักษณะเด่น คือ เป็นทันตแพทย์ที่มีความรอบรู้ในเรื่องของศาสตร์และศิลป์ในสาขาวิชาทันตกรรมต่างๆ และสามารถเชื่อมโยงกับองค์ความรู้ทางการแพทย์ เพื่อใช้ในการวางแผนและให้การรักษา ฟื้นฟู และคงอยู่ของทันตสุขภาพของผู้สูงอายุและผู้ที่มีความต้องการพิเศษ สามารถทำงานเป็นทีมได้

2. แผนพัฒนาปรับปรุง

แผนการพัฒนา/เปลี่ยนแปลง	กลยุทธ์	หลักฐาน/ตัวบ่งชี้
ปรับปรุงหลักสูตรให้มีมาตรฐาน	พัฒนาหลักสูตร โดยมีพื้นฐานจาก	มีเอกสารการปรับปรุงหลักสูตรและ

ไม่ต่ำกว่าเกณฑ์ที่ สกอ.กำหนด	หลักสูตรในระดับสากล มีการติดตามประเมินหลักสูตรอย่างสม่ำเสมอ	รายงานผลการประเมินหลักสูตร
ปรับปรุงหลักสูตรให้สอดคล้องกับความต้องการของทันตแพทย์และสังคม รวมถึงการเปลี่ยนแปลงของเทคโนโลยีทางทันตกรรมผู้สูงอายุและการดูแลผู้ป่วยพิเศษ	ติดตามความเปลี่ยนแปลงของสังคมและเทคโนโลยีทางทันตกรรมผู้สูงอายุและการดูแลผู้ป่วยพิเศษ	รายงานผลการประเมินความพึงพอใจในการใช้บัณฑิตและความพึงพอใจในทักษะ ความรู้ความสามารถของบัณฑิต
พัฒนาบุคลากรด้านการเรียนการสอนและการบริการวิชาการให้มีประสบการณ์จากการนำความรู้ทางทันตกรรมผู้สูงอายุและการดูแลผู้ป่วยพิเศษไปปฏิบัติงานจริง	สนับสนุนบุคลากรด้านการเรียนการสอนให้บริการงานวิชาการแก่สถาบัน และงานประชุมวิชาการต่างๆ จัดให้มีโครงการการศึกษาต่อเนื่อง	ปริมาณงานบริการวิชาการต่ออาจารย์ในหลักสูตร

หมวดที่ 3. ระบบการจัดการศึกษาการดำเนินการและโครงสร้างของหลักสูตร

1. ระบบการจัดการศึกษา

1.1 ระบบ

■ ระบบทวิภาค (นานาชาติ) ภาคการศึกษาละไม่น้อยกว่า 15 สัปดาห์

1.2 การจัดการศึกษาภาคฤดูร้อน

■ ไม่มีภาคฤดูร้อน

1.3 การเทียบเคียงหน่วยกิตในระบบทวิภาค

-ไม่มี-

*1.4 การลงทะเบียนเรียน

■ ระดับบัณฑิตศึกษา ภาคการศึกษาปกติไม่เกิน 15 หน่วยกิต

2. การดำเนินการหลักสูตร

2.1 วัน-เวลาในการดำเนินการเรียนการสอน

ระบบทวิภาค (นานาชาติ) ภาคการศึกษาต้น : สิงหาคม - ธันวาคม

ภาคการศึกษาปลาย : มกราคม - พฤษภาคม

2.2 คุณสมบัติของผู้เข้าศึกษา

1. ได้รับปริญญาทันตแพทยศาสตรบัณฑิตจากคณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หรือมหาวิทยาลัยอื่น ๆ ที่กระทรวงศึกษาธิการและ/หรือทันตแพทยสภา รับรอง และได้จดทะเบียนประกอบวิชาชีพทันตกรรมในประเทศไทย และได้ปฏิบัติงานทางด้านทันตกรรมมาแล้วไม่น้อยกว่า 1 ปี

2. คุณสมบัติอื่นๆ เป็นไปตามประกาศ ซึ่งบัณฑิตวิทยาลัยจะประกาศให้ทราบเป็นปีๆ ไป หรือกรรมการบริหารหลักสูตรพิจารณาแล้วเห็นสมควรให้มีสิทธิสมัครเข้าศึกษาได้

*** การคัดเลือกผู้เข้าศึกษา**

หลักสูตรระดับบัณฑิตศึกษา เป็นไปตามคู่มือการสมัครเข้าศึกษาซึ่งบัณฑิตวิทยาลัยจะประกาศให้ทราบในปีการศึกษานั้น หรือคณะกรรมการบริหารหลักสูตรฯ พิจารณาแล้วเห็นสมควรรับเข้าศึกษาได้

2.3 ปัญหาของนิสิตแรกเข้า

การทำงานร่วมกับทีมแพทย์และทันตแพทย์ ปัญหาในเรื่องของทักษะและความสามารถในการใช้ภาษาอังกฤษของนิสิต เนื่องจากตำรา บทความวิชาการที่ใช้ประกอบการเรียนการสอนและการทำวิทยานิพนธ์เป็นภาษาอังกฤษ นอกจากนี้ยังมีปัญหาในเรื่องของการใช้เทคโนโลยีสารสนเทศประกอบการทำวิทยานิพนธ์

2.4 กลยุทธ์ในการดำเนินการเพื่อแก้ไขปัญหา/ข้อจำกัดของนิสิตในข้อ 2.3

กำหนดให้ต้องมีประสบการณ์การทำงานในโรงพยาบาลของรัฐ หรือเอกชน อย่างน้อย 1 ปี กำหนดให้นิสิตผู้ที่จะเข้าศึกษา จะต้องมีการสอบวัดทักษะความสามารถภาษาอังกฤษอยู่ในระดับดีหรือมีผลสอบวัดมาตรฐานไม่ต่ำกว่าเกณฑ์ที่บัณฑิตวิทยาลัยกำหนด และสนับสนุนให้นิสิตเข้ารับการฝึกอบรมการใช้เทคโนโลยีสารสนเทศที่เกี่ยวข้อง

3. หลักสูตรและอาจารย์ผู้สอน

3.1 หลักสูตร

3.1.1 จำนวนหน่วยกิตรวมตลอดหลักสูตร

แผน ก แบบ ก 1	40	หน่วยกิต
แผน ก แบบ ก 2	40	หน่วยกิต
ระยะเวลาการศึกษา 2 ปี		

3.1.2 โครงสร้างหลักสูตร

	แผน ก แบบ ก 1	แผน ก แบบ ก 2
จำนวนหน่วยกิตรวมตลอดหลักสูตร	40	40
จำนวนหน่วยกิตรายวิชาเรียน	-	28
- รายวิชาบังคับ	-	8
- รายวิชาปฏิบัติการคลินิก	-	18
- รายวิชาเลือก	-	2

	จำนวนหน่วยกิตวิทยานิพนธ์	40 12

3.1.3 รายวิชา

แผน ก แบบ ก 2

	1) รายวิชาบังคับ	**8 หน่วยกิต**
3200770*	การบริหารจัดการทางทันตกรรมในผู้ป่วยสูงอายุที่มีโรคทางระบบ Dental Management in Medically Compromised Geriatric Patients	1(1-0-3)
3200771*	ทันตกรรมผู้สูงอายุขั้นสูง 1 Advanced Geriatric Dentistry I	1(1-0-3)
3200772*	ทันตกรรมผู้สูงอายุขั้นสูง 2 Advanced Geriatric Dentistry II	1(1-0-3)
3200773*	การสร้างเสริมสุขภาพและการป้องกันโรคในช่องปากผู้สูงอายุ Oral Health Promotion and Prevention in Elderly	1(1-0-3)
3200774*	สัมมนาทันตกรรมผู้สูงอายุขั้นสูง 2 Advanced Geriatric Dentistry Seminar II	1(1-0-3)
3207748*	สัมมนาทันตกรรมผู้สูงอายุขั้นสูง 1 Advanced Geriatric Dentistry Seminar I	1(1-0-3)
3207749*	สัมนาทันตกรรมสำหรับผู้ที่มีความต้องการพิเศษ Special Care Dentistry Seminar	1(1-0-3)
3207750*	การรักษาทางทันตกรรมประดิษฐ์ในผู้สูงอายุ Prosthodontics Treatment in the Elderly	1(1-0-3)
	2) รายวิชาปฏิบัติการคลินิก	**18 หน่วยกิต**
3200775*	คลินิกทันตกรรมผู้สูงอายุและการดูแลผู้ป่วยพิเศษ 1 Geriatric Dentistry and Special Patients Care Clinic I	4(0-12-4)
3200776*	คลินิกทันตกรรมผู้สูงอายุและการดูแลผู้ป่วยพิเศษ 2 Geriatric Dentistry and Special Patients Care Clinic II	4(0-12-4)
3200777*	คลินิกทันตกรรมผู้สูงอายุและการดูแลผู้ป่วยพิเศษ 3 Geriatric Dentistry and Special Patients Care Clinic III	5(0-15-5)
3200778*	คลินิกทันตกรรมผู้สูงอายุและการดูแลผู้ป่วยพิเศษ 4 Geriatric Dentistry and Special Patients Care Clinic IV	5(0-15-5)
	3) รายวิชาเลือก	**2 หน่วยกิต**

3200711 ชีวเวชศาสตร์ 1 2(2-0-6)

Biomedical Science I

3200712 ชีวเวชศาสตร์ 2 2(2-0-6)

Biomedical Science II

3200713 วิธีวิทยาการวิจัยทางทันตแพทยศาสตร์ 2(2-0-6)

Research Methodology in Dentistry

3200714 สถิติทางทันตแพทยศาสตร์ 2(2-0-6)

Statistics in Dentistry

* รายวิชาเปิดใหม่

3211701 เวชศาสตร์ช่องปาก 1 1(1-0-3)

Oral Medicine I

3215781 ปริทันตวิทยาขั้นสูง 1 2(2-0-6)

Advanced Periodontology I

3215784 ปริทันตวิทยาขั้นสูง 4 2(2-0-6)

Advanced Periodontology IV

นอกจากรายวิชาที่กล่าวข้างต้น นิสิตสามารถเลือกเรียนรายวิชาระดับบัณฑิตศึกษา ของคณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยได้รับความเห็นชอบจากคณะกรรมการบริหารหลักสูตร

วิทยานิพนธ์

3200811 วิทยานิพนธ์ (แผน ก แบบ ก 2) 12 หน่วยกิต

Thesis

3200817* วิทยานิพนธ์ (แผน ก แบบ ก 1) 40 หน่วยกิต

Thesis

3.1.4 แผนการศึกษา

<u>แผน ก แบบ ก 1</u>

ปีที่ 1 ภาคการศึกษาที่ 1 **หน่วยกิต**

3200817* วิทยานิพนธ์ 10

หน่วยกิตรวม **<u>10</u>**

ปีที่ 1 ภาคการศึกษาที่ 2

3200817* วิทยานิพนธ์ 10

หน่วยกิตรวม **<u>10</u>**

ปีที่ 2 ภาคการศึกษาที่ 1

3200817*	วิทยานิพนธ์	10
	หน่วยกิตรวม	**10**

ปีที่ 2 ภาคการศึกษาที่ 2

3200817*	วิทยานิพนธ์	10
	หน่วยกิตรวม	**10**

แผน ก แบบ ก2

ปีที่ 1 ภาคการศึกษาที่ 1		**หน่วยกิต**
3200770*	การบริหารจัดการทางทันตกรรมในผู้ป่วยสูงอายุที่มีโรคทางระบบ	1
3200771*	ทันตกรรมผู้สูงอายุขั้นสูง 1	1
3200775*	คลินิกทันตกรรมผู้สูงอายุและการดูแลผู้ป่วยพิเศษ 1	4
3207748*	สัมมนาทันตกรรมผู้สูงอายุขั้นสูง 1	1
3200811	วิทยานิพนธ์	2
	วิชาเลือก	1
	หน่วยกิตรวม	**10**

* รายวิชาเปิดใหม่

ปีที่ 1 ภาคการศึกษาที่ 2		**หน่วยกิต**
3200772*	ทันตกรรมผู้สูงอายุขั้นสูง 2	1
3200773*	การสร้างเสริมสุขภาพและการป้องกันโรคในช่องปากผู้สูงอายุ	1
3207749*	สัมมนาทันตกรรมสำหรับผู้ที่มีความต้องการพิเศษ	1
3207750*	การรักษาทางทันตกรรมประดิษฐ์ในผู้สูงอายุ	1
3200776*	คลินิกทันตกรรมผู้สูงอายุและการดูแลผู้ป่วยพิเศษ 2	4
3200811	วิทยานิพนธ์	2
	วิชาเลือก	1
	หน่วยกิตรวม	**11**

ปีที่ 2 ภาคการศึกษาที่ 1		**หน่วยกิต**
3200774*	สัมมนาทันตกรรมผู้สูงอายุขั้นสูง 2	1
3200777*	คลินิกทันตกรรมผู้สูงอายุและการดูแลผู้ป่วยพิเศษ 3	5
3200811	วิทยานิพนธ์	4

	หน่วยกิตรวม	**10**
ปีที่ 2 ภาคการศึกษาที่ 2		**หน่วยกิต**
3200778*	คลินิกทันตกรรมผู้สูงอายุและการดูแลผู้ป่วยพิเศษ 4	5
3200811	วิทยานิพนธ์	4
	หน่วยกิตรวม	**9**

4.9 การจัดบรรยายและสัมมนาเพื่อเป็นเวทีถ่ายทอดความรู้และอภิปราย

FDCU International Symposium 2021 จัดร่วมกับงานวันวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ครั้งที่ 33

1.1 ชื่องานประชุม

FDCU International Symposium 2021 จัดร่วมกับงานวันวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ครั้งที่ 33

1.2 หน่วยงานที่รับผิดชอบ

ฝ่ายวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.3 ระยะเวลา

1 วัน (วันจันทร์ที่ 24 พฤษภาคม 2564)

1.4 สถานที่จัดการประชุม

Virtual Meeting Symposium (Webinar and Zoom meeting)

1.5 หลักการและเหตุผล

1.5.1 ปัญหาของกลุ่มเป้าหมาย

1.5.1.1 การเผยแพร่ผลงานจากการดำเนินการโครงการวิจัยเป็นสิ่งสำคัญ เพื่อเป็นการต่อยอดความรู้ที่มีอยู่เดิม หรือเผยเพร่องค์ความรู้ใหม่

1.5.1.2 การนำเสนอผลงานในระดับนานาชาติเป็นตัวชี้วัดที่สำคัญในการให้ได้รับการยอมรับในระดับนานาชาติ ดังนั้น เมื่อหน่วยงานในคณะฯ เป็นเจ้าภาพในการจัดประชุม จะทำให้คณะฯ ได้เปิดตัวให้นานาชาติรู้จักงานวิจัยของคณาจารย์ในคณะฯ และรู้จักคณะฯ มากยิ่งขึ้น

1.5.2 ปัญหาส่งผลกระทบอย่างไร

คณะฯ ยังไม่เป็นที่รู้จักในระดับนานาชาติอย่างกว้างขวาง

1.5.3 แนวทางแก้ไขปัญหา

การเป็นเจ้าภาพในการจัดประชุม จะทำให้คณะฯ ได้เปิดตัวให้นานาชาติรู้จักงานวิจัยของคณาจารย์ในคณะฯ และรู้จักคณะฯ มากยิ่งขึ้น

1.6 วัตถุประสงค์ของการจัดการประชุม

1.6.1 สร้างความสัมพันธ์ และปฏิสัมพันธ์ระหว่าง นิสิต อาจารย์และนักวิจัย

1.6.2 นิสิต อาจารย์ และนักวิจัยได้นำเสนอความก้าวหน้าทางด้านงานวิจัย

1.6.3 เพื่อให้นิสิตมีความสามารถในการนำเสนอผลงานวิจัยในที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

1.6.4 เพื่อให้อาจารย์และนิสิตได้มีส่วนร่วมในกิจกรรมส่งเสริมการวิจัยของคณะฯ

1.6.5 เพื่อให้นิสิตสามารถนำความรู้ด้านวิจัยไปใช้ในการผลิตองค์ความรู้ใหม่ซึ่งเป็นประโยชน์แก่สังคมและประเทศชาติ

1.6.6 ประชาสัมพันธ์คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาฯ ให้เป็นที่รู้จักมากขึ้น

1.6.7 ส่งเสริมการสร้างชื่อเสียงของคณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาฯ ในระดับนานาชาติ

1.6.8 การส่งเสริมและผลักดันการประกวดผลงานวิจัยของนิสิต และอาจารย์คณะทันตแพทยศาสตร์

1.7 กิจกรรมการจัดงานประชุม

ชื่อกิจกรรม	**ประเภทกิจกรรม**	**วันที่**	**ระยะเวลาดำเนินงาน (ชั่วโมง(**
1. วางแผนการจัดกิจกรรม (Plan)	กำหนดรูปแบบการจัด Symposium	15 มีนาคม ถึง 31 มีนาคม 2564	1 ชั่วโมง
	กำหนดมหาวิทยาลัยต่างประเทศที่เป็นเป้าหมาย	16 มีนาคม ถึง 31 มีนาคม 2564	1 ชั่วโมง
	ทบทวนหลักการและรูปแบบกิจกรรม	17 มีนาคม ถึง 31 มีนาคม 2564	1 ชั่วโมง
2. การดำเนินงาน (Do)	ติดต่อเชิญ speaker และ student presenter จากมหาวิทยาลัยต่างประเทศ	1 เมษายน ถึง 30 เมษายน 2564	15 ชั่วโมง
	จัดทำ abstract book และระบบการออนไลน์	1 พฤษภาคม ถึง 20 พฤษภาคม 2564	30 ชั่วโมง
	ประชาสัมพันธ์กิจกรรม	1 พฤษภาคม ถึง 24 พฤษภาคม 2564	14 ชั่วโมง
	จัด online symposium	24 พฤษภาคม 2564	8 ชั่วโมง
	ประกวดผลงานวิจัยของนิสิตคณะทันตแพทยศาสตร์	24 พฤษภาคม 2564	3 ชั่วโมง

3. ประเมินผลการจัดกิจกรรม (Check)	ประเมินความพึงพอใจในการจัดกิจกรรมจากผู้ร่วมงาน	24 พฤษภาคม 2564	1 ชั่วโมง
	ประชุมประเมิน output ของการจัดงาน	มิถุนายน 2564	1 ชั่วโมง
4. การดำเนินการหลังการประเมินงาน (Act)	ประชุมรวบรวมผลการประเมินเพื่อวางแนวทางการจัดหรือปรับปรุงแก้ไขในครั้งต่อไป	มิถุนายน 2564	1 ชั่วโมง
	สรุปผลการดำเนินงานต่อกรรมการคณะ		

1.8 รูปแบบงานประชุม

Webinar and Zoom meeting

1.9 ผู้เข้าร่วมการประชุมที่คาดหวัง

1.9.1 ผู้แทนจาก Tokyo Medical and Dental University จำนวน 3 คน

1.9.2 ผู้แทนจาก Tohoku University จำนวน 3 คน

1.9.3 ผู้แทนจาก University of Indonesia จำนวน 3 คน

1.9.4 ผู้แทนจาก University of Sumatera Utara จำนวน 3 คน

1.9.5 ผู้แทนจาก University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City จำนวน 3 คน

1.9.6 ผู้แทนจาก University of Malaya จำนวน 3 คน

1.9.7 ผู้แทนจาก Guangxi Medical University, College of Stomatology จำนวน 3 คน

1.9.8 คณาจารย์ นิสิต และบุคลากรในคณะฯ จำนวน 250 คน

ส่วนที่ 2
ขั้นตอนการดำเนินงาน

2.1 ขั้นตอนก่อนการจัดการประชุม

2.1.1 ประชุมคณะกรรมการวิจัย

2.1.2 ติดต่อบริษัทจัดทำระบบประชุมออนไลน์ และWebinar

2.1.3 ติดต่อกลุ่มเป้าหมาย และผู้ร่วมโครงการ

2.1.4 จัดเตรียมห้องประชุม

2.1.5 ประชาสัมพันธ์

2.1.6 จัดทำกำหนดการประชุม

2.2 ขั้นตอนการดำเนินการประชุม

Program Schedule

May 24th, 2021

8.30 Virtual Event registration

8.45 Opening Remark

Associate Professor Dr. Pornchai Jansisyanont, DDS, MS, PhD

Dean, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Thailand

9.00-10.00 **Keynote Speaker**

Associate Professor Dr. Nikos Mattheos, DDS, MSc (Health Inf), MASc (Perio), PhD

Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Thailand

"Success and failure with oral rehabilitation: in the mind of a patient!"

10.00-12.00 Invited Speakers and Oral Presentation

Oral Session Room 1	Oral Session Room 2	Oral Session Room 3	
Invited Speakers			
10.00-10.20 **Single-cell whole-transcriptome analysis in oral cancer** Huynh Cong Nhat Nam University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City, Vietnam	10.00-10.20 **Immediate placement and immediate loading of full edentulous arches in 20 periodontally compromised patients – in-line clinical case series with 3 years follow-up** Tran Hung Lam Vanlang University, Vietnam	10.00-10.20 **Oral health and Systemic diseases** Renchuan Tao Guangxi Medical University College of Stomatology, China	**Close Session** **FDCU Research Day Inhouse Competition** For FDCU students, by invitation only
10.20-10.40 **Application of cellular engineering and bio-imaging methods for the skeletal muscle**	10.20-10.40 **Effect of Betel Quid Chewing on Salivary Nitric Oxide Levels and Its Association with Oral Lesion of**	10.20-10.40 **Tunnel Approach versus Coronally Advanced Flap in Treating Gingival Recessions: A**	

microenvironment study Chayanit Chaweewannakorn Chulalongkorn University, Thailand	**Batak Karo Woman in Karo District of Sumatera Utara Province Indonesia** Sondang Pintauli University of Sumatera Utara, Indonesia	**Systematic Review** Nor Shafina Mohamed Nazari University of Malaya, Malaysia	
10.40-11.00 **“TBA”** Citra Fragantia Theodorea University of Indonesia, Indonesia	10.40-11.00 **Expression of PDGF-BB in rat gingiva receiving intragingival injection of modified mRNA encoding PDGF-BB: A Pilot Study** Wichaya Wisitrasameewong Chulalongkorn University, Thailand	10.40-11.00 **Development of Manipulation Methods of iPSCs for Prospective Bone Regeneration** Phoonsuk Limraksasin Tohoku University, Japan	
Invited Student Presenters			
11.00-11.12 **Analysis of Growth Factor Expression of Wistar Rats with Diabetes Mellitus after Tooth Extraction** Devy Putri Kusumawardhani Universitas Airlangga, Indonesia	11.00-11.12 **Discrimination of Microbial Community Structure among Periodontitis, Gingivitis, and Healthy Statuses with Integrated Metatranscriptomic and Network Analysis** Takashi Nemoto	11.00-11.12 **Effect of Environmental pH on Viscoelastic Properties of Bioactive Restorative Materials: A Dynamic Mechanical Analysis** Ong JEX University of Malaya, Malaysia	

	Tokyo Medical and Dental University, Japan		
11.12-11.24 **The Mechanism of Coconut Shell-Liquid Smoke as Oral Ulcer Remedies** Kelvin Alfan Nola Anggrarista Universitas Airlangga, Indonesia	11.12-11.24 **Notch-Wnt signaling crosstalk in modulation of odonto/osteogenic differentiation in hDPs** Chatvadee Kornsuthisopon Chulalongkorn University, Thailand	11.12-11.24 **Does the Incorporation of Green Capping Agent Enhance the Biochemical Properties of Silver Diamine Fluoride?** Mehmood Asghar University of Malaya, Malaysia	
11.24-11.36 **“TBA”** Ms. Guo Kunyao Guangxi Guangxi Medical University College of Stomatology, China	11.24-11.36 **Dlx5-augmentation in neural crest cells reveals early development and differentiation potential of mouse apical head mesenchyme** Vu Hoang Tri University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City, Vietnam	11.24-11.36 **Oral status and the incidence of dementia: Mediation of nutritional and social factors** Sakura Kiuchi Tohoku University, Japan	
11.36-11.48 **Effect Of Hydroxyapatite Synthesized From**	11.36-11.48 **Activity of Fibroblast Growth Factor 18 on Macrophage**	11.36-11.48 **Adult Age Estimation In A Group Of Thai Population By Tooth**	

Nila Fish Scale Waste On The Shear Bond Strength Of Resin Modified Glass Ionomer Cement To Email Layer (In Vitro Study) Dinda Andaru Wirsa University of Sumatera Utara, Indonesia	**Activation and Calvarial Bone Healing** Worachat Namangkalakul Tokyo Medical and Dental University, Japan	**Coronal Index and Coronal Pulp/Tooth Area Ratio from Horizontal Bitewing Radiographs** Nguyen Hung Khanh University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City, Vietnam	
11.48-12.00 **Knowledges, Perceptions, Attitudes, and Preparedness of Indonesian Dental Co-Assistant Students About COVID-19 Disease and Infection Control** Nabila Daneta Putri Universitas Indonesia, Indonesia	11.48-12.00 **Role of *Amelx* Activation in Stepwise Ameloblast Induction from Mouse Induced Pluripotent Stem Cells** Xinchao Miao Tohoku University, Japan	11.48-12.00 **“TBA”** Ms. Wu Tiantian (postgraduate) Guangxi Medical University College of Stomatology, China	
12.00-12.12 **Evaluation and Satisfaction of Dentistry Students in University of Indonesia towards**			

Online Learning during the COVID-19 Pandemic Syafira Irviana Nawir Universitas Indonesia, Indonesia			

12.00-13.00 Lunch Break

13.00-13.30 **Keynote Speaker**

Prof. Haruka Tohara, DDS, PhD

Section of Dysphagia Rehabilitation, Department of Gerontology and Gerodontology

Tokyo Medical and Dental University, Japan

"Outline of dysphagia and our recent researches"

13.30-14.00 Dr. Nareudee Limpuangthip, DDS, PhD

Department of Prosthodontics, Faculty of Dentistry,

Chulalongkorn University, Thailand

"Dysphagia and oral hypofunction: current research and practice"

14.00-15.30 Oral Presentation

Oral Session Room 1	Oral Session Room 2	Oral Session Room 3
14.00-14.10 Comparing solubility of triamcinolone mucoadhesive patches by novel artificial saliva dispenser Khunlerdamorn K, Lertpanyanuch N, Pakornsajjanun N, Bhalang K, Limjeerajarus N, Limjeerajarus C	14.00-14.10 Wear resistance and micro-hardness between 2 different bulk-fill resin composites using chewing simulator Udomkoon N, Leenanon T, Boomperm W, Srimaneepong V	14.00-14.10 Using Feedback to Enhance learning in Operative Dentistry Clinic Sujitrom J, Chulamanee P, Suppawawisit N, Vacharaksa A
14.10-14.20	14.10-14.20	14.10-14.20

Synergistic effect of chlorhexidine gluconate and citronellal against *Streptococcus mutans* Charoenwattanawinyu N, Luangwutiwong P, Limwongthong P, Piboonratanakit P, Thanyasrisang P, Sucharitakul J	Color stability, water sorption and water solubility of gingival indirect composite resins after coffee immersion Rungaphacharaskul Y, Foosiri S, Fang M, Kamonkhantikul K	Chulalongkorn University dental students' opinions on soft skills components according to Thai Dental Council's competency standards of dental professionals Sata P, Chae F, Kasevayuth K
14.20-14.30 The impact of 2017 WHO Classification changes on the prevalence of Odontogenic Tumors : A 35-years retrospective study Booncharoensinchai S, Rerkchaimongkol J, Mahaphan N, Vipismakul V	14.20-14.30 Radiographic analysis of maxillofacial bone lesions: A comparison between panoramic and CBCT Rodwanno S, Choysungnern S, Silkosessak O	14.20-14.30 Are educators too conservative or are students too fashionable? Identifying professionally-appropriate attire for undergraduate dental students at the Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University. Bhusidin P, Yoopree I, Chuenjitwongsa S
14.30-14.40 A retrospective analysis of gingival lesions from Chulalongkorn Dental School Boonkhanasan S, Kasarat P, Nateetaweewat P, Dhanuthai K	14.30-14.40 Comparison of Dental Age between Cleft Lip and/or Palate and Non-Cleft Children and Adolescents in Thailand Nonthitipong W, Suttapirom P, Tharapanich H, Sinpitaksakul P, Pittayapat P	14.30-14.40 Sixteen personalities in postgraduate and undergraduate dental students in Chulalongkorn University Srikasikul T, Anuntaramporn P, Yongsathianchot P, Chantarangsu S
14.40-14.50	14.40-14.50	14.40-14.50

Comparison in antibacterial and antibiofilm effect on E. faecalis between using 17% EDTA and Normal saline solution as a final flush Shotelersuk V, Leelahawong N, Tangworanigoonkit N, Ampornaramveth RS, Chivatxaranukul P	Radiographic Features of Intraosseous Benign Lesions of the Jaws: Precise Diagnosis by CBCT Analysis Malikhao N, Srivichien N, Chawanratikun S, Charoenlarp P	Stress and Burnout of Undergraduate Dental Students Yuera M, Chanpeng R, Suwannarat W, Petdachai S, Subbalekha K
14.50-15.00 Surface modification and characteristics on sandblasted and acid-etched together with anodized-treated titanium surface for dental implants	14.50-15.00 Effect of drinking and eating after fluoride varnish application on saliva fluoride level Ruangturakit V, Jiraritthumrong K, Pakdeemeechai S, Songsiripradubboon S	14.50-15.00 The Effectiveness of the Instruction Media: Animation Promotes Oral Health Knowledge of Bangkok Prathomnonsri School Grade 1-3 Student in Bangkok metropolis Phuangtong S, Khlambu A, Hayeeteh U, Pisarnturakit P
15.00-15.10 Biological evaluation of herbal mouthwashes containing ginseng extract on human gingival fibroblasts Tansiri N, Ruensukon T, Hatsadaloi W, Trachoo V, Lochaiwatana Y, Laiteerapong A	15.00-15.10 The comparison of wear behavior between Poly(methyl methacrylate) occlusal splint and tooth structure Ekrojanakul C, Harikul T, Kositvanich R, Potewiratnanond P	15.00-15.10 Mechanical Properties and Fluoride Release of Titanium Dioxide and Zirconium Dioxide Nanoparticles Modified Glass Ionomer Cements Sarapath S, Chaiyaprukdecha K, Piyawaradech P, Nantanapiboon D
15.10-15.20		

Prevention of salivary gland epithelial hypofunction after radiotherapy with 10% trehalose compound containing epigallocatechin-3-gallate Saipin N, Sanitwong Na Ayudhaya F, Chanchaipattana P, Maison K, Vacharaksa A, N. Ferreira J		

15.30-16.00 Award Announcement for Student Research Competition

Closing Remark

2.3 ขั้นตอนหลังการจัดการประชุม

2.3.1 ผู้เข้าร่วมประชุมประเมินความพึงพอใจ

2.3.2 มอบรางวัล

ส่วนที่ 3

ผลการดำเนินงาน

ตัวชี้วัด	เป้าหมาย	ผลดำเนินการ
1. จำนวนมหาวิทยาลัยต่างประเทศที่เข้าร่วมประชุม (Thai Universities: Chiangmai University, Chulalongkorn University, Khonkhan University, KMITL, Mahidol University, Naresuan University, Prince Songkla University, Srinakarinwirot University, Rangsit University, Western University) (International Universities: Dalian Medical University, Defense Service Medical Academy, Kurukshetra University, Lotus Dental Art, National Taiwan University, National University of Malaysia, New York University, University of Sumatera Ultara, Tokyo Medical and Dental University, Tohoku University, National Autonoous University of Honduras, Universitas Airlangga, Universitas Indonesia, Universitas Padjadjaran, University of Dental Medicine Yangon, University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City, University of Health Science, University of Helsinki, University of Hong Kong, University of Malaya, University of the Philippines, Vanlang	7 สถาบัน	34 สถาบัน

Univesity, Gaungxi Medical University)		
2. จำนวน Invited speaker/presenter	21 คน	28 คน
3. จำนวนผู้เข้าร่วมประชุม 3.1 จำนวนผู้เข้าร่วมประชุมไทย 3.2 จำนวนผู้เข้าร่วมประชุมต่างชาติ (Cambodia, China, Egypt, Finland, Grenada, Honduras, India, Indonesia, Japan, Malaysia, Myanmar, Pakistan, Philippines, Singapore, Taiwan, Thailand, USA, Vietnam)	300 คน	422 คน 258 184

4.10 โครงการจัดอบรมระยะสั้นทันตกรรมผู้สูงอายุ

หลักการและเหตุผล

สังคม ไทยเป็นสังคมที่กำลัง ก้าวสู่ เข้า สังคมผู้สูงอายุเช่นเดียวกับประเทศอื่นๆที่พัฒนาแล้ว การที่คนในสังคมมีอายุยืนยาวเป็นตัวบ่งชี้ว่าประชากรในสังคมนั้นๆมีความใส่ใจดูแลสุขภาพ มีการพัฒนาองค์ความรู้มาตรฐานการรักษาให้ดีขึ้น มีการตรวจคัดกรอง และรู้จักป้องกันโรคหรือเจอปัญหาตั้งแต่ระยะแรกๆซึ่ งเป็นสิ่งสำคัญที่ทำให้มีอายุยืนยาวอย่างมีคุณภาพงานทันตกรรมเป็นส่วนหนึ่งของงานสาธารณสุข ที่มีผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตในมิติสุขภาพที่เราควรให้ความสนใจ และมีความสัมพันธ์เกี่ยวเนื่องกับสุขภาพร่างกาย การจัด อบรมด้านกรรมผู้สูงอายุจะแสดงให้เห็นถึงความเชื่อมต่อผสมผสานระหว่างงานทันตกรรมเฉพาะทางหลายด้านเข้าด้วยกันและงานทันตกรรมกับสหสาขาวิชาอื่นในด้านสาธารณสุข เพื่อตอบรับแนวโน้มจำนวนประชากรผู้สูงอายุในประเทศมีการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ทั้งนี้ผู้สูงอายุมีปัญหาทางด้านสุขภาพด้านการช่องปากและจิตใจจึงจำเป็นต้องพิจารณาให้ครอบคลุมหลายด้าน เพื่อให้การรักษาที่ดีส่งผลถึงภาพชีวิตที่ดีขึ้น จึงสมควรมีการเตรียมพร้อมในการรับมือ ซึ่งในขณะนี้ประเทศไทยยังขาดแคลนบุคลากรที่มีความรู้ความเชี่ยวชาญในสหสาขาวิชาทันตกรรมผู้สูงอายุและการดูแลผู้ป่วยพิเศษ โดยเฉพาะบุคลากรในสังกัดกระทรวงสาธารณสุข คณาจารย์ผู้ทำหน้าที่รับผิดชอบทางด้านการเรียนการสอนและการวิจัย นอกจากนี้หน่วยงานราชการต่างๆยังมีความต้องการบุคลากรผู้มีความรู้ความชำนาญด้านนี้เพื่อรองรับสังคมผู้สูงอายุที่จะเกิดขึ้น ดังนั้นเพื่อให้มีงานบริการศัลยกรรมผู้สูงอายุเต็มรูปแบบ สถาบันหรือหน่วยงานราชการจึงต้องส่งบุคลากรไปศึกษาต่อในระดับมหาบัณฑิตซึ่งต้องใช้ระยะเวลาในการศึกษานาน ประกอบกับหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตสาขาฐานะกรรมผู้สูงอายุและการดูแลผู้ป่วยพิเศษที่เปิดสอนในมหาวิทยาลัยในประเทศไทยยังมีไม่เพียงพอ จึงเห็นควรที่จะจัดอบรมระยะสั้น เพื่อเตรียมความพร้อม ทางด้านบุคลากร การดูแลผู้สูงอายุและผู้ป่วยพิเศษ โดยให้ผู้เข้าฝึกอบรมได้รับการฝึกเป็นพิเศษ ทั้งการดูแลแบบองค์รวมและจำเพาะพิเศษในงานทันตกรรมเฉพาะสาขาที่เกี่ยวข้องกับสูงอายุ โดยมีทั้งภาคทฤษฎีและภาคปฏิบัติ มีจุดมุ่งหมายให้ผู้เข้าร่วมสามารถนำความรู้และประสบการณ์ที่ได้จากการฝึกอบรมนี้ไปใช้ในการดูแลรักษาโรคช่องปากผู้สูงอายุ เพิ่มพูน

ทักษะให้เกิดความมั่นใจในการทำงานเกี่ยวกับผู้สูงอายุ และส่งเสริมคุณภาพชีวิตประชากรผู้สูงอายุชาวไทยให้ดียิ่งขึ้น

โครงการจัดอบรมระยะสั้นงานทันตกรรมผู้สูงอายุ ประจำปี 2563
เดือน กันยายน 2563
สังคมผู้สูงอายุ มุมมองจากภาครัฐและเอกชน
ห้อง smart classroom ห้อง 912 ชั้น 9 อาคารทันตแพทยศาสตร์เฉลิมนวมราช 80 คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วันที่ / ช่วงเวลา	จันทร์ที่ 31 สิงหาคม 2563	อังคารที่ 1 กันยายน 2563	พุธที่ 2 กันยายน 2563	พฤหัสบดีที่ 3 กันยายน 2563	ศุกร์ที่ 4 กันยายน 2563
9.00 – 10.30 น.	Orientation Introduction to Geriatric Dentistry ผศ.ทญ.ดร.อรพินท์ โคมิน ประธานหลักสูตรทันตกรรมผู้สูงอายุฯ	Geriatric medicine and Dental work อ.นพ.ไอศวรรย์ เพชรล่อเหลียน เวชศาสตร์ผู้สูงวัย ร.พ. จุฬาฯ	Cognitive aging and MCI Dementia and Alzheimer's ผศ.นพ.สุชเจริญ ตั้งวงษ์ไชย ภาควิชาจิตเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาฯ	บทบาทของคนพยาบาลกับการดูแลผู้สูงอายุระยะยาว พว.อรนันท์ อุดมภาพ สถาบันดูแลผู้สูงอายุนวศรีเนอสซิ่งโฮม	**วันหยุดราชการ** ประกาศให้เป็นวันหยุดวันสงกรานต์ทดแทนวันหยุดสงกรานต์ที่ ครม.ประกาศไม่ให้เป็นวันหยุดสงกรานต์ในเดือน เมษายน 2563
10.30 – 12.00 น.	Holistic Treatment plan I for Prosthodontic ผศ.ทพ.สรรพัชญ์ นาระโน			ทันตกรรมในผู้สูงวัย ภูเขาน้ำแข็งด้านสุขภาพ โอกาสพัฒนาในสถานดูแลผู้สูงอายุระยะยาว นพ.เก่งพงศ์ ตั้งอรุณสันติ ผู้อำนวยการ รพ.ผู้สูงอายุ Chersery Home International	
13.00 – 14.30 น.	นโยบายและการขับเคลื่อนงานผู้สูงอายุ	Family medicine for Dentistry	Geriatric depression Psychological and emotional change in elderly	Living Beautifully Dying Gracefully พญ.นาฏ พ่องสมุทร อนุกรรมการบริหารโครงการที่พักผู้สูงอายุ สวางคนิเวศ สภากาชาดไทย	
14.30 – 16.00 น.	น.ส.ศิริวรรณ อรุณทิพย์ไพฑูรย์ กรมกิจการผู้สูงอายุ กระทรวงการพัฒนาสังคมและความมั่นคงของมนุษย์	อ.นพ.ดร.ภรเอก มนัสวานิช เวชศาสตร์ครอบครัว ร.พ จุฬาฯ	อ.นพ.ดร.ชาวิท คันวิระชัยสกุล ภาควิชาจิตเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาฯ		

วันที่ / ช่วงเวลา	จันทร์ 5 ตุลาคม 2563	อังคาร 6 ตุลาคม 2563	พุธที่ 7 ตุลาคม 2563	พฤหัสบดีที่ 8 ตุลาคม 2563	ศุกร์ที่ 9 ตุลาคม 2563
9.00 – 10.30 น.	ศึกษาดูงาน การดูแลสุขภาพช่องปากผู้สูงอายุ ครอบครัวและชุมชน ร.พ ลำลูกกา อ.ลำลูกกา จ.ปทุมธานี		Family Medicine for geriatric and special care dentistry Field Work Treatment plan concept ผศ.ทญ.ดร.อรพินท์ โคมิน	การพยาบาลผู้สูงอายุในโรงพยาบาล ผศ.ดร.ดวงกมล วัดราดูลย์ ผู้อำนวยการศูนย์บริการการพยาบาล สถาบันการพยาบาลศรีสวรินทิรา สภากาชาดไทย	ถอดบทเรียนจากรุ่นพี่ทันตแพทย์งานทันตกรรมในผู้สูงอายุ ณ สถานพยาบาลต่าง ๆ ทญ.นฎา บูรณรมย์ แผนกทันตกรรม รพ. พหลพลพยุหเสนา ทพ. ปิย์เมธ บุญมีชาว แผนกทันตกรรม รพ.บางบ่อ ทญ.สิริอตา เสี้ยงบุญญพันธ์ แผนกทันตกรรม รพ.กลาง
13.00 – 14.30 น.	โดย อ.ทพ.ดร.อิสระพงศ์ แก้วกำเหนิดพงษ์ อ.ทญ.ปณิทชา วีระพล	ศึกษาดูงาน ร.พราชพิพัฒน์ สำนักการแพทย์ การบรรยายยุทธศาสตร์และกลยุทธในการบริหารงานการดูแลผู้สูงอายุ โดย แพทย์หญิงวริชา เอี่ยมจิณณสุวัฒน์ หัวหน้ากลุ่มงานเวชศาสตร์ชุมชน และเวชศาสตร์ผู้สูงอายุ เยี่ยมชมคลินิกสุขใจ สูงวัยประสับประคอง และหอผู้ป่วยชีวาภิบาล	ศึกษาดูงาน ร.พ ผู้สูงอายุบางขุนเทียน สำนักการแพทย์ สังกัด กรุงเทพมหานคร โดย ศ.ทญ.ดร.สุดาดวง กฤษฎางพงษ์ ผศ.ทญ.ดร.พลินี เตชะมบูรณ์วัตน์ อ.ทญ.ปณิทชา วีระพล	การใช้ยาในผู้สูงอายุ ผศ.นพ.พิสนธิ์ จงตระกูล ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาฯ	
14.30 – 16.00 น.					Discussion ผศ.ทญ.ดร.อรพินท์ โคมิน

วันที่ / ช่วงเวลา	จันทร์ที่ 2 พฤศจิกายน 2563	อังคารที่ 3 พฤศจิกายน 2563	พุธที่ 4 พฤศจิกายน 2563	พฤหัสบดีที่ 5 พฤศจิกายน 2563	ศุกร์ที่ 6 พฤศจิกายน 2563
9.00 – 10.30 น.	เวชศาสตร์ผู้สูงอายุ อ.พญ.อรพิชญา ศรีวรรโณภาส คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี	Cardio vascular in the elderly อ.พญ.ภัทราณี อีสะพัฒนะ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาฯ	-	Endodontics for the elderly & Root Canal Treatment รศ.ทพ.ดร.ไพโรจน์ หลินศุวนนท์	นโยบายระบบบริการสุขภาพผู้สูงอายุ นางนิติกุล ทองน่วม
10.30 – 12.00 น.	โภชนาการในผู้สูงอายุ อ.พญ. ณิชา สมหล่อ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาฯ	Prosthodontic treatment I รศ.ทพ.ดร.แมนสรวง อักษรนุกิจ อ.ทพ.ดร.กฤช กมลชันติกุล	ศึกษาดูงาน ศูนย์ดูแลภาวะสมองเสื่อม ผศ.นพ.สุชเจวิญ ตั้งวงษ์ไชย รพ.จุฬาฯ สภากาชาดไทย (สธ. ชั้น 15)	อ.ทพ.ดร.ศุภศันส์ ทิศทรีรัตน์ Cracked tooth syndrome: Diagnosis, treatment plan and prognosis" ร.พ พญาไท 2	สถาบันเวชศาสตร์ สมเด็จพระสังฆราช ญาณสังวรเพื่อผู้สูงอายุ กรมการแพทย์
13.00 – 14.30 น.	Stroke and the consequence อ.นพ.พงศ์ภัทร์ วรสายัณห์ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาฯ	Respiration in the elderly and now to care อ.นพ.ชิติวัฒน์ ศรีประสาธน์ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาฯ	Dementia and Health Promotion อ.ทญ.ปณิฑชา วีระพล	Root caries and filling material รศ.ทญ.ดร.รังสิมา สกุลณะมรรคา	อ.ทพ.นพ.วรภัทร ตราชู การเตรียมตัวผู้ป่วย เพื่อเข้ารับหัตถการ ในห้องผ่าตัด
14.30 – 16.00 น.	Parkinson's disease อ.พญ.อรอนงค์ จิตรกฤษฎากุล ศูนย์ความเป็นเลิศทางการแพทย์ โรคพาร์กินสันฯ รพ.จุฬาฯ	Chronic Kidney disease ผศ.นพ.เมธัฐวุฒิ โควน้ำชัย ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาฯ	งานวิจัยในผู้สูงอายุ อ.ทญ.ดร.ณฤที สิ้มปวงทิพย์	Implant in the Elderly ผศ.ทญ.ดร.เกศกัญญา สัพพะเลข	

วันที่ / ช่วงเวลา	จันทร์ที่ 30 พฤศจิกายน 2563	อังคารที่ 1 ธันวาคม 2563	พุธที่ 2 ธันวาคม 2563	พฤหัสบดีที่ 3 ธันวาคม 2563	ศุกร์ที่ 4 ธันวาคม 2563
9.00 – 10.30 น.	Our population and Aging Society ศ.ดร.วิพรรณ ประจวบเหมาะ ประชากรศึกษา คณบดีวิทยาลัยประชากรศาสตร์ จุฬา	Prosthodontic treatment II รศ.ทพ.ดร.แมนสรวง อักษรนุกิจ อ.ทพ.ดร.กฤช กมลชันติกุล	Dental material use in Prosthodontics work รศ.ทพ.ดร.นิยม อิรวงศ์อนันต์สกุล	Denture design and applications for geriatric patient ทพ.สุวิทย์ สิมบ้ปิหมปาณี สำนักงานสาธารณสุข จังหวัดนครราชสีมา	Workshop for research Paper writing Prof. Murray Thomson Dental Epidemiology and Public Health, Division of Health Sciences, School of Dentistry,University of Dunedin, New Zealand (online) via Zoom
10.30 – 12.00 น.	Holistic Treatment plan I for Prosthodontic ผศ.ทพ.สรรพัชญ์ นามะโน		Chemotherapy and what to aware รศ.นพ.ดร.วิโรจน์ ศรีอุทารพงศ์ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาฯ		
13.00 – 14.30 น.	งานทางสถาปัตยกรรม ที่เกี่ยวข้องกับสังคมผู้สูงอายุ รศ.ไตรรัตน์ จารุหัตน์ คณะสถาปัตยกรรมศาสตร์ จุฬาฯ	Oral lesions รศ.ทพ.ดร. ชาญวิทย์ ประพิณจำรูญ	Periodontology Treatment in Elderly I ผศ.ทญ.ดร.สุปรีดา ศรีอัญรัตน์	Dysphagia and how to manage, Home visit in Japan Prof. Haruka Tohara Dysphagia Rehabilitation Tokyo Medical and Dental University, Japan (online) Via Zoom	รับประทานอาหารกลางวัน
14.30 – 16.00 น.	ศึกษาดูงานศูนย์ความเป็นเลิศ ทางการแพทย์โรคพาร์กินสัน ศ.นพ.รุ่งโรจน์ พิทยศิริ รพ.จุฬาฯ สภากาชาดไทย	Saliva and xerostomia ผศ.ทญ.ดร.เกศกาญจน์ เกศวยุธ	Periodontology Treatment in Elderly II ผศ.ทพ.ชจร กังสดาลพิภพ		พิธีมอบประกาศเกียรติคุณ

4.11 คู่มือการดูแลผู้ป่วย

ในระยะแรกของโครงการนี้ได้ทำคู่มือ การดูแลผู้สูงอายุและผู้ป่วยพิเศษ โดยเริ่มจากกลุ่มผู้ป่วยพาร์กินสัน ซึ่งเป็นโรคที่พบได้บ่อยในผู้สูงอายุ และเป็นหนึ่งในเป้าหมายของโปรแกรมสังคมผู้สูงวัยที่ต้องการให้ประชากรที่มีอายุเกินหกสิบปีหรือร้อยละแปดสิบมีสุขภาพดีและพึ่งพาตัวเองได้

โรคพาร์กินสันเป็นโรคทางระบบประสาทที่ส่งผลต่อการเคลื่อนไหวและบุคลิกท่าทางของผู้ป่วย โดยผู้ป่วยกลุ่มนี้มาพบในผู้สูงอายุและมักมีสุขภาพช่องปากแย่ลงเนื่องจากผู้ป่วยมีระบบการทำงานของระบบประสาทและกล้ามเนื้อที่เปลี่ยนแปลงไปเกิดการสั่นและเกร็งของกล้ามเนื้อโดยเฉพาะมือและแขนนำไปสู่การเกิดปัญหาการดูแลสุขภาพช่องปาก คือ อไม่สามารถถือด้ามแปรงฟันถนัดได้ทำให้แปรงฟันได้สะอาดเพียงพอ เกิดปัญหาสุขภาพช่องปากตามมาอย่างเรื้อรัง เช่น โรคเหงือกอักเสบ โรคปริทันต์ ฟันผุและกลิ่นปาก อีกทั้งยาที่ใช้ในการรักษาโรคพาร์กินสันบางชนิดอาจทำให้เกิดกลุ่มอาการแสบปากแสบร้อนได้ โดยมักจะเกิดในประมาณร้อยละยี่สิบห้าของผู้ป่วยพาร์กินสัน นอกจากนี้ในผู้ป่วยที่ใส่ฟันเทียมและมีการทำงานของกล้ามเนื้อผิดปกติมาก จะทำให้ฟันเทียมชนิดถอดได้มีความเสี่ยงในการบิ่นหักของตะขอลวด หรือฟันเทียมไม่สามารถอยู่นิ่งในช่องปากได้อาจจะทำให้ฟันปลอมไปขัดขวางการบดเคี้ยว การกลืน หรือการหายใจได้

โรคพาร์กินสันส่งผลต่อคุณภาพชีวิตในด้านการใช้ชีวิตประจำวัน การทำงาน การเข้าสังคม เช่น การเดินการรับประทานอาหาร การออกไปทำกิจกรรมต่างๆนอกบ้าน และการดูแลสุขภาพของตนเองทั้งสุขภาพร่างกายและสุขภาพช่องปาก ซึ่งสุขภาพช่องปากที่ดีเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ผู้ป่วยมีสุขภาพร่างกายโดยรวมที่สมบูรณ์แข็งแรง ดังนั้น จึงได้จัดทำคู่มือการดูแลผู้ป่วยเล่มนี้ได้รวบรวมปัญหาเกี่ยวกับสุขภาพช่องปากในกลุ่มผู้ป่วยโรคพาร์กินสันและนำเสนอ การดูแลสุขภาพช่องปากและฟันในผู้ป่วยที่ เป็นโรคพาร์กินสัน *(เอกสารแสดงภาคผนวก)*

บทที่ 5
อภิปรายและวิจารณ์ผล

การมีสัดส่วนประชากรผู้สูงอายุที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ทำให้เห็นว่าประเทศไทยต้องเตรียมความพร้อมรองรับการเป็นสังคมผู้สูงอายุ โครงการวิจัยนี้เล็งเห็นความสำคัญของการวินิจฉัยอย่างแม่นยำและศึกษากลไก พยาธิสภาพของความผิดปกติในช่องปากและฟัน โดยทำการศึกษาในผู้ป่วยที่เป็นโรคทางพันธุกรรม มีพยาธิสภาพในช่องปากและฟันรุนแรง และมีโรคทางระบบ ความรู้ในระดับสากลเป็นที่ยอมรับแล้วว่าผู้ป่วยที่เป็นโรคทางพันธุกรรม เป็นตัวอย่างทางชีววิทยาที่ดีมากในการศึกษาพยาธิกำเนิดของโรค เนื่องจากมีความรุนแรงและลักษณะทางคลินิกของโรคที่ชัดเจน และความรู้ที่ค้นพบสามารถนำไปใช้กับโรคไม่ติดต่อเรื้อรังได้เป็นอย่างดี

- ความผิดปกติของเคลือบฟันและการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างเคลือบฟันกับอายุ

งานวิจัยนี้ศึกษาผู้ป่วยที่มีการสร้างเคลือบฟันไม่สมบูรณ์จากพันธุกรรม ซึ่งโดยปกติมีลักษณะการแสดงออกที่หลากหลายและไม่ชัดเจนทำให้การวินิจฉัยโรคไม่แน่ชัด จากการศึกษานี้ทำให้พบว่าการกลายพันธุ์ในยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเคลือบฟันจะทำให้ผู้ป่วยมีฟันที่เปราะแตกง่ายมีการเปลี่ยนแปลงทั้งในระดับคลินิกภาพถ่ายรังสีและลักษณะทางจุลภาค อันรวมถึง คุณสมบัติเชิงกลและส่วนประกอบทางแร่ธาตุ โดยการศึกษานี้เป็นการบ่งบอกเป็นครั้งแรกว่าในผู้ป่วยสูงอายุจะสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงที่สามารถให้การพยากรณ์ล่วงหน้าและป้องกันการสูญเสียเคลือบฟันและฟันอักเสบที่จะเกิดตามมาได้ ดังนั้น หากสามารถให้การวินิจฉัยได้ถูกต้องและให้การรักษาที่เหมาะสมแต่ละช่วงวัย จะสามารถป้องกันการสูญเสียของฟันในผู้สูงวัยได้

- ความผิดปกติของเนื้อฟันและกระดูกเปราะ

การศึกษาวิจัยชี้ให้เห็นและสร้างความเข้าใจถึงลักษณะโครงสร้างทางจุลภาค ลักษณะทางฟิสิกส์เชิงกลของฟันที่มีการสร้างเนื้อฟันไม่สมบูรณ์ในผู้ป่วยที่มีกระดูกเปราะทางพันธุกรรม โดยพบว่าฟันจะมีสีเข้มลักษณะทางโพรงฟันผิดปกติไป เนื้อฟันมีความแข็งแรงลดลง และมีส่วนประกอบในชั้นเนื้อฟันผิดปกติ แสดงถึงความผิดปกติอย่างรุนแรงในระดับจุลภาค ซึ่งเป็นการอธิบายว่าทำไมการรักษาทางทันตกรรมถึงไม่ประสบผลสำเร็จในผู้ป่วยกลุ่มนี้ ดังนั้นบุคลากรทางการแพทย์จึงควรให้การวินิจฉัยและการพยากรณ์โรคอย่างเหมาะสมในผู้ป่วยกลุ่มนี้เพื่อเป็นการลดค่าใช้จ่ายของผู้ป่วยและภาคสาธารณสุข และหาวิธีการรักษาหรือเลือกวัสดุทางทันตกรรมที่เหมาะสมโดยที่ไม่จำเป็นต้องพึ่งพาโครงสร้างของชั้นเนื้อฟันในการยึดอยู่ เพื่อให้ผู้ป่วยเป็นผู้สูงอายุที่มีฟันครบและแข็งแรง ความรู้ในส่วนนี้จะทำให้การวินิจฉัยโรคในผู้ป่วยได้ถูกต้องแม่นยำมากขึ้น และสร้างความเข้าใจว่าการเปลี่ยนแปลงของคอลลาเจนอาจเป็นสาเหตุทำให้ฟันผู้สูงอายุทั่วๆไปมีการแตกหักง่าย เช่นเดียวกับผู้ป่วยที่มีการสร้างเนื้อฟันไม่สมบูรณ์จากสาเหตุทางพันธุกรรม

นอกจากนี้การศึกษาผลของการกลายพันธุ์ในยีนที่สร้างเอนไซม์ Membrane-Bound Transcription factor Protease Site-2 gene (MBTPS2) ที่สร้าง site-2 protease (S2P) มีทำหน้าที่สำคัญในกระดูกและผิวหนัง โดยพบว่าการกลายพันธุ์ในยีนเดียวกันแต่คนละตำแหน่งจะทำให้เกิดโรคทางพันธุกรรมที่แตกต่างกันอย่างสิ้นเชิง จากการวิเคราะห์วิจัยทำให้เข้าใจถึงความแตกต่างของการกลายพันธุ์ในแต่ละตำแหน่งของยีนที่ส่งผลให้เกิดลักษณะความผิดปกติที่แตกต่างกันอย่างสิ้นเชิง โดยผู้ป่วยจะมีโครงสร้างใบหน้าและกระดูกขากรรไกรที่ผิดปกติร่วมด้วย ดังนั้นหากทำการศึกษาต่อไปและเข้าใจถึงกระบวนการของเอนไซน์ในการทำหน้าที่ และทำให้เกิดความผิดปกติที่แตกต่างกันนี้ ย่อมสามารถให้การวินิจฉัยที่ถูกต้อง โดยเฉพาะผู้ป่วยที่เป็น Ichthyosis Follicularis, Atrichia and Photophobia syndrome (IFAP) with or without BRESHECK syndrome ควรส่งผู้ป่วยทำการตรวจตาอย่างละเอียดเพื่อป้องกันภาวะจอตาเสื่อมจนถึงตาบอดได้ ส่วนผู้ป่วยที่เป็นโรคกระดูกเปราะควรป้องกันกระดูกหักและความพิการถาวร และมุ่งเป้างานวิจัยไปสู่การรักษาที่จำเพาะเจาะจง เช่นการปรับเปลี่ยนสารพันธุกรรม

- ภาวะฟันหายและการไม่มีฟัน

ค้นพบการกลายพันธุ์ใหม่ที่ทำให้เกิดภาวะฟันหายและพบว่าการกลายพันธุ์ในยีน WNT10A พบได้บ่อยในประชากรไทย โดยการกลายพันธุ์นี้สัมพันธ์กับภาวะฟันหายของฟันกรามน้อยซี่ที่สองและเกี่ยวข้องกับขนาดฟันตัดข้างเล็กผิดปกติ โดยผลการค้นพบนี้สามารถช่วยให้แพทย์ให้การวินิจฉัยเบื้องต้นในผู้ป่วยที่พบภาวะฟันหายที่มีลักษณะทางคลินิกดังที่กล่าวมาว่ามีโอกาสเกิดจากการกลายพันธุ์ในยีน WNT10A และมักจะไม่พบความผิดปกติของโรคทางระบบร่วมด้วย แต่หากเป็นลักษณะฟันหายในรูปแบบอื่นมีข้อแนะนำว่าควรตรวจทางพันธุกรรมให้ชี้ชัดเนื่องจากอาจมีภาวะซ่อนเร้นทางระบบ เช่น โรคมะเร็งลำไส้ โรคนิ่วในไต และโรคหัวใจ ซึ่งพบร่วมกับการกลายพันธุ์ในยีนที่ทำให้เกิดภาวะฟันหายได้ เพื่อป้องกันโรคแทรกซ้อนที่เกิดขึ้นอันส่งผลเสียในระยะยาวเมื่อเข้าสู่สูงอายุ

- โครงสร้างใบหน้าและช่องปากกับภาวะทางสมองที่ผิดปกติ

ศึกษาและรายงานผู้ป่วยไทยสองรายแรกที่การกลายพันธุ์ในยีน PYCR2 และทำให้เกิดโรค Hypomyelinating leukodystrophy 10 (HLD10) เป็นการขยายความเข้าใจทางจีโนไทป์และฟีโนไทป์และแสดงให้เห็นว่าการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง c.400G>A เป็นตำแหน่งที่พบจำเพาะเจาะจงในคนไทย ดังนั้น ความรู้จากการศึกษาในสองเคสผู้ป่วยนี้จะเป็นแนวทางในการรักษาและดูแลผู้ป่วยไทย ที่มีภาวะบกพร่องชองมัยยีลินในสมอง และความผิดปกติของโครงสร้างใบหน้าช่องปากและฟันต่อไป เพื่อลดความพิการถาวรในผู้สูงอายุ

- ผลงานวิจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับช่องปากและฟันและภาวะทางพันธุกรรม

การศึกษาโรคทางเมแทบอลิซึมที่มีผลต่อภูมิคุ้มกันร่างกาย มีรายงานชัดเจนถึงความแปรปรวนในยีน POLG ว่าเป็นสาเหตุสำคัญของกลุ่มโรคไมโทคอนเดรีย ที่ทำให้พัฒนาการล่าช้า และอาจอาการตับวายและเสียชีวิตฉับพลันได้งา

วิจัยศึกษาและค้นพบการกลายพันธุ์ของยีน POLG แบบใหม่ อันเป็นการขยายสเปกตรัมของยีนและโรคทางพันธุกรรม แสดงให้เห็นถึงความสำเร็จในการใช้เอ็กโซมซีเควนซิงสำหรับการตรวจคัดกรองความผิดปกติที่เกี่ยวข้องกับโรคทางไมโทคอนเดรียก่อนคลอดและทารกแรกเกิด และแสดงความสัมพันธ์ของจีโนไทป์และฟีโนไทป์ของรหัสพันธุกรรม c.3286C> T และที่สำคัญเป็นการแสดงให้เห็นว่าการตรวจพบการกลายพันธุ์แบบยีนด้อยในผู้ป่วยกลุ่มนี้ ควรได้รับการเฝ้าระวัง และให้การพยากรณ์โรคเพื่อป้องกันการเสียชีวิตฉับพลันในตัวผู้ป่วยและป้องกันการเกิดความผิดปกติซ้ำในครอบครัว

โรคไมโตคอนเดรียที่มีการขาดของเอนไซม์ HMG-CoA synthase หรือ Mitochondrial 3-hydroxy-3 methylglutaryl-CoA synthase-2 deficiency (HMGCS2D) เป็นโรคที่เกิดจากความผิดปกติของกระบวนการเกิดคีโตเจเนซิสในตับ ซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์แบบด้อยในยีน HMGCS การวิจัยค้นพบการกลายพันธุ์แบบ c.1502G>C (p.Arg501Pro) ที่ไม่เพียงแต่พบในผู้ป่วยทั้งสองรายของงานวิจัยเท่านั้น แต่ยังตรวจพบ heterozygous ใน 9 รายจาก 1081 รายที่ไม่เกี่ยวข้องกัน (ความถี่อัลลีล 9/2162; 0.42%) ในฐานข้อมูลเอ็กโซมไทย ชี้ให้เห็นว่าอาจมีทารกประมาณ 14 คนที่มี HMGCS2D ในเด็กแรกเกิดในประเทศไทย 800,000 คนต่อปี ดังนั้นจึงควรสร้างความตระหนักเรื่อง HMGCS2D ให้กับบุคลากรทางการแพทย์ในประเทศไทย และควรให้การป้องกันก่อนที่จะเกิดความผิดปกติของเอนไซม์จนทำให้เกิดความพิการถาวร

โครงการจีโนมิกส์เพื่อประชากรไทยที่มีความพิการทางช่องปากและฟันเริ่มดำเนินการตรวจทางคลินิก และพันธุศาสตร์ ให้คำปรึกษาทางพันธุศาสตร์ ศึกษาสาเหตุ ความผิดปกติ และพยาธิกำเนิดของความพิการทางช่องปากและฟัน โดยแบ่งสรุปผลการวิจัยได้ ในแง่มุมต่างๆดังนี้

1. สร้างผลงานทางการแพทย์: ใน 1 ปีที่ดำเนินการ โครงการผลิตและเผยแพร่ผลงานตีพิมพ์ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ จำนวน 10 เรื่อง ซึ่งเป็นองค์ความรู้ใหม่ทั้งในแง่สาเหตุ และพยาธิกำเนิดของความพิการทางช่องปากและฟัน เป็นองค์ความรู้ที่เป็นประโยชน์ต่อผู้ป่วย การแพทย์ การศึกษา และต่อยอดงานวิจัย

1) Sriwattanapong K, Nitayavardhana I, Theerapanon T, Thaweesapphithak S, Chantarawaratit PO, Garuyakich R, Phokaew C, Porntaveetus T*, Shotelersuk V. 2021. Age-related dental phenotypes and tooth characteristics of FAM83H-associated hypocalcified amelogenesis imperfecta. Oral Dis. doi: 10.1111/odi.13780.

2) Nutchoey O, Intarak N, Theerapanon T, Thaweesapphithak S, Boonprakong L, Srijunbarl S, Porntaveetus T*, Shotelersuk V. 2021. Phenotypic features of dentinogenesis imperfecta associated with osteogenesis imperfecta and COL1A2 mutations. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 131:694-701

3) Intarak N, Budsamongkol T, Theerapanon T, Chanamuangkon T, Srijunbarl A, Boonprakong L, Porntaveetus T*, Shotelersuk V. 2020. Tooth ultrastructure of a novel COL1A2 mutation expanding its genotypic and phenotypic spectra. Oral Dis. 27:1257-1267.

4) Caengprasath N, Theerapanon T, Porntaveetus T*, Shotelersuk V. 2021. MBTPS2, a membrane bound protease, underlying several distinct skin and bone disorders. J Transl Med. 19:114.

5) Kanchanasevee C, Sriwattanapong K, Theerapanon T, Thaweesapphithak S, Chetruengchai W, Porntaveetus T*, Shotelersuk V. 2020. Phenotypic and genotypic features of Thai patients with nonsyndromic tooth agenesis and WNT10A variants. Front Physiol. 11: 573214.

6) Manaspon C, Boonsimma P, Phokaew C, Theerapanon T, Sriwattanapong K, Porntaveetus T*, Shotelersuk V. Expanding the genotypic spectrum of PYCR2 and a common ancestry in Thai patients with hypomyelinating leukodystrophy 10. Am J Med Genet A. 2021. doi: 10.1002/ajmg.a.62365.

7) Sriwattanapong K, Rojnueangnit K, Theerapanon T, Srichomthong C, Porntaveetus T*, Shotelersuk V. 2021. Compound heterozygosity for a novel frameshift variant causing fatal infantile liver failure and genotype-phenotype correlation of POLG c.3286C>T variant. Int J Neonatal Screen. 7: 9.

8) Rojnueangnit K, Maneechai P, Thaweekul P, Piriyanon P, Khositseth S, Ittiwut C, Chetruengchai W, Kamolvisit W, Theerapanon T, Suphapeetiporn K, Porntaveetus T*, Shotelersuk V. 2020. Expanding phenotypic and mutational spectra of mitochondrial HMG-CoA synthase deficiency. Eur J Med Genet. 63: 104086.

9) Manaspon C, Jongwannasiri C, Chumprasert S, Sa-Ard-Iam N, Mahanonda R, Pavasant P, Porntaveetus T, Osathanon T. Human dental pulp stem cell responses to different dental pulp capping materials. 2021. BMC Oral Health. 21:209.

10) Faruangsaeng T, Thaweesapphitak S, Boonchoo K, Porntaveetus T*. 2021. Gene expression in human dental pulp cells of mandibular second premolar teeth. Proceedings of RSU Research Conference. 330-341.

2. ด้านสาธารณสุข ส่งเสริมคุณภาพชีวิตและความสามารถของผู้ป่วยและครอบครัว : ให้การตรวจทางพันธุศาสตร์และคำปรึกษา ในผู้ป่วยที่มีปัญหาทางช่องปากและฟันและโรคทางพันธุกรรมป้องกันการเกิดความพิการซ้ำในครอบครัว ให้การวินิจฉัยตรงจุด ให้การพยากรณ์โรคที่ถูกต้อง ลดผลข้างเคียงของการรักษา และป้องกันหรือชะลอความพิการในผู้สูงอายุ ป้องกันการเสียชีวิตก่อนเวลาอันควร และลดการลดค่าใช้จ่ายในการ

รักษาที่แม่นยำ โดยในปีแรกได้ครอบคลุม ผู้ที่มีความผิดปกติของเคลือบฟัน เนื้อฟันไม่แข็งแรง มีการติดเชื้อในช่องปาก ผู้ที่มีฟันหาย ผู้ที่มีกล้ามเนื้ออ่อนแรง ผู้ป่วยที่มีกระดูกเปราะ และความผิดปกติทางเมตาบอลิซึม

3. ด้านการผลิตและพัฒนาบุคลากร
    3.1 พัฒนาบุคลากรทางทันตแพทย์ผู้เชี่ยวชาญสูงอายุและผู้ป่วยพิเศษผ่านหลักสูตรทันตกรรมผู้สูงอายุและผู้ป่วยพิเศษ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
    3.2 พัฒนาผู้เชี่ยวชาญด้านพันธุศาสตร์ ผ่านเครือข่ายวิชาภาคีวิชาชีพสุขภาพ ได้แก่ การแพทย์ การพยาบาลทั นตแพทย์ เภสัชกรรมฯ และเทคนิคการแพทย์
    3.3 พัฒนานักวิจัย (postdoctoral fellowship) ที่มีความเชี่ยวชาญทางพันธุศาสตร์ เพื่อแก้ปัญหาทันตสาธารณสุขระดับชาติด้านสูงอายุและผู้พิการด้วยพันธุศาสตร์ต่อไป
4. ด้านการเผยแพร่ความรู้
    4.1 จัดประชุมนานาชาติเผยแพร่ความรู้ที่เป็นวิทยาการสมัยใหม่อีก เพื่อให้บุคลากรทางการแพทย์ การศึกษาและบุคคลทั่วไป ได้เข้าใจความสำคัญของช่องปากและฟัน
    4.2 หลักสูตรฝึกอบรมระยะสั้นทันตแพทย์ผู้สนใจด้านผู้สูงอายุและผู้ป่วยพิเศษ เพิ่มสร้างความรู้และความเชี่ยวชาญ และนำกลับไปรักษาผู้สูงอายุและผู้ป่วยที่มีความพิการทางช่องปากและฟันในท้องที่
5. เครือข่ายการส่งต่อผู้ป่วย และสร้างความร่วมมือของบุคลากรทางการแพทย์ในศาสตร์ต่างๆ
    5.1 ร่าง standard of operation การรับส่งต่อผู้ป่วยโดยตรงทางศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านพันธุศาสตร์และการแพทย์แม่นยำ และหน่วยปฏิบัติการวิจัยทางจีโนมิกส์และทันตกรรมแม่นยำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
    5.2 คณะทำงานในเครือข่ายโรคหายาก เพื่อสร้างแนวทางในการส่งต่อผู้ป่วย การวิจัยและการประยุกต์ใช้ การบริการ การวิเคราะห์ข้อมูลและการจัดการ จริยธรรมกฎหมาย และทางสังคม ผลิตและพัฒนาบุคลากร และการส่งเสริมการพัฒนาการอุตสาหกรรมใหม่ ภายใต้โครงการจีโนมิกส์ไทยแลนด์ อันประกอบด้วย โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ มหาวิทยาลัยขอนแก่น มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โรงพยาบาลเด็ก และโรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า
6. จัดทำคู่มือ การดูแลผู้ป่วยที่มีปัญหาทางพันธุกรรมและความพิการทางช่องปากและฟัน ได้จัดทำคู่มือการดูแลช่องปากและฟันในผู้ป่วยพาร์กินสันเป็นคู่มือแรก เนื่องจาก เป็นโรคพบบ่อยในผู้สูงอายุและมีผลกระทบต่อการดูแลสุขภาพช่องปาก ซึ่งคู่มือสามารถใช้ได้กับทางผู้ป่วย ผู้ดูแล และบุคลากรทางการแพทย์ มุ่งหวังให้ประชากรผู้สูงอายุมีสุขภาพที่ดีและพึ่งพาตัวเองได้ ตาม key result ของโปรแกรมสังคมผู้สูงวัย

บทที่ 6
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

โดยสรุปผลการศึกษาของโครงการวิจัยเรื่องจีโนมิกส์เพื่อประชากรไทยที่มีความพิการทางช่องปากและฟัน สอดคล้องกับวัตถุประสงค์ สร้างผลงานทางการแพทย์ สร้างความร่วมมือของบุคลากรทางการแพทย์ สร้างความรู้ด้านพยาธิกำเนิดของความพิการ การผลิตบุคลากรทางการแพทย์ และการพัฒนาเพิ่มขีดความสามารถและคุณภาพชีวิตของผู้สูงอายุและผู้ป่วยที่มีความพิการทางช่องปากและฟัน

ผลลัพธ์ของโครงการวิจัยนี้ ประกอบด้วย สร้างองค์ความรู้ใหม่ที่เกี่ยวกับการกลายพันธุ์ใหม่ที่ทำให้เกิดความพิการ กลไกพยาธิกำเนิดโรคในช่องปากและฟัน โครงสร้างจุลภาคของฟันและกระดูก และการเปลี่ยนแปลงของเซลล์สัมพันธ์กับการลุกลามของโรค ผลิตผลงานทางวิชาการในวารสารระดับนานาชาติ และเผยแพร่องค์ความรู้วงกว้างในที่ประชุมระดับนานาชาติ ให้การวินิจฉัยที่ตรงจุด รายงานผลการวินิจฉัยโรคเป็นข้อมูลของผู้ป่วยและครอบครัว ที่เป็นประโยชน์ต่อตัวผู้ป่วยและครอบครัว ป้องกันภาวะแทรกซ้อน เฝ้าระวัง และลดโอกาสเกิดซ้ำ ทำให้ผู้ป่วยและครอบครัวมีความเข้าใจโรคและความผิดปกติดีขึ้น บ่มเพาะนักวิจัยที่มีศักยภาพผลิตผลงานนานาชาติ นักศึกษาทันตแพทย์ที่ทำโครงการวิจัยด้านผู้สูงอายุและผู้ป่วยพิเศษ ที่เป็นประโยชน์ต่อการดูแลผู้ป่วยพิเศษสถานพยาบาล และศูนย์บริการทันตสาธารณสุขมีทันตแพทย์ด้านการดูแลผู้ป่วยพิเศษ ซึ่งเป็นสาขาที่ขาดแคลน นอกจากนี้เมื่อโครงการจีโนมิกส์ประเทศไทยเริ่มดำเนินการอย่างเต็มรูปแบบ จะมีการเชื่อมโยงข้อมูลสุขภาพจากฐานข้อมูลของโครงการวิจัยเข้ากับเลขประจำตัวประชาชน 13 หลักที่เกี่ยวข้องกับสำนักงานหลักประกันสุขภาพแห่งชาติ (สปสช) เพื่อเป็นฐานข้อมูลของผู้ป่วยในประเทศไทยต่อไป

งานวิจัยในขั้นต่อไป ทีมวิจัยได้ค้นพบการทำงานของยีนหรือเอนไซม์ในช่องปากที่ไม่เคยมีการรายงานมาก่อน แต่มีหน้าที่สำคัญในการรักษาสมดุลและสุขภาพที่ดีของอวัยวะปริทันต์ จึงเป็นไปได้อย่างมากว่าสาเหตุและกลไกการเกิดโรคปริทันต์มีปัจจัยทางพันธุกรรมที่เพิ่มความเสี่ยงต่อการติดเชื้อซ่อนเร้นอยู่ และหากสามารถปรับเปลี่ยนการทำงานของเอนไซม์ในระดับโปรตีนหรือการเปลี่ยนแปลงในระดับดีเอ็นเอ หรืออาร์เอ็นเอได้ ก็จะทำให้สามารถรักษาโรคปริทันต์ที่เป็นโรคที่พบบ่อยในผู้สูงอายุและเป็นปัญหาเรื้อรังมายาวนานไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ ทำให้ผู้สูงอายุมีฟันครบ สามารถทานอาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีสุขภาพร่างกายที่สมบูรณ์ อีกทั้งการทำงานของเอนไซม์นี้ยังเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อในปอด ผิวหนัง และอวัยวะอื่นๆของร่างกายอีกด้วย นอกเหนือจากโรคปริทันต์แล้วยังทำการศึกษาสภาวะอื่นๆที่พบปัญหาทางช่องปากและฟัน อาทิ ภาวะกล้ามเนื้อเสื่อม (muscular dystrophy) ที่ส่งผลกระทบต่อการคิด พฤติกรรม การกลืน และการดูแลตนเองและสุขภาพช่องปาก โรคกระดูกเปราะที่ทำให้ความหนาแน่นของกระดูกเบ้าฟันและขากรรไกรลดลง เพิ่มความเสี่ยงต่อการสูญเสียฟันมากกว่าผู้ที่ไม่ได้เป็นโรคกระดูกถึง 3 เท่า โรคนิ่วในไตและภาวะเคลือบฟันผิดปกติ และโรคมะเร็งในช่องปาก เป็นต้น ซึ่งยังรอการศึกษาวิจัยเชิงลึกเพื่อระบุสาเหตุและหาแนวทางการรักษาโรคที่แม่นยำ

การพัฒนาเทคโนโลยีทางอณูพันธุศาสตร์ในปัจจุบันเป็นไปอย่างก้าวกระโดด ก่อให้เกิดเทคโนโลยีที่สามารถหาสาเหตุของความผิดปกติที่เกิดจากการกลายพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเทคโนโลยี whole genome sequencing (WGS) และ omics ที่สามารถตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสทั้งหมดของมนุษย์จำนวนพันล้านเบสได้ภายในเวลาไม่กี่วัน เมื่อนำมาใช้ในการถอดรหัสพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับความเจ็บป่วยหรือความพิการ ทำให้ได้ข้อมูลที่นำมาช่วยให้การวินิจฉัยสุดท้าย (definite diagnosis) ทราบการพยากรณ์โรคอย่างแม่นยำ (prognosis of disease) และทราบแนวทางการดูแลผู้ป่วยอย่างถูกต้องเหมาะสม (precision treatment) นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้ยังสามารถนำมาให้คำปรึกษาทางพันธุศาสตร์ (genetic counselling) เพื่อฟื้นฟูสุขภาพจิตใจ และลดการเกิดความผิดปกติซ้ำในครอบครัวได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยในส่วนที่เป็นการหาลำดับเบสทั้งหมด หรือ WGS โครงการวิจัยนี้ที่ดำเนินงานในปีที่สอง จะดำเนินการภายใต้โครงการจีโนมิกส์ประเทศไทยที่กำลังจะเริ่มดำเนินการอย่างเป็นทางการในเร็วๆนี้

อย่างไรก็ตาม แม้ว่า WGS ซึ่งเป็นเทคโนโลยี short-read (แต่ละ read ยาวไม่เกิน 150 nucleotides) จะทำให้แพทย์สามารถให้การวินิจฉัยโรคเพิ่มขึ้นได้เป็นจำนวนมาก แต่ diagnostic yield ก็จะจำกัด โดย short-read WGS สามารถให้การวินิจฉัยโรคพันธุกรรมได้เพียงประมาณ 1 ใน 2 ทั้งนี้เนื่องมาจาก short-read WGS มีข้อจำกัดหลายประการ เช่น ไม่สามารถตรวจเจอ structural variation (SV), repetitive sequences, extreme guanine-cytosine (GC) content และ sequences ที่มี multiple homologous elements อีกทั้งมีความคลาดเคลื่อนในข้อมูล variant phasing และต้องอาศัย reference genomes (ที่มีความไม่สมบูรณ์ และอ้างอิงจากประชากรตะวันตกเป็นหลัก) ในการแปลผล เทคโนโลยีการอ่านลำดับเบสสายยาว (long-read sequencing) ซึ่งอ่านได้ครั้งละมากกว่า 10,000 นิวคลีโอไทด์ จึงนำมาใช้ในการระบุความหลากหลายทางพันธุกรรมระดับโครงสร้างชนิด structural variation และ copy number variation ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ทรานคริปโตม เป็นการศึกษากระบวนการทางชีววิทยาในหลายระดับอาร์เอ็นเอ จากการเชื่อมโยงความสัมพันธ์ของจีโนมิกส์ (DNA) และ ทรานสคริปโตมิกส์ (RNA) จะนำไปสู่ความรู้ความเข้าใจกระบวนการทางสรีรวิทยาและชีววิทยาของความพิการได้อย่างลึกซึ้ง และสามารถใช้ดูประสิทธิผลของการใช้ยาในผู้สูงอายุ กลุ่มวิจัยซึ่งมีความพร้อมของเครื่องมือ long-read sequencing บุคลากร และความเชี่ยวชาญทาง genomics จึงเสนอโครงการเพื่อทำการศึกษาจีโนมหาการกลายพันธุ์ก่อโรค และให้การวินิจฉัย undiagnosed diseases เหล่านี้โดยละเอียดด้วย long read sequencing และ transcriptomics ควบคู่ไปกับการศึกษาในระดับจุลภาคของความผิดปกติและในระดับเซลล์ จะนำไปสู่การวินิจฉัยโรคที่แน่ชัด เป็นประโยชน์ทางตรงต่อผู้ป่วย ความรู้จากการวินิจฉัยโรคเป็นประโยชน์ต่อวงการแพทย์ ความรู้ด้านเทคนิค long-read และ transcriptome เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย นอกจากนี้ ความรู้ทางการแพทย์และการวิจัยที่ได้จากโรคหายาก สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับโรคไม่ติดต่อเรื้อรังที่มีความซับซ้อน (non-communicable complex disease) การแพ้/ดื้อยา (pharmacogenomics) และโรคติดเชื้อ (infectious disease) ได้อีกด้วย นำไปสู่การค้นพบการรักษาด้วยอาร์เอ็น

เอ และ nanoparticles รวมถึงการตัดแต่งสารพันธุกรรม ซึ่งเป็นเทคโนโลยีที่ได้รับการแสดงให้เห็นชัดแล้วว่าสามารถใช้ได้ดีในการผลิตวัคซีนโควิด-19 ที่มีประสิทธิภาพสูง และกำลังจะเป็นแนวทางในการรักษาตรงจุด (precision medicine) ต่อไปในอนาคต

โครงการนี้ยังมีส่วนร่วมสร้างเครือข่ายกับหน่วยบริการสาธารณสุขทั่วประเทศ ให้บริการตรวจวินิจฉัย และศึกษาความพิการทางช่องปากและฟันด้วยเทคโนโลยีที่ทันสมัย โดยมีจุดมุ่งหมายหลักเพื่อให้ผู้ที่มีความพิการทางใบหน้า ช่องปาก และฟัน ซึ่งอาจมีความผิดปกติทางพันธุกรรม ได้เข้าถึงบริการทางการแพทย์ที่ก้าวหน้านำองค์ความรู้ทางพันธุศาสตร์ที่ก่อให้เกิดความพิการทางทันตกรรม เพื่อหาทางป้องกันการเกิดความพิการดังกล่าว และแนวทางการรักษากรณีที่ได้เกิดความพิการนั้นส่งผลต่อพัฒนาทางด้านร่างกายเป็นไปตามปกติ ให้ผู้สูงอายุมีสุขภาพที่แข็งแรง ลดความรุนแรงของความพิการไม่ให้เป็นภาระสังคม และไม่ให้ผู้พิการเป็นภาระการดูแลของผู้สูงอายุ ลดปัญหาการเกิดความพิการของประชาชนของประเทศไทยในอนาคต

ด้านการพัฒนาบุคลากรและการเผยแพร่ความรู้ โครงการจะดำเนินการต่อเนื่องในด้านการพัฒนาบุคลากรในสาขาที่ขาดแคลน 1) ผลิตบุคลากรทางทันตแพทย์เฉพาะทางด้านผู้สูงอายุและผู้ป่วยพิเศษ ด้วยความร่วมมือของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและหลักสูตรพัฒนาทันตบุคลากรภายใต้แผนงานทันตกรรมสุขภาพสำหรับผู้สูงอายุประเทศไทย กระทรวงสาธารณสุข จัดทำหลักสูตรปริญญาโทแบบเรียนทางไกล (distance learning) และการอบรมระยะสั้น 4 เดือน 2) ส่งร่างหลักสูตรที่ปรึกษาทางพันธุศาสตร์ (genetic counsellor) ให้ผ่านภาคีวิชาชีพทั้งแพทยสภา ทันตแพทยสภา สภาการเภสัชกรรม สภาการพยาบาล และสภาเทคนิคการแพทย์ และ 3) พัฒนานักวิจัยที่มีความเชี่ยวชาญทางพันธุศาสตร์ เพื่อแก้ปัญหาทันตสาธารณสุขระดับชาติด้านสูงอายุและผู้พิการด้วยพันธุศาสตร์ต่อไป และ 4) จัดประชุมเพื่อเผยแพร่ความรู้แก่บุคลากรทางการแพทย์ การศึกษา และบุคคลทั่วไป โดยเพิ่มการเผยแพร่ความรู้ทางสื่ออิเล็กทรอนิกส์

บรรณานุกรม

1. Sanz M, Marco Del Castillo A, Jepsen S, Gonzalez-Juanatey JR, D'Aiuto F, Bouchard P, et al. Periodontitis and cardiovascular diseases: Consensus report. J Clin Periodontol. 2020;47(3):268-88.

2. Jorth P, Turner KH, Gumus P, Nizam N, Buduneli N, Whiteley M. Metatranscriptomics of the Human Oral Microbiome during Health and Disease. 2014;5(2):e01012-14.

3. Willis JR, Gabaldón T. The Human Oral Microbiome in Health and Disease: From Sequences to Ecosystems. 2020;8(2):308.

4. Baima G, Iaderosa G, Citterio F, Grossi S, Romano F, Berta GN, et al. Salivary metabolomics for the diagnosis of periodontal diseases: a systematic review with methodological quality assessment. Metabolomics : Official journal of the Metabolomic Society. 2021;17(1):1.

5. Gonçalves PF, Harris TH, Elmariah T, Aukhil I, Wallace MR, Shaddox LM. Genetic polymorphisms and periodontal disease in populations of African descent: A review. J Periodontal Res. 2018;53(2):164-73.

6. Aarabi G, Zeller T, Seedorf H, Reissmann DR, Heydecke G, Schaefer AS, et al. Genetic Susceptibility Contributing to Periodontal and Cardiovascular Disease. J Dent Res. 2017;96(6):610-7.

7. Loos BG, Van Dyke TE. The role of inflammation and genetics in periodontal disease. Periodontol 2000. 2020;83(1):26-39.

8. Sharma V, Nandan A, Sharma AK, Singh H, Bharadwaj M, Sinha DN, et al. Signature of genetic associations in oral cancer. Tumour Biol. 2017;39(10):1010428317725923.

9. Krishna A, Singh S, Singh V, Kumar V, Singh US, Sankhwar SN. Does Harvey-Ras gene expression lead to oral squamous cell carcinoma? A clinicopathological aspect. J Oral Maxillofac Pathol. 2018;22(1):65-72.

10. Murugan AK, Munirajan AK, Alzahrani AS. MicroRNAs: Modulators of the Ras Oncogenes in Oral Cancer. Journal of Cellular Physiology. 2016;231(7):1424-31.

11. Katoh M, Katoh M. Precision medicine for human cancers with Notch signaling dysregulation (Review). Int J Mol Med. 2020;45(2):279-97.

12. Osathanon T, Nowwarote N, Pavasant P. Expression and influence of Notch signaling in oral squamous cell carcinoma. J Oral Sci. 2016;58(2):283-94.
13. Gracco ALT, Zanatta S, Forin Valvecchi F, Bignotti D, Perri A, Baciliero F. Prevalence of dental agenesis in a sample of Italian orthodontic patients: an epidemiological study. Progress in Orthodontics. 2017;18(1):33.
14. Al-Ani AH, Antoun JS, Thomson WM, Merriman TR, Farella M. Hypodontia: An Update on Its Etiology, Classification, and Clinical Management. BioMed Research International. 2017;2017:9378325.
15. Shimizu T, Maeda T. Prevalence and genetic basis of tooth agenesis. Japanese Dental Science Review. 2009;45(1):52-8.
16. Lidral AC, Reising BC. The role of MSX1 in human tooth agenesis. Journal of dental research. 2002;81(4):274-8.
17. Fauzi NH, Ardini YD, Zainuddin Z, Lestari W. A review on non-syndromic tooth agenesis associated with PAX9 mutations. Japanese Dental Science Review. 2018;54(1):30-6.
18. Lammi L, Arte S, Somer M, Jarvinen H, Lahermo P, Thesleff I, et al. Mutations in AXIN2 cause familial tooth agenesis and predispose to colorectal cancer. Am J Hum Genet. 2004;74(5):1043-50.
19. Nikopensius T, Annilo T, Jagomägi T, Gilissen C, Kals M, Krjutškov K, et al. Non-syndromic Tooth Agenesis Associated with a Nonsense Mutation in Ectodysplasin-A (EDA). Journal of Dental Research. 2013;92(6):507-11.
20. Intarak N, Theerapanon T, Srijunbarl A, Suphapeetiporn K, Porntaveetus T, Shotelersuk V. Novel compound heterozygous mutations in KREMEN1 confirm it as a disease gene for ectodermal dysplasia. British Journal of Dermatology. 2018;179(3):758-60.
21. Song S, Zhao R, He H, Zhang J, Feng H, Lin L. WNT10A variants are associated with non-syndromic tooth agenesis in the general population. Hum Genet. 2014;133(1):117-24.
22. Intarak N, Theerapanon T, Thaweesapphithak S, Suphapeetiporn K, Porntaveetus T, Shotelersuk V. Genotype–phenotype correlation and expansion of orodental anomalies in LTBP3-related disorders. Molecular Genetics and Genomics. 2019;294(3):773-87.
23. Shi C, Ma N, Zhang W, Ye J, Shi H, Xiang D, et al. Haploinsufficiency of Dspp Gene Causes Dentin Dysplasia Type II in Mice. Frontiers in physiology. 2020;11:593626-.

24. Intarak N, Theerapanon T, Ittiwut C, Suphapeetiporn K, Porntaveetus T, Shotelersuk V. A novel PITX2 mutation in non-syndromic orodental anomalies. Oral Diseases. 2018;24(4):611-8.
25. Li H, Yang L, Sun Z, Yuan Z, Wu S, Sui R. A novel small deletion in the NHS gene associated with Nance-Horan syndrome. Scientific Reports. 2018;8(1):2398.
26. Otto F, Kanegane H, Mundlos S. Mutations in the RUNX2 gene in patients with cleidocranial dysplasia. Hum Mutat. 2002;19(3):209-16.
27. Gadhia K, McDonald S, Arkutu N, Malik K. Amelogenesis imperfecta: an introduction. British Dental Journal. 2012;212(8):377-9.
28. Sriwattanapong K, Nitayavardhana I, Theerapanon T, Thaweesapphithak S, Chantarawaratit P-O, Garuyakich R, et al. Age-related dental phenotypes and tooth characteristics of FAM8 3 H-associated hypocalcified amelogenesis imperfecta. Oral Diseases.n/a(n/a).
29. Whitehouse LLE, Smith CEL, Poulter JA, Brown CJ, Patel A, Lamb T, et al. Novel DLX3 variants in amelogenesis imperfecta with attenuated tricho-dento-osseous syndrome. Oral Dis. 2019;25(1):182-91.
30. Bansal AK, Shetty DC, Bindal R, Pathak A. Amelogenin: A novel protein with diverse applications in genetic and molecular profiling. J Oral Maxillofac Pathol. 2012;16(3):395-9.
31. Hu JC, Yamakoshi Y. Enamelin and autosomal-dominant amelogenesis imperfecta. Crit Rev Oral Biol Med. 2003;14(6):387-98.
32. Nitayavardhana I, Theerapanon T, Srichomthong C, Piwluang S, Wichadakul D, Porntaveetus T, et al. Four novel mutations of FAM20A in amelogenesis imperfecta type IG and review of literature for its genotype and phenotype spectra. Mol Genet Genomics. 2020;295(4):923-31.
33. Jain P, Kaul R, Saha S, Sarkar S. Tricho-dento-osseous syndrome and precocious eruption. J Clin Exp Dent. 2017;9(3):e494-e7.
34. Jalili IK. Cone-rod dystrophy and amelogenesis imperfecta (Jalili syndrome): phenotypes and environs. Eye (Lond). 2010;24(11):1659-68.
35. Riemann D, Wallrafen R, Dresbach T. The Kohlschütter-Tönz syndrome associated gene Rogdi encodes a novel presynaptic protein. Scientific Reports. 2017;7(1):15791.

36. Malloy PJ, Zhou Y, Wang J, Hiort O, Feldman D. Hereditary vitamin D-resistant rickets (HVDRR) owing to a heterozygous mutation in the vitamin D receptor. J Bone Miner Res. 2011;26(11):2710-8.

37. Frommer L, Kahaly GJ. Autoimmune Polyendocrinopathy. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2019;104(10):4769-82.

38. Porntaveetus T, Srichomthong C, Ohazama A, Suphapeetiporn K, Shotelersuk V. A novel GJA1 mutation in oculodentodigital dysplasia with extensive loss of enamel. Oral Dis. 2017;23(6):795-800.

39. Bhandari S, Pannu K. Dentinogenesis imperfecta: a review and case report of a family over four generations. Indian J Dent Res. 2008;19(4):357-61.

40. Porntaveetus T, Osathanon T, Nowwarote N, Pavasant P, Srichomthong C, Suphapeetiporn K, et al. Dental properties, ultrastructure, and pulp cells associated with a novel DSPP mutation. Oral Dis. 2018;24(4):619-27.

41. Budsamongkol T, Intarak N, Theerapanon T, Yodsanga S, Porntaveetus T, Shotelersuk V. A novel mutation in COL1A2 leads to osteogenesis imperfecta/Ehlers-Danlos overlap syndrome with brachydactyly. Genes Dis. 2019;6(2):138-46.

42. Porntaveetus T, Nowwarote N, Osathanon T, Theerapanon T, Pavasant P, Boonprakong L, et al. Compromised alveolar bone cells in a patient with dentinogenesis imperfecta caused by DSPP mutation. Clin Oral Investig. 2019;23(1):303-13.

43. Barron MJ, McDonnell ST, MacKie I, Dixon MJ. Hereditary dentine disorders: dentinogenesis imperfecta and dentine dysplasia. Orphanet Journal of Rare Diseases. 2008;3(1):31.

44. Lou S, Lamfers P, McGuire N, Boerkoel CF. Longevity in Schimke immuno-osseous dysplasia. Journal of Medical Genetics. 2002;39(12):922.

45. Specktor P, Cooper JG, Indelman M, Sprecher E. Hyperphosphatemic familial tumoral calcinosis caused by a mutation in GALNT3 in a European kindred. Journal of Human Genetics. 2006;51(5):487-90.

46. Ouattara ABI, Barro M, Nacro SF, Traoré I, Sanogo B, Diallo JW, et al. The Seckel Syndrome: A Case Observed in the Pediatric Department of the University Hospital Center Sourou Sanou (Burkina Faso). Pediatric Reports. 2020;12(1):20-1.

47. Bober MB, Jackson AP. Microcephalic Osteodysplastic Primordial Dwarfism, Type II: a Clinical Review. Curr Osteoporos Rep. 2017;15(2):61-9.
48. Qiu YH, Xu YL, Zhang WH. Effect of GSTM1, GSTT1, and GSTP1 Ile105Val polymorphisms on susceptiblity to gestational diabetes mellitus. Genet Mol Res. 2016;15(2).
49. Zaki MA, Moghazy TF, El-Deeb MMK, Mohamed AH, Mohamed NAA. Glutathione S-transferase M1 , T1 and P1 gene polymorphisms and the risk of developing type 2 diabetes mellitus in Egyptian diabetic patients with and without diabetic vascular complications. Alexandria Journal of Medicine. 2015;51(1):73-82.
50. Rice AO. Alzheimer's Disease and Oral-Systemic Health: Bidirectional Care Integration Improving Outcomes. Frontiers in Oral Health. 2021;2(36).
51. Scherer RX, Scherer WJ. U.S. state correlations between oral health metrics and Alzheimer's disease mortality, prevalence and subjective cognitive decline prevalence. Scientific Reports. 2020;10(1):20962.
52. Ribeiro GR, Costa JLR, Bovi Ambrosano GM, Rodrigues Garcia RCM. Oral health of the elderly with Alzheimer's disease. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology. 2012;114(3):338-43.
53. Meurman JH, Sanz M, Janket SJ. Oral health, atherosclerosis, and cardiovascular disease. Crit Rev Oral Biol Med. 2004;15(6):403-13.
54. Najafipour H, Malek Mohammadi T, Rahim F, Haghdoost AA, Shadkam M, Afshari M. Association of oral health and cardiovascular disease risk factors "results from a community based study on 5900 adult subjects". ISRN Cardiol. 2013;2013:782126-.
55. Joshy G, Arora M, Korda RJ, Chalmers J, Banks E. Is poor oral health a risk marker for incident cardiovascular disease hospitalisation and all-cause mortality? Findings from 172 630 participants from the prospective 45 and Up Study. BMJ Open. 2016;6(8):e012386.
56. Estrela C, Alencar AH, Kitten GT, Vencio EF, Gava E. Mesenchymal stem cells in the dental tissues: perspectives for tissue regeneration. Braz Dent J. 2011;22(2):91-8.
57. Li B, Ouchi T, Cao Y, Zhao Z, Men Y. Dental-Derived Mesenchymal Stem Cells: State of the Art. Frontiers in Cell and Developmental Biology. 2021;9(1310).
58. Kim J, Hu C, Moufawad El Achkar C, Black LE, Douville J, Larson A, et al. Patient-Customized Oligonucleotide Therapy for a Rare Genetic Disease. N Engl J Med. 2019.

59. Le Gallo M, Lozy F, Bell DW. Next-Generation Sequencing. Adv Exp Med Biol. 2017;943:119-48.

60. Jeon SA, Park JL, Kim JH, Kim JH, Kim YS, Kim JC, et al. Comparison of the MGISEQ-2000 and Illumina HiSeq 4 0 0 0 sequencing platforms for RNA sequencing. Genomics Inform. 2019;17(3):e32.

61. Mahajan MC, McLellan AS. Whole-Exome Sequencing (WES) for Illumina Short Read Sequencers Using Solution-Based Capture. Methods Mol Biol. 2020;2076:85-108.

ภาคผนวก

สรุปผลงานวิจัย/โครงการวิจัย 1 หน้ากระดาษ *A4* (สำหรับประชาสัมพันธ์)

1. ชื่อผลงาน/โครงการ จีโนมิกส์เพื่อประชากรไทยที่มีความพิการทางช่องปากและฟัน

GENOMICS FOR THAI PEOPLE WITH ORO-DENTAL DISABILITY

2. **ชื่อ - นามสกุล นักวิจัย** รศ.ทพญ.ดร. ฑัณฑริรา พรทวีทัศน์

Assoc.Prof.Dr.Thantrira Porntaveetus

3. **ที่อยู่ที่ติดต่อได้** ภาควิชาสรีรวิทยา หน่วยปฏิบัติการวิจัยทางจีโนมิกส์และทันตกรรมแม่นยำ
คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 34 ถ.อังรีดูนังต์ ปทุมวัน กรุงเทพ 10330
เบอร์โทรศัพท์ 081-999-9939 **E-mail** thantrira.p@chula.ac.th

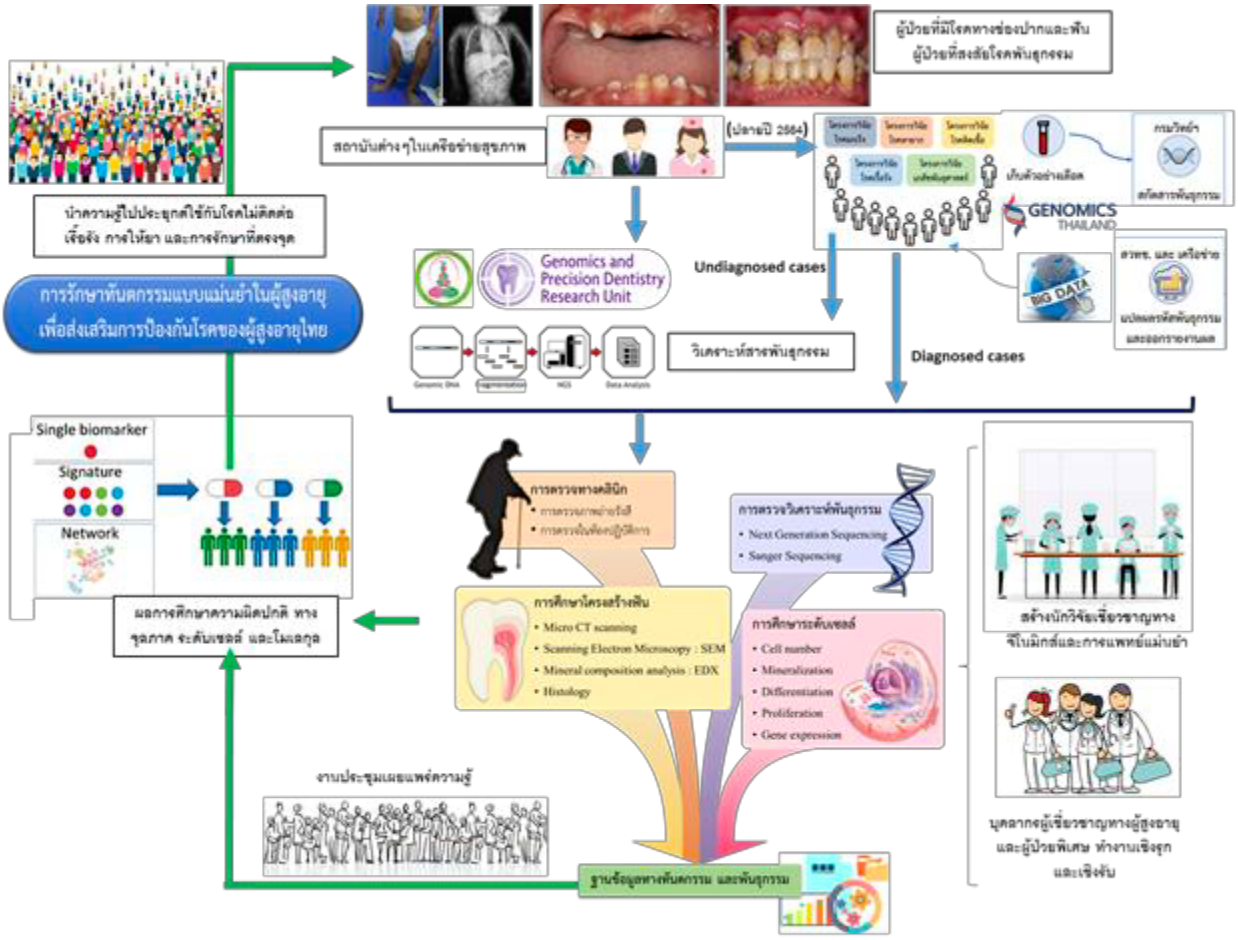
4. **ชื่อหน่วยงาน** จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. **ปี พ.ศ. ที่ดำเนินการเสร็จ** 2564

6. **คำค้น keyword**
ผู้สูงอายุ สุขภาพ ความพิการ ช่องปากและฟัน ประชากรไทย
Geriatrics, Health, Disabilities, Orodental, Thais

7. **อ้างอิง** (ใส่ URL ที่สามารถเข้าถึงเอกสารได้กรณีเผยแพร่ผลงานฉบับเต็มทางอินเตอร์เน็ต ถ้าไม่มีให้เว้นว่างไว้)

8. **รูปภาพ หรือภาพเคลื่อนไหว** (สามารถแยกไฟล์ หรือใส่รวมไว้ในเนื้อหาได้)



9. คำอธิบาย 1 หน้ากระดาษ A4 (font Tahoma ขนาด 10 แบบ Regular)

ผู้พิการทางร่างกายในประเทศไทยมีมากกว่า 2 ล้านคน โดยร้อยละ 52 หรือมากกว่า 1 ล้านรายไม่ระบุสาเหตุที่ทำให้เกิดความพิการ ซึ่งคาดว่าเป็นสาเหตุจากพันธุกรรม จากจำนวนผู้พิการทั้งประเทศพบความพิการบริเวณช่องปากและใบหน้ามากกว่าร้อยละ 7 หรือ มากกว่า 100 ประเภท อาทิ ปากแหว่งเพดานโหว่ มะเร็งช่องปาก ขากรรไกรเบี้ยว ฟันหายแต่กำเนิด ทำให้ผู้ป่วยเคี้ยวอาหารไม่ได้ พูดไม่ชัด ใบหน้าเบี้ยว ซึ่งนับเป็นความพิการที่กระทบต่อคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยเป็นอันมาก จากการสำรวจพบว่าการรักษาความพิการเหล่านี้มากกว่าร้อยละ 90 เป็นการรักษาเมื่อเกิดความพิการขึ้นแล้วและดูแลตามอาการ ซึ่งเป็นการรักษาที่ปลายเหตุ ปัญหาหลัก คือ ผู้ป่วยไม่ได้รับการตรวจวินิจฉัยหาสาเหตุการเกิดความผิดปกติอย่างแท้จริง ทำให้ได้รับการรักษาที่ไม่เหมาะสม ไม่หายขาด สิ้นเปลืองทรัพยากรอย่างมหาศาล ในปัจจุบันการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสทั้งหมดของมนุษย์ถูกนำมาใช้ในการถอดรหัสพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับความพิการ ใช้ข้อมูลทางพันธุกรรมหรือข้อมูลในระดับโมเลกุลของบุคคลร่วมกับข้อมูลทางสุขภาพอื่น เช่น การดำเนินชีวิต และสิ่งแวดล้อม และข้อมูลขั้นสูง ฐานข้อมูลขนาดใหญ่ ร่วมกับการวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศ เพื่อพัฒนาประสิทธิภาพของการรักษา ทำให้ได้ข้อมูลที่นำมาช่วยให้การวินิจฉัยสุดท้าย ทราบการพยากรณ์โรคอย่างแม่นยำ ลดผลข้างเคียงของการรักษา ลดความเสี่ยงต่อการเป็นโรค ชะลอความพิการในผู้สูงวัย ลดค่าใช้จ่ายในการรักษาไม่ตรงจุด และลดการเกิดความผิดปกติซ้ำ ดังนั้นวัตถุประสงค์โครงการ คือ 1. เพื่อพัฒนาขีดความสามารถและคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยทางช่องปากและฟันและผู้สูงอาย 2. ร่วมมือกับบุคลากรทางการแพทย์ และสถานพยาบาลต่างๆ ให้บริการด้านการวินิจฉัยตรงจุด พยากรณ์ และส่งเสริมการรักษาแก่ผู้ป่วยไทยที่มีความพิการทางช่องปากและฟันและผู้สูงอายุ 3. สร้างผลงานทางการแพทย์ ทันตแพทย์ และวิทยาศาสตร์แขนงต่างๆ ด้านช่องปากและฟัน เพื่อนำไปสู่การค้นพบองค์ความรู้ใหม่ที่เป็นประโยชน์ต่อวงการวิจัยและวิชาการ 4. สร้างความรู้ด้านพยาธิกำเนิดของความพิการ 5. ผลิตบุคลากรทางทันตแพทย์เฉพาะทางด้านผู้สูงอายุและผู้ป่วยพิเศษ ที่ปรึกษาทางพันธุศาสตร์

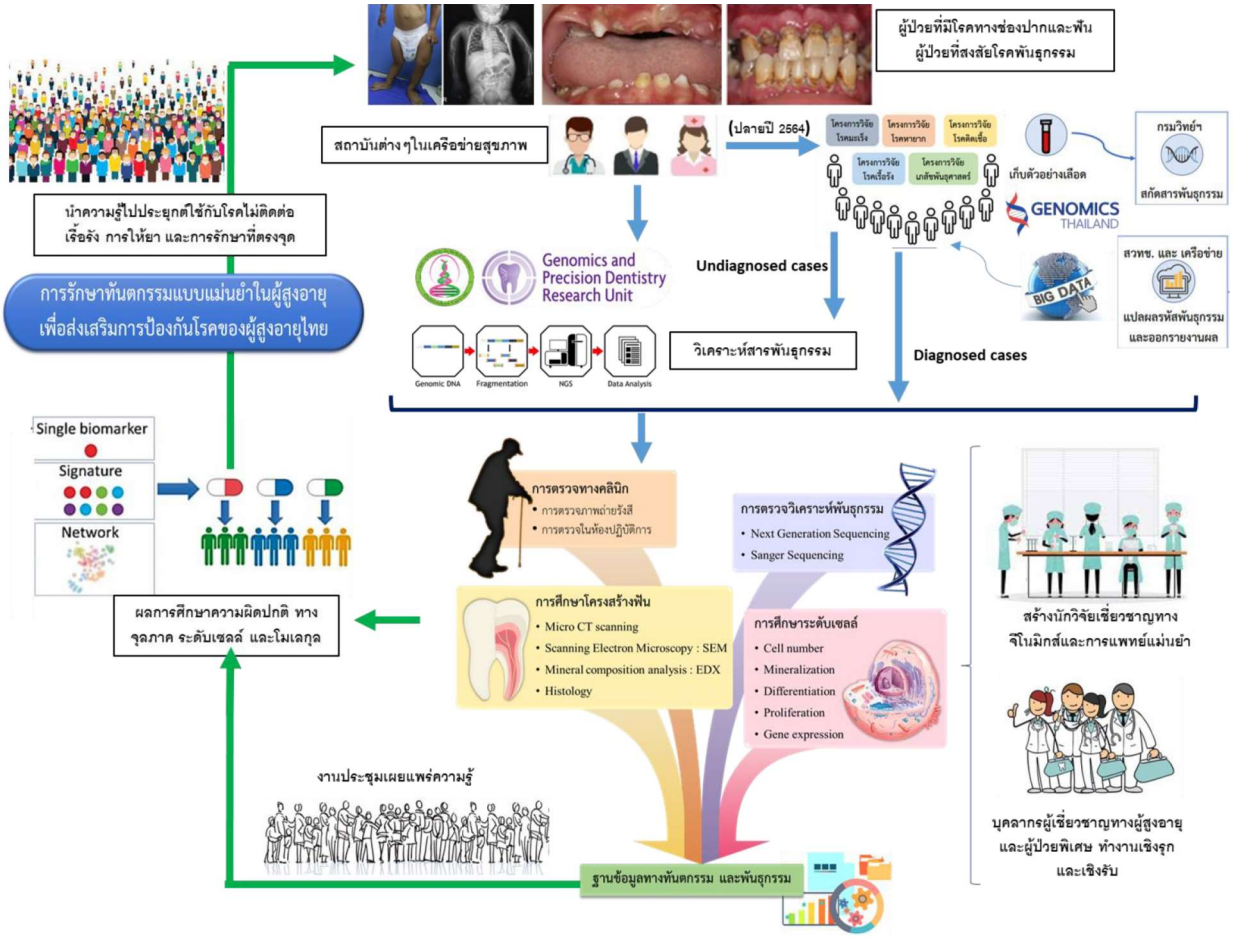
ผลงานของโครงการในหนึ่งปีที่ผ่านมา ได้แก่ 1. ผลิตและเผยแพร่ผลงานตีพิมพ์ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ จำนวน 10 เรื่อง ซึ่งเป็นองค์ความรู้ใหม่ทั้งในแง่สาเหตุและพยาธิสภาพของความพิการทางช่องปากและฟัน เป็นประโยชน์ต่อผู้ป่วย การแพทย์ การศึกษา และต่อยอดงานวิจัย 2. ด้านสาธารณสุข ส่งเสริมคุณภาพชีวิตและความสามารถของผู้ป่วยและครอบครัว ให้การตรวจทางพันธุศาสตร์และคำปรึกษา ในผู้ป่วยที่มีปัญหาทางช่องปากและฟันและโรคทางพันธุกรรมป้องกันการเกิดความพิการซ้ำในครอบครัว ครอบคลุม ผู้ที่มีความผิดปกติของเคลือบฟัน เนื้อฟันไม่แข็งแรง มีการติดเชื้อในช่องปาก ผู้ที่มีฟันหาย ผู้ที่มีกล้ามเนื้ออ่อนแรง ผู้ป่วยที่มีกระดูกเปราะ และความผิดปกติทางเมตาบอลิซึม 3. ด้านการผลิตและพัฒนาบุคลากรทางทันตแพทย์ผู้เชี่ยวชาญด้านผู้สูงอายุและผู้ป่วยพิเศษ และพัฒนาผู้เชี่ยวชาญด้านพันธุศาสตร์ ผ่านเครือข่ายวิชาภาคีวิชาชีพสุขภาพ พัฒนานักวิจัยที่มีความเชี่ยวชาญทางพันธุศาสตร์ 4. ด้านการเผยแพร่ความรู้ ทำการจัดประชุมนานาชาติและหลักสูตรฝึกอบรมทันตแพทย์ผู้สนใจด้านผู้สูงอายุและผู้ป่วยพิเศษ 5. เครือข่ายการส่งต่อผู้ป่วยทั้งทางตรง และทางอ้อมผ่านเครือข่ายโรคหายากแห่งประเทศไทย 6. จัดทำคู่มือการดูแลช่องปากผู้ป่วยที่มีปัญหาทางพันธุกรรมและความพิการทางช่องปากและฟัน

โดยสรุป ผลการศึกษาของโครงการวิจัยเรื่องจีโนมิกส์เพื่อประชากรไทยที่มีความพิการทางช่องปากและฟัน สอดคล้องกับวัตถุประสงค์ สร้างผลงานทางการแพทย์ สร้างความร่วมมือของบุคลากรทางการแพทย์ สร้างความรู้ด้านพยาธิกำเนิดของความพิการ การผลิตบุคลากรทางการแพทย์ และการพัฒนาเพิ่มขีดความสามารถและคุณภาพชีวิตของผู้สูงอายุและผู้ป่วยที่มีความพิการทางช่องปากและฟัน โดยมีหน่วยงานผู้ใช้ประโยชน์จากงานวิจัย ได้แก่ บุคลากรและหน่วยงานทางสาธารณสุข การศึกษา และการวิจัย

สรุปผลงานวิจัย/โครงการวิจัย 5 บรรทัด

(สำหรับเผยแพร่ในระบบ EXPLORE ผ่านทางเว็บไซต์ www.thai-explore.net)

1. **ชื่อผลงาน/โครงการ** จีโนมิกส์เพื่อประชากรไทยที่มีความพิการทางช่องปากและฟัน
   GENOMICS FOR THAI PEOPLE WITH ORO-DENTAL DISABILITY
2. **ชื่อ - นามสกุล นักวิจัย** รศ.ทพญ.ดร. ฑัณฑริรา พรทวีทัศน์
   Assoc.Prof.Dr.Thantrira Porntaveetus
3. **ที่อยู่ที่ติดต่อได้** ภาควิชาสรีรวิทยา หน่วยปฏิบัติการวิจัยทางจีโนมิกส์และทันตกรรมแม่นยำ
   คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 34 ถ.อังรีดูนังต์ ปทุมวัน กรุงเทพ 10330
   เบอร์โทรศัพท์ 081-999-9939 **E-mail** thantrira.p@chula.ac.th
4. **ชื่อหน่วยงาน** จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
5. **ปี พ.ศ. ที่ดำเนินการเสร็จ** 2564
6. **คำค้น keyword**
   ผู้สูงอายุ สุขภาพ ความพิการ ช่องปากและฟัน ประชากรไทย
   Geriatrics, Health, Disabilities, Orodental, Thais
7. **อ้างอิง** (ใส่ URL ที่สามารถเข้าถึงเอกสารได้กรณีเผยแพร่ผลงานฉบับเต็มทางอินเตอร์เน็ต ถ้าไม่มีให้เว้นว่างไว้)
8. **รูปภาพ หรือภาพเคลื่อนไหว**



9. คำอธิบาย 5 บรรทัด (font Tahoma ขนาด 10 แบบ Regular)

(สรุปรายละเอียดผลงานวิจัย/โครงการวิจัย มีความยาวไม่เกิน 5 บรรทัด อธิบายด้วยภาษาง่ายๆ เข้าใจได้ง่าย ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อผู้ใช้งานทุกระดับ)

ความพิการทางช่องปากและฟันกระทบต่อคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยเป็นอันมาก ปัญหาใหญ่ คือ ผู้ป่วยไม่ได้รับการวินิจฉัยความพิการ โครงการนำการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสทั้งหมดของมนุษย์มาใช้ในการถอดรหัสพันธุกรรม ร่วมกับการศึกษาทางห้องปฏิบัติการเชิงลึก ให้การวินิจฉัยสุดท้าย ทราบการพยากรณ์โรค ลดผลข้างเคียงของการรักษา ชะลอความพิการในผู้สูงวัย และลดการเกิดความผิดปกติซ้ำ โครงการผลิตและเผยแพร่ผลงานตีพิมพ์ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติที่มีประโยชน์ต่อผู้พิการทางช่องปากและฟัน จำนวนกว่า 10 เรื่องใน 1 ปี เป็นองค์ความรู้ใหม่ทั้งในแง่สาเหตุและพยาธิสภาพของความพิการ ด้านสาธารณสุข สร้างความร่วมมือของบุคลากรทางการแพทย์ ส่งเสริมคุณภาพชีวิตและความสามารถของผู้ป่วยและครอบครัว ให้การตรวจทางพันธุศาสตร์และคำปรึกษา ครอบคลุม ผู้ที่มีความผิดปกติของเคลือบฟัน เนื้อฟันไม่แข็งแรง มีการติดเชื้อในช่องปาก ผู้ที่มีฟันหาย ผู้ที่มีกล้ามเนื้ออ่อนแรง ผู้ป่วยที่มีกระดูกเปราะ และความผิดปกติทางเมตาบอลิซึม โครงการยังร่วมผลิตและพัฒนาบุคลากรทางทันตแพทย์ผู้เชี่ยวชาญด้านผู้สูงอายุและผู้ป่วยพิเศษ และร่างหลักสูตรผู้เชี่ยวชาญด้านพันธุศาสตร์ผ่านเครือข่ายวิชาภาคีวิชาชีพสุขภาพ และพัฒนานักวิจัยที่มีความเชี่ยวชาญทางพันธุศาสตร์ จัดประชุมนานาชาติและหลักสูตรฝึกอบรมทันตแพทย์ผู้สนใจด้านผู้สูงอายุและผู้ป่วยพิเศษ ร่วมสร้างเครือข่ายการส่งต่อผู้ป่วยและจัดทำคู่มือการดูแลช่องปากผู้ป่วยที่มีปัญหาทางพันธุกรรมและความพิการทางช่องปากและฟัน โดยมีหน่วยงานผู้ใช้ประโยชน์จากงานวิจัย ได้แก่ บุคลากรและหน่วยงานทางสาธารณสุข การศึกษา และการวิจัย

10. **นำเข้าข้อมูลสรุปผลงานวิจัย/โครงการวิจัย 5 บรรทัด ในระบบ EXPLORE ผ่านทางเว็บไซต์ www.thai-explore.net**

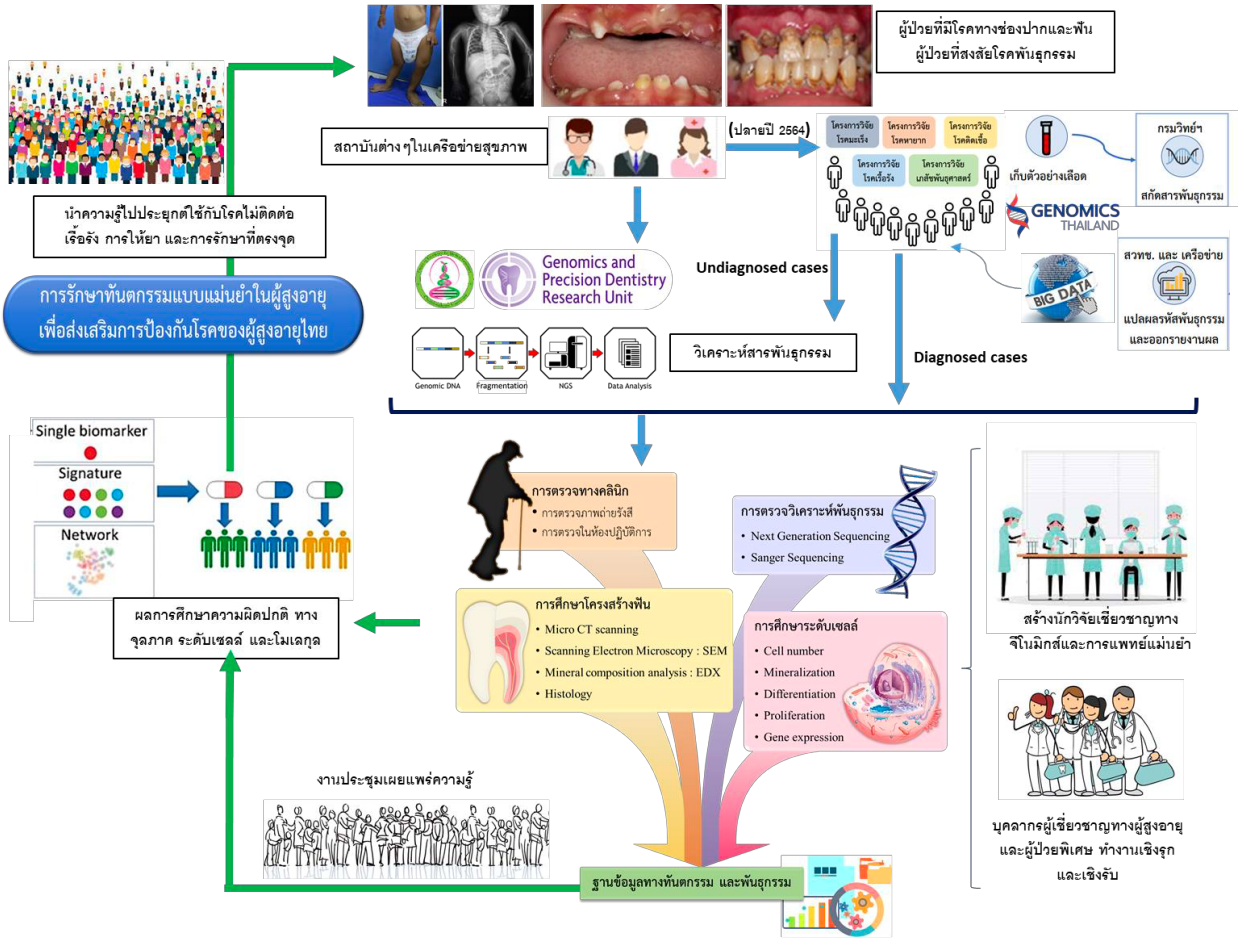
สรุปงานวิจัยในรูปแบบ info graphic

1. **ตราสัญลักษณ์ของ วช. และหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง**





2. **ชื่อผลงาน/โครงการ** จีโนมิกส์เพื่อประชากรไทยที่มีความพิการทางช่องปากและฟัน
   GENOMICS FOR THAI PEOPLE WITH ORO-DENTAL DISABILITY
3. **ชื่อ - นามสกุล นักวิจัย** รศ.ทพญ.ดร. ฑัณฑริรา พรทวีทัศน์
   Assoc.Prof.Dr.Thantrira Porntaveetus
4. **E-mail** thantrira.p@chula.ac.th
5. **ชื่อหน่วยงาน** จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
6. **ประมวลผลงานวิจัยสรุปเป็นภาพ info graphic ในรูปแบบต่างๆ อย่างสร้างสรรค์ที่เข้าใจง่ายและน่าสนใจ**



www.nrct.go.th
@nrctofficial
สอบถามรายละเอียดเพิ่มเติมได้ที่ :
รศ.ทพญ.ดร.ทัณฑริรา พรทวีทัศน์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย Thantrira.p@chula.ac.th

แบบฟอร์มประเมินผลการวิจัยในการนำไปใช้ประโยชน์อย่างเป็นรูปธรรม
ที่ได้รับการจัดสรรงบประมาณ

****

<u>ส่วนที่ 1</u> ข้อมูลทั่วไป

ชื่อแผนงานวิจัย/ชื่อโครงการวิจัย

จีโนมิกส์เพื่อประชากรไทยที่มีความพิการทางช่องปากและฟัน

GENOMICS FOR THAI PEOPLE WITH ORO-DENTAL DISABILITY

ชื่อนักวิจัย รศ.ทพญ.ดร.ทัณฑิริรา พรทวีทัศน์ หน่วยงาน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

งบประมาณที่ได้รับการสนับสนุน 3,517,000 (บาท) ปีงบประมาณที่ได้รับการสนับสนุน 2563

วัน/เดือน/ปี ที่ดำเนินการวิจัยแล้วเสร็จ 28 สิงหาคม 2564

เป้าหมายดำเนินการ

- เพื่อพัฒนาขีดความสามารถและคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยทางช่องปากและฟันและผู้สูงอายุให้เข้าถึงทรัพยากรและบริการสาธารณะของรัฐ
- ร่วมมือกับบุคลากรทางการแพทย์ และ สถานพยาบาลต่างๆ ให้บริการด้านการวินิจฉัยตรงจุดทางพันธุกรรมพยากรณ์และส่งเสริมการรักษาแก่ผู้ป่วยไทยที่มีความพิการทางช่องปากและฟันและผู้สูงอายุ ที่เข้าไม่ถึงเทคโนโลยีพันธุศาสตร์ที่ก้าวหน้า และให้คำปรึกษาทางพันธุศาสตร์แก่ครอบครัวผู้ป่วยเพื่อลดอุบัติการณ์การเกิดโรคซ้ำในประชากรไทย เพื่อไม่ให้ผู้ป่วยเป็นภาระการดูแลของผู้สูงอายุ และเพื่อไม่ให้เป็นผู้สูงอายุที่มีความพิการรุนแรงและเป็นภาระของสังคม
- สร้างผลงานทางการแพทย์ ทันตแพทย์ และวิทยาศาสตร์แขนงต่างๆ ด้านช่องปากและฟัน เพื่อนำไปสู่การค้นพบองค์ความรู้ใหม่ที่เป็นประโยชน์ต่อวงการวิจัยและวิชาการ
- สร้างความรู้ด้านพยาธิกำเนิดของความพิการ และค้นหาวิธีการรักษาความพิการทางช่องปากและฟัน จากต้นเหตุ เพื่อส่งเสริมคุณภาพชีวิตของผู้ป่วย ผู้สูงอายุและครอบครัว และป้องกันความพิการที่ยั่งยืน
- ผลิตบุคลากรทางทันตแพทย์เฉพาะทางด้านผู้สูงอายุและผู้ป่วยพิเศษ ที่ปรึกษาทางพันธุศาสตร์ และนักวิจัยเพื่อแก้ปัญหาทันตสาธารณสุขระดับชาติด้านสูงอายุและผู้พิการ

พื้นที่การใช้ประโยชน์ ทั่วประเทศ

<u>ส่วนที่ 2</u> ผลการวิจัยและการนำไปใช้ประโยชน์อย่างเป็นรูปธรรม

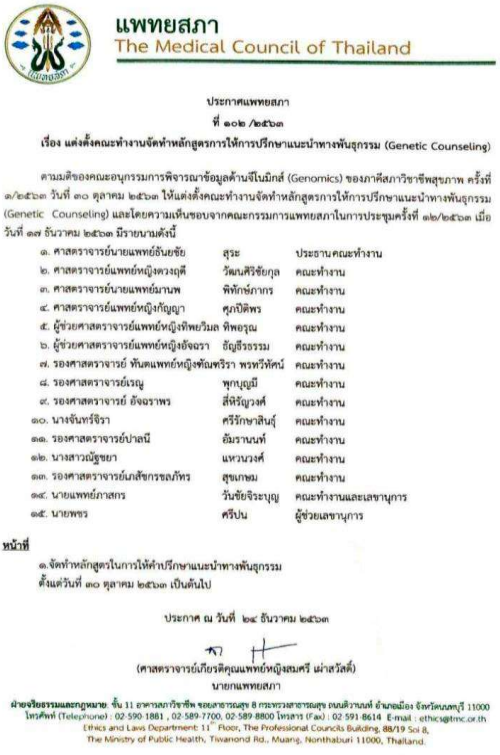
2.1 การนำไปใช้ประโยชน์อย่างเป็นรูปธรรม (สามารถตอบได้มากกว่า 1 มิติ)

☑ **มิตินโยบาย** หมายถึง การมีเอกสารแสดงความสนใจ ความต้องการ หรือการนำข้อมูลและแนวทางแก้ไขซึ่งได้จากผลงานวิจัย สิ่งประดิษฐ์และนวัตกรรมมาใช้ประกอบการแก้ไขปัญหาสำคัญและปัญหาเร่งด่วนของประเทศในองค์กร หรือหน่วยงานภาครัฐและภาคเอกชน

- ปัญหาสำคัญ/ปัญหาเร่งด่วนของประเทศ คือ ไม่มีหน่วยงานกลางของรัฐที่ดำเนินการด้านการแพทย์จีโนมิค การวิจัยทางคลินิกยังน้อยและขาดความเชื่อมโยงกับปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย บุคลากรด้านพันธุศาสตร์การแพทย์ด้านชีวสารสนเทศและด้านที่เกี่ยวข้องยังไม่เพียงพอ
- ชื่อองค์กร หรือหน่วยงานภาครัฐและภาคเอกชน ที่นำงานวิจัยไปใช้ประโยชน์:หน่วยงานผู้ใช้ประโยชน์จากงานวิจัย ได้แก่ บุคลากรทางการแพทย์ ทันตแพทย์ ทันตบุคลากร นักวิจัย นักวิชาการ นักศึกษา นักเรียน และผู้ที่สนใจด้านพันธุศาสตร์และความพิการทางช่องปากและฟัน จากหน่วยงานต่างๆ เช่น กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมการแพทย์ กรมควบคุมโรค กรมอนามัยกรมสุขภาพจิต คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล คณะแพทยศาสตร์และคณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี คณะแพทยศาสตร์และคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น มหาวิทยาลัยเชียงใหม่มหาวิทยาลัยบูรพา มหาวิทยาลัยนเรศวร โรงพยาบาลเด็ก วิทยาลัยแพทย์ศาสตร์โรงพยาบาลพระมงกุฎ โรงพยาบาลราชวิถี โรงพยาบาลพระปกเกล้าจันทบุรี สถาบันมะเร็งแห่งชาติ สถาบันโรคทรวงอก สถาบันทันตกรรม สำนักงานทันตะสาธารณสุข แพทยสมาคมแห่งประเทศไทย ทันตแพทย์สมาคมแห่งประเทศไทย สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย สมาคมมนุษยพันธุศาสตร์ แพทยสภา สภาการพยาบาล สภาเภสัชกรรม สภาเทคนิคการแพทย์ และทันตแพทยสภา
- ช่วงเวลาที่นำงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ (วัน/เดือน/ปี) 2563-ปัจจุบัน
- ลักษณะการนำงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ (โปรดให้คำอธิบาย พร้อมแนบเอกสาร/ภาพประกอบ)
    - แต่งตั้งคณะทำงานจัดทำหลักสูตรการให้คำปรึกษาแนะนำทางพันธุกรรม โดยมติของอนุกรรมการการพิจารณาข้อมูลด้านจีโนมิกส์ของภาคีสภาวิชาชีพสุขภาพ ครั้งที่ 1/2563 สามวันที่ 30 ตุลาคม 2563 ให้แต่งตั้งคณะทำงานจัดทำหลักสูตรการให้คำปรึกษาแนะนำทางพันธุกรรม และโดยความเห็นชอบของคณะกรรมการแพทยสภาในการประชุมครั้งที่ 12/2563 เมื่อวันที่ 17 ธันวาคม 2563 โดยให้จัดทำหลักสูตรในการให้คำปรึกษาแนะนำทางพันธุกรรมตั้งแต่ 30 ตุลาคม 2563 เป็นต้นไป จนแล้วเสร็จรวมทั้งประสานแต่ละเครือข่ายภาคีวิชาชีพ เพื่อให้หลักสูตรนำไปสู่การบังคับใช้และเป็นการยอมรับของสภาวิชาชีพสุขภาพ
- การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นต่อองค์กร หรือหน่วยงานภาครัฐและภาคเอกชน (โปรดให้คำอธิบาย พร้อมแนบเอกสาร/ภาพประกอบ)
    - ภาคีสภาวิชาชีพสุขภาพ ได้แก่ แพทยสภาทันตแพทย์สภา สภาเภสัชกรรมสภาการพยาบาลสภาเทคนิคการแพทย์ ร่วมพิจารณา และยอมรับในการจัดตั้งหลักสูตร การให้คำปรึกษาแนะนำทาง

พันธุกรรมซึ่งเป็นหลักสูตรกลางหลักสูตรแรกในประเทศไทย ที่เป็นการทำงานประสานร่วมกันระหว่างภาคีสภาวิชาชีพสุขภาพ

- ก่อตั้งสมาคมมนุษยธรรมพันธุศาสตร์ขึ้นเป็นครั้งแรกในประเทศไทย เมื่อวันที่ 27 ธันวาคม 2562 เพื่อดำเนินการส่งเสริมการศึกษางานวิจัยและนวัตกรรมที่เกี่ยวข้องกับด้านพันธุศาสตร์ทุกสาขาที่เกี่ยวข้องกับมนุษย์ ส่งเสริมการศึกษาผลกระทบทางสังคมจริยธรรมและกฎหมายที่เกี่ยวข้องกับความรู้และเทคโนโลยีด้านพันธุศาสตร์ที่เกี่ยวกับมนุษย์ สนับสนุนพัฒนานโยบายและแนวปฏิบัติส่งเสริมงานด้านวิชาการสนับสนุนกิจการและร่วมมือกับหน่วยงานราชการและองค์การต่างๆทั้งในประเทศและต่างประเทศที่เกี่ยวข้องกับงานด้านพันธุศาสตร์ของมนุษย์



แพทยสภา
The Medical Council of Thailand

ประกาศแพทยสภา
ที่ ๑๐๒ /๒๕๖๓
เรื่อง แต่งตั้งคณะทำงานจัดทำหลักสูตรการให้การปรึกษาแนะนำทางพันธุกรรม (Genetic Counseling)

ตามมติของคณะอนุกรรมการพิจารณาข้อมูลด้านดีโนมิกส์ (Genomics) ของภาคีสภาวิชาชีพสุขภาพ ครั้งที่ ๑/๒๕๖๓ วันที่ ๓๐ ตุลาคม ๒๕๖๓ ให้แต่งตั้งคณะทำงานจัดทำหลักสูตรการให้การปรึกษาแนะนำทางพันธุกรรม (Genetic Counseling) และโดยความเห็นชอบจากคณะกรรมการแพทยสภาในการประชุมครั้งที่ ๑๒/๒๕๖๓ เมื่อวันที่ ๑๗ ธันวาคม ๒๕๖๓ มีรายนามดังนี้

๑. ศาสตราจารย์นายแพทย์ธันยชัย	สุระ	ประธานคณะทำงาน
๒. ศาสตราจารย์แพทย์หญิงวงกมุดี	วัฒนศิริชัยกุล	คณะทำงาน
๓. ศาสตราจารย์นายแพทย์มานพ	พิทักษ์ภากร	คณะทำงาน
๔. ศาสตราจารย์แพทย์หญิงกัญญา	ศุภปิติพร	คณะทำงาน
๕. ผู้ช่วยศาสตราจารย์แพทย์หญิงทิพวรินล	ทิพอรุณ	คณะทำงาน
๖. ผู้ช่วยศาสตราจารย์แพทย์หญิงอัจฉรา	อัญธีรธรรม	คณะทำงาน
๗. รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิงพัณฑพิรา พรหวิหัตน์		คณะทำงาน
๘. รองศาสตราจารย์เรณู	พุกบุญมี	คณะทำงาน
๙. รองศาสตราจารย์ อัจฉราพร	สีหิรัญวงศ์	คณะทำงาน
๑๐. นางจันทร์จิรา	ศรีรักษาสินธุ์	คณะทำงาน
๑๑. รองศาสตราจารย์ปาลนี	อัมรานนท์	คณะทำงาน
๑๒. นางสาวณัฐยา	แหวนวงศ์	คณะทำงาน
๑๓. รองศาสตราจารย์เมาลิยัภรณภัทร	สุขเกษม	คณะทำงาน
๑๔. นายแพทย์ภาสกร	วันชัยจิระบุญ	คณะทำงานและเลขานุการ
๑๕. นายพชร	ศรีปน	ผู้ช่วยเลขานุการ

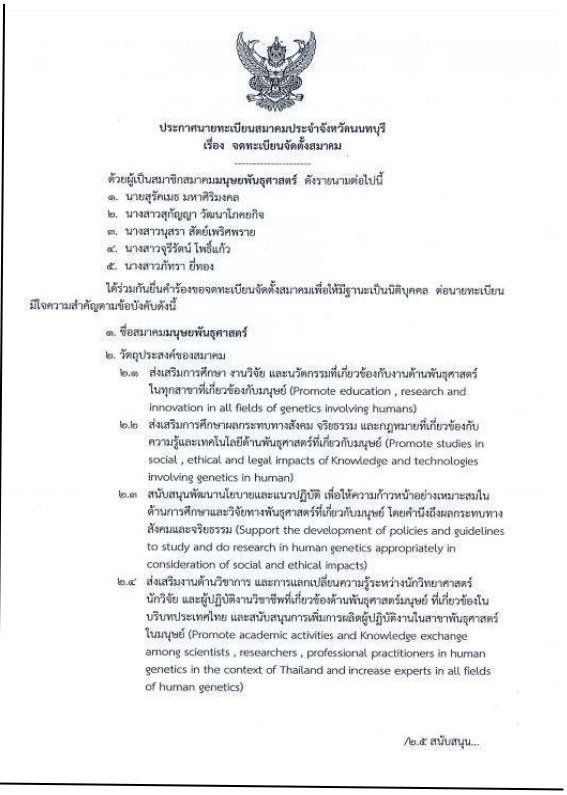
หน้าที่

๑.จัดทำหลักสูตรในการให้คำปรึกษาแนะนำทางพันธุกรรม
ตั้งแต่วันที่ ๓๐ ตุลาคม ๒๕๖๓ เป็นต้นไป

ประกาศ ณ วันที่ ๒๔ ธันวาคม ๒๕๖๓

(ศาสตราจารย์เกียรติคุณแพทย์หญิงสมศรี เผ่าสวัสดิ์)
นายกแพทยสภา

ฝ่ายจริยธรรมและกฎหมาย ชั้น 11 อาคารสภาวิชาชีพ รองอาธารณสุข 8 กระทรวงสาธารณสุข ถนนติวานนท์ ตำบลตลาดขวัญ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000
โทรศัพท์ (Telephone) : 02-590-1881 , 02-589-7700, 02-589-8800 โทรสาร (Fax) : 02-591-8614 E-mail : ethics@tmc.or.th
Ethics and Laws Department 11th Floor, The Professional Councils Building, 88/19 Soi 8,
The Ministry of Public Health, Tiwanond Rd., Muang, Nonthaburi 11000, Thailand.



ประกาศนายทะเบียนสมาคมประจำจังหวัดนนทบุรี
เรื่อง จดทะเบียนจัดตั้งสมาคม

ด้วยผู้เป็นสมาชิกสมาคมมนุษยพันธุศาสตร์ ดังรายนามต่อไปนี้

๑. นายสุรัตเมธ มหาศิริมงคล
๒. นางสาวสุกัญญา วัฒนาโกยกิจ
๓. นางสาวนุสรา สัตย์เพริศพราย
๔. นางสาวจุรีรัตน์ ไพจิ่แก้ว
๕. นางสาวภัทรา ยี่ทอง

ได้ร่วมกันยื่นคำร้องขอจดทะเบียนจัดตั้งสมาคมเพื่อให้มีฐานะเป็นนิติบุคคล ต่อนายทะเบียน มีใจความสำคัญตามข้อบังคับดังนี้

๑. ชื่อสมาคมมนุษยพันธุศาสตร์

๒. วัตถุประสงค์ของสมาคม

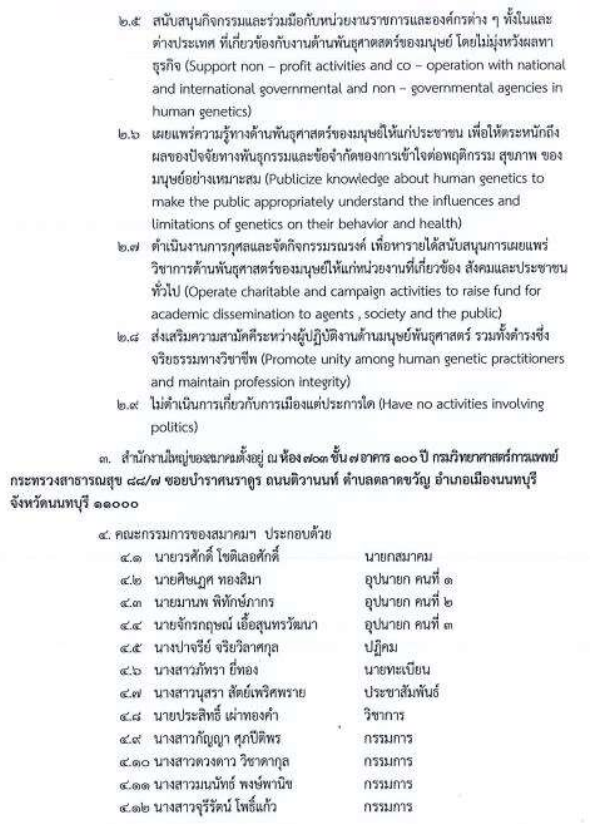
๒.๑ ส่งเสริมการศึกษา งานวิจัย และนวัตกรรมที่เกี่ยวข้องกับงานด้านพันธุศาสตร์ในทุกสาขาที่เกี่ยวข้องกับมนุษย์ (Promote education , research and innovation in all fields of genetics involving humans)

๒.๒ ส่งเสริมการศึกษาผลกระทบทางสังคม จริยธรรม และกฎหมายที่เกี่ยวข้องกับความรู้และเทคโนโลยีด้านพันธุศาสตร์ที่เกี่ยวกับมนุษย์ (Promote studies in social , ethical and legal impacts of Knowledge and technologies involving genetics in human)

๒.๓ สนับสนุนพัฒนานโยบายและแนวปฏิบัติ เพื่อให้ความก้าวหน้าอย่างเหมาะสมในด้านการศึกษาและวิจัยทางพันธุศาสตร์ที่เกี่ยวกับมนุษย์ โดยคำนึงถึงผลกระทบทางสังคมและจริยธรรม (Support the development of policies and guidelines to study and do research in human genetics appropriately in consideration of social and ethical impacts)

๒.๔ ส่งเสริมงานด้านวิชาการ และการแลกเปลี่ยนความรู้ระหว่างนักวิทยาศาสตร์ นักวิจัย และผู้ปฏิบัติงานวิชาชีพที่เกี่ยวข้องด้านพันธุศาสตร์มนุษย์ ที่เกี่ยวข้องในบริบทประเทศไทย และสนับสนุนการเพิ่มการผลิตผู้ปฏิบัติงานในสาขาพันธุศาสตร์ในมนุษย์ (Promote academic activities and Knowledge exchange among scientists , researchers , professional practitioners in human genetics in the context of Thailand and increase experts in all fields of human genetics)

/๒.๕ สนับสนุน...



๒.๕ สนับสนุนกิจกรรมและร่วมมือกับหน่วยงานราชการและองค์กรต่าง ๆ ทั้งในและต่างประเทศ ที่เกี่ยวข้องกับงานด้านพันธุศาสตร์ของมนุษย์ โดยไม่มุ่งหวังผลทางธุรกิจ (Support non – profit activities and co – operation with national and international governmental and non – governmental agencies in human genetics)

๒.๖ เผยแพร่ความรู้ทางด้านพันธุศาสตร์ของมนุษย์ให้แก่ประชาชน เพื่อให้ตระหนักถึงผลของปัจจัยทางพันธุกรรมและข้อจำกัดของการเข้าใจต่อพฤติกรรม สุขภาพ ของมนุษย์อย่างเหมาะสม (Publicize knowledge about human genetics to make the public appropriately understand the influences and limitations of genetics on their behavior and health)

๒.๗ ดำเนินงานการกุศลและจัดกิจกรรมรณรงค์ เพื่อหารายได้สนับสนุนการเผยแพร่วิชาการด้านพันธุศาสตร์ของมนุษย์ให้แก่หน่วยงานที่เกี่ยวข้อง สังคมและประชาชนทั่วไป (Operate charitable and campaign activities to raise fund for academic dissemination to agents , society and the public)

๒.๘ ส่งเสริมความสามัคคีระหว่างผู้ปฏิบัติงานด้านมนุษย์พันธุศาสตร์ รวมทั้งดำรงซึ่งจริยธรรมทางวิชาชีพ (Promote unity among human genetic practitioners and maintain profession integrity)

๒.๙ ไม่ดำเนินการเกี่ยวกับการเมืองแต่ประการใด (Have no activities involving politics)

๓. สำนักงานใหญ่ของสมาคมตั้งอยู่ ณ ห้อง ๗๐๓ ชั้น ๗ อาคาร ๑๐๐ ปี กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ๘๘/๗ ซอยบำราศนราดูร ถนนติวานนท์ ตำบลตลาดขวัญ อำเภอเมืองนนทบุรี จังหวัดนนทบุรี ๑๑๐๐๐

๔. คณะกรรมการของสมาคมฯ ประกอบด้วย

๔.๑	นายวรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์	นายกสมาคม
๔.๒	นายศิษฎศ ทองสิมา	อุปนายก คนที่ ๑
๔.๓	นายมานพ พิทักษ์ภากร	อุปนายก คนที่ ๒
๔.๔	นายจักรกฤษณ์ เอื้อสุนทรวัฒนา	อุปนายก คนที่ ๓
๔.๕	นางปาจรีย์ จริยวิลาศกุล	ปฏิคม
๔.๖	นางสาวภัทรา ยี่ทอง	นายทะเบียน
๔.๗	นางสาวนุสรา สัตย์เพริศพราย	ประชาสัมพันธ์
๔.๘	นายประสิทธิ์ เผ่าทองคำ	วิชาการ
๔.๙	นางสาวกัญญา ศุภปีติพร	กรรมการ
๔.๑๐	นางสาวดวงตาว วิชาตากุล	กรรมการ
๔.๑๑	นางสาวมนนัทธ์ พงษ์พานิช	กรรมการ
๔.๑๒	นางสาวจุรีรัตน์ โพธิ์แก้ว	กรรมการ



-๓-

๔.๑๓	นางพัณพริรา พรหวีหัตน์	เหรัญญิก
๔.๑๔	นางรัชนีกร ธรรมโชติ	ผู้ช่วยเหรัญญิก
๔.๑๕	นายสุรัคเมธ มหาศิริมงคล	เลขานุการ
๔.๑๖	นางสาวสุกัญญา วัฒนาโกยกิจ	ผู้ช่วยเลขานุการ

นายทะเบียนสมาคมประจำจังหวัดนนทบุรี ได้มีคำสั่งให้รับจดทะเบียนจัดตั้งสมาคมรายนี้ เลขทะเบียนที่ จ.นบ ๒๔ /๒๕๖๒ ตั้งแต่วันที่ ๒๑ ธันวาคม ๒๕๖๒

ฉะนั้น อาศัยอำนาจตามความในมาตรา ๘๒ แห่งประมวลกฎหมายแพ่งและพาณิชย์ที่ได้ตรวจชำระใหม่ พ.ศ. ๒๕๓๕ จึงขอประกาศให้ทราบโดยทั่วกัน

ประกาศ ณ วันที่ ๒๑ ธันวาคม พ.ศ. ๒๕๖๒

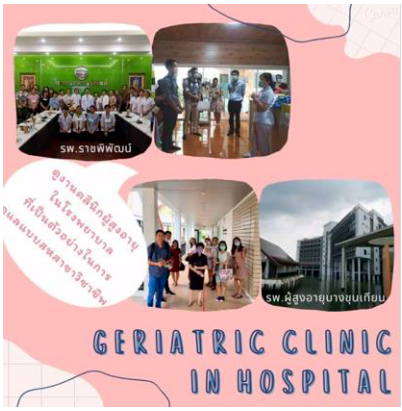
(นายอดิเทพ กมลวรชัย)
ปลัดจังหวัด ปฏิบัติราชการแทน
ผู้ว่าราชการจังหวัดนนทบุรี
นายทะเบียนสมาคมประจำจังหวัดนนทบุรี

☑ **มิติวิชาการ** หมายถึง การมีเอกสารแสดงถึงการอ้างอิง (Citations) บทความวิจัย ที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ ซึ่งมี Peer-review (โปรดแนบเอกสาร/หลักฐานอ้างอิง)
โครงการ มีผลงานตีพิมพ์ในระดับนานาชาติจำนวน 10 เรื่อง แต่เนื่องจากโครงการดำเนินการเป็นปีแรก ดังนั้น การอ้างอิงบทความวิจัยจะแสดงผลในปีถัดๆไป

☑ **มิติเชิงสังคม/ชุมชน** หมายถึง การมีเอกสารแสดงความสนใจ หรือความต้องการเข้ารับการถ่ายทอดความรู้ของชุมชน ท้องถิ่น หรือองค์กร (ไม่ใช่หน่วยงานต้นสังกัดของนักวิจัย/หน่วยงานให้ทุน) ที่แสดงให้เห็นถึงการนำงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ และรูปแบบการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นต่อชุมชน ท้องถิ่น องค์กร

- ชื่อชุมชน ท้องถิ่น หรือองค์กร ที่นำงานวิจัยไปใช้ประโยชน์
  สมาคมมนุษยธรรมพันธุศาสตร์, โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย, มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, Chinese Stomatological Association, ศูนย์ดูแลภาวะสมองเสื่อม รพ จุฬาฯ, ศูนย์การเรียนรู้ฟื้นฟูเด็กพิการโดยครอบครัว, ชุมชนในอำเภอลำลูกกาจังหวัดปทุมธานี, โรงเรียนวัดปทุมวนารามฯ, โรงพยาบาลผู้สูงอายุบางขุนเทียน, โรงพยาบาลราชพิพัฒน์, คลินิกพาร์กินสัน โรงพยาบาลจุฬาฯ
- ช่วงเวลาที่นำงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ (วัน/เดือน/ปี) 2563-ปัจจุบัน
- ลักษณะการนำงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ (โปรดให้คำอธิบาย พร้อมแนบเอกสาร/ภาพประกอบ)
  - ร่วมจัดตั้งและดำเนินงานสมาคมมนุษยพันธุศาสตร์เป็นแห่งแรกในประเทศไทย

- ได้รับเชิญเป็นวิทยากร บรรยายด้านจีโนมิกส์และโรคทางพันธุกรรม ที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย โดยผู้เข้าร่วมงานเป็นบุคลากรทางการแพทย์ นักวิทยาศาสตร์และนักวิจัย
- ได้รับเชิญเป็นวิทยากรบรรยายด้านความผิดปกติทางช่องปากและฟันและการรักษาทางทันตกรรมในผู้ป่วยที่มีปัญหาทางช่องปากและฟันที่มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
- ได้รับเชิญจากประเทศจีนในการเข้าร่วมการประชุมและอภิปรายทางทันตแพทย์ งานวิจัยทางคลินิก และงานวิจัยพื้นฐานที่เกี่ยวข้องกับปัญหาทางช่องปากและพันธุกรรม





















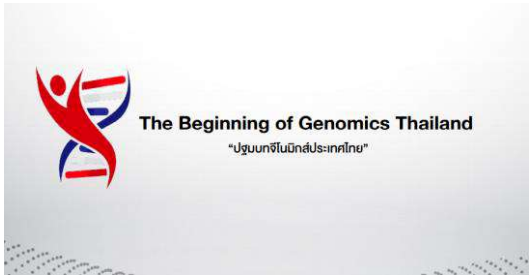






- การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นต่อชุมชน ท้องถิ่น องค์กร (โปรดให้คำอธิบาย พร้อมแนบเอกสาร/ภาพประกอบ)

  ■ สมาคมมนุษยธรรมพันธุศาสตร์ จัดงานประชุมสมาคมมนุษยธรรมพันธุศาสตร์เป็นครั้งแรกในประเทศไทย เรื่องปฐมบทจีโนมิกส์ประเทศไทย (https://www.tshg.or.th/) เพื่อเผยแพร่ข้อมูลความรู้ทางด้านจีโนมิกส์แก่ประชาชนทั่วไป และบุคลากรทางการแพทย์ บุคลากรด้าน การศึกษาที่สนใจ (วันที่จัดงานประชุมจะถูกกำหนดอีกครั้งเมื่อสถานการณ์การระบาดโควิด-19 ในประเทศไทยคลี่คลาย)



  ■ งานประชุม Genomics in Mendelian Medicine โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย เป็นเวทีให้นักวิจัยนักคิดนักปฏิบัติและผู้ที่เกี่ยวข้องได้แสดงความเห็นเพื่อนำไปสู่การปรับปรุงและเปลี่ยนแปลงการให้บริการทางการแพทย์และสาธารณสุขโดยใช้การแพทย์จีโนมิกส์

  ■ งานบรรยายที่มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์เ ป็นการเผยแพร่ความรู้และการสัมมนาให้นักเรียนนักศึกษา ได้ร่วมเสนอความเห็น อภิปราย ด้านจีโนมิกส์และทันตกรรม

  ■ Chinese Stomatological Association เป็นเวทีระดับนานาชาติ ที่ให้ทันตแพทย์ นักวิจัย นักเรียนและนักศึกษา ได้แลกเปลี่ยนความเห็นทางทันตแพทย์ งานวิจัยพื้นฐาน และงานวิจัยประยุกต์

☐ **มิติพาณิชย์** หมายถึง การมีเอกสารแสดงความสนใจ หรือความต้องการในการนำผลงานวิจัย สิ่งประดิษฐ์ และนวัตกรรมไปพัฒนา/ปรับปรุง กระบวนการผลิตและจำหน่ายในภาคการผลิตและภาคอุตสาหกรรม

- ภาคการผลิต/ภาคอุตสาหกรรม ที่นำงานวิจัยไปใช้ประโยชน์.....
- ช่วงเวลาที่นำงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ (วัน/เดือน/ปี).....
- ลักษณะการนำงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ (โปรดให้คำอธิบาย พร้อมแนบเอกสาร/ภาพประกอบ).....

.....

- การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นต่อภาคการผลิตและภาคอุตสาหกรรม (โปรดให้คำอธิบาย พร้อมแนบเอกสาร/ภาพประกอบ).....

.....

2.2 ทรัพย์สินทางปัญญาที่เกิดจากงานวิจัย (โปรดระบุเดือน/ปี ที่ยื่นขอและได้รับ)

.....

.....

2.3 ผู้ได้รับผลประโยชน์อย่างเป็นรูปธรรม (โปรดระบุหน่วยงาน บุคคล หรือพื้นที่ที่นำงานวิจัยไปใช้ประโยชน์)

.....

2.4 ปัญหาและอุปสรรคในการดำเนินงานวิจัย (งานวิจัยที่แล้วเสร็จ)

☑ **ไม่มีปัญหาและอุปสรรค**

☐ **มีปัญหาและอุปสรรค** (โปรดระบุสาเหตุ)

2.5 ผลกระทบจากการนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ (งานวิจัยที่แล้วเสร็จ)

☐ **ไม่มีผลกระทบ**

☑ **มีผลกระทบ** (โปรดระบุสาเหตุ)

- ผลกระทบทางด้านวิทยาศาสตร์: จัดงานประชุมและสัมมนา เพื่อแลกเปลี่ยนเรียนรู้ภายในวงวิชาการและวิจัยในด้านการแพทย์จีโนมิกส์ ผู้สูงอายุ และผู้ที่มีปัญหาทางช่องปากและฟัน
- ผลกระทบทางด้านสังคมและสาธารณสุข: โครงการนำไปสู่การวินิจฉัยตรงจุดและให้การดูแลรักษาผู้ป่วยที่มีปัญหาทางช่องปากและฟัน ด้วยศาสตร์ทางจีโนมิกส์ เพื่อป้องกันความพิการซ้ำซ้อน และบรรเทาความรุนแรงและชะลอความพิการที่เกิดขึ้นในผู้สูงอายุ
- ผลกระทบด้านวิชาการ: พัฒนานักเรียน นักศึกษาและบุคลากรทางการแพทย์ให้มีความเชี่ยวชาญด้านผู้สูงอายุและผู้ป่วยพิเศษ และพัฒนานักวิจัยที่มีความเชี่ยวชาญด้านจีโนมิกส์

ลงชื่อ ..... Thantrira P. .....

(รศ.ทพญ.ดร.ฑัณฑริรา พรทวีทัศน์)

ตำแหน่ง รองศาสตราจารย์

ผลงานตีพิมพ์ และเอกสารอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

1. Sriwattanapong K, Nitayavardhana I, Theerapanon T, Thaweesapphithak S, Chantarawaratit PO, Garuyakich R, Phokaew C, Porntaveetus T*, Shotelersuk V. 2021. Age-related dental phenotypes and tooth characteristics of FAM83H-associated hypocalcified amelogenesis imperfecta. Oral Dis. doi: 10.1111/odi.13780.
2. Nutchoey O, Intarak N, Theerapanon T, Thaweesapphithak S, Boonprakong L, Srijunbarl S, Porntaveetus T*, Shotelersuk V. 2021. Phenotypic features of dentinogenesis imperfecta associated with osteogenesis imperfecta and COL1A2 mutations. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 131:694-701
3. Intarak N, Budsamongkol T, Theerapanon T, Chanamuangkon T, Srijunbarl A, Boonprakong L, Porntaveetus T*, Shotelersuk V. 2020. Tooth ultrastructure of a novel COL1A2 mutation expanding its genotypic and phenotypic spectra. Oral Dis. 27:1257-1267.
4. Caengprasath N, Theerapanon T, Porntaveetus T*, Shotelersuk V. 2021. MBTPS2, a membrane bound protease, underlying several distinct skin and bone disorders. J Transl Med. 19:114.
5. Kanchanasevee C, Sriwattanapong K, Theerapanon T, Thaweesapphithak S, Chetruengchai W, Porntaveetus T*, Shotelersuk V. 2020. Phenotypic and genotypic features of Thai patients with nonsyndromic tooth agenesis and WNT10A variants. Front Physiol. 11: 573214.
6. Manaspon C, Boonsimma P, Phokaew C, Theerapanon T, Sriwattanapong K, Porntaveetus T*, Shotelersuk V. Expanding the genotypic spectrum of PYCR2 and a common ancestry in Thai patients with hypomyelinating leukodystrophy 10. Am J Med Genet A. 2021. In press.
7. Sriwattanapong K, Rojnueangnit K, Theerapanon T, Srichomthong C, Porntaveetus T*, Shotelersuk V. 2021. Compound heterozygosity for a novel frameshift variant causing fatal infantile liver failure and genotype-phenotype correlation of POLG c.3286C>T variant. Int J Neonatal Screen. 7: 9.
8. Rojnueangnit K, Maneechai P, Thaweekul P, Piriyanon P, Khositseth S, Ittiwut C, Chetruengchai W, Kamolvisit W, Theerapanon T, Suphapeetiporn K, Porntaveetus T*, Shotelersuk V. 2020. Expanding phenotypic and mutational spectra of mitochondrial HMG-CoA synthase deficiency. Eur J Med Genet. 63: 104086.

9. Manaspon C, Jongwannasiri C, Chumprasert S, Sa-Ard-Iam N, Mahanonda R, Pavasant P, Porntaveetus T, Osathanon T. Human dental pulp stem cell responses to different dental pulp capping materials. 2021. BMC Oral Health. 21:209.
10. Faruangsaeng T, Thaweesapphitak S, Boonchoo K, Porntaveetus T*. 2021. Gene expression in human dental pulp cells of mandibular second premolar teeth. Proceedings of RSU Research Conference. 330-341.
11. คู่มือการดูแลสุขภาพช่องปากสำหรับผู้ป่วยโรคพาร์กินสัน

Check for updates

Received: 7 August 2020 | Revised: 6 January 2021 | Accepted: 18 January 2021

DOI: 10.1111/odi.13780

ORIGINAL ARTICLE

ORAL DISEASES WILEY

Age-related dental phenotypes and tooth characteristics of *FAM83H*-associated hypocalcified amelogenesis imperfecta

Kanokwan Sriwattanapong[1] | Issree Nitayavardhana[2] | Thanakorn Theerapanon[1] | Sermporn Thaweesapphithak[3] | Pintu-On Chantarawaratit[4] | Rakkierti Garuyakich[2] | Chureerat Phokaew[5,6] | Thantrira Porntaveetus[1,2] | Vorasuk Shotelersuk[5,6]

[1]Genomics and Precision Dentistry Research Unit, Department of Physiology, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

[2]Geriatric Dentistry and Special Patients Care Clinic, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

[3]Center of Excellence in Regenerative Dentistry, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

[4]Department of Orthodontics, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

[5]Center of Excellence for Medical Genomics, Medical Genomics Cluster, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

[6]Excellence Center for Genomics and Precision Medicine, King Chulalongkorn Memorial Hospital, The Thai Red Cross Society, Bangkok, Thailand

Correspondence
Thantrira Porntaveetus, Genomics and Precision Dentistry Research Unit, Department of Physiology, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.
Email: thantrira.p@chula.ac.th

Funding information
Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Grant/Award Number: DRF64013; Thailand Research Fund, Grant/Award Number: RSA6280001 and DPG6180001; Global partnership, Grant/Award Number: CU-C16F630029; Thailand Science Research and Innovation, Grant/Award Number: CU_FRB640001_01_32_3 and CU_FRB640001_01_32_4; Chulalongkorn University; Health Systems Research Institute; National Research Council of Thailand

Abstract

Objectives: Autosomal-dominant hypocalcified amelogenesis imperfecta (ADHCAI) shows phenotypic heterogeneity. Our aim was to characterise the ADHCAI phenotypes, tooth properties and genotypes.

Methods: Three unrelated ADHCAI probands and seven additional affected members of the three families were recruited. Mutations were identified by exome and Sanger sequencing, and haplotypes by SNP array. Tooth colour, roughness, density, nanohardness, minerals and ultrastructure were investigated.

Results: Ten participants were heterozygous for the *FAM83H* mutation c.1387C>T (p.Gln463*). All shared a 3.43 Mbp region on chromosome 8q24.3 encompassing the *FAM83H* variant, indicating a common ancestry. The c.1387C>T was estimated to be 23.8 generations or 600 years. The *FAM83H* enamel had higher roughness and lower lightness, density, nanohardness, and calcium and phosphorus levels than controls. Blunted enamel rods, wide interrod spaces and disorganised dentinoenamel junctions were observed. Evaluating the patients with the same mutation and reviewing others with different mutations in *FAM83H* revealed that the *FAM83H* heterogeneous phenotypes are age-influenced. Tooth colour and surface texture change with ageing.

Conclusions: *FAM83H* enamel demonstrated decreased lightness, density, hardness, calcium, phosphorus and defective ultrastructure. We have identified that the phenotypic variation in *FAM83H*-associated ADHCAI is age-related. Awareness of the correlation between age and clinical features of *FAM83H*-ADHCAI can help dentists make an accurate diagnosis.

KEYWORDS

enamel, hypomineralisation, lightness, mineral density, nanohardness, roughness

 © 2021 Wiley Periodicals LLC

1 | INTRODUCTION

Amelogenesis imperfecta (AI) is a phenotypically and genotypically heterogeneous group of enamel anomalies affecting the primary and permanent dentitions. The most common classification proposed by Witkop (1988) categorised AI based on phenotype into four types including hypoplastic, hypomaturation, hypocalcification and hypomaturation-hypoplastic with taurodontism and then subdivided into 15 subtypes based on phenotype and mode of inheritance (Witkop, 1988). To date, mutations in 28 genes have been associated with AI according to the Human Phenotype Ontology (HPO) (Köhler et al., 2018) and Leiden Open Variation Database (LOVD) v.3.0 (Fokkema et al., 2011). The genes mutated in AI are involved in amelogenesis with diverse functions such as the enamel matric proteins (*AMELX*, *ENAM and AMBN*), the enamel matric proteases (*MMP20 and KLK4*), cell–cell and cell–matrix adhesion (*FAM83H*, *ITGB6*, *LAMA3 and LAMB3*) and ion transport (*WDR72 and SLC24A4*) (Nitayavardhana et al., 2020; Smith et al., 2017).

The *FAM83H* gene (OMIM#130900) functions as the linker between casein kinase 1α and keratin (Fulcher et al., 2018; Kuga et al., 2016). It is highly expressed in the presecretory and secretory ameloblasts and plays an important role during enamel calcification (Kim et al., 2008). Mutations in *FAM83H* are associated with autosomal-dominant hypocalcified AI (ADHCAI; OMIM 130,900), which is the most prevalent and severe AI type (Crawford et al., 2007; Witkop, 1988). To date, fifty mutations in *FAM83H* have been reported (LOVD v3.0 and ClinVar) (Fokkema et al., 2011; Landrum et al., 2018). These mutations are exclusively found in the last exon, exon 5, and are truncating mutations, except for two missense variants. Although the type and location of mutations are specific, the *FAM83H*-ADHCAI phenotypes are diverse (Kim et al., 2008; Mendoza et al., 2007; Nowwarote et al., 2018; Wright et al., 2011). Currently, the phenotype–genotype correlation of *FAM83H* mutations has not been established, and the understanding of tooth properties related to *FAM83H*-ADHCAI is minimal.

This study aimed to thoroughly characterise the phenotype, genotype and tooth characteristics (physical, mechanical and ultrastructural features) associated with ADHCAI. Three Thai patients from 3 different families were recruited. Whole-exome sequencing identified that all three patients possessed the same nonsense mutation, c. 1387C>T, p.Gln463*, in *FAM83H*. From the 31 reportedly affected members in these three families, 10 patients were recruited for phenotypic and genotypic characterisation. Haplotype and relatedness analyses were performed. This study identified the patients sharing the same *FAM83H* mutation and evaluated their phenotypes compared with the patients in previous reports. We have found that the heterogeneous phenotypes of ADHCAI are age-related. In addition, the physical, mechanical and ultrastructural features of *FAM83H*-ADHCAI are revealed.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Subjects

Three unrelated Thai patients affected with ADHCAI were recruited. Families 1, 2 and 3 were reported to have 9, 14 and 8 affected members, respectively. Of these 31 individuals, 10 were available for phenotypic and genotypic studies (Figure 1, Figure 2 and Figure S1). All participants or parents/guardians gave written informed consent for publication. Clinical and radiographic examinations were performed. The study was approved by the Research Ethics Committee (HREC-DCU 2017-078), Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University and performed according to the ethical standards of the 1964 Declaration of Helsinki and its amendments.

2.2 | Whole-exome sequencing (WES) and Sanger sequencing

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leucocytes. WES was performed using Illumina Hiseq4000 sequencer at Macrogen Inc. (Seoul, Korea) (Intarak et al., 2019; Porntaveetus et al., 2018). The variants were filtered following these criteria: (a) passed all quality filters during the variants calling process, (b) had a read depth > 10, (c) located in the coding regions and canonical splice sites of genes related to amelogenesis imperfecta (Smith et al., 2017), and (d) had < 1% minor allele frequency in the Genome Aggregation Database (gnomAD), Exome Variant Server, 1,000 Genomes Project Consortium, dbSNPs, and in-house database of 2,166 Thai exomes. Pathogenicity of the filtered variant was classified according to the ACMG standards and guidelines (Richards et al., 2015). The pathogenic variant was validated by Sanger sequencing using primers F: TTCTTCCAGGCGCGGCACCT and R: GAAGTCATCCGGGTCCGCGA.

2.3 | Single Nucleotide Polymorphism (SNP) array genotyping

SNP genotyping was achieved using the Infinium OmniZhongHua-8 BeadChip microarray containing 1,175,489 SNPs (Illumina, Seoul, South Korea). Ten participants including Family 1 (Patient 1, parents and grandmother), Family 2 (Patient 2, parents and aunt) and Family 3 (Patient 3 and daughter) were included for haplotype analysis. The SNPs genotype data from position 140,812,347 (rs12679196) to 146,301,427 (kgp22790488) in chromosome 8 that encompasses the *FAM83H* gene were extracted from whole SNP array data. The SNPs that were missing in any individuals were excluded. The genotype data from each family were then phased to define the ancestral haplotypes that linked with

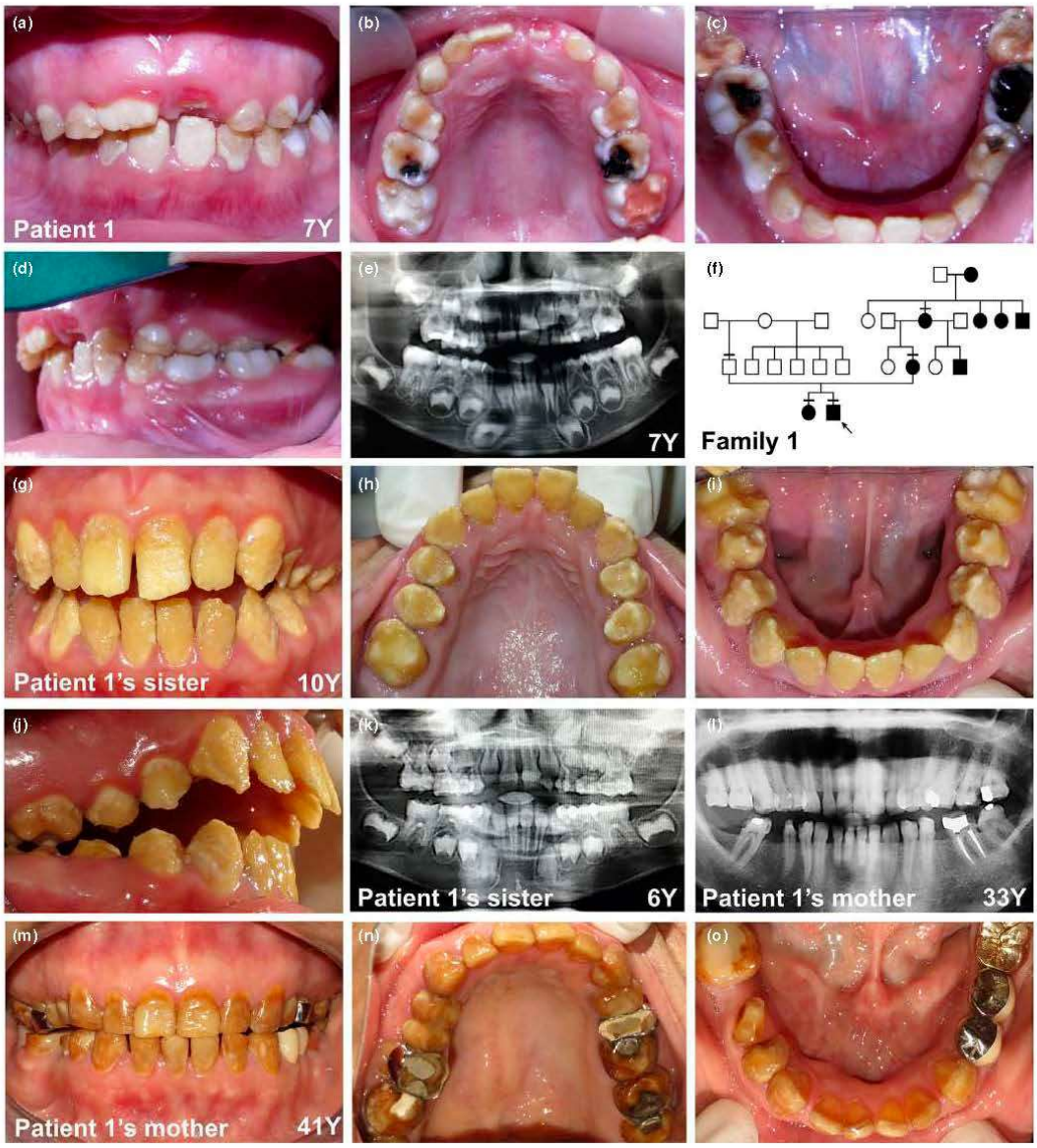


FIGURE 1 Phenotypes and pedigree of Family 1. (a–d) Clinical images of Patient 1 at age 7 years show porous and yellowish teeth. Normal-looking enamel was present on the buccal and lingual surfaces and cusp tips of primary molars and first molars. (e) Panoramic radiograph demonstrated enamel loss on the erupted teeth, normal thickness of enamel on the unerupted teeth, and reduced radiodensity contrast between enamel and dentine. (f) Pedigree of Family1. Males are marked by squares and females by circles. Filled symbols indicate reportedly affected individuals. An arrow indicates the proband. A horizontal line above symbol indicates an individual having Sanger sequencing. (g–j) Clinical image of Patient 1's sister at 10 years of age exhibited cheesy-soft teeth and anterior open bite. (k) Panoramic radiograph of Patient 1's sister at 6 years of age showed that the erupted teeth had reduced enamel thickness and radiopacity. (l–o) Patient 1's mother had brown and glossy teeth with scattered small white patches. The lower left second molar was endodontically treated. The lower first molars were previously extracted. The panoramic radiograph showed thin enamel with reduced radiodensity. Y, years of age

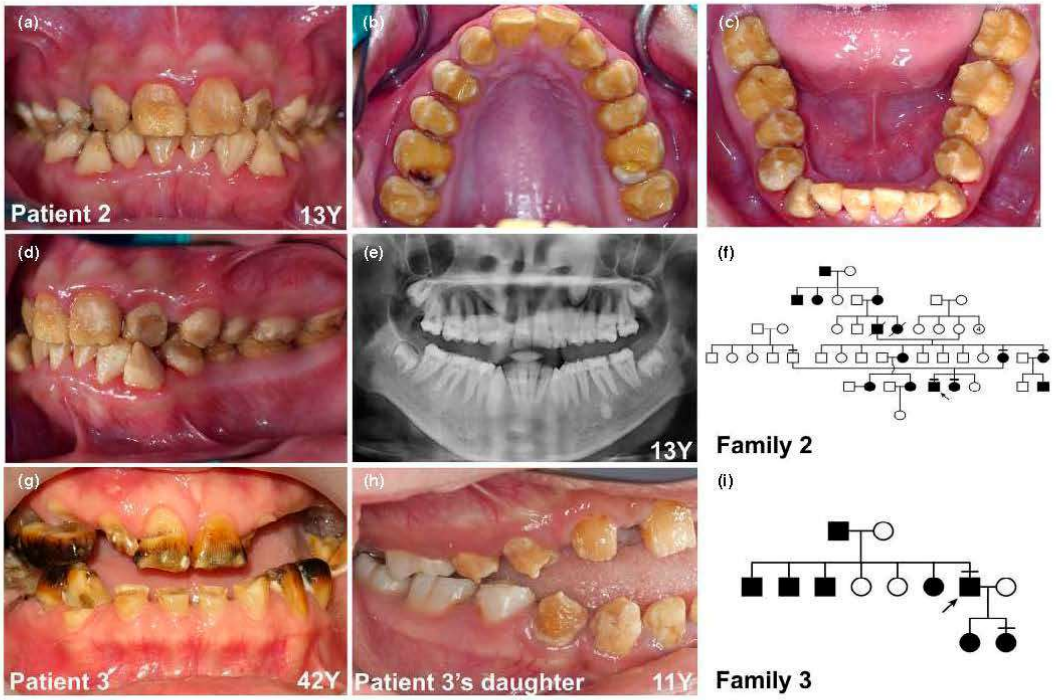


FIGURE 2 Phenotypes and pedigree of Families 2 and 3. (a–e) Clinical and radiographic images of Patient 2 at 13 years of age showed yellowish, discoloured, rough and soft teeth. Panoramic radiograph presented reduced contrast between the enamel and dentine and embedded maxillary canines. The erupted teeth had minimal enamel thickness. (f) Pedigree of Family 2. Males are marked by squares and females by circles. Filled symbols indicate reportedly affected individuals. An arrow indicates the proband. A horizontal line above symbol indicates an individual having Sanger sequencing. (g) Patient 3 at age 42 years had smooth, shiny, brownish-black teeth (h) Patient 3's daughter presented rough and yellow teeth. Normal-looking enamel was present on the buccal and lingual surfaces of the posterior teeth. (i) Pedigree of Family 3. Males are marked by squares and females by circles. Filled symbols indicate reportedly affected individuals. An arrow indicates the proband. A horizontal line above symbol indicates an individual having Sanger sequencing

the mutation. The coordinates of the shared ancestral segments from each family were input into the Genetic Mutation Age Estimator program (https://shiny.wehi.edu.au/rafehi.h/mutation-dating) to estimate the mutation's age (Gandolfo et al., 2014; Yeetong et al., 2019).

2.4 | Tooth samples analyses

A primary upper left lateral incisor (AI1), permanent lower right first premolar (AI2) and permanent upper right lateral incisor (AI3) were collected from Patients 1, 2 and 3, respectively. Each AI sample was evaluated in comparison with three tooth type-matched controls collected from age-matched healthy individuals. For AI3, only the root portion was available for evaluation.

Tooth colour was measured on the buccal and lingual surfaces (3 times/surface) using a digital spectrophotometer (VITA Easyshade® V, Bad Sackingen, Germany) based on the CIE L*a*b* colour scale of the International Commission on Illumination.

Mineral density was evaluated by a micro-computerised tomographic machine (μCT35, Scanco Medical, Brüttisellen, Switzerland). Thirty layers of enamel and dentine were selected. The images were processed using Image Processing Language (Scanco Medical AG, Wangen-Brüttisellen, Switzerland).

The tooth surface roughness was measured as surface topography parameter by the Talyscan 150 and the TalyMap Universal program (Taylor Hobson Ltd, Leicester, United Kingdom). Thirty spots every 600 μm were selected.

Nanohardness were measured on longitudinal sections of the samples (30 locations) using a nano-base indentation system (Ultra Micro-Indentation System, UMIS II, CSIRO, Canberra, Australia).

The sections were dried using a critical point dryer (Emitech K850, Emitech Ltd, Kent, England) and covered with gold powder (JFC 1200, Tokyo, Japan). The elemental levels (%) of carbon (C), oxygen (O), phosphorus (P) and calcium (Ca) were measured at 3 locations using EDX (ISIS 300 EDX-system; Oxford Instruments, UK). Tooth ultrastructure was examined by an SEM (Quanta Feg 250, FEI Company, Oregon, USA).

Comparisons between the ADHCAI and control teeth were determined using the independent *t* test ($p < .05$) (GraphPad Prism5 Software Inc., San Diego, CA, USA).

3 | RESULTS

3.1 | Clinical manifestations of ADHCAI

Patient 1, a 7-year-old boy, presented with tooth sensitivity. His oral examination revealed that the patient had porous and yellowish teeth with an extensive loss of enamel and exposed dentine. The remaining white and chalky enamel was observed on the buccal and lingual surfaces and cusp tips of the deciduous molars and permanent first molars. The erupting permanent incisors' enamel was mildly yellowish and porous. The panoramic radiograph showed reduced radiodensity contrast between the enamel and dentine, thin enamel on the erupted teeth, and normal enamel thickness on the unerupted teeth (Figure 1a–e). A primary upper left lateral incisor was extracted due to prolonged retention (AI1 sample). Anterior open bite was not present. The patient's sister (10 years old) exhibited cheesy-soft teeth. The enamel was partially lost, exposing yellowish dentine. Normal-looking enamel was present along the gingival margins and cusp tips of the teeth. Anterior open bite was present (Figure 1g–k). Patient 1's mother, aged 41 years, exhibited yellow to brownish discoloured teeth. Severe enamel loss was present, leaving shiny brown dentine with scattered small white patches. Both lower first molars were extracted due to irreversible pulpitis, and the lower left second molar was endodontically treated. The panoramic radiograph showed thin enamel with reduced radiodensity (Figure 1l–o). The family pedigree of Patient 1 showed 9 affected family members (Figure 1f).

Patient 2, a 13-year-old boy, complained of yellow and sensitive teeth. His oral examination revealed generalised tooth discolouration with irregular texture, anterior tooth crowding and crossbite. Normal-looking enamel was present along the cervical areas and cusp tips of the teeth (Figure 2a–d). The radiograph exhibited embedded upper canines. The unerupted third molars had a normal enamel thickness, while the erupted teeth had thin enamel with reduced radiopacity (Figure 2e). The lower right first premolar (AI2 sample) was extracted according to the orthodontic treatment plan. The family pedigree of Patient 2 revealed an AI phenotype in five generations (Figure 2f).

Patient 3, a 42-year-old male, presented with smooth, shiny, brownish-black teeth with severe wear, dental caries and multiple retained roots. The clinical and radiographic features of this family were previously reported (Kantaputra et al., 2016). The upper left lateral incisor (AI3 sample) was extracted. Patient 3's daughter had soft, porous and yellowish teeth. Normal-appearing enamel was observed on the buccal and lingual surfaces of the posterior teeth. Anterior open bite was present (Figure 2h).

We found that all affected patients had generalised plaque accumulation, gingival inflammation and multiple dental cavities. The medical history of the three families revealed no significant systemic diseases or medications affecting the teeth.

3.2 | Mutation analyses

WES identified that Patients 1, 2 and 3 harboured the same heterozygous nonsense mutation, c.1387C>T, p.Gln463*, in the exon 5 of *FAM83H* (NM_198488.5). The variant was classified as pathogenic based on the ACMG standards and guidelines (PVS1, PM2, PP1 and PP3) (Richards et al., 2015). Sanger sequencing confirmed the presence of the mutation in the patients and all available affected family members (Figure S1). The inheritance pattern, genetic mutation and phenotypic features found in these three families indicated ADHCAI.

3.3 | SNP array genotyping

Because the three families with the same ethnicity possessed the same *FAM83H* mutation, it was speculated that they might have a common ancestry. We first performed haplotype analysis in the family with the largest number of affected members, Family 2 (Patient 2, parents and aunt), and detected a 3.41 Mbp segment between coordinates 142,883,316 and 146,293,414 on chromosome 8q24.3 segregating in the affected members. Next, we analysed the affected members in Family 3 (Patient 3 and his daughter) and Family 1 (Patient 1, parents, and grandmother) and detected a common 3.43 Mbp segment between coordinates 142,862,278 and 146,293,414. This region covered the shared 3.41 Mbp segment identified in Family 2 and the c.1387C>T variant in *FAM83H*.

The coordinates were input into the Genetic Mutation Age Estimator program (https://shiny.wehi.edu.au/rafehi.h/mutation-dating) (Gandolfo et al., 2014; Yeetong et al., 2019). It was estimated that the age of c.1387C>T variant was 23.8 generations or 600 years (assuming one generation = 25 years) with a 95% confidence interval (CI) between 7.4 (175 years) and 84.3 (2,100 years) generations. These estimations suggest that the c.1387C>T mutation is identical by descent and these three families have a common ancestry.

3.4 | Characteristics of the deciduous and permanent teeth affected with *FAM83H*-ADHCAI

The exfoliated deciduous upper left lateral incisor (AI1) was collected from Patient 1. The permanent lower right first premolar (AI2) in Patient 2 was extracted according to orthodontic treatment plan. The retained root of the permanent upper right lateral incisor (AI3) in Patient 3 was extracted due to non-restorable condition. All patients donated the tooth samples for this study. We examined the physical, mechanical and ultrastructural features of the AI teeth compared with controls.

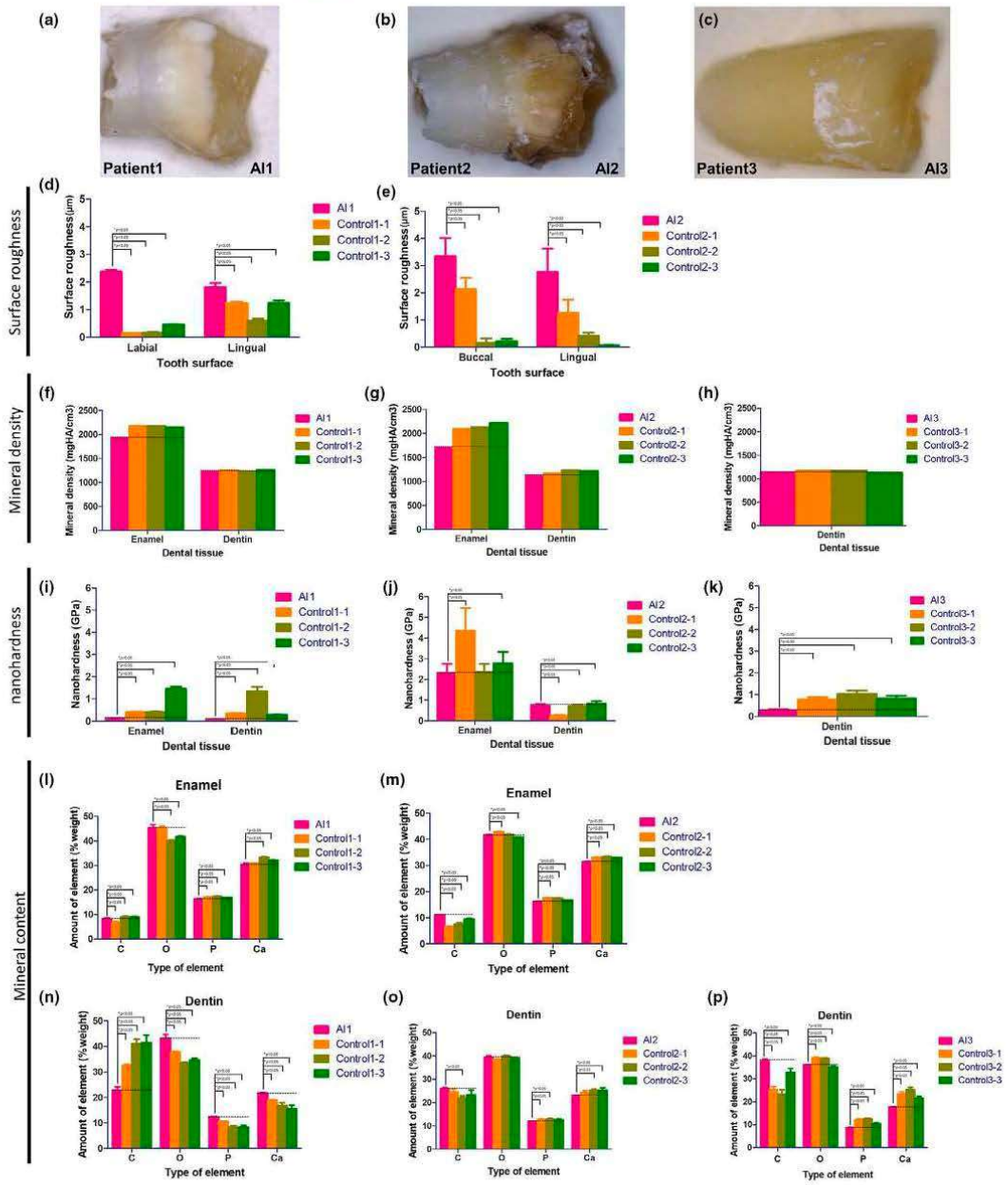


FIGURE 3 Tooth characteristics and phenotypic properties. (a) Microscopic images of the primary upper left lateral incisor (AI1) obtained from Patient1 had yellow and opaque white enamel and exposed dentine. (b) The permanent lower right first premolar (AI2) obtained from Patient 2 was dark yellow in colour and had an irregular surface. (c) The permanent upper right lateral incisor (AI3) obtained from Patient 3 had a smooth and yellow root. (d, e) The surface roughness values of AI1 and AI2 were significantly higher than those of controls ($p < .05$). (f-h) The mineral density differences in enamel and dentine between patients and controls were not statistically significant. (i-k) Nanohardness values of AI1 and AI2 enamel were significantly decreased compared to control values. In dentine, AI1 and AI3 showed lower nanohardness values than controls ($p < .05$). (l-m) AI1 and AI2 enamel demonstrated siginificantly lower Ca and P levels than controls. (n-p) AI2 and AI3 dentine revealed significantly lower Ca and P levels than controls whereas AI1 had significantly higher Ca and P than controls. C, carbon; O, oxygen; P, phosphorus; Ca, calcium

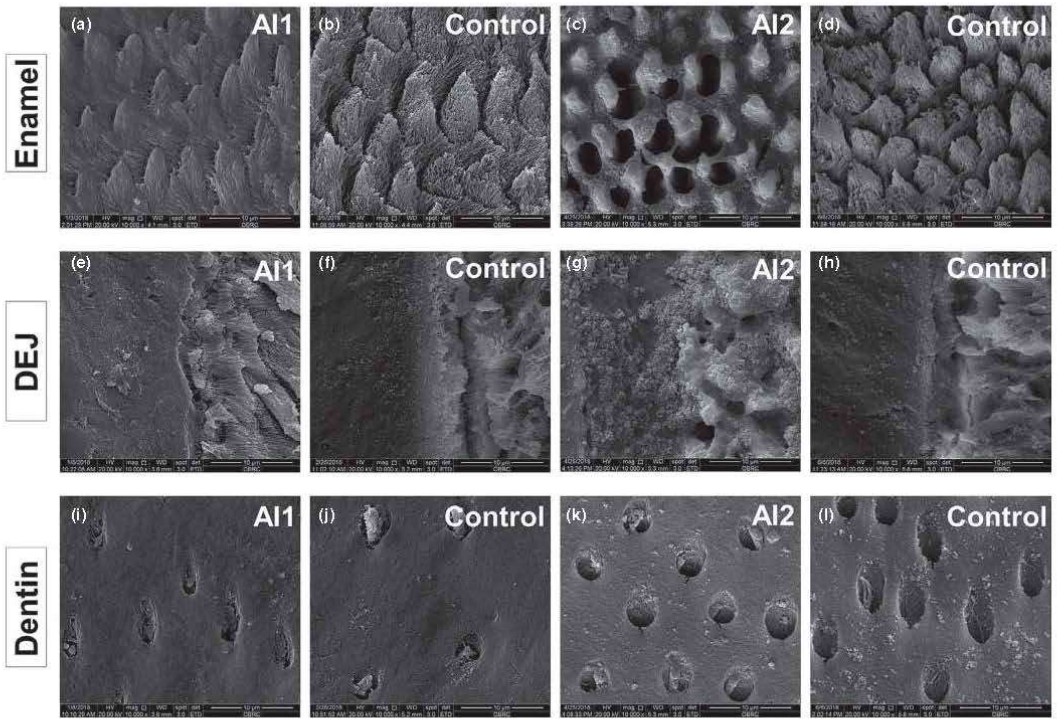


FIGURE 4 Tooth ultrastructure. (a–d) Scanning electron microscopic images of the AI1 and AI2 enamel had rounded and short enamel rods with wider interrod areas compared with control. Porosities were seen in the AI2 enamel. (e–h) Disorganised dentinoenamel junctions (DEJ) were present in AI1 and AI2. (i–l) The dentine ultrastructure and dentinal tubules of AI1 and AI2 were comparable to controls. SEM images at 10,000× magnification

3.5 | Gross characteristics

AI1 had yellowish and rough enamel with white patches (Figure 3a). AI2 had yellow-brown and rough enamel with demineralised spots and AI3 had yellow and smooth root surface (Figure 3a–c). Based on the CIE LAB, the crown portions of AI1 and AI2 were darker, redder and yellower compared with controls. Similarly, the root portions of AI1, AI2 and AI3 were darker and redder compared with controls. The colour differences between the AI teeth and controls were perceivable by the human eye ($\Delta E > 2$) (Tables S1 and S2). The surface roughness values of the AI1 and AI2 crowns were significantly greater than those of controls (Figure 3d–e).

3.6 | Ultrastructural characteristics

Micro-CT revealed that the differences in the enamel and dentine mineral density between patients and controls were not statistically significant (Figure 3f–h, Tables S3 and S4). Mechanical property evaluation indicated that the nanohardness values of the AI1 and AI2 enamel and of the AI1 and AI3 dentine were significantly lower than those of controls (Figure 3i–k). EDX demonstrated that the AI1 and AI2 enamel had significantly reduced phosphorus and calcium content compared with controls. In dentine, the AI2 and AI3 calcium and phosphorus levels were significantly lower, while those of AI1 were significantly higher, than those of controls (Figure 3l–p, Table S5).

SEM revealed that AI1 and AI2 had shorter and rounder enamel rods and wider interprismatic areas than controls. AI2 demonstrated severely disturbed enamel containing several holes. AI1 and AI2 showed disorganised dentinoenamel junctions (DEJ), while the controls had a continuous interface between the enamel and dentine. The dentine and dentinal tubules of the AI samples were comparable to controls (Figure 4).

3.7 | Phenotypic analysis of *FAM83H*-ADHCAI

Although our patients had the same *FAM83H* mutation, a wide range of clinical features were observed. We thoroughly characterised the phenotypes of our patients and those having different *FAM83H* mutations in previous reports (Chan et al., 2011;

Ding et al., 2009; El-Sayed et al., 2010; Gjørup et al., 2009; Hart et al., 2009; Haubek et al., 2011; Hyun et al., 2009; Kantaputra et al., 2016; Kim et al., 2008; Lee et al., 2008, 2011; Nowwarote et al., 2019; Nowwarote et al., 2018; Pourhashemi et al., 2014; Song et al., 2012; Urzua et al., 2015; Wang et al., 2020; Wright et al., 2009, 2011; Xin et al., 2017; Yu et al., 2018; Zhang et al., 2015; Zheng et al., 2020) (Table S6). We observed that the phenotypic differences in *FAM83H*-ADHCAI were age-related. Newly erupted permanent teeth are porous, soft, opaque white and slightly yellow. In the mixed dentition, the enamel gradually chips off. The teeth are still porous; however, the tooth colour becomes darker, likely due to accumulated food staining. Normal-looking enamel is seen at the cervical margins of the tooth crown and cusp tips. In adulthood, the teeth turn dark brown to black in colour and the tooth surfaces become smooth and shiny rather than soft and porous. It is expected that the exposed dentine is abraded and discoloration gradually increases over time (Figure 5).

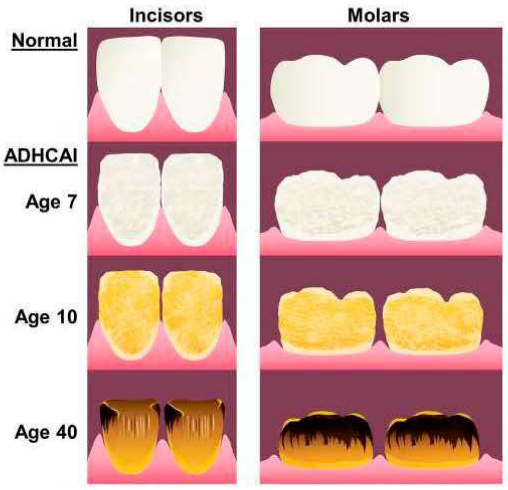


FIGURE 5 Clinical phenotypes of ADHCAI caused by *FAM83H* mutation

4 | DISCUSSION

The present study identified the ADHCAI patients caused by the nonsense mutation, c.1387C>T, p.Gln463*, in the exon 5 of *FAM83H*. The *FAM83H* gene consists of 5 exons. Exon 5 is the largest and contains all phosphorylation sites of the FAM83H protein. The C-terminus of the FAM83H protein contains evolutionarily conserved regions critical for amelogenesis (Huang et al., 2017). Among the genes causing AI, mutations in *FAM83H* are the most commonly found and produce the most severe enamel defects. The p.Gln463* mutation identified here is expected to generate a prematurely truncated FAM83H protein (NP_940890.4) lacking 717 amino acids. Consistent with previous studies, the ADHCAI-causing *FAM83H* mutations occur exclusively in the last exon and most mutations are truncating (LOVD v3.0 and ClinVar) (Fokkema et al., 2011; Landrum et al., 2018). *FAM83H* truncated mutations alter its subcellular localisation and act by a neomorphic mechanism to cause ADHCAI (Lee et al., 2011; Wang et al., 2019).

Although up to 50 pathogenic mutations in *FAM83H* have been reported, the c.1387C>T (p.Gln463*) mutation has been detected in only three families in Thailand. Haplotype analysis revealed that these 3 families shared a common 3.43 Mbp segment covering the *FAM83H* locus. These findings suggest that they have a common ancestor and the c.1387C>T mutation is identical by descent. It was estimated that the age of the c.1387C>T mutation was 23.8 generations or 600 years (assuming one generation = 25 years), with a 95% confidence interval (CI) between 7.4 (175 years) and 84.3 (2,100 years) generations. Similarly, a previous study found that the c.1366C>T mutation in *FAM83H* found in 5 Turkish families was identical by descent. This mutation was inherited from a common ancestor with a shared 1.8 Mb haplotype spanning the *FAM83H* locus (Hart et al., 2009). We show here that detection of identity by descent can be useful to estimate familial relatedness and fine-scale population structure (Browning & Browning, 2012).

Clinically, the *FAM83H*-ADHCAI teeth are generally rough and yellowish. In patients with *FAM83H* mutations, the quantity of enamel matrix proteins is normal; however, enamel calcification is disturbed (Hyun et al., 2009). Radiologically, the hypomineralised enamel appears to be of normal thickness, but has reduced contrast with dentine. After eruption, the enamel rapidly deteriorates, resulting in exposed dentine, loose proximal contacts and malocclusion. The tooth cervical regions and cusp tips are less affected by the mutation. Tooth sensitivity and infection are common problems of these patients. Other dental abnormalities reported in *FAM83H* patients include anterior open bite, embedded teeth, crowding and crossbite. In this study, anterior open bite was observed in 2 participants (Patient 1's sister and Patient 3's daughter). Moreover, an impacted canine and crossbite were found in Patient 2, similar to the patient reported by Xin et al., 2017 (Xin et al., 2017).

Phenotypic characterisation of the patients with the same mutation, c.1387C>T, p.Gln463*, in *FAM83H* reveals that the phenotypic differences in *FAM83H*-ADHCAI are age-related. Newly erupted teeth are porous, soft and slightly yellow. In young adults, the teeth are still porous, but darker in colour. The enamel is eroded leaving normal-looking enamel along the cervical margin of the tooth crown and cusp tips (Hart et al., 2009; Haubek et al., 2011; Nowwarote et al., 2019; Nowwarote et al., 2018; Song et al., 2012; Xin et al., 2017; Yu et al., 2018; Zhang et al., 2015). In adulthood, the teeth turn dark brown or black and the tooth surfaces become smooth and shiny rather than soft and porous. Most of the severely hypocalcified enamel in *FAM83H* teeth is usually worn down soon after the teeth erupt. However, the cusp tips on the premolars and molars and the areas along the gingival margin of the enamel are maintained for years and resist post-eruptive enamel loss (Haubek et al., 2011; Lee et al., 2008). It is

suggested that the enamel on different tooth locations is differentially affected by the *FAM83H* mutation (Kantaputra et al., 2016). Following enamel loss, the exposed dark dentin could gradually trap external stain, leading to brown and black discoloured teeth in affected adults. The reasons of these changes can probably be due to the poor mineralisation degree of the enamel and other factors such as poor access to dental care, extrinsic pigmentation, medication, trauma and poor oral hygiene.

The *FAM83H* mutation reduces the enamel's physical and mechanical properties. The deciduous and permanent teeth with the *FAM83H* mutation had significantly increased surface roughness. Moreover, mineral density, nanohardness, and major inorganic substance levels, calcium and phosphorus, in *FAM83H* enamel were significantly less compared with controls. Ultrastructural analyses revealed that the *FAM83H* teeth had poorly formed enamel prisms and widened interrod spaces, consistent with previous reports (El-Sayed et al., 2010; Yu et al., 2018; Zhang et al., 2015). Unlike other studies, several holes were evident in the A12 enamel. These findings indicate that the enamel is dramatically disturbed during amelogenesis due to the *FAM83H* mutation (Kim et al., 2008; Wright et al., 2009). The relationship between low enamel hardness and increased tooth susceptibility to caries and fracture have been shown (Gutiérrez-Salazar & Reyes-Gasga, 2001). Enamel roughness also contributes to plaque and stain accumulation and dental caries initiation. These results suggest that the accumulated enamel defects in *FAM83H* teeth make them prone to rapid deterioration and dental diseases.

Sequential and reciprocal interactions between epithelial and mesenchymal tissues are essential mechanisms regulating the formation of enamel and dentine during tooth development (Thesleff, 2003). An integration between the enamel and dentin mineral is established via the regulation of mineral formation and organisation of the dentine and enamel matrices at the DEJ (Fang et al., 2011). We observed that the DEJ in *FAM83H* teeth was disorganised containing amorphous material. In dentine, the AI2 and AI3 calcium and phosphorus levels were significantly lower, while those of AI1 were significantly higher compared with controls. A previous study showed that the *FAM83H* tooth dentine exhibited irregular dentinal tubules with partly obliterated lumens and had less tubules, compared with those in normal controls (Zhang et al., 2015). Interglobular dentin representing incompletely calcified dentine matrix was also observed in some affected teeth (Wright et al., 2009). It was proposed that the *FAM83H* mutations not only disturbed enamel mineralisation, but also affected dentine formation (Zhang et al., 2015). Based on these findings, the *FAM83H* tooth dentine could be different from that of normal teeth.

To conclude, here, we identify the nonsense mutation, c.1387C>T (p.Gln463*), in *FAM83H* causing ADHCAI in the patients sharing a common ancestor. *FAM83H*-ADHCAI exhibits deteriorated tooth ultrastructural, physical and mechanical characteristics. We also demonstrate that the heterogeneous clinical features of *FAM83H*-ADHCAI are age-related. These findings broaden the understanding of the phenotypic spectrum of *FAM83H*-ADHCAI leading to prompt prognosis and dental management for ADHCAI patients.

ACKNOWLEDGEMENTS

This project is funded by the National Research Council of Thailand, TSRI Fund (CU_FRB640001_01_32_3, CU_FRB640001_01_32_4), Global partnership CU-C16F630029, Health Systems Research Institute, Thailand Research Fund (MRG6280001, DPG6180001), and Faculty Research Grant (DRF64013), Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University. KS is supported by the Ratchadapisek Somphot Fund for Postdoctoral Fellowship, Chulalongkorn University. ST is supported by the 100th Anniversary Chulalongkorn University Fund for Doctoral Scholarship and the 90th Anniversary of Chulalongkorn University Fund (Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund). We thank Dr. Kevin A. Tompkins for language revision of the manuscript.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no competing interests.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Kanokwan Sriwattanapong: Data curation; investigation; writing–original draft; writing–review and editing. **Issree Nitayavardhana:** Investigation; writing–review and editing. **Thanakorn Theerapanon:** Investigation; writing–review and editing. **Sermporn Thaweesapphithak:** Investigation; writing–review and editing. **Pintu-On Chantarawaratit:** Investigation; writing–review and editing. **Rakkierti Garuyakich:** Investigation; writing–review and editing. **Chureerat Phokaew:** Data curation; writing–review and editing. **Thantrira Porntaveetus:** Conceptualization; formal analysis; writing–original draft; writing–review and editing. **Vorasuk Shotelersuk:** Formal analysis; resources; writing–review and editing.

PEER REVIEW

The peer review history for this article is available at https://publons.com/publon/10.1111/odi.13780.

ORCID

Thanakorn Theerapanon https://orcid.org/0000-0001-6727-862X
Thantrira Porntaveetus https://orcid.org/0000-0003-0145-9801

REFERENCES

Browning, S. R., & Browning, B. L. (2012). Identity by descent between distant relatives: Detection and applications. *Annual Review of Genetics*, *46*(1), 617–633. https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110711-155534

Chan, H. C., Estrella, N. M., Milkovich, R. N., Kim, J. W., Simmer, J. P., & Hu, J. C. (2011). Target gene analyses of 39 amelogenesis imperfecta kindreds. *European Journal of Oral Sciences*, *119*(Suppl 1), 311–323. https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2011.00857.x

Crawford, P. J., Aldred, M., & Bloch-Zupan, A. (2007). Amelogenesis imperfecta. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 2, 17. https://doi.org/10.1186/1750-1172-2-17

Ding, Y., Estrella, M., Hu, Y. Y., Chan, H. L., Zhang, H. D., Kim, J.-W., Simmer, J. P., & Hu, J.-C. (2009). Fam83h is associated with intracellular vesicles and ADHCAI. *Journal of Dental Research*, *88*(11), 991–996. https://doi.org/10.1177/0022034509349454

El-Sayed, W., Shore, R. C., Parry, D. A., Inglehearn, C. F., & Mighell, A. J. (2010). Ultrastructural analyses of deciduous teeth affected by hypocalcified amelogenesis imperfecta from a family with a novel Y458X FAM83H nonsense mutation. *Cells Tissues Organs*, *191*(3), 235–239. https://doi.org/10.1159/000252801

Fang, P.-A., Lam, R. S. K., & Beniash, E. (2011). Relationships between dentin and enamel mineral at the dentino-enamel boundary: Electron tomography and high-resolution transmission electron microscopy study. *European Journal of Oral Sciences*, *119*(Suppl 1), 120–124. https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2011.00876.x

Fokkema, I. F. A. C., Taschner, P. E. M., Schaafsma, G. C. P., Celli, J., Laros, J. F. J., & den Dunnen, J. T. (2011). LOVD vol 2.0: The next generation in gene variant databases. *Human Mutation*, *32*(5), 557–563. https://doi.org/10.1002/humu.21438

Fulcher, L. J., Bozatzi, P., Tachie-Menson, T., Wu, K. Z. L., Cummins, T. D., Bufton, J. C., Pinkas, D. M., Dunbar, K., Shrestha, S., Wood, N. T., Weidlich, S., Macartney, T. J., Varghese, J., Gourlay, R., Campbell, D. G., Dingwell, K. S., Smith, J. C., Bullock, A. N., & Sapkota, G. P. (2018). The DUF1669 domain of FAM83 family proteins anchor casein kinase 1 isoforms. *Science Signaling*, *11*(531), eaao2341. https://doi.org/10.1126/scisignal.aao2341

Gandolfo, L. C., Bahlo, M., & Speed, T. P. (2014). Dating rare mutations from small samples with dense marker data. *Genetics*, *197*(4), 1315–1327. https://doi.org/10.1534/genetics.114.164616

Gjørup, H., Haubek, D., Hintze, H., Haukali, G., Løvschall, H., Hertz, J. M., & Poulsen, S. (2009). Hypocalcified type of amelogenesis imperfecta in a large family: Clinical, radiographic, and histological findings, associated dento-facial anomalies, and resulting treatment load. *Acta Odontologica Scandinavica*, *67*(4), 240–247. https://doi.org/10.1080/00016350902973685

Gutiérrez-Salazar, M., & Reyes-Gasga, J. (2001). Enamel hardness and caries susceptibility in human teeth. *Revista Latinoamericana De Metalurgia Y Materiales*, *21*, 36–40.

Hart, P. S., Becerik, S., Cogulu, D., Emingil, G., Ozdemir-Ozenen, D., Han, S. T., & Hart, T. C. (2009). Novel FAM83H mutations in Turkish families with autosomal dominant hypocalcified amelogenesis imperfecta. *Clinical Genetics*, *75*(4), 401–404. https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2008.01112.x

Haubek, D., Gjørup, H., Jensen, L. G., Juncker, I., Nyegaard, M., Børglum, A. D., Poulsen, S., & Hertz, J. M. (2011). Limited phenotypic variation of hypocalcified amelogenesis imperfecta in a Danish five-generation family with a novel FAM83H nonsense mutation. *International Journal of Paediatric Dentistry*, *21*(6), 407–412. https://doi.org/10.1111/j.1365-263X.2011.01142.x

Huang, W., Yang, M., Wang, C., & Song, Y. (2017). Evolutionary analysis of FAM83H in vertebrates. *PLoS One*, *12*(7), e0180360. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180360

Hyun, H. K., Lee, S. K., Lee, K. E., Kang, H. Y., Kim, E. J., Choung, P. H., & Kim, J. W. (2009). Identification of a novel FAM83H mutation and microhardness of an affected molar in autosomal dominant hypocalcified amelogenesis imperfecta. *International Endodontic Journal*, *42*(11), 1039–1043. https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2009.01617.x

Intarak, N., Theerapanon, T., Thaweesapphithak, S., Suphapeetiporn, K., Porntaveetus, T., & Shotelersuk, V. (2019). Genotype-phenotype correlation and expansion of orodental anomalies in LTBP3-related disorders. *Molecular Genetics and Genomics*, *294*(3), 773–787. https://doi.org/10.1007/s00438-019-01547-x

Kantaputra, P. N., Intachai, W., & Auychai, P. (2016). All enamel is not created equal: Supports from a novel FAM83H mutation. *American Jounral of Medical Genetics Part A*, *170a*(1), 273–276. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37406

Kim, J.-W., Lee, S.-K., Lee, Z. H., Park, J.-C., Lee, K.-E., Lee, M.-H., Park, J.-T., Seo, B.-M., Hu, J.-C., & Simmer, J. P. (2008). FAM83H mutations in families with autosomal-dominant hypocalcified amelogenesis imperfecta. *American Jounal of Human Genetics*, *82*(2), 489–494. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2007.09.020

Köhler, S., Carmody, L., Vasilevsky, N., Jacobsen, J. O. B., Danis, D., Gourdine, J.-P., Gargano, M., Harris, N. L., Matentzoglu, N., McMurry, J. A., Osumi-Sutherland, D., Cipriani, V., Balhoff, J. P., Conlin, T., Blau, H., Baynam, G., Palmer, R., Gratian, D., Dawkins, H., … Robinson, P. N. (2018). Expansion of the Human Phenotype Ontology (HPO) knowledge base and resources. *Nucleic Acids Research*, *47*(D1), D1018–D1027. https://doi.org/10.1093/nar/gky1105

Kuga, T., Kume, H., Adachi, J., Kawasaki, N., Shimizu, M., Hoshino, I., Matsubara, H., Saito, Y., Nakayama, Y., & Tomonaga, T. (2016). Casein kinase 1 is recruited to nuclear speckles by FAM83H and SON. *Scientific Reports*, *6*, 34472. https://doi.org/10.1038/srep34472

Landrum, M. J., Lee, J. M., Benson, M., Brown, G. R., Chao, C., Chitipiralla, S., Gu, B., Hart, J., Hoffman, D., Jang, W., Karapetyan, K., Katz, K., Liu, C., Maddipatla, Z., Malheiro, A., McDaniel, K., Ovetsky, M., Riley, G., Zhou, G., … Maglott, D. R. (2018). ClinVar: Improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Research*, *46*(D1), D1062–d1067. https://doi.org/10.1093/nar/gkx1153

Lee, S. K., Hu, J. C., Bartlett, J. D., Lee, K. E., Lin, B. P., Simmer, J. P., & Kim, J. W. (2008). Mutational spectrum of FAM83H: The C-terminal portion is required for tooth enamel calcification. *Human Mutation*, *29*(8), E95–99. https://doi.org/10.1002/humu.20789

Lee, S. K., Lee, K. E., Jeong, T. S., Hwang, Y. H., Kim, S., Hu, J. C., & Kim, J. W. (2011). FAM83H mutations cause ADHCAI and alter intracellular protein localization. *Journal of Dental Research*, *90*(3), 377–381. https://doi.org/10.1177/0022034510389177

Mendoza, G., Pemberton, T. J., Lee, K., Scarel-Caminaga, R., Mehrian-Shai, R., Gonzalez-Quevedo, C., Ninis, V., Hartiala, J., Allayee, H., Snead, M. L., Leal, S. M., Line, S. R. P., & Patel, P. I. (2007). A new locus for autosomal dominant amelogenesis imperfecta on chromosome 8q24.3. *Human Genetics*, *120*(5), 653–662. https://doi.org/10.1007/s00439-006-0246-6

Nitayavardhana, I., Theerapanon, T., Srichomthong, C., Piwluang, S., Wichadakul, D., Porntaveetus, T., & Shotelersuk, V. (2020). Four novel mutations of FAM20A in amelogenesis imperfecta type IG and review of literature for its genotype and phenotype spectra. *Molecular Genetics and Genomics*, *295*(4), 923–931. https://doi.org/10.1007/s00438-020-01668-8

Nowwarote, N., Osathanon, T., Kanjana, K., Theerapanon, T., Porntaveetus, T., & Shotelersuk, V. (2019). Decreased osteogenic activity and mineralization of alveolar bone cells from a patient with amelogenesis imperfecta and FAM83H 1261G>T mutation. *Genes & Diseases*, *6*(4), 391–397. https://doi.org/10.1016/j.gendis.2019.07.005

Nowwarote, N., Theerapanon, T., Osathanon, T., Pavasant, P., Porntaveetus, T., & Shotelersuk, V. (2018). Amelogenesis imperfecta: A novel FAM83H mutation and characteristics of periodontal ligament cells. *Oral Diseases*, *24*(8), 1522–1531. https://doi.org/10.1111/odi.12926

Porntaveetus, T., Abid, M. F., Theerapanon, T., Srichomthong, C., Ohazama, A., Kawasaki, K., & Shotelersuk, V. (2018). Expanding the oro-dental and mutational spectra of kabuki syndrome and expression of KMT2D and KDM6A in human tooth germs. *International Journal of Biological Sciences*, *14*(4), 381–389. https://doi.org/10.7150/ijbs.23517

Pourhashemi, S. J., Ghandehari Motlagh, M., Meighani, G., Ebrahimi Takaloo, A., Mansouri, M., Mohandes, F., & Heidari, M. (2014). Missense mutation in Fam83H gene in Iranian patients with amelogenesis imperfecta. *Iranian Journal of Public Health*, *43*(12), 1680–1687.

Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W. W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., & Rehm, H. L. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*, *17*(5), 405–423. https://doi.org/10.1038/gim.2015.30

Smith, C. E. L., Poulter, J. A., Antanaviciute, A., Kirkham, J., Brookes, S. J., Inglehearn, C. F., & Mighell, A. J. (2017). Amelogenesis imperfecta; genes, proteins, and pathways. *Frontiers in Physiology*, *8*, 435. https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00435

Song, Y. L., Wang, C. N., Zhang, C. Z., Yang, K., & Bian, Z. (2012). Molecular characterization of amelogenesis imperfecta in Chinese patients. *Cells Tissues Organs*, *196*(3), 271–279. https://doi.org/10.1159/000334210

Thesleff, I. (2003). Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. *Journal of Cell Science*, *116*(9), 1647–1648. https://doi.org/10.1242/jcs.00410

Urzúa, B., Martínez, C., Ortega-Pinto, A., Adorno, D., Morales-Bozo, I., Riadi, G., Jara, L., Plaza, A., Lefimil, C., Lozano, C., & Reyes, M. (2015). Novel missense mutation of the FAM83H gene causes retention of amelogenin and a mild clinical phenotype of hypocalcified enamel. *Archives of Oral Biology*, *60*(9), 1356–1367. https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.06.016

Wang, S. K., Hu, Y., Smith, C. E., Yang, J., Zeng, C., Kim, J. W., & Simmer, J. P. (2019). The enamel phenotype in homozygous Fam83h truncation mice. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, *7*(6), e724. https://doi.org/10.1002/mgg3.724

Wang, S. K., Zhang, H., Hu, C. Y., Liu, J. F., Chadha, S., Kim, J. W., & Hu, J. C. C. (2020). FAM83H and autosomal dominant hypocalcified amelogenesis imperfecta. *Journal of Dental Research*, 22034520962731. https://doi.org/10.1177/0022034520962731

Witkop, C. J., Jr. (1988). Amelogenesis imperfecta, dentinogenesis imperfecta and dentin dysplasia revisited: Problems in classification. *Journal of Oral Pathology*, *17*(9–10), 547–553. https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.1988.tb01332.x

Wright, J. T., Frazier-Bowers, S., Simmons, D., Alexander, K., Crawford, P., Han, S. T., & Hart, T. C. (2009). Phenotypic variation in FAM83H-associated amelogenesis imperfecta. *Journal of Dental Reserach*, *88*(4), 356–360. https://doi.org/10.1177/0022034509333822

Wright, J. T., Torain, M., Long, K., Seow, K., Crawford, P., Aldred, M. J., Hart, P. S., & Hart, T. C. (2011). Amelogenesis imperfecta: Genotype-phenotype studies in 71 families. *Cells Tissues Organs*, *194*(2–4), 279–283. https://doi.org/10.1159/000324339

Xin, W., Wenjun, W., Man, Q., & Yuming, Z. (2017). Novel FAM83H mutations in patients with amelogenesis imperfecta. *Scientific Reports*, *7*(1), 6075. https://doi.org/10.1038/s41598-017-05208-0

Yeetong, P., Pongpanich, M., Srichomthong, C., Assawapitaksakul, A., Shotelersuk, V., Tantirukdham, N., Chunharas, C., Suphapeetiporn, K., & Shotelersuk, V. (2019). TTTCA repeat insertions in an intron of YEATS2 in benign adult familial myoclonic epilepsy type 4. *Brain*, *142*(11), 3360–3366. https://doi.org/10.1093/brain/awz267

Yu, S., Quan, J., Wang, X., Sun, X., Zhang, X., Liu, Y., Zhang, C., & Zheng, S. (2018). A novel FAM83H mutation in one Chinese family with autosomal-dominant hypocalcification amelogenesis imperfecta. *Mutagenesis*, *33*(4), 333–340. https://doi.org/10.1093/mutage/gey019

Zhang, C., Song, Y., & Bian, Z. (2015). Ultrastructural analysis of the teeth affected by amelogenesis imperfecta resulting from FAM83H mutations and review of the literature. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, and Oral Radiology*, *119*(2), e69–76. https://doi.org/10.1016/j.oooo.2014.09.002

Zheng, Y., Lu, T., Chen, J., Li, M., Xiong, J., He, F., Gan, Z., Guo, Y., Zhang, L., & Xiong, F. U. (2020). The gain-of-function FAM83H mutation caused hypocalcification amelogenesis imperfecta in a Chinese family. *Clinical Oral Investigations*. https://doi.org/10.1007/s00784-020-03609-6

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

How to cite this article: Sriwattanapong K, Nitayavardhana I, Theerapanon T, et al. Age-related dental phenotypes and tooth characteristics of *FAM83H*-associated hypocalcified amelogenesis imperfecta. *Oral Dis*. 2021;00:1–11. https://doi.org/10.1111/odi.13780

Phenotypic features of dentinogenesis imperfecta associated with osteogenesis imperfecta and *COL1A2* mutations

Oadcharawadee Nutchoey, MSc,[a,b] Narin Intarak, PhD,[b] Thanakorn Theerapanon, MSc,[b] Sermporn Thaweesapphithak, MSc,[c] Lawan Boonprakong, BSc,[d] Anucharte Srijunbarl, MSc,[e] Thantrira Porntaveetus, DDS, Grad Dip, MSc, PhD,[a,b] and Vorasuk Shotelersuk, MD[f,g]

Objective. Dentinogenesis imperfecta (DI) requires dental treatment. This study investigated the characteristics of DI teeth associated with osteogenesis imperfecta (OI) and *COL1A2* mutations.

Study Design. Whole exome and Sanger sequencing were performed. Three primary teeth (called "OIDI teeth") obtained from 3 unrelated *COL1A2* patients were investigated and compared with 9 control teeth from age-matched healthy individuals using colorimetry, micro–computed tomography, Knoop microhardness, energy dispersive X-ray spectroscopy, scanning electron microscopy, and histology.

Results. All patients were identified with heterozygous glycine substitutions in *COL1A2*. The *COL1A2* mutations, c.1531G>T and c.2027G>T, were *de novo*, whereas c.3106G>C was inherited. OIDI1, 2, and 3 teeth had a substantial decrease in dentin microhardness and lightness. OIDI2 enamel microhardness was significantly reduced, whereas OIDI1 and 3 had enamel microhardness comparable to that of control individuals. The OIDI1 pulp cavity was large; OIDI2 was narrow; and OIDI3 was obliterated. OIDI1 and 3 had significantly higher carbon levels than those in control individuals. Numerous ectopic calcified masses, sparse and obstructed dentinal tubules, dentin holes, and collagen disorientation were observed.

Conclusions. OIDI teeth had reduced lightness and variable pulp morphology. Weak dentin, mineral disproportion, and abnormal ultrastructure could contribute to the brittleness of OIDI teeth and adhesive restoration failure. Here, we expand the phenotypic spectrum of *COL1A2* mutations and raise awareness among dentists seeing patients with OI. (Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol 2021;131:694–701)

Dentinogenesis imperfecta (DI) is a genetic disorder of dentin affecting the primary and permanent dentition. The Shields classification, based on phenotypes, proposed dividing DI into 3 types.[1] Shields DI type I is associated with osteogenesis imperfecta (OI), whereas DI types II and III are nonsyndromic. Due to the availability of genetic data concerning the causes of inherited dentin disorders, it has been proposed that the pathogenesis of Shields DI I is different from that of DI II and DI III and should be considered as a unique entity.[2,3]

Shields DI II (OMIM accession no. 125490) and DI III (OMIM accession no. 125500) are associated with mutations in the dentin sialophosphoprotein (*DSPP*) gene (MIM*125485).[4-6] Recent genetic studies have shown that Shields DI II and DI III could be the same disease with phenotypic variability.[3,5] In contrast, Shields DI I is primarily caused by heterozygous mutations in type I collagen coding gene *COL1A1* or *COL1A2* (MIM*120150 or MIM*120160, respectively).[7-9] It was suggested that the abnormal dentin associated with OI should be called "DI-like" or opalescent teeth associated with OI.[2,3]

Clinically, DI teeth are opalescent, brittle, and prone to fracture.[10-13] Bulbous crowns, cervical constriction, and pulp obliteration are radiologic features. There are a few studies showing the ultrastructural features of DI teeth, such as weak dentin, irregular tubules, and

Statement of Clinical Relevance

Dentinogenesis imperfecta, osteogenesis imperfecta, and *COL1A2* mutations lead to a significant decrease in dentin hardness and lightness, mineral disproportion, pulp obliteration, and abnormal dentin, including holes, ectopic calcified masses, sparse tubules, and collagen disorientation. Dentists should be aware of these anomalies.

[a]Master of Science Program in Geriatric Dentistry and Special Patients Care (International Program), Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.
[b]Genomics and Precision Dentistry Research Unit, Department of Physiology, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University.
[c]Center of Excellence for Regenerative Dentistry, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University.
[d]Oral Biology Research Center, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University.
[e]Dental Materials R&D Center, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University.
[f]Center of Excellence for Medical Genomics, Medical Genomics Cluster, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University.
[g]Excellence Center for Genomics and Precision Medicine, King Chulalongkorn Memorial Hospital, Thai Red Cross Society, Bangkok, Thailand.
Received for publication Sep 14, 2020; returned for revision Dec 2, 2020; accepted for publication Jan 5, 2021.
© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.
2212-4403/$-see front matter
https://doi.org/10.1016/j.oooo.2021.01.003

changes in mineral content. However, these phenotypes concerned *DSPP*-associated DI and the opalescent teeth associated with OI caused by *COL1A1* mutation.[4,14-19] Only one previous study demonstrated the dentin defects in a patient with *COL1A2* mutation. However, that patient had a glycine substitution in the carboxyl terminus of *COL1A2* leading to OI/Ehlers-Danlos overlap syndrome, which is not typical of OI.[20] Because of the limited understanding of the dental phenotypic spectrum related to *COL1A2* mutations, the present study collected primary teeth (called OIDI) from 3 unrelated patients with OI who had glycine substitutions in *COL1A2*. Our aims were to thoroughly investigate and expand knowledge of the ultrastructural, physical, and mechanical properties of OIDI teeth associated with *COL1A2* mutations.

MATERIALS AND METHODS

Subject enrollment

Three unrelated patients with OI and DI and their family members were recruited. Informed consent was obtained from all participants or their parents/legal guardians. The project was approved by the research ethics committee at the Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Thailand (HREC-DCU 2018-092), and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and additional requirements.

Mutation identification

Peripheral blood samples were collected and extracted to obtain genomic DNA. Whole-exome sequencing (WES) was performed at Macrogen Inc. (Seoul, Korea) using a HiSeq 4000 sequencer (Illumina) and processed as previously described.[21-23] The variants were filtered out if they were noncoding variants or synonymous exonic variants; if they were not in the genes associated with OI;[24,25] or if they were found in >1% in the 1000 Genomes Project database, Genome Aggregation Database (Gnomad.broadinstitute.org), or in-house database of 2166 Thai exomes. The identified mutations were validated by Sanger sequencing using primers shown in Supplemental Table S1.

Tooth samples

Three primary teeth were obtained from 3 unrelated patients with OI with *COL1A2* mutations. OIDI1 was the primary right first molar obtained from patient 1 (Pt-1); OIDI2 was the primary left central incisor from Pt-2; and OIDI3 was the primary right second molar from Pt-3. Each OIDI tooth was studied and compared with 3 tooth-type matched controls collected from age-matched healthy individuals.

Tooth color

Tooth color was measured on the buccal surface of each tooth 3 times using a digital intraoral colorimeter (VITA Easyshade V; VITA Zahnfabrik H. Rauter GmbH & Co KG, Bad Sackingen, Germany). The L*a*b values were recorded according to the International Commission on Illumination. The L* displays the lightness in the black-and-white scale; a* is the saturation in the red-and-green scale; and b* is the saturation in the blue-and-yellow scale. The color difference (ΔE*) was calculated using the equation $\Delta E = \sqrt{(L_2 - L_1)^2 + (a_2 - a_1)^2 + (b_2 - b_1)^2}$.

Micro–computed tomography (micro-CT)

The whole tooth was scanned using micro-CT (Specimen μCT35; SCANCO Medical AG, Brüttisellen, Switzerland). A square area of 16 × 16 and 104 × 104 pixels was created in 30 sections of the sample. Mineral density was measured using the Image Processing Language (SCANCO Medical AG, Brüttisellen, Switzerland).

Microhardness

After micro-CT scanning, the tooth was fixed in a resin block. The block was cut longitudinally into buccal and lingual segments. Microhardness was measured on the lingual segment using a Knoop microhardness tester (FM700 e Type D; Future Tech, Kanagawa, Japan) at 100 gF for 15 s/load. Thirty locations on the enamel and dentin were selected. The Knoop microhardness (H_K) values were calculated according to the formula $H_K = 14\,229\,P/L^2$ (P, applied test load [gF]; L, indentation diagonal length [μm]).

Mineral composition, ultrastructure, and histology

Mineral composition, comprising carbon (C), oxygen (O), phosphorus (P), and calcium (Ca), was measured at 3 spots on the buccal segment using energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX) (ISIS 300 EDX System; Oxford Instruments, Abingdon, UK). Tooth ultrastructure was analyzed using a scanning electron microscope (SEM) (JSM 5410-LV; Jeol Ltd., Tokyo, Japan). The segment was then embedded in paraffin, sectioned, and stained with hematoxylin and eosin and Masson's trichrome.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using IBM SPSS Statistics for Windows software (version 22; IBM Corp., Armonk, NY, USA). Data normality was assessed by using the Kolmogorov-Smirnov test. For normally distributed data, independent group comparison was analyzed using analysis of variance followed by Tukey's test for pairwise comparison. For non-

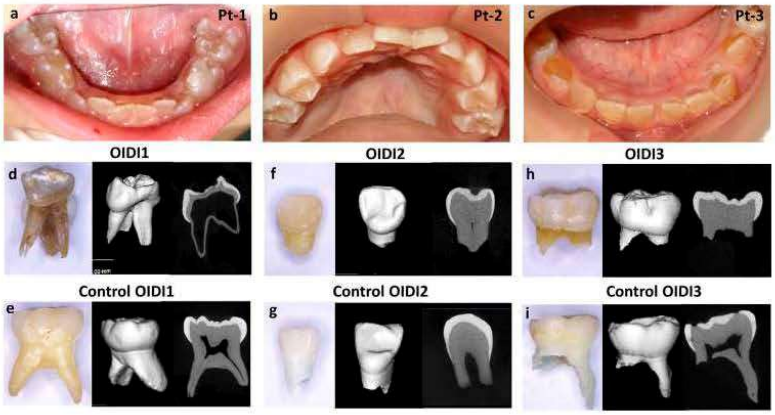


Fig. 1. Phenotypes of Patients 1, 2 and 3 and OIDI1, 2, and 3. (a-c) Intraoral image of Pt-1, 2, and 3 show opalescent primary teeth. (d-i) Light microscopic image, three-dimensional reconstruction, and longitudinal cross-section of the OIDI teeth and controls.

normally distributed data, the Kruskal-Wallis test was used for independent group comparison, and the Mann-Whitney *U* test was used for pairwise comparison. The significance level was set at .05.

RESULTS

Medical features and genetic mutations

Three unrelated patients were diagnosed with OI and DI on the basis of clinical, radiographic, and laboratory examinations. Pt-1 was 7 years old; Pt-2 was 6 years old; and Pt-3 was 13 years old. All 3 patients had short stature, bone curvature, low bone mineral density, flat feet, DI, and a history of bone fractures (Figure 1a–c). The phenotype of Pt-1 was described in our previous study.[24] All 3 patients had received intravenous pamidronate therapy (7.2 mg/kg) every 2 months.

Using WES, we identified Pt-1 with a *de novo* heterozygous missense mutation, c.1531G>T (p.Gly511 Cys), in exon 26 of *COL1A2* (NM_000089.4).[24] Pt-1's parents were healthy and had normal teeth. Pt-2 possessed a heterozygous missense mutation, c.3106G>C (p.Gly1036 Arg), in exon 47 of *COL1A2*. The mutation was inherited from the mother, who also had OI and DI. Pt-3 harbored a *de novo* heterozygous missense mutation, c.2027G>T (p.Gly676 Val), in exon 34 of *COL1A2*. Pt-3's parents were healthy and had normal teeth. All 3 mutations were glycine substitutions in

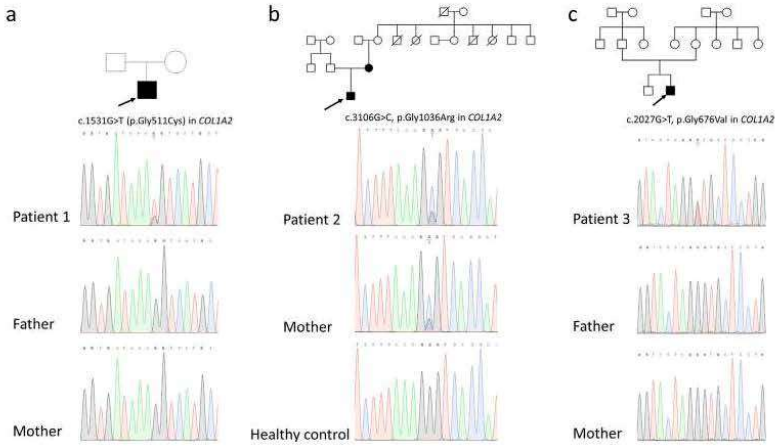


Fig. 2. Family pedigree and chromatogram of patients and their families. A filled symbol indicates an individual with dentinogenesis imperfecta associated with osteogenesis imperfecta. Arrows indicate the probands.

COL1A2 (Figure 2). These mutations were predicted to be pathogenic according to the American College of Medical Genetics and Genomics standards and guidelines.[26] Genetic findings confirmed the diagnosis of OI in Pt-1, -2, and -3.

Dental phenotype

Primary tooth samples, OIDI1, OIDI2, and OIDI3, were collected from Pt-1, 2, and 3, respectively. Clinically, the OIDI teeth were opalescent. The lightness (L*) values of OIDI1, OIDI2, and OIDI3 (38, 68, and

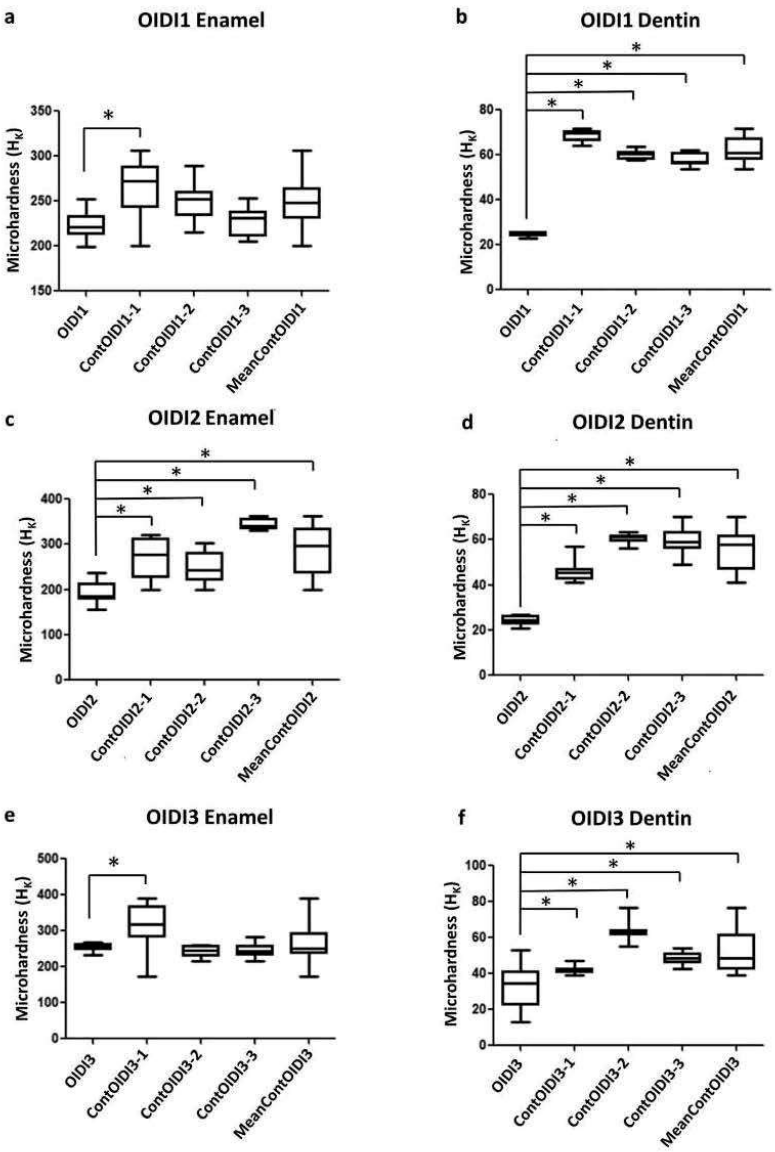


Fig. 3. Knoop microhardness of enamel and dentin of OIDI1, 2, 3 and controls. Dentin microhardness values of OIDI1, 2, and 3 are significantly lower than controls. The microhardness values of OIDI1 and OIDI3 enamel are comparable to controls, while that of OIDI2 enamel is lower than controls. *Significant at $P < 0.05$. Cont, control.

62 respectively) were lower than their controls, revealing that the OIDI teeth were darker than normal teeth. On the basis of a* and b* values, OIDI1 was bluer and greener than controls; OIDI2 was yellower and redder than controls; and OIDI3 was bluer and redder than controls. The color differences (ΔE) between OIDI1, OIDI2, and OIDI3 and their controls were 50.62, 25.70, and 28.00, respectively.[27] These values indicate that the color distinction between the OIDI and normal teeth is perceivable by the human eye (Supplemental Table S2).

Micro-CT cross-sections demonstrated that OIDI1 had a very wide pulp cavity, whereas that of OIDI2 was narrow and that of OIDI3 was obliterated (Figure 1d–i). The enamel and dentin mineral densities of OIDI1, 2, and 3 analyzed by micro-CT were comparable to those of controls (Supplemental Table S3).

The Knoop microhardness values of OIDI1, OIDI2, and OIDI3 dentin were significantly lower than those of controls. The enamel microhardness values of OIDI1 and OIDI3 were comparable to those of controls, whereas OIDI2 had a significantly lower microhardness than that of controls (Figure 3 and Supplemental Table S4).

The mineral content was measured by EDX. In dentin, OIDI1 had a significantly increased level of carbon and significantly reduced levels of phosphate and calcium compared with controls. A significant increase in carbon was observed in OIDI2 dentin, whereas a significant decrease in carbon content was observed in OIDI3 dentin compared with that of controls. The OIDI1 and OIDI3 enamel had significantly higher levels of carbon, but lower levels of oxygen, phosphorus, and calcium, than those of controls. No significant differences in mineral content were observed in the OIDI2 enamel compared with controls (Supplemental Table S5 and Supplemental Figure S1).

SEM demonstrated that the OIDI teeth had severe dentin abnormalities. These teeth lacked a uniform arrangement of dentinal tubules. OIDI1 and OIDI2

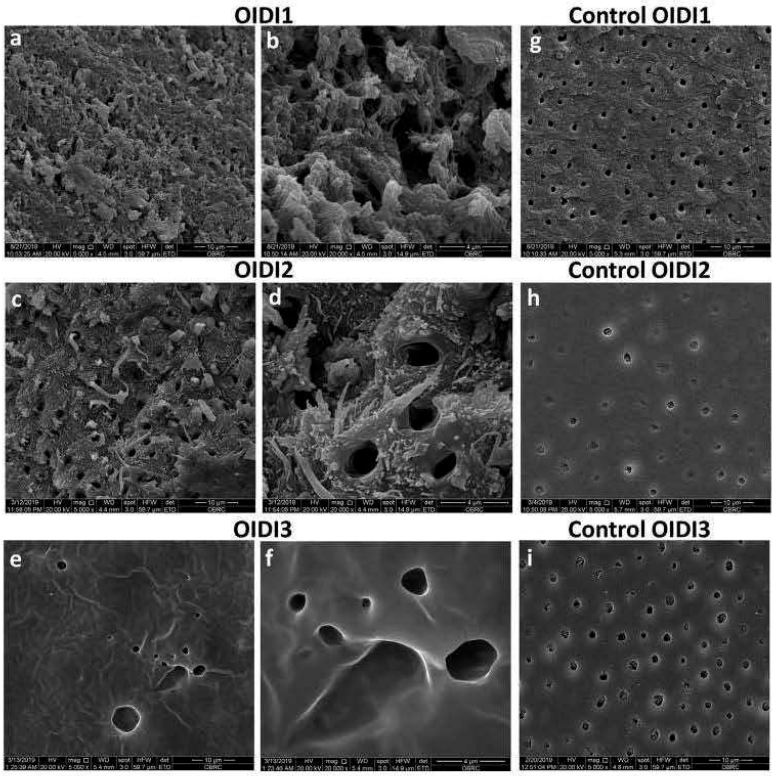


Fig. 4. Scanning electron microscopic images of OIDI1, 2, 3 and controls. (a-f) OIDI1 and OIDI2 have a rough dentin texture comprising large gaps and numerous ectopic calcified masses. OIDI3 has a wavy dentin surface and holes. (g-i) Controls exhibit the typical arrangement of dentinal tubules. a, c, e, g, h, i: magnification 5,000x; b, d, f: 20,000x.

presented a rough dentin texture containing large gaps and ectopic, calcified masses, whereas OIDI3 dentin showed a wavy surface and large holes. Some dentinal tubules were observed in OIDI1 and OIDI2; however, they were minimal in OIDI3. In controls, the tubule orientation was regular, and the dentin surface was smooth (Figure 4). Histologically, regular alignment of dentinal tubules and collagen fibers was found in controls, whereas disorientated and sparse tubules and collagen fibers were present in the OIDI teeth (Figure 5).

DISCUSSION

In this study, 3 unrelated patients diagnosed with OI and DI were identified with glycine substitutions in *COL1A2*. Type I collagen is a major component of bone and tooth extracellular matrix. Mutations in the glycine triple-helix of collagen chains have been demonstrated to cause OI and DI in a large number of OI cases.[7,11,24,28-30] The prevalence of DI was increased when the mutations occurred between p.Gly376 and p.Gly745 and from p. Gly982 to the amino-terminal end of the triple-helical domain.[31] Correspondingly, Pt-1, Pt-2, and Pt-3 had DI features and possessed the mutations p.Gly511 Cys, p. Gly1036 Arg, and p.Gly676 Val, respectively.

Clinically, all 3 patients had opalescent teeth that were darker than normal, which was perceivable by the human eye. Based on the L*a*b values, the discoloration of the OIDI teeth observed in this study was consistent with a previous report demonstrating that patients with OI had a tooth color in the gray/blue-yellow/brown range.[32] Micro-CT scanning revealed that OIDI teeth had a variable pulp size ranging from very wide to obliterated, and OIDI1 had the widest pulp cavity and the thinnest dentin. It is possible that the very thin dentin of OIDI1 could make the teeth weak and prone to deterioration and fracture. The absence or obliteration of the OIDI2 and OIDI3 pulp cavities could be due to excessive formation of reparative dentin to compensate for rapid attrition.[16,17,33]

Significant decreases in dentin hardness were consistently observed in OIDI teeth. Similarly, reduced dentin hardness was reported in patients with DI Shields type I and *COL1A1* mutations and in those with DI Shields type II.[18,34] The mineral content of OIDI1, 2, and 3 was diversely different from that of controls. Disproportionate mineral composition was reported in DI Shields type II teeth.[35] At the ultrastructural level, SEM revealed that the OIDI teeth had multiple dentin abnormalities, including disorganized and reduced dentinal tubules; rough dentin texture; large holes; and ectopic, calcified masses. These features overlapped with those previously reported.[36-38] Histologically, the collagen fibers in OIDI teeth were irregular in size and arrangement, as well as reduced in number. It was postulated that the dentinal tubules in DI teeth were occluded by excessive production of peritubular dentin.[17,36] Future studies using tooth samples from patients with OI at different ages would verify these findings. The abnormal formation of dentinal tubules and collagen fibers could limit the penetration of dental adhesives and formation of a hybrid layer, affecting the quality of a dental restoration.[39,40]

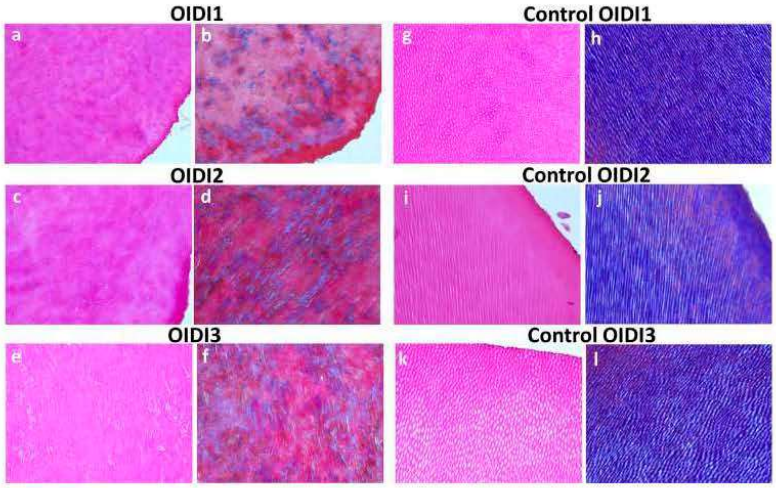


Fig. 5. Histological images of OIDI1, 2, 3 and controls. (a-f) OIDI dentin has disorientated and sparse dentinal tubules and collagen fibers. (g-l) Controls exhibit regular alignment of tubules and collagen fibers. a, c, ,e, g, i, k: hematoxylin and eosin staining; b, d, f, h, j, l: Masson's trichrome staining. Microscopic magnification at 40x.

To conclude, this study expands the phenotypic features, including the ultrastructural, physical, and mechanical properties, of OIDI teeth associated with glycine substitutions in *COL1A2*. The OIDI teeth had a distinctly dark color, variable pulp morphology, reduced dentin hardness, disproportionate mineral composition, and dentin ultrastructural defects. These findings provide insights into the accumulated dentin defects of OIDI that could contribute to tooth weakness and failure of adhesive restorations and raise awareness among dentists providing dental care for these patients.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Kevin A. Tompkins for language revision of the manuscript.

FUNDING

This research is supported by the 90th Anniversary of Chulalongkorn University, Rachadapisek Sompote Fund, Chulalongkorn University. N.I. is supported by the Rachadapisek Sompot Fund for Postdoctoral Fellowship, Chulalongkorn University. S.T. is supported by the 100th Anniversary Chulalongkorn University Fund for Doctoral Scholarship and the 90th Anniversary of Chulalongkorn University Fund (Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund). This project is funded by the National Research Council of Thailand, TSRI Fund (CU_FRB640001_01_32_3, CU_FRB640001_01_32_4), Global partnership CU[1]C16F630029, Health Systems Research Institute, Thailand Research Fund (MRG6280001, DPG6180001), and Faculty Research Grant (DRF64013), Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Supplementary material associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.oooo.2021.01.003.

REFERENCES

1. Shields ED, Bixler D, el-Kafrawy AM. A proposed classification for heritable human dentine defects with a description of a new entity. *Arch Oral Biol*. 1973;18:543-553.
2. Chetty M, Roberts T, Stephen LXG, Beighton P. Hereditary dentine dysplasias: terminology in the context of osteogenesis imperfecta. *Br Dent J*. 2016;221:727-730.
3. de La Dure-Molla M, Philippe Fournier B, Berdal A. Isolated dentinogenesis imperfecta and dentin dysplasia: revision of the classification. *Eur J Hum Genet*. 2015;23:445-451.
4. Porntaveetus T, Osathanon T, Nowwarote N, et al. Dental properties, ultrastructure, and pulp cells associated with a novel DSPP mutation. *Oral Dis*. 2018;24:619-627.
5. Barron MJ, McDonnell ST, Mackie I, Dixon MJ. Hereditary dentine disorders: dentinogenesis imperfecta and dentine dysplasia. *Orphanet J Rare Dis*. 2008;3:31.
6. Maciejewska I, Chomik E. Hereditary dentine diseases resulting from mutations in DSPP gene. *J Dent*. 2012;40:542-548.
7. Marini JC, Forlino A, Bächinger HP, et al. Osteogenesis imperfecta. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17052.
8. van Dijk FS, Cobben JM, Kariminejad A, et al. Osteogenesis imperfecta: a review with clinical examples. *Mol Syndromol*. 2011;2:1-20.
9. Tauer JT, Robinson ME, Rauch F. Osteogenesis imperfecta: new perspectives from clinical and translational research. *JBMR Plus*. 2019;3:e10174.
10. Kim JW, Simmer JP. Hereditary dentin defects. *J Dent Res*. 2007;86:392-399.
11. Udomchaiprasertkul W, Kuptanon C, Porntaveetus T, Shotelersuk V. A family with homozygous and heterozygous p.Gly337Ser mutations in *COL1A2*. *Eur J Med Genet*. 2020;63:103896.
12. Tongkobpetch S, Limpaphayom N, Sangsin A, Porntaveetus T, Suphapeetiporn K, Shotelersuk V. A novel de novo *COL1A1* mutation in a Thai boy with osteogenesis imperfecta born to consanguineous parents. *Genet Mol Biol*. 2017;40:763-767.
13. Porntaveetus T, Nowwarote N, Osathanon T, et al. Compromised alveolar bone cells in a patient with dentinogenesis imperfecta caused by *DSPP* mutation. *Clin Oral Investig*. 2019;23:303-313.
14. Leal CT, Martins LD, Verli FD, de Souza MA, Ramos-Jorge ML. Case report: clinical, histological and ultrastructural characterization of type II dentinogenesis imperfecta. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2010;11:306-309.
15. Majorana A, Bardellini E, Brunelli PC, Lacaita M, Cazzolla AP, Favia G. Dentinogenesis imperfecta in children with osteogenesis imperfecta: a clinical and ultrastructural study. *Int J Paediatr Dent*. 2010;20:112-118.
16. Sapir S, Shapira J. Dentinogenesis imperfecta: an early treatment strategy. *Pediatr Dent*. 2001;23:232-237.
17. Turkkahraman H, Galindo F, Tulu US, Helms JA. A novel hypothesis based on clinical, radiological, and histological data to explain the dentinogenesis imperfecta type II phenotype. *Connect Tissue Res*. 2020;61:526-536.
18. Ibrahim S, Strange AP, Aguayo S, et al. Phenotypic properties of collagen in dentinogenesis imperfecta associated with osteogenesis imperfecta. *Int J Nanomed*. 2019;14:9423-9435.
19. Malmgren B, Lindskog S. Assessment of dysplastic dentin in osteogenesis imperfecta and dentinogenesis imperfecta. *Acta Odontol Scand*. 2003;61:72-80.
20. Budsamongkol T, Intarak N, Theerapanon T, Yodsanga S, Porntaveetus T, Shotelersuk V. A novel mutation in *COL1A2* leads to osteogenesis imperfecta/Ehlers-Danlos overlap syndrome with brachydactyly. *Genes Dis*. 2019;6:138-146.
21. Intarak N, Theerapanon T, Thaweesapphithak S, Suphapeetiporn K, Porntaveetus T, Shotelersuk V. Genotype-phenotype correlation and expansion of orodental anomalies in LTBP3-related disorders. *Mol Genet Genom*. 2019;294:773-787.
22. Nitayavardhana I, Theerapanon T, Srichomthong C, et al. Four novel mutations of *FAM20A* in amelogenesis imperfecta type IG and review of literature for its genotype and phenotype spectra. *Mol Genet Genom*. 2020;295:923-931.
23. Porntaveetus T, Abid MF, Theerapanon T, et al. Expanding the oro-dental and mutational spectra of Kabuki syndrome and expression of *KMT2D* and *KDM6A* in human tooth germs. *Int J Biol Sci*. 2018;14:381-389.
24. Hemwong N, Phokaew C, Srichomthong C, et al. A patient with combined pituitary hormone deficiency and osteogenesis imperfecta associated with mutations in *LHX4* and *COL1A2*. *J Adv Res*. 2020;21:121-127.
25. Rossi V, Lee B, Marom R. Osteogenesis imperfecta: advancements in genetics and treatment. *Curr Opin Pediatr*. 2019;31:708-715.
26. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and

Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17:405-424.
27. Yamanel K, Caglar A, Özcan M, Gulsah K, Bagis B. Assessment of color parameters of composite resin shade guides using digital imaging versus colorimeter. *J Esthet Restor Dent*. 2010;22:379-388.
28. Zhytnik L, Maasalu K, Duy BH, et al. De novo and inherited pathogenic variants in collagen-related osteogenesis imperfecta. *Mol Genet Genom Med*. 2019;7:e559.
29. Lu Y, Zhang S, Wang Y, Ren X, Han J. Molecular mechanisms and clinical manifestations of rare genetic disorders associated with type I collagen. *Intractable Rare Dis Res*. 2019;8:98-107.
30. Basel D, Steiner RD. Osteogenesis imperfecta: recent findings shed new light on this once well-understood condition. *Genet Med*. 2009;11:375-385.
31. Rauch F, Lalic L, Roughley P, Glorieux FH. Genotype-phenotype correlations in nonlethal osteogenesis imperfecta caused by mutations in the helical domain of collagen type I. *Eur J Hum Genet*. 2010;18:642-647.
32. Andersson K, Dahllof G, Lindahl K, et al. Mutations in *COL1A1* and *COL1A2* and dental aberrations in children and adolescents with osteogenesis imperfecta – a retrospective cohort study. *PLoS One*. 2017;12:e0176466.
33. Singhal P, Arya S, Vengal M, Bhalodia M. Dentinogenesis imperfecta type II – a case report with review of literature. *Glob J Med Res*. 2014;14:25-28.
34. Wieczorek A, Loster J, Ryniewicz W, Ryniewicz AM. Dentinogenesis imperfecta - hardness and Young's modulus of teeth. *Acta Bioeng Biomech*. 2013;15:65-69.
35. Wieczorek A, Loster J. Analysis of the mineral composition of permanent teeth in dentinogenesis imperfecta type II. *J Stomatol*. 2012;65:404-410.
36. Hall RK, Maniere MC, Palamara J, Hemmerle J. Odontoblast dysfunction in osteogenesis imperfecta: an LM, SEM, and ultrastructural study. *Connect Tissue Res*. 2002;43:401-405.
37. Lygidakis NA, Smith R, Oulis CJ. Scanning electron microscopy of teeth in osteogenesis imperfecta type I. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1996;81:567-572.
38. Kantaputra PN, Sirirungruangsarn Y, Intachai W, Ngamphiw C, Tongsima S, Dejkhamron P. Osteogenesis imperfecta with ectopic mineralizations in dentin and cementum and a *COL1A2* mutation. *J Hum Genet*. 2018;63:811-820.
39. Guo J, Wang L, Zhu J, Yang J, Zhu H. Impact of dentinal tubule orientation on dentin bond strength. *Curr Med Sci*. 2018;38:721-726.
40. Schüpbach P, Krejci I, Lutz F. Dentin bonding: effect of tubule orientation on hybrid-layer formation. *Eur J Oral Sci*. 1997;105:344-352.

Reprint requests:

Thantrira Porntaveetus, DDS Grad Dip, MSc, PhD
Genomics and Precision Dentistry Research Unit
Department of Physiology
Faculty of Dentistry
Chulalongkorn University
Bangkok 10330
Thailand
thantrira.p@chula.ac.th

Received: 23 March 2020 | Revised: 9 September 2020 | Accepted: 18 September 2020

DOI: 10.1111/odi.13657

Check for updates

ORIGINAL ARTICLE

ORAL DISEASES WILEY

Tooth ultrastructure of a novel *COL1A2* mutation expanding its genotypic and phenotypic spectra

Narin Intarak[1] | Thunyaporn Budsamongkol[1,2] | Thanakorn Theerapanon[3] | Theerapat Chanamuangkon[4] | Anucharte Srijunbarl[5] | Lawan Boonprakong[6] | Thantrira Porntaveetus[1] | Vorasuk Shotelersuk[7,8]

[1]Genomics and Precision Dentistry Research Unit, Department of Physiology, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

[2]Geriatric Dentistry and Special Patients Care Program, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

[3]Excellence Center in Regenerative Dentistry, Department of Anatomy, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

[4]Biomaterial Testing Center, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

[5]Dental Materials R&D Center, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

[6]Oral Biology Research Center, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

[7]Center of Excellence for Medical Genomics, Medical Genomics Cluster, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

[8]Excellence Center for Genomics and Precision Medicine, King Chulalongkorn Memorial Hospital, the Thai Red Cross Society, Bangkok, Thailand

Correspondence
Thantrira Porntaveetus, Genomics and Precision Dentistry Research Unit, Department of Physiology, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.
Email: thantrira.p@chula.ac.th

Funding information
This project is funded by National Research Council of Thailand, Global Partnership CU-C16F630029, Health Systems Research Institute, and Thailand Research Fund (MRG6280001, DPG6180001)

Abstract

Objectives: To investigate tooth ultrastructure and mutation of two patients in a family affected with osteogenesis imperfecta (OI) type IV and dentinogenesis imperfecta (DGI).

Methods: Mutations were detected by whole exome and Sanger sequencing. The permanent second molar obtained from the proband (DGI1) and the primary first molar from his affected son (DGI2) were studied for their color, roughness, mineral density, hardness, elastic modulus, mineral content, and ultrastructure, compared to the controls.

Results: Two novel missense *COL1A2* variants, c.752C > T (p.Ser251Phe) and c.758G > T (p.Gly253Val), were identified in both patients. The c.758G > T was predicted to be the causative mutation. Pulp cavities of DGI1 (permanent teeth) were obliterated while those of DGI2 (primary teeth) were wide. The patients' teeth had darker and redder colors; reduced dentin hardness; decreased, disorganized, and scattered dentinal tubules and collagen fibers; and irregular dentinoenamel junction (DEJ), compared to controls. Lacunae-like structures were present in DGI2.

Conclusions: We reported the novel causative mutation, c.758G > T (p.Gly253Val), in *COL1A2* for OI type IV and DGI. The DGI dentin demonstrated inferior mechanical property and ultrastructure, suggesting severe disturbances of dentin formation. These could contribute to fragility and prone to infection of DGI teeth. This study expands phenotypic and genotypic spectra of *COL1A2* mutations.

KEYWORDS

bisphosphonate, dental disease, dentin, dentinogenesis imperfecta, osteoporosis, skeleton

© 2020 John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd. All rights reserved

1 | INTRODUCTION

Osteogenesis imperfecta (OI) is a rare heterogeneous inherited disorder of connective tissue with an estimated incidence of 1:15–20,000 individuals (Marini et al., 2017). Main features of OI are bone fragility, deformity, and growth deficiency. Its secondary features include blue sclerae, hearing loss, cardiopulmonary complication, and dentinogenesis imperfecta (DGI). Craniofacial manifestations associated with OI include midfacial hypoplasia, class III malocclusion, and posterior crossbite (O'Connell & Marini, 1999). Irregular pattern and reduced number of dentinal tubules and cracked enamel were reported in DGI teeth (Ibrahim et al., 2019; Wieczorek & Loster, 2013).

OI poses variable severity ranging from perinatal lethality to unnoticeable clinical signs. OI is classically classified into four main types (types I, II, III, and IV) (Sillence et al., 1979). Eighty-five percent of cases are caused by mutations in *COL1A1* or *COL1A2* which encode type I collagen. Of those, substitution of another amino acid for glycine is the most common, causing negative alteration of triple-helical domain of the collagen chains. Mutations in at least 17 other genes in autosomes (Marini et al., 2017) or chromosome X can lead to OI (Lindert et al., 2016). Although many reports have studied mutations in OI patients, knowledge of ultrastructure of DGI teeth is limited.

This study identified the proband and his son affected with type IV OI and DGI. Both patients were found to harbor two novel missense variants, c.752C > T (p.Ser251Phe) and c.758G > T (p.Gly-253Val), in *COL1A2*. The teeth affected with DGI obtained from both patients were thoroughly studied for their characteristics including tooth color, roughness, hardness, elastic modulus, mineral density, mineral composition, and ultrastructure.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Subject enrollment

A Thai family, diagnosed with OI and DGI, enrolled in this study. Informed consents were obtained. The study was approved by the research ethics committee, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University (HREC-DCU 2017-077, date of approval: 6 October 2017) and complied with Declaration of Helsinki (version 2002) and the additional requirements. Medical history was obtained and clinical examination was performed for all participants.

2.2 | Mutation analyses

Genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes and processed by TruSeq Exome Enrichment Kit and Illumina Hiseq 2000 at Macrogen Inc. (Seoul, Korea). The CASAVA v1.7 was used to map the data with the Human Genome version 19 and SAM tools (http://samtools.sourceforge.net/) to call variants. The sequencing data were mapped to NCBI37 reference human genome. To exclude polymorphism variants, the identified variants obtained from the subjects were filtered with various databases including NHLBI Exome Variant Server (EVS), Genome Aggregation Database (gnomAD), 1000 Genomes Project Consortium, dbSNPs and in-house database of 2,166 Thai exomes (including at least 1,000 healthy individuals). The variants located in the coding regions of genes related to osteogenesis imperfecta were screened using the genes listed in OI mutation database (https://oi.gene.le.ac.uk). The variants reported here were segregated in affected family members. Mutation pathogenicity was predicted by InterVar (Li & Wang, 2017), Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT) (Ng & Henikoff, 2003), and Mendelian Clinically Applicable Pathogenicity (M-CAP) (Jagadeesh et al., 2016).

The identified variant was validated by Sanger sequencing. The coding region of *COL1A2* was amplified using specific primers: F:GTCATGCCACTGTAAGCAAC and R:GCAAACACAGTTCCAATC TTTCAC. The amino acid sequence of human COL1A2 (NP_000080.2) was compared with that of *Rhesus macaque* (NP_001253266.1), *Bos taurus* (NP_776945.1), *Mus musculus* (NP_031769.2), *Xenopus laevis* (NP_001080727.1), and *Danio rerio* (NP_892013.2).

2.3 | Tooth samples

The permanent upper left second molar of the proband (DGI1) and the primary lower left first molar of the proband's son (DGI2) were extracted due to caries. DGI teeth were analyzed compared with three tooth type-matched controls collected from healthy age-matched individuals who did not have any systemic condition or medication affecting the teeth and bone.

2.4 | Micro computerized tomography (micro-CT)

Tooth samples were scanned with specimen μCT 35 (SCANCO Medical, Brüttisellen, Switzerland) at Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University. A square area of 16 00D 16–104x104 pixels from 30 layers of sections was selected from each sample. Mineral density was measured in and quantified using the Image Processing Language (IPL, Scanco Medical AG).

2.5 | Tooth color

A digital intraoral colorimeter (ShadeEye NCC Dental Chroma Meter, Shofu Inc., Kyoto, Japan) was used to measure color on buccal and lingual surfaces of tooth crown. The values of colorimeter were demonstrated as L^*, a^*, and b^*. Color difference (ΔE value) between DGI and control teeth was determined following previous study (Alghazali et al., 2012).

2.6 | Surface roughness

Surface roughness was examined on the lingual and mesial tooth surfaces using a surface Profilometer (Talyscan 150, Taylor Hobson Ltd., UK). Each surface was measured 30 times randomly at 600

micrometer intervals on *y*-axis. The stylus speed was 1,000 micrometer/second. Tracing area was 2×2 mm^2. Cutoff length was 0.025 mm. The surface topography parameters were calculated by the TalyMap Universal program.

2.7 | Nanohardness and elastic modulus

After samples were sectioned, the enamel and dentin were indented using the nano-base indentation system (Ultra Micro-Indentation System, UMIS II, CSIRO, Australia) and a calibrated diamond Berkovich indenter. All samples were indented to maximum force 200 mN for 30 spots. In all loading-unloading cycles, 50 points were plotted to make load–displacement curve. The IBIS software was used to calculate hardness and elastic modulus values.

2.8 | Energy-Dispersive X-ray (EDX)

The dehydrated tooth sections were coated with gold powder for 10 s. Mineral contents, carbon (C), oxygen (O), phosphorus (P), and calcium (Ca), in enamel and dentin were measured using EDX (ISIS 300 EDX-system; Oxford Instruments, UK).

2.9 | Histology

Samples were subjected to EDTA decalcification, embedded in paraffin wax, sectioned, stained with hematoxylin and eosin and Masson's Trichrome, and examined under light microscope.

2.10 | Scanning Electron Microscopy (*SEM*)

Samples were sputter-coated with gold and examined using *SEM* (QuantaFeg 250, FEI Company, Oregon, USA).

2.11 | Statistical analysis

GraphPad Prism 5 Software Package (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) was used. Data with normal distribution were tested for significance using independent *t* test. Mann–Whitney U test was used for data with non-normal distribution (significance level at 0.05).

3 | RESULTS

3.1 | Physical and oral characteristics

The proband was a 43-year-old Thai male. He had a history multiple episodes of bone fractures including spontaneous fractures of his ribs and clavicles at 3 months of age and a fracture of his right femur at age 12 years while jumping. Physical examinations at age 43 years revealed short stature (156 cm; 25th percentile), white sclerae, widen antero-posterior body axis, and marked limb deformities (Figure 1a–c). Radiographic features showed generalized osteopenia, narrow and angulated long bones, hyperlordosis, fish vertebrae, and compression fractures (Figure 1d–g). His BMD of lumbar spine was significantly reduced (0.534 g/cm^2; *z*-score −3.0). Craniofacial findings included wormian bones, DGI, anterior crossbite, and class III malocclusion. The teeth had severe attrition, marked cervical constriction, and pulp obliteration. Dental radiograph showed bulbous crowns, curved roots, and obliterated pulp canals. The upper left second and third molars were broken and subjected for extraction (Figure 1h–j). He never received pamidronate therapy.

The proband's son was a 3-year-old boy (Figure 2a). He was delivered naturally at 38 weeks of gestation. His birthweight was 2,660 g (25th–50th centile); body length 46 cm (25th centile); head circumference 33 cm (25th–50th centile); and chest circumference 31 cm. He was referred to our hospital due to fracture of his left femur during neonatal period. At 1 month of age, he had right humerus fracture. Callus formation was observed at the left femur and right humerus on the radiographs (Figure 2b,c). Wormian bone formation was found in the lambdoid suture (Figure 2d). The anterior fontanelle was 5×5 cm. Intravenous pamidronate (7.2 mg/kg) was started at the age of 4 months and continued every 2 months. At 5 months of age, his right femur was fractured. Distinct curvature of femurs and humerii and zebra stripe signs were present (Figure 2e–h). His bone age was 3–6 months when his chronological age was 23 months (Figure 2i). Follow-up at age 3 years, he had diffused osteopenia. Callus formation was observed on the left femur and metaphyses of left tibia and fibula. His bone age was 2 years (Figure 2j,k). His lumbar spine BMD was 0.194 g/cm^2 (*z*-score −0.3) at age 12 months, and 0.387 g/cm^2 (*z*-score −1.4) at age 36 months (Supplementary Table 1) Serum levels of calcium, phosphate, alkaline phosphatase, thyroid hormones, and insulin-like growth factor were within normal limits. He had triangular face, blue sclerae, and DGI. The teeth showed severe attrition and wide pulp chamber (Figure 2l–o).

3.2 | Mutation identification

The proband and his son were diagnosed with OI type IV. WES identified that both harbored two novel missense mutations, c.752C > T (p.Ser251Phe) (ClinVar accession number: SCV001244947) and c.758G > T (p.Gly253Val) (ClinVar accession number: SCV001244948), in exon 16 of the *COL1A2* gene (NM_000089) (Figure 3a–d). Both variants were not present in the databases including the NHLBI Exome Variant Server (EVS), Genome Aggregation Database (gnomAD), 1000 Genomes Project Consortium, and dbSNPs databases. Both *COL1A2* variants segregated in the affected individuals including the proband and his son. They were



FIGURE 1 Clinical and radiographic manifestations of the proband. (a–c) A 43-year-old Thai male with short stature and limb deformities. (d, f) Diffuse osteopenia in the humerus (d), radius and ulna (e), tibia and fibula (f). (g) Hyperlordotic alignment with multiple levels of compression fracture at the thoracic and lumbar spine level. (h) Wormian bones formation in the cranial suture (i) Yellowish opalescent teeth with severe attrition and anterior cross bite. (j) Panoramic radiograph showing bulbous tooth crowns, curved roots, and constriction of pulp canals

not detected in the proband's wife who was healthy. Furthermore, they were not present in 2,166 Thai controls including at least 1,000 healthy individuals. Using in silico analyses of variant pathogenicity, the p.Ser251Phe and p.Gly253Val were predicted to be damaging and the residues Ser251 and Gly253 were highly conserved. According to ACMG/AMP 2015 guideline (Richards et al., 2015), the p.Ser251Phe was predicted to be likely pathogenic (PM1, PM2, PP1, PP3) whereas the p.Gly253Val was predicted to be pathogenic (PS1, PS3, PM1, PM2, PP1, PP3). The p.Ser251Phe and p.Gly253Val were predicted to be damaging by SIFT (scores 0.004 and 0.00) (Ng & Henikoff, 2003) and M-CAP (scores 0.042 and 0.913) (Jagadeesh et al., 2016). The residue Ser251 and Gly253 were highly conserved among species including monkey, cattle, mouse, frog, and zebra fish (Figure 3e).

3.3 | Color, surface roughness, and mineral density

The permanent upper left second molar (DGI1) and the primary lower left first molar (DGI2) were obtained from the proband and proband's son, respectively (Figure 4a and Supplementary Figure 1). The colorimeter detected that the crown of DGI1 was darker, redder, and bluer than its controls and DGI2 was darker, redder, and yellower than its controls (Supplementary Table 2).

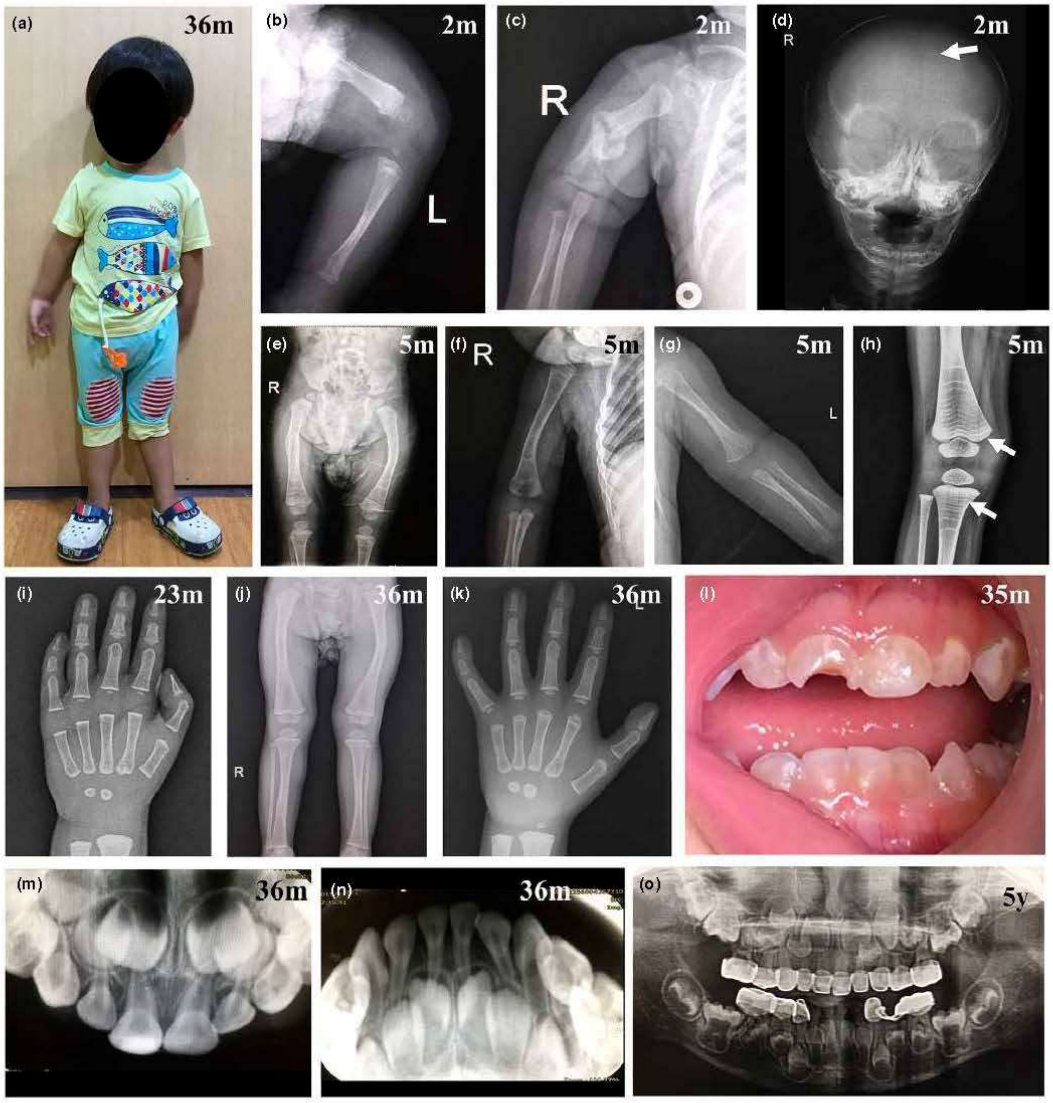


FIGURE 2 Clinical and radiographic manifestations of the proband's son. (a) A 3-year-old boy with triangular face and deformities of upper thighs. (b, c) Callus formation found in the left femur (b) and right humerus (c). (d) Diffuse osteopenia and wormian bones formation in lambdoid suture of the skull. (e, f) Abnormal curvature of both femurs (e) and right humerus (f). (g) Thin solid periosteal reaction on the left humeral shaft. (h) Zebra stripe sign of pamidronate therapy at the tibia and femur with callus formation at distal metaphyses. (i) Bone age around 3–6 months at chronological age of 23 months. (j) Abnormal curvature of femurs with evidence of callus formation and diffuse osteopenia. (k) Bone age of 24 months at chronological age of 36 months. (l) DGI teeth with severe attrition at age 35 months. (m, n) Radiographs showing wide pulp cavities of primary teeth at age 36 months. (o) Panoramic radiograph at age 5 years showing bulbous crown and wide pulp chamber of teeth. The primary upper anterior and posterior teeth were restored with stainless steel crowns. The chronological age of the patient is shown in the upper right corner

The color difference value (ΔE) between DGI1 and its controls was 10.55, and the ΔE between DGI2 and its controls was 11.86. Both ΔE values were above 8, which was considered distinctly perceivable by the human eyes (Yamanel et al., 2010). The surface roughness values of DGI1 and DGI2 were among their controls (Supplementary Figure 2). Micro-CT revealed that the density of

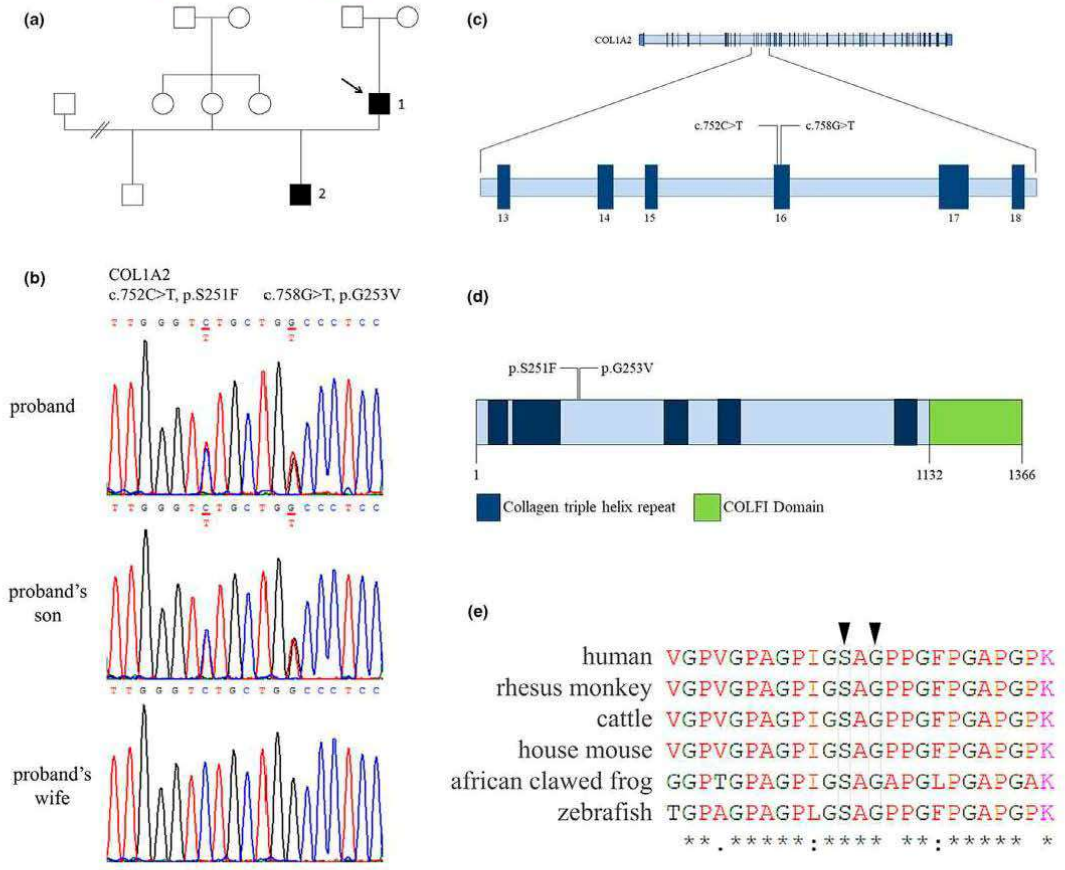


FIGURE 3 Pedigree of the family and mutation analyses (a) A diagram demonstrates two affected individuals in a non-consanguineous family. The affected patients are denoted in black and the proband is indicated by arrow. (b) Chromatograms of the family show two missense variants in the proband and his son. (c, d) The organization of *COL1A2* gene and structural domains of COL1A2 protein indicate the position of mutations. (e) Conservation of the p.Ser251 and p.Gly253 across species are indicated by black arrowheads

DGI1 (both dentin and enamel) was higher than its controls while the density of DGI2 (dentin and enamel) was among its control (Supplementary Table 3).

3.4 | Hardness and elastic modulus

The dentin hardness values of both DGI1 and DGI2 were significantly reduced compared to their controls values. DGI1 also showed a significant reduction in enamel hardness compared to its controls while the enamel hardness value of DGI2 was among its control (Figure 4b). Regarding the elastic modulus, a significant decrease was observed in the enamel of DGI1 and the enamel and dentin of DGI2, compared to controls. The elastic modulus of DGI1 dentin was comparable to its controls (Figure 4c).

3.5 | Changes in mineral composition

EDX showed that the calcium and phosphorus contents of DGI1 dentin were significantly decreased compared to its controls while those of DGI2 were comparable to its controls. Regarding to the enamel, the mineral contents of both DGI1 and DGI2 were not statistically different from those of their controls (Figure 4d,e).

3.6 | Altered tooth ultrastructure

Histologically, DGI1 and DGI2 dentin showed reduced dentinal tubules with non-circular cross section. Longitudinal histological sections showed irregular arrangement of their tubules. In

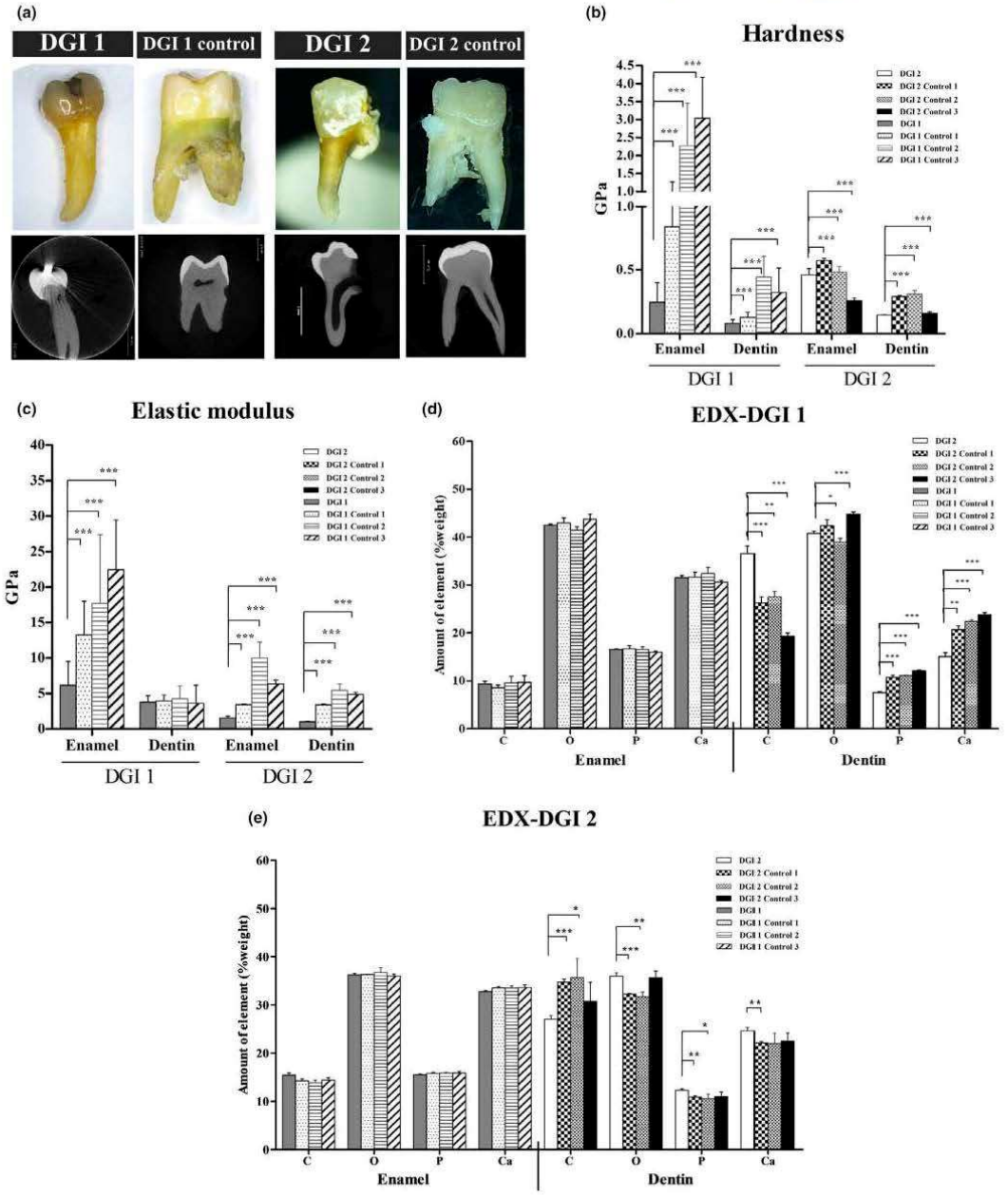


FIGURE 4 Tooth appearance and physical properties. (a) The images and micro-CT sections of the teeth obtained from the proband (DGI1) and his son (DGI2), compared with their control teeth. (b) The dentin hardness of DGI 1 and DGI2 was significantly lower than that of the controls. (c) The elastic modulus of DGI 1 (enamel) and DGI2 (enamel and dentin) was significantly lower than that of the controls. (d, e) The mineral contents of enamel of DGI teeth were not significantly different from their controls. The calcium and phosphorous contents of DGI1 dentin were significantly lower than those of the controls whereas the DGI2 dentin contained comparable calcium and phosphorous contents to its controls. *p value ≤ .05, **p value ≤ .01, ***p value ≤ .001

contrast, the dentinal tubules of the controls were circular and regularly distributed. Both DGI1 and DGI2 also showed less collagen fibers than the controls (Figure 5a–p). Moreover, the lacunae-like areas were noticeable in DGI2 dentin (Figure 5k,l). *SEM* also revealed that both DGI1 and DGI2 dentin had reduced number of tubules with variable diameters compared to their controls. In addition, rough peritubular and intertubular dentin consisting of ectopic calcified masses was observed in DGI teeth (Supplementary Figure 3a–d). The etched enamel of DGI teeth showed the prismatic structure comprising opened prism sheath, slight dissolution of prism core, and intact prism periphery, similar to their controls (Supplementary Figure 3e–h). The dentinoenamel junctions (DEJs) in both DGI1 and DGI2 were irregular compared to the organized interlinking junction in the controls (Supplementary Figure 3i–n).

4 | DISCUSSION

This study identified two Thai patients in a family who were affected with OI type IV and DGI. Both possessed two novel variants, c.752C > T (p.Ser251Phe) and c.758G > T (p.Gly253Val), in *COL1A2*. According to the ACMG/AMP guideline, both the p.Ser251Phe and p.Gly253Val were predicted to be likely pathogenic (Richards et al., 2015). In addition, many lines of evidence indicate the pathogenic and causative roles of the c.758G > T (p.Gly253Val) for OI. First, glycine substitutions were demonstrated to be causative of OI in a large number of cases worldwide (Budsamongkol et al., 2019; Hemwong et al., 2020; Marini et al., 2017; Udomchaiprasertkul et al., 2020). Second, the substitutions of glycine, the smallest amino acid, were shown to alter collagen structure and stability (Bhate et al., 2002; Shoulders &

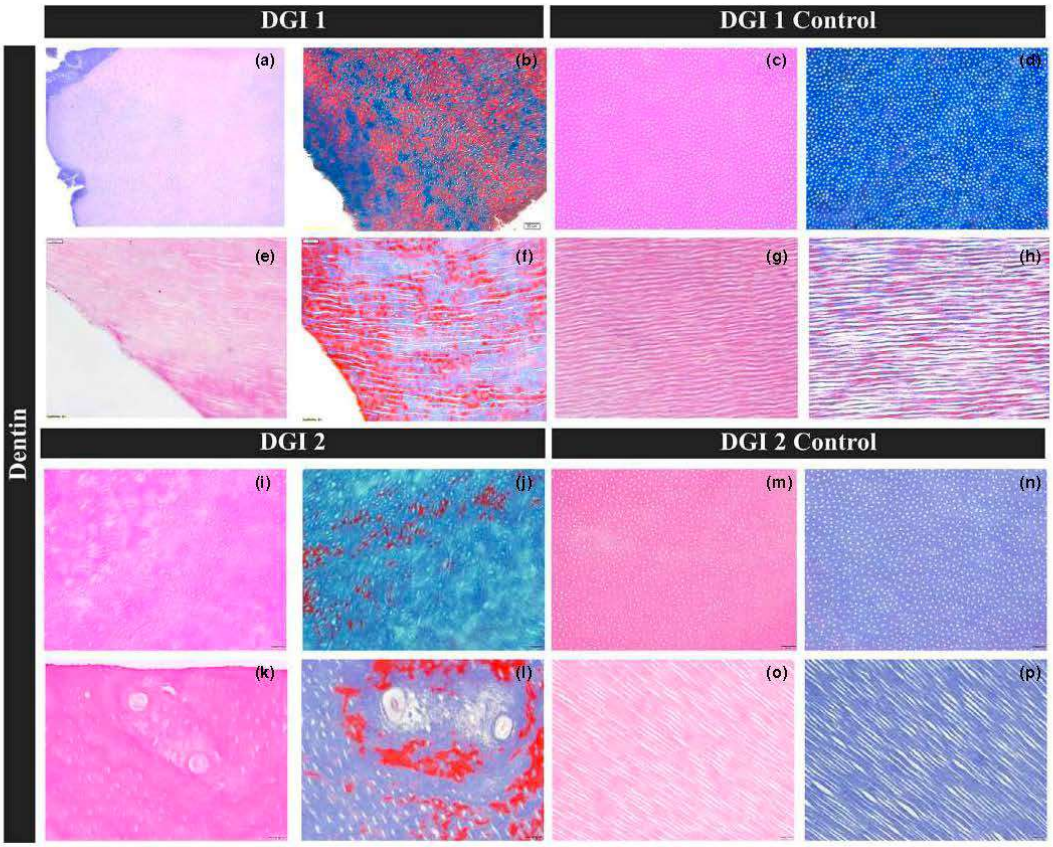


FIGURE 5 Histological analysis. Hematoxylin and eosin staining showed irregularity, reduction, and multidirection of dentinal tubules in the dentin of DGI1 and DGI2. Masson's Trichrome staining showed inconsistent distribution of collagen (blue) in DGI dentin. Lacunae-like areas were observed in DGI2 dentin. H&E staining (x40), a, c, e, g, i, k, m, o; Masson's Trichrome (x40), b, d, f, j, l, n, p; cross sections, a, b, e, f, i, j, m, n; longitudinal sections, c, d, g, h, k, l, o, p

Raines, 2009) and the substitution of valine for glycine, in particular, was shown to undermine cross-linking of tropocollagens to form fibrils (Gautieri et al., 2009). Third, glycine substitution at the position p.Gly253, c.758G > A (p.Gly253Asp), was reported in a patient with OI (Pollitt et al., 2006). However, the pathogenic and causative role of the c.752C > T (p.Ser251Phe) for OI is not as strong as the c.758G > T (p.Gly253Val). More than 300 mutations in *COL1A2* have been identified to cause OI. Of those, only one serine substitution, c.2740A > G (p.Ser914Gly) related to OI type I is reported in the database (www.oi.gene.le.ac.uk). Although several lines of evidence suggest that the p.Ser251Phe is less pathogenic than p.Gly253Val, further studies are required to definitely conclude its pathogenicity and causality.

The distribution of glycine mutations along *COL1A2* has been associated with the phenotypes and severity of OI (Ben Amor et al., 2011; Tongkobpetch et al., 2017). Clinical features and genetic mutations of the proband and his son indicate the diagnosis of OI type IV. It has been shown that mutations in *COL1A2* are predominantly related to the non-lethal phenotype (Marini et al., 2007) and associated with OI type IV more often than Type I and III (Lin et al., 2015). Within the *COL1A2* gene, helical mutations usually lead to more severe bone phenotypes such as shorter height, lower BMD, or more disproportionate body, compared to non-helical mutations (Ben Amor et al., 2011; Liu et al., 2017; Rauch et al., 2010). In addition, the prevalence of DGI has been shown to increase when mutations occur in the C-terminal location to the p.Gly211 in the α2-chain (Lindahl et al., 2015; Maioli et al., 2019; Rauch et al., 2010). Collagen type I is a major component of extracellular matrix in dentin. Mutations of *COL1* have been shown to alter collagen structure and stability and impair function of odontoblasts (Hall et al., 2002; Shoulders & Raines, 2009). These could lead to the production of dysplastic dentin, irregular pattern and reduced number of dentinal tubules, and abnormal DEJ (Ibrahim et al., 2019; Kamasaki et al., 2019; Majorana et al., 2010). In this study, the proband and his son had short stature, low BMD, DGI, and *COL1A2* mutation. Their phenotype and genotype are in lines with previous reports.

Regarding to tooth color, both DGI1 and DGI2 showed a decrease in lightness and increase in red chroma reflecting opalescent appearance of DGI teeth. DGI1 appeared bluish while DGI2 appeared yellowish compared to their controls. Consistently, the primary tooth affected with DGI caused by *DSPP* mutation also showed an increase in red and yellow color tones (Porntaveetus, Osathanon, et al., 2018).

The hardness of DGI1 and DGI2 enamel was lower than their controls whereas their mineral contents were comparable to their controls. Similar to the enamel, the hardness of DGI1 and DGI2 dentin was significantly lower than that of their controls. DGI1 dentin showed a decrease in calcium and phosphorus contents compared with controls whereas those of DGI2 dentin were not declined. Physiologically, the chemical composition between the primary tooth and the permanent tooth is different. In addition, the calcium and phosphorus contents may be related to the age. In the enamel, calcium and phosphorus contents were significantly higher in the old age group than those in the young (He et al., 2011) while these correlations were not observed in the dentin (Fernández-Escudero et al., 2020). Previous studies reported that pulp chambers and root canals of DGI teeth were initially abnormally large and progressively obliterated due to irregular dentin deposition (Acevedo et al., 2009; Taleb et al., 2018). Consistently, DGI1, permanent tooth of the proband age 43, showed partially obliterated pulp cavities whereas DGI2, primary tooth of the proband son age 3, showed wide pulp cavity. In addition, the lacunae-like areas were observed in DGI2 dentin. These suggest that the difference in set of teeth, age, and dentin ultrastructure could cause the difference between DGI1 and DGI2.

Enamel surface roughness values of DGI1 and DGI2 were among their controls, indicating that enamel surface of DGI teeth was unlikely to be deviated. Interestingly, we observed a significant reduction in hardness and elastic modulus of DGI1 enamel. Even though the pathology of DGI is expected occur in the dentin, the enamel-dentin formation requires reciprocal interactions of genes and signaling. In addition, the undermined dentin could cause negative impact on enamel physical properties. It was reported that the patients with OI/DGI had severe attrition and fracture of enamel (Majorana et al., 2010). Moreover, Wieczorek & Loster, 2013 demonstrated the abnormal enamel prismatic structure in DGI teeth and suggested that enamel was subject to severe attrition during mastication (Wieczorek & Loster, 2013). In this study, the ultrastructure and mineral content of DGIs' enamel were similar to controls. This implies that underlying dentin defects could contribute to the weakness of DGI enamel.

The ultrastructural investigations in the present study indicate severe pathologic change of DGI dentin. The dentinal tubules were reduced, scattered, irregular in arrangement, and variable in diameter. The collagen fibers were decreased in DGIs. These are consistent with previous reports (Hall et al., 2002; Ibrahim et al., 2019; Lindau et al., 1999; Lygidakis et al., 1996). The lacunae-like structure was also found in DGI2 dentin. In addition, the DEJs of both DGI1 and DGI1 were irregular compared to the proper interlinking line in the controls. It was suggested that a typical scallop nature of DEJ conferred a biomechanical advantage to the integrity of the tooth during mastication (Shimizu & Macho, 2007). We speculate that the irregular DEJs of DGI teeth could contribute to weak connection between enamel and dentin, making them prone to fracture.

Due to abnormal dentin and DEJ structures, DGI teeth showed the increased risk of tooth fracture, restoration failure, and periapical infection (Gallusi et al., 2006; Seow, 2003). The penetration of dental adhesives to create hybrid layer is an important factor for successful restoration of tooth-colored filling material (Nakabayashi et al., 1991). Disorganization and reduction in the number and size of dentinal tubules in DGI teeth could jeopardize the effective bonding between resin adhesives and the dentin, resulting in a consecutive failure of restorations. Abnormal dentin structure could also increase the risk of periapical lesion (Porntaveetus, Nowwarote, et al., 2018). Therefore, close monitoring of DGI patients should be implemented.

To conclude, this study demonstrated two patients affected with OI type IV and DGI. Two novel variants in *COL1A2* were identified. The DGI teeth were dark, weak, and contained abnormal dentinal

tubules and DEJ. Last but not least, this study expands phenotypic and genotypic spectra of *COL1A2* mutations.

ACKNOWLEDGEMENTS

NI was supported by Ratchadapisek Somphot Fund for Postdoctoral Fellowship, Chulalongkorn University. This project is funded by National Research Council of Thailand, Global Partnership CU-C16F630029, Health Systems Research Institute, and Thailand Research Fund (MRG6280001, DPG6180001).

CONFLICT OF INTEREST

None to declare.

AUTHOR CONTRIBUTION

Narin Intarak: Investigation; Writing-original draft. **Thunyaporn Budsamongkol:** Investigation; Writing-review & editing. **Thanakorn Theerapanon:** Data curation; Formal analysis; Writing-review & editing. **Theerapat Chanamuangkon:** Methodology; Writing-review & editing. **Anucharte Srijunbarl:** Investigation; Writing-review & editing. **Lawan Boonprakong:** Investigation; Methodology; Writing-review & editing. **Thantrira Porntaveetus:** Conceptualization; Data curation; Supervision; Writing-original draft; Writing-review & editing. **Vorasuk Shotelersuk:** Conceptualization; Resources; Visualization; Writing-review & editing.

PEER REVIEW

The peer review history for this article is available at https://publons.com/publon/10.1111/odi.13657.

ORCID

Narin Intarak https://orcid.org/0000-0001-7504-1403
Thunyaporn Budsamongkol https://orcid.org/0000-0003-1962-2793
Thanakorn Theerapanon https://orcid.org/0000-0001-6727-862X
Theerapat Chanamuangkon https://orcid.org/0000-0003-0293-765X
Anucharte Srijunbarl https://orcid.org/0000-0002-9199-9651
Lawan Boonprakong https://orcid.org/0000-0002-5622-8691
Thantrira Porntaveetus https://orcid.org/0000-0003-0145-9801
Vorasuk Shotelersuk https://orcid.org/0000-0002-1856-0589

REFERENCES

Acevedo, A. C., Santos, L. J. S., Paula, L. M., Dong, J., & MacDougall, M. (2009). Phenotype characterization and DSPP mutational analysis of three Brazilian dentinogenesis imperfecta type II families. *Cells Tissues Organs*, *189*(1–4), 230–236. https://doi.org/10.1159/000152917

Alghazali, N., Burnside, G., Moallem, M., Smith, P., Preston, A., & Jarad, F. D. (2012). Assessment of perceptibility and acceptability of color difference of denture teeth. *Journal of Dentistry*, *40*(Suppl 1), e10–e17. https://doi.org/10.1016/j.jdent.2012.04.023

Ben Amor, I. M., Glorieux, F. H., & Rauch, F. (2011). Genotype-phenotype correlations in autosomal dominant osteogenesis imperfecta. *Journal of Osteoporosis*, *2011*, 540178. https://doi.org/10.4061/2011/540178

Bhate, M., Wang, X., Baum, J., & Brodsky, B. (2002). Folding and conformational consequences of glycine to alanine replacements at different positions in a collagen model peptide. *Biochemistry*, *41*(20), 6539–6547. https://doi.org/10.1021/bi020070d

Budsamongkol, T., Intarak, N., Theerapanon, T., Yodsanga, S., Porntaveetus, T., & Shotelersuk, V. (2019). A novel mutation in COL1A2 leads to osteogenesis imperfecta/Ehlers-Danlos overlap syndrome with brachydactyly. *Genes and Disease*, *6*(2), 138–146. https://doi.org/10.1016/j.gendis.2019.03.001

Fernández-Escudero, A. C., Legaz, I., Prieto-Bonete, G., López-Nicolás, M., Maurandi-López, A., & Pérez-Cárceles, M. D. (2020). Aging and trace elements in human coronal tooth dentine. *Scientific Reports*, *10*(1), 9964. https://doi.org/10.1038/s41598-020-66472-1

Gallusi, G., Libonati, A., & Campanella, V. (2006). SEM-morphology in dentinogenesis imperfecta type II: Microscopic anatomy and efficacy of a dentine bonding system. *European Journal of Paediatric Dentistry*, *7*(1), 9–17.

Gautieri, A., Uzel, S., Vesentini, S., Redaelli, A., & Buehler, M. J. (2009). Molecular and mesoscale mechanisms of osteogenesis imperfecta disease in collagen fibrils. *Biophysical Journal*, *97*(3), 857–865. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.04.059

Hall, R. K., Maniere, M. C., Palamara, J., & Hemmerle, J. (2002). Odontoblast dysfunction in osteogenesis imperfecta: An LM, SEM, and ultrastructural study. *Connective Tissue Research*, *43*(2–3), 401–405. https://doi.org/10.1080/03008200290001005

He, B., Huang, S., Zhang, C., Jing, J., Hao, Y., Xiao, L., & Zhou, X. (2011). Mineral densities and elemental content in different layers of healthy human enamel with varying teeth age. *Archives of Oral Biology*, *56*(10), 997–1004. https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.02.015

Hemwong, N., Phokaew, C., Srichomthong, C., Tongkobpetch, S., Srilanchakon, K., Supornsilchai, V., Suphapeetiporn, K., Porntaveetus, T., & Shotelersuk, V. (2020). A patient with combined pituitary hormone deficiency and osteogenesis imperfecta associated with mutations in LHX4 and COL1A2. *Journal of Advanced Research*, *21*, 121–127. https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.10.006

Ibrahim, S., Strange, A. P., Aguayo, S., Shinawi, A., Harith, N., Mohamed-Ibrahim, N., & Bozec, L. (2019). Phenotypic properties of collagen in dentinogenesis imperfecta associated with osteogenesis imperfecta. *International Journal of Nanomedicine*, *14*, 9423–9435. https://doi.org/10.2147/IJN.S217420

Jagadeesh, K. A., Wenger, A. M., Berger, M. J., Guturu, H., Stenson, P. D., Cooper, D. N., Bernstein, J. A., & Bejerano, G. (2016). M-CAP eliminates a majority of variants of uncertain significance in clinical exomes at high sensitivity. *Nature Genetics*, *48*(12), 1581–1586. https://doi.org/10.1038/ng.3703

Kamasaki, Y., Imamura, K., Nishimata, H., Nishiguchi, M., & Fujiwara, T. (2019). Study of enamel and dentin in primary teeth with dentinogenesis imperfecta type I: A case report. *Journal of Dental Research and Reports*, *2*, 1–4. https://doi.org/10.15761/JDRR.1000110

Li, Q., & Wang, K. (2017). InterVar: Clinical interpretation of genetic variants by the 2015 ACMG-AMP guidelines. *American Journal of Medical Genetics*, *100*(2), 267–280. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.01.004

Lin, H. Y., Chuang, C. K., Su, Y. N., Chen, M. R., Chiu, H. C., Niu, D. M., & Lin, S. P. (2015). Genotype and phenotype analysis of Taiwanese patients with osteogenesis imperfecta. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, *10*, 152. https://doi.org/10.1186/s13023-015-0370-2

Lindahl, K., Astrom, E., Rubin, C. J., Grigelioniene, G., Malmgren, B., Ljunggren, O., & Kindmark, A. (2015). Genetic epidemiology, prevalence, and genotype-phenotype correlations in the Swedish population with osteogenesis imperfecta. *European Journal of Human Genetics*, *23*(8), 1042–1050. https://doi.org/10.1038/ejhg.2015.81

Lindau, B. M., Dietz, W., Hoyer, I., Lundgren, T., Storhaug, K., & Noren, J. G. (1999). Morphology of dental enamel and

dentine–enamel junction in osteogenesis imperfecta. *International Journal of Paediatric Dentistry*, *9*(1), 13–21. https://doi.org/10.1046/j.1365-263x.1999.00101.x

Lindert, U., Cabral, W. A., Ausavarat, S., Tongkobpetch, S., Ludin, K., Barnes, A. M., Yeetong, P., Weis, M., Krabichler, B., Srichomthong, C., Makareeva, E. N., Janecke, A. R., Leikin, S., Röthlisberger, B., Rohrbach, M., Kennerknecht, I., Eyre, D. R., Suphapeetiporn, K., Giunta, C., … Shotelersuk, V. (2016). MBTPS2 mutations cause defective regulated intramembrane proteolysis in X-linked osteogenesis imperfecta. *Nature Communications*, *7*, 11920. https://doi.org/10.1038/ncomms11920

Liu, Y., Asan, Ma, D., Lv, F., Xu, X., Wang, J., Xia, W., Jiang, Y., Wang, O., Xing, X., Yu, W., Wang, J., Sun, J., Song, L., Zhu, Y., Yang, H., Wang, J., & Li, M. (2017). Gene mutation spectrum and genotype-phenotype correlation in a cohort of Chinese osteogenesis imperfecta patients revealed by targeted next generation sequencing. *Osteoporosis International*, *28*(10), 2985–2995. https://doi.org/10.1007/s00198-017-4143-8

Lygidakis, N. A., Smith, R., & Oulis, C. J. (1996). Scanning electron microscopy of teeth in osteogenesis imperfecta type I. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, *81*(5), 567–572. https://doi.org/10.1016/S1079-2104(96)80048-5

Maioli, M., Gnoli, M., Boarini, M., Tremosini, M., Zambrano, A., Pedrini, E., Mordenti, M., Corsini, S., D'Eufemia, P., Versacci, P., Celli, M., & Sangiorgi, L. (2019). Genotype-phenotype correlation study in 364 osteogenesis imperfecta Italian patients. *European Journal of Medical Genetics*, *27*(7), 1090–1100. https://doi.org/10.1038/s41431-019-0373-x

Majorana, A., Bardellini, E., Brunelli, P. C., Lacaita, M., Cazzolla, A. P., & Favia, G. (2010). Dentinogenesis imperfecta in children with osteogenesis imperfecta: A clinical and ultrastructural study. *International Journal of Paediatric Dentistry*, *20*(2), 112–118. https://doi.org/10.1111/j.1365-263X.2010.01033.x

Marini, J. C., Forlino, A., Bächinger, H. P., Bishop, N. J., Byers, P. H., Paepe, A. D., Fassier, F., Fratzl-Zelman, N., Kozloff, K. M., Krakow, D., Montpetit, K., & Semler, O. (2017). Osteogenesis imperfecta. *Nature Reviews Disease Primers*, *3*, 17052. https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.52

Marini, J. C., Forlino, A., Cabral, W. A., Barnes, A. M., San Antonio, J. D., Milgrom, S., Hyland, J. C., Körkkö, J., Prockop, D. J., De Paepe, A., Coucke, P., Symoens, S., Glorieux, F. H., Roughley, P. J., Lund, A. M., Kuurila-Svahn, K., Hartikka, H., Cohn, D. H., Krakow, D., … Byers, P. H. (2007). Consortium for osteogenesis imperfecta mutations in the helical domain of type I collagen: Regions rich in lethal mutations align with collagen binding sites for integrins and proteoglycans. *Human Mutation*, *28*(3), 209–221. https://doi.org/10.1002/humu.20429

Nakabayashi, N., Nakamura, M., & Yasuda, N. (1991). Hybrid layer as a dentin-bonding mechanism. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*, *3*(4), 133–138. https://doi.org/10.1111/j.1708-8240.1991.tb00985.x

Ng, P. C., & Henikoff, S. (2003). SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Research*, *31*(13), 3812–3814. https://doi.org/10.1093/nar/gkg509

O'Connell, A. C., & Marini, J. C. (1999). Evaluation of oral problems in an osteogenesis imperfecta population. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, *87*(2), 189–196. https://doi.org/10.1016/S1079-2104(99)70272-6

Pollitt, R., McMahon, R., Nunn, J., Bamford, R., Afifi, A., Bishop, N., & Dalton, A. (2006). Mutation analysis of COL1A1 and COL1A2 in patients diagnosed with osteogenesis imperfecta type I-IV. *Human Mutation*, *27*(7), 716. https://doi.org/10.1002/humu.9430

Porntaveetus, T., Nowwarote, N., Osathanon, T., Theerapanon, T., Pavasant, P., Boonprakong, L., Sanon, K., Srisawasdi, S., Suphapeetiporn, K., & Shotelersuk, V. (2018). Compromised alveolar bone cells in a patient with dentinogenesis imperfecta caused by DSPP mutation. *Clinical Oral Investigations*, *23*(1), 303–313. https://doi.org/10.1007/s00784-018-2437-7

Porntaveetus, T., Osathanon, T., Nowwarote, N., Pavasant, P., Srichomthong, C., Suphapeetiporn, K., & Shotelersuk, V. (2018). Dental properties, ultrastructure, and pulp cells associated with a novel DSPP mutation. *Oral Diseases*, *24*(4), 619–627. https://doi.org/10.1111/odi.12801

Rauch, F., Lalic, L., Roughley, P., & Glorieux, F. H. (2010). Genotype-phenotype correlations in nonlethal osteogenesis imperfecta caused by mutations in the helical domain of collagen type I. *European Jounral of Human Genetics*, *18*(6), 642–647. https://doi.org/10.1038/ejhg.2009.242

Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W. W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., & Rehm, H. L. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medice*, *17*(5), 405–424. https://doi.org/10.1038/gim.2015.30

Seow, W. K. (2003). Diagnosis and management of unusual dental abscesses in children. *Australian Dental Journal*, *48*(3), 156–168. https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2003.tb00026.x

Shimizu, D., & Macho, G. A. (2007). Functional significance of the microstructural detail of the primate dentino-enamel junction: A possible example of exaptation. *Journal of Human Evolution*, *52*(1), 103–111. https://doi.org/10.1016/j.jhevol.2006.08.004

Shoulders, M. D., & Raines, R. T. (2009). Collagen structure and stability. *Annual Review of Biochemistry*, *78*(1), 929–958. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833

Sillence, D. O., Senn, A., & Danks, D. M. (1979). Genetic heterogeneity in osteogenesis imperfecta. *Journal of Medical Genetics*, *16*(2), 101–116. https://doi.org/10.1136/jmg.16.2.101

Taleb, K., Lauridsen, E., Daugaard-Jensen, J., Nieminen, P., & Kreiborg, S. (2018). Dentinogenesis imperfecta type II- genotype and phenotype analyses in three Danish families. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, *6*(3), 339–349. https://doi.org/10.1002/mgg3.375

Tongkobpetch, S., Limpaphayom, N., Sangsin, A., Porntaveetus, T., Suphapeetiporn, K., & Shotelersuk, V. (2017). A novel de novo COL1A1 mutation in a Thai boy with osteogenesis imperfecta born to consanguineous parents. *Genetics and Molecular Biology*, *40*(4), 763–767. https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2016-0033

Udomchaiprasertkul, W., Kuptanon, C., Porntaveetus, T., & Shotelersuk, V. (2020). A family with homozygous and heterozygous p.Gly337Ser mutations in COL1A2. *European Journal of Medical Genetics*, *63*(6), 103896. https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2020.103896

Wieczorek, A., & Loster, J. (2013). Dentinogenesis imperfecta type II: Ultrastructure of teeth in sagittal sections. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, *51*(3), 244–247. https://doi.org/10.5603/FHC.2013.0035

Yamanel, K., Caglar, A., Ozcan, M., Gulsah, K., & Bagis, B. (2010). Assessment of color parameters of composite resin shade guides using digital imaging versus colorimeter. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*, *22*(6), 379–388. https://doi.org/10.1111/j.1708-8240.2010.00370.x

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

How to cite this article: Intarak N, Budsamongkol T, Theerapanon T, et al. Tooth ultrastructure of a novel *COL1A2* mutation expanding its genotypic and phenotypic spectra. *Oral Dis*. 2020;00:1–11. https://doi.org/10.1111/odi.13657

Caengprasath et al. J Transl Med (2021) 19:114
https://doi.org/10.1186/s12967-021-02779-5

Journal of Translational Medicine

REVIEW Open Access

MBTPS2, a membrane bound protease, underlying several distinct skin and bone disorders

Natarin Caengprasath[1,2], Thanakorn Theerapanon[3], Thantrira Porntaveetus[3*] and Vorasuk Shotelersuk[1,2]

Abstract

The *MBTPS2* gene on the X-chromosome encodes the membrane-bound transcription factor protease, site-2 (MBTPS2) or site-2 protease (S2P) which cleaves and activates several signaling and regulatory proteins from the membrane. The MBTPS2 is critical for a myriad of cellular processes, ranging from the regulation of cholesterol homeostasis to unfolded protein responses. While its functional role has become much clearer in the recent years, how mutations in the *MBTPS2* gene lead to several human disorders with different phenotypes including Ichthyosis Follicularis, Atrichia and Photophobia syndrome (IFAP) with or without BRESHECK syndrome, Keratosis Follicularis Spinulosa Decalvans (KFSD), Olmsted syndrome, and Osteogenesis Imperfecta type XIX remains obscure. This review presents the biological role of MBTPS2 in development, summarizes its mutations and implicated disorders, and discusses outstanding unanswered questions.

Keywords: BRESHECK, KFSD, IFAP, Olmsted syndrome, Osteogenesis imperfecta, S2P

Introduction

The Membrane-Bound Transcription factor Protease, Site-2 gene (*MBTPS2*) on the X-chromosome encodes site-2 protease (S2P) which is an integral membrane protein that plays vital roles in regulating membrane-tethered transcriptional factors. It is ubiquitously expressed within the Golgi membrane where it functions sequentially with site-1 protease (S1P), encoded by the membrane-bound transcription factor protease, site-1 (MBTPS1), to proteolytically activate membrane-tethered latent transcription factors. This mechanism is known as regulated intramembrane proteolysis (RIP).

RIP is a tightly organized process that is critical for cellular signal transductions and the regulation of diverse processes, such as cellular division and differentiation, cell migration, transcriptional regulation, apoptosis, cellular stress responses, degradation of transmembrane protein fragments, and lipid metabolism as well as a plethora of physiological processes including embryonic development and normal functioning of the nervous and immune system [1]. Disruption or deregulation of RIP have been implicated in the pathogenesis of several diseases such as cancer, Alzheimer's disease, and developmental disorders [2–4].

RIP generally employs a two-step sequential cleavage process (Fig. 1). The first cleavage, either constitutively or in response to cell stimuli, cleaves a membrane protein substrate close to or within its transmembrane (TM), resulting in the release of the soluble extracellular domain (ectodomain) from the membrane and a fragment containing one or more functional domains remains bound to the membrane [5]. The remaining membrane-embedded fragment is then recognized by a second protease and is cleaved within the TM region, liberating the fragment into the cytoplasm. Following its

*Correspondence: thantrira.p@chula.ac.th
[3] Genomics and Precision Dentistry Research Unit, Department of Physiology, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand
Full list of author information is available at the end of the article

© The Author(s) 2021. This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

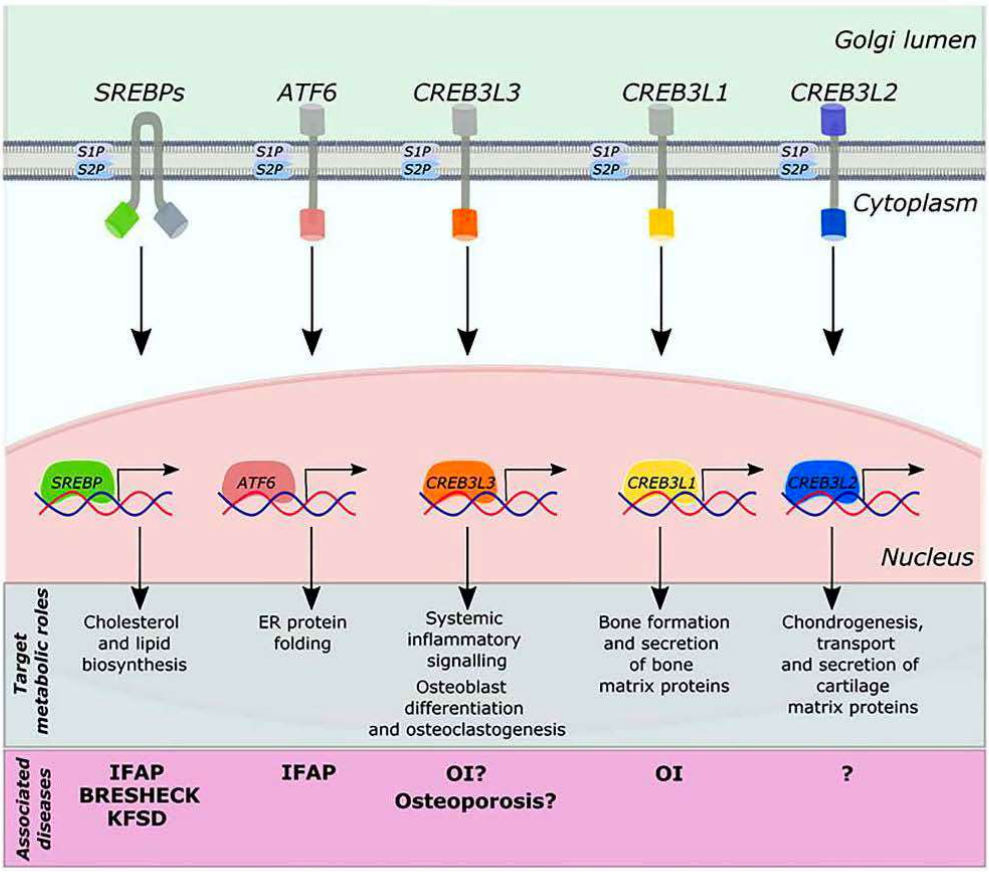


Fig. 1 Schematic illustration of S1P and S2P mediated RIP. Following stimulation, substrates are translocated from the ER to Golgi. At the Golgi, they are cleaved by S1P and then by S2P, liberating their N-terminal domains from the membrane to activate genes in the nucleus and thereby initiating signaling pathways involved in lipid metabolism, protein folding, osteogenesis, inflammatory signaling, osteoclastogenesis, chondrogenesis, and secretion of extracellular matrix proteins. Impairments of S2P lead to IFAP syndrome with or without BRESHECK, KFSD, OS and OI

release, the fragment is either translocated to the nucleus where it functions as a transcription regulator [2] or acts as an activator of different signaling pathways [6].

The second intramembrane cut, that releases the membrane bound fragments into the cytosol is carried out by one of the four distinct and evolutionarily conserved proteases named intramembrane cleaving proteases (I-CLiPs): the aspartyl protease-like, the zinc metalloproteinase S2P, the serine protease family of rhomboids, and the glutamatergic intramembrane proteases [7]. Among the four I-CLiPs, the S2P was the first to be discovered with a role involved in the feedback regulation of sterol and fatty acid biosynthesis and uptake by controlling the activity of the membrane-bound transcription factors sterol regulator element binding proteins (SREBPs) [8–10]. Subsequently, additional transcriptional factors were identified for other pathways such as activating transcription factor 6 (ATF6) [11] and cyclic AMP-responsive element-binding protein 3-like protein 3 (CREB3L3) [12]. Of late, newer roles have been attributed to *MBTPS2* (MIM #300,294), not only for the transcription factors that it processes but also for its involvement in unexpected pathways that are critical for diverse biological process,

such as ER stress, unfolded protein response, and gluconeogenesis [13]. Accordingly, MBTPS2 contributes to the pathogenesis of several X-linked disorders.

In this review, we focus on MBTPS2 and provide an update overview of the current understanding of how MBTPS2 contributes to a range of functions in maintaining cellular integrity and examine diseases caused by *MBTPS2* mutations. We highlight the role of MBTPS2 in skin disorders and X-linked recessive form of osteogenesis imperfecta (X-OI), as these pathological states provide good examples of the diversified functions and their dysfunction in diseases.

Substrates cleaved by S2P

Discovery of S2P and the identification of SREBPs as its first substrates

The landmark discovery of the human zinc metalloproteinase S2P in 1997 as a critical component of the processing machinery in cleaving TM precursor proteins has transformed our conceptual molecular understanding of the regulation of fundamental cellular processes carried out via RIP. Somewhat serendipitous, S2P was discovered through a series of independent studies that deciphered the SREBP pathway to understand the global regulation of cholesterol homeostasis in mammalian cells [8, 10]. In fact, the requirement of proteolysis of SREBPs (SREBP-1 and SREBP-2) to maintain cholesterol homeostasis was well-understood prior to the discovery of S2P [14]. However, it was not until the seminal observation that for SREBPs to fulfill its role in cholesterol homeostasis, they must undergo a two-step proteolytic cascade, owing to the distinctive protein structure of the SREBPs [8].

Dissimilar to other transcriptional factors, SREBPs are translated as inactive precursors anchored to the ER membrane. The SREBP precursor proteins, approximately 1,150 amino acids in length, are composed of three domains. The amino (NH_2)-terminal DNA-binding domain is a basic-helix-loop-helix-leucine zipper (bHLHL-Zip) family of transcription factors. The middle domain is a helical hairpin membrane anchor, with two TM helices separated by a short loop that projects into the lumen of the ER and nuclear envelope. The carboxy (COOH)-terminal, which also projects in the cytosol, functions as the regulatory domain [15, 16]. In response to sterol deprivation, precursor SREBPs are transported from the ER membrane to the Golgi where it is cleaved by two site-specific proteases. The first protease cleaves the precursor SREBP proteins at site 1, a conserved leucine residue within the luminal loop, separating the SREBPs into two halves but the bHLHL-Zip domain remains bound to the membrane. Following this, a second protease, cleaves the NH_2-terminal intermediate domain at site 2, a site within the transmembrane helix, to release the bHLHL-Zip domain from the membrane. The bHLHL-Zip domain is then translocated to the nucleus to initiate the transcription of genes encoding enzymes involved in the biosynthesis and uptake of cholesterol, fatty acids, and triglyceride (Fig. 1). The initial proteolytic cleavage is regulated by sterol levels whereas the cleavage occurring at site 2 is not, however, cleavage at site 2 can only occur following the site 1 cleavage [8].

The characterization and appreciation of the vital role that these cleavage machineries serve in the feedback regulatory system of cholesterol synthesis and uptake warranted studies to identify these proteases. Grasping this opportunity was the Rawson lab who conducted pioneering work in isolating the *MBTPS2* gene. By utilizing two previously established cell lines, the M19 mutagenized Chinese hamster ovary (CHO) that is auxotrophic for cholesterol due to a defect in carrying out the site-2 cleavage to release the bHLHL-Zip domain of SREBPs from the membranes, and the HfT1M19(c) CHO that is a revertant cell line of the M19 CHO, as a recipient for complementation cloning, the *S2P* was isolated and characterized [10, 17]. The HfT1M19(c) CHO was transfected into the M19 CHO cells to generate complemented cells. This was repeated three times to eliminate extraneous human DNA and resulted in prototrophs that retained only a minute amount of human DNA with the rescue gene. Analysis of this gene revealed a protein of 519 amino acids whose sequence had a His-Glu-x-x-His (HExxH) motif which is a characteristic of zinc metalloproteases. Substitution of either of the two histidine residues or the glutamic acid blocked the site-2 cleavage of SREBPs, thus this protein was designated as S2P (site-2 protease) [10]. Further studies then revealed an additional motif, Leu-Asp-Gly (LDG), located ~300 residues from the HExxH sequence that is equally essential for S2P activity [18].

The proteolytic function of S2P is further supported from the discovery of a family of related proteins in bacteria. These proteins are vital for the proteolysis of membrane-bound transcription factor needed for sporulation. For instance, the σ^k factor regulates gene expression in the mother cell after engulfment of the forespore. Cleavage of pro-σ^k and liberation of transcription factor require the membrane protein SpoIVFB, which this protein contains the HExxH motif [19]. In another bacterial S2P family member, YaeL in Escherichia coli, also harbors a HExxH motif that is essential for coordinating cell growth and cell division via intramembrane proteolysis of RseA, a factor activated in response to extracytoplasmic stress [20]. These studies have not only commenced a greater understanding of this protease but also has

expanded the role of S2P beyond its proteolytic property to much broader roles.

Activation transcription factor 6 (ATF6)

ATF6 activates the transcription of genes in response to the accumulation of unfolded or misfolded proteins in the ER [21]. As a type II ER TM protein, ATF6 contains a basic leucine zipper (bZip) domain at its NH_2-terminal cytosolic domain, and a stress-sensing domain in the ER lumen [22]. Under resting conditions, ATF6 is retained in the ER through its association with the ER protein chaperone, BiP/GRP78 [23]. Upon accumulation of unfolded or misfolded proteins in the ER, ATF6 dissociates from BiP and migrates to the Golgi, where it is subjected to the sequential action of S1P and S2P, in a similar fashion to SREBPs [11]. The cleaved ATF6 cytosolic domain then migrates to the nucleus and induces the transcription of target genes, which encode ER stress proteins such as GRP78/BiP and XBP1 [24] (Fig. 1). Though ATF6 is widely known for its role in ER stress, there has also been reports of novel functions for ATF6 involving organogenesis and tissue homeostasis [25–27].

Cyclic-AMP responsive element-binding protein 3 (CREB3)

The CREB3 family of transcription factors consist of five members—CREB3, CREB3L1, CREB3L2, CREB3L3, and CREB3L4. Like SREBPs and ATF6, all members of this family harbor a single TM helix with an NH_2-terminal cytosolic domain resembling a transcription factor of the bZIP family and undergo proteolytic cleavage by S1P and S2P. They have been reported to have major roles in development, however, other roles have been identified such as metabolism, secretion of signaling proteins, cell survival, differentiation and division, and tumorigenesis.

CREB3 or Luman was first within its family to be identified as an ER-bound transcription factor as a counterpart of the herpes simplex virus transcriptional activator VP16 that binds to the host cell factor regulator [28, 29]. It is now well recognized to be involved in ER stress and unfolded protein responses as well as having regulatory roles in a multitude of processes related to the maturation of dendritic cells [30], Golgi stress [31], signaling of the glucocorticoid receptor [32], migration and function of leukocytes [33, 34], and metastatic progression of breast cancer [35]. Following stimulation, CREB3 is transported to the Golgi to be sequentially cleaved by S1P and S2P. The released NH_2-terminal fragment relocates to the nucleus to activate target transcription genes and proteins such as cAMP response element (CRE), ER stress response element II, and unfolded protein response element [36, 37]. The activation leads to a transient translational attenuation, a transcription initiation of ER-resident chaperone folding capacity, and degradation of accumulated unfolded proteins in the ER, preventing cellular damage and apoptotic cell death [36] (Fig. 1).

CREB3L1, originally known as OASIS, plays a critical role in bone development. In response to bone morphogenetic protein-2 (BMP-2), a cytokine required for bone formation and osteoblast differentiation, CREB3L1 is cleaved sequentially by S1P and S2P [38, 39]. The cleaved NH_2-terminal fragment enters the nucleus to initiate the transcription of COL1A1 by binding to a CRE-like sequence in its promoter region. Its prominent role in bone formation was further supported by its contribution as a genetic cause of OI [40–42] (Fig. 1). Mutations in *CREB3L1* downregulated the expressions of genes encoding components of the COPII coat, Sec23A and Sec24, protein components responsible for the transport and secretion of cartilage matrix proteins from the rough ER to the Golgi apparatus [43].

CREB3L2 is widely expressed in various tissue and organs, however, is preferentially expressed in proliferating chondrocytes in the cartilage [39, 43]. During chondrocyte proliferation, CREB3L2 is cleaved by S1P and S2P at the Golgi. The NH_2-terminal domain of CREB3L2 then enters the nucleus and stimulates the transcription of genes encoding SEC23A and SEC24 [43]. Transcription of these genes expands the COPII-coated vesicles to accommodate the bulky type II collagen, an important component during chondrogenesis and chondrocyte differentiation [44] (Fig. 1). Additionally, CREB3L2 is implicated to have a role promoting collagen synthesis in dermal fibroblast also via the Sec23A pathway [45].

CREB3L3, also named CREB-H, was originally isolated as a hepatocyte-specific bZIP transcription factor and has an important role in innate immunity [12, 46]. Following microbial infection, the production of pro-inflammatory cytokines such as interleukin-6 (IL-6) by leukocytes results in ER stress in hepatocytes, which in turn triggers the proteolytic cleavage of CREB3L3 by S1P and S2P [12]. The cleaved NH_2-terminal nuclear form activates the transcription of C-reactive protein and other acute phase proteins in the liver to provide an early defense against microbial infection [12, 47] (Fig. 1). On the contrary, a recent study found that the proteolytic cleavage of CREB3L3 in response to the production proinflammatory cytokines during myocardial ischemia causes a superimposed injury to myocardial cells [48]. Additionally, CREB3L3 has been implicated to have a role in ER-stress and proinflammatory cytokine TNFα-induced inhibition of osteogenesis. Following the inducement of tunicamycin, a potent inducer of ER stress, and TNFα in both MC3T3-E1 cells, a murine preosteoblast cell line, and primary osteoblasts, cleaved CREB3L3 blunted the BMP-2-induced up-regulation of osteogenic markers

runt-related transcription factor 2 (RUNX2), alkaline phosphatase (ALP), and osteocalcin. This suggests of a negatively regulating role of CREB3L3 in osteoblast differentiation and bone formation [49, 50]. Interestingly, this is an opposite effect of BMP-2 on CREB3L1 despite being closely related. In another study, CREB3L3 was identified to have a role in osteoclastogenesis. Differentiation of osteoclast precursor cells via receptor activator of NF-κB ligand (RANKL)-induced differentiation, led to the accumulation of activated CREB3L3 in the nucleus and the activation of inflammatory transcription factor nuclear factor of activated T cells (*NFATC1*), a prominent transcription factor for osteoclast differentiation, to induce osteoclast. Inhibition of ER stress, however, reduced the expression of osteoclast-related genes and CREB3L3 activation, and thereby prevented RANKL-induced bone destruction, suggesting the inactivation of ER stress CREB3L3-induced signaling pathways may be of therapeutic use for the treatment of osteoporosis [51].

CREB3L4, also known as androgen-induced bZIP protein (AIbZIP), is highly abundant in the prostate where it is involved in the chromatin organization during spermiogenesis [52–54]. Like other members of the CREB3 family, CREB3L4, contains a single TM helix with an NH_2-terminal cytosolic domain resembling a transcription factor of the bZIP family. However, unlike its relatives, the requirement to be sequentially cleaved by S1P and S2P at the Golgi for its activation remains slightly unclear. In one study using the human prostate cancer cell line, LNCaP, it was demonstrated that treatment with brefeldin A, a pharmacological compound that collapses the ER and Golgi to a single compartment, levels of full-length CREB3L4 were reduced, indicating that CREB3L4 undergoes S1P and S2P cleavage at the Golgi [55]. In a more recent study, however, CREB3L4 was found to be localized to the Golgi apparatus as well as the ER, suggesting it did not undergo proteolytic cleavage by S1P and S2P in normal and ER-stress induced conditions in LNCaP cells [56]. The activation of CREB3L4 may therefore require additional components or stimuli to undergo proteolytic cleavage for its activation. Despite this, CREB3L4 has been linked to numerous cellular process in addition to spermiogenesis, such as, cellular differentiation into adipocytes [57] or the progression of breast carcinoma [58].

MBTPS2 gene and protein structure

The primary function of MBTPS2, as aforementioned above, is to cleave its substrates to enable them to perform vital cellular functions. To accomplish this, MBTPS2 relies on both of its conserved catalytic site motifs, HExxH and LDG, that are not only hallmarks of MBTPS2 but also core to its activity. Illuminating this was the structural studies of MBTPS2, via sequence-based topology predictions or X-ray crystallography methods, which has provided a substantial amount of information regarding the fundamental structural requirements of MBTPS2 and how they conform to its function as a membrane-embedded protease.

The *MBTPS2* gene spans greater than 4 kilobase pairs on human chromosome X and has 11 exons (Fig. 2a). The first glimpse of the MBTPS2 structure was deduced from a combination of protease protection and glycosylation studies, which revealed that it is 519 amino acids long and has a primary structure consisting of eight TM helices partitioned by four luminal loops and two cytoplasmic domains, an NH_2- and a COOH-terminal [18] (Fig. 2b). Among the transmembrane domains, are the core segments of MBTPS2, the fourth (TM4) and the seventh (TM7) transmembrane that holds both of its conserved catalytic motifs, HExxH and LDG, respectively. The HExxH motif is a well-established signature of zinc metalloproteases that utilizes the two histidine residues to chelate a catalytic zinc ion and the glutamate residue to activate a water molecule for peptide bond hydrolysis. The LDG motif, another signature motif of metalloproteases, uses its aspartate residue to further facilitate the coordination of the zinc ion [18, 59]. Together these residues activate a zinc-bound molecule that initiates a nucleophilic attack at the scissile peptide bond of a substrate following S1P cleavage.

The luminal loops are made up of an uneven distribution of charged amino acids including lysine, arginine, glutamate, and aspartate [18]. The first luminal loop other than its hydrophilicity is considered unremarkable. The second loop is made up of 76% serine residues, though the importance of this run of serine residues is also yet to be defined. The third loop, which is the longest of the loops, is made up of 188 residues and contains a PDZ domain with a cysteine-rich insert, charged and polar amino acids, and a consensus sequence with homology to a glycosylated site. Protein glycosylation has not been suggested to be a necessary posttranslational modification for the activation or functioning of MBTPS2, unlike MBTPS1 that requires cleavage of its inhibitory portion prior to its activation [60]. Analysis of the PDZ domain, on the other hand, has been suggested to be essential in the recognition and/or binding of a newly synthesized COOH-terminus end of substrates following its cleavage by S1P [61]. Thus, the presence of a PDZ domain may be a potential explanation why a substrate must undergo cleavage by S1P prior to being cleavage by S2P [62]. PDZ domains are in fact present on the COOH-terminal of bacterial S2P homologs and deemed essential in substrate recognition. As an example, in Mycobacterium tuberculosis, removal of the PDZ binding domain of Rip1 (S2P)

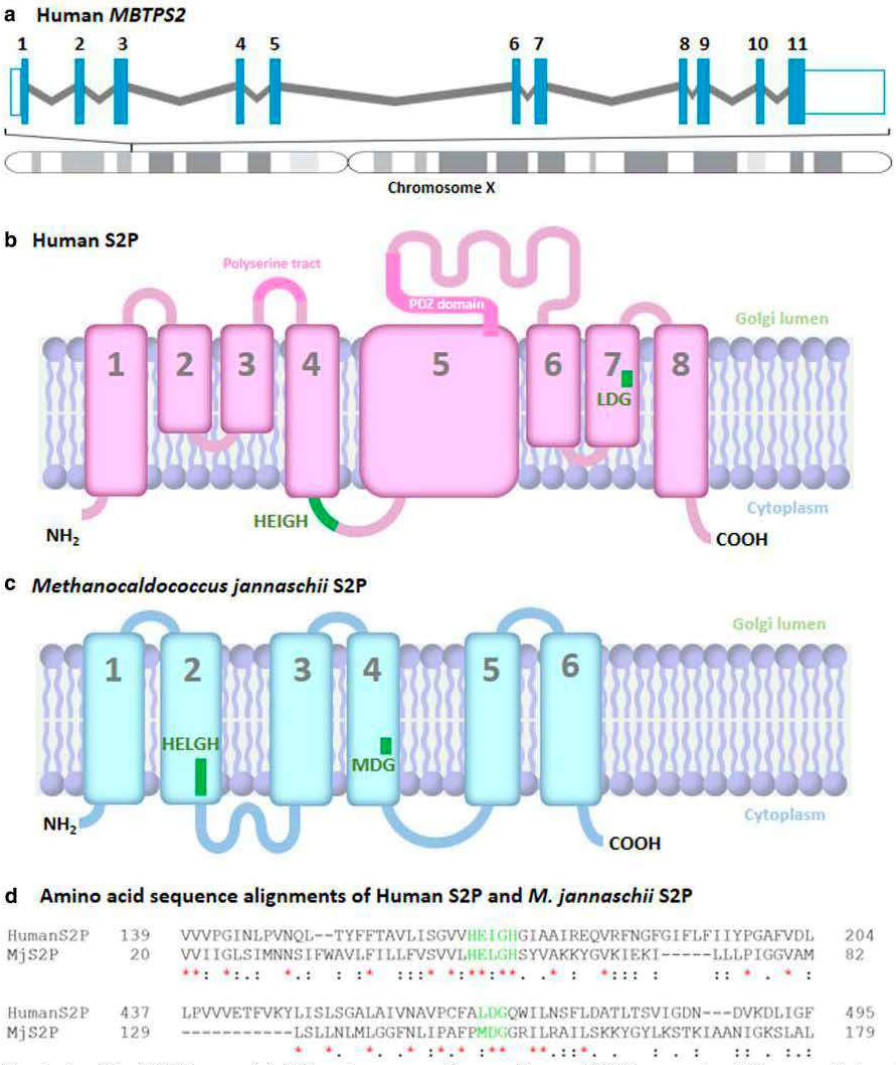


Fig. 2 Organization of the MBTPS2 gene and the S2P protein structure. **a** Structure of human *MBTPS2* gene consists of 11 exons and is located on human chromosome X. **b** Predicted structure of human S2P protein contains eight transmembrane domains, a polyserine tract, a PDZ domain, and catalytic active motifs, HEIGH and LDG. **c** Membrane topology of MjS2P, adapted from Feng et al. [65]. **d** Amino sequence alignments of human S2P and MjS2P at the catalytic active motifs. Sequences were obtained from NCBI Protein Database, aligned using Clustal Omega Software [126], and cropped at the catalytic active motifs (green letters). An asterisk (*) indicates positions which have a single, fully conserved residue. A: (colon) indicates conservation between alignments of strongly similar properties. A. (period) indicates conservation between alignments of weakly similar properties

via truncation of the COOH-terminal, prevented the binding of the Rip1 to PDZ-interacting protease regulator 1. Thus, the PDZ binding domain acts as a substrate-specific adaptor protein that tethers the substrate to S2P for it to be cleaved and released in the cytosol [63]. The use of the PDZ domain as an a substate-specific adapter protein by the human S2P has yet to be demonstrated and is an area for discovery. The fourth luminal loop, shortest of the loops, bridges the last TM helix before the protein terminates at its COOH-terminal (Fig. 2b).

This predicted architectural view of the MBTPS2 structure has since been confirmed by sequence homologs studies [61, 64] and astonishingly by the first S2P atomic-resolution crystal structure obtained from an archaebacterium S2P (Methanocaldococcus jannaschii S2P (MjS2P)) [65] (Fig. 2c). Though the S2P crystal structure was obtained from the archaeal S2P homolog, there are striking parallels between the human S2P predicted sequence topology and the crystal structure of MjS2P (Fig. 2d). First, the placement of the two catalytic active sites at the cytosolic side of the membrane. Interestingly, this orientation complements well with the location of where SREBPs are cleaved which is near the cytosolic portion of the membrane [8, 66]. Second, the geometry of the active-site residues, the placement of the catalytic dyad, His-His and Asp for its catalytic activity indeed coordinate with each other and are spatially arrange in a manner similar to that seen with other HExxH-containing metalloprotease, such as thermolysin [67]. The only difference is, however, the MjS2P crystal structure suggests a six TM helix model, we speculate this difference is due to the human S2P being longer than the MjS2P.

The MjS2P crystal structure for the first time has given access to unprecedented structural and mechanistic insights of S2P at an atomic-level, providing answers to challenging questions and novel insights. The longest-standing conundrum of S2P proteolysis, as a matter of fact for most intramembrane proteases, has been the question of how a water-requiring proteolytic reaction can occur in a lipid membrane. The structure demonstrated the existence of a polar channel at the COOH-terminal which allows water entry to the active sites of S2P. Additionally, the inner surface of the polar channel is lined with several polar groups and charged amino acids including backbone carbonyls, and acidic and basic side chains, providing an aqueous microenvironment required for proteolysis. The structure also confirmed that proteolysis does indeed takes place within the plane of the membrane as the residues of the catalytic active sites were found to reside beneath the surface of the membrane. Another remarkable insight gained are hints of a 'lateral gating mechanism' that regulates substrate access to the active catalytic sites. This involves the pushing of TM1 and TM6 away from each other in a 'double door opening' fashion that exposes the S2P active sites. This translocation of the helices generates a crevice as wide as the length S2P to sufficiently accommodate the substrate [65]. Interestingly, this mechansim is similar to those established from the crystal structures of other membrane proteases such as rhomboids [68]. Thus, this allows us to begin to draw a picture of the core catalytic mechanisms of MBTPS2 that may serve as a conceptional framework for a deeper understanding of the machinery for its proteolytic activity. Nonetheless, this mechanism was inferred from the archaeal S2P homolog, thus it remains unclear if this gating mechanism will be of relevance for human MBTPS2 and it is unlikely to be fully resolved until complexes of S2P bound to a substate can be crystallized and their structure determined.

The successful resolving of the MjS2P structure may have faded former doubts of the proteolysis action of MBTPS2 but have also posed further questions. One particular aspect is that it has not been identified yet how substrates unfold or unwind to allow the catalytic sites of MBTPS2 to gain access to its scissile peptide bond. The process of cleavage of SREBPs may be utilized as a template: following S1P cleavage of SREBPs at their luminal loop, both of its TM segments separate from one another, causing it to partially unfold and its transcriptional domain easily accessed by S2P [59]. For the other substrates of MBTPS2, such as ATF6 and CREB3, their precise mechanism of cleavage has not been fully understood, thus it can only be speculated that these substrates must also be unfolded to allow its scissile peptide bond to be exposed to MBTPS2 catalytic sites. Another area that we have yet a real insight into is how MBTPS2 substrates are defined or selected. Initial mutational studies of SREBPs revealed two sequences that were critical for S2P cleavage [59]. The first, Asp-Arg-Ser-Arg (DRSR), which immediately precedes the first TM segment of SREBP-1a and SREBP-2. Changes to the DRSR sequence via substitutions or deletions severely disrupted the cleavage of S2P for SREBP-1a but did not have the same effect on SREBP-2. The second sequence important for S2P cleavage is Asn-Pro (NP) which sits within the first TM segment of SREBP-2. Changes to each residue of the NP sequence resulted in a partial reduction of S2P cleavage and changes to the both of sequence simultaneously, completely abolished the cleavage of SREBP-2 by S2P. Interestingly, translocating the NP sequence 5 residues NH_2-terminally did not alter the position of cleavage nor impact its cleavage by S2P [59]. This may be suggestive of a recognition sequence, as it is not spatially regulated. However, it was not determined if cleavage at an altered position had any down-stream effects, perhaps at a transcriptional level. Similarly, ATF6 has a Asn-Tyr-Gly-Pro

(NYGP) sequence within in its TM domain that is important for S2P cleavage, as substitution to both of the NP residues completely abolished cleavage [11]. The presence of the NP sequence in SREBP-2 and ATF6 is an exciting observation of a 'specific recognition sequence' that can dictate substate specificity of MBTPS2, rather than just a sequence cleavage, however, does require deeper analysis. The PDZ domain on MBTPS2 COOH-terminal may be an alternative route of a regulative mechanism, particularly the observations that certain bacteria S2P rely on its PDZ binding motif as an adapter protein for substrate specificity. The MjS2P, however, did not have any domain or motif inserts of such between its TMS or luminal loop, instead, had a rather noticeable cavity in its structure and we are tempted to speculate that this would be the region where the PDZ binding motif would sit.

Overall, these emerging proposals are plausible, but there is more to be understood about the details of S2P substrate entry, its catalytic mechanism, and specifications of what makes an S2P substrate. Perhaps, genome editing approaches such as CRISPR-Cas9 of known substates combined with structures of S2P in complex with its substates, will aid in resolving this. Implications of these will not only be a subject of interest on mechanistical and theoretical levels but has major connotations in understanding how MBTPS2 functions in various biological contexts, diseases, and the possibility of utilizing MBTPS2 and its substrates as a therapeutic target.

MBTPS2 associated diseases

Given the significance in cholesterol homeostasis and ER stress responses, and the many substrates and cellular functions that rely on the proteolytic activity of MBTPS2, it is not surprising that mutations leading to MBTPS2 deficiency can lead to multiple diseases. To date, mutations in the *MBTPS2* gene have been reported to cause debilitating disorders including IFAP syndrome with or without BRESHECK, KFSD, Olmsted and most recently, OI.

Ichthyosis follicularis, alopecia and photophobia (IFAP) syndrome with or without BRESHECK

IFAP syndrome (MIM #308205) is an extremely rare congenital disorder with only about 60 cases reported worldwide since it was first identified by McLeod in 1909 [69]. The syndrome is inherited in an X-linked recessive fashion and primarily affects males, however, there have been reports of autosomal-dominantly inherited IFAP cases in females [70–72]. Female carriers have also been reported to display symptoms, though the trait may be nonpenetrant or are mild such as follicular ichthyosis, mild atrophoderma, hairlessness, and hypohidrosis in a linear mosaic pattern [73, 74]. The phenotypic spectrum of this syndrome in males is variable, ranging from mild to severe, but all affected individuals display the peculiar triad of follicular ichthyosis, nonscarring generalized absence of hair and abnormal sensitivity to light [75]. Ichthyosis follicularis, a hallmark feature of this syndrome, arises as widespread non-inflammatory thorn-like follicular keratosis, which many occur at the scalp and extensor extremities (Fig. 3a, b). Additional cutaneous defects may include hyperkeratotic psoriasiform plaques, lamellar scaling, angular cheilitis, periungual inflammation and dystrophic nails. Noncicatricial alopecia, the most prominent manifestation, is the loss of hair at the scalp, eyebrows and eyelashes or a complete body hair loss. Superficial corneal ulceration and vascularization lead to progressive scaring of the cornea and possibly cause a defect in Bowman membrane, which underlies photophobia, the third defining characteristic of the triad. Further ocular manifestations include corneal erosions and scarring, chronic tearing, nystagmus, myopia, and atopic keratoconjunctivitis. The anterior chamber, lens, and ocular fundus are not affected. Further manifestations



Fig. 3 Clinical and radiographic images of patients with IFAP or OI caused by *MBTPS2* mutations. **a**, **b** A patient with IFAP harboring the p.R429H mutation in *MBTPS2* exhibited alopecia, ichthyotic scaling, scaly hyperkeratotic plaques over scalp, hyperkeratosis, and dystrophic nails **c**, **d** A patient with OI harboring p.N459S mutation in *MBTPS2* exhibited a severely anterior angulation of legs

may occur together with the triad such as intellectual disability, seizures, hypotonia, short stature, frontal bossing, choanal atresia, recurring infections, and intestinal irregularities as well as renal, cardiac, and vertebral anomalies [76]. In extreme cases, an assortment of manifestations can be presented in affected individuals including brain anomalies, intellectual disability, ectodermal dysplasia, skeletal deformities, ear or eye anomalies, and renal anomalies or small kidneys, with or without Hirschsprung disease and cleft palate or cryptorchidism (BRESEK or BRESHECK) [77].

Though identified over a century ago in 1909, the genetic basis of this rare disorder was only uncovered in 2009 [78]. By linkage analysis and sequencing of the candidate genes, five unrelated affected males with the IFAP syndrome were each found to harbor a missense mutation in *MBTPS2* (Fig. 4, Table 1). The five identified missense mutations, p.R429H, p.H227L, p.M87I, p.W226L, and p.F475S, resulted in the abolishment of the proteolytic activity of S2P, with the extent of S2P proteolytic activity loss specific to each mutation. This was determined by the analyses of cell viability in M19 CHO cells bearing the different detected missense mutations. Under sterol-depleted conditions, the five mutants displayed varying degrees of poor cell growth compared to M19 cells transfected with wild-type MBTPS2. Most strikingly was the p.R429H mutant that had almost no detectable cell growth and the lowest residual proteolytic activity. Interestingly, the affected male harboring this mutation also had the most prominent IFAP phenotypes, suggestive of a correlation between clinical severity and the extent of impairment in S2P proteolytic function as a consequence of the mutation [78]. This mutation lies within the domain of the COOH-terminal located near the LDG motif at TM 7, one of the two proteolytic active sites of S2P, further hinting at a relationship between proteolytic function and clinical severity.

Regarding genotype–phenotype correlation, it appears that mutations lying within in or close to TM 5 and 8 contribute to severe manifestations, while mutations closer to the NH_2- or COOH-terminals result in milder forms of IFAP. This is not only evident for the p.R429H

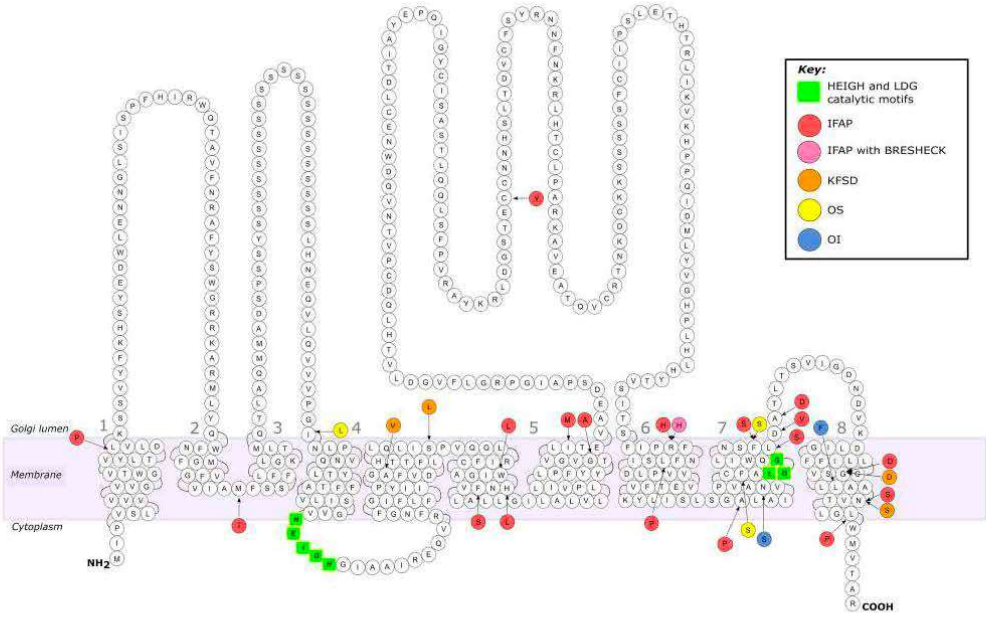


Fig. 4 Reported pathogenic *MBTPS2* variants. MBTPS2 protein structure contains eight transmembrane domains (TM 1 to TM 8) spanning the Golgi membrane. The NH2-terminal, COOH-terminal and the loop linking TM 4 and 5 are cytoplasmic, whilst the four loops are luminal. The schematic diagram is adapted from Bornholdt et al., 2013. Green highlighted amino acids are the catalytic active motifs, HEIGH and LDG. Pathogenic variants with the substituted amino acids are indicated by arrows and colored circles. Red amino acids are substitutions that cause IFAP syndrome. Pink amino acids are substitutions that cause IFAP with BRESHECK. Orange amino acids are substitutions that cause KFSD. Yellow amino acids are substitutions that cause OS. Blue amino acids are substitutions that cause OI

Table 1 Disorders and main clinical features associated with *MBTPS2* mutations

Disorders	Main clinical features	Mutation	Amino acid change
IFAP	Ichthyosis follicularis, alopecia, photophobia, non-inflammatory thorn-like follicular keratosis, hyperkeratosis, dystrophic nails, ectopic keratoconjunctivitis, corneal scars, corneal erosion, and neovascularization	c.71T>C	p.L24P
		c.261G>A	p.M87I
		c.667G>T	p.W226L
		c.680A>T	p.H227L
		c.686T>C	p.F229S
		c.758G>C	p.G253A
		c.774C>G	p.I258M
		c.1001G>A	p.C334Y
		c.1286G>A	p.R429H
		c.1360G>C	p.A454P
		c.1424T>C	p.F475S
		c.1427T>C	p.L476S
		c.1430A>T	p.D477V
		c.1433C>A	p.A478D
		c.1499G>A	p.G500D
		c.1523A>G	p.N508S
		c.1538T>C	p.L513P
		c.671-9T>G	p.I225Lfs*25
IFAP with BRESHECK	Ichthyosis follicularis, atrichia, photophobia, with brain anomalies, intellectual disability, ectodermal dysplasia, skeletal malformations, Hirschsprung disease, ear deformity and deafness, eye hypoplasia, cleft palate, cryptorchidism, and kidney dysplasia/hypoplasia (BRESHECK)	c.1286G>A	p.R429H
KFSD	Diffuse follicular hyperkeratosis, progressive cicatricial alopecia of the scalp, eyebrows, and eyelashes, photophobia, blepharitis/conjunctivitis, and corneal dystrophy	c.599C>T	p.A200V
		c.1499G>A	p.G500D
		c.1523A>G	p.N508S
		c.638C>T	p.S213L
OS	Periorificial keratotic plaques, bilateral palmoplantar transgredient keratoderma, diffuse alopecia, leukokeratosis of oral mucosa, onychodystrophy, hyperkeratotic linear streaks, follicular keratosis, and constriction of digits	c.671-9T>G	p.I225Lfs*25
		c.1391T>C	p.F464S
		c.1424T>C	p.F475S
OI Type XIX	Low bone mass, progressive bone deformities with increased fracture frequencies, craniofacial abnormalities, scoliosis, atraumatic subluxations, dentinogenesis imperfecta, hearing impairments, blue sclerae, and lung abnormalities	c.1376A>G	p.N459S
		c.1515G>C	p.L505F

IFAP Ichthyosis follicularis, atrichia and photophobia syndrome, *OI* Osteogenesis imperfecta, *KFSD* Keratosis follicularis spinulosa decalvan, *OS* Olmsted syndrome

mutation but also for the p.L433P, p. A454P, p.F475S, p.L476S, p.D477V, p.A478D, and p.G500D mutations that are as well adjacent to the LDG motif and led to clinically severe IFAP phenotypes [78–81]. Additionally, mutations within the TM 5, p.F229S, p.W226L, p.H227L, p.G253A, and p.I258M are also associated with considerably severe IFAP phenotypes. Interestingly, a mutation was identified at the large luminal loop between TM 6 and 7 (p.C334Y), which the affected male displayed classic clinical features of IFAP along with psoriasiform skin plaques, nail dystrophy, facial dysmorphism, intellectual disability, severe skeletal abnormalities, and chorea-like movement. Though the IFAP phenotypes of this mutation were not severe, it may suggest that a mutation at this site may be particular to severe skeletal anomalies. However, this remains to be clarified [82]. A patient with a p.L24P mutation, the most-proximal mutation close to the NH_2-terminal end on TM 1 had mild IFAP phenotypes but also had global developmental delay [83]. In two other patients, one harboring the p.M87I mutation, the second most-proximal mutation on TM 2, and the p.L513P mutation, the most COOH-terminal encountered mutation on TM 8, resulted in milder phenotypes of IFAP [78, 79] (Fig. 4). Nonetheless, it could be contended that no specific phenotype or genotype correlation can be formed from mutation positions. In one study it was reported that a patient carrying the p.R429H mutation displayed mild phenotypes of IFAP, in contrast to what was previously observed, the patient however, did experience neurological abnormalities such as retarded psychomotor development and seizures [78, 84]. Additionally, another patient was not affected by the triad of IFAP but by BRESHECK with atrichia and photophobia [85]. Yet, another patient severely manifested

the cardinal triad of IFAP with an additional five features of BRESHECK [77]. Precaution, therefore, must be taken when making predictions of clinical outcome from a specific mutation.

Initially, BRESEK or BRESHECK was considered as a distinct entity that was termed 'BRESEK or BRESHECK syndrome' by Reish et al. (1997); however, as majority of its symptoms are often presented along side the IFAP triad, particularily Hirschsprung disease in severe cases of IFAP, IFAP, and BRESHECK have been classified within the same entity as 'IFAP with or without BRESHECK (MIM #308205) [77–79, 85, 86]. In essence, prior to the coining of the 'BRESEK or BRESHECK syndrome' Martino et al. (1992) reported a male patient that was affected by the IFAP triad and additional symptoms that were very much alike to those of the BRESHECK syndrome, including short stature, intellectual disability, seizures, hypohidrosis, enamel dysplasia, congenital aganglionic megacolon, inguinal hernia, vertebral and renal anomalies, however the genetic basis underlying IFAP and the additional phenotypes of this patient was not determined [76].

Keratosis follicularis spinulosa decalvans

Keratosis follicularis spinulosa decalvans (KFSD, MIM #308800) is a rare hereditary disorder of keratinization recognized by widespread hyperkeratotic follicular papules [87]. First described in 1926, the disorder is often presented at infancy or early childhood with an X-linked pattern of inheritance, though sporadic cases or cases inherited in an autosomal dominant fashion have been reported [88–92]. Some affected individuals exhibit extensive keratosis pilaris-like papules, as well as facial erythema, hypotrichosis, and cicatricial alopecia of the scalp, eyebrows, and eyelashes. Extracutaneous features include photophobia, keratitis, blepharitis, and enamel hypoplasia. As the phenotypes of this disorder considerably simulates IFAP, KFSD is sometimes considered as a 'milder form of IFAP, however, this disorder can be distinguished from IFAP via the nature of alopecia, which is progressive with variable degrees of inflammatory change leading to scarring in KFSD.

Mutations in *MBTPS2* have been identified as one of the causative genes of KFSD. Alike mutations leading to the IFAP triad, mutations underlying KFSD lie within the TM domains of MBTPS2. In three unrelated families, a missense mutation in *MBTPS2* (p.N508S) was identified in affected males displaying mild phenotypes [87]. Following this, two independent studies reported a Chinese and a Swedish family in which the same mutation segregated with mild phenotypes of KFSD [79, 92]. The position of this recurrent mutation was mapped to be at the COOH-terminal end of MBTPS2 and a genotype–phenotype effect specific to *MBTPS2* mutation was speculated (Fig. 4). Indeed, cell viability assays of M19 CHO cells possessing the p.N508S mutation showed a 50% reduced growth rate in sterol deprived conditions compared to wild-type, though, in comparison to the mutations underlying severe phenotypes of IFAP, the p.N508S mutation had a higher survival rate [78, 79, 87]. Not only does this strengthens the notion that mutations located far away from the active proteolytic site do not lead to severe phenotypes but may also suggest that localization of mutations can be utilized as a marker of clinical severity [78]. Subsequently, additional reports of missense *MBTPS2* mutations have been linked to mild phenotypes of KFSD and abide to the genotype to phenotype pattern [79, 93, 94].

Olmsted syndrome

Olmsted syndrome (OS, MIM #614594) is an extremely rare keratinization genetic disorder classically marked by the combination of bilateral mutilating palmoplantar keratoderma, and periorificial hyperkeratotic plaques [95]. The disease normally presents at birth or early childhood, however, onset in adults have been reported [96]. Diagnosis of OS generally relies on the clinical presentation of bilateral mutilating palmoplantar keratoderma and periorificial hyperkeratotic plaques, though there is a high variability in its phenotypic spectrum by the presence of accompanied features. These include corneal opacities, diffuse alopecia, digital constriction rings, nail dystrophy, high-tone hearing impairment, infections, hyperkeratotic linear streaks at the elbows, knees, axillae, and antecubital fossae, and squamous cell carcinomas [97, 98]. As such, diagnosis is often difficult and confusing as majority of its phenotypes overlap with IFAP. To complicate things further, *MBTPS2* mutations via an X-linked mode of inheritance has recently become alight to cause OS, in addition to the classical OS-causative gene, transient receptor potential cation channel, subfamily V (TRPV3) [74, 99–104].

Among the 106 cases of OS, three of these are to date reported to be caused by mutations in *MBTPS2*. First of the three is a missense mutation (p.F464S) harbored by two males in an Iranian pedigree [99, 105]. This missense mutation is located on TM 7 and only two codons away from the LDG catalytic center of MBTPS2. Rather close to the LDG motif, severe OS manifestations were expected. Accordingly, the two probands severely displayed all the features of OS, with alopecia universalis, painful hyperkeratotic lesions, severe periorificial plaques, and severely dystrophic nails with a fork-like appearance and yellow in color. In another pedigree, a c.671-9 T > G intronic mutation was present in a Chinese proband that exhibited not only features of OS but also

the IFAP triad with short stature, inguinal hernia, palmoplantar, periorificial keratoderma, and pachyonychia [74]. Interestingly, this mutation was previously reported in two IFAP patients that also exhibited hernia, short stature, and thickened dystrophic nails, but no symptoms of OS [78]. By an in vitro mini gene assay and reverse transcription PCR, this mutation disrupted the intronic splicing enhancer, resulting in the skipping of exon 6 for mRNA transcription and a frameshift that prematurely terminated MBTPS2 (p.I225Lfs*25) [74, 78]. This diversifies the heterogeneity of *MBTPS2* mutations to not only consist of mutations on TM domains but also ones at the exon–intron boundaries of *MBTPS2*. The third mutation is another recurrent mutation (p.F475S) that was reported in two Lebanese brothers that displayed clinical features for both OS and IFAP [104] (Fig. 4). This missense mutation had previously been documented in an Argentinian male and two Lebanese brothers with severe manifestations of IFAP with hyperkeratotic psoriasis-like lesions and plantar keratoderma, respectively, amongst other features [78, 79]; however, there were no mentions of OS. Whilst, in another report by Nemer et al. (2017), two affected Lebanese brothers displayed phenotypes of both IFAP and OS with development delays, recurrent seizures, osteoporosis, and renal insufficiency [104]. These reports together underscore the challenge in reaching at a consensus for diagnosis when OS cases with IFAP manifestations or vice versa are presented simultaneously. As a result, there has been controversy over whether X-linked OS should exist as an independent syndrome or just as a severe form of IFAP [74, 106]. The reason for debate arose from the observation that, patients displaying clinical features of OS occasionally also show IFAP phenotypes. This contrasts with the onset of OS due to *TRPV3* mutations which affected individuals only display classical OS phenotypes without any IFAP features. Whether the nomenclature of OS should be incorporated with IFAP in a similar manner that the BRESHECK syndrome was grouped as 'IFAP with or without BRESHECK' requires further considerations.

Osteogenesis imperfecta (OI)

Osteogenesis Imperfecta (OI) or brittle bone disease is a congenital heterogenous skeletal deformity disorder that affects approximately 1 in 10,000–20,000 births worldwide [107]. Individuals with OI display a marked skeletal phenotype with a broad clinical spectrum of severities that varies from low bone mass to progressive bone deformities with increased fracture frequencies and perinatal lethality. Additionally, OI individuals may exhibit an array of associated secondary features including craniofacial abnormalities, scoliosis, atraumatic subluxations, and dentinogenesis imperfecta as well as extra-skeletal manifestations including hearing impairments, blue sclerae, and lung abnormalities [108, 109].

Typically, OI is most often found to be caused by autosomal dominant mutations in either of the genes that encode for collagen type 1 alpha chains, *COL1A1* or *COL1A2*, causing an alteration in the structure or function of collagen type 1, the most abundant protein of bone extracellular matrix [108, 110–112]. Mutations in genes involved in posttranslational modification of collagen (*CRTAP, PPIB, LEPRE1/P3H1*) [113–115], folding (*SERPINH1, FKBP10*) [13, 116], intracellular trafficking (*SEC24D*) [117], and extracellular processing (*BMP1*) [118, 119] have also been described to cause OI as a result of autosomal recessive inheritance. Over the past decade, however, the advent of high-resolution sequencing technologies such as next-generation sequencing (NGS) and the increased application of whole-exome sequencing has greatly widened the horizon of the genetic contributions to OI. These approaches have led to the identification of new OI-causing genes and novel pathogenic variants that are not classically associated with collagen metabolism and can occur via distinct inheritance patterns, such as the first X-linked recessive form of OI (OI type XIX, OI19, MIM #301014), caused by missense mutations in *MBTPS2* [3, 120, 121] (Fig. 3c, d). In two independent pedigrees with moderate to severe OI, linkage analysis and NGS revealed two novel *MBTPS2* missense mutations. In both pedigrees, the resulting substitutions (p.N459S and p.L505F) were found to occur within or adjacent to the zinc ion coordinating site required for enzymatic activity (Fig. 4). Expression levels of mutant S2P were stable, however, processing of the RIP substrates ATF6, CREB3L3, and SREBPs were impaired, resulting in decreased expression levels of several genes critical for osteoblast differentiation and extracellular matrix synthesis.

The underlying molecular mechanism for the phenotypic differences for these very distinctive disorders is currently unclear but may potentially be revealed by an in-depth characterization of intracellular signaling differences associated with the skin disorders or OI mutations using stem cell-based disease models such as induced pluripotent stem cells (iPSCs) and/or animal models [122]. Any insights gained from these studies will further our understanding of the MBTPS2 properties in disease, and thereby assist in the possibility of utilizing MBTPS2 as a therapeutic target for the treatment of its associated skin disorders and OI. Interestingly, it has been demonstrated that Nelfinavir, an HIV protease inhibitor, was able to induce apoptosis and growth arrest of both liposarcoma and castration-resistant prostate cancer, through the inhibition of S2P

activity [123–125], suggesting a potential role of utilizing S2P as a therapeutic target for certain malignancies.

Conclusions

Since the serendipitous discovery of MBTPS2 in 1997, tremendous strides have inarguably been made in understanding the role of this once heretical protease. It has transition S2P from just a component in the cleavage machinery of SREBPs to now a protease that is widely regarded as a critical regulator of serval cellular processes in health and disease. The biochemical and structural biology studies have offered spectacular insights into the mechanisms and functions of S2P, disposing the longstanding doubt of whether its proteolytic action via hydrolysis of peptide bonds can occur in the membrane, provided a conceptual platform in appreciating the broader functions of S2P and revealed a plethora of substrates that are entirely dependent on S2P for their downstream target pathways. Another notable insight gained is the identification of both of the catalytic active sites of S2P that is not only crucial to its proteolysis, but also seemingly an essential aspect in the pathogenesis of the disorders resulting from *MBTPS2* mutations in which several studies have revealed a prominent concordance in the molecular and biochemical properties of the mutations to the catalytic sites. What is also rather striking is the very distinctive disorders that result from the variants of *MBTPS2*, which may be suggestive of MBTPS2 having pleiotropic properties. Additionally, the disorders that so far have been reported arise from mutations that all lead to loss of function of MBTPS2, an area that has not been delved into are effects or disorders of variants that lead to the hyperactivity of MBTPS2. Nonetheless, the challenge lies in deciphering the complex pathomechanism underlying the associated distinctive disorders. Investing efforts into these important, albeit challenging, technical areas will most definitely accelerate our understanding of MBTPS2 in pathophysiological conditions even further. Looking into the future we hope that many of the fundamental remaining questions about MBTPS2 will be addressed and look forward to the exciting advances in both the mechanistic features of MBTPS2 functions and to utilize it as a therapeutic target.

Abbreviations

ATF6: Activating transcription factor 6; bHLHL-Zip: Basic-helix-loop-helix-leucine zipper; BMP-2: Bone morphogenetic protein-2; BRESHECK: Brain anomalies, intellectual disability, ectodermal dysplasia, skeletal deformities, ear or eye anomalies, and renal anomalies or small kidneys, with or without Hirschsprung disease and cleft palate or cryptorchidism; CHO: Chinese hamster ovary; COOH terminal: Carboxyl terminal; CREB3L1: Cyclic AMP-responsive element-binding protein 3-like protein 1; CREB3L2: Cyclic AMP-responsive element-binding protein 3-like protein 2; CREB3L3: Cyclic AMP-responsive element-binding protein 3-like protein 3; CREB3L4: Cyclic AMP-responsive element-binding protein 3-like protein 3; IFAP: Ichthyosis Follicularis, Atrichia and Photophobia syndrome; KFSD: Keratosis follicularis spinulosa decalvans; MBTPS1: Membrane-bound transcription factor protease, site-1; MBTPS2: Membrane-bound transcription factor protease, site-2; MjS2P: Methanocaldococcus jannaschii S2P; NH2-terminal: Amino-terminal; OI: Osteogenesis imperfecta; OS: Olmsted syndrome; RANKL: Receptor activator of NF-κB ligand; RIP: Regulated intramembrane proteolysis; S1P: Site-1 protease; S2P: Site-2 protease; SREBPs: Sterol regulator element binding proteins; TM: Transmembrane.

Acknowledgements

We thank Dr. Verayuth Praphanphoj for referring the IFAP patient to us.

Authors' contributions

Conceptualization, NC and TP; Data curation, TP, TT, VS; Writing—Original Draft Preparation, NC, TP; Writing—Review & Editing, NC, TT, TP, VS. All authors approve the submitted version and agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This project is funded by the National Research Council of Thailand, TSRI Fund (CU_FRB640001_01_32_3, CU_FRB640001_01_32_4, CU_FRB640001_01_30_10), Global partnership CU-C16F630029, Health Systems Research Institute, Thailand Research Fund (MRG6280001, DPG6180001). N.C. is supported by the Ratchadapisek Somphot Fund for Postdoctoral Fellowship, Chulalongkorn University.

Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this study are included in this published article.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

This study was approved by the Institutional Review Board, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University (IRB 264/62) and in accordance with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Consent for publication

Consents for publication were obtained from all participants.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Author details

[1] Center of Excellence for Medical Genomics, Medical Genomics Cluster, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand. [2] Excellence Center for Genomics and Precision Medicine, King Chulalongkorn Memorial Hospital, The Thai Red Cross Society, Bangkok 10330, Thailand. [3] Genomics and Precision Dentistry Research Unit, Department of Physiology, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

Received: 16 January 2021 Accepted: 8 March 2021
Published online: 20 March 2021

References

1. Ye J. Roles of regulated intramembrane proteolysis in virus infection and antiviral immunity. Biochim Biophys Acta. 2013;1828:2926–32.
2. Brown MS, Ye J, Rawson RB, Goldstein JL. Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. Cell. 2000;100:391–8.
3. Lindert U, Cabral WA, Ausavarat S, Tongkobpetch S, Ludin K, Barnes AM, et al. MBTPS2 mutations cause defective regulated intramembrane proteolysis in X-linked osteogenesis imperfecta. Nat Commun. 2016;7:11920.

4. Murphy G, Murthy A, Khokha R. Clipping, shedding and RIPping keep immunity on cue. Trends Immunol. 2008;29:75–82.
5. Ehlers MR, Riordan JF. Membrane proteins with soluble counterparts: role of proteolysis in the release of transmembrane proteins. Biochemistry. 1991;30:10065–74.
6. Lichtenthaler SF, Steiner H. Sheddases and intramembrane-cleaving proteases: RIPpers of the membrane. Symposium on regulated intramembrane proteolysis. EMBO Rep. 2007;8:537–41.
7. Urban S. Making the cut: central roles of intramembrane proteolysis in pathogenic microorganisms. Nat Rev Microbiol. 2009;7:411–23.
8. Sakai J, Duncan EA, Rawson RB, Hua X, Brown MS, Goldstein JL. Sterol-regulated release of SREBP-2 from cell membranes requires two sequential cleavages, one within a transmembrane segment. Cell. 1996;85:1037–46.
9. Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. Cell. 1997;89:331–40.
10. Rawson RB, Cheng D, Brown MS, Goldstein JL. Isolation of cholesterol-requiring mutant Chinese hamster ovary cells with defects in cleavage of sterol regulatory element-binding proteins at site 1. J Biol Chem. 1998;273:28261–9.
11. Ye J, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Davé UP, Prywes R, et al. ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. Mol Cell. 2000;6:1355–64.
12. Zhang K, Shen X, Wu J, Sakaki K, Saunders T, Rutkowski DT, et al. Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response. Cell. 2006;124:587–99.
13. Alanay Y, Avaygan H, Camacho N, Utine GE, Boduroglu K, Aktas D, et al. Mutations in the gene encoding the RER protein FKBP65 cause autosomal-recessive osteogenesis imperfecta. Am J Hum Genet. 2010;86:551–9.
14. Wang X, Sato R, Brown MS, Hua X, Goldstein JL. SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis. Cell. 1994;77:53–62.
15. Hua X, Sakai J, Ho YK, Goldstein JL, Brown MS. Hairpin orientation of sterol regulatory element-binding protein-2 in cell membranes as determined by protease protection. J Biol Chem. 1995;270:29422–7.
16. Hua X, Sakai J, Brown MS, Goldstein JL. Regulated cleavage of sterol regulatory element binding proteins requires sequences on both sides of the endoplasmic reticulum membrane. J Biol Chem. 1996;271:10379–84.
17. Hasan MT, Chang CC, Chang TY. Somatic cell genetic and biochemical characterization of cell lines resulting from human genomic DNA transfections of Chinese hamster ovary cell mutants defective in sterol-dependent activation of sterol synthesis and LDL receptor expression. Somat Cell Mol Genet. 1994;20:183–94.
18. Zelenski NG, Rawson RB, Brown MS, Goldstein JL. Membrane topology of S2P, a protein required for intramembranous cleavage of sterol regulatory element-binding proteins. J Biol Chem. 1999;274:21973–80.
19. Rudner DZ, Fawcett P, Losick R. A family of membrane-embedded metalloproteases involved in regulated proteolysis of membrane-associated transcription factors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96:14765–70.
20. Kanehara K, Akiyama Y, Ito K. Characterization of the yaeL gene product and its S2P-protease motifs in Escherichia coli. Gene. 2001;281:71–9.
21. Yoshida H, Okada T, Haze K, Yanagi H, Yura T, Negishi M, et al. ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. Mol Cell Biol. 2000;20:6755–67.
22. Haze K, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Mori K. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. Mol Biol Cell. 1999;10:3787–99.
23. Shen J, Chen X, Hendershot L, Prywes R. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. Dev Cell. 2002;3:99–111.
24. Hillary RF, FitzGerald U. A lifetime of stress: ATF6 in development and homeostasis. J Biomed Sci. 2018;25:48.
25. Wang X, Karamariti E, Simpson R, Wang W, Xu Q. Dickkopf homolog 3 induces stem cell differentiation into smooth muscle lineage via ATF6 signalling. J Biol Chem. 2015;290:19844–52.
26. Naranjo JR, Zhang H, Villar D, González P, Dopazo XM, Morón-Oset J, et al. Activating transcription factor 6 derepression mediates neuroprotection in Huntington disease. J Clin Invest. 2016;126:627–38.
27. Jin JK, Blackwood EA, Azizi K, Thuerauf DJ, Fahem AG, Hofmann C, et al. ATF6 decreases myocardial ischemia/reperfusion damage and links ER stress and oxidative stress signaling pathways in the heart. Circ Res. 2017;120:862–75.
28. Freiman RN, Herr W. Viral mimicry: common mode of association with HCF by VP16 and the cellular protein LZIP. Genes Dev. 1997;11:3122–7.
29. Lu R, Yang P, O'Hare P, Misra V. Luman, a new member of the CREB/ATF family, binds to herpes simplex virus VP16-associated host cellular factor. Mol Cell Biol. 1997;17:5117–26.
30. Eleveld-Trancikova D, Sanecka A, van Hout-Kuijer MA, Looman MW, Hendriks IA, Jansen BJ, et al. DC-STAMP interacts with ER-resident transcription factor LUMAN which becomes activated during DC maturation. Mol Immunol. 2010;47:1963–73.
31. Reiling JH, Olive AJ, Sanyal S, Carette JE, Brummelkamp TR, Ploegh HL, et al. A CREB3-ARF4 signalling pathway mediates the response to Golgi stress and susceptibility to pathogens. Nat Cell Biol. 2013;15:1473–85.
32. Kang H, Kim YS, Ko J. A novel isoform of human LZIP negatively regulates the transactivation of the glucocorticoid receptor. Mol Endocrinol. 2009;23:1746–57.
33. Jang SW, Kim YS, Kim YR, Sung HJ, Ko J. Regulation of human LZIP expression by NF-kappaB and its involvement in monocyte cell migration induced by Lkn-1. J Biol Chem. 2007;282:11092–100.
34. Jang SW, Kim YS, Lee YH, Ko J. Role of human LZIP in differential activation of the NF-kappaB pathway that is induced by CCR1-dependent chemokines. J Cell Physiol. 2007;211:630–7.
35. Howley BV, Link LA, Grelet S, El-Sabban M, Howe PH. A CREB3-regulated ER–Golgi trafficking signature promotes metastatic progression in breast cancer. Oncogene. 2018;37:1308–25.
36. Chan CP, Kok KH, Jin DY. CREB3 subfamily transcription factors are not created equal: recent insights from global analyses and animal models. Cell Biosci. 2011;1:6.
37. Taniguchi M, Yoshida H. TFE3, HSP47, and CREB3 pathways of the mammalian golgi stress response. Cell Struct Funct. 2017;42:27–36.
38. Murakami T, Saito A, Hino S, Kondo S, Kanemoto S, Chihara K, et al. Signalling mediated by the endoplasmic reticulum stress transducer OASIS is involved in bone formation. Nat Cell Biol. 2009;11:1205–11.
39. Chen Q, Lee CE, Denard B, Ye J. Sustained induction of collagen synthesis by TGF-β requires regulated intramembrane proteolysis of CREB3L1. PLoS ONE. 2014;9:e108528.
40. Symoens S, Malfait F, D'hondt S, Callewaert B, Dheedene A, Steyaert W, et al. Deficiency for the ER-stress transducer OASIS causes severe recessive osteogenesis imperfecta in humans. Orphanet J Rare Dis. 2013;8:154.
41. Keller RB, Tran TT, Pyott SM, Pepin MG, Savarirayan R, McGillivray G, et al. Monoallelic and biallelic CREB3L1 variant causes mild and severe osteogenesis imperfecta, respectively. Genet Med. 2018;20:411–9.
42. Guillemyn B, Kayserili H, Demuynck L, Sips P, De Paepe A, Syx D, et al. A homozygous pathogenic missense variant broadens the phenotypic and mutational spectrum of CREB3L1-related osteogenesis imperfecta. Hum Mol Genet. 2019;28:1801–9.
43. Saito A, Hino S-i, Murakami T, Kanemoto S, Kondo S, Saitoh M, et al. Regulation of endoplasmic reticulum stress response by a BBF2H7-mediated Sec23a pathway is essential for chondrogenesis. Nat Cell Biol. 2009;11:1197–204.
44. Saito A, Hizukuri Y, Matsuo E-i, Chiba S, Mori H, Nishimura O, et al. Post-liberation cleavage of signal peptides is catalyzed by the site-2 protease (S2P) in bacteria. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108:13740–5.
45. Ishikura-Kinoshita S, Saeki H, Tsuji-Naito K. BBF2H7-mediated Sec23A pathway is required for endoplasmic reticulum-to-Golgi trafficking in dermal fibroblasts to promote collagen synthesis. J Invest Dermatol. 2012;132:2010–8.
46. Omori Y, Imai J, Watanabe M, Komatsu T, Suzuki Y, Kataoka K, et al. CREB-H: a novel mammalian transcription factor belonging to the CREB/ATF family and functioning via the box-B element with a liver-specific expression. Nucleic Acids Res. 2001;29:2154–62.
47. Luebke-Wheeler J, Zhang K, Battle M, Si-Tayeb K, Garrison W, Chhinder S, et al. Hepatocyte nuclear factor 4alpha is implicated in endoplasmic reticulum stress-induced acute phase response by regulating

expression of cyclic adenosine monophosphate responsive element binding protein H. Hepatology. 2008;48:1242–50.
48. Jin Z, Chen Y, Weng X, Huang A, Lin S, Li H. Cleavage of cyclic AMP-responsive element-binding protein H aggravates myocardial hypoxia reperfusion injury in a hepatocyte-myocardial cell co-culture system. J Int Med Res. 2020;48:300060520904835.
49. Jang WG, Kim EJ, Koh JT. Tunicamycin negatively regulates BMP2-induced osteoblast differentiation through CREBH expression in MC3T3E1 cells. BMB Rep. 2011;44:735–40.
50. Jang WG, Jeong BC, Kim EJ, Choi H, Oh SH, Kim DK, et al. Cyclic AMP response element-binding protein H (CREBH) mediates the inhibitory actions of tumor necrosis factor α in osteoblast differentiation by stimulating Smad1 degradation. J Biol Chem. 2015;290:13556–66.
51. Kim JH, Kim K, Kim I, Seong S, Nam K-I, Kim KK, et al. Endoplasmic reticulum–bound transcription factor CREBH stimulates RANKL-induced osteoclastogenesis. J Immunol. 2018;200:1661–70.
52. Adham IM, EckTJ, Mierau K, Müller N, Sallam MA, Paprotta I, et al. Reduction of spermatogenesis but not fertility in Creb3l4-deficient mice. Mol Cell Biol. 2005;25:7657–64.
53. El-Alfy M, Azzi L, Lessard J, Lavergne E, Pelletier M, Labrie C. Stage-specific expression of the Atce1/Tisp40alpha isoform of CREB3L4 in mouse spermatids. J Androl. 2006;27:686–94.
54. Nagamori I, Yomogida K, Ikawa M, Okabe M, Yabuta N, Nojima H. The testes-specific bZip type transcription factor Tisp40 plays a role in ER stress responses and chromatin packaging during spermiogenesis. Genes Cells. 2006;11:1161–71.
55. Ben Aicha S, Lessard J, Pelletier M, Fournier A, Calvo E, Labrie C. Transcriptional profiling of genes that are regulated by the endoplasmic reticulum-bound transcription factor AIbZIP/CREB3L4 in prostate cells. Physiol Genomics. 2007;31:295–305.
56. Cui X, Cui M, Asada R, Kanemoto S, Saito A, Matsuhisa K, et al. The androgen-induced protein AIbZIP facilitates proliferation of prostate cancer cells through downregulation of p21 expression. Sci Rep. 2016;6:37310.
57. Kim TH, Jo SH, Choi H, Park JM, Kim MY, Nojima H, et al. Identification of Creb3l4 as an essential negative regulator of adipogenesis. Cell Death Dis. 2014;5:e1527.
58. Pu Q, Lu L, Dong K, Geng W-w, Lv Y-r, Gao H-d. The novel transcription factor CREB3L4 contributes to the progression of human breast carcinoma. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2020;25:37–50.
59. Ye J, Davé UP, Grishin NV, Goldstein JL, Brown MS. Asparagine-proline sequence within membrane-spanning segment of SREBP triggers intramembrane cleavage by Site-2 protease. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97:5123–8.
60. Cheng D, Espenshade PJ, Slaughter CA, Jaen JC, Brown MS, Goldstein JL. Secreted site-1 protease cleaves peptides corresponding to luminal loop of sterol regulatory element-binding proteins. J Biol Chem. 1999;274:22805–12.
61. Kinch LN, Ginalski K, Grishin NV. Site-2 protease regulated intramembrane proteolysis: sequence homologs suggest an ancient signaling cascade. Protein Sci. 2006;15:84–93.
62. Harris BZ, Lim WA. Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. J Cell Sci. 2001;114:3219–31.
63. Schneider JS, Reddy SP, Evans HW, Glickman MS. Site-2 protease substrate specificity and coupling in trans by a PDZ-substrate adapter protein. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110:19543–8.
64. Ha Y. Structure and mechanism of intramembrane protease. Sem Cell Dev Biol. 2009;20:240–50.
65. Feng L, Yan H, Wu Z, Yan N, Wang Z, Jeffrey PD, et al. Structure of a site-2 protease family intramembrane metalloprotease. Science. 2007;318:1608–12.
66. Duncan EA, Davé UP, Sakai J, Goldstein JL, Brown MS. Second-site cleavage in sterol regulatory element-binding protein occurs at transmembrane junction as determined by cysteine panning. J Biol Chem. 1998;273:17801–9.
67. English AC, Done SH, Caves LSD, Groom CR, Hubbard RE. Locating interaction sites on proteins: the crystal structure of thermolysin soaked in 2% to 100% isopropanol. Protein Struct Funct Genet. 1999;37:628–40.
68. Düsterhöft S, Künzel U, Freeman M. Rhomboid proteases in human disease: mechanisms and future prospects. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res. 2017;1864:2200–9.
69. MacLeod J. Three cases of 'ichthyosis follicularis' associated with baldness. Br J Dermatol. 1909;21:165–89.
70. Sato-Matsumura KC, Matsumura T, Kumakiri M, Hosokawa K, Nakamura H, Kobayashi H, et al. Ichthyosis follicularis with alopecia and photophobia in a mother and daughter. Br J Dermatol. 2000;142:157–62.
71. Cambiaghi S, Barbareschi M, Tadini G. Ichthyosis follicularis with atrichia and photophobia (IFAP) syndrome in two unrelated female patients. J Am Acad Dermatol. 2002;46:S156–8.
72. Wang H, Humbatova A, Liu Y, Qin W, Lee M, Cesarato N, et al. Mutations in SREBF1, encoding sterol regulatory element binding transcription factor 1, cause autosomal-dominant IFAP syndrome. Am J Hum Genet. 2020;107:34–45.
73. König A, Happle R. Linear lesions reflecting lyonization in women heterozygous for IFAP syndrome (ichthyosis follicularis with atrichia and photophobia). Am J Med Genet. 1999;85:365–8.
74. Wang HJ, Tang ZL, Lin ZM, Dai LL, Chen Q, Yang Y. Recurrent splice-site mutation in MBTPS2 underlying IFAP syndrome with Olmsted syndrome-like features in a Chinese patient. Clin Exp Dermatol. 2014;39:158–61.
75. Mégarbané H, Mégarbané A. Ichthyosis follicularis, alopecia, and photophobia (IFAP) syndrome. Orphanet J Rare Dis. 2011;6:29.
76. Martino F, D'Eufemia P, Pergola MS, Finocchiaro R, Celli M, Giampà G, et al. Child with manifestations of dermotrichic syndrome and ichthyosis follicularis-alopecia-photophobia (IFAP) syndrome. Am J Med Genet. 1992;44:233–6.
77. Corujeira S, Águeda S, Monteiro G, Canelhas A, Sampaio M, Rocha R, et al. Expanding the phenotype of IFAP/BRESECK syndrome: A new case with severe hypogammaglobulinemia. Eur J Med Genet. 2013;56:603–5.
78. Oeffner F, Fischer G, Happle R, König A, Betz RC, Bornholdt D, et al. IFAP syndrome is caused by deficiency in MBTPS2, an intramembrane zinc metalloprotease essential for cholesterol homeostasis and ER stress response. Am J Hum Genet. 2009;84:459–67.
79. Bornholdt D, Atkinson TP, Bouadjar B, Catteau B, Cox H, De Silva D, et al. Genotype-phenotype correlations emerging from the identification of missense mutations in MBTPS2. Hum Mutat. 2013;34:587–94.
80. Jiang Y, Jin H, Zeng Y. A novel mutation in MBTPS2 causes ichthyosis follicularis, alopecia, and photophobia syndrome. Mol Genet Genomic Med. 2019;7:e812.
81. Tang L, Liang J, Wang W, Yu L, Yao Z. A novel mutation in MBTPS2 causes a broad phenotypic spectrum of ichthyosis follicularis, atrichia, and photophobia syndrome in a large Chinese family. J Am Acad Dermatol. 2011;64:716–22.
82. Pietrzak A, Kanitakis J, Staśkiewicz G, Sobczyńska-Tomaszewska A, Dybiec E, Szumiło J, et al. IFAP syndrome with severe cutaneous, neurologic and skeletal manifestations due to a novel MBTPS2 mutation in a Polish patient. Eur J Dermatol. 2012;22:467–72.
83. Izumi K, Wilkens A, Treat JR, Pride HB, Krantz ID. Novel MBTPS2 missense mutation in the N-terminus transmembrane domain in a patient with ichthyosis follicularis, alopecia, and photophobia Syndrome. Pediatr Dermatol. 2013;30:e263–4.
84. Nakayama J, Iwasaki N, Shin K, Sato H, Kamo M, Ohyama M, et al. A Japanese case of ichthyosis follicularis with atrichia and photophobia syndrome with an MBTPS2 mutation. J Hum Genet. 2011;56:250–2.
85. Naiki M, Mizuno S, Yamada K, Yamada Y, Kimura R, Oshiro M, et al. MBTPS2 mutation causes BRESEK/BRESHECK syndrome. Am J Med Genet A. 2012;158a:97–102.
86. Reish O, Gorlin RJ, Hordinsky M, Rest EB, Burke B, Berry SA. Brain anomalies, retardation of mentality and growth, ectodermal dysplasia, skeletal malformations, Hirschsprung disease, ear deformity and deafness, eye hypoplasia, cleft palate, cryptorchidism, and kidney dysplasia/hypoplasia (BRESEK/BRESHECK): new X-linked syndrome? Am J Med Genet. 1997;68:386–90.
87. Aten E, Brasz LC, Bornholdt D, Hooijkaas IB, Porteous ME, Sybert VP, et al. Keratosis Follicularis Spinulosa Decalvans is caused by mutations in MBTPS2. Hum Mutat. 2010;31:1125–33.
88. Siemens. Keratosis follicularis spinulosa decalvans. Arch Dermatol Syph. 1926;151:384–6.
89. Porteous ME, Strain L, Logie LJ, Herd RM, Benton EC. Keratosis follicularis spinulosa decalvans: confirmation of linkage to Xp221.3-p22.2. J Med Genet. 1998;35:336–7.

90. Baden HP, Byers HR. Clinical findings, cutaneous pathology, and response to therapy in 21 patients with keratosis pilaris atrophicans. Arch Dermatol. 1994;130:469–75.
91. Castori M, Covaciu C, Paradisi M, Zambruno G. Clinical and genetic heterogeneity in keratosis follicularis spinulosa decalvans. Eur J Med Genet. 2009;52:53–8.
92. Fong K, Wedgeworth EK, Lai-Cheong JE, Tosi I, Mellerio JE, Powell AM, et al. MBTPS2 mutation in a British pedigree with keratosis follicularis spinulosa decalvans. Clin Exp Dermatol. 2012;37:631–4.
93. Zhang J, Wang Y, Cheng R, Ni C, Liang J, Li M, et al. Novel MBTPS2 missense mutation causes a keratosis follicularis spinulosa decalvans phenotype: mutation update and review of the literature. Clin Exp Dermatol. 2016;41:757–60.
94. Chen C, Xu C, Li H, Jia M, Tang S. Novel mutation in MBTPS2 causes keratosis follicularis spinulosa decalvans in a large Chinese family. Int J Dermatol. 2019;58:493–6.
95. Olmsted HC. Keratodermia palmaris et plantaris congenitalis: Report of a case showing associated lesions of unusual location. Am J Dis Child. 1927;33:757–64.
96. Frias-Iniesta J, Sanchez-Pedreño P, Martinez-Escribano JA, Jimenez-Martinez A. Olmsted syndrome: report of a new case. Br J Dermatol. 1997;136:935–8.
97. Mevorah B, Goldberg I, Sprecher E, Bergman R, Metzker A, Luria R, et al. Olmsted syndrome: mutilating palmoplantar keratoderma with periorificial keratotic plaques. J Am Acad Dermatol. 2005;53:S266–72.
98. Elise Tonoli R, De Villa D, Hübner Frainer R, Pizzarro Meneghello L, Ricachnevsky N, de Quadros M. Olmsted syndrome. Case Rep Dermatol Med. 2012;2012:927305.
99. Haghighi A, Scott CA, Poon DS, Yaghoobi R, Saleh-Gohari N, Plagnol V, et al. A missense mutation in the MBTPS2 gene underlies the X-linked form of Olmsted syndrome. J Invest Dermatol. 2013;133:571–3.
100. Duchatelet S, Guibbal L, de Veer S, Fraitag S, Nitschké P, Zarhrate M, et al. Olmsted syndrome with erythromelalgia caused by recessive transient receptor potential vanilloid 3 mutations. Br J Dermatol. 2014;171:675–8.
101. Eytan O, Fuchs-Telem D, Mevorach B, Indelman M, Bergman R, Sarig O, et al. Olmsted syndrome caused by a homozygous recessive mutation in TRPV3. J Invest Dermatol. 2014;134:1752–4.
102. Cao X, Wang H, Li Y, Lee M, Jiang L, Zhou Y, et al. Semidominant inheritance in olmsted syndrome. J Invest Dermatol. 2016;136:1722–5.
103. Lin Z, Chen Q, Lee M, Cao X, Zhang J, Ma D, et al. Exome sequencing reveals mutations in TRPV3 as a cause of Olmsted syndrome. Am J Hum Genet. 2012;90:558–64.
104. Nemer G, Safi R, Kreidieh F, Usta J, Bergqvist C, Ballout F, et al. Understanding the phenotypic similarities between IFAP and Olmsted syndrome from a molecular perspective: the interaction of MBTPS2 and TRPV3. Arch Dermatol Res. 2017;309:637–43.
105. Yaghoobi R, Omidian M, Sina N, Abtahian SA, Panahi-Bazaz MR. Olmsted syndrome in an Iranian family: report of two new cases. Arch Iran Med. 2007;10:246–9.
106. Ni C, Yan M, Zhang J, Cheng R, Liang J, Deng D, et al. A novel mutation in TRPV3 gene causes atypical familial Olmsted syndrome. Sci Rep. 2016;6:21815.
107. Byers PH, Steiner RD. Osteogenesis imperfecta. Annu Rev Med. 1992;43:269–82.
108. Marini JC, Forlino A, Bächinger HP, Bishop NJ, Byers PH, Paepe A, et al. Osteogenesis imperfecta. Nat Rev Dis Primers. 2017;3:17052.
109. Intarak N, Budsamongkol T, Theerapanon T, Chanamuangkon T, Srijunbarl A, Boonprakong L, et al. Tooth ultrastructure of a novel COL1A2 mutation expanding its genotypic and phenotypic spectra. Oral Dis. 2020. https://doi.org/10.1111/odi.13657.
110. Tongkobpetch S, Limpaphayom N, Sangsin A, Porntaveetus T, Suphapeetiporn K, Shotelersuk V. A novel de novo COL1A1 mutation in a Thai boy with osteogenesis imperfecta born to consanguineous parents. Genet Mol Biol. 2017;40:763–7.
111. Udomchaiprasertkul W, Kuptanon C, Porntaveetus T, Shotelersuk V. A family with homozygous and heterozygous p.Gly337Ser mutations in COL1A2. Eur J Med Genet. 2020;63:103896.
112. Budsamongkol T, Intarak N, Theerapanon T, Yodsanga S, Porntaveetus T, Shotelersuk V. A novel mutation in COL1A2 leads to osteogenesis imperfecta/Ehlers-Danlos overlap syndrome with brachydactyly. Genes Dis. 2019;6:138–46.
113. Van Dijk FS, Nesbitt IM, Nikkels PG, Dalton A, Bongers EM, van de Kamp JM, et al. CRTAP mutations in lethal and severe osteogenesis imperfecta: the importance of combining biochemical and molecular genetic analysis. Eur J Hum Genet. 2009;17:1560–9.
114. Van Dijk FS, Nesbitt IM, Zwikstra EHV, Nikkels PG, Piersma SR, Fratantoni SA, et al. PPIB mutations cause severe osteogenesis imperfecta. Am J Hum Genet. 2009;85:521–7.
115. Baldridge D, Schwarze U, Morello R, Lennington J, Bertin TK, Pace JM, et al. CRTAP and LEPRE1 mutations in recessive osteogenesis imperfecta. Hum Mutat. 2008;29:1435–42.
116. Christiansen HE, Schwarze U, Pyott SM, AlSwaid A, Al Balwi M, Alrasheed S, et al. Homozygosity for a missense mutation in SERPINH1, which encodes the collagen chaperone protein HSP47, results in severe recessive osteogenesis imperfecta. Am J Hum Genet. 2010;86:389–98.
117. Moosa S, Chung BH, Tung JY, Altmüller J, Thiele H, Nürnberg P, et al. Mutations in SEC24D cause autosomal recessive osteogenesis imperfecta. Clin Genet. 2016;89:517–9.
118. Syx D, Guillemyn B, Symoens S, Sousa AB, Medeira A, Whiteford M, et al. Defective proteolytic processing of fibrillar procollagens and prodecorin due to biallelic BMP1 mutations results in a severe, progressive form of osteogenesis imperfecta. J Bone Miner Res. 2015;30:1445–56.
119. Sangsin A, Kuptanon C, Srichomthong C, Pongpanich M, Suphapeetiporn K, Shotelersuk V. Two novel compound heterozygous BMP1 mutations in a patient with osteogenesis imperfecta: a case report. BMC Med Genet. 2017;18:25.
120. Kuptanon C, Srichomthong C, Sangsin A, Kovitvanitcha D, Suphapeetiporn K, Shotelersuk V. The most 5′truncating homozygous mutation of WNT1 in siblings with osteogenesis imperfecta with a variable degree of brain anomalies: a case report. BMC Med Genet. 2018;19:117.
121. Porntaveetus T, Theerapanon T, Srichomthong C, Shotelersuk V. Cole-Carpenter syndrome in a patient from Thailand. Am J Med Genet A. 2018;176:1706–10.
122. Tongkobpetch S, Rungsiwiwut R, Pruksananonda K, Suphapeetiporn K, Shotelersuk V. Generation of two human iPSC lines (MDCUi001-A and MDCUi001-B) from dermal fibroblasts of a Thai patient with X-linked osteogenesis imperfecta using integration-free Sendai virus. Stem Cell Res. 2019;39:101493.
123. Guan M, Fousek K, Jiang C, Guo S, Synold T, Xi B, et al. Nelfinavir induces liposarcoma apoptosis through inhibition of regulated intramembrane proteolysis of SREBP-1 and ATF6. Clin Cancer Res. 2011;17:1796–806.
124. Guan M, Fousek K, Chow WA. Nelfinavir inhibits regulated intramembrane proteolysis of sterol regulatory element binding protein-1 and activating transcription factor 6 in castration-resistant prostate cancer. Febs j. 2012;279:2399–411.
125. Guan M, Su L, Yuan YC, Li H, Chow WA. Nelfinavir and nelfinavir analogs block site-2 protease cleavage to inhibit castration-resistant prostate cancer. Sci Rep. 2015;5:9698.
126. Madeira F, Park YM, Lee J, Buso N, Gur T, Madhusoodanan N, et al. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. Nucleic Acids Res. 2019;47:W636–41.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

frontiers in Physiology

ORIGINAL RESEARCH
published: 19 November 2020
doi: 10.3389/fphys.2020.573214

Phenotypic and Genotypic Features of Thai Patients With Nonsyndromic Tooth Agenesis and *WNT10A* Variants

Charinya Kanchanasevee[1], Kanokwan Sriwattanapong[2], Thanakorn Theerapanon[2], Sermporn Thaweesapphithak[3], Wanna Chetruengchai[4,5], Thantrira Porntaveetus[2] and Vorasuk Shotelersuk[4,5]*

[1] Geriatric Dentistry and Special Patients Care International Program, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, [2] Genomics and Precision Dentistry Research Unit, Department of Physiology, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, [3] Center of Excellence for Regenerative Dentistry, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, [4] Center of Excellence for Medical Genomics, Medical Genomics Cluster, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, [5] Excellence Center for Genomics and Precision Medicine, King Chulalongkorn Memorial Hospital, Thai Red Cross Society, Bangkok, Thailand

OPEN ACCESS

Edited by:
Maisa Hanna-Maija Seppala, King's College London, United Kingdom

Reviewed by:
Dong Han, Peking University Hospital of Stomatology, China
Mushriq Abid, University of Baghdad, Iraq

***Correspondence:**
Thantrira Porntaveetus
thantrira.p@chula.ac.th
orcid.org/0000-0003-0145-9801

Specialty section:
This article was submitted to Craniofacial Biology and Dental Research, a section of the journal Frontiers in Physiology

Received: *16 June 2020*
Accepted: *27 October 2020*
Published: *19 November 2020*

Citation:
Kanchanasevee C, Sriwattanapong K, Theerapanon T, Thaweesapphithak S, Chetruengchai W, Porntaveetus T and Shotelersuk V (2020) Phenotypic and Genotypic Features of Thai Patients With Nonsyndromic Tooth Agenesis and WNT10A Variants. Front. Physiol. 11:573214. doi: 10.3389/fphys.2020.573214

Tooth agenesis is one of the most common orodental anomalies that demonstrate phenotypic and genotypic heterogeneity with a prevalence of 2.5%–7%. Mutations in *WNT10A* have been proposed to be the most common cause of nonsyndromic tooth agenesis (NSTA). The aim of this study was to characterize the dental features and genetic variants of NSTA in a Thai population. We recruited 13 unrelated patients with NSTA who attended the Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Thailand, from 2017 to 2019. All 13 underwent whole exome sequencing that identified likely pathogenic genetic variants, all in *WNT10A*, in five patients. All five patients had second premolar agenesis, while three also had absent or peg-shaped upper lateral incisors. Patient 1 possessed a novel heterozygous duplication, c.916_918dupAAC (p.Asn306dup) in *WNT10A*. Patients 2 and 3 harbored a heterozygous and homozygous c.637G > A (p.Gly213Ser) in *WNT10A*, respectively. Patients 4 possessed a heterozygous c.511C > T (p.Arg171Cys) in *WNT10A*. Patient 5 harbored a homozygous c.511C > T (p.Arg171Cys) in *WNT10A* and a novel heterozygous c.413A > T (p.Asn138Ile) in *EDARADD*, suggesting digenic inheritance. We recruited another 18 family members of these five patients. Out of 23 participants, homozygous *WNT10A* variants were identified in 2 patients and heterozygous variants in 17 individuals. Both homozygous patients had NSTA. Eight out of 17 heterozygous individuals (8/17) had NSTA or a peg-shaped lateral incisor, indicating a 47% penetrance of the heterozygous variants or 53% (10/19) penetrance of either homozygous or heterozygous variants in *WNT10A*. The frequencies of the c.511C > T in our in-house 1,876 Thai exome database, Asian populations, and non-Asian populations were 0.016, 0.005–0.033, and 0.001, respectively; while those of the c.637G > A were 0.016, 0.004–0.029, and 0.000, respectively. In conclusion, our study reports two novel variants with one each in *WNT10A* and *EDARADD*, expanding the genotypic spectra of NSTA. Second premolar

agenesis is a common phenotype in affected individuals with variants in *WNT10A*; however, its penetrance is incomplete. Lastly, the different frequencies of *WNT10A* variants, c.511C > T and c.637G > A, in diverse populations might contribute to the prevalence range of NSTA between continents.

Keywords: hypodontia, oligodontia, nonsynonymous, homozygous, heterozygous, ectoderm

INTRODUCTION

Tooth agenesis is the most common developmental dental anomaly in humans with a prevalence between 2.5 and 7% (Polder et al., 2004; Khalaf et al., 2014). Missing less than 6 teeth is called hypodontia, agenesis of 6 or more teeth is called oligodontia, and the complete absence of teeth is called anodontia. Multiple signaling pathways, including bone morphogenic protein, fibroblast growth factor, sonic hedgehog, and wingless (WNT), play important roles in the epithelial-mesenchymal interactions during tooth development. WNT/β-catenin signaling is involved from the early to late stages of tooth formation (Liu et al., 2008; Porntaveetus et al., 2012; Intarak et al., 2018). Among *WNT* family members, mutations in *WNT10A* (OMIM *606268) are predominantly related to tooth agenesis (TA) involving both nonsyndromic/isolated/selective tooth agenesis (NSTA/STHAG4, MIM #150400) and syndromic tooth agenesis, such as odontoonychodermal dysplasia (MIM #257980) and Schopf-Schulz-Passarge syndrome (MIM #224750).

Population-based studies have revealed that 28%–62% of tooth agenesis patients have with *WNT10A* variants (van den Boogaard et al., 2012; Mostowska et al., 2013; Arzoo et al., 2014). Heterozygous, homozygous, and compound heterozygous forms of *WNT10A* were associated with NSTA with phenotypic heterogeneity. Using *WNT10A* target sequencing, significantly elevated frequencies of *WNT10A* variants were observed in the tooth agenesis group compared with the control group (Song et al., 2014; Machida et al., 2017). Biallelic *WNT10A* variants were proposed to be a pathogenic factor for tooth agenesis with complete penetrance, while a single allelic variant, presenting in a significantly higher frequency in tooth agenesis patients, was considered to be a predisposing factor for tooth agenesis with reduced penetrance (Mues et al., 2014; Guazzarotti et al., 2018). These findings prompted us to investigate the dental phenotype and genotype in Thai patients with NSTA and determine the allele frequencies of *WNT10A* in Thais compared with Asian and non-Asian populations.

MATERIALS AND METHODS

Subject Enrollment

The study protocol was approved by the Institutional Review Board (HREC-DCU 2018-091), Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University and complied with the Declaration of Helsinki. Written informed consents were obtained prior to the patients' participation in this study. Thirteen unrelated patients with NSTA who attended the Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Thailand between January 2017 and March 2019 and their family member were recruited. Clinical and radiographic examinations, dental history, and intraoral photographs of the probands were used to assess tooth agenesis. The size and shape of the remaining teeth were also observed. The patients did not have any signs or symptoms related to ectodermal organ defects, e.g. intolerance to heat, dry skin, abnormal sweating, sparse hair, or brittle nails (Bergendal et al., 2006). The dental phenotypes of the probands' family members were obtained from clinical and radiographic examinations, dental records, or participant interviews.

Mutation Analyses

Genomic DNA extracted from peripheral blood leukocytes was subjected to mutation analysis using whole exome sequencing (WES) (Porntaveetus et al., 2018). Briefly, genomic DNA was captured using a SureSelect Human All Exon version 4 kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, United States) and sequenced using Hiseq2000 (Macrogen, Seoul, South Korea). The sequences were aligned to the human genome reference sequence[1] using the Burrows-Wheeler Aligner[2]. Downstream processing was performed with SAMtools[3] and annotated against the dbSNP and 1000 Genomes. After quality filtering, the variants were screened using the genes listed in HP: 0009804 (reduced number of teeth) in Human Phenotype Ontology (Köhler et al., 2018). All calls with a coverage < 10×, minor allele frequency > 5% in the 1000 Genomes Project, Genome Aggregation Database (gnomAD[4]), and our in-house database of 1,876 Thai exomes; non-coding variants; and synonymous exonic variants were filtered out. The identified variants were confirmed by Sanger sequencing (**Supplementary Table 1**). The alignment and conservation of amino acid residues were generated by Clustal Omega (Madeira et al., 2019).

Allele frequencies of *WNT10A* variants were screened with multiple variant databases comprising the Genome Aggregation Database (gnomAD), GenomeAsia100K consortium, Northeast Asian Reference Database (NARD), Han Chinese genome project (PGG.Han), 4.7K Japanese individual genome variation (4.7KJPN), Human Genetic Variation Database (HGVD), Korean Variant Archive (KOVA), and our in-house database, last access on June 3, 2020.

Bioinformatics tools consisting of PolyPhen-2 (Adzhubei et al., 2010), SIFT (Kumar et al., 2009), MutationTaster

[1]UCSC Genome Browser, hg19
[2]http://bio-bwa.sourceforge.net/
[3]samtools.sourceforge.net/
[4]gnomad.broadinstitute.org



FIGURE 1 | Family pedigrees and genetic variants. Arrow indicates the proband. Tooth phenotypes of the participants were determined either by the dentist or reported by the participants. W+/+, homozygous *WNT10A* variant; W+/-, heterozygous *WNT10A* variant; W+/+, wild-type *WNT10A* variant; E+/+, homozygous *EDARADD* variant; E+/-, heterozygous *EDARADD* variant; E+/+, wild-type *EDARADD* variant.

(Schwarz et al., 2014), and CADD (Rentzsch et al., 2018) were used to predict each variant's pathogenicity.

RESULTS

We performed WES for 13 unrelated patients with NSTA during 2017–2019 and detected variants related to tooth agenesis (HP: 0009804) in five patients. All five patients (Patients 1–5) possessed variants in *WNT10A* (NM_025216.3). We then recruited 18 additional family members of these 5 index patients, characterized their dental phenotype, and performed Sanger sequencing (**Figure 1** and **Supplementary Figure 1**).

Patient 1, a 16-year-old female, lacked nine permanent teeth, all premolars and the lower right first molar. The lower left second molar was extracted due to pulp necrosis. Oral examination revealed that she had peg-shaped upper lateral incisors, severely hypoplastic edentulous ridges, anterior deep bite, and malocclusion. WES identified that the patient possessed a novel heterozygous duplication, c.916_918dupAAC (p.Asn306dup), in *WNT10A* (ClinVar SCV001335264). This variant was detected in the patient's mother and grandmother who had NSTA, and in the unaffected half aunt.

Patient 2, a 27-year-old female, had 6 missing teeth, 4 upper premolars, and 2 lower third molars. The known heterozygous missense mutation, c.637G > A (p.Gly213Ser), in *WNT10A* was identified in the patient, and in the patient's father and two sisters who reported no missing teeth. The mothers had biallelic wild-type alleles.

Patient 3, a 28-year-old male, had 12 missing teeth comprising an upper right canine, 3 first premolars, 4 second premolars, and 4 third molars. The homozygous mutation, c.637G > A (p.Gly213Ser), in *WNT10A* was identified in the patient. The *WNT10A* heterozygous c.637G > A (p.Gly213Ser) variant was

detected in the patient's older sister who was missing her 4 second premolars, and the younger sister, father, and mother who did not have any teeth missing.

Patient 4, a 31-year-old female, was missing her 2 lower second premolars and peg-shaped upper lateral incisors. Her deciduous lower right and left second molars were retained. Four third molars were previously extracted. The known heterozygous missense variant, c.511C > T (p.Arg171Cys), in *WNT10A* was detected in the patient, and in the patient's older sister and mother who did not have tooth agenesis. The father possessed wild-type alleles.

Patient 5, a 34-year-old male, had agenesis of 8 permanent teeth, 2 upper lateral incisors, 2 right second premolars, and 4 third molars. He had implant replacements at the upper right lateral incisor and lower right second premolar. The homozygous missense variant, c.511C > T (p.Arg171Cys) in *WNT10A* and a novel heterozygous missense variant, c.413A > T (p.Asn138Ile), in *EDARADD* (Clinvar SCV001335265) was identified in the patient. The heterozygous *WNT10A* c.511C > T variant was also detected in the patient's older sister who was missing two upper lateral incisors and two lower third molars and the mother who had peg-shaped upper lateral incisors. The heterozygous *EDARADD* c.413A > T variant was present in the patient's older brother, but not in the sister and mother.

In Patients 1–5, the number of missing teeth was between 2 and 12 or between 2 and 9 teeth (excluding the third molars). An absent second premolar or peg-shaped upper lateral incisor was frequently observed in the patients (**Table 1**).

We used several bioinformatic tools to predict the pathogenicity of the variants. We found that the *WNT10A* c.511C > T (p.Arg171Cys) was predicted to be deleterious (CADD: 25.6), deleterious (SIFT: 0.0), possibly damaging (PolyPhen-2: 0.93), and disease causing (MutationTaster). The *WNT10A* c.637G > A (p.Gly213Ser) was predicted to be deleterious (CADD: 27.2), deleterious (SIFT: 0.0), probably damaging (PolyPhen-2: 1.0), and disease causing (MutationTaster). Furthermore, the *EDARADD* c.413A > T (p.Asn138Ile) was predicted to be deleterious (CADD: 27.3), deleterious (SIFT: 0.0), possibly damaging (PolyPhen: 1.0), and disease causing (MutationTaster).

The amino acid residues; p.Arg171, p.Gly213, and p.Asn306 in WNT10A, and p.Asn128 in EDARADD are conserved among multiple species (**Supplementary Figure 2**). According to the ACMG standards and guidelines, the *WNT10A* c.511C > T and c.637G > A and the *EDARADD* c.413A > T variants are considered to be likely pathogenic, while the *WNT10A* c.916_918dupAAC variant is considered as uncertain significance (Richards et al., 2015).

Eighteen members of the five index patients' families (23 total) were included. Out of the 23 participants, the homozygous *WNT10A* variants were identified in 2 patients (3.II.2 and 5.II.3) and the heterozygous variants in 17 individuals. Both homozygous patients had nonsyndromic tooth agenesis (NSTA). Eight (1.I.2, 1.II.2, 1.III.1, 2.II.1, 3.II.1, 4.II.2, 5.I.2, and 5.II.2) out of 17 heterozygous individuals (8/17) had NSTA or a peg-shaped lateral incisor, indicating a 47% penetrance of the heterozygous variants, or a 53% (10/19) penetrance of either homozygous or heterozygous variants in *WNT10A*.

We screened the frequencies of the *WNT10A* c.511C > T and c.637G > A variants in multiple variant databases comprising the Genome Aggregation Database (gnomAD), GenomeAsia100K consortium, Northeast Asian Reference Database (NARD), Han Chinese genome project (PGG.Han), 4.7K Japanese individual genome variation (4.7KJPN), Human Genetic Variation Database (HGVD), Korean Variant Archive (KOVA), and our in-house database. The allele frequencies of *WNT10A* c.511C > T and c.637G > A in Asian populations was between 0.005 and 0.033 and between 0.004 and 0.029, respectively. In our in-house database (ThWES) of 1,876 Thai exomes, the frequency of c.511C > T variant was 0.016 and that of c.637G > A variant was 0.016, which were in the Asian population ranges. In contrast, the frequency of the c.511C > T variant was 0.001 and that of the c.637G > A variant was and 0.000 in non-Asian populations (**Table 2**). These results indicate that the WNT10A c.511C > T and c.637G > A variants are common and concentrated in Asian populations compared with non-Asian populations.

DISCUSSION

In this study, we identified five index patients having NSTA and variants in *WNT10A*. Eighteen more family members were included. The number of missing teeth observed ranged from 2 to 12 teeth or 2 to 9 teeth, excluding third molars. *WNT10A* is the most common variant associated with NSTA (van den Boogaard et al., 2012; Mostowska et al., 2013; Arzoo et al., 2014). Here, we identified that all five patients possessed *WNT10A* variants. The novel heterozygous duplication, c.916_918dupAAC (p.Asn306dup), was identified in Patient 1. The heterozygous state of c.637G > A (p.Gly213Ser) variant was detected in Patient 2 and its homozygous state in Patient 3. The heterozygous state of c.511C > T (p.Arg171Cys) variant was detected in Patient 4 and its homozygous state was detected in Patient 5. The novel heterozygous c.413A > T (p.Asn138Ile) in *EDARADD* was observed in Patient 5.

The relationship between the heterozygous *WNT10A* variants (c.511C > T and c.637G > A) and NSTA was characterized in large well-phenotyped population cohorts (Song et al., 2014; Machida et al., 2017). Both variants were significantly associated with tooth agenesis compared with healthy control individuals. In other studies, the variants were shown to cause tooth agenesis with incomplete penetrance (He et al., 2013; Plaisancié et al., 2013; Kantaputra et al., 2014). Biallelic *WNT10A* variants were proposed to be the pathogenic factor for tooth agenesis with complete penetrance, while single allelic variants, presenting with a significantly higher frequency in tooth agenesis patients, were considered to be a predisposing factor for tooth agenesis with reduced penetrance (Mues et al., 2014; Guazzarotti et al., 2018). In addition, the phenotypic spectrum of *WNT10A* mutations was shown to be dose-dependent with variable expressivity, including within the same family (Park et al., 2019). Patients with biallelic *WNT10A* mutations had severe tooth agenesis,

TABLE 1 | The identified *WNT10A* variants in subjects with tooth agenesis or peg-shaped upper lateral incisors.

Family	Patient	Dental arch	Tooth															Number of missing teeth (excluding 3rd molars)	Mode	Mutation	Amino acid change
			8	7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7	8				
1	Patient 1	Upper				•	•		▫			▫		•	•							
		Lower			•	•	•							•	•		x		9	Het	c.916_918dup	p.Asn360dup
2	Patient 2	Upper				•	•							•	•							
		Lower	•															•	6 (4)	Het	c.637G > A	p.Gly213Ser
3	Patient 3	Upper	•			•	•	•						•	•			•				
		Lower	•			•								•	•			•	12 (8)	Homo	c.637G > A	p.Gly213Ser
	Patient 3's older sister	Upper				•									•							
		Lower	□			□								□	□			□	2	Het	c.637G > A	p.Gly213Ser
4	Patient 4	Upper							▫			▫										
		Lower				•									•				2	Het	c.511C > T	p.Arg171Cys
5	Patient 5[a]	Upper	•			•			■			■						•				
	(II.3)	Lower	•			•												•	8 (4)	Homo	c.511C > T	p.Arg171Cys
	Patient 5's sister	Upper							■			■										
	(II.2)	Lower	■			□												•	4 (2)	Het	c.511C > T	p.Arg171Cys
	Patient 5's mother	Upper							▫			▫										
	(I.2)	Lower																	0	Het	c.511C > T	p.Arg171Cys

1, central incisor; 2, lateral incisor; 3, canine; 4, first premolar; 5, second premolar; 6, first molar; 7, second molar; 8, third molar.; •, missing tooth; ■, missing upper lateral incisor; □, peg-shaped upper lateral incisors; x, extraction; NA, not available; Het, heterozygous; Homo, homozygous.
[a]The heterozygous missense variant, c.413A > T (p.Asn138Ile), in EDARADD was also found in Patient 5.

TABLE 2 | Allele frequencies and details of *WNT10A* c.511C > T (p.Arg171Cys) and c.637G > A (p.Gly213Ser) variants.

	rs116998555 c.511C > T (p.Arg171Cys)				rs147680216 c.637G > A (p.Gly213Ser)			
Database	**Allele count**	**Allele number**	**Number of homozygotes**	**Allele frequency**	**Allele count**	**Allele number**	**Number of homozygotes**	**Allele frequency**
gnomAD (v2.1.1 and v3)								
East Asian	370	23084	3	0.016	657	22960	16	**0.029**
Non-East Asian	335	402864	1	0.001	22	400838	0	0.000
South Asian	51	33652	1	0.002	4	33616	0	0.000
African	32	67004	0	0.001	3	66550	0	0.000
Ashkenazi Jewish	0	13692	0	0.000	0	13646	0	0.000
European (Finnish)	13	35558	0	0.000	0	35046	0	0.000
European (non-Finnish)	223	193594	0	0.001	4	192768	0	0.000
Latino	6	49094	0	0.000	3	48994	0	0.000
Other	10	10270	0	0.001	8	10218	0	0.001
Total	705	425948	4	0.002	679	423798	16	0.002
GenomeAsia 100K								
Southeast Asia	4	692	0	0.006	3	692	0	**0.004**
Northeast Asia	5	702	0	0.007	10	702	0	0.014
South Asia	7	1448	0	**0.005**	0	1448	0	0.000
Other	0	636	0	0.000	0	636	0	0.000
Total	16	3478	0	0.005	13	3478	0	0.004
Northeast Asian Reference Database (NARD)	35	3558	NA	0.010	51	3558	NA	0.014
Han Chinese genome project (PGG.Han)	3596	107232	NA	**0.033**	1161	108146	NA	0.011
4.7K JPN (4,773 Japanese individuals)	NA	NA	NA	0.010	NA	NA	NA	0.015
HGVD (3,248 Japanese individuals)	36	2412	0	0.015	35	2388	0	0.015
Korean Variant Archive (KOVA) (1,055 healthy Korean individuals)	NA	NA	NA	0.019	NA	NA	NA	0.019
ThWES 1876 (In-house database of 1,876 Thai individuals)	58	3752	4	0.016	59	3752	0	0.016

JPN, Japanese individual genome variation; genomAD, Genome Aggregation Database; HGVD, Human Genetic Variation Database; NA, not available. Bold numbers indicate maximum and minimum allele frequencies in the column.

while heterozygous patients were either unaffected or had a mild tooth phenotype.

In our study, Patient 3 (3.II.2) and Patient 5 (5.II.3), who harbor the homozygous *WNT10A* c.637G > A and c.511C > T variants, respectively, have tooth agenesis and their phenotypes are more severe than the heterozygous individuals with the same variant. In our cohort, the heterozygous c.511C > T and c.637G > A variants demonstrated incomplete penetrance, which is consistent with previous reports. The evidence mentioned above suggests that the heterozygous *WNT10A* c.511C > T or c.637G > A allele can be a contributing factor for NSTA with low penetrance, while biallelic variants are associated with greater clinical severity. However, there might be other genetic or environmental factors influencing the phenotypic expression of NSTA patients.

Mutations in *EDARADD* (OMIM* 606603) are associated with autosomal dominant ectodermal dysplasia 11A (MIM# 614940) (Bal et al., 2007; Cluzeau et al., 2011) and autosomal recessive ectodermal dysplasia 11B (MIM# 614941) (Chaudhary et al., 2016). The *EDARADD* c.413A > T (p.Asn138Ile) variant identified in Patient 5 is located in the death domain that interacts with EDAR. The homozygous and heterozygous mutations in the EDAR death domain cause hypohidrotic ectodermal dysplasia (MIM #614940, #614941) with low penetrance (Bal et al., 2007; Cluzeau et al., 2011). To the best of our knowledge, only one heterozygous *EDARADD* variant, c.308C > T, p.Ser103Phe, was identified in patients with NSTA. The allelic frequency of the *EDARRADD* c.308C > T variant is found in up to 2% of a healthy population according to the dbSNP database. However, this variant has been associated with NSTA, but with low penetrance and variable expressivity. (Bergendal et al., 2011; Arte et al., 2013; Barbato et al., 2018; Martínez-Romero et al., 2019). Although the heterozygous *EDARADD* c.413A > T mutation was detected in the patient and his unaffected brother, it was not in his affected sister or mother.

Interestingly, the digenic heterozygous variants of *WNT10A* and other genes in the EDA pathway, including *EDA*, *EDAR*, and *EDARADD*, have been found in several patients with NSTA (Arte et al., 2013; He et al., 2013; Barbato et al., 2018; Martínez-Romero et al., 2019). The WNT and EDA pathways are suggested to play complementary roles during tooth development (Yu et al., 2019). In Family 5, the *WNT10A* c.511C > T variant was present in the homozygous state in the patient (8 missing teeth), in the heterozygous state in the sister (4 missing teeth) and proband's mother (peg-shaped lateral incisors), and not detected in the proband's brother (unaffected). Therefore, the role of the *WNT10A* variant in this family may be because its homozygous state is associated with more severe NSTA than those with the heterozygous variant, and the heterozygous variant shows incomplete penetrance. Moreover, the coexistence and variable penetrance of *WNT10A* and *EDARADD* variants may modulate the final phenotype of Patient 5.

Tooth agenesis is one of the most common anomalies in human development. Its prevalence in the general population is 2.5–7% (Polder et al., 2004). Mutations in *WNT10A* are the most frequently found variants associated with NSTA in several populations studied to date (van den Boogaard et al., 2012; Mostowska et al., 2013; Song et al., 2014; Tardieu et al., 2017). In particular, the *WNT10A* c.511C > T and c.637G > A variants are predominant in Asian populations compared with Europeans (Song et al., 2014; Machida et al., 2017). According to multiple genetic databases, we observed the allele frequencies of *WNT10A* c.511C > T and c.637G > A variants in Asian populations up to 0.033 and 0.029, respectively, compared with those in non-Asians, which are 0.000–0.001. The frequencies of the c.511C > T and c.637G > A variants in our in-house database of 1,876 Thai exomes are 0.016, which are in the range of Asian populations, including Japanese, Chinese, and Koreans. These results indicate that these two variants are relatively common in Asian populations. The difference in *WNT10A* allele frequencies among different ethnic groups may also partly explain the diverse prevalence of tooth agenesis on different continents (Khalaf et al., 2014).

The number and location of missing teeth are associated with mutations in specific genes (Al-Ani et al., 2017). A genotype-phenotype correlation study revealed that the second premolars were the most common missing teeth found in patient with *WNT10A* variants (Arzoo et al., 2014). All five patients in our study had agenesis of the second premolars, suggesting that *WNT10A* variants might be responsible for the absence of second premolars with high penetrance. Mutations in *WNT10A* have also been proposed to cause agenesis or microdontia of the upper lateral incisors (Kantaputra et al., 2014; Mostowska et al., 2015). Absent upper lateral incisors was observed in Patient 5 and his sister, and peg-shaped upper lateral incisors were found in Patient 1, Patient 4, and Patient 5's mother who had the heterozygous *WNT10A* variants.

CONCLUSION

In conclusion, this study reports a novel in-frame duplication, c.916_918dupAAC (p.Asn306dup), in *WNT10A* and a novel heterozygous missense variant, c.413A > T (p.Asn138Ile), in *EDARADD*, expanding the genotypic spectrum related to NSTA. The heterozygous *WNT10A* c.511C > T and c.637G > A variants demonstrate incomplete penetrance. Both variants are more common in Asian populations compared with non-Asians, which might explain the diverse prevalence of NSTA in various continents.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found in the article/**Supplementary Material**.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by the Institutional Review Board (HREC-DCU 2018-091), Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University and were

complied with the Declaration of Helsinki. Written informed consent to participate in this study was provided by the participants' legal guardian/next of kin. Written informed consent was also obtained from the individual(s), and minor(s)' legal guardian/next of kin, for the publication of any potentially identifiable images or data included in this article.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CK and TT contributed to the data acquisition and drafting of the manuscript. KS, ST, and WC contributed to the analysis and interpretation of the results. TP contributed to the study conception and design and drafting of the manuscript. VS contributed to the conception and data analysis. All authors revised and approved the submitted version.

FUNDING

This project was funded by the National Research Council of Thailand, Global partnership CU-C16F630029, Health Systems Research Institute, Thailand Research Fund (MRG6280001 and DPG6180001), and Faculty Research Grant (DRF64013) Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University. KS is supported by Ratchadapisek Somphot Fund for Postdoctoral Fellowship, Chulalongkorn University. ST is supported by the 100th Anniversary Chulalongkorn University Fund for Doctoral Scholarship and The 90th Anniversary Chulalongkorn University Fund (Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Nut Pusuntisumpun, Adisa Suthirathikul, and Athipong Boonchanawiwat for their kind assistance with specimen collection, and Dr. Kevin A. Tompkins for the language revision of the manuscript.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2020.573214/full#supplementary-material

Supplementary Figure 1 | Clinical and radiographic features of the patients. *Indicates missing tooth.

Supplementary Figure 2 | Schematic diagrams of the *WNT10A* and *EDARADD* genes and proteins showing the identified *WNT10A* variants c.916_918dupAAC (p.Asn306dup), c.637G > A (p.Gly213Ser), and c.511C > T (p.Arg171Cys).

Supplementary Table 1 | Primers for Sanger sequencing.

REFERENCES

Adzhubei, I. A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V. E., Gerasimova, A., Bork, P., et al. (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Methods* 7, 248–249. doi: 10.1038/nmeth0410-248

Al-Ani, A. H., Antoun, J. S., Thomson, W. M., Merriman, T. R., and Farella, M. (2017). Hypodontia: an update on its etiology, classification, and clinical management. *BioMed Res. Int.* 2017:9378325. doi: 10.1155/2017/9378325

Arte, S., Parmanen, S., Pirinen, S., Alaluusua, S., and Nieminen, P. (2013). Candidate gene analysis of tooth agenesis identifies novel mutations in six genes and suggests significant role for WNT and EDA signaling and allele combinations. *PLoS One* 8:e73705. doi: 10.1371/journal.pone.0073705

Arzoo, P. S., Klar, J., Bergendal, B., Norderyd, J., and Dahl, N. (2014). WNT10A mutations account for $\frac{1}{2}$ of population-based isolated oligodontia and show phenotypic correlations. *Am. J. Med. Genet. A* 164a, 353–359. doi: 10.1002/ajmg.a.36243

Bal, E., Baala, L., Cluzeau, C., El Kerch, F., Ouldim, K., Hadj-Rabia, S., et al. (2007). Autosomal dominant anhidrotic ectodermal dysplasias at the EDARADD locus. *Hum. Mut.* 28, 703–709. doi: 10.1002/humu.20500

Barbato, E., Traversa, A., Guarnieri, R., Giovannetti, A., Genovesi, M. L., Magliozzi, M. R., et al. (2018). Whole exome sequencing in an Italian family with isolated maxillary canine agenesis and canine eruption anomalies. *Arch. Oral. Biol.* 91, 96–102. doi: 10.1016/j.archoralbio.2018.04.011

Bergendal, B., Klar, J., Stecksén-Blicks, C., Norderyd, J., and Dahl, N. (2011). Isolated oligodontia associated with mutations in EDARADD. AXIN2, MSX1, and PAX9 genes. *Am. J. Med. Genet. A* 155, 1616–1622. doi: 10.1002/ajmg.a.34045

Bergendal, B., Norderyd, J., Bågesund, M., and Holst, A. (2006). Signs and symptoms from ectodermal organs in young Swedish individuals with oligodontia. *Int. J. Paediatr. Dent.* 16, 320–326. doi: 10.1111/j.1365-263X.2006.00741.x

Chaudhary, A. K., Girisha, K. M., and Bashyam, M. D. (2016). A novel EDARADD 5'-splice site mutation resulting in activation of two alternate cryptic 5'-splice sites causes autosomal recessive hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Am. J. Med. Genet. A* 170, 1639–1641. doi: 10.1002/ajmg.a.37607

Cluzeau, C., Hadj-Rabia, S., Jambou, M., Mansour, S., Guigue, P., Masmoudi, S., et al. (2011). Only four genes (EDA1, EDAR, EDARADD, and WNT10A) account for 90% of hypohidrotic/anhidrotic ectodermal dysplasia cases. *Hum. Mut.* 32, 70–72. doi: 10.1002/humu.21384

Guazzarotti, L., Tadini, G., Mancini, G. E., Sani, I., Pisanelli, S., Galderisi, F., et al. (2018). WNT10A gene is the second molecular candidate in a cohort of young Italian subjects with ectodermal derivative impairment (EDI). *Clin. Genet.* 93, 693–698. doi: 10.1111/cge.13147

He, H., Han, D., Feng, H., Qu, H., Song, S., Bai, B., et al. (2013). Involvement of and interaction between WNT10A and EDA mutations in tooth agenesis cases in the Chinese population. *PLoS One* 8:e80393. doi: 10.1371/journal.pone.0080393

Intarak, N., Theerapanon, T., Srijunbarl, A., Suphapeetiporn, K., Porntaveetus, T., and Shotelersuk, V. (2018). Novel compound heterozygous mutations in KREMEN1 confirm it as a disease gene for ectodermal dysplasia. *Br. J. Dermatol.* 179, 758–760. doi: 10.1111/bjd.16541

Kantaputra, P., Kaewgahya, M., and Kantaputra, W. (2014). WNT10A mutations also associated with agenesis of the maxillary permanent canines, a separate entity. *Am. J. Med. Genet. A* 164, 360–363. doi: 10.1002/ajmg.a.36280

Khalaf, K., Miskelly, J., Voge, E., and Macfarlane, T. V. (2014). Prevalence of hypodontia and associated factors: a systematic review and meta-analysis. *J. Orthod.* 41, 299–316.

Köhler, S., Carmody, L., Vasilevsky, N., Jacobsen, J. O. B., Danis, D., Gourdine, J.-P., et al. (2018). Expansion of the human phenotype ontology (HPO) knowledge base and resources. *Nucleic Acids Res.* 47, D1018–D1027. doi: 10.1093/nar/gky1105

Kumar, P., Henikoff, S., and Ng, P. C. (2009). Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat. Protoc.* 4, 1073–1081. doi: 10.1038/nprot.2009.86

Liu, F., Chu, E. Y., Watt, B., Zhang, Y., Gallant, N. M., Andl, T., et al. (2008). Wnt/β-catenin signaling directs multiple stages of tooth morphogenesis. *Dev. Biol.* 313, 210–224. doi: 10.1016/j.ydbio.2007.10.016

Machida, J., Goto, H., Tatematsu, T., Shibata, A., Miyachi, H., Takahashi, K., et al. (2017). WNT10A variants isolated from Japanese patients with congenital tooth agenesis. *Hum. Genome Var.* 4:17047. doi: 10.1038/hgv.2017.47

Madeira, F., Park, Y. M., Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., et al. (2019). The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res.* 47, W636–W641. doi: 10.1093/nar/gkz268

Martínez-Romero, M. C., Ballesta-Martínez, M. J., López-González, V., Sánchez-Soler, M. J., Serrano-Antón, A. T., Barreda-Sánchez, M., et al. (2019). EDA, EDAR, EDARADD and WNT10A allelic variants in patients with ectodermal derivative impairment in the Spanish population. *Orphanet J. Rare Dis.* 14:281. doi: 10.1186/s13023-019-1251-x

Mostowska, A., Biedziak, B., Zadurska, M., Dunin-Wilczynska, I., Lianeri, M., and Jagodzinski, P. P. (2013). Nucleotide variants of genes encoding components of the Wnt signalling pathway and the risk of non-syndromic tooth agenesis. *Clin. Genet.* 84, 429–440. doi: 10.1111/cge.12061

Mostowska, A., Biedziak, B., Zadurska, M., Matuszewska-Trojan, S., and Jagodziński, P. P. (2015). WNT10A coding variants and maxillary lateral incisor agenesis with associated dental anomalies. *Eur. J. Oral Sci.* 123, 1–8. doi: 10.1111/eos.12165

Mues, G., Bonds, J., Xiang, L., Vieira, A. R., Seymen, F., Klein, O., et al. (2014). The WNT10A gene in ectodermal dysplasias and selective tooth agenesis. *Am. J. Med. Genet. A* 164A, 2455–2460. doi: 10.1002/ajmg.a.36520

Park, H., Song, J.-S., Shin, T. J., Hyun, H.-K., Kim, Y.-J., and Kim, J.-W. (2019). WNT10A mutations causing oligodontia. *Arch. Oral. Biol.* 103, 8–11. doi: 10.1016/j.archoralbio.2019.05.007

Plaisancié, J., Bailleul-Forestier, I., Gaston, V., Vaysse, F., Lacombe, D., Holder-Espinasse, M., et al. (2013). Mutations in WNT10A are frequently involved in oligodontia associated with minor signs of ectodermal dysplasia. *Am. J. Med. Genet. A* 161, 671–678. doi: 10.1002/ajmg.a.35747

Polder, B. J., Van't Hof, M. A., Van der Linden, F. P. G. M., and Kuijpers-Jagtman, A. M. (2004). A meta-analysis of the prevalence of dental agenesis of permanent teeth. *Am. J. Med. Genet. A* 32, 217–226. doi: 10.1111/j.1600-0528.2004.00158.x

Porntaveetus, T., Abid, M. F., Theerapanon, T., Srichomthong, C., Ohazama, A., Kawasaki, K., et al. (2018). Expanding the oro-dental and mutational spectra of kabuki syndrome and expression of KMT2D and KDM6A in human tooth germs. *Int. J. Biol. Sci.* 14, 381–389. doi: 10.7150/ijbs.23517

Porntaveetus, T., Ohazama, A., Choi, H. Y., Herz, J., and Sharpe, P. T. (2012). Wnt signaling in the murine diastema. *Eur. J. Orthod.* 34, 518–524. doi: 10.1093/ejo/cjr049

Rentzsch, P., Witten, D., Cooper, G. M., Shendure, J., and Kircher, M. (2018). CADD: predicting the deleteriousness of variants throughout the human genome. *Nucleic Acids Res.* 47, D886–D894. doi: 10.1093/nar/gky1016

Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., et al. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of medical genetics and genomics and the association for molecular pathology. *Genet. Med.* 17, 405–423. doi: 10.1038/gim.2015.30

Schwarz, J. M., Cooper, D. N., Schuelke, M., and Seelow, D. (2014). MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat. Methods* 11, 361–362. doi: 10.1038/nmeth.2890

Song, S., Zhao, R., He, H., Zhang, J., Feng, H., and Lin, L. (2014). WNT10A variants are associated with non-syndromic tooth agenesis in the general population. *Hum. Genet.* 133, 117–124. doi: 10.1007/s00439-013-1360-x

Tardieu, C., Jung, S., Niederreither, K., Prasad, M., Hadj-Rabia, S., Philip, N., et al. (2017). Dental and extra-oral clinical features in 41 patients with WNT10A gene mutations: a multicentric genotype–phenotype study. *Clin. Genet.* 92, 477–486. doi: 10.1111/cge.12972

van den Boogaard, M. J., Créton, M., Bronkhorst, Y., van der Hout, A., Hennekam, E., Lindhout, D., et al. (2012). Mutations in WNT10A are present in more than half of isolated hypodontia cases. *J. Med. Genet.* 49, 327–331. doi: 10.1136/jmedgenet-2012-100750

Yu, M., Wong, S.-W., Han, D., and Cai, T. (2019). Genetic analysis: wnt and other pathways in nonsyndromic tooth agenesis. *Oral. Dis.* 25, 646–651. doi: 10.1111/odi.12931

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

The reviewer MA declared a past co-authorship with the authors TT and TP to the handling editor.

Copyright © 2020 Kanchanasevee, Sriwattanapong, Theerapanon, Thaweesapphithak, Chetruengchai, Porntaveetus and Shotelersuk. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Check for updates

Received: 11 February 2021 | Revised: 27 April 2021 | Accepted: 8 May 2021

DOI: 10.1002/ajmg.a.62365

CLINICAL REPORT

AMERICAN JOURNAL OF medical genetics PART A WILEY

Expanding the genotypic spectrum of *PYCR2* and a common ancestry in Thai patients with hypomyelinating leukodystrophy 10

Chawan Manaspon[1,2] | Ponghatai Boonsimma[3] | Chureerat Phokaew[4,5] | Thanakorn Theerapanon[2] | Kanokwan Sriwattanapong[2] | Thantrira Porntaveetus[2] | Vorasuk Shotelersuk[4,5]

[1]Biomedical Engineering Institute, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

[2]Genomics and Precision Dentistry Research Unit, Department of Physiology, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

[3]Division of Medical Genetics and Metabolism, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

[4]Center of Excellence for Medical Genomics, Medical Genomics Cluster, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

[5]Excellence Center for Genomics and Precision Medicine, King Chulalongkorn Memorial Hospital, The Thai Red Cross Society, Bangkok, Thailand

Correspondence
Thantrira Porntaveetus, Genomics and Precision Dentistry Research Unit, Department of Physiology, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.
Email: thantrira.p@chula.ac.th

Funding information
Chulalongkorn University; Health Systems Research Institute; National Research Council of Thailand; Thailand Research Fund, Grant/Award Numbers: DPG6180001, MRG6280001; TSRI fund, Grant/Award Numbers: CU_FRB640001_01_30_10, CU_FRB640001_01_32_3, CU_FRB640001_01_32_4

Abstract

PYCR2 pathogenic variants lead to an autosomal recessive hypomyelinating leukodystrophy 10 (HLD10), characterized by global developmental delay, microcephaly, facial dysmorphism, movement disorder, and hypomyelination. This study identified the first two unrelated Thai patients with HLD10. Patient 1 harbored the novel compound heterozygous variants, c.257T>G (p.Val86Gly) and c.400G>A (p.Val134Met), whereas patient 2 possessed the homozygous variant, c.400G>A (p.Val134Met), in *PYCR2*. Haplotype analysis revealed that the two families' members shared a 2.3 Mb region covering the c.400G>A variant, indicating a common ancestry. The variant was estimated to age 1450 years ago. Since the c.400G>A was detected in three out of four mutant alleles and with a common ancestry, this variant might be common in Thai patients. We also reviewed the phenotype and genotype of all 35 previously reported *PYCR2* patients and found that majorities of cases were homozygous with a consanguineous family history, except patient 1 and another reported case who were compound heterozygous. All patients had microcephaly and developmental delay. Hypotonia and peripheral spasticity were common. Hypomyelination or delayed myelination was a typical radiographic feature. Here, we report the first two Thai patients with HLD10 with the novel *PYCR2* variants expanding the genotypic spectrum and suggest that the c.400G>A might be a common mutation in Thai patients.

KEYWORDS
dysmorphism, global developmental delay, hypomyelination, hypotonia, microcephaly

1 | INTRODUCTION

Hypomyelinating leukodystrophy 10 or HLD10 (OMIM #616420) is an autosomal recessive neurological disorder characterized by global developmental delay, postnatal progressive microcephaly, movement disorder, and hypomyelination (Meng et al., 2017; Nakayama et al., 2015; Spagnoli et al., 2019; Zaki et al., 2016). The disorder is caused by alterations in the *PYCR2* gene (OMIM *616406) which encodes the mitochondrial enzyme, pyrroline-5-carboxylate reductase 2, that converts pyrroline-5-carboxylate to proline (Nakayama et al., 2015; Pérez-Arellano et al., 2010). Proline is an important amino acid for the function of central nervous system and connective

 © 2021 Wiley Periodicals LLC.

tissues. The pyrroline-5-carboxylate reductase 2 also plays roles in regulating $NADP^+$/NADPH balance, apoptosis, and intracellular redox potential (Liang et al., 2013; Wu et al., 2011).

To date, there have been nine studies reporting 35 patients with the *PYCR2* variants and HLD10 features (Afroze & Mercimek-Andrews, 2020; Al-Shamsi et al., 2016; Bick et al., 2017; Escande-Beillard et al., 2020; Meng et al., 2017; Nakayama et al., 2015; Spagnoli et al., 2019; Theunissen et al., 2018; Zaki et al., 2016). This study reported the first two unrelated Thai patients affected with HLD10 and two novel variants in *PYCR2*. We observed that both patients shared the c.400G>A (p.Val134Met) variant which was originated from a common ancestor and estimated to arise 1450 years ago. Additionally, we summarized the phenotype and genotype of all patients with *PYCR2* variants published in the literature.

2 | CASE REPORT

Patient 1 was a 13-year-old Thai girl. She was born at 38 weeks. The pregnancy was unremarkable. The patient started to have occasional twitching on her right cheek and a developmental delay was noticed at the 6 months of age. Brain MRI at age 9 months was unremarkable. Electroencephalogram at age 2 years showed no epileptiform discharge. Vision screening was normal. The patient was lost to follow-up and presented at age 7 years with occasional muscle spasticity for 2–3 times a week. Each episode started from rapid eye blinking followed by persistent whole-body twitching for 2–3 min. Physical examinations showed severe muscle wasting, spastic tone, clonus, hyperreflexia, deep tendon reflexes (DTR) 3+, and motor scoring scale III. Seizure and facial palsy were not observed. Plasma amino acid and urine organic acid profiles were within normal limits. Brain MRI at age 7 years showed incomplete myelination, pronounced brain volume loss along deep cerebral white matter, small corpus callosum, and prominent size of posterior body-trigone of the lateral ventricles. The EEG revealed focal spikes in the left temporo-parietal area with moderate encephalopathy, suggesting multifocal epileptic disorder. Valproic acid was prescribed at age 8 years. Clonazepam and ferrous sulfate supplement were added at age 10 years, followed by a muscle relaxer, Baclofen, at age 11 years. With medications, the duration and frequency of spastic tones were subsided. Swollen legs and feet were noticed at age 11 years.

At age 13 years, the patient showed global developmental delay. She could neither walk, sit, nor say a word. Physical examination revealed microcephaly (OFC 44.5 cm, <3rd percentile), truncal hypotonia, pectus excavatum, appendicular hypertonia, hyperreflexia, and delayed puberty. Her breast development was at Tanner stage II. She had facial dysmorphism including narrow forehead, low frontal hairline, thick hairs, deep set eyes, bulbous nose, full lips, short columella, large pinnae, overfolded helix, and high-arched palate (Figure 1(a–h)).

Patient 2 was a 2-year-old Thai girl. She was born full term with a birth weight of 3332 g. The pregnancy was unremarkable. No perinatal complication was noted. At age 1 year, the patient had feeding difficulty and showed developmental delay. Physical examination showed microcephaly (OFC 42 cm, <3rd percentile), strabismus, upturned bulbous nose, full lips, prominent ears, medial strabismus without nystagmus, hyperreflexia, poor coordination, and spasticity. Brain MRI demonstrated hypomyelination with thin corpus callosum and brainstem (Figure 1(i–k)). The videofluoroscopic swallowing study with barium sulfate solution showed normal structure and function of esophagus, esophagogastric junction, stomach, duodenum, and duodenojejunal junction. The parents of both patient 1 and patient 2 were nonconsanguineous (Figure S1, Supporting Information). A history of brain anomalies in both families was not noted.

Whole exome sequencing and Sanger sequencing were performed as previously described (Intarak et al., 2019; Porntaveetus et al., 2017) (Table S1). We identified that patient 1 harbored the novel compound heterozygous variants in *PYCR2* (NM_013328.3). A novel missense variant c.400G>A, p.Val134Met (ClinVar accession VCV000872905.1) was detected on the maternal allele and a novel missense variant, c.257T>G, p.Val86Gly (ClinVar accession VCV000872904.1) on another allele. Patient 1's father was not available for genetic test. Patient 2 was homozygous for the missense variant, c.400G>A, p.Val134Met in *PYCR2*. Both the c.257T>G and c.400G>A variants were not observed in gnomAD exome v2.1.1, dbSNP, and in-house exome database of 3206 Thai individuals consisting of patients with rare diseases and their healthy family members. The variants were located in the NAD(P) binding domain of the PYCR2 protein. They were highly conserved among species (Figure S1) and predicted to be deleterious (SIFT), probably damaging (Polyphen), possibly pathogenic (MCAP), and uncertain significance (PM2, PP3) according to the ACMG guideline (Richards et al., 2015). Based on the phenotype and genotype of both patients, the diagnosis of hypomyelinating leukodystrophy 10 (HLD10) is highly likely.

We speculated that the two patients might have a common ancestry as they shared the c.400G>A variant. Microarray genotyping was performed using the Infinium OmniZhongHua-8 Kit (Illumina, Seoul, South Korea). Three members of family 1 (patient 1, brother, and mother) and three members of family 2 (patient 2, father, and mother) were included. Using microarray and homozygosity haplotype analysis of patient 2's family members, we detected the homozygous segment of 3.2 Mb between coordinates 223632876 and 226846391 (1312 SNPs) on chromosome 1q42.13 that covered the c.400G>A variant. These coordinates were then applied to determine the haplotype of family 1. We then observed that both families shared a 2.3 Mb segment between coordinates 224440468 and 226846391 (Figure S2). These coordinates were input into the Genetic Mutation Age Estimator, which is the application that estimates the age of genetic variants based on the length of ancestral haplotypes common to individuals who share the variant (https://shiny.wehi.edu.au/rafehi.h/mutation-dating/) (Figure S3) (Gandolfo et al., 2014; Yeetong et al., 2019). The c.400G>A variant was estimated to age 58 generations or 1450 years (assuming one generation = 25 years) with a 95% confidence interval (CI) between 17.4 (425 years) and 218 (5450 years) generations. This indicates that the c.400G>A variant is identity by descent and the two families share a common ancestry.

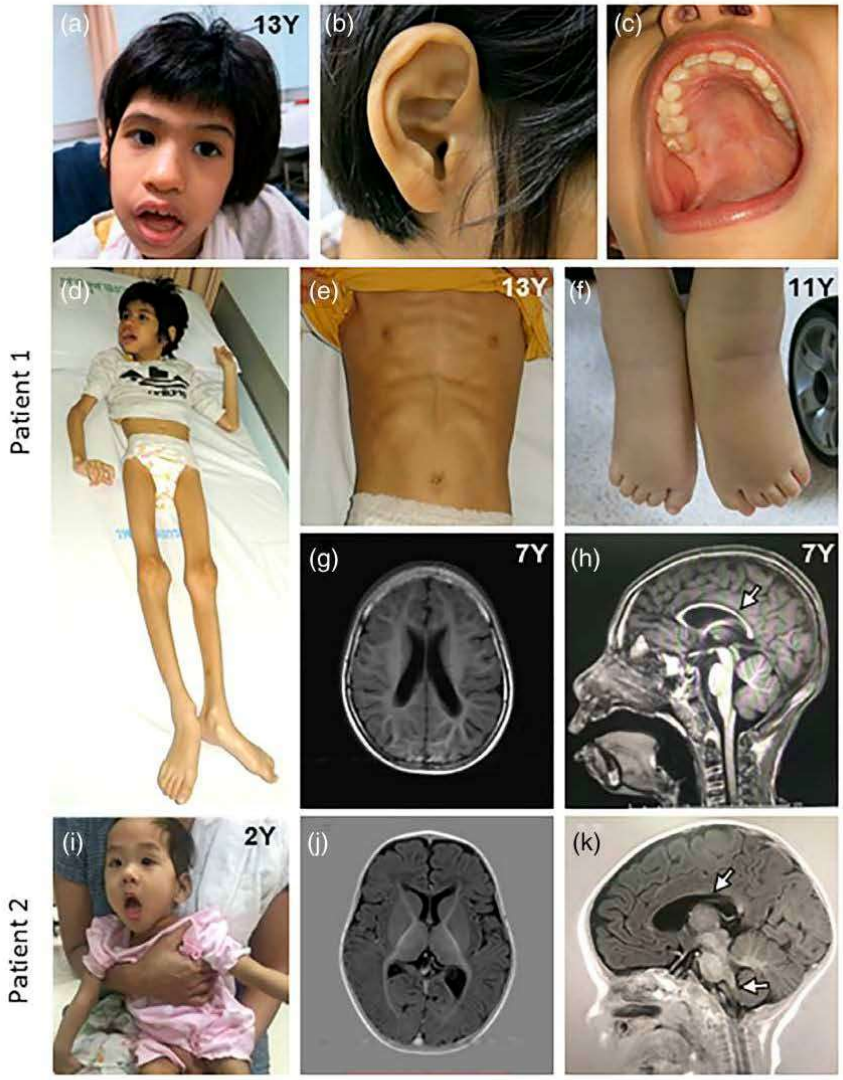


FIGURE 1 Phenotypic features of the patients. Patient 1 at age 13 years showed facial dysmorphism including oval face, narrow forehead, low frontal hairline, thick hairs, deep set eyes, bulbous nose, full lips, short columella, large pinnae, overfolded helix, and high-arched palate (a–c). She had severe muscle wasting and pectus excavatum (d, e). Swollen legs and feet were noticed at age 11 years (f). T2 weighted images (T2WI) of brain MRI showed incomplete myelination, brain volume loss, and small corpus callosum (arrow) (g, h). Facial features of patient 2 at age 2 years showed microcephaly, upturned bulbous nose, full lips, and prominent ears (i). Brain MRI showed hypomyelination, and thin corpus callosum and brainstem (arrows) (j, k) [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

Additionally, we reviewed and summarized the phenotypic and genotypic features of all 37 patients (including patients 1 and 2 in this study) reported with *PYCR2* variants as shown in Figure 2 and Tables S2 and S3.

3 | DISCUSSION

This study reported the first two Thai patients having HLD10 and two novel *PYCR2* variants. Both patients showed global development

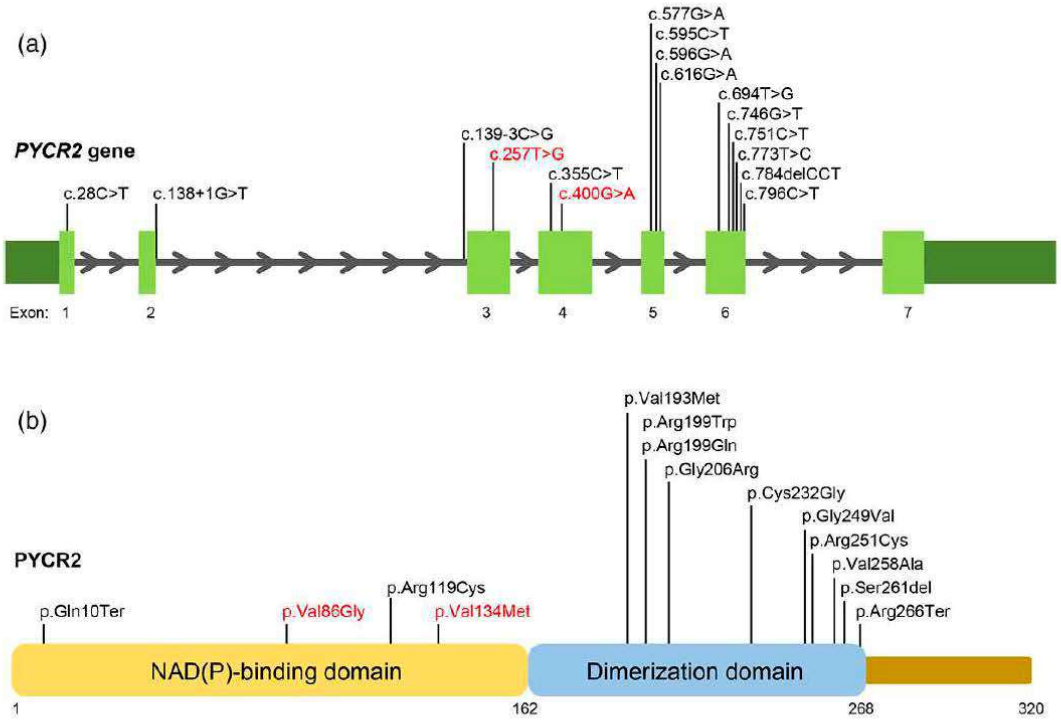


FIGURE 2 Schematic diagrams PYCR2 gene and protein with mutations. The variants identified in this study, c.257T>G (p.Val86Gly) and c.400G>A (p.Val134Met), are shown in red [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

delay, failure to thrive, microcephaly, facial dysmorphism, muscle wasting, spastic tone, and hyperreflexia. According to our review (Tables S2 and S3), we observed that all *PYCR2* patients had microcephaly, failure to thrive, and global developmental delay. Abnormal muscle tone and coordination including muscle wasting, central hypotonia, and peripheral spasticity were common. Only 2 out of 30 patients were able to walk and 4 out of 12 patients were able to sit with support. Seizure was present in 17 out of 31 patients (54.8%) and feeding difficulty in 10 out of 21 patients (47.6%). The consistent radiographic features were hypomyelination or delayed myelination, diminished while-matter volume, and small/thin corpus callosum. Neurodevelopmental delay was usually detected in a brain MRI within the first 5 years of life. Only 1 out of 22 patients having brain MRI image did not show a thin brainstem. However, two MRIs at 6 months intervals are required to differentiate between hypomyelination and delayed myelination, and a finding of increased myelin content indicates delayed myelination (Afroze & Mercimek-Andrews, 2020; Schiffmann & van der Knaap, 2009). We noticed that most reported cases with hypomyelination were based on a single MRI. It is therefore uncertain to determine delayed myelination or hypomyelination in the published cases. None of the reported cases had abnormal plasma and urine profiles and there was no evidence for proline depletion, suggesting that the HLD10 features are restricted to the central nervous system.

Majority of HLD10 cases were from consanguineous families (20/25 families: 80.0%). Twenty-nine out of 37 patients (78.4%) harbored the homozygous *PYCR2* variants except one previously reported patient (Bick et al., 2017) and patient 1 in this study who were compound heterozygous. In total, 16 different *PYCR2* variants were identified from 26 families, 11 variants were missense (68.75%), 2 were nonsense (12.5%), 2 were splice site (12.5%), and 1 was in-frame deletion (6.25%) (Table S4). The PYCR2 protein consists of two common domains, the NAD(P) binding and dimerization domains, which encompass 268 amino acid residues or 84% of the PYCR2 protein (320 amino acids). All variants except the splice site were observed in these two functional domains, emphasizing their functional importance (Figure 2).

Afroze and Mercimek-Andrews (2020) demonstrated that the c.796G>A (p.Arg26*) variant reported by Zaki et al. (2016) should be corrected to the c.796C>T (p.Arg266Ter) variant. We then checked all variants reported by Zaki et al. (2016) against the *PYCR2* transcript (NM_013328.4) and protein (NP_037460.2) and found the mismatches. The corrections are shown in Table S5.

The c.400G>A variant identified in both patient 1 and patient 2 has never been reported in any HLD10 cases with other ethnicities. Using haplotype analysis, it detected the shared 2.3 Mb segments covering the c.400G>A variant in the two families, indicating a common ancestry. The variant was estimated to occur around 1450 years or 58 generations ago. Regarding the c.257T>G (p.Val86Gly) variant which was identified in compound heterozygous with c.400G>A in the patient 1, the variant is conserved among several species and located in the NAD(P)-binding domain. This domain is important for the function of the pyrroline-5-carboxylate reductase (PYCR) enzyme. The PYCR uses NAD(P)H to catalyze the reduction of L-Δ1-pyrroline-5-carboxylate (L-P5C) to L-proline in the final stage of L-proline biosynthesis. The variants in the NAD(P)-binding domain have been reported in the other patients with HLD10 (Table S4). In addition, a recent study has validated the pathogenicity of the Arg119Cys variant, also in the NAD(P)-binding domain, and showed that the Arg119Cys impairs catalytic efficiency of PYCR2 up to 366 times lower than that of the wild-type enzyme, confirming its pathologic role in HLD10 (Patel et al., 2021). The above evidences suggest that the variants in the NAD(P)-binding domain could interfere the PYCR2 function, leading to HLD10 phenotype.

To conclude, we report the first two Thai patients with HLD10 and the two novel *PYCR2* variants, expanding the genotypic spectrum. We also suggest that the c.400G>A might be a common *PYCR2* variant in Thai patients with HLD10.

ACKNOWLEDGMENTS

This project was funded by the National Research Council of Thailand, TSRI Fund (CU_FRB640001_01_32_3, CU_FRB640001_01_32_4, CU_FRB640001_01_30_10), Health Systems Research Institute, and Thailand Research Fund (MRG6280001, DPG6180001). Kanokwan Sriwattanapong is supported by the Ratchadapisek Somphot Fund for Postdoctoral Fellowship, Chulalongkorn University.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

ETHICS STATEMENT

This study was approved by the Institutional Review Board, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University (IRB 264/62) and in accordance with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards. Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Chawan Manaspon: Initial writing of manuscript draft; experimental design; data acquisition; data interpretation. **Ponghatai Boonsimma**: Obtained patients consent; clinical data analysis; clinical data acquisition. **Chureerat Phokaew**: Computational analysis; interpretation. **Thanakorn Theerapanon**: Edited manuscript; computational analysis; interpretation. **Kanokwan Sriwattanapong**: Assisted with writing of manuscript draft; edited manuscript. **Thantrira Porntaveetus**: Conceptualization; initial writing of manuscript draft; data interpretation; critical revision of the manuscript; submitted the manuscript. **Vorasuk Shotelersuk**: Edited manuscript; reviewed the study; conceptualization of the manuscript. All authors critically revised the manuscript.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are openly available in ClinVar at https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/, accession number VCV000872905.1 and VCV000872904.1.

ORCID

Chawan Manaspon https://orcid.org/0000-0001-8961-7901
Ponghatai Boonsimma https://orcid.org/0000-0002-2414-7010
Chureerat Phokaew https://orcid.org/0000-0002-4246-2604
Thanakorn Theerapanon https://orcid.org/0000-0001-6727-862X
Kanokwan Sriwattanapong https://orcid.org/0000-0003-1133-1983
Thantrira Porntaveetus https://orcid.org/0000-0003-0145-9801
Vorasuk Shotelersuk https://orcid.org/0000-0002-1856-0589

REFERENCES

Afroze, B., & Mercimek-Andrews, S. (2020). Pyrroline-5-carboxylate reductase 2 deficiency: A new case and review of the literature. *Canadian Journal of Neurological Sciences*, *47*(2), 280–282. https://doi.org/10.1017/cjn.2020.5

Allot, A., Peng, Y., Wei, C. H., Lee, K., Phan, L., & Lu, Z. (2018). LitVar: A semantic search engine for linking genomic variant data in PubMed and PMC. *Nucleic Acids Research*, *46*, W530–W536. https://doi.org/10.1093/nar/gky355

Al-Shamsi, A., Hertecant, J. L., Souid, A.-K., & Al-Jasmi, F. A. (2016). Whole exome sequencing diagnosis of inborn errors of metabolism and other disorders in United Arab Emirates. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, *11*(1), 94. https://doi.org/10.1186/s13023-016-0474-3

Bick, D., Fraser, P. C., Gutzeit, M. F., Harris, J. M., Hambuch, T. M., Helbling, D. C., Jacob, H. J., Kersten, J. N., Leuthner, S. R., May, T., & North, P. E. (2017). Successful application of whole genome sequencing in a medical genetics clinic. *Journal of Pediatric Genetics*, *6*(2), 61–76. https://doi.org/10.1055/s-0036-1593968

Escande-Beillard, N., Loh, A., Saleem, S. N., Kanata, K., Hashimoto, Y., Altunoglu, U., Metoska, A., Grandjean, J., Ng, F. M., Pomp, O., & Baburajendran, N. (2020). Loss of PYCR2 causes neurodegeneration by increasing cerebral glycine levels via SHMT2. *Neuron*, *107*(1), 82–94. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.03.028

Gandolfo, L. C., Bahlo, M., & Speed, T. P. (2014). Dating rare variants from small samples with dense marker data. *Genetics*, *197*(4), 1315–1327. https://doi.org/10.1534/genetics.114.164616

Intarak, N., Theerapanon, T., Thaweesapphithak, S., Suphapeetiporn, K., Porntaveetus, T., & Shotelersuk, V. (2019). Genotype–phenotype correlation and expansion of orodental anomalies in LTBP3-related disorders. *Molecular Genetics and Genomics*, *294*(3), 773–787. https://doi.org/10.1007/s00438-019-01547-x

Liang, X., Zhang, L., Natarajan, S. K., & Becker, D. F. (2013). Proline mechanisms of stress survival. *Antioxidants & Redox Signaling*, *19*(9), 998–1011. https://doi.org/10.1089/ars.2012.5074

Meng, L., Donti, T., Xia, F., Niu, Z., Al Shamsi, A., Hertecant, J., Al-Jasmi, F., Gibson, J. B., Nagakura, H., Zhang, J., He, W., Eng, C., Yang, Y., & Elsea, S. H. (2017). Homozygous variants in pyrroline-5-carboxylate reductase 2 (PYCR2) in patients with progressive microcephaly and hypomyelinating leukodystrophy. *American Journal of Medical Genetics Part A*, *173*(2), 460–470. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.38049

Nakayama, T., Al-Maawali, A., El-Quessny, M., Rajab, A., Khalil, S., Stoler, J. M., Tan, W.-H., Nasir, R., Schmitz-Abe, K., Hill, R. S., Partlow, J. N., Al-Saffar, M., Servattalab, S., LaCoursiere, C. M., Rambunan, D. E., Coulter, M. E., Elhosary, P. C., Gorski, G., Barkovich, A. J., … Mochida, G. H. (2015). Mutations in PYCR2, encoding pyrroline-5-carboxylate reductase 2, cause microcephaly and hypomyelination. *American Journal of Human Genetics*, *96*(5), 709–719. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2015.03.003

Patel, S. M., Seravalli, J., Liang, X., Tanner, J. J., & Becker, D. F. (2021). Disease variants of human Δ1-pyrroline-5-carboxylate reductase 2 (PYCR2). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *703*, 108852. https://doi.org/10.1016/j.abb.2021.108852

Pérez-Arellano, I., Carmona-Alvarez, F., Martínez, A. I., Rodríguez-Díaz, J., & Cervera, J. (2010). Pyrroline-5-carboxylate synthase and proline biosynthesis: From osmotolerance to rare metabolic disease. *Protein Science*, *19*(3), 372–382. https://doi.org/10.1002/pro.340

Porntaveetus, T., Srichomthong, C., Suphapeetiporn, K., & Shotelersuk, V. (2017). Monoallelic FGFR3 and Biallelic ALPL mutations in a Thai girl with hypochondroplasia and hypophosphatasia. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, *173*(10), 2747–2752. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.38370

Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W. W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., & Rehm, H. L. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*, *17*(5), 405–424. https://doi.org/10.1038/gim.2015.30

Schiffmann, R., & van der Knaap, M. S. (2009). Invited Article: An MRI-based approach to the diagnosis of white matter disorders. *Neurology*, *72*(8), 750–759. https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000343049.00540.c8

Spagnoli, C., Pavlidis, E., Salerno, G. G., Koskinen, L., Kääriäinen, H., Frattini, D., Frattini, D., Koskenvuo, J. W., & Fusco, C. (2019). Prolonged survival in a patient with a novel pyyrroline-5-carboxylase reductase 2 genetic variant. *European Journal of Neurology*, *26*, e45–e46. https://doi.org/10.1111/ene.13817

Theunissen, T. E. J., Nguyen, M., Kamps, R., Hendrickx, A. T., Sallevelt, S. C. E. H., Gottschalk, R. W. H., Calis, C. M., Stassen, A. P. M., Koning, B., Hartog, E. N. M., Schoonderwoerd, K., Fuchs, S. A., Hilhorst-Hofstee, Y., Visser, M., Vanoevelen, J., Szklarczyk, R., Gerards, M., Coo, I. F. M., Hellebrekers, D. M. E. I., & Smeets, H. J. M. (2018). Whole exome sequencing is the preferred strategy to identify the genetic defect in patients with a probable or possible mitochondrial cause. *Frontiers in Genetics*, *9*, 400. https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00400

Wu, G., Bazer, F. W., Burghardt, R. C., Johnson, G. A., Kim, S. W., Knabe, D. A., Li, P., Li, X., McKnight, J. R., Satterfield, M. C., & Spencer, T. E. (2011). Proline and hydroxyproline metabolism: Implications for animal and human nutrition. *Amino Acids*, *40*(4), 1053–1063. https://doi.org/10.1007/s00726-010-0715-z

Yeetong, P., Pongpanich, M., Srichomthong, C., Assawapitaksakul, A., Shotelersuk, V., Tantirukdham, N., Chunharas, C., Suphapeetiporn, K., & Shotelersuk, V. (2019). TTTCA repeat insertions in an intron of YEATS2 in benign adult familial myoclonic epilepsy type 4. *Brain*, *142*(11), 3360–3366. https://doi.org/10.1093/brain/awz267

Zaki, M. S., Bhat, G., Sultan, T., Issa, M., Jung, H. J., Dikoglu, E., Selim, L. G., Mahmoud, I., Abdel-Hamid, M. S., Abdel-Salam, G., & Marin-Valencia, I. (2016). PYCR2 mutations cause a lethal syndrome of microcephaly and failure to thrive. *Annals of Neurology*, *80*(1), 59–70. https://doi.org/10.1002/ana.24678

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Manaspon, C., Boonsimma, P., Phokaew, C., **T**heerapanon, **T.**, Sriwattanapong, K., Porntaveetus, **T.**, & Shotelersuk, V. (2021). Expanding the genotypic spectrum of *PYCR2* and a common ancestry in **T**hai patients with hypomyelinating leukodystrophy 10. *American Journal of Medical Genetics Part A Part A*, 1–6. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.62365

International Journal of Neonatal Screening

Case Report

Compound Heterozygosity for a Novel Frameshift Variant Causing Fatal Infantile Liver Failure and Genotype–Phenotype Correlation of *POLG* c.3286C>T Variant

Kanokwan Sriwattanapong [1], Kitiwan Rojnueangnit [2], Thanakorn Theerapanon [1], Chalurmpon Srichomthong [3,4], Thantrira Porntaveetus [1,4,*] and Vorasuk Shotelersuk [3,4]

[1] Genomics and Precision Dentistry Research Unit, Department of Physiology, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand; kanokwan.s@chula.ac.th (K.S.); theerapanon.t@gmail.com (T.T.)
[2] Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Thammasat University, Pathumthani 12120, Thailand; rkitiwan@tu.ac.th
[3] Center of Excellence for Medical Genomics, Medical Genomics Cluster, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand; chalurmpon_s@hotmail.com (C.S.); vorasuk@chula.ac.th (V.S.)
[4] Excellence Center for Genomics and Precision Medicine, King Chulalongkorn Memorial Hospital, The Thai Red Cross Society, Bangkok 10330, Thailand
* Correspondence: thantrira.p@chula.ac.th; Tel.: +66-022 18-8695

check for updates

Citation: Sriwattanapong, K.; Rojnueangnit, K.; Theerapanon, T.; Srichomthong, C.; Porntaveetus, T.; Shotelersuk, V. Compound Heterozygosity for a Novel Frameshift Variant Causing Fatal Infantile Liver Failure and Genotype–Phenotype Correlation of *POLG* c.3286C>T Variant. *Int. J. Neonatal Screen.* 2021, *7*, 9. https://doi.org/10.3390/ijns7010009

Received: 28 December 2020
Accepted: 2 February 2021
Published: 5 February 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Abstract: A variant in the *POLG* gene is the leading cause of a heterogeneous group of mitochondrial disorders. No definitive treatment is currently available. Prenatal and newborn screening have the potential to improve clinical outcome of patients affected with *POLG*-related disorders. We reported a 4-month-old infant who presented with developmental delay, fever, and diarrhea. Within two weeks after hospital admission, the patient developed hepatic failure and died. Liver necropsy demonstrated an extensive loss of hepatocytes and bile duct proliferations. Trio-whole exome sequencing identified that the patient was compound heterozygous for a novel frameshift variant c.3102delG (p.Lys1035Serfs*59) and a common variant c.3286C>T (p.Arg1096Cys) in *POLG* (NM_002693.3) inherited from the mother and father, respectively. The c.3102delG (p.Lys1035Serfs*59) was a null variant and classified as pathogenic according to the American College of Medical Genetics and Genomics Standards and Guidelines. Prenatal genetic screenings using rapid whole exome sequencing successfully detected the heterozygous c.3286C>T variant in the following pregnancy and the normal alleles in the other one. Both children had been healthy. We reviewed all 34 cases identified with the *POLG* c.3286C>T variant and found that all 15 compound heterozygous cases had two missense variants except our patient who had the truncating variant and showed the earliest disease onset, rapid deterioration, and the youngest death. All homozygous cases had disease onset before age 2 and developed seizure. Here, we report a novel *POLG* variant expanding the genotypic spectrum, demonstrate the successful use of exome sequencing for prenatal and neonatal screenings of *POLG*-related disorders, and show the genotype–phenotype correlation of the common c.3286C>T variant.

Keywords: failure to thrive; hepatopathy; liver; mitochondria; polymerase; metabolic disorder; newborn

1. Introduction

Mitochondria are double membrane bound organelles that play important roles for energy production and cell survival. The *POLG* gene (OMIM *174763) encodes the catalytic subunit of DNA polymerase gamma (pol γ), which is essential for mitochondrial DNA replication, repair, and maintenance [1,2]. Alterations in the *POLG* gene are the most common cause of inherited mitochondrial disorders, with up to 2% of the population having the variants [2,3]. Six major *POLG*-related disorders, showing overlapping phenotypes

and a wide range of disease severity and onset from infancy to adulthood, comprise: (1) the childhood myocerebrohepatopathy spectrum (MCHS) presenting from the first few months of life to the age of three years with developmental delay, lactic acidosis, myopathy, and failure to thrive; (2) Alpers–Huttenlocher syndrome (AHS) characterized by childhood onset of severe encephalopathy, epilepsy, and hepatic failure; (3) myoclonic epilepsy myopathy sensory ataxia (MEMSA) presenting with epilepsy, myopathy, and ataxia without ophthalmoplegia, and including spinocerebellar ataxia with epilepsy (SCAE); (4) the ataxia neuropathy spectrum (ANS), presenting with ataxia and neuropathy, and including mitochondrial recessive ataxia syndrome (MIRAS) and sensory ataxia neuropathy dysarthria and ophthalmoplegia (SANDO); (5) autosomal recessive progressive external ophthalmoplegia (arPEO), characterized by progressive weakness of the extraocular eye muscle; and (6) autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia (adPEO), which is an adult onset of external eye muscle weakness.

Genetic testing is important for diagnosing the *POLG*-related disorders [4]. Treatment is currently limited to symptom management and supportive care. Prenatal and neonatal screening and early intervention for the *POLG*-related disorders can ameliorate symptoms, reduce irreversible damage, and improve the clinical outcomes of the patients. If left undiagnosed, the newborns may suffer severe consequences including developmental delay, organ damage, and disability. Here, we reported a patient who was compound heterozygote for a novel frameshift c.3102delG (p.Lys1035Serfs*59) variant and a previously reported c.3286C>T (p.Arg1096Cys) variant in *POLG* (NM_002693.3). The patient had a severe childhood myocerebrohepatopathy spectrum and died at 4 months old. For the family, prenatal screenings of the two following pregnancies were successfully performed by rapid whole exome sequencing. Here, we also reviewed the phenotype and genotype of an additional 33 patients reported to have the c.3286C>T variant.

2. Case Report

The proband was the second child of a non-consanguineous couple. He was born at 39-week gestation by normal delivery. His birth weight was 3196 g (25–50th centile) and Apgar scores were 9 and 10 at 5 and 10 min, respectively. During the first three months, he was in good health. At 4 months old, the patient started showing symptoms. He had fever, vomiting, diarrhea, jaundice and pale stool. He had a delay in development. He was unable to roll over, grasp, or lift his head. His weight was 6.2 kg (50th centile), height 64 cm (50–75th centile), and head circumference 39 cm (50th centile). Marked icteric sclera and liver enlargement (liver span 10 cm) were observed. A liver function test showed cholestatic jaundice with acute hepatic failure. Total bilirubin was 145.35 μmol/L (reference < 21), direct bilirubin 109.44 μmol/L (<3.4), lactate 4 mmol/L (<2), AST 257 U/L (5–55), ALT 139 U/L (5–45), ALP 139 U/L (150–420), albumin 2.3 g/dL (3.5–5.5), globulin 1.5 g/dL (2.3–3.5), prothrombin time 48.7 s (11.5–15.3), partial thromboplastin time 76.2 s (35.1–46.3 s), and international normalized ratio (INR) 4.24 s (0.86–1.22). The CBC, BUN, creatinine, ammonia, electrolyte, and blood sugar were within normal ranges. Liver ultrasound revealed hepatosplenomegaly, diffuse increase in parenchymal echotexture, diffuse thickening of gallbladder wall, and bile sludge. Diisopropyl iminodiacetic acid (DISIDA) scan showed poor hepatic intake with no evidence of gall bladder and bowel activities. Comprehensive metabolic tests including fatty acid oxidation defect, tyrosinemia type I deficiency, and citrin deficiency were negative. Tandem mass spectrometry detected increased levels of methionine, phenylalanine, and tyrosine. Viral antibody tests of hepatitis A, B and C, herpes simplex, and Epstein–Barr viruses and PCR of adenovirus and enterovirus were negative. The PCR for cytomegalovirus was positive.

He developed severe ascites, fulminant hepatic failure, hepatic encephalopathy, and severe coagulopathy. Although the Single Pass Albumin Dialysis (SPAD) was administered, his condition progressively worsened. The patient deceased 2 weeks after hospital admission. Liver necropsy showed an extensive loss of hepatocytes, bile duct proliferation, and a large number of foamy cells. Viral cytopathic change was not observed. Whole exome

sequencing (WES) was performed as described in previous studies [5,6]. Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes. WES was performed using an Illumina Hiseq4000 sequencer at Macrogen Inc. (Seoul, Korea). The variants were filtered following these criteria: (1) passed all quality filters during the variant-calling process, (2) had a read depth > 10, (3) located in the coding regions and canonical splice sites of genes related to the hepatic failure according to the Human Phenotype Ontology, HP:0001399 [7], and (4) had <1% minor allele frequency in the Genome Aggregation Database (gnomAD), Exome Variant Server, 1000 Genomes Project Consortium, dbSNPs, and in-house database of 2166 Thai exomes. Only the variants in *POLG* passed the filtering criteria. The variant was called novel if it was not listed in the Human Gene Mutation Database [8]. Pathogenicity of the filtered variant was classified according to the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) standards and guidelines [9]. The pathogenic variant was validated by Sanger sequencing using primers listed in Table S1.

Trio-WES identified that the patient harbored the compound heterozygous variants in the *POLG* gene. A novel frameshift variant, c.3102delG (p.Lys1035Serfs*59), in exon 19 of *POLG* (NM_002693.3, ClinVar SCV001245410) was detected on the maternal allele. The c.3102delG (p.Lys1035Serfs*59) was a null variant and classified as pathogenic (PVS1, PM2, PM3) according to the ACMG Standards and Guidelines [9]. On the paternal allele, the missense *POLG* variant, c.3286C>T (p.Arg1096Cys), in exon 21 was identified (ClinVar SCV001245409; dbSNP rs201732356). This variant was previously reported in several studies (Table 1). Both the c.3102delG and c.3286C>T variants are located in the polymerase domain of the POLG protein (Figure 1).

Prenatal testing for the third and fourth pregnancies was performed by rapid WES (Illumina's NextSeq^{TM} 500, Excellence Center of Medical Genomics, Bangkok, Thailand) using amniocyte DNA at 16-week gestation. The third fetus was found to be heterozygous for the missense *POLG* variant, c.3286C>T (p.Arg1096Cys), while the fourth fetus was found with two wild-type alleles. The duration from amniocentesis to molecular diagnosis of these two pregnancies was less than seven days. Sanger sequencing of blood derived DNA was performed to confirm WES results. At present, both children are healthy.

Thirty-four patients, including our proband, had been identified with the c.3286C>T variant in *POLG* (Table 1). Of those, 18 were homozygous, 15 were compound heterozygous, and one was single heterozygous. Among 15 compound heterozygous cases for the c.3286C>T variant, 14 cases had the missense variant on another allele while the proband was the only one with the truncating variant. He had the most severe phenotype, earliest onset, and youngest death, compared with the other compound heterozygous patients. In addition, we observed that all homozygous patients with the c.3286C>T variant had disease onset before the age of 2 years and developed seizure.

Table 1. The patients reported with the variant, c.3286C>T (p.Arg1096Cys), in exon 21 of the *POLG* gene (NM_002693.3).

No.	Age of Onset	Age at Report	Age at Death	Nationality	Genotype			Clinical Manifestations			
					The Other Variant	Expected Amino Acid Change of the Other Variant	Exon	Domain	Liver Failure	Seizure	Other Signs and Symptoms	Reference
Homozygous variant												
1.	birth	4 y	NA	United Arab Emirates	NA	NA	NA	NA	-	+	subtle neurodevelopmental problem, develop left-sided weakness	Mohamed et al., 2011 [10]
2.	6 w	4 m	11 m	United Arab Emirates	NA	NA	NA	NA	NA	+	Alpers syndrome, hepatomegaly, abnormal liver function, mild hypotonia	Mohamed et al., 2011 [10]
3.	4 m	6 m	NA	United Arab Emirates	NA	NA	NA	NA	NA	+	Alpers syndrome, severe hypotonia, modulate liver involvement	Mohamed et al., 2011 [10]
4.	4 m	6 m	NA	United Arab Emirates	NA	NA	NA	NA	+	+	Alpers syndrome, severe neurological disease, chronically elevated liver enzymes	Mohamed et al., 2011 [10]
5.	5 m	5 m	NA	United Arab Emirates	NA	NA	NA	NA	-	+	hypotonia, lethargy, moderate developmental delay	Mohamed et al., 2011 [10]
6.	5 m	11 m	NA	United Arab Emirates	NA	NA	NA	NA	+	+	-	Mohamed et al., 2011 [10]
7.	5 m	5 m	15 m	NA	NA	NA	NA	NA	+	+	Alpers syndrome, non-specific encephalopathy and blindness, severe coagulopathy, hypoglycemia, epilepsy, hepatopathy	Ashley et al., 2008 [11]
8.	8 m	8 m	15 m	Afghanistan	NA	NA	NA	NA	+	+	altered sensorium, hypotonia, mild hepatomegaly	Bijarnia Mahay et al., 2014 [12]
9.	9 m	9 m	NA	Arab states	NA	NA	NA	NA	NA	+	dementia, encephalopathy	Tang et al., 2011 [4]
10.	<12 m	3 y	NA	United Arab Emirates	NA	NA	NA	NA	-	+	hypotonia, refractory epilepsia partialis continua, severe neurological disability	Mohamed et al., 2011 [10]
11.	12 m	12 m	NA	Arab states	NA	NA	NA	NA	+	+	-	Tang et al., 2011 [4]
12.	12 m	12 m	NA	NA	NA [a]	NA [a]	NA	NA	NA	+	Alpers syndrome, dementia	Wong et al., 2008 [5]
13.	NA	12 m	NA	Arab states	NA	NA	NA	NA	NA	+	Alpers syndrome, multifocal therapy-refractory epilepsy, hippocampal sclerosis, COX-negative fibers, reduced mtDNA copy number, mtDNA deletions.	Stewart et al., 2010 [13]
14.	13 m	13 m	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Choreoathetosis; myoclonus (epileptic and non-epileptic); intermittent, myoclonic jerks sometimes in sleep, worsened by illness; abnormal neurotransmitters	Papandreou et al., 2018 [14]
15.	14 m	14 m	NA	Saudi arabia	NA	NA	NA	NA	+	+	Alpers syndrome, epilepsia partialis continua (EPC), hypotonia	Kentab, 2019 [15]
16.	24 m	24 m	NA	Arab states	NA	NA	NA	NA	NA	+	developmental delay, elevated transaminases, lactic acidosis	Tang et al., 2011 [4]
17.	24 m	9 y	NA	NA	NA [a]	NA [a]	NA	NA	+	NA	encephalopathy, myoclonus, achalasia	Horvath et al., 2006 [16]
18.	NA	NA	NA	European	NA	NA	NA	NA	NA	+	Leigh syndrome	De Kovel et al., 2016 [17]
Compound Heterozygous Variant with Frameshift Variant												
19.	4 m	4 m	4 m	Thai	c.3102delC	p.Lys1035Serfs*59	19	P	+	-	developmental delay, hepatic failure	This study
20.	5 m	5 m	11 m	NA	c.2542G>A	p.Gly848Ser	16	P	+	NA	encephalopathy, hypotonia	Stumpf et al., 2013 [3]
21.	<12 m	<12 m	14 m	NA	c.2740A>C	p.Thr914Pro	18	P	+	NA	Alpers syndrome, hypotonia, myoclonic epilepsy, respiratory insufficiency, hepatopathy, choreoathetosis, ataxia, static nystagmus	Ashley et al., 2008 [11]
22.	24 m	24 m	NA	Arab states	c.2542G>A	p.Gly848Ser	16	P	+	NA	developmental delay, hypotonia, dementia/encephalopathy, exercise intolerance, muscle weakness, easy fatigability, ptosis, gastrointestinal reflux, delayed gastric emptying, cyclic vomiting, elevated transaminases, lactic acidosis, short stature, failure to thrive	Tang et al., 2011 [4]
23.	17 y	42 y	NA	England	c.1399G>A	p.Ala467Thr	7	L	NA	NA	chronic progressive external ophthalmoplegia, ptosis, peripheral neuropathy, sensory and motor neuropathy, distal and proximal neurogenic change	Lax et al., 2012 [18]
24.	25 y	49 y	NA	England	c.2243G>C	p.Trp748Ser	13	L	NA	NA	chronic progressive external ophthalmoplegia, ptosis, peripheral neuropathy, epilepsy, severe sensory and moderate motor neuropathy	Lax et al., 2012 [18]

Table 1. *Cont.*

No.	Age of Onset	Age at Report	Age at Death	Nationality	Genotype				Clinical Manifestations			
					The Other Variant	Expected Amino Acid Change of the Other Variant	Exon	Domain	Liver Failure	Seizure	Other Signs and Symptoms	Reference
25.	26 y	45 y	NA	European	c.1399G>A	p.Ala467Thr	7	L	NA	+	myoclonic seizures, epilepsy	Whittaker et al., 2015 [19]
26.	26 y	55 y	NA	European	c.2243G>C	p.Trp748Ser	13	L	NA	+	myoclonic and tonic-clonic seizures, epilepsy, multifocal epileptiform abnormalities	Whittaker et al., 2015 [19]
27.	40 y	61 y	NA	NA	c.2890C>T	p.Arg964Cys	18	P	NA	NA	chronic progressive external ophthalmoplegia, ptosis	Leighton et al., 2019 [20]
28.	42 y	42 y	NA	NA	c.1399G>A	p.Ala467Thr	7	L	NA	NA	severe ptosis, myopathy, cerebella dysfunction, peripheral neuropathy	Yu-Wai-Man et al., 2013 [21]
29.	48 y	48 y	NA	NA	c.1774C>T	p.Leu592Phe[b]	10	L	NA	NA	sensory ataxic neuropathy, dysarthria, ophthalmoplegia, dysphagia	Kurt et al., 2012 [22]
30.	49 y	55 y	NA	NA	c.1943C>G	p.Pro648Arg	10	L	NA	NA	sensory ataxic neuropathy, dysarthria, ophthalmoparesis	Mazingue et al., 2019 [23]
31.	53 y	55 y	NA	NA	c.1943C>G	p.Pro648Arg	10	L	NA	NA	progressive external ophthalmoplegia, myopathy	Horvath et al., 2006 [16]
32.	54 y	54 y	NA	NA	c.2243G>C	p.Trp748Ser	13	L	NA	NA	ataxia, epilepsy, peripheral neuropathy, cognitive impairment	Yu-Wai-Man et al., 2013 [21]
33.	NA	NA	NA	NA	c.2243G>C	p.Trp748Ser	13	L	NA	NA	mitochondrial recessive ataxia syndrome	Mazingue et al., 2019 [23]
Single heterozygous variant												
34.	23 y	23 y	NA	Italian	NA	NA	NA	NA	NA	NA	sporadic progressive external ophthalmoplegia	Agostino et al., 2003 [24]

P, polymerase domain; L, linker domain; w, week; m, month; y, year; NA, not available or not applicable; +, present; -, not present. [a] Presenting with the homozygous variant, c.3708G>T (p.Gln1236His), in *POLG*. [b] p.Leu592Phe was reported as p.Leu591Phe by Kurt et al., 2012 [22].

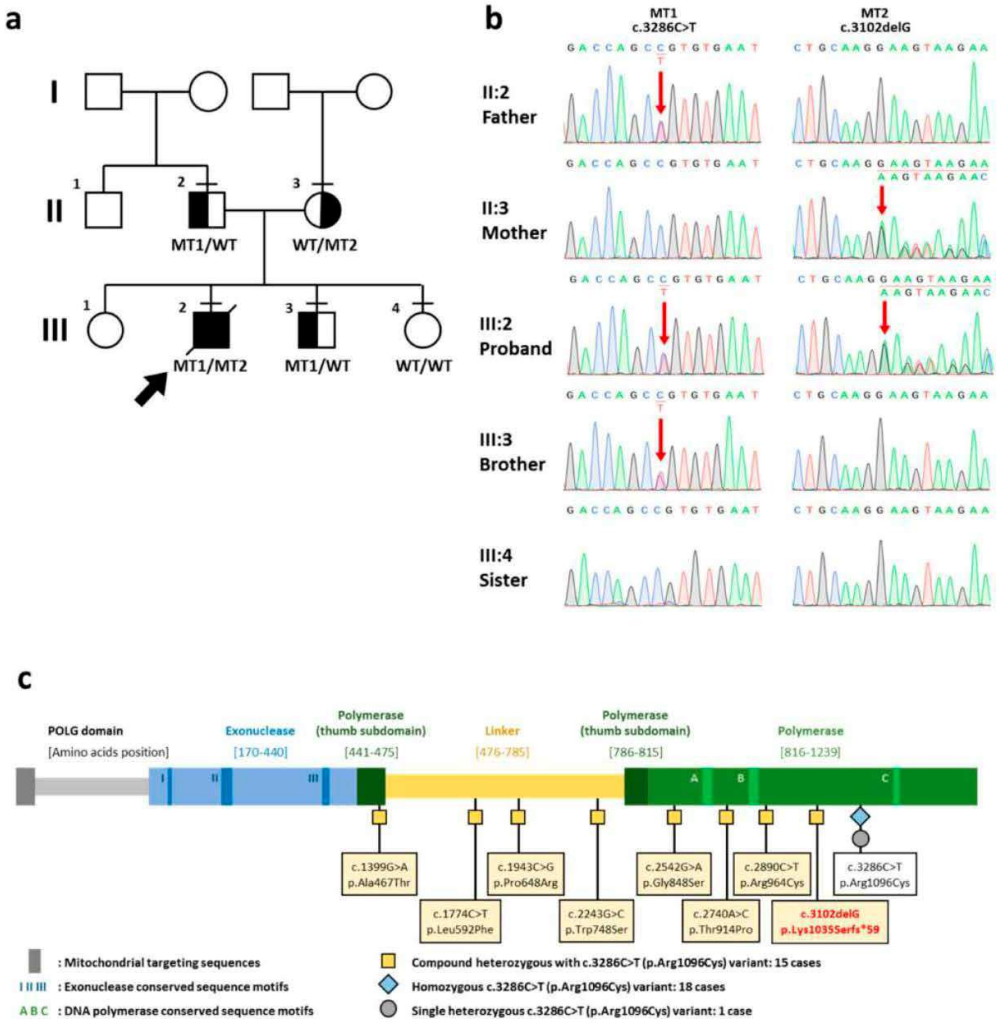


Figure 1. Family pedigree, chromatograms, and schematic diagram of the POLG protein. (**a**) Family pedigree. The proband is indicated by an arrow. A horizontal line above each symbol indicates the family members participated in genetic testing. (**b**) Chromatograms show that the proband possesses the compound heterozygous variants, c.3286C>T and c.3102delG, in *POLG* (NM_002693.3). The heterozygous variant, c3286C>T, is observed in the father and the proband's younger brother. The heterozygous variant, c.3102delG, in *POLG* is present in the mother. Red arrows indicate the *POLG* variants. The younger sister possesses two normal alleles. (**c**) Schematic diagram of the POLG protein. The *POLG* variants reported to be compound heterozygous with the c.3286C>T (p.Arg1096Cys) variant are tagged with yellow square. The homozygous and single heterozygous c.3286C>T (p.Arg1096Cys) variants are tagged with blue diamond and grey circle, respectively. The novel c.3102delG (p.Lys1035Serfs*59) variant identified in the proband is shown in red letters. Functional domain is demonstrated above the diagram. I, II, and III indicate the conserved sequence motifs for 3′–5′ exonuclease function. A, B, and C indicate the conserved sequence motifs for DNA polymerase function. WT, wild type allele; MT1, c.3286C>T allele; MT2, c.3102delG allele.

3. Discussion

We reported an infant affected with severe MCHS. The patient was in good health at birth. The onset of illness was at the age of 4 months. Due to hepatic failure, the patient died at 4 months old or 2 weeks after his first hospital admission. Seizure was not present. Due to rapid disease progression, it is possible that the patient might not survive long enough to develop seizure [2].

Trio WES identified that the proband was compound heterozygous for a novel c.3102delG (p.Lys1035Serfs*59) and a known c.3286C>T (p.Arg1096Cys) variant in *POLG* (NM_002693.3) which was inherited from the mother and father, respectively. Several studies have tried to establish the genotype–phenotype correlation of *POLG*-related disorders, but none were successful. The same variant can lead to a wide range of different symptoms. *POLG* truncating variants including nonsense and frameshift variants have been reported to cause a spectrum of phenotypes in many studies [2,25,26]. The *POLG* Pathogenicity Prediction Server (http://polg.bmb.msu.edu) has been established to predict the pathogenicity of variants based on five distinct clusters. However, the variants affecting different functional domains or clusters of POLG can have either exacerbating or compensatory effects. These complicate the prediction of disease phenotype or prognosis on the basis of observed variants [27]. In this study, we decided to target our review into the previously reported *POLG* c.3286C>T variant. Thirty-four patients (including the proband) with the c.3286C>T variant were identified. Of those, 18 were homozygous, 15 were compound heterozygous, and one was single heterozygous [1,3,4,10–24]. A single heterozygous c.3286C>T variant was reported in a patient affected with progressive external ophthalmoplegia without neurological symptoms [24]. Among 15 compound heterozygous cases for the c.3286C>T variant, our proband had the earliest disease onset and death (4 months old). Consistent with the phenotype, the proband was the only one who was compound heterozygous for the truncating variant while the other 14 cases were compound heterozygous for the missense variant. This suggests that the truncating variant when found with the missense c.3286C>T variant can cause early onset and rapid progression of disease. We also observed that all homozygous cases for the c.3286C>T variant showed symptoms before the age of 2 years and developed seizure. In contrast, a majority of the compound heterozygous cases had late clinical presentation until adulthood and seizure was not common.

POLG is essential for mitochondrial DNA to replicate and repair. Alterations in *POLG* cause mitochondrial DNA depletion or deletion in several organs leading to diverse clinical manifestations. However, the same variant can lead to mitochondrial DNA deletion, depletion or both, complicating phenotype–genotype correlation. In addition, other factors including genetic modifiers, immunity, and environmental effects such as mitochondrial toxins and infections can modify the *POLG* disease phenotype [28,29]. A previous study demonstrated that the homozygous c.3286C>T variant in *POLG* caused a depletion of mitochondrial DNA and a reduction in cytochrome c oxidase activity [11]. A functional study in a patient with Alpers syndrome and compound heterozygosity for a nonsense p.Glu873* and a missense p.Ala467Thr variant showed that more than 95% of functional *POLG* mRNA was derived from the missense allele and less than 5% of mRNA from the nonsense allele. The nonsense variant was found to be subjected to a nonsense-mediated decay and the Alpers phenotype was a consequence of a functional missense allele and selectively nonfunctional nonsense allele [27,30]. Based on the above evidence, it is speculated that the more severe phenotype in our proband, compared with the other compound heterozygous cases, could be a deleterious consequence of the truncating variant combined with the milder effect of the missense variant. The variants were expected to reduce, and interfere with, protein function, resulting in organ malfunction.

At present, no evidence-based therapies are available for *POLG*-related disorders [2]. Genetic testing is essential for prenatal and neonatal screening. Here, the compound heterozygous *POLG* variants were successfully detected by trio WES and the two following prenatal diagnoses were achieved by rapid WES. These prove the efficacy of WES for prenatal screening of *POLG*-related disorders. Newborn screening enables a presymptomatic

diagnosis. This could lead to dose reduction or avoidance of medications metabolized by hepatic enzymes such as valproic acid and sodium valproate. These medications can precipitate or accelerate liver disease. In addition, similar to some other mitochondrial diseases, physical factors such as fever and dehydration may lead to a sudden deterioration and should be avoided.

In conclusion, we report the novel frameshift *POLG* variant expanding the genotypic spectrum of *POLG*-related disorders and demonstrate the association between the truncating variant and disease severity. We also show that prenatal exome sequencing is effectively used for screening *POLG*-related disorders.

Supplementary Materials: The following are available online at https://www.mdpi.com/2409-515X/7/1/9/s1, Table S1. Primer sequences used for confirmation of variants, c.3102delG and c.3286C>T, identified through WES.

Author Contributions: Conceptualization, T.P. and V.S.; Methodology, K.S., K.R., T.T. and C.S.; Formal Analysis, Investigation, K.S., K.R., T.T., T.P. and C.S.; Resources, T.P. and V.S.; Writing—Original Draft Preparation, K.S., K.R. and T.P.; Writing—Review and Editing, K.S., K.R., T.T., C.S., T.P. and V.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This project is funded by the National Research Council of Thailand, TSRI Fund (CU_FRB640001_01_32_3, CU_FRB640001_01_32_4), Global Partnership CU-C16F630029, Health Systems Research Institute, Thailand Research Fund (MRG6280001, DPG6180001), and Faculty Research Grant (DRF64013), Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University. KS was supported by the Ratchadapisek Somphot Fund for Postdoctoral Fellowship, Chulalongkorn University.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Human Research Ethics Committee of Thammasat University No.1, Thailand (071/2019, Date of approval: 25 April 2019).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available in the supplementary material.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Wong, L.J.; Naviaux, R.K.; Brunetti-Pierri, N.; Zhang, Q.; Schmitt, E.S.; Truong, C.; Milone, M.; Cohen, B.H.; Wical, B.; Ganesh, J.; et al. Molecular and clinical genetics of mitochondrial diseases due to *POLG* mutations. *Hum. Mut.* **2008**, *29*, E150–172. [CrossRef]
2. Rahman, S.; Copeland, W.C. *POLG*-related disorders and their neurological manifestations. *Nat. Rev. Neurol.* **2019**, *15*, 40–52. [CrossRef]
3. Stumpf, J.; Saneto, R.; Copeland, W. Clinical and molecular Features of *POLG*-related mitochondrial disease. *Csh Perspect Biol.* **2013**, *5*, a011395. [CrossRef]
4. Tang, S.; Wang, J.; Lee, N.C.; Milone, M.; Halberg, M.C.; Schmitt, E.S.; Craigen, W.J.; Zhang, W.; Wong, L.J. Mitochondrial DNA polymerase gamma mutations: An ever expanding molecular and clinical spectrum. *J. Med. Genet.* **2011**, *48*, 669–681. [CrossRef]
5. Nowwarote, N.; Theerapanon, T.; Osathanon, T.; Pavasant, P.; Porntaveetus, T.; Shotelersuk, V. Amelogenesis imperfecta: A novel *FAM83H* mutation and characteristics of periodontal ligament cells. *Oral Dis.* **2018**, *24*, 1522–1531. [CrossRef] [PubMed]
6. Hemwong, N.; Phokaew, C.; Srichomthong, C.; Tongkobpetch, S.; Srilanchakon, K.; Supornsilchai, V.; Suphapeetiporn, K.; Porntaveetus, T.; Shotelersuk, V. A patient with combined pituitary hormone deficiency and osteogenesis imperfecta associated with mutations in *LHX4* and *COL1A2*. *J. Adv. Res.* **2020**, *21*, 121–127. [CrossRef] [PubMed]
7. Köhler, S.; Carmody, L.; Vasilevsky, N.; Jacobsen, J.O.B.; Danis, D.; Gourdine, J.-P.; Gargano, M.; Harris, N.L.; Matentzoglu, N.; McMurry, J.A.; et al. Expansion of the Human Phenotype Ontology (HPO) knowledge base and resources. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *47*, D1018–D1027. [CrossRef] [PubMed]
8. Stenson, P.D.; Mort, M.; Ball, E.V.; Shaw, K.; Phillips, A.; Cooper, D.N. The Human Gene Mutation Database: Building a comprehensive mutation repository for clinical and molecular genetics, diagnostic testing and personalized genomic medicine. *Hum. Genet.* **2014**, *133*, 1–9. [CrossRef] [PubMed]
9. Richards, S.; Aziz, N.; Bale, S.; Bick, D.; Das, S.; Gastier-Foster, J.; Grody, W.W.; Hegde, M.; Lyon, E.; Spector, E.; et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet. Med.* **2015**, *17*, 405–424. [CrossRef]
10. Mohamed, K.; FathAllah, W.; Ahmed, E. Gender variability in presentation with Alpers' syndrome: A report of eight patients from the UAE. *J. Inherit. Metab Dis.* **2011**, *34*, 439–441. [CrossRef]

11. Ashley, N.; O'Rourke, A.; Smith, C.; Adams, S.; Gowda, V.; Zeviani, M.; Brown, G.; Fratter, C.; Poulton, J. Depletion of mitochondrial DNA in fibroblast cultures from patients with *POLG1* mutations is a consequence of catalytic mutations. *Hum. Mol. Genet.* **2008**, *17*, 2496–2506. [CrossRef]
12. Bijarnia-Mahay, S.; Mohan, N.; Goyal, D.; Verma, I. Mitochondrial DNA depletion syndrome causing liver failure. *Indian Pediatr.* **2014**, *51*, 666–668. [CrossRef]
13. Stewart, J.D.; Schoeler, S.; Sitarz, K.S.; Horvath, R.; Hallmann, K.; Pyle, A.; Yu-Wai-Man, P.; Taylor, R.W.; Samuels, D.C.; Kunz, W.S.; et al. *POLG* mutations cause decreased mitochondrial DNA repopulation rates following induced depletion in human fibroblasts. *Biochim. Biophys Acta.* **2011**, *1812*, 321–325. [CrossRef]
14. Papandreou, A.; Rahman, S.; Fratter, C.; Ng, J.; Meyer, E.; Carr, L.J.; Champion, M.; Clarke, A.; Gissen, P.; Hemingway, C.; et al. Spectrum of movement disorders and neurotransmitter abnormalities in paediatric POLG disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* **2018**, *41*, 1275–1283. [CrossRef] [PubMed]
15. Kentab, A. Alpers–Huttenlocher syndrome presenting with epilepsia partialis continua. *JNSK* **2019**, *9*, 29–32. [CrossRef]
16. Horvath, R.; Hudson, G.; Ferrari, G.; Futterer, N.; Ahola, S.; Lamantea, E.; Prokisch, H.; Lochmuller, H.; McFarland, R.; Ramesh, V.; et al. Phenotypic spectrum associated with mutations of the mitochondrial polymerase gamma gene. *Brain* **2006**, *129*, 1674–1684. [CrossRef]
17. De Kovel, C.G.; Brilstra, E.H.; van Kempen, M.J.; Van't Slot, R.; Nijman, I.J.; Afawi, Z.; De Jonghe, P.; Djemie, T.; Guerrini, R.; Hardies, K.; et al. Targeted sequencing of 351 candidate genes for epileptic encephalopathy in a large cohort of patients. *Mol. Genet. Genom. Med.* **2016**, *4*, 568–580. [CrossRef]
18. Lax, N.Z.; Whittaker, R.G.; Hepplewhite, P.D.; Reeve, A.K.; Blakely, E.L.; Jaros, E.; Ince, P.G.; Taylor, R.W.; Fawcett, P.R.W.; Turnbull, D.M. Sensory neuronopathy in patients harbouring recessive polymerase γ mutations. *Brain* **2012**, *135*, 62–71. [CrossRef]
19. Whittaker, R.G.; Devine, H.E.; Gorman, G.S.; Schaefer, A.M.; Horvath, R.; Ng, Y.; Nesbitt, V.; Lax, N.Z.; McFarland, R.; Cunningham, M.O.; et al. Epilepsy in adults with mitochondrial disease: A cohort study. *Ann. Neurol.* **2015**, *78*, 949–957. [CrossRef] [PubMed]
20. Heighton, J.; Brady, L.; Sadikovic, B.; Bulman, D.; Tarnopolsky, M. Genotypes of chronic progressive external ophthalmoplegia in a large adult-onset cohort. *Mitochondrion* **2019**, *49*, 227–231. [CrossRef] [PubMed]
21. Yu-Wai-Man, C.; Smith, F.E.; Firbank, M.J.; Guthrie, G.; Guthrie, S.; Gorman, G.S.; Taylor, R.W.; Turnbull, D.M.; Griffiths, P.G.; Blamire, A.M.; et al. Extraocular muscle atrophy and central nervous system involvement in chronic progressive external ophthalmoplegia. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e75048. [CrossRef] [PubMed]
22. Kurt, B.; Naini, A.B.; Copeland, W.C.; Lu, J.; Dimauro, S.; Hirano, M. A novel *POLG* gene mutation in a patient with SANDO. *J. Exp. Integr. Med.* **2012**, *2*. [CrossRef] [PubMed]
23. Masingue, M.; Adanyeguh, I.; Tchikviladzé, M.; Maisonobe, T.; Jardel, C.; Galanaud, D.; Mochel, F. Quantitative neuroimaging biomarkers in a series of 20 adult patients with *POLG* mutations. *Mitochondrion* **2019**, *45*, 22–28. [CrossRef] [PubMed]
24. Agostino, A.; Valletta, L.; Chinnery, P.; Ferrari, G.; Carrara, F.; Taylor, R.; Schaefer, A.; Turnbull, D.; Tiranti, V.; Zeviani, M. Mutations of *ANT1*, *Twinkle*, and *POLG1* in sporadic progressive external ophthalmoplegia (PEO). *Neurology* **2003**, *60*, 1354–1356. [CrossRef] [PubMed]
25. Rouzier, C.; Chaussenot, A.; Serre, V.; Fragaki, K.; Bannwarth, S.; Ait-El-Mkadem, S.; Attarian, S.; Kaphan, E.; Cano, A.; Delmont, E.; et al. Quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragments for the detection of large intragenic *POLG* rearrangements in a large French cohort. *Eur. J. Hum. Genet.* **2014**, *22*, 542–550. [CrossRef]
26. Compton, A.G.; Troedson, C.; Wilson, M.; Procopis, P.G.; Li, F.Y.; Brundage, E.K.; Yamazaki, T.; Thorburn, D.R.; Wong, L.J. Application of oligonucleotide array CGH in the detection of a large intragenic deletion in *POLG* associated with Alpers Syndrome. *Mitochondrion* **2011**, *11*, 104–107. [CrossRef]
27. Nurminen, A.; Farnum, G.A.; Kaguni, L.S. Pathogenicity in POLG syndromes: DNA polymerase gamma pathogenicity prediction server and database. *BBA Clin.* **2017**, *7*, 147–156. [CrossRef] [PubMed]
28. Cohen, B.H.; Chinnery, P.F.; Copeland, W.C. *POLG*-related disorders. In *GeneReviews*; Adam, M.P., Ardinger, H.H., Pagon, R.A., Wallace, S.E., Bean, L.J., Mirzaa, G., Amemiya, A., Eds.; University of Washington: Seattle, WA, USA, 2018.
29. Meyer, J.N.; Leung, M.C.; Rooney, J.P.; Sendoel, A.; Hengartner, M.O.; Kisby, G.E.; Bess, A.S. Mitochondria as a target of environmental toxicants. *Toxicol. Sci.* **2013**, *134*, 1–17. [CrossRef]
30. Chan, S.S.; Longley, M.J.; Naviaux, R.K.; Copeland, W.C. Mono-allelic *POLG* expression resulting from nonsense-mediated decay and alternative splicing in a patient with Alpers syndrome. *DNA Repair (Amst)* **2005**, *4*, 1381–1389. [CrossRef]

European Journal of Medical Genetics 63 (2020) 104086

Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medical Genetics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejmg

Original article

Expanding phenotypic and mutational spectra of mitochondrial HMG-CoA synthase deficiency

Kitiwan Rojnueangnit[a], Parisa Maneechai[a], Patcharapa Thaweekul[a], Punnapat Piriyanon[a], Sookkasem Khositseth[a], Chupong Ittiwut[b,c], Wanna Chetruengchai[b,c], Wuttichart Kamolvisit[b,c], Thanakorn Theerapanon[d], Kanya Suphapeetiporn[b,c], Thantrira Porntaveetus[d,*], Vorasuk Shotelersuk[b,c]

[a] Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Thammasat University, Pathumthani, 12120, Thailand
[b] Center of Excellence for Medical Genomics, Medical Genomics Cluster, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand
[c] Excellence Center for Genomics and Precision Medicine, King Chulalongkorn Memorial Hospital, The Thai Red Cross Society, Bangkok, 10330, Thailand
[d] Genomics and Precision Dentistry Research Unit, Department of Physiology, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand

ARTICLE INFO

Keywords:
HMGCS2
Hypoglycemia
Hypertriglyceridemia
Hypophosphatemia
Hepatomegaly

ABSTRACT

Mitochondrial 3-hydroxy-3 methylglutaryl-CoA synthase-2 deficiency (HMGCS2D) is a rare autosomal recessive inborn error of hepatic ketogenesis, caused by mutations in *HMGCS2*. As its clinical and laboratory manifestations resemble many other metabolic disorders, HMGCS2D definite diagnosis presents a challenge, frequently requiring molecular tests. Only 26 patients with *HMGCS2* mutations have been previously described, and this study reports the first two unrelated Thai patients, a 9-month-old male and an 8-month-old female, with HMGCS2D. During acute episodes, steatorrhea and dyslipidemia occurred, both previously unreported. Increased serum levels of triglycerides, very low density lipoproteins (VLDL), and low density lipoproteins (LDL), along with a decreased serum level of HDL were found. Both patients had hypophosphatemic encephalopathy, and the female had metabolic acidosis without hypoglycemia. Trio whole-exome sequencing (WES) revealed that the male harbored two *HMGCS2* mutations, a novel c.1480C>T (p.Arg494*) and a previously reported c.1502G>C (p.Arg501Pro), while the female was compound heterozygous for the c.1502G>C (p.Arg501Pro) and a previously reported mutation, c.520T>C (p.Phe174Leu). Interestingly, c.1502G>C (p.Arg501Pro) was not only found in both of our patients but also detected heterozygously in 9 out of 1081 unrelated individuals (allele frequency of 9/2162; 0.42%) in our in-house Thai exome database. Discovery of this common mutation suggests there could be about 14 babies with HMGCS2D within 800,000 newborns in Thailand annually. Therefore, awareness of HMGCS2D among medical personnel in Thailand should be raised.

1. Introduction

Mitochondrial 3-hydroxy-3 methylglutaryl-CoA synthase-2 deficiency (mitochondrial HMG-CoA synthase deficiency; HMGCS2D; MIM#605911) is a rare autosomal recessive metabolic disorder. The disease is caused by mutations in the *HMGCS2* gene (MIM*600234), which encodes mitochondrial HMG-CoA synthase (HMG-CoA synthase 2). The enzyme catalyzes the reactions of acetyl-CoA and acetoacetyl-CoA into HMG-CoA during ketone body synthesis (Hegardt, 1999). The lack of this enzyme leads to an underproduction of ketone bodies, which are an important energy supply for brain, heart, kidneys and metabolic systems during fasting and carbohydrate deprivation.

Clinical symptoms include intermittent hypoglycemia, vomiting, lethargy, hepatomegaly, respiratory distress, and encephalopathy, precipitated by prolonged fasting or infections (Thompson et al., 1997; Wolf et al., 2003). Hypoketosis, dicarboxylic aciduria, transaminitis, and metabolic acidosis are common laboratory findings (Pitt et al., 2015; Puisac et al., 2018; Wolf et al., 2003). Without proper treatment, this deficiency can progress to coma.

The presentation of hypoketotic hypoglycemia with an elevation of non-specific dicarboxylic aciduria in HMGCS2D resembles that of other fatty acid oxidation disorders. However, normal acyl-carnitine profile

* Corresponding author.
E-mail address: thantrira.p@chula.ac.th (T. Porntaveetus).

https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2020.104086
Received 25 December 2019; Received in revised form 9 September 2020; Accepted 4 October 2020
Available online 9 October 2020
1769-7212/© 2020 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

and elevation of specific biomarkers, such as 3-hydroxydicarboxylic acids, 5- hydroxyhexanoic acid, trans-5-hydroxyhex-2-enoic, and trans-3-hydroxyhex-4-enoic may be suggestive of the disease (Pitt et al., 2015). Definite diagnosis is obtained by detecting decreased activity of mitochondrial HMG-CoA synthase in liver cells is invasive, required controls, and complicated by cytosol HMG-CoA synthase. Genetic analysis of *HMGCS2* is currently considered to be the best diagnostic tool (Ramos et al., 2013), and to date, less than 40 mutations in *HMGCS2* have been reported. Most are missense variations located in exons 1–9, with the exception of exon 8 (Pitt et al., 2015; Puisac et al., 2018; Ramos et al., 2013).

Here, we describe two unrelated Thai infant patients with unique presentations which add to the phenotypic spectrum of HMGCS2D. Whole exome sequencing identified one novel mutation to expand the mutational spectrum of *HMGCS2*. Notably, allele frequency for the c.1502G>C (p.Arg501Pro) mutation is 0.42% in our Thai exome database, suggesting that Thai patients with HMGCS2D have been underdiagnosed.

2. Clinical report

Our study was approved by the Human Research Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Thammasat University No. 1 (MTU-EC-PE-0-061/62). Written informed consent was obtained from each participant.

2.1. Patient data

2.1.1. Patient 1

A nine-month-old male, was the second child of healthy and non-consanguineous Thai parents. He was delivered at term by cesarean section, without complications, with a birth weight of 2830 g. He had been in good health until nine months of age, when he got a cold and presented with drowsiness. Admitted to a local hospital, he was found to have hypoglycemia (glucose 1.28 mmol/L) and 2+ urine ketones. He recovered after receiving intravenous glucose infusion, intravenous ampicillin, and supportive treatment. Two weeks later, he had poor appetite, low grade fever, and oily-stool diarrhea. Investigations revealed milky serum (Fig. 1A) and a blood glucose level of 6.55 mmol/L.

He was then referred to our tertiary care hospital. His weight was 7.5 kg (10th percentile), length 68 cm (10th-25th percentile), and head circumference 44 cm (50th percentile). He had hepatomegaly (liver span of 13 cm), mild anemia (hemoglobin 6.52 mmol/L and hematocrit 0.30 L/L), high triglycerides (31.31 mmol/L; reference 0.68–1.69), high cholesterol (9.9 mmol/L; < 5.17) with high LDL (3.65 mmol/L; < 2.59) and low HDL (0.23 mmol/L; >1), cholestasis with total bilirubin of 61.05 μmol/L, direct bilirubin 45.66 μmol/L, AST 6.81 μmol/L, ALT 4.5 μmol/L, and ALP 3.48 μmol/L. Electrolytes showed hyponatremia and metabolic acidosis with high anion gap (corrected Na 134 mmol/L, HCO_3 14 mmol/L with a gap of 22; reference 8–16); serum phosphate was low (1.03 mmol/L). The levels of lipase (0.4 μmol/L; 0.35–0.85) and amylase (0.4 μmol/L; 0.47–1.67) were within normal limits. Serum ketones were 0.2 mmol/L (reference 0.6–1.5). Serum lipoprotein electrophoresis revealed the presence of chylomicron as well as elevated VLDL and LDL. He received supportive care, recovered, and was discharged from the hospital.

A week later, he was again drowsy, had fatty diarrhea, and was admitted to our hospital. He was found to have normoglycemia, hyponatremia, metabolic acidosis with a wide anion gap (corrected Na 119, K 3.2, Cl 84, corrected Cl 89, HCO_3 11.8 mmol/L), elevated triglycerides (28 mmol/L), high cholesterol (9.5 mmol/L), high LDL (3.9 mmol/L), low HDL (0.44 mmol/L), fractional excretion of sodium 0.14%, with normal findings from a brain CT scan. His liver ultrasound demonstrated infiltrative liver disease suggesting fatty liver: a core needle liver biopsy revealed marked steatosis (Fig. 1B).

A serum phosphate of 0.36 mmol/L and tubular resorption of PO_4 of 5% (normal range >85%) were detected. Hypophosphatemia was determined to be the cause of his drowsiness. Proximal tubular function was evaluated and revealed evidence of marked hyperphosphaturia and proteinuria (urine protein/creatinine ratio of 1.88). Glucosuria was not detected. After being given a PO_4 supplement, his serum PO_4 was above 0.81 mmol/L, and he became alert and active.

2.1.2. Patient 2

An eight-month-old female, was born at term after an uncomplicated pregnancy from non-consanguineous parents. She had been healthy until the age of 8 months when she had vomiting and diarrhea. Then, she became unresponsive with a Kussmaul breathing pattern. Laboratory investigations showed metabolic acidosis and wide anion gap of 41 (Na 140, K 4.85, Cl 97, HCO_3 2 mmol/L). Besides the multiple dicarboxylic acids and ketone bodies detected in her urine, semi-quantitative urine organic acid analysis found a large amount of lactic acid with a moderate amount of beta-hydroxyisovaleric acid. 4-OH-6-methyl-2-pyrone (4-HMP) was not detected. Serum glucose was 3.39 mmol/L, and serum ketones were negative (0.66 mmol/L). Her AST (6.5 μmol/L; 0.13–1) and ALT (2.95 μmol/L; 0.12–0.91) levels were elevated. Lipid profiles were not measured at the critical period.

New onset seizures began while the patient was hospitalized, and a CT scan revealed mild brain atrophy. Hypophosphatemia was observed (PO_4 0.61 mmol/L) while magnesium, calcium and albumin levels were within normal ranges. Stool culture was positive for Salmonella group C. Intravenous fluids and bicarbonate bolus were given. However, due to persistence acidosis with pH < 7, she eventually underwent hemodialysis. After two weeks of hospitalization, she fully recovered.

2.2. Mutation analyses

Trio whole-exome sequencing was performed as previously described (Intarak et al., 2019; Porntaveetus et al., 2018). SNVs and indels were filtered by the following criteria: located in exons or flanking introns, not synonymous, and minor allele frequency less than 1% in both the 1000 Genomes Project and our in-house database of 1081 Thai exomes (2162 alleles). Compound heterozygous mutations in *HMGCS2* (NM_005518.3) were identified in both patients. Patient 1 harbored the *HMGCS2* mutations, c.1480C>T, p.Arg494* (ClinVar accession SCV001169710) inherited from his father and c.1502G>C, p.Arg501Pro from his mother (ClinVar accession SCV001189983) (Fig. 1D). The c.1480C>T, p.Arg494* variant was observed in two out of 282,752 alleles in gnomAD (https://gnomad.broadinstitute.org). Patient 2 also possessed the c.1502G>C, p.Arg501Pro mutation in *HMGCS2* inherited from her father and the known mutation c.520T>C, p.Phe174Leu from her mother (Fig. 1E). The known c.520T>C variant was previously reported in patients with HMGCS2D (Bouchard et al., 2001; Pitt et al., 2015) and predicted to be possibly damaging (PolyPhen: 0.855), possibly pathogenic (M-CAP: 0.09), tolerated (SIFT: 0.07), and highly conserved among several species. Interestingly, both patients shared the c.1502G>C, p.Arg501Pro mutation. This variant was found in three out of 251,332 alleles in genomAD, whereas it was present in nine out of 2162 alleles (0.42%) of 1081 unrelated Thai individuals. It was predicted to be probably damaging (PolyPhen: 1.0), possibly pathogenic (M-CAP: 0.110), deleterious (SIFT: 0.0), and highly conserved among species (Fig. 1E).

3. Discussion

Clinical and molecular findings of cases with *HMGCS2* mutations are summarized in Table 1. Patient 1 had three notable laboratory findings. The first was severe hypertriglyceridemia and low HDL, previously reported in only one patient (Conboy et al., 2018). Marked elevation of serum triglycerides typically results from increased plasma concentration of chylomicron and VLDL. This may be due to abnormal ketogenesis and hypoglycemia, leading to an increase of lipolysis, and markedly

Table 1
Clinical and molecular findings of cases with *HMGCS2* mutations.

Cases	This study		Liu et al. (2019)	Lee et al. (2019)	Zhang et al. (2019)	Ma and Yu (2018)	Puisac et al. (2018)		
	Patient 1	Patient 2	Patient 1	Patient 1	Patient 1	Patient 1	Patient 1	Patient 2	Patient 3
Ethnicity	Thai	Thai	Chinese	Japanese	Chinese	NA	Romanian	South-Asian	French/ Canadian
Gender	M	F	M	M	F	F	M	M	M
Age of the first symptoms (month)	9	8	9	12	11	8	3	11	36
Trigger by vomiting/diarrhea/ poor intake	+	+	+	+	–	+	+	+	–
Coma	–	+	NA	+	+	–	–	–	–
Kussmual breathing	–	+	+	–	NA	NA	–	–	–
Hepatomegaly	+	–	NA	+	+	NA	–	–	–
Fatty liver	+	NA	NA	+	+	NA	NA	NA	NA
Seizure	–	+	+	+	NA	+	NA	NA	+
Encephalopathy	+	+	+	+	+	NA	–	+	–
Hypoglycemia	+	–	+	–	NA	+	+	+	+
Metabolic acidosis	+	+	+	+	+	+	–	–	–
Renal replacement therapy	–	+	NA	–	+	NA	–	–	–
Steatorrhea	+	–	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Transaminitis	+	+	+	+	+	+	–	+	+
Dyslipidemia (hypertriglyceridemia, low HDL)	+	NA	NA	NA	NA	NA	–	–	–
Elevation of free fatty acids	NA	NA	NA	+	NA	NA	NA	NA	NA
Hypophosphatemia	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Ketonuria	++	+	NA	+	NA	NA	+	+	+
Urine organic acid									
- Multiple dicarboxylic acids	NA	+	+	+	+	+	+	+	+
- Ketone bodies (3-hydroxy-n-butyric acid, acetone)	NA	moderate	moderate	mildly elevated	increased level	NA	low	low	NA
Mutation (allele 1)	c.1480C>T (p. Arg494*)	c.1502G>C (p. Arg501Pro)	c.100C>T (p.Gln34*)	c.130_131insC (p. Leu44Profs*29)	c.1347_1351del (p. Ala450Profs*7)	c.1502G>A (p. Arg501Gln)	c.334C>T (p. Arg112Trp)	c.430G>T (p. Val144Leu)	c.1514G>A (p. Arg505Gln)
Mutation (allele 2)	c.1502G>C (p. Arg501Pro)	c.520T>C (p. Phe174Leu)	c.1465delA (p. Thr489Leufs*55)	c.1156_1157insC (p. Leu386Profs*73)	c.1201G>T (p. Glu401*)	c.1502G>A (p. Arg501Gln)	NA	c.430G>T (p. Val144Leu)	c.1514G>A (p. Arg505Gln)

Cases	Conboy et al., 2017	Pitt et al., 2015						
	Patient 1	A1-1	A1-2	A1-3	A1-4	A2-1	A3-1	A4-1
Ethnicity	NA	Lebanese	Lebanese	Lebanese	Lebanese	Greek	Egyptian	Indian
Gender	M	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Age of the first symptoms (month)	8	8	9	6	10	37	6	29
Trigger by vomiting/diarrhea/poor intake	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Coma	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Kussmual breathing	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Hepatomegaly	+	+	+	+	+	NA	+	NA
Fatty liver	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Seizure	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Encephalopathy	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Hypoglycemia	–	+	+	+	+	+	+	+
Metabolic acidosis	+	+	+	+	+	NA	+	NA
Renal replacement therapy	NA	+	+	+	+	–	–	–
Steatorrhea	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Transaminitis	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

(continued on next page)

Table 1 (*continued*)

Cases	Conboy et al., 2017	Pitt et al., 2015						
	Patient 1	A1-1	A1-2	A1-3	A1-4	A2-1	A3-1	A4-1
Dyslipidemia (hypertriglyceridemia, low HDL)	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Elevation of free fatty acids	NA	+	+	+	+	+	+	NA
Hypophosphatemia	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Ketonuria	++	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Urine organic acid								
- Multiple dicarboxylic acids	+	+	+	+	+	+	+	+
- Ketone bodies (3-hydroxy-n- butyric acid, acetone)	moderate	low	low	high	low	low	low	low
Mutation (allele 1)	c.409A>T (p. Lys137*)	c.1-?_104+?del (exon 1 deletion)	c.1-?_104+?del (exon 1 deletion)	c.1-?_104+?del (exon 1 deletion)	c.1-?_104+?del (exon 1 deletion)	c.797T>C (p. Leu266Ser)	c.1162G>A (p. Gly388Arg)	c.506G>A (p. Gly169Asp)
Mutation (allele 2)	c.1141A>G (p. Met381Val)	c.1-?_104+?del (exon 1 deletion)	c.1-?_104+?del (exon 1 deletion)	c.1-?_104+?del (exon 1 deletion)	c.1-?_104+?del (exon 1 deletion)	c.1220T>C (p. Ile407Thr)	c.1162G>A (p. Gly388Arg)	c.1514G>A (p. Arg505Gln)

Cases	Pitt et al., 2015						Ramos et al., 2013	Aledo et al. (2006)
	B1-1	B2-1	B3-1	B4-1	B5-1	B6-1	Proband	Proband
Ethnicity	Mediterranean	English	Australian	Northern Irish	Arabian	Australian (Chinese/ Caucasian descent)	Caucasian	NA
Gender	NA	NA	NA	NA	NA	NA	M	M
Age of the first symptoms (month)	12	<24	<24	<24	<24	<24	15	7
Trigger by vomiting/diarrhea/poor intake	NA	NA	NA	NA	NA	NA	+	+
Coma	+	+	+	+	+	+	NA	+
Kussmual breathing	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	+
Hepatomegaly	NA	NA	NA	NA	NA	NA	+	+
Fatty liver	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Seizure	+	+	+	+	+	+	NA	NA
Encephalopathy	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	+
Hypoglycemia	+	+	+	+	+	+	+	+
Metabolic acidosis	+	+	+	+	+	+	NA	+
Renal replacement therapy	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	–
Steatorrhea	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Transaminitis	NA	NA	NA	NA	NA	NA	+	–
Dyslipidemia (hypertriglyceridemia, low HDL)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Elevation of free fatty acids	NA	NA	NA	NA	NA	NA	+	NA
Hypophosphatemia	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Ketonuria	NA	NA	NA	NA	NA	NA	++	–
Urine organic acid								
- Multiple dicarboxylic acids	NA	NA	NA	NA	NA	NA	+	+
- Ketone bodies (3-hydroxy-n-butyric acid, acetone)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	trace	trace
Mutation (allele 1)	c.1-?_104+?del (exon 1 deletion)	c.634G>A (p. Gly212RArg)	c.847C>T (p. Gln283*)	c.553T>C (p. Trp185Arg)	c.1078T (p. Ser360Pro)	c.502G>A (p.Gly168Ser)	c.1162G>A (p. Gly388Arg)	c.563G>A (p. Arg188His)
Mutation (allele 2)	c.1-?_104+?del (exon 1 deletion)	c.431_432del (p. Val144Serfs*11)	c.695G>T (p. Gly232Val)	c.1508A>G (p. Tyr503Cys)	c.1078T (p. Ser360Pro)	c.526T>C (p.Phe174Leu)	c.1270C>T (p. Arg424*)	c.920 T>C (p. Met307Thr)

Cases	Wolf et al., 2003	Zschocke et al., 2002	Aledo et al., 2001	Bouchard et al. (2001)[a]	
	Proband	Proband	Proband	Patient 1	Patient 2
Ethnicity	Caucasian	German	NA	Chinese	NA
Gender	F	F	M	M	M
Age of the first symptoms (month)	53	9	11	72	16

(*continued on next page*)

Table 1 (*continued*)

Cases	Wolf et al., 2003	Zschocke et al., 2002	Aledo et al., 2001	Bouchard et al. (2001)[a]	
	Proband	Proband	Proband	Patient 1	Patient 2
Trigger by vomiting/diarrhea/poor intake	+	+	+	+	+
Coma	+	+	+	+	+
Kussmaul breathing	NA	NA	NA	NA	NA
Hepatomegaly	+	+	+	NA	+
Fatty liver	+	NA	NA	NA	-
Seizure	NA	NA	NA	+	NA
Encephalopathy	NA	NA			
Hypoglycemia	+	+	+	+	+
Metabolic acidosis	+	NA	NA	NA	NA
Renal replacement therapy		NA	NA	NA	NA
Steatorrhea	NA	NA	NA	NA	NA
Transaminitis	+	-	+	-	+
Dyslipidemia (hypertriglyceridemia, low HDL)	NA	NA	NA	NA	NA
Elevation of free fatty acids	+	+	+	+	+
Hypophosphatemia	+	NA	NA	NA	NA
Ketonuria	NA	-	NA	-	-
Urine organic acid					
- Multiple dicarboxylic acids	+	+	+	-	+
- Ketone bodies (3-hydroxy-n- butyric acid, acetone)	low	low	low	-	low
Mutation (allele 1)	c.160G>A (p.Val54Met)	c.634G>A (p.Gly212Arg)	c.634G>A (p.Gly212Arg)	c.520 T>C (p.Phe174Leu)	c.1270C>T (p.Arg424*)
Mutation (allele 2)	c.500A>G (p.Tyr167Cys)	c.1016+1G>A (IVS5+1G>A)	c.1499G>A (p.Arg500His)	c.520 T>C (p.Phe174Leu)	c.1270C>T (p.Arg424*)

M, male; F, female; NA, not available; +, present; -, not present.

[a] Clinical reports by Morris et al. (1998), Thompson et al. (1997).

elevating free fatty acids along with triglycerides (Fukao et al., 2014). The reuptake of free fatty acids into hepatic cells can lead to the synthesis of hepatic VLDL and overproduction of triglycerides, spurring on fatty liver. In addition, metabolic illnesses or stressful conditions potentially lead to a decrease in endothelial lipoprotein lipase activity for the hydrolysis of triglyceride carried in chylomicron and VLDL (Kersten, 2014; Olivecrona, 2016). Hepatocytic inflammation decreases hepatic lipase synthesis and function; therefore, it is possibly all these reasons lead to hypertriglyceridemia (Chatterjee and Sparks, 2011; Olivecrona, 2016). It is possible that dyslipidemia may have occurred in previously studied HMGCS2D patients, as suggested by the findings of fatty liver and elevated free fatty acids (Fukao et al., 2014).

The second important feature was the intermittent steatorrhea during acute episode, which has not yet been reported in any patients with *HMGCS2* mutations. One possibility is that inflammation of fatty liver stimulates some nuclear receptors, which, in turn, regulate hepatic lipogenesis and reduce bile flow. This decrease of bile in the small bowel interferes with fat absorption and causes steatorrhea in the patient (Mulder et al., 2009).

The third pertinent finding was severe hypophosphatemia leading to encephalopathy. Hypophosphatemia was also detected in Patient 2 and previously reported in one patient (Wolf et al., 2003). Renal phosphate loss could be due to the abnormal absorption of the proximal tubules. Hyponatremia was noted in Patient 1, but his fractional excretion of sodium was less than 1%. It is, therefore, likely that the hyponatremia is pseudohyponatremia due to hypertriglyceridemia and inadequate intake, not renal sodium loss. Although the presence of 4-HMP in urine has been reported as a biomarker of HMGCS2D (Pitt et al., 2015), the substance is not always present (Conboy et al., 2018; Puisac et al., 2018). It is possible that 4-HMP may only appear during acute episodes of hypoglycemia and metabolic decompensation (Pitt et al., 2015).

In HMGCS2D, hypoglycemia, as a result of prolonged fasting or starvation, is usually a trigger for an acute episode. Patient 2 did not have hypoglycemia but suffered from severe metabolic acidosis requiring hemodialysis. There have been few reports of HMGCS2D cases without hypoglycemia (Conboy et al., 2018; Lee et al., 2019) and those needing dialysis (Pitt et al., 2015; Zhang et al., 2019). Here, we show that metabolic acidosis without hypoglycemia can be a metabolic feature of HMGCS2D.

WES successfully identified two mutant alleles in each patient. Three HMGCS2 mutations in total were identified in two patients. A novel mutation for HMGCS2D was a nonsense mutation, c.1480C>T (p.Arg494*), found in Patient 1. Although the c.1480C>T (p.Arg494*) variant has been registered in gnomAD, it had not previously been found in any patients with any diseases. As we have found it to be a causative variant for HMGCS2, we, thus, classify it as a "novel" mutation. The missense mutation, c.1502G>C (p.Arg501Pro), shared by the two patients was recently described in a South Asian patient with HMGCS2D (Bagheri-Fam et al., 2020). This c.1502G>C variant was predicted to be pathogenic withthe p.Arg501Pro protein completely abolishing HMGCS2 enzymatic activity (Bagheri-Fam et al., 2020). The identification of c.1502G>C (p.Arg501Pro) in our study confirms that it is a causative mutation for HMGCS2D. In addition, an infant affected with HMGCS2D was reported as homozygous for the mutation c.1502G>A, p.Arg501Gln (Ma and Yu, 2018). These cases suggest that arginine at the position 501 is critical for enzymatic function.

Notably, the allele frequency of the c.1502G>C (p.Arg501Pro) in our in-house exome database is 0.42% (9/2162); with our database having around 800,000 newborns in Thailand, there could be 14 babies affected with HMGCS2D. Currently, the newborn screening program in Thailand does not include HMGCS2, the manifestation of the disease is rather nonspecific, and there are only a handful of clinical biochemical geneticists and medical centers having facilities to diagnose it in Thailand. If a well-established health care system providing adequate resources for rapid diagnosis and prompt treatment was developed, the prognosis of HMGCS2D in Thai patients would be excellent.

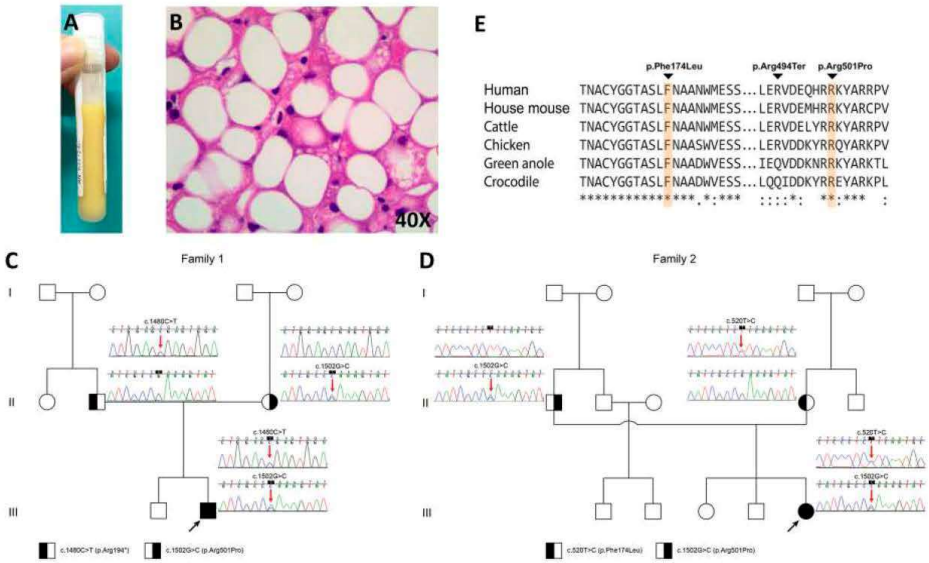


Fig. 1. Phenotype and genotype of the probands. (A) Milky white serum of Patient 1. (B) Histological findings revealed fat accumulation in the hepatocytes (liver steatosis) of Patient 1. (C, D) Family pedigrees and chromatograms of Patient 1 and 2. A black-filled symbol indicates the proband. (E) Amino acid alignment showed the conservation of mutations across species.

In summary, we propose that steatorrhea may be a manifestation of HMGCS2D. We substantiate that hypertriglyceridemia, hypophosphatemic encephalopathy, and metabolic acidosis without hypoketotic hypoglycemia can be its metabolic features. One mutation, c.1502G>C (p.Arg501Pro), is novel as well as common in the Thai population. This justifies raising awareness with medical personnel regarding HMGCS2D in Thailand toward improving patient prognosis.

CRediT authorship contribution statement

Kitiwan Rojnueangnit: Conceptualization, Investigation, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Parisa Maneechai:** Investigation, Writing - review & editing. **Patcharapa Thaweekul:** Investigation, Writing - review & editing. **Punnapat Piriyanon:** Investigation, Writing - review & editing. **Sookkasem Khositseth:** Investigation, Writing - review & editing. **Chupong Ittiwut:** Methodology, Investigation, Writing - review & editing. **Wanna Chetruengchai:** Methodology, Investigation, Writing - review & editing. **Wuttichart Kamolvisit:** Methodology, Investigation, Writing - review & editing. **Thanakorn Theerapanon:** Methodology, Investigation, Writing - review & editing. **Kanya Suphapeetiporn:** Methodology, Investigation, Writing - review & editing. **Thantrira Porntaveetus:** Conceptualization, Investigation, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization. **Vorasuk Shotelersuk:** Conceptualization, Supervision.

Declaration of competing interest

None.

Acknowledgements

This projected is funded by National Research Council of Thailand, Global Partnership CU-C16F630029, Health Systems Research Institute, and Thailand Research Fund (RSA6280001, DPG6180001).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2020.104086.

References

Aledo, R., Mit, C., Dalton, R.N., et al., 2006. Refining the diagnosis of mitochondrial HMG-CoA synthase deficiency. J. Inherit. Metab. Dis. 29 (1), 207–211. https://doi:10.1007/s10545-006-0214-2.

Aledo, R., Zschocke, J., Pié, J., et al., 2001. Genetic basis of mitochondrial HMG-CoA synthase deficiency. Hum. Genet. 109 (1), 19–23. https://doi: 10.1007/s004390100554.

Bagheri-Fam, S., Chen, H., Wilson, S., et al., 2020. The gene encoding the ketogenic enzyme HMGCS2 displays a unique expression during gonad development in mice. PloS One 15 (1), e0227411. https://doi:10.1371/journal.pone.0227411.

Bouchard, L., Robert, M.F., Vinarov, D., et al., 2001. Mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase deficiency: clinical course and description of causal mutations in two patients. Pediatr. Res. 49 (3), 326–331. https://doi:10.1203/00006450-200103000-00005.

Chatterjee, C., Sparks, D.L., 2011. Hepatic lipase, high density lipoproteins, and hypertriglyceridemia. Am. J. Pathol. 178 (4), 1429–1433. https://doi:10.1016/j.ajpath.2010.12.050.

Conboy, E., Vairo, F., Schultz, M., et al., 2018. Mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase deficiency: unique presenting laboratory values and a review of biochemical and clinical features. JIMD Reports 40, 63–69. https://doi:10.1007/8904_2017_59.

Fukao, T., Mitchell, G., Sass, J.O., et al., 2014. Ketone body metabolism and its defects. J. Inherit. Metab. Dis. 37 (4), 541–551. https://doi:10.1007/s10545-014-9704-9.

Hegardt, F.G., 1999. Mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase: a control enzyme in ketogenesis. Biochem. J. 338 (Pt 3), 569–582.

Intarak, N., Theerapanon, T., Thaweesapphithak, S., et al., 2019. Genotype-phenotype correlation and expansion of orodental anomalies in LTBP3-related disorders. Mol. Genet. Genom. 294 (3), 773–787. https://doi:10.1007/s00438-019-01547-x.

Kersten, S., 2014. Physiological regulation of lipoprotein lipase. Biochim. Biophys. Acta 1841 (7), 919–933. https://doi:10.1016/j.bbalip.2014.03.013.

Lee, T., Takami, Y., Yamada, K., et al., 2019. A Japanese case of mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase deficiency who presented with severe metabolic acidosis and fatty liver without hypoglycemia. JIMD Reports 48 (1), 19–25. https://doi:10.1002/jmd2.12051.

Liu, H., Miao, J.-K., Yu, C.-W., et al., 2019. Severe clinical manifestation of mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase deficiency associated with two novel mutations: a case report. BMC Pediatr. 19 (1), 344. https://doi:10.1186/s12887-019-1747-5.

Ma, D., Yu, D., 2018. Mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase deficiency: a case report and literature review. Chin. J. Contemp. Pediatr. 20 (11), 930–933. http://doi:10.7499/j.issn.1008-8830.2018.11.010.

Mulder, J., Karpen, S.J., Tietge, U.J., Kuipers, F., 2009. Nuclear receptors: mediators and modifiers of inflammation-induced cholestasis. Front. Biosci. 14, 2599–2630. https://doi:10.2741/3400.

Olivecrona, G., 2016. Role of lipoprotein lipase in lipid metabolism. Curr. Opin. Lipidol. 27 (3), 233–241. https://doi:10.1097/mol.0000000000000297.

Pitt, J.J., Peters, H., Boneh, A.Y., et al., 2015. Mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase deficiency: urinary organic acid profiles and expanded spectrum of mutations. J. Inherit. Metab. Dis. 38 (3), 459–466. https://doi:10.1007/s10545-014-9801-9.

Porntaveetus, T., Abid, M.F., Theerapanon, T., et al., 2018. Expanding the oro-dental and mutational spectra of kabuki syndrome and expression of KMT2D and KDM6A in human tooth germs. Int. J. Biol. Sci. 14, 381–389. http://doi: 10.7150/ijbs.23517.

Puisac, B., Marcos-Alcalde, I., Hernandez-Marcos, M., et al., 2018. Human mitochondrial HMG-CoA synthase deficiency: role of enzyme dimerization surface and characterization of three new patients. Int. J. Mol. Sci. 19 (4). https://doi:10.3390/ijms19041010.

Ramos, M., Menao, S., Arnedo, M., et al., 2013. New case of mitochondrial HMG-CoA synthase deficiency. Functional analysis of eight mutations. Eur. J. Med. Genet. 56 (8), 411–415. https://doi:10.1016/j.ejmg.2013.05.008.

Thompson, G.N., Hsu, B.Y., Pitt, J.J., Treacy, E., Stanley, C.A., 1997. Fasting hypoketotic coma in a child with deficiency of mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase. N. Engl. J. Med. 337 (17), 1203–1207. https://doi:10.1056/nejm199710233371704.

Wolf, N.I., Rahman, S., Clayton, P.T., Zschocke, J., 2003. Mitochondrial HMG-CoA synthase deficiency: identification of two further patients carrying two novel mutations. Eur. J. Pediatr. 162 (4), 279–280. https://doi:10.1007/s00431-002-1110-x.

Zhang, P., Hu, X., Guo, R., et al., 2019. Novel HMGCS2 pathogenic variants in a Chinese family with mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase deficiency. Pediatric Investigation 3 (2), 86–90. https://doi.org/10.1002/ped4.12130.

Zschocke, J., Penzien, J.M., Bielen, R., et al., 2002. The diagnosis of mitochondrial HMG-CoA synthase deficiency. J. Pediatr. 140 (6), 778–780. https://doi.org/10.1067/mpd.2002.123854.

Manaspon et al. BMC Oral Health (2021) 21:209
https://doi.org/10.1186/s12903-021-01544-w

BMC Oral Health

RESEARCH ARTICLE Open Access

Human dental pulp stem cell responses to different dental pulp capping materials

Chawan Manaspon[1,2], Chavin Jongwannasiri[3], Sujin Chumprasert[4], Noppadol Sa-Ard-Iam[5], Rangsini Mahanonda[5,6], Prasit Pavasant[7], Thantrira Porntaveetus[8] and Thanaphum Osathanon[1,7*]

Abstract

Background: Direct pulp capping is a vital pulp therapy for a pin-point dental pulp exposure. Applying a pulp capping material leads to the formation of a dentin bridge and protects pulp vitality. The aim of this study was to compare the effects of four dental materials, DyCal®, ProRoot® MTA, Biodentine™, and TheraCal™ LC in vitro.

Methods: Human dental pulp stem cells (hDPs) were isolated and characterized. Extraction medium was prepared from the different pulp capping materials. The hDP cytotoxicity, proliferation, and migration were examined. The odonto/osteogenic differentiation was determined by alkaline phosphatase, Von Kossa, and alizarin red s staining. Osteogenic marker gene expression was evaluated using real-time polymerase chain reaction.

Results: ProRoot® MTA and Biodentine™ generated less cytotoxicity than DyCal® and TheraCal™ LC, which were highly toxic. The hDPs proliferated when cultured with the ProRoot® MTA and Biodentine™ extraction media. The ProRoot® MTA and Biodentine™ extraction medium induced greater cell attachment and spreading. Moreover, the hDPs cultured in the ProRoot® MTA or Biodentine™ extraction medium migrated in a similar manner to those in serum-free medium, while a marked reduction in cell migration was observed in the cells cultured in DyCal® and TheraCal™ LC extraction media. Improved mineralization was detected in hDPs maintained in ProRoot® MTA or Biodentine™ extraction medium compared with those in serum-free medium.

Conclusion: This study demonstrates the favorable in vitro biocompatibility and bioactive properties of ProRoot® MTA and Biodentine™ on hDPs, suggesting their superior regenerative potential compared with DyCal® and TheraCal™.

Keywords: Human dental pulp cells, Pulp capping, Mineral trioxide aggregate, Calcium silicate materials, Calcium hydroxide

Background

The ultimate aim of restorative dentistry is to preserve dental pulp tissue vitality. Various therapeutic applications have been introduced to maintain dental pulp function. Direct pulp capping is performed to treat a pin-point dental pulp tissue exposure when there is no inflammation. In this method, a bioactive material is placed directly over the exposed dental pulp tissue. Pulp capping materials function as a physical barrier to seal and prevent a connection between the dental pulp and oral cavity, reducing potential irritation and infection. The material simultaneously promotes dental pulp healing by inducing reparative dentin. Moreover, the direct pulp capping method is more cost-effective compared with traditional root canal treatment [1].

For pulp wound healing process, dental pulp cells generally proliferate and also migrate to the injured site. Subsequently, these cells differentiate into odontoblast-like

*Correspondence: thanaphum.o@chula.ac.th
[1] Dental Stem Cell Biology Research Unit, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand
Full list of author information is available at the end of the article

© The Author(s) 2021. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

cells that form tertiary dentin [2]. The cells participating in this regeneration and repair processes originate from several locations in the pulp tissue, including the perivascular area [3]. In response to a deep dental cavity, the cells in the perivascular area proliferate, then migrate to an area adjacent to the injury site after 4–6 weeks, and form reactionary dentin [3]. Human dental pulp stem cells (hDPs) have been reported as a critical key for reparative dentin formation. STRO1-positive hDPs express pericyte-associated antigen, confirming the perivascular niche of hDPs [4]. These cells exhibit a fibroblast-like morphology with superior proliferative ability compared with human bone marrow-derived mesenchymal stem cells [5]. hDPs express mesenchymal stem cell markers and have multipotential differentiation ability [5]. It has been shown that hDPs can differentiate into ectodermal, mesodermal, and endodermal-derived cells [6–8]. Hence, these cells are proposed as an alternative cell source for various regenerative applications [9].

An ideal pulp capping material should prevent bacterial infiltration, trigger minimal inflammation, and induce dentin bridge formation. Current materials clinically used for pulp capping can be generally divided into calcium hydroxide ($Ca(OH)_2$)-, mineral trioxide aggregate (MTA)-, calcium silicate-, and adhesive-based materials. A systematic review and meta-analysis demonstrated that MTA-treated teeth have a higher clinical success rate (including inflammatory response and dentin bridge formation) than those treated with $Ca(OH)_2$ [10]. However, $Ca(OH)_2$ treatment results in more dentin bridge formation and less inflammation compared with adhesive system treatment [10]. Interestingly, MTA- and calcium silicate-based materials have a comparable effect on dentin bridge formation, inflammatory response, and success rate [10]. Apart from these clinical observations, direct comparison of the effects of these materials on hDPs in vitro is limited. Thus, the aim of the present study was to compare the response of hDPs to four commercially available materials for vital pup therapy, DyCal® ($Ca(OH)_2$-based material), ProRoot® MTA (MTA-based materials), Biodentine™ (calcium silicate-based material), and TheraCal™ LC (resin modified calcium silicate-based material). The effects of these materials on cytotoxicity, cell proliferation, cell migration, and odonto/osteogenic differentiation were examined.

Methods

Cell culture

The hDP isolation protocol was approved by the Human Research Ethics Committee, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University (No. 020/2018). Healthy permanent teeth extracted according to the dental treatment plan (impacted teeth) were collected from healthy donors [11–13]. Dental pulp tissues were separated from the teeth and cell isolation was performed by tissue explanation. The cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM Gibco BRL, CA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco), 1% L-glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin (Gibco). The cells were incubated at 37 °C in a 5% CO_2 humidified atmosphere. Cells obtained between passages 4–6 were used in this study. To characterize the cells, the surface protein expression of hematopoietic and mesenchymal stem cell markers was examined using flow cytometry. In vitro mineralization by the cells was evaluated using alizarin red s and Von Kossa staining.

Flow cytometry analysis

Cells were harvested using trypsin/EDTA solution to obtain a single cell suspension. The cells were immunostained in 1% horse serum (Gibco) in sterile phosphate buffered saline (PBS) with primary antibodies conjugated with fluorescent dye. The antibodies were PerCP-conjugated anti-CD45 (Immuno Tools, Friesoythe, Germany), FITC conjugated anti-human CD44 (BD Bioscience Pharmingen, NJ, USA), PE-conjugated anti-human CD105 (Immuno Tools), and APC-conjugated anti-human CD90 (Immuno Tools). Flow cytometry analysis was performed using a FACS^{Calibur} Flow cytometer (BD Bioscience, CA, USA).

Materials and extraction medium preparation

DyCal® and ProRoot® MTA were purchased from Dentsply International Inc., DE, USA. Biodentine™ was purchased from Septodont, CO, USA. TheraCal™ LC was purchased from Bisco Inc., IL, USA. All materials were prepared following the manufacturers' instructions into a cylindrical mold (5 mm high and 2.5 mm radius: 1.18 cm^2 surface area). The mixtures were prepared in sterile condition and left for 24 h at room temperature before removing the mold. Culture medium (1 ml, following ISO 10993 part 12) was added to each material and incubated for 24 h at 37 °C in a 5% CO_2 atmosphere. The extraction medium from each material was filtered (0.1 µm) and kept at − 20 °C until use. Each experiment employed the same batch of extraction medium.

In the odontogenic induction assay, the pulp capping materials were immersed in odontogenic medium. The odontogenic medium was prepared by adding 50 µg/ml ascorbic acid, 100 nM dexamethasone, and 5 mM β-glycerophosphate into the growth medium [11, 14]. The extraction medium in odontogenic medium was prepared the same as the growth medium. In the migration assay, serum-free culture medium was used to extract the materials.

Cytotoxicity assay

An indirect cytotoxicity assay was performed using serially diluted extraction medium, according to the International Standard ISO (10993). Cells were plated into 96-well plate at 1×10^4 cells per well and maintained in growth medium for 24 h. Serial dilutions of the extraction medium were prepared at 100, 50, 25, and 10% [15]. After 24 h exposure to the extraction medium, an MTT assay was performed and the percentage of cell number was calculated. Cells maintained in growth medium were used as control.

Cell proliferation assay

Cells (1×10^4 cells) were seeded in 24-well plates and maintained in growth medium for 24 h. Subsequently, the cells were exposed to each material's extraction medium at 100, 50, 25, and 10% concentrations. At day 1, 4, and 7, cell viability was evaluated using an MTT assay. The percentage of cell number was calculated. The control condition was cells maintained in normal growth medium. The doubling time was calculated as previously described [16].

Cell morphology evaluation

The effect of direct cell contact with the materials was evaluated. hDPs were directly seeded on the materials and maintained in normal growth medium. At 3, 6, 24, and 48 h, the cells were fixed with 3% glutaraldehyde (Sigma-Aldrich, MO, USA) in PBS for 30 min. The specimens were then dehydrated using a graded ethanol series, followed by hexamethyldisilazane (Sigma-Aldrich, MO, USA) treatment for 5 min. The samples were gold sputter-coated and observed using a Scanning Electron Microscope (SEM) (Quanta 250, FEI, Hillsboro, OR, USA).

Migration assay

Cell migration was performed using an in vitro scratch assay. hDPs at a concentration of 2×10^5 cells/well were seeded into 24-well plates and maintained in normal growth medium for 24 h. The culture medium was then replaced with serum-free culture medium and cultured for 24 h. A scratch was created using a sterilized-pipette tip and the cells were exposed to 25% of each material's extracted medium. Images were captured using an inverted phase contrast microscope at the initial time and 24 h at the same location. Migrated cells were counted from at least 3 images from the same frame as the initial time image.

ALP and in vitro mineralization assay

Cells were seeded into 24-well plates at a concentration of 5×10^4 cells/well. After 24 h, the media were replaced with 25% of the different extracted osteogenic mediums and cultured for 14 days. Alkaline phosphatase staining (ALP) was performed at day 10, and Von Kossa and alizarin red s staining were performed at day 14 [11, 14]. For ALP staining, the cells were fixed and stained with TRACP & ALP double-stain kit (Takara Bio USA Inc., CA, USA). For alizarin red s staining, the cells were fixed with cold methanol and washed with deionized water. Alizarin red s solution (1% w/v) was incubated with the samples for 3 min, removed, and washed with DI water 3 times. The staining was solubilized with 10% cetylpyridinium chloride monohydrate (Sigma-Aldrich, MO, USA) solution and the absorbance was measured at 570 nm using a spectrophotometer. For Von Kossa staining, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, MO, USA) in PBS for 10 min. After rinsing with deionized water, 5% silver nitrate (Sigma-Aldrich, MO, USA) was added and the samples were exposed to UV light for 60 min. The cells were washed and rinsed with 5% sodium thiosulfate (JT Baker) 3 times before counterstaining with methyl-green (Takara Bio USA Inc., CA, USA).

Real-time polymerase chain reaction assay

Cells were seeded at concentration of 5×10^5 cells per well in 24-well plated and maintained in growth medium for 24 h. The culture medium was then replaced with 25% of the different extracted medium and cultured for 4 and 10 days. For this experiment, the extraction medium from Biodentine™ and ProRoot® MTA was prepared using growth medium (GM) or osteogenic induction medium (OM). Fresh growth medium was used as the control condition. To determine the mRNA expression of odonto/osteogenic differentiation markers, total RNA was extracted using Trizol reagent (RiboEx™, GeneAll® Seoul, Korea) [17]. The RNA samples were converted to cDNA using a reverse transcriptase (Promega, WI, USA). FastStart® Essential DNA Green Master was used to evaluate the expression level of osteogenic-related genes. The amplification profile was: 95 °C/20 s, 60 °C/20 s, and 72 °C/20 s for 45 cycles. The expression levels were normalized to *18S* expression levels and subsequently normalized to the control condition. Melting curve analysis was performed to determine product specificity. The oligonucleotide sequences used were *RUNX2* forward: 5′-ATGATGACACTGCCACCTCTG-3′, *RUNX2* Reverse: 5′-GGCTGGATAGTGCATTCGTG-3′, *DMP1* forward: 5′-CAGGAGCACAGGAAAAGGAG-3′, *DMP1*

reverse: 5′-CTGGTGGTATCTTGGGCACT-3′, *DSPP* forward: 5′-ATATTGAGGGCTGGAATGGGGA-3′, *DSPP* reverse: 5′-TTTGTGGCTCCAGCATTGTCA-3′, *OCN* forward: 5′-CTTTGTGTCCAAGCAGGAGG-3′, *OCN* reverse: 5′-CTGAAAGCCGATGTGGTCAG-3′, and *18S* forward: 5′-GGCGTCCCCCAACTTCTTA-3′, reverse: 5′-GGGCATCACAGACCTGTTATT-3′.

In vitro release of calcium ions

The in vitro release of calcium ions from the materials was investigated using a calcium detection kit (Calcium Colorimetric Assay, Sigma-Aldrich, MO, USA). The eluted medium samples were collected at 6 h, 1, 3, 5, and 7 days. The samples were placed in microtubes containing 100 µl of DMEM, and DMEM without materials was used as control [18]. The collected supernatants were stored at − 20 °C until analyzed.

Statistical analysis

Each experiment performed at least three times. The results are presented as mean ± standard error of mean (SEM). Statistical analysis was performed using the Mann Whitney U test for two group comparison. Kruskal Wallis test followed by pairwise comparison was applied to those experiment comparing more than 3 groups. All statistical analyses and graphical illustration was performed using Prism 8 (GraphPad Software, CA, USA). Significance was considered at $p < 0.05$. All raw data was provided in the Additional file 1.

Results

Isolated cell characterization

Cells isolated from human dental pulp tissues (hDPs) exhibited a spindle shape and fibroblast-like morphology (Fig. 1a). These cells did not express CD45, a hematopoietic stem cell marker, but did express the mesenchymal stem cell markers CD44, CD90, and CD105 (Fig. 1b, c). To determine their differentiation ability, the cells were maintained in osteogenic medium for 14 days. Cells in normal growth medium were used as control. The results demonstrated that these cells deposited mineral crystals in vitro after induction, confirming their osteogenic differentiation potency (Fig. 1d).

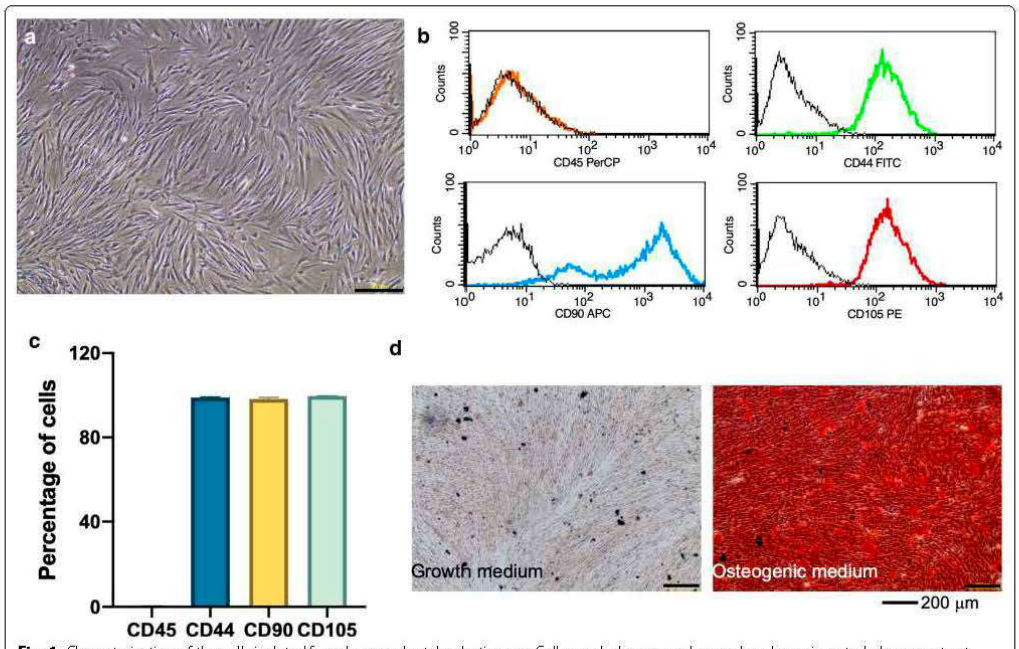


Fig. 1 Characterization of the cells isolated from human dental pulp tissue. **a** Cell morphology was observed under an inverted phase contrast microscope. **b** Surface marker expression was investigated by flow cytometry analysis. **c** The percentage of cells expressing surface markers. **d** Alizarin red s staining was performed to identify mineral deposition after maintaining the cells in odontogenic medium for 14 days. Scale bars indicate 200 µm

Cytotoxicity and proliferation assay

Cells were exposed to a range of concentrations of the extraction medium from DyCal®, ProRoot® MTA, Biodentine™, and TheraCal™ LC for 24 h. Cell morphology was observed under an inverted phase contrast microscope (Fig. 2a) and cell viability was determined using an MTT assay (Fig. 2b). Cells maintained in normal growth medium were used as controls. The hDPs were round and partial cell detachment was observed after exposure to the DyCal® extraction medium. A significant decrease in cell viability was observed in the cells treated with all DyCal® extraction medium concentrations. Similarly, cells exposed to the TheraCal™ LC extraction medium were round in the 100% concentration and some

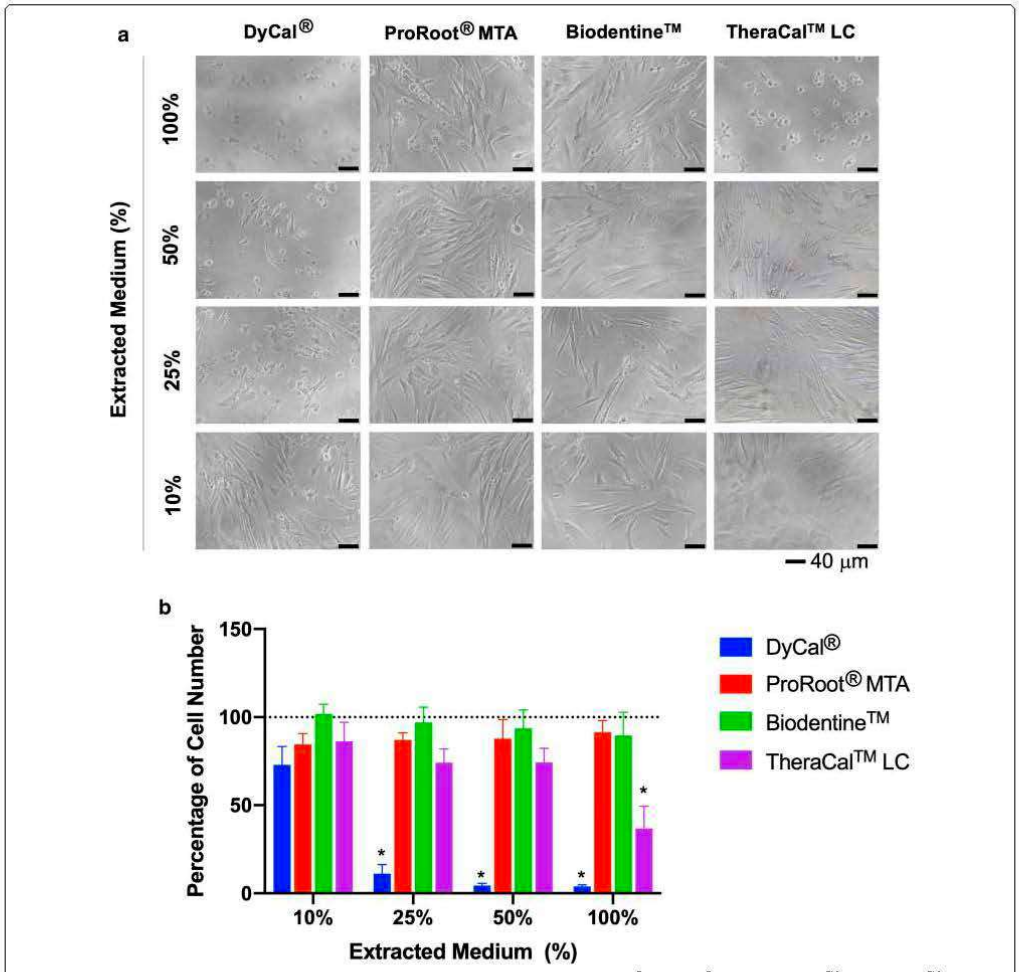


Fig. 2 In vitro cytotoxicity of hDPs after exposure to extracted medium prepared from DyCal®, ProRoot® MTA, Biodentine™ and TheraCal™ LC for 1 day. Cell cultured in normal growth medium was employed as the control. **a** Cell morphology was observed under an inverted phase contrast microscope 1 day after exposure. The hDPs were round and partial cell detachment was observed after exposure to the DyCal® or TheraCal™ LC extraction medium. While fibroblast-like morphology shape was noted on those cells culture with ProRoot® MTA or Biodentine™ extraction medium. **b** Cell viability was examined using MTT assay. The percentage of cell number. Dashed line indicates the reference value of the control condition. Asterisk designates significant differences compared with the control (Kruskal Wallis test followed by pairwise comparison, $p < 0.05$)

detachment was noted at all concentrations. This observation corresponded with reduced cell viability. However, there was no significant difference in cell viability in the 10% TheraCal™ LC condition compared control. ProRoot® MTA extraction medium at 10% and 25% caused the decrease of cell viability compared with the control. However, the cell viability was higher than 85% in those cells treated with 10% and 25% ProRoot® MTA extraction medium. Biodentine™ extraction medium treatment resulted in a similar cytotoxicity to that of the controls.

In the proliferation assay, the hDPs were maintained in a range of concentration of extraction medium and cell viability was assessed at day 1, 4, and 7. Cells cultured in normal growth medium were employed as control (Fig. 3a). A significant increase in cell number percentage was observed at day 3 and 7 compared with day 1 in the control condition. At high percentages of DyCal® and TheraCal™ LC extraction medium treatment, there was no marked increase in cell number percentage at later time points compared with day 1 (Fig. 3b, e). However, a significant increase in cell number percentage was observed at day 7 in the cells exposed to 10% DyCal® and TheraCal™ LC extraction medium. When treated with ProRoot® MTA or Biodentine™ extraction medium, the cells proliferated as determined by a significant increase in cell number percentage at later time points (Fig. 3c, d). These observations corresponded with the doubling time results (Fig. 3f). Treatment with 10% extraction medium from all four materials resulted in a comparable doubling time to that of the control. However, when treated with 100% extraction medium, the cells in the DyCal® and TheraCal™ LC medium exhibited an increased doubling time compared with those in the ProRoot® MTA or Biodentine™ medium and the control.

Cell morphology observation

Cells were directly seeded on DyCal®, ProRoot® MTA, Biodentine™, and TheraCal™ LC and maintained in normal culture medium. Glass cover slips were employed in the control condition. At 3, 6, 24, and 48 h, cell morphology was observed using SEM (Fig. 4). The cells attached and filopodia and lamellopodia were observed in the control condition at 3 h. Marked cell spreading was observed at 6 h and a completely flattened cell morphology was noted at 24 and 48 h. In the DyCal® group, cell attachment was seen at 3 h. However, membrane blebbing and rupture were observed. The cells were not completely spread at 48 h. Cells seeded on ProRoot® MTA or Biodentine™ demonstrated similar responses. The cells attached and spread on those materials. Complete cell spreading was noted at 24 and 48 h, comparable to

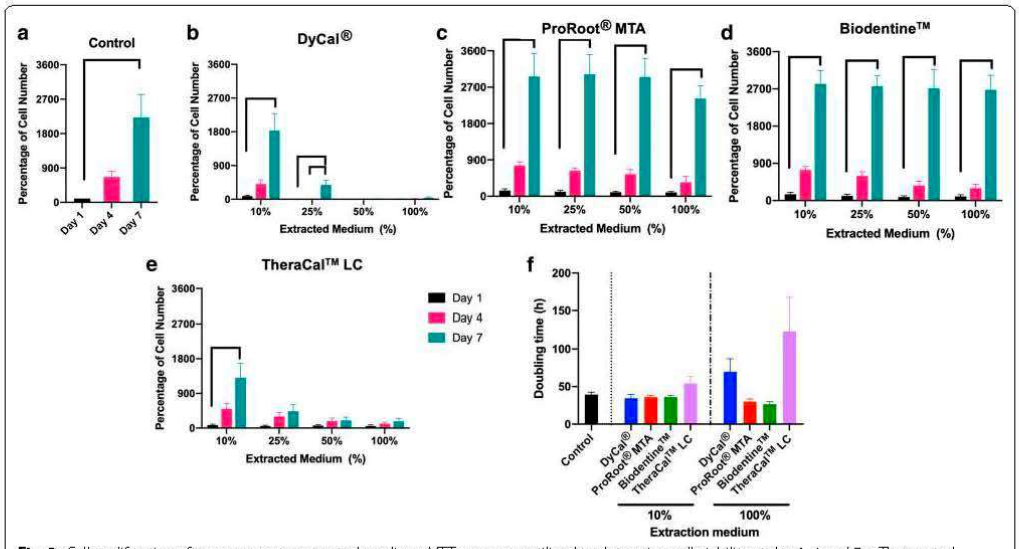


Fig. 3 Cell proliferation after exposure to extracted medium. MTT assay was utilized to determine cell viability at day 1, 4 and 7. **a** The control condition was cells maintained in normal growth medium. The percentage of cell number at different time points after the hDPs were exposed to extraction medium from **b** DyCal®, **c** ProRoot® MTA, **d** Biodentine™, and **e** TheraCal™ LC. **f** Doubling time was calculated using formula previously described. Bars indicate a significant difference (Kruskal Wallis test followed by pairwise comparison, $p < 0.05$)

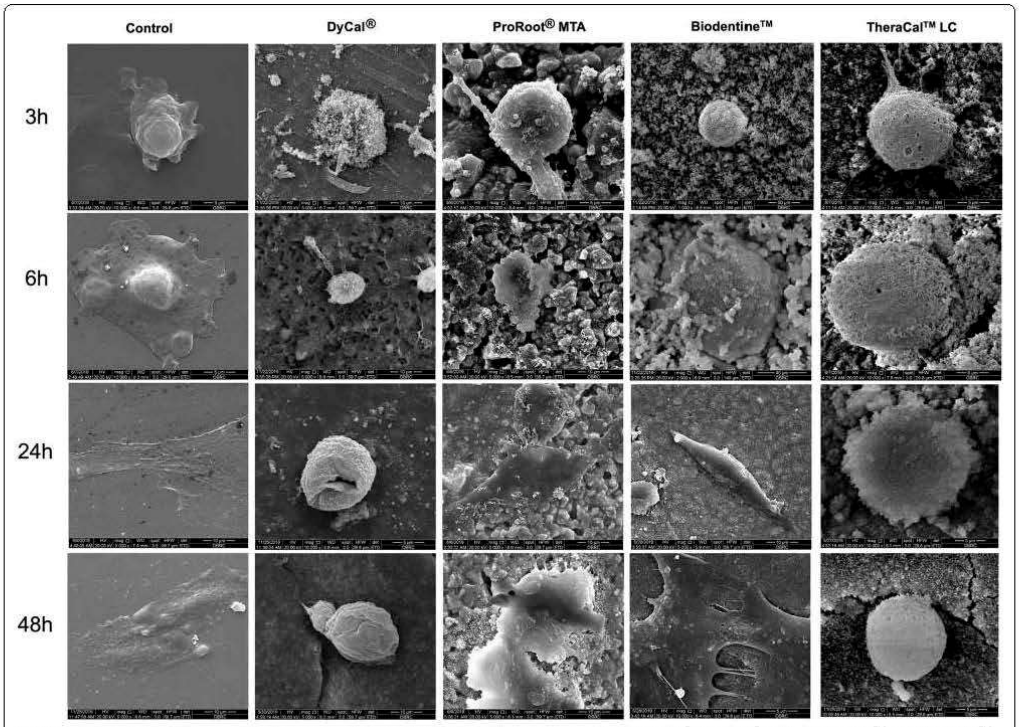


Fig. 4 Representative SEM micrographs illustrate the morphology of hDPs directly seeded on DyCal®, ProRoot® MTA, Biodentine™, and TheraCal™ LC at 3, 6, 24, and 48 h. Membrane blebbing and rupture were observed in DyCal® group. Cells seeded on ProRoot® MTA or Biodentine™ were able to attach and to spread on those materials. Cells on TheraCal™ LC exhibited membrane porosity

the control condition. Lastly, the cells on TheraCal™ LC exhibited membrane porosity. However, some filopodia were observed. The cells were not completely spread on the material at 48 h.

Cell migration assay

An in vitro scratch assay was performed to evaluate cell migration. The hDPs were exposed to 25% serum-free extraction medium. Cells maintained in serum-free medium were employed as the control. At 24 h after creating the wound, cell migration was present in the control condition and in the ProRoot® MTA or Biodentine™ extraction medium treated cells (Fig. 5a, b). However, cell migration was compromised in those cells exposed to DyCal® or TheraCal™ LC medium.

Odonto/osteogenic differentiation assay

Due to the in vitro toxicity of DyCal® or TheraCal™, these materials were not employed in the differentiation study. Hence, only ProRoot® MTA and Biodentine™ were investigated in this experiment. Extraction medium was prepared in both normal growth medium (GM) and osteogenic medium (OM). The cells were exposed to 25% extraction medium. ALP activity was determined at day 10 (Fig. 6a). There was no marked difference in ALP staining between these conditions. However, increased Von Kossa and alizarin red s staining at day 14 was observed in the cells cultured with ProRoot® MTA and Biodentine™ extraction medium (Fig. 6a). The alizarin red s staining was solubilized and the quantitative analysis was performed by measuring the optical density of dissoluted solution. The quantitative values were plotted in Fig. 6b.

The mRNA expression of odonto/osteogenic markers was evaluated at day 4 and 10 after induction. The expression pattern of the cells treated with Biodentine™ extraction medium was similar to the control. *RUNX2* expression levels were increased at day 4 in osteogenic

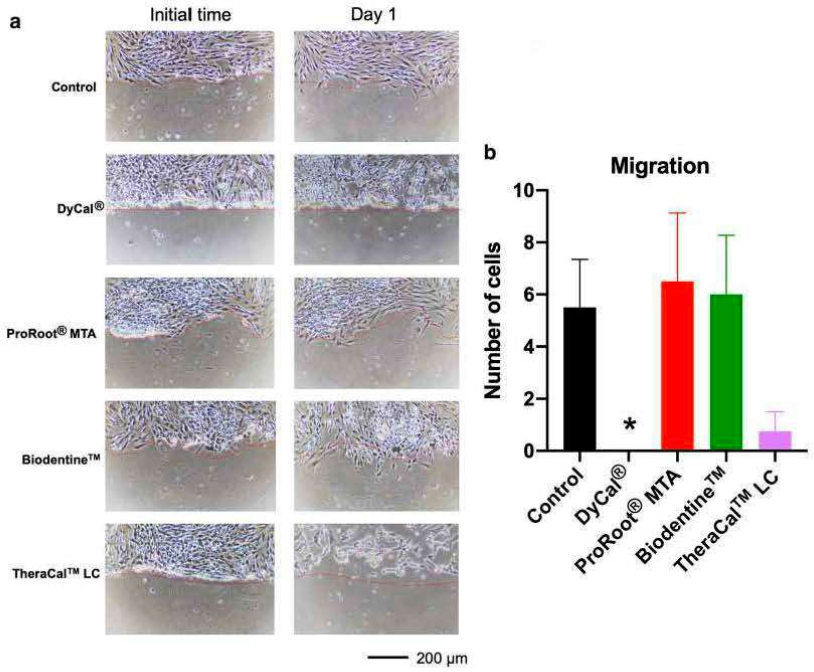


Fig. 5 Cell migration was evaluated using a scratch assay. Cells were maintained in 25% extraction medium from the different materials. The control condition was cells maintained in normal growth medium. **a** Representative images of the scratch areas. The red dot line represented the initial border of the edge of scratched wound. At day 1, cell migration beyond the reference line was observed in the control, ProRoot® MTA, and Biodentine™. **b** Graph illustrated the number of cells migrating from the edge at day 1. Asterisk designates significant differences compared with the control (Mann Whitney U test, $p < 0.05$)

medium compared with the control and subsequently decreased at day 10 (Fig. 6c). The upregulation of *DMP1*, *DSPP*, and *OCN* expression was observed at day 4 and day 10 in the control and Biodentine™ condition. However, the cells in the control condition exhibited a significant increase in *DMP1* and *DSPP* expression at day 10, while those in Biodentine™ extraction medium demonstrated a significant increase in *DMP1*, *DSPP*, and *OCN* mRNA expression at all time points. The ProRoot® MTA treatment resulted in a significant upregulation in *RUNX2* expression at day 10. Interestingly, the *OCN* mRNA expression was not significantly different in osteogenic medium compared with the growth medium control at day 4, however, a marked decrease was noted at day 10.

Calcium release assay

All materials contained calcium as a component (data not shown) and released calcium ions (Fig. 7). At 6 h, the calcium ions released from Biodentine™ was the highest. In all materials, the amount of released calcium at 5 and 7 days was similar for each material when distinctly evaluated. Moreover, the released calcium ions increased in a time-dependent manner in the DyCal®, ProRoot® MTA, and TheraCal™ LC groups. However, the level of calcium ions released from Biodentine™ was comparable between all time-points. At day 7, ProRoot® MTA released the highest amount of calcium ions compared with other materials.

Discussion

In the past decade, many commercial products have become available as direct pulp capping materials. Apart from clinical success reports, the biological mechanism by which these materials stimulate tertiary dentin formation remains unclear. Many quantitative and qualitative assessments of in vitro and in vivo toxicity show the effectiveness of pulp capping materials. The investigations were usually carried out to gain increased understanding of the biological mechanisms of tertiary dentin

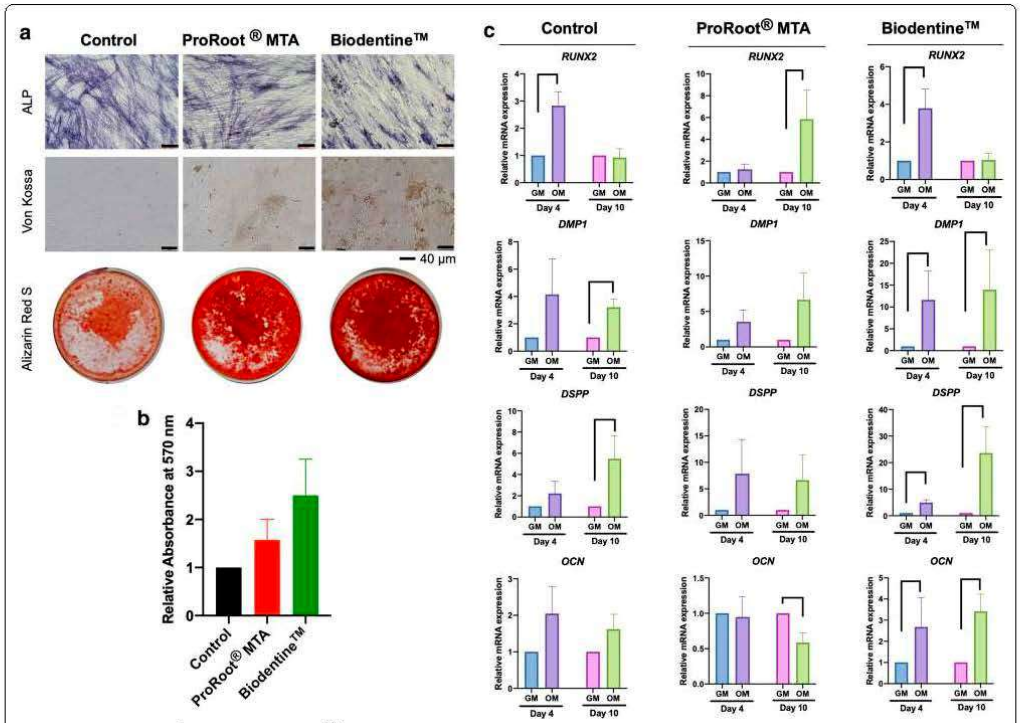


Fig. 6 Effect of ProRoot® MTA and Biodentine™ on odonto/osteogenic differentiation was evaluated. **a** ALP activity at day 10 after osteogenic induction and mineralization was examined using Von Kossa staining and alizarin red s staining at day 14. Scale bars indicate 40 μm. **b** The relative absorbance of the eluted alizarin red s dye. **c** The mRNA expression of odonto/osteogenic differentiation markers (*RUNX2*, *DMP1*, *DSPP*, and *OCN*) was examined using real-time polymerase chain reaction at day 4 and 10. Bars indicate a significant difference (Mann Whitney U test, $p < 0.05$)

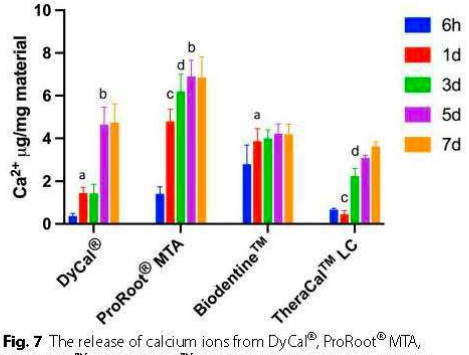


Fig. 7 The release of calcium ions from DyCal®, ProRoot® MTA, Biodentine™, and TheraCal™ LC was quantified at 6 h, 1, 3, 5, and 7 days. Letters indicated the statistically significant difference (Kruskal Wallis test followed by pairwise comparison, $p < 0.05$)

formation. However, the limitations of those reports were the types of tested cells, exposure duration and formulation of the materials. Studies directly comparing the different materials are limited. The present study employed DyCal®, ProRoot® MTA, Biodentine™, and TheraCal™ LC as representatives of the current clinically used materials.

The present study demonstrated that DyCal® and TheraCal™ LC were cytotoxic in vitro while ProRoot® MTA and Biodentine™ demonstrated the better biocompatibility to hDPs. These findings are comparable to previous studies in stem cells isolated from human exfoliated deciduous teeth (SHEDs), periodontal ligament cells (PDLs), and a mouse dental pulp cell line (MDPC-23) [14, 19–25]. However, the present study illustrated that treatment with 10% extracted medium from each material resulted in the 70% or above of cytotoxicity levels compared with the control. In addition, the cells

proliferated in the 10% concentrations. These outcomes were comparable to previous reports demonstrating that ProRoot® MTA, Biodentine™, and TheraCal™ LC were not cytotoxic or genotoxic to human dental pulp cells at concentrations of 0–1000 μg/ml [22]. Recently, report demonstrated that nonresident bone marrow derived cells participate in reparative dentin formation after treating with ProRoot® MTA and Biodentine™ [26]. In this regard, the nonresident bone marrow derived cells were found in associate with reparative dentin and these cells expressed dentin sialoprotein, implicating the involvement of nonresident bone marrow derived cells in tertiary dentin formation [26].

The cell death that occurred from the DyCal® treatment may be due to increased pH. This increase was observed from the color change of the pH indicator in the culture medium. Correspondingly, DyCal® produced pH 10.15 at 3 h and pH increased to 10.88 at 24 h after setting [27]. The high release of hydroxyl ions leads to cell death because disrupted membrane morphology was observed on the SEM micrographs [23, 25]. The cytotoxicity of TheraCal™ LC may be due to remaining unpolymerized resin monomers. However, when using the appropriate curing technique, there should be no unpolymerized monomers. Further, the cured TheraCal™ LC exhibited very low pore volume percentage per total volume ($0.19 \pm 0.09\%$) [28]. Hence, the effect of unpolymerized resin monomers on cell death activation is unlikely. However, previous studies demonstrated that cured TheraCal™ LC released specific additives, camphoroquinone and ethyl-4-(dimethylamino)benzoate [28]. Human dental pulp fibroblasts treated with camphoroquinone demonstrated increased reactive oxygen species production [29, 30]. Taken together, the light curing additives released from TheraCal™ LC might induce cell death by increasing the production of reactive oxygen species; while the high pH produced by DyCal® provides a high concentration of hydroxyl ions and subsequently causes cell death.

The present study demonstrated that ProRoot® MTA and Biodentine™ at 100% extraction medium was not toxic to hDPs. Sequeira et al. reported that ProRoot® MTA did not affect apical papilla cell viability at all extraction medium concentrations, while 100% Biodentine™ extraction medium induced cell death [31]. Unlike DyCal®, ProRoot® MTA does not increase the production of reactive oxygen species, nitric oxide, or prostaglandin E2 in immortalized human dental pulp cells [32]. TheraCal™ LC but not Biodentine™ induced IL-8 release from dental pulp cells [33]. TheraCal™ LC also induced cell apoptosis higher than MTA and Biodentine™ [34]. Another hypothesis is that TheraCal™ LC decreased cellular metabolic activity [35]. These mechanisms could partly explain the different cytotoxic effect among the tested materials.

The present study demonstrated that ProRoot® MTA slightly reduced cell viability at 10% and 25% extraction medium while hDPs exposed to higher concentration of ProRoot® MTA extraction medium did not exhibit the marked difference of cell viability compared with the control. Another study demonstrated that ProRoot® MTA was cytotoxic to human dental pulp fibroblasts at all extraction medium concentration at 24, 48, and 72 h [36]. These disparate results might be due to different cell types and extraction methods. The present study used the ISO 10993 protocol. Thus, standardized methods for extraction medium preparation were employed. Therefore, the in vitro evaluation of the cell responses to these materials could be compared between studies.

It has been reported that pulp capping materials solubilize dentin, leading to the release of various growth factors that promote several biological events [37], particularly cell migration, that enhance pulp healing. In the present study, serum-free culture medium was used for extracting the materials in the in vitro scratch wound assay. Thus, the influence of serum proteins and released factors from dentin were excluded. We found that ProRoot® MTA and Biodentine™ extraction medium promoted cell migration at 24 h, similar to the controls. Similarly, a study evaluating cell migration in serum-free medium using a transwell migration assay demonstrated that ProRoot® MTA and Biodentine™ promoted the migration of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and hDPs, respectively [38, 39]. The ProRoot® MTA and Biodentine™ extraction medium in DMEM supplemented with 20% fetal bovine serum promoted a similar rate of cell migration at 24 h compared with the control [31]. However, at 48 h, complete scratch wound healing in vitro was observed in the control, but not in the ProRoot® MTA and Biodentine™ treated groups [31]. The marked decrease in cell migration in the DyCal® or TheraCal™ LC treated groups could be due to the effect of these materials on cell viability. Our cell migration results correspond with our cell attachment and spreading results. In general, cells have to attach and spread on a surface and subsequently migrate. Cell attachment and spreading were compromised in the DyCal® or TheraCal™ LC treated groups as observed by SEM. Hence, their migration would also be affected.

Despite these negative in vitro effects, the successful application of DyCal® and TheraCal™ LC in direct pulp capping treatment has been reported. The clinical success rate at a 6 month follow-up of DyCal® and TheraCal™ LC was approximately 73% and 66%, respectively, which were not significantly different [40]. Increased

dentin bridge formation was observed in direct pulp capping with TheraCal™ LC compared with DyCal®, however, the difference was not significant [41, 42]. Due to the complex cell responses, an in vivo study is required to confirm the effect of these pulp capping materials on tertiary dentin formation. However, an in vitro investigation could allow for in-depth evaluation of the mechanism(s) of the cell responses to these materials.

A systematic review and meta-analysis indicated that MTA and calcium silicate materials exhibited a similar clinical success rate, dentin bridge formation, and inflammatory response [10]. The present study demonstrated that ProRoot® MTA and Biodentine™ treatment slightly enhanced in vitro mineralization and osteogenic marker gene expression compared with normal osteogenic medium. In parallel with previous reports, ProRoot® MTA enhanced mineral deposition compared with control in immortalized human dental pulp cells, and human mandibular derived MSCs and stem cells isolated from apical papilla (SCAPs) [32, 43, 44]. Biodentine™ treatment also resulted in increased mineralization by SCAPs and human mandibular derived MSCs [43, 44]. The different cell types and more importantly, extraction medium preparation methods could influence different cell responses. Hence, standardized methods should be used for extraction medium preparation to allow for direct comparison between studies.

It is hypothesized that the tricalcium and dicalcium silicate in ProRoot® MTA and Biodentine™ are key factors in generating cell responses [45]. Calcium ions are considered as a bioactive ingredient in pulp capping materials. In mouse bone marrow mesenchymal stem cells, elevated extracellular calcium ions promoted cell proliferation and *Fgf2*, *Tgfb1*, and *Opn* mRNA expression [46]. The elevated Opn level influenced cell migration, but not cell proliferation or mineralization [46]. In hDPs, increased extracellular calcium ions resulted in cell apoptosis and increased mineralization [47, 48]. It was hypothesized that the increase in cell apoptosis at early calcium ion treatment time points in hDPs may be associated with the early onset of mineral deposition by these cells [47]. It has been reported in vascular smooth muscle cells that apoptotic bodies may involve in calcium ions concentration and subsequently promoted the onset of calcification [49]. In other words, apoptotic bodies function as nucleator for calcium and phosphate precipitation [50]. However, calcium ions did not markedly influence hDP cell proliferation in vitro [47, 48]. Similar to mesenchymal stem cells, calcium ions promoted *OPN* mRNA expression in hDPs at early time points [47]. However, the long-term supplementation of calcium ions in osteogenic medium (14–21 days) resulted in significantly decreased *OPN* mRNA levels, despite increased mineral deposition [48]. The link between *OPN* expression in calcium ions-treated hDPs and other biological functions, such as those in mesenchymal stem cells, has not yet been established. Further, reduced *RUNX2* and *COL1A2* mRNA levels, but increased *OCN* expression, was observed in the elevated extracellular calcium ion condition compared with the control [48]. The present study illustrated that *RUNX2* and *OCN* mRNA levels were increased in the Biodentine™ treated groups, while only *RUNX2* expression was increased in the ProRoot® MTA treated group. These observations suggest that calcium ions are not solely responsible in the biological effects of these materials. Thus, the bioactive components of these pulp capping materials should be further evaluated to better understand the basic mechanism(s) of dental pulp responses.

Conclusions

The present study described the biological responses of hDPs to various direct pulp capping materials in vitro. DyCal® and TheraCal™ LC were found to be toxic to the cells. Cell attachment, spreading, proliferation, and migration were compromised when the cells were exposed to DyCal® or TheraCal™ LC. In contrast, ProRoot® MTA and Biodentine™ exhibited biocompatibility and supported cell activities toward regeneration potency. We show here that, despite their clinical success, the in vitro biological effects and molecular mechanisms should be further investigated to clarify the contribution of these bioactive materials to reparative dentin formation and dental pulp vitality protection. Further study is needed.

Abbreviations

ALP: Alkaline phosphatase staining; hDPs: Human dental pulp stem cells; MTA: Mineral trioxide aggregate; SEM: Scanning electron microscope; SHEDs: Human exfoliated deciduous teeth; PDLs: Periodontal ligament cells.

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at https://doi.org/10.1186/s12903-021-01544-w.

Additional file 1: Raw data used in the article.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Kevin Tompkins for language editing.

Authors' contributions

CM contributed to experimental design, data acquisition, statistical analysis, data interpretation, and manuscript drafting. CJ contributed to material characterization. SC contributed to scanning electron microscope analysis. NS and RM contributed to flow cytometry analysis and interpretation. PP and TP contributed to data interpretation. TO contributed to study conceptualization,

experimental design, data acquisition, and data interpretation. All authors critically revised the manuscript and gave final approval for publication. All authors read and approved the final manuscript.

Funding
This study was supported by the Center of Excellence for Regenerative Dentistry, Chulalongkorn Academic Advancement Into Its 2nd Century Project. T.O. is supported by the Thailand Research Fund (RSA6180019) T.P. is supported by the Thailand Research Fund (RSA6280001), Medical Genomics Cluster, National Research Council of Thailand, and Global partnership CU-C16F630029.

Availability of data and materials
The datasets generated during and analyzed during the current study are available in supplementary file. Other images are available from the corresponding author on reasonable request.

Declarations

Ethics approval and consent to participate
The hDP isolation protocol was approved by the Human Research Ethics Committee, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University (No. 020/2018). Teeth extracted according to the dental treatment plan were collected from healthy donors. All methods were carried out in accordance with relevant guidelines and regulations. Informed consent was obtained from subjects.

Consent for publication
Not applicable.

Competing interests
All authors declare no competing interests.

Author details
[1]Dental Stem Cell Biology Research Unit, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand. [2]Biomedical Engineering Institute, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand. [3]Faculty of Medicine and Public Health, HRH Princess Chulabhorn College of Medical Science, Chulabhorn Royal Academy, Bangkok 10210, Thailand. [4]Oral Biology Research Center, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand. [5]Immunology Research Center, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand. [6]Department of Periodontology, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand. [7]Department of Anatomy, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand. [8]Genomics and Precision Dentistry Research Unit, Department of Physiology, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

Received: 16 December 2020 Accepted: 1 April 2021
Published online: 26 April 2021

References

1. Wells C, Dulong C, McCormack S. Vital pulp therapy for endodontic treatment of mature teeth: a review of clinical effectiveness, cost-effectiveness, and guidelines. Ottawa (ON): Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health 2019 Jul. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK546327/.
2. Goldberg M. Pulp healing and regeneration: more questions than answers. Adv Dent Res. 2011;23(3):270–4. https://doi.org/10.1177/1172F0022034511405385.
3. Téclès O, Laurent P, Zygouritsas S, Burger A-S, Camps J, Dejou J. About I: activation of human dental pulp progenitor/stem cells in response to odontoblast injury. Arch Oral Biol. 2005;50(2):103–8. https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2004.1011.1009.
4. Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. J Bone Miner Res. 2003;18(4):696–704. https://doi.org/10.1359/jbmr.2003.1318.1354.1696.
5. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. Proc Natl Acad Sci USA. 2000;97(25):13625–30. https://doi.org/10.11073/pnas.240309797.
6. Osathanon T, Nowwarote N, Pavasant P. Basic fibroblast growth factor inhibits mineralization but induces neuronal differentiation by human dental pulp stem cells through a FGFR and PLCγ signaling pathway. J Cell Biochem. 2011;112(7):1807–16. https://doi.org/10.1002/jcb.23097.
7. Osathanon T, Sawangmake C, Nowwarote N, Pavasant P. Neurogenic differentiation of human dental pulp stem cells using different induction protocols. Oral Dis. 2014;20(4):352–8. https://doi.org/10.1111/odi.12119.
8. Sawangmake C, Nowwarote N, Pavasant P, Chansiripornchai P, Osathanon T. A feasibility study of an *in vitro* differentiation potential toward insulin-producing cells by dental tissue-derived mesenchymal stem cells. Biochem Biophys Res Commun. 2014;452(3):581–7. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.1008.1121.
9. Yen AH-H, Sharpe PT. Stem cells and tooth tissue engineering. Cell Tissue Res. 2008;331(1):359–72. https://doi.org/10.1007/s00441-00007-00467-00446.
10. Paula AB, Laranjo M, Marto C-M, Paulo S, Abrantes AM, Casalta-Lopes J, Marques-Ferreira M, Botelho MF, Carrilho E. Direct pulp capping: What is the most effective therapy?—Systematic review and meta-analysis. J Evid Based Dent Pract. 2018;18(4):298–314. https://doi.org/10.1016/j.jebdp.2018.1002.1002.
11. Manokawinchoke J, Nattasit P, Thongngam T, Pavasant P, Tompkins KA, Egusa H, Osathanon T. Indirect immobilized Jagged1 suppresses cell cycle progression and induces odonto/osteogenic differentiation in human dental pulp cells. Sci Rep. 2017;7(1):10124.
12. Manokawinchoke J, Ritprajak P, Osathanon T, Pavasant P. Estradiol induces osteoprotegerin expression by human dental pulp cells. Odontology. 2016;104(1):10–8.
13. Manaspon C, Boonprakong L, Porntaveetus T, Osathanon T. Preparation and characterization of Jagged1-bound fibrinogen-based microspheres and their cytotoxicity against human dental pulp cells. J Biomater Appl. 2020;34(8):1105–13.
14. Wang F, Okawa H, Kamano Y, Niibe K, Kayashima H, Osathanon T, Pavasant P, Saeki M, Yatani H, Egusa H. Controlled osteogenic differentiation of mouse mesenchymal stem cells by tetracycline-controlled transcriptional activation of amelogenin. PLoS ONE. 2015;10(12):0145677. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145677.
15. Pedano MS, Li X, Li S, Sun Z, Cokic SM, Putzeys E, Yoshihara K, Yoshida Y, Chen Z, Van Landuyt K. Freshly-mixed and setting calcium-silicate cements stimulate human dental pulp cells. Dent Mater. 2018;34(5):797–808. https://doi.org/10.1016/j.dental.2018.1002.1005.
16. Osathanon T, Subbalekha K, Sastravaha P, Pavasant P. Notch signalling inhibits the adipogenic differentiation of single-cell-derived mesenchymal stem cell clones isolated from human adipose tissue. Cell Biol Int. 2012;36(12):1161–70. https://doi.org/10.1042/CBI20120288.
17. Charoenpong H, Osathanon T, Pavasant P, Limjeerajarus N, Keawprachum B, Limjeerajarus CN, Cheewinthamrongrod V, Palaga T, Lertchirakarn V, Ritprajak P. Mechanical stress induced S100A7 expression in human dental pulp cells to augment osteoclast differentiation. Oral Dis. 2019;25(3):812–21. https://doi.org/10.1111/odi.13033.
18. Chung CJ, Kim E, Song M, Park J-W, Shin S-J. Effects of two fast-setting calcium-silicate cements on cell viability and angiogenic factor release in human pulp-derived cells. Odontology. 2016;104(2):143–51. https://doi.org/10.1007/s10266-10015-10194-10265.
19. Farhadmollashahi N, Ghotbi F, Karkeabadi H, Havaei R. Cytotoxic effects of mineral trioxide aggregate, calcium enrichedmixture cement, Biodentine and octacalcium pohosphate onhuman gingival fibroblasts. J Dent Res Dent Clin Dent Prospects. 2016;10(2):75–80. https://doi.org/10.15171/joddd.12016.15012.
20. Collado-González M, García-Bernal D, Oñate-Sánchez R, Ortolani-Seltenerich P, Álvarez-Muro T, Lozano A, Forner L, Llena C, Moraleda J, Rodríguez-Lozano F. Cytotoxicity and bioactivity of various pulpotomy materials on stem cells from human exfoliated primary teeth. Int Endod J. 2017;50:e19–30. https://doi.org/10.1111/iej.12751.
21. Escobar-García DM, Aguirre-López E, Méndez-González V, Pozos-Guillén A. Cytotoxicity and initial biocompatibility of endodontic biomaterials (MTA and Biodentine™) used as root-end filling materials. Biomed Res Int. 2016;206:7926961. https://doi.org/10.1155/2016/7926961.
22. Zakerzadeh A, Esnaashari E, Dadfar S. *In vitro* comparison of cytotoxicity and genotoxicity of three vital pulp capping materials. Iran Endod

J. 2017;12(4):491. https://doi.org/10.22037/22032Fiej.v22012i22034.15104.
23. Poggio C, Ceci M, Dagna A, Beltrami R, Colombo M, Chiesa M. *In vitro* cytotoxicity evaluation of different pulp capping materials: a comparative study. Arh Hig Rada Toksikol. 2015;66(3):181–8. https://doi.org/10.1515/aiht-2015-1566-2589.
24. Loison-Robert LS, Tassin M, Bonte E, Berbar T, Isaac J, Berdal A, Simon S, Fournier BP. In vitro effects of two silicate-based materials, Biodentine and BioRoot RCS, on dental pulp stem cells in models of reactionary and reparative dentinogenesis. PLoS ONE. 2018;13(1):0190014. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190014.
25. Arandi NZ, Rabi T. TheraCal LC: from biochemical and bioactive properties to clinical applications. Int J Dent. 2018;2018:3484653. https://doi.org/10.1155/2018/3484653.
26. Frozoni M, Marques MR, Hamasaki SK, Mohara NT, de Jesus SA, Zaia AA. Contribution of bone marrow-derived cells to reparative dentinogenesis using bone marrow transplantation model. J Endod. 2020;46(3):404–12.
27. Luczaj-Cepowicz E, Marczuk-Kolada G, Pawinska M, Obidzinska M, Holownia A. Evaluation of cytotoxicity and pH changes generated by various dental pulp capping materials—an *in vitro* study. Folia Histochem Cytobiol. 2017;55(2):86–93. https://doi.org/10.5603/FHC.a2017.0008.
28. Nilsen BW, Jensen E, Örtengren U, Michelsen VB. Analysis of organic components in resin-modified pulp capping materials: critical considerations. Eur J Oral Sci. 2017;125(3):183–94. https://doi.org/10.1111/eos.12347.
29. Engelmann J, Volk J, Leyhausen G, Geurtsen W. ROS formation and glutathione levels in human oral fibroblasts exposed to TEGDMA and camphorquinone. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2005;75(2):272–6. https://doi.org/10.1002/jbm.b.30360.
30. Atsumi T, Ishihara M, Kadoma Y, Tonosaki K, Fujisawa S. Comparative radical production and cytotoxicity induced by camphorquinone and 9-fluorenone against human pulp fibroblasts. J Oral Rehabil. 2004;31(12):1155–64. https://doi.org/10.1111/j.1365-2842.2004.01357.x.
31. Sequeira DB, Seabra CM, Palma PJ, Cardoso AL, Peça J, Santos JM. Effects of a new bioceramic material on human apical papilla cells. J Funct Biomater. 2018;9(4):74. https://doi.org/10.3390/jfb9040074.
32. Chang S-W, Lee S-Y, Kum K-Y, Kim E-C. Effects of ProRoot MTA, bioaggregate, and micromega MTA on odontoblastic differentiation in human dental pulp cells. J Endod. 2014;40(1):113–8. https://doi.org/10.1016/j.joen.2013.1009.1036.
33. Jeanneau C, Laurent P, Rombouts C, Giraud T, About I. Light-cured tricalcium silicate toxicity to the dental pulp. J Endod. 2017;43(12):2074–80.
34. Collado-Gonzalez M, Garcia-Bernal D, Onate-Sanchez RE, Ortolani-Seltenerich PS, Alvarez-Muro T, Lozano A, Forner L, Llena C, Moraleda JM, Rodriguez-Lozano FJ. Cytotoxicity and bioactivity of various pulpotomy materials on stem cells from human exfoliated primary teeth. Int Endod J. 2017;50(Suppl 2):e19–30.
35. Hebling J, Lessa FC, Nogueira I, Carvalho RM, Costa CA. Cytotoxicity of resin-based light-cured liners. Am J Dent. 2009;22(3):137–42.
36. Zhu L, Yang J, Zhang J, Peng B. A comparative study of BioAggregate and ProRoot MTA on adhesion, migration, and attachment of human dental pulp cells. J Endod. 2014;40(8):1118–23. https://doi.org/10.1016/j.joen.2013.1112.1028.
37. Tomson P, Lumley P, Smith A, Cooper P. Growth factor release from dentine matrix by pulp-capping agents promotes pulp tissue repair-associated events. Int Endod J. 2017;50(3):281–92. https://doi.org/10.1111/iej.12624.
38. Sun Y, Liu J, Luo T, Shen Y, Zou L. Effects of two fast-setting pulp-capping materials on cell viability and osteogenic differentiation in human dental pulp stem cells: an in vitro study. Arch Oral Biol. 2019;100:100–5. https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.1002.1014.
39. D'Antò V, Di Caprio MP, Ametrano G, Simeone M, Rengo S, Spagnuolo G. Effect of mineral trioxide aggregate on mesenchymal stem cells. J Endod. 2010;36(11):1839–43. https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.1808.1010.
40. Cengiz E, Yilmaz HG. Efficacy of erbium, chromium-doped: yttrium, scandium, gallium, and garnet laser irradiation combined with resin-based tricalcium silicate and calcium hydroxide on direct pulp capping: a randomized clinical trial. J Endod. 2016;42(3):351–5. https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.1011.1015.
41. Parolia A, Kundabala M, Rao N, Acharya S, Agrawal P, Mohan M, Thomas M. A comparative histological analysis of human pulp following direct pulp capping with Propolis, mineral trioxide aggregate and Dycal. Aust Dent J. 2010;55(1):59–64. https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2009.01179.x.
42. Cannon M, Gerodias N, Vieira A, Percinoto C, Jurado R. Primate pulpal healing after exposure and TheraCal application. Int J Clin Pediatr Dent. 2014;38(4):333–7. https://doi.org/10.17796/jcpd.17738.17794.m585322121536q585322121571.
43. Margunato S, Taşlı PN, Aydın S, Kazandağ MK, Şahin F. *In vitro* evaluation of ProRoot MTA, Biodentine, and MM-MTA on human alveolar bone marrow stem cells in terms of biocompatibility and mineralization. J Endod. 2015;41(10):1646–52. https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.1605.1012.
44. Saberi E, Farhad-Mollashahi N, Aval FS, Saberi M. Proliferation, odontogenic/osteogenic differentiation, and cytokine production by human stem cells of the apical papilla induced by biomaterials: a comparative study. Clin Cosmet Investig Dent. 2019;11:181–93. https://doi.org/10.2147/2142FCCIDES211893.
45. Camilleri J. The chemical composition of mineral trioxide aggregate. J Conserv Dent. 2008;11(4):141–3. https://doi.org/10.4103/4102F0972-0707.48834.
46. Lee MN, Hwang H-S, Oh S-H, Roshanzadeh A, Kim J-W, Song JH, Kim E-S, Koh J-T. Elevated extracellular calcium ions promote proliferation and migration of mesenchymal stem cells via increasing osteopontin expression. Exp Mol Med. 2018;50(11):1–16. https://doi.org/10.1038/s12276-12018-10170-12276.
47. An S, Gao Y, Huang Y, Jiang X, Ma K, Ling J. Short-term effects of calcium ions on the apoptosis and onset of mineralization of human dental pulp cells *in vitro* and *in vivo*. Int J Mol Med. 2015;36(1):215–21. https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2218.
48. An S, Gao Y, Ling J, Wei X, Xiao Y. Calcium ions promote osteogenic differentiation and mineralization of human dental pulp cells: implications for pulp capping materials. J Mater Sci Mater Med. 2012;23(3):789–95. https://doi.org/10.1007/s10856-10011-14531-10850.
49. Proudfoot D, Skepper JN, Hegyi L, Farzaneh-Far A, Shanahan CM, Weissberg PL. The role of apoptosis in the initiation of vascular calcification. Z Kardiol. 2001;90(Suppl 3):43–6.
50. Proudfoot D, Skepper JN, Hegyi L, Bennett MR, Shanahan CM, Weissberg PL. Apoptosis regulates human vascular calcification *in vitro*: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies. Circ Res. 2000;87(11):1055–62.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Gene Expression in Human Dental Pulp Cells of Mandibular Second Premolar Teeth

Thira Faruangsaeng[1], Sermporn Thaweesapphitak[2], Kanokporn Boonchoo[2], and Thantrira Porntaveetus[1,2*]

[1]Department of Geriatric and Special patients care, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand
[2]Genomics and Precision Dentistry Research Unit, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand
*Corresponding author, E-mail: thantrira.p@chula.ac.th

Abstract

Genes and signaling of the teeth are conserved during evolution and these similar gene networks regulate the development of other organs. The tooth has been an excellent model to study molecular mechanisms of organs, signaling networks, cellular heterogeneity, and adult tissue renewal. Human dental pulp cells (hDPCs) are pluripotent with a high capacity for differentiation and regeneration of dentin/pulp-like complex and extraoral tissues. To discover molecular characteristics of adult hDPSC, we performed a transcriptome analysis of hDPCs obtained from the premolar teeth to reveal gene expression profile, signaling pathways, and expression of odontogenesis genes. hDPCs of mandibular second premolar from two adult donors were isolated, cultured, and subjected for RNA sequencing. RNA-Seq Alignment, RNA-Seq Differential Expression, and Reactome program were used to analyze gene expression profile and pathways. The RNA sequencing demonstrated that 17,968 genes out of 27,914 in total were expressed in adult premolar teeth. The *FN1, COL1A2, ACTB, COL1A1, EEF1A1* were the top expression genes. The extracellular matrix pathway was the most involving pathway. The important genes for odontogenesis such as *BMP2, BMP4, MSX1, MSX2, TBX2* were still expressed in mature adult human teeth while *FGF3, FGF8, LHX7, ALX3, FOXI3* were not observed. We showed that the mature permanent teeth expressed tooth developmental genes especially those related to the extracellular matrix. Our findings provide new knowledge about RNA profiles and signaling networks in the permanent mandibular second premolar teeth.

Keywords: *Premolar tooth, RNA-Sequencing, RNA profile, Cellular behavior*

1. Introduction

Tooth development is controlled by complex reciprocal interactions between genes and cell signaling. During the initial steps of differentiation, the developing tooth shares similar regulatory pathways with other ectodermal organs. (Thesleff & Sharpe, 1997) Calcified tissues of the tooth comprise enamel, dentine, and cementum. The main component is the dentine which is produced from the odontoblasts. (Lumsden, 1988) Odontoblasts are differentiated from ectomesenchymal cells that possess a cranial neural crest origin. Many studies have demonstrated that odontoblast differentiation involves genes and signaling cues such as bone morphogenetic proteins (BMP), fibroblast growth factors (FGF), and wingless (WNT) signaling molecules as well as transcription factors such as *Runx2* and *Pax9*. (Ramanathan, Srijaya, Sukumaran, Zain, & Kasim, 2018; Sun et al., 2013; Tummers, Thesleff, & Evolution, 2009; T. Wang, Xu, & communications, 2010)

Msx1 (Msh homeobox 1) and its main protein-protein interactor *Pax9* (paired box gene 9) are both transcription factors working together during odontogenesis. (Nakatomi et al., 2010) Msx1 and Pax9 mutation or deletion were associated with some oral phenotypes, including tooth agenesis. (Bonczek, Balcar, & Šerý, 2017) The transforming growth factor alpha (TGFa) regulates the transcription of genes, cell proliferation, differentiation, death, adhesion, migration, and positioning. Genetic variations in these genes can lead to tooth agenesis. (Phan et al., 2016; A. Vieira, Meira, Modesto, & Murray, 2004) Fibroblast growth factor (FGF) plays a significant role in craniofacial development and controls the balance among skeletal cell growth, differentiation, and apoptosis. (Xiong, Li, Cai, & Chen, 2017)

One of the most common congenitally missing teeth is the mandibular second premolar. (Rakhshan, 2015; Rølling & Poulsen, 2009) In the patients with second premolar missing, the primary second molars might be retained in some cases (Bergendal, 2008) while some cases required an intervention such as auto-transplant, (Bokelund, Andreasen, Christensen, & Kjær, 2013; Ok & Yilmaz, 2019), orthodontic treatment with space closure (Fines, Rebellato, & Saiar, 2003), or implants with an implant-supported restoration. (Borzabadi-Farahani, 2012; Eliášová, Marek, & Kamínek, 2014) Regenerative dentistry is a trending concept

Published online: Copyright © 2016-2021 Rangsit University

that uses stem cells to restore tooth structure. For cell-based regeneration of damaged dental tissues using bioengineering strategies, it requires an understanding of molecular mechanisms and biological processes involved in tooth function and vitality (Volponi, Zaugg, Neves, Liu, & Sharpe, 2018)

This study investigated gene expression profiles of mandibular second premolars intending to reveal gene expression patterns of dental pulp cells by RNA-sequencing technique and demonstrate an expression of significant odontogenic genes (Cunha et al., 2020; Ramanathan et al., 2018) these findings could apply to dental tissue engineering and tackle clinical problems such as eruption disturbance and a tooth missing.

2. Objectives

To analyze gene expression profiles of dental pulp cells derived from mature mandibular second premolar teeth.

3. Materials and Methods

3.1 Cell isolation and culture

The research protocol was submitted for approval to the Human Ethics Committee, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University. Inform consents were obtained from participants. Teeth scheduling for extraction according to dental treatment plan were collected for cell isolation. The mandibular second premolar teeth obtained from 2 unrelated participants were employed. The data of teeth (tooth number, cusp, root) were pictured and recorded. Briefly, dental pulp tissues were gently removed and minced. Cell isolation was performed by explant protocol. Cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Gibco, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco), 2 mM L-glutamine (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 100 Units/ml penicillin (Invitrogen), 100 µg/ml streptomycin (Invitrogen), and 250 ng/ml amphotericin B (Invitrogen) at 37°C in a humidified 5% CO_2 atmosphere. The culture medium was changed every 3 days. Cells from passage 4 were used for RNA isolation and analysis.

3.2 RNA preparation and sequencing

RNA isolation was performed using RNeasy kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's protocol with DNaseI treatment. RNA was eluted from the column using nuclease-free water. Further, RNA quality was examined using a Bioanalyzer (Agilent 2100; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Total 14 RNA (1 µg) were used for mRNA library preparation. The RNA samples were sent to Illumina Inc. to synthesize cDNA and performed following their protocols.

3.3 RNA-Seq analysis

RNA-Seq Analysis was carried out using RNA-Seq Alignment and RNA-Seq Differential Expression program (Illumina Inc.). Reactome program was used for pathway analysis.

4. Results and Discussion

4.1 Results

RNA-Seq Alignment program was used to analyzed raw data from 2 mandibular second premolar teeth for 2 rounds and the aligned data from the first round and second round were used simultaneously in differential analysis. RNA-Seq Differential Expression program was used for data analysis after alignment. Homo sapiens (UCSC hg19) was used as a reference genome. From total 27,914 genes, 9,946 genes were not expressed. From the remaining expressed 17,968 genes, top-20 genes with the most expression were shown in Table 1. MA-plot analysis was shown in Figure 1.

Proceedings of RSU International Research Conference (2021)
Published online: Copyright © 2016-2021 Rangsit University

Table 1 list of 20 top-expression genes

Gene	Tooth		
	Sample 1	Sample 2	Mean count
1. *COL1A2*	347285.89	720341.07	533813.5
2. *ACTB*	360057.80	348383.84	354220.8
3. *COL1A1*	356972.07	341019.60	348995.8
4. *EEF1A1*	263796.29	366186.36	314991.3
5. *VIM*	289188.06	270188.50	279688.3
6. *TGFBI*	50263.65	411307.27	230785.5
7. *ACTG1*	211085.99	193315.21	202200.6/
8. *FTH1*	48299.71	350915.16	199607.4
9. *THBS1*	222719.50	163533.09	193126.3
10. *GREM1*	105511.83	267795.60	186653.7
11. *PENK*	26762.53	329865.62	178314.1
12. *GAPDH*	131272.26	216535.09	173903.7
13. *IGFBP5*	94387.68	250384.91	172386.3
14. *COL6A3*	118588.87	210611.13	164600.0
15. *TIMP3*	45765.42	253683.76	149724.6
16. *FLNA*	178216.23	108365.23	143290.7
17. *FSTL1*	80682.70	140907.00	110795.3
18. *COL6A2*	65960.32	129411.05	97685.7
19. *COL5A2*	58002.94	129550.85	93776.9

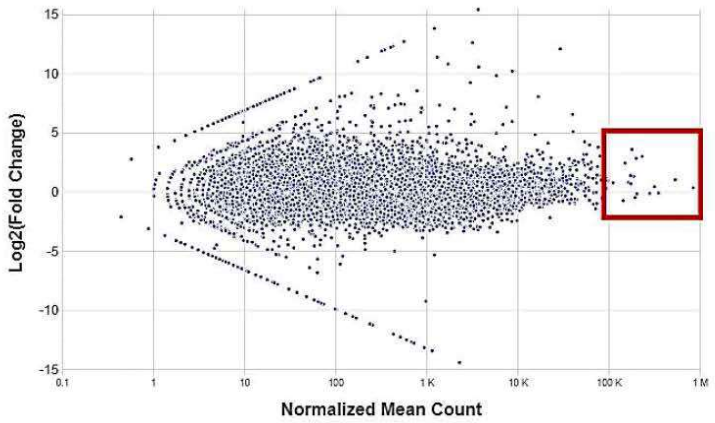


Figure 1 MA-plot provides an overall of the expression genes, with the log2FC on the Y-axis and mean of normalized counts in X-axis (A red block shows top 20-ranked expressed genes)

Proceedings of RSU International Research Conference (2021)
Published online: Copyright © 2016-2021 Rangsit University

From the top 20 genes expression, there were 8 major pathways involved according to the Reactome program analysis: 1) Extracellular matrix organization pathway, 2) Immune system, 3) Signal transduction, 4) Nervous system development, 5) Metabolism of proteins, 6) Hemostasis, 7) cell-cell communication, 8) vesicle-mediated transport (Figure 2, Table 2)

Table 2 Most related pathway from top 20 genes (Sort by p-value)

	Pathway	p-value	FDR*	Gene involvement
1.	Integrin cell surface interactions (E)**	2.67e-10	4.84e-08	*COL1A1, COL1A2, COL5A2, COL6A2, COL6A3, FN1, THBS1*
2.	Syndecan interactions (E)**	2.81e-09	2.53e-07	*COL1A1, COL1A2, COL5A2, FN1, THBS1*
3.	ECM proteoglycan (E)**	8.13e-09	4.88e-07	*COL1A1, COL1A2, COL5A2, COL6A2, COL6A3, FN1*
4.	Collagen chain trimerization(E)**	2.21e-08	9.96e-07	*COL1A1, COL1A2, COL5A2, COL6A2, COL6A3*
5.	Non-integrin membrane-ECM interactions (E)**	1.11e-07	3.99e-06	*COL1A1, COL1A2, COL5A2, FN1, THBS1*
6.	Assembly of collagen fibrils and other multimeric structures (E)**	1.76e-07	5.08e-06	*COL1A1, COL1A2, COL5A2, COL6A2, COL6A3*
7.	Collagen degradation (E)**	2.03e-07	5.08e-06	*COL1A1, COL1A2, COL5A2, COL6A2, COL6A3*
8.	Degradation of extracellular matrix (E)**	3.22e-07	6.53e-06	*COL1A1, COL1A2, COL5A2, COL6A2, COL6A3, FN1*
9.	Collagen biosynthesis and modifying enzymes (E)**	3.26e-07	6.53e-06	*COL1A1, COL1A2, COL5A2, COL6A2, COL6A3*
10.	MET activates PTK2 signaling	4.38e-07	7.89e-06	*COL1A1, COL1A2, COL5A2, FN1*
11.	Collagen formation (E)**	1.51e-06	2.10e-05	*COL1A1, COL1A2, COL5A2, COL6A2, COL6A3*
12.	Signaling by receptor Tyrosine kinases	1.56e-06	2.10e-05	*ACTB, ACTG1, COL1A1, COL1A2, COL5A2, COL6A2, COL6A3, FN1, THBS1*
13.	MET promotes cell motility	1.69e-06	2.10e-05	*COL1A1, COL1A2, COL5A2, FN1*
14.	GP1b-IX-V activation signaling	1.75e-06	2.10e-05	*COL1A1, COL1A2, FLNA*
15.	Extracellular matrix organization (E)**	2.22e-06	2.67e-05	*COL1A1, COL1A2, COL5A2, COL6A2, COL6A3, FN1, THBS1*
16.	Interleukin-4 and interleukin-13 signaling	2.85e-06	3.13e-05	*COL1A2, FN1, VIM*
17.	Cell-extracellular matrix interactions	6.88e-06	6.88e-05	*ACTB, ACTG1, FLNA*
18.	Platelet activation, signaling and aggregation	1.70e-05	1.70e-04	*COL1A1, COL1A2, FLNA, FN1, THBS1, TIMP3*
19.	Signaling by PDGF	2.13e-05	1.92e-04	*COL5A2, COL6A2, COL6A3, THBS1*
20.	Signaling by MET	2.33e-05	2.10e-04	*COL1A1, COL1A2, COL5A2, FN1*

*FDR = False Discovery Rate, **E = Extracellular matrix pathway

Proceedings of RSU International Research Conference (2021)
Published online: Copyright © 2016-2021 Rangsit University

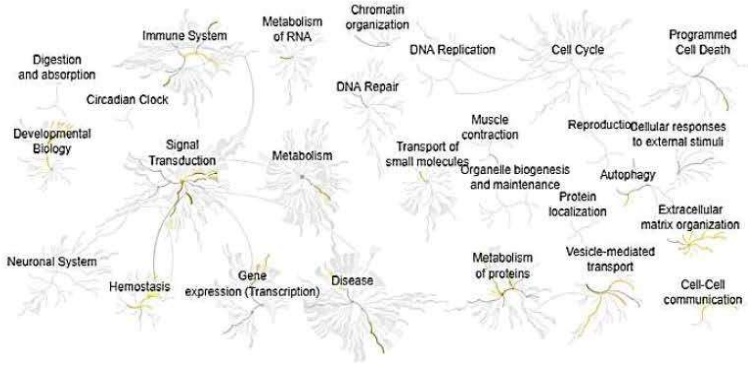


Figure 2 Significant pathways according to the top 20 expressed genes created by Reactome program. The related pathways are highlighted in yellow color.

Significant genes for odontogenesis

From the literature reviews, The genes that play an important role in odontogenesis consisting of *WNT6, WNT10A, WNT10B, PITX1, PITX2, FOXI3, LEF1, BMP2, BMP4, MSX1, MSX2, TBX2, PAX9, RUNX2, RUNX3, LHX6, LHX7, LHX8, BARX1, DLX1, DLX2, DLX3, DLX5, DLX6, ALX3, ALX4, TFGA, FGF3, FGF8, FGF10, FGF13, GLI2* and *GLI3* (Cunha et al., 2020; Ramanathan et al., 2018) were used for analysis. From 33 genes, 28 genes were expressed while 5 genes were not expressed in mature adult premolar teeth (Table 3, Figure 3).

4.2 Discussion

Tooth development is related to genetic and environmental factors. Genetics play a role in determining the shape, size, number and position of tooth. (Azzaldeen, Watted, Mai, Borbély, & Abu-Hussein, 2017; Cunha et al., 2020; Lee et al., 2012; Ramanathan et al., 2018) Many studies in mice and laboratory have found many genes that are important for tooth development but there is still a lack of knowledge about gene expression in adult human teeth. In this study, we evaluate the gene expression profiles of the hDPCs of mandibular second premolar by RNA-sequencing technique and investigate the significant genes (*WNT6, WNT10A, WNT10B, PITX1, PITX2, FOXI3, LEF1, BMP2, BMP4, MSX1, MSX2, TBX2, PAX9, RUNX2, RUNX3, LHX6, LHX7, LHX8, BARX1, DLX1, DLX2, DLX3, DLX5, DLX6, ALX3, ALX4, TFGA, FGF3, FGF8, FGF10, FGF13, GLI2* and *GLI3*)(Cunha et al., 2020; Ramanathan et al., 2018) that play an important role in odontogenesis.

From 17,968 expressed genes, we targeted the top 20 expressed genes. Some genes are associated with tooth formation such as *FN1, COL1A1, COL1A2, TGFBI, IGFBP5,* and *TIMP3*. Fibronectin (*FN1*) showed a greater level in odontoblasts and the fibronectin protein is involving in the organization of extracellular matrix. (Kadler, Hill, & Canty-Laird, 2008) Furthermore, the studies in primary tooth buds showed that *FN1* was involved in cell movement via actin organization in cell cytoskeleton. (Hu, Parker, & Wright, 2015) The *FN1* is also a biomarker for head and neck squamous cell carcinoma because it has a strong association with EMT (Epithelial-mesenchymal transition) and tumor invasion/metastasis. (X. Liu et al., 2020)

Proceedings of RSU International Research Conference (2021)
Published online: Copyright © 2016-2021 Rangsit University

Table 3 Expression of important odontogenic genes

Gene	Tooth		
	Sample 1	Sample 2	Mean count
1. *WNT6*	0.16	11.16	5.66
2. *WNT10A*	0.16	8.89	4.53
3. *WNT10B*	5.54	5.42	5.48
4. *PITX1*	38.20	313.35	175.77
5. *PITX2*	1.07	40.10	20.59
6. *FOXI3*	0	0	0
7. *LEF1*	507.46	506.12	506.79
8. *BMP2*	1189.62	9294.88	5242.25
9. *BMP4*	2327.84	3836.17	3082
10. *MSX1*	4167.62	4896.81	4532.21
11. *MSX2*	3395.72	3818.90	3607.31
12. *TBX2*	3778.70	4724.35	4251.52
13. *PAX9*	1049.14	464.40	756.77
14. *RUNX2*	1099.77	927.38	1013.57
15. *RUNX3*	1610.34	1453.59	1531.96
16. *LHX6*	9.92	47.69	28.80
17. *LHX7*	0	0	0
18. *LHX8*	949.28	694.47	821.88
19. *BARX1*	1045.63	2322.37	1684.00
20. *DLX1*	852.20	467.98	660.09
21. *DLX2*	418.82	158.11	288.47
22. *DLX3*	744.98	437.07	591.03
23. *DLX5*	2973.63	1772.74	2373.19
24. *DLX6*	556.31	388.40	472.36
25. *ALX3*	0	0	0
26. *ALX4*	66.05	79.58	72.81
27. *TGFA*	1.70	5.87	3.79
28. *FGF3*	0	0	0
29. *FGF8*	0	0	0
30. *FGF10*	2.69	27.92	15.30
31. *FGF13*	0.16	15.68	7.92
32. *GLI2*	566.44	456.07	511.26
33. *GLI3*	1102.78	1791.23	1447.00

COL1A2 encodes for alpha-2 type 1 collagen (the most common collagen type in humans) and plays role in collagen formation. (Schröder et al., 2018) *COL1A1* (collagen type 1, alpha 1) plays a crucial role in osteoblasts and odontoblasts' activities. (Winning, El Karim, & Lundy, 2019; Y. Xiong et al., 2019) Mutations in these genes (*COL1A1, COL1A2*) are associated with osteogenesis imperfecta and dentinogenesis imperfecta in humans. (Andersson et al., 2017)

TGFBI gene (transformed growth factor-beta-induced gene) encodes an extracellular matrix connective protein that can bind integrin to extracellular matrix protein and plays an essential role in embryonic development and many cell activities. (Thapa, Lee, & Kim, 2007) Many researchers have studied the relationship between overexpressed *TGFBI* and different kinds of tumors including oral squamous cell carcinoma. (B. Han et al., 2015; Ozawa et al., 2016; B.-j. Wang et al., 2019)

Proceedings of RSU International Research Conference (2021)
Published online: Copyright © 2016-2021 Rangsit University

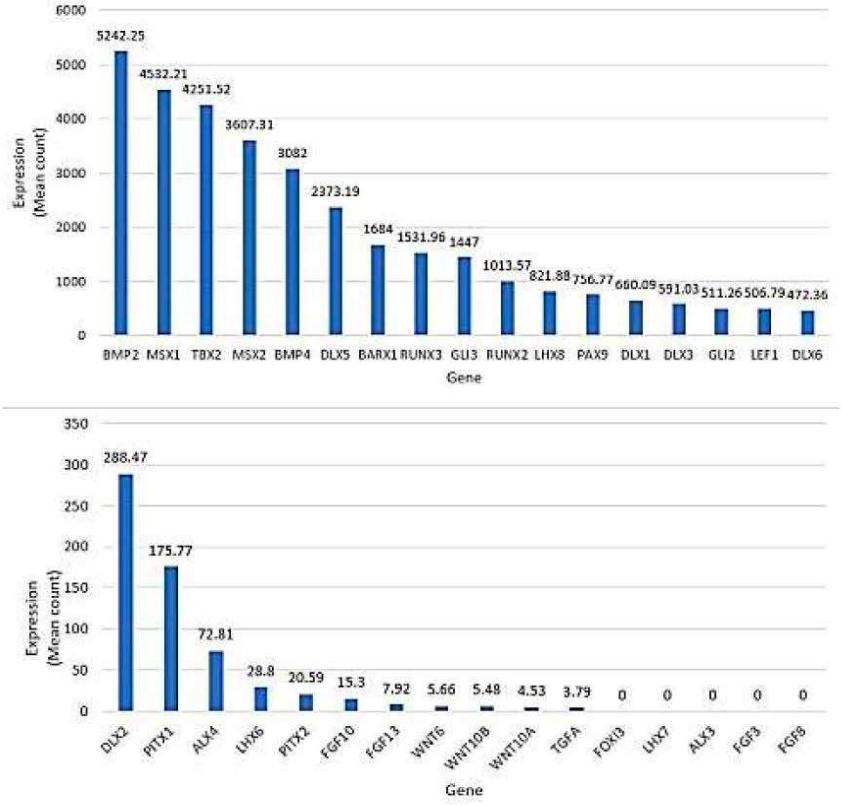


Figure 3 Bar charts show expression of selected genes, with the level of expression (mean count) on the Y-axis and the selected genes on X-axis

GREM1 is an inhibitor of osteogenesis (BMP antagonist). Inhibition of this gene results in an increased expression of *RUNX2, BSP, ALP,* and *OPN* (osteogenic markers) while overexpression of *GREM1* inhibited adipose-derived stem cells senescence and increased telomerase activity which had an anti-aging effect. (Liu et al., 2020) *IGFBP5* (Insulin-like growth factor binding protein 5), the member of IGFs family, has been shown to enhance the growth, remodeling, and repair of bone cells. In periodontitis patients, *IGFBP5* expression is significantly decreased in periodontal ligament and gingival crevicular fluid whereas *IGFBP5* overexpression could promote periodontal tissue regeneration and anti-inflammation of periodontal tissues. (Han et al., 2017; Liu et al., 2015)

TIMP3 is one member of tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMPs). The balancing between TIMPs and MMPs regulates tissue remodeling, cell proliferation, cell cycle progression, and odontoblast/ameloblast differentiation. (Yoshiba et al., 2006; Yoshiba et al., 2003) *FLNA* gene, found in dental pulp, plays a role in cytoskeletal rearrangement in the differentiation of neural progenitors. (Gnanasegaran, Govindasamy, & Abu Kasim, 2016)

Expression of important genes for odontogenesis

Proceedings of RSU International Research Conference (2021)
Published online: Copyright © 2016-2021 Rangsit University

WNTs and BMPs signaling pathways regulate the microenvironment and molecular cross-talk between stem cells in both humans and mice. (Mitsiadis & Graf, 2009) *WNT6* plays a significant role in human tooth development by promoting migration and differentiation of human dental pulp cells. (Li et al., 2014) *WNT10A* is related to cell-matrix interactions regulating odontoblast differentiation and cusp morphogenesis. (Yamashiro et al., 2007) *WNT10B* is particularly expressed in the dental epithelium. (Sarkar & Sharpe, 1999) *BMP2* and *BMP4* are expressed in odontoblasts and ameloblasts during embryonic tooth development until post-natal tooth cytodifferentiation. Deletion of *Bmp2* gene in early odontoblast affects molars and incisors, with thin dentin in a crown and reduced blood vessels/pericytes in dental pulp (Yang et al., 2012) while deletion of *BMP4* results in both odontogenesis and amelogenesis disrupted, with hypomineralized enamel and thin dentin. (Gluhak-Heinrich et al., 2010) In this study, *BMP2* and *Bmp4* have a high expression while *WNT6, WNT10A,* and *WNT10B* have a low expression. It is indicated that BMPs still have a role in normal dental pulp mature mandibular second premolar teeth more than WNTs.

FGF8 gene induces *BMP4* and *MSX1* expression in dental epithelium while *MSX1* triggers *BMP4* in the ectomesenchyme with a feedback loop. *BMP4* positive feedback loop can induce both *MSX1* and *MSX2*, on the other hand, *TBX2* negative feedback regulates *BMP4* and *MSX1* expression. (Saadi et al., 2013) This mechanism is crucial for the proliferation and determination of cranial neural crest cells until tooth differentiation. *MSX1* is expressed in the mesenchyme of all teeth from the dental placode stage to the bell stage in tooth development. *MSX2* expression is observed in both epithelial and mesenchymal compartments of all developing teeth. (Duverger & Morasso, 2008) From our results, *BMP4, TBX2, MSX1* and *MSX2* were still expressed in normal dental pulp cells of mature lower second premolars but *FGF8* was not expressed. Noticeably, *MSX1* and *MSX2* deletion resulted in a cessation of tooth development at the placode stage for both incisors and molars. (Bei, Stowell, & Maas, 2004; Duverger & Morasso, 2008) The missense mutation and frameshift insertion mutation of *MSX1* caused an absence of second premolars and third molars. (Abid, Simpson, Petridis, Cobourne, & Sharpe, 2017; Vastardis, Karimbux, Guthua, Seidman, & Seidman, 1996)

Distal-less (*DLX*) families are also related to tooth morphogenesis. They are expressed along proximo-distal axis of the branchial arch. The expression of *DLX1* and *DLX2* during tooth development are induced by *FGF8* and *BMP4*. At the molar area, *DLX1* and *DLX2* expression regulate the mesenchymal gene expression of both the maxillary and mandibular process but only *DLX2* is expressed in the distal epithelium of incisors area. (Suryadeva & Khan, 2015) The null mutation of both *Dlx1* and *Dlx2* in mice showed that the developing maxillary molars were arrest at epithelial thickening stage, however, the development of incisors and mandibular molars were still maintained. (Duverger & Morasso, 2008) At the early stage of tooth formation, *DLX5* and *DLX6* are expressed only proximal mesenchyme of mandibular process but later expressed in the mesenchyme of all teeth. (Duverger & Morasso, 2008) *DLX3* expressed in mesenchymal of developing tooth, inhibits proliferation of dental pulp cells through inactivation of WNTs signaling. (Zhan et al., 2018) The mutation of *DLX3* in humans affected the thickness and microhardness of enamel (amelogenesis imperfecta). (Kim et al., 2016)

PITX1 is expressed in mesenchyme and dental epithelium of developing incisors and molars throughout all stages of odontogenesis. It has synergistic interaction with *TBX1* and *BARX1*. Deletion of *Pitx1* gene in mice causing abnormal tooth morphology of mandibular molars. (Mitsiadis & Drouin, 2008) *PITX2* is a marker of tooth development. It is regulated positively by *FGF8* and negatively by *BMP4*. Axenfeld-Reiger syndrome, a condition with tooth hypoplasia and hypodontia, is associated with the mutation of *PITX2*. (Intarak et al., 2018) *LHX6* is induced by *PITX2* and *LHX6* has negative feedback to repress *PITX2*. (Zhang et al., 2013) *LHX6* and *LHX7* are expressed in the dental mesenchyme. *Lhx6* and *Lhx7* double mutant mice showed an absence of molar teeth but mutant mice with at least one allele of either *Lhx6* or *Lhx7* can develop molar teeth suggesting that two genes have an overlap function in odontogenesis. (Denaxa, Sharpe, & Pachnis, 2009)

PAX9, which is induced by *FGF8* and repressed by *BMP2/BMP4*, is the marker for determining the exact site for tooth germ appearances. (Hloušková et al., 2015) *GLI2* and *GLI3*, major component mediators of Sonic Hedgehog (Shh) signaling pathway, have also be related to tooth agenesis. (Vieira et al., 2013) FGFs family have important roles in craniofacial development but our results from mature teeth showed that FGFs had low expression (*FGF10*, *FGF13*) or were not expressed (*FGF3*, *FGF8*). *FGF3* is associated with upper

Proceedings of RSU International Research Conference (2021)
Published online: Copyright © 2016-2021 Rangsit University

lateral incisors tooth formation. (Cunha et al., 2020) Deletion of *Fgf10* in mice causes a lack of cervical loop formation. (Harada et al., 2002)

The present results may promote further studies to investigate the gene expression in all tooth types (incisors, canine, premolar, molars) and the functions and molecular roles of genes and regulatory mechanisms in adult human dental pulp cells. Furthermore, these may advance knowledge about genetic engineering and stem-cell based therapy in regeneration medicine.

5. Conclusion

In conclusion, by applying RNA-seq to dental pulp cells of mandibular second premolar teeth, we identified and reported the top 20 expressed genes and the most significant involving pathways. Apart from these results, we also investigated the genes that have important roles in odontogenesis and showed that *BMP2, BMP4,* and *MSX1* were expressed whereas *FGF3, FGF8, LHX7, ALX3, and FOXI3* genes were not observed in the mature adult teeth.

6. Acknowledgements

This project is funded by the National Research Council of Thailand, TSRI Fund (CU_FRB640001_01_32_3, CU_FRB640001_01_32_4), Global partnership CU-C16F630029, Health Systems Research Institute, and Thailand Research Fund (MRG6280001). This research is supported by the 90th Anniversary of Chulalongkorn University, Rachadapisek Sompote Fund, Chulalongkorn University. ST is supported by the 100th Anniversary Chulalongkorn University Fund for Doctoral Scholarship and the 90th Anniversary of Chulalongkorn University Fund (Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund).

7. References

Abid, M. F., Simpson, M., Petridis, C., Cobourne, M., & Sharpe, P. (2017). Non-syndromic severe hypodontia caused by a novel frameshift insertion mutation in the homeobox of the MSX1 gene. *Archives of oral biology, 75*, 8-13.

Andersson, K., Dahllöf, G., Lindahl, K., Kindmark, A., Grigelioniene, G., Åström, E., & Malmgren, B. (2017). Mutations in COL1A1 and COL1A2 and dental aberrations in children and adolescents with osteogenesis imperfecta–a retrospective cohort study. *PloS one, 12*(5), e0176466.

Azzaldeen, A., Watted, N., Mai, A., Borbély, P., & Abu-Hussein, M. (2017). Tooth Agenesis; Aetiological Factors. *Journal of Dental and Medical Sciences, 16*(1), 75-85.

Bei, M., Stowell, S., & Maas, R. (2004). Msx2 controls ameloblast terminal differentiation. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists, 231*(4), 758-765.

Bergendal, B. (2008). When should we extract deciduous teeth and place implants in young individuals with tooth agenesis? *Journal of Oral Rehabilitation, 35*, 55-63.

Bokelund, M., Andreasen, J. O., Christensen, S. S. A., & Kjær, I. (2013). Autotransplantation of maxillary second premolars to mandibular recipient sites where the primary second molars were impacted, predisposes for complications. *Acta Odontologica Scandinavica, 71*(6), 1464-1468.

Bonczek, O., Balcar, V. J., & Šerý, O. (2017). PAX9 gene mutations and tooth agenesis: A review. *Clinical genetics, 92*(5), 467-476.

Borzabadi-Farahani, A. (2012). Orthodontic considerations in restorative management of hypodontia patients with endosseous implants. *Journal of Oral Implantology, 38*(6), 779-791.

Cunha, A. S., Dos Santos, L. V., Marañón-Vásquez, G. A., Kirschneck, C., Gerber, J. T., Stuani, M. B., . . . Küchler, E. C. (2020). Genetic variants in tooth agenesis–related genes might be also involved in tooth size variations. *Clinical oral investigations, 5*(3),1307-1318 doi:10.1007/s00784-020-03437-8

Denaxa, M., Sharpe, P. T., & Pachnis, V. (2009). The LIM homeodomain transcription factors Lhx6 and Lhx7 are key regulators of mammalian dentition. *Developmental Biology, 333*(2), 324-336.

Duverger, O., & Morasso, M. I. (2008). Role of homeobox genes in the patterning, specification, and differentiation of ectodermal appendages in mammals. *Journal of cellular physiology, 216*(2), 337-346.

Published online: Copyright © 2016-2021 Rangsit University

Eliášová, P., Marek, I., & Kamínek, M. (2014). Implant site development in the distal region of the mandible: bone formation and its stability over time. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics, 145*(3), 333-340.

Fines, C. D., Rebellato, J., & Saiar, M. (2003). Congenitally missing mandibular second premolar: treatment outcome with orthodontic space closure. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics, 123*(6), 676-682.

Gluhak-Heinrich, J., Guo, D., Yang, W., Harris, M., Lichtler, A., Kream, B., . . . Dechow, P. (2010). New roles and mechanism of action of BMP4 in postnatal tooth cytodifferentiation. *Bone, 46*(6), 1533-1545.

Gnanasegaran, N., Govindasamy, V., & Abu Kasim, N. (2016). Differentiation of stem cells derived from carious teeth into dopaminergic-like cells. *International endodontic journal, 49*(10), 937-949.

Han, B., Cai, H., Chen, Y., Hu, B., Luo, H., Wu, Y., & Wu, J. (2015). The role of TGFBI (βig-H3) in gastrointestinal tract tumorigenesis. *Molecular cancer, 14*(1), 1-12.

Han, N., Zhang, F., Li, G., Zhang, X., Lin, X., Yang, H., . . . Fan, Z. (2017). Local application of IGFBP5 protein enhanced periodontal tissue regeneration via increasing the migration, cell proliferation and osteo/dentinogenic differentiation of mesenchymal stem cells in an inflammatory niche. *Stem cell research & therapy, 8*(1), 1-13.

Harada, H., Toyono, T., Toyoshima, K., Yamasaki, M., Itoh, N., Kato, S., . . . Ohuchi, H. (2002). FGF10 maintains stem cell compartment in developing mouse incisors. *Development, 129*(6), 1533-1541.

Hloušková, A., Bonczek, O., Izakovičová-Hollá, L., Lochman, J., Šoukalová, J., Štembírek, J., . . . Vaněk, J. (2015). Novel PAX9 gene polymorphisms and mutations and susceptibility to tooth agenesis in the Czech population. *Neuroendocrinology Letters, 36*(5), 101-106.

Hu, S., Parker, J., & Wright, J. T. (2015). Towards unraveling the human tooth transcriptome: the dentome. *PloS one, 10*(4), e0124801.

Intarak, N., Theerapanon, T., Ittiwut, C., Suphapeetiporn, K., Porntaveetus, T., & Shotelersuk, V. (2018). A novel PITX2 mutation in non-syndromic orodental anomalies. *Oral diseases, 24*(4), 611-618.

Kadler, K. E., Hill, A., & Canty-Laird, E. G. (2008). Collagen fibrillogenesis: fibronectin, integrins, and minor collagens as organizers and nucleators. *Current opinion in cell biology, 20*(5), 495-501.

Kim, Y. J., Seymen, F., Koruyucu, M., Kasimoglu, Y., Gencay, K., Shin, T., . . . Kim, J. W. (2016). Unexpected identification of a recurrent mutation in the DLX 3 gene causing amelogenesis imperfecta. *Oral diseases, 22*(4), 297-302.

Lee, W.-C., Yamaguchi, T., Watanabe, C., Kawaguchi, A., Takeda, M., Kim, Y.-I., . . . Maki, K. (2012). Association of common PAX9 variants with permanent tooth size variation in non-syndromic East Asian populations. *Journal of human genetics, 57*(10), 654-659.

Li, R., Wang, C., Tong, J., Su, Y., Lin, Y., Zhou, X., & Ye, L. (2014). WNT6 promotes the migration and differentiation of human dental pulp cells partly through c-Jun N-terminal kinase signaling pathway. *Journal of endodontics, 40*(7), 943-948.

Liu, D., Wang, Y., Jia, Z., Wang, L., Wang, J., Yang, D., . . . Fan, Z. (2015). Demethylation of IGFBP5 by histone demethylase KDM6B promotes mesenchymal stem cell-mediated periodontal tissue regeneration by enhancing osteogenic differentiation and anti-inflammation potentials. *Stem Cells, 33*(8), 2523-2536.

Liu, H., Han, X., Yang, H., Cao, Y., Zhang, C., Du, J., . . . Fan, Z. (2020). GREM1 inhibits osteogenic differentiation, senescence and BMP transcription of adipose-derived stem cells. *Connective tissue research*, 1-12.

Liu, X., Meng, L., Li, X., Li, D., Liu, Q., Chen, Y., . . . Sun, H. (2020). Regulation of FN1 degradation by the p62/SQSTM1-dependent autophagy–lysosome pathway in HNSCC. *International Journal of Oral Science, 12*(1), 1-11.

Lumsden, A. J. D. (1988). Spatial organization of the epithelium and the role of neural crest cells in the initiation of the mammalian tooth germ. *Development, 103*(Supplement), 155-169.

Mitsiadis, T. A., & Drouin, J. (2008). Deletion of the Pitx1 genomic locus affects mandibular tooth morphogenesis and expression of the Barx1 and Tbx1 genes. *Developmental Biology, 313*(2), 887-896.

Published online: Copyright © 2016-2021 Rangsit University

Mitsiadis, T. A., & Graf, D. (2009). Cell fate determination during tooth development and regeneration. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews, 87*(3), 199-211.

Nakatomi, M., Wang, X.-P., Key, D., Lund, J. J., Turbe-Doan, A., Kist, R., . . . Peters, H. (2010). Genetic interactions between Pax9 and Msx1 regulate lip development and several stages of tooth morphogenesis. *Developmental Biology, 340*(2), 438-449.

Ok, U., & Yilmaz, B. S. (2019). Alternative treatment plan for congenitally missing teeth in an adolescent patient: A case report. *The Journal of the American Dental Association, 150*(8), 707-713.

Ozawa, D., Yokobori, T., Sohda, M., Sakai, M., Hara, K., Honjo, H., . . . Kuwano, H. (2016). TGFBI expression in cancer stromal cells is associated with poor prognosis and hematogenous recurrence in esophageal squamous cell carcinoma. *Annals of surgical oncology, 23*(1), 282-289.

Phan, M., Conte, F., Khandelwal, K. D., Ockeloen, C. W., Bartzela, T., Kleefstra, T., . . . Carels, C. (2016). Tooth agenesis and orofacial clefting: genetic brothers in arms? *Human genetics, 135*(12), 1299-1327.

Rakhshan, V. (2015). Meta-analysis of observational studies on the most commonly missing permanent dentition (excluding the third molars) in non-syndromic dental patients or randomly-selected subjects, and the factors affecting the observed rates. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry, 39*(3), 198-207.

Ramanathan, A., Srijaya, T. C., Sukumaran, P., Zain, R. B., & Kasim, N. H. A. (2018). Homeobox genes and tooth development: understanding the biological pathways and applications in regenerative dental science. *Archives of oral biology, 85*, 23-39.

Rølling, S., & Poulsen, S. (2009). Agenesis of permanent teeth in 8138 Danish schoolchildren: prevalence and intra-oral distribution according to gender. *International journal of paediatric dentistry, 19*(3), 172-175.

Saadi, I., Das, P., Zhao, M., Raj, L., Ruspita, I., Xia, Y., . . . Bei, M. (2013). Msx1 and Tbx2 antagonistically regulate Bmp4 expression during the bud-to-cap stage transition in tooth development. *Development, 140*(13), 2697-2702.

Sarkar, L., & Sharpe, P. T. (1999). Expression of Wnt signalling pathway genes during tooth development. *Mechanisms of development, 85*(1-2), 197-200.

Schröder, A., Bauer, K., Spanier, G., Proff, P., Wolf, M., & Kirschneck, C. (2018). Expression kinetics of human periodontal ligament fibroblasts in the early phases of orthodontic tooth movement. *Journal of Orofacial Orthopedics/Fortschritte der Kieferorthopädie, 79*(5), 337-351.

Sun, Q., Liu, H., Lin, H., Yuan, G., Zhang, L., Chen, Z. J. M., & biochemistry, c. (2013). MicroRNA-338-3p promotes differentiation of mDPC6T into odontoblast-like cells by targeting Runx2. *377*(1-2), 143-149. Retrieved from https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s11010-013-1580-3.pdf

Suryadeva, S., & Khan, M. B. (2015). Role of homeobox genes in tooth morphogenesis: a review. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR, 9*(2), ZE09.

Thapa, N., Lee, B.-H., & Kim, I.-S. (2007). TGFBIp/βig-h3 protein: A versatile matrix molecule induced by TGF-β. *The international journal of biochemistry & cell biology, 39*(12), 2183-2194.

Thesleff, I., & Sharpe, P. J. M. o. d. (1997). Signaling networks regulating dental development. *67*(2), 111-123.

Tummers, M., Thesleff, I. J. J. o. E. Z. P. B. M., & Evolution, D. (2009). The importance of signal pathway modulation in all aspects of tooth development. *312*(4), 309-319.

Vastardis, H., Karimbux, N., Guthua, S. W., Seidman, J., & Seidman, C. E. (1996). A human MSX1 homeodomain missense mutation causes selective tooth agenesis. *Nature genetics, 13*(4), 417-421.

Vieira, A., Meira, R., Modesto, A., & Murray, J. (2004). MSX1, PAX9, and TGFA contribute to tooth agenesis in humans. *Journal of dental research, 83*(9), 723-727.

Vieira, A. R., D'Souza, R. N., Mues, G., Deeley, K., Hsin, H.-Y., Küchler, E. C., . . . Lips, A. (2013). Candidate gene studies in hypodontia suggest role for FGF3. *European Archives of Paediatric Dentistry, 14*(6), 405-410.

Volponi, A. A., Zaugg, L. K., Neves, V., Liu, Y., & Sharpe, P. T. (2018). Tooth Repair and Regeneration. *Current Oral Health Reports, 5*(4), 295-303.

Published online: Copyright © 2016-2021 Rangsit University

Wang, B.-j., Chi, K.-p., Shen, R.-l., Zheng, S.-w., Guo, Y., Li, J.-f., . . . He, Y. (2019). Tgfbi promotes tumor growth and is associated with poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Journal of Cancer, 10*(20), 4902-4912.

Wang, T., Xu, Z. J. B., & communications, b. r. (2010). miR-27 promotes osteoblast differentiation by modulating Wnt signaling. *402*(2), 186-189.

Winning, L., El Karim, I. A., & Lundy, F. T. (2019). A comparative analysis of the osteogenic potential of dental mesenchymal stem cells. *Stem cells and development, 28*(15), 1050-1058.

Xiong, X., Li, S., Cai, Y., & Chen, F. (2017). Targeted sequencing in FGF/FGFR genes and association analysis of variants for mandibular prognathism. *Medicine, 96*(25). , e7240. doi: 10.1097/MD.0000000000007240.

Xiong, Y., Fang, Y., Qian, Y., Liu, Y., Yang, X., Huang, H., . . . Zhang, Z. (2019). Wnt production in dental epithelium is crucial for tooth differentiation. *Journal of dental research, 98*(5), 580-588.

Yamashiro, T., Zheng, L., Shitaku, Y., Saito, M., Tsubakimoto, T., Takada, K., . . . Thesleff, I. (2007). Wnt10a regulates dentin sialophosphoprotein mRNA expression and possibly links odontoblast differentiation and tooth morphogenesis. *Differentiation, 75*(5), 452-462.

Yang, W., Harris, M., Cui, Y., Mishina, Y., Harris, S., & Gluhak-Heinrich, J. (2012). Bmp2 is required for odontoblast differentiation and pulp vasculogenesis. *Journal of dental research, 91*(1), 58-64.

Yoshiba, N., Yoshiba, K., Stoetzel, C., Perrin-Schmitt, F., Cam, Y., Ruch, J. V., . . . Lesot, H. (2006). Differential regulation of TIMP-1,-2, and-3 mRNA and protein expressions during mouse incisor development. *Cell and tissue research, 324*(1), 97-104.

Yoshiba, N., Yoshiba, K., Stoetzel, C., Perrin-Schmitt, F., Cam, Y., Ruch, J. V., & Lesot, H. (2003). Temporospatial gene expression and protein localization of matrix metalloproteinases and their inhibitors during mouse molar tooth development. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists, 228*(1), 105-112.

Zhan, Y., Li, X., Gou, X., Yuan, G., Fan, M., & Yang, G. (2018). DLX3 inhibits the proliferation of human dental pulp cells through inactivation of canonical Wnt/β-catenin signaling pathway. *Frontiers in physiology, 9*, 1637. doi: 10.3389/fphys.2018.01637

Zhang, Z., Gutierrez, D., Li, X., Bidlack, F., Cao, H., Wang, J., . . . Amendt, B. A. (2013). The LIM homeodomain transcription factor LHX6: a transcriptional repressor that interacts with pituitary homeobox 2 (PITX2) to regulate odontogenesis. *Journal of Biological Chemistry, 288*(4), 2485-2500.

Proceedings of RSU International Research Conference (2021)
Published online: Copyright © 2016-2021 Rangsit University



คำนำ

โรคพาร์กินสันเป็นโรคทางระบบประสาท ที่ส่งผลต่อการเคลื่อนไหวและบุคลิกท่าทางของผู้ป่วย ส่งผลต่อคุณภาพชีวิตทั้งในด้านการใช้ชีวิตประจำวัน การทำงาน การเข้าสังคม เช่น การเดิน การรับประทานอาหาร การออกไปทำกิจกรรมต่างๆ นอกบ้าน รวมถึงการดูแลสุขภาพของตนเอง ทั้งสุขภาพร่างกาย และสุขภาพช่องปาก ซึ่งสุขภาพช่องปากที่ดีเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ผู้ป่วยมีสุขภาพร่างกายโดยรวมที่สมบูรณ์แข็งแรง

Mini E-book เล่มนี้ได้รวบรวมคำถามเกี่ยวกับสุขภาพช่องปากและปัญหาที่เกิดขึ้นจากการสำรวจปัญหาสุขภาพช่องปากและฟันในกลุ่มผู้ป่วยโรคพาร์กินสัน โดยความร่วมมือของศูนย์ความเป็นเลิศทางการแพทย์โรคพาร์กินสันและกลุ่มโรคความเคลื่อนไหวผิดปกติ คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ผ่านแบบสำรวจออนไลน์ (Google form) ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์-มีนาคม 2564 มีผู้เข้าร่วมตอบแบบสอบถามทั้งหมด 86 ราย และกิจกรรม Facebook Live (4 มี.ค. 64)

คณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่าข้อมูลที่ได้รวบรวมขึ้นมานี้ จะเป็นประโยชน์ไม่มากก็น้อยต่อผู้ป่วยโรคพาร์กินสัน ครอบครัว ผู้ดูแล ตลอดจนสหสาขาวิชาชีพที่ร่วมกันรักษาและดูแลผู้ป่วยให้มีคุณภาพชีวิตที่ดีต่อไป

คณะผู้จัดทำ



สารบัญ

1. โรคพาร์กินสันมีความเกี่ยวข้องกับโรคในช่องปากใดบ้าง 1
2. ในผู้ป่วยโรคพาร์กินสันที่มีน้ำลายไหลย้อย (drooling) มีวิธีการดูแลอย่างไร และการที่มีน้ำลายมากมีผลต่อสุขภาพฟันหรือไม่ 4
3. การที่ผู้ป่วยกัดฟันเบาๆ มีผลเสียต่อฟันหรือจริวะอื่นหรือไม่ 6
4. ผู้ที่มีอาการเกร็งจนฟันกัดกันแน่น มีเครื่องมือป้องกันการกัดฟันได้หรือไม่ 8
5. ผู้ป่วยโรคพาร์กินสันช่วยยาไม่ออกฤทธิ์ จะมีอาการเกร็ง จำปากไม่ได้ มีวิธีแก้ไขปัญหาและข้อแนะนำในการดูแลช่องปากอย่างไร 10
6. การเลือกแปรงสีฟันและอุปกรณ์เสริมในการทำความสะอาดช่องปาก ควรเลือกใช้อย่างไร 13
7. หากผู้ดูแลต้องแปรงฟันให้ผู้ป่วย มีวิธีทำให้ผู้ป่วยอ้าปากได้อย่างไร 17
8. ผู้ป่วยควรไปตรวจสุขภาพช่องปากและฟัน บ่อยแค่ไหน 22
9. ในผู้ป่วยที่ทานยาละลายลิ่มเลือดร่วมด้วย จำเป็นต้องงดยา 7 วันก่อนไปทำฟันหรือไม่ 24
10. ในผู้สูงอายุควรเลือกอย่างไรระหว่างการฝังรากฟันเทียม หรือการใส่ฟันเทียมถอดได้ 26
11. การทำความสะอาดฟันเทียมชนิดถอดได้ที่ถูกวิธีต้องทำอย่างไร 28



โรคพาร์กินสัน มีความเกี่ยวข้องกับ โรคในช่องปาก ใดบ้าง

1



สุขภาพช่องปาก (Oral Health) มักแย่ลงในผู้ป่วยโรคพาร์กินสันเนื่องจากผู้ป่วยมีระบบการทำงานของประสาทและกล้ามเนื้อที่เปลี่ยนแปลงไป เกิดการสั่นและเกร็งของกล้ามเนื้อ โดยเฉพาะมือและแขน นำไปสู่การเกิดปัญหาในการดูแลสุขภาพช่องปาก คือ ไม่สามารถถือด้ามแปรงฟันให้กดได้ จึงทำให้แปรงฟันได้ไม่สะอาดเพียงพอ เกิดปัญหาสุขภาพช่องปากตามมา เช่น โรคเหงือกอักเสบหรือโรคปริทันต์ โรคฟันผุ และมีกลิ่นปาก เป็นต้น

ยาที่ใช้ในการรักษาโรคพาร์กินสันบางชนิด เช่น Levodopa อาจทำให้เกิดกลุ่มอาการแสบร้อนช่องปาก (Burning Mouth Syndrome) ได้ โดยมักจะเกิดประมาณร้อยละ 25 ของผู้ป่วยโรคพาร์กินสัน

นอกจากนี้ ในผู้ป่วยที่ใส่ฟันเทียมและมีการทำงานของกล้ามเนื้อไม่ปกติ แรงกัดที่มากเกินไปทำให้ฟันเทียมชนิดถอดได้มีความเสี่ยงในการบิ่น แตก ตะขอลวดหัก หรือฟันเทียมไม่อยู่นิ่งในช่องปาก ซึ่งหากผู้ป่วยมีอาการหรือปัญหาในช่องปากควรปรึกษาทันตแพทย์เพื่อรับคำแนะนำและการรักษาที่เหมาะสม[1-4]



ปัญหาดังกล่าวสอดคล้องกับ ผลจากการสำรวจออนไลน์ผ่าน Google Form ในช่วงเดือน กุมภาพันธ์ - มีนาคม 2564 ซึ่งมีผู้เข้าร่วมตอบแบบสอบถามทั้งหมด 86 ราย คิดเป็น ชาย 45 ราย (ร้อยละ 52.33) หญิง 41 ราย (ร้อยละ 47.67) อายุเฉลี่ยของผู้ป่วย คือ 68 ปี (โดยพบผู้ป่วยที่อายุมากที่สุด 92 ปี และน้อยที่สุด 36 ปี) และระยะเวลาเฉลี่ยของการเป็นโรคคือ 9.3 ปี



จากผลสำรวจพบว่าส่วนใหญ่ผู้ป่วยโรคพาร์กินสันมีปัญหาเกี่ยวกับสุขภาพช่องปาก สูงถึงร้อยละ 87 ของผู้ป่วยทั้งหมดที่ตอบแบบสอบถาม

และจากจำนวนทั้งหมดของผู้ที่มีปัญหาสุขภาพช่องปาก (75 คน) พบว่าปัญหาที่พบมากเป็น 5 อันดับแรก ได้แก่

1. มีปัญหาในการทำความสะอาดช่องปาก 68 %
2. เศษอาหารติดค้างในช่องปาก 61 %
3. มีน้ำลายไหลมาก / ไหลย้อย 53 %
4. เคี้ยวอาหารลำบาก 35 %
5. มีกลิ่นปาก 35 %

> ในผู้ป่วยโรคพาร์กินสันที่มี
> **น้ำลายไหลย้อย (drooling)**
> มีวิธีการดูแลอย่างไร
> และการที่มีน้ำลายมาก
> มีผลต่อสุขภาพฟันหรือไม่



การเกิด Drooling หรือ น้ำลายไหลย้อยโดยไม่ตั้งใจในผู้ป่วยโรคพาร์กินสันเกิดจากภาวะกลืนลำบาก ทำให้ไม่สามารถกลืนน้ำลายได้ตามปกติ และเกิดจากผู้ป่วยไม่สามารถปิดริมฝีปากได้สนิท รวมถึงท่าทางการยืนและเดินของผู้ป่วยพาร์กินสันที่มักยื่นศีรษะมาทางด้านหน้า ทำให้น้ำลายไหลกองที่มุมปากหรือเกิดปัญหาน้ำลายไหลย้อยโดยไม่ได้ตั้งใจ มีโอกาสเกิดแผลติดเชื้อบริเวณมุมปาก (Angular cheilitis) ได้



การรักษาสามารถทำได้โดยการจ่ายยาในกลุ่ม Anticholinergics Drugs เพื่อลดอัตราการไหลของน้ำลาย การฉีด Botulinum Toxin A เข้าบริเวณต่อมน้ำลาย และการผ่าตัดท่อ/ต่อมน้ำลาย เป็นต้น[4]

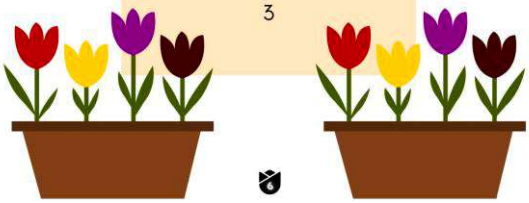
การมีน้ำลายมากไม่ส่งผลเสียต่อฟัน เนื่องจากน้ำลายสามารถลดสภาวะความเป็นกรดในช่องปากได้ ส่งผลให้ความเสี่ยงในการเกิดฟันผุลดลง แต่การมีน้ำลายที่มากเกินไป หรือการมีน้ำลายไหลย้อยโดยไม่ตั้งใจ อาจจะทำให้ผู้ป่วยสูญเสียความมั่นใจในการเข้าสังคม ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตลดลง



“

การที่ผู้ป่วย
กัดฟันเยอะๆ
มีผลเสียต่อฟัน
หรืออวัยวะอื่นหรือไม่

3

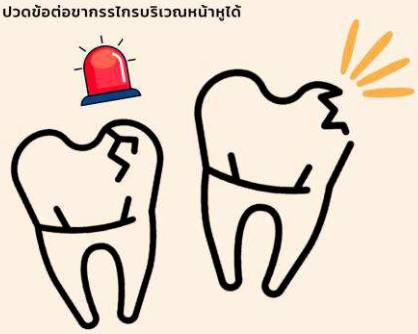


3. การที่ผู้ป่วยกัดฟันเยอะๆ มีผลเสียต่อฟันหรืออวัยวะอื่นหรือไม่



การกัดฟันหรือ Bruxism ในผู้ป่วยโรคพาร์กินสัน มักเกิดจากตัวโรคพาร์กินสันเองและการที่ผู้ป่วยได้รับการรักษาโดยใช้ยาที่มีส่วนประกอบของ Levodopa

การกัดฟันนั้นนอกจากจะทำให้เกิดฟันสึก ส่วนประกอบของเคลือบฟันและเนื้อฟันบางลงแล้ว อาจทำให้เกิดผลเสียต่อข้อต่อขากรรไกร หรือ TMJ (Temporomandibular joint) ทำให้เกิดอาการปวดข้อต่อขากรรไกรบริเวณหน้าหูได้



“

ผู้ที่มีอาการเกร็ง
จนฟันกัดกันแน่น
มีเครื่องมือป้องกัน
การกัดฟันได้หรือไม่

4



4. ผู้ที่มีอาการเกร็งจนฟันกัดกันแน่น มีเครื่องมือป้องกันการกัดฟันได้หรือไม่



ผู้ที่มีอาการเกร็งฟันกัดกันแน่นสามารถใส่เฝือกสบฟันแบบนิ่ม (Soft Splint) ซึ่งมีลักษณะคล้ายเฝือกสบฟันที่ใส่ป้องกันขณะเล่นกีฬา สามารถถอด-ใส่ได้ง่าย เพื่อป้องกันการสบกระแทกหรือกัดเน้นระหว่างฟันบนและฟันล่าง



อุปกรณ์เฝือกสบฟันสามารถป้องกันการสึกของฟันและสามารถลดแรงกัดที่มากเกิน ที่ส่งต่อไปยังข้อต่อขากรรไกรได้ หากต้องการคำแนะนำสำหรับการใส่เฝือกสบฟัน สามารถรับคำปรึกษาและคำแนะนำเฉพาะบุคคลจากทันตแพทย์



ผู้ป่วยโรคพาร์กินสันช่วงยาไม่ออกฤทธิ์ จะมีอาการเกร็ง อ้าปากไม่ได้ มีวิธีแก้ไขปัญหาและข้อแนะนำในการดูแลช่องปากอย่างไร

5



ผู้ป่วยโรคพาร์กินสันที่มีอาการแข็งเกร็ง สั่น เคลื่อนไหวช้า สามารถยืดหยุ่นเวลาในการดูแลความสะอาดช่องปากได้ แนะนำให้แปรงฟันในช่วงเวลาที่ยาออกฤทธิ์ และเลือกใช้อุปกรณ์เสริมตามความเหมาะสม

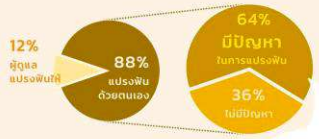


กรณีที่ต้องอาศัยผู้ดูแลในการทำความสะอาด ผู้ดูแลควรเลือกเวลาที่ผู้ป่วยอารมณ์ดีและให้ความร่วมมือ การบังคับหรือใช้แรงพยายามทำให้ผู้ป่วยอ้าปากอาจจะทำให้เกิดแผลในช่องปากและมีผลกระทบต่อจิตใจผู้ป่วย

หากยาที่ทานอยู่ออกฤทธิ์ช้า แนะนำให้พบแพทย์เฉพาะทางโรคพาร์กินสันเพื่อพิจารณาปรับยา



สอดคล้องกับผลสำรวจเรื่องการทำความสะอาดช่องปาก พบว่า หลังการแปรงฟัน **ผู้ป่วยร้อยละ 43.02 รู้สึกว่าแปรงได้ไม่สะอาดเพียงพอ**



ผู้ป่วยส่วนใหญ่ (ร้อยละ 88.37) สามารถทำความสะอาดช่องปากได้เอง

ในขณะที่ร้อยละ 11.63 ต้องการความช่วยเหลือจากผู้ดูแลในการแปรงฟัน

ในกลุ่มผู้ป่วยที่แปรงฟันเอง พบว่า ร้อยละ 64 มีปัญหาหรือมีความยากลำบากในการแปรงฟัน

โดยปัญหาที่พบมากที่สุด 5 อันดับแรก ได้แก่



การเลือกแปรงสีฟันและอุปกรณ์เสริมในการทำความสะอาดช่องปาก ควรเลือกใช้อย่างไร

6

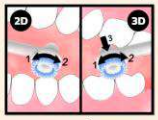




ในกรณีที่ผู้ป่วยจับด้ามแปรงได้ไม่ถนัด ควรหาอุปกรณ์เสริมพันด้ามแปรงให้มีขนาดใหญ่ขึ้น เพื่อให้ผู้ป่วยสามารถจับได้ถนัดมือมากขึ้น

สนับสนุนให้ผู้ป่วยแปรงฟันด้วยตนเอง และให้ผู้ดูแลแปรงซ้ำให้อีกครั้ง ในกรณีที่แปรงได้ไม่สะอาดเพียงพอ เพื่อเป็นการกระตุ้นให้ผู้ป่วยสามารถดูแลสุขภาพช่องปากของตนเองให้ได้นานที่สุด และยังเป็นการฝึกกล้ามเนื้อมือและแขนไปในตัว

แปรงสีฟันไฟฟ้า เป็นอุปกรณ์ที่นิยมในกลุ่มคนใช้พาร์กินสัน เนื่องจากเป็นการทุ่นแรงในขยับแปรงสีฟันเอง มีข้อแนะนำว่าควรเลือกใช้แปรงสีฟันไฟฟ้าที่มีลักษณะการทำงานของปลายแปรงในรูปแบบสองมิติหรือสามมิติ เนื่องจากมีประสิทธิภาพการกำจัดคราบจุลินทรีย์ที่ดี





แต่มีข้อควรระวังคือ ความถี่ของการหมุน/แรงดันของแปรง และปลายขนที่แข็งของแปรงฟันไฟฟ้า อาจจะทำให้ฟันสึก และเกิดอาการเสียวฟันตามมาได้

นอกจากแปรงสีฟันที่ใช้เป็นอุปกรณ์หลักในการทำความสะอาดฟัน ยังมีอุปกรณ์อีกหลายชนิดที่ช่วยเสริมการทำความสะอาดในบริเวณอื่นๆ ภายในช่องปากที่แปรงสีฟันไม่สามารถเข้าถึงได้ เช่น **แปรงกอเดียว** ใช้บริเวณที่ฟันซ้อนเก ฟันซี่สุดท้าย หรือรอบรากฟันเทียม

บริเวณด้านประชิดของฟัน ซึ่งมักเป็นแหล่งสะสมของเศษอาหารและแบคทีเรีย แนะนำให้ใช้ไหมขัดฟันหรือแปรงซอกฟันเพื่อทำความสะอาด



ไหมขัดฟัน มีทั้งชนิดที่เป็นเส้นและแบบมีด้ามจับ ใช้สำหรับบริเวณซอกฟันที่ชิดติดกัน ทำได้โดยการสอดไหมระหว่างซอกฟัน แล้วโอบด้านข้างฟันทีละซี่ พร้อมทั้งถูเข้าออก แต่ละซอกจะโอบสองด้านเพื่อทำความสะอาดฟันแต่ละซี่



แปรงซอกฟัน ใช้บริเวณซอกฟันที่มีช่องว่างระหว่างซี่ โดยถูแปรงเข้าออกทีละตำแหน่งให้สะอาด ควรเลือกใช้ให้เหมาะกับขนาดซอกฟัน ถ้าเล็กเกินไปจะทำความสะอาดได้ไม่ดี แต่หากมีขนาดใหญ่เกินไปอาจทำให้เกิดการบาดเจ็บของเหงือกและทำให้เหงือกร่นตามมาได้







ในบริเวณที่ไม่มีฟัน แนะนำให้ใช้ผ้าก๊อซ หรือผ้าสะอาดชุบน้ำให้หมาด เช็ดบริเวณสันเหงือกให้สะอาดเป็นประจำ



นอกจากนี้การ **ทำความสะอาดลิ้น** เป็นประจำ ช่วยลดแบคทีเรียในช่องปากที่ก่อให้เกิดกลิ่นปากและโรคภายในช่องปากอีกด้วย

หากไม่แน่ใจในการเลือกใช้อุปกรณ์

แนะนำให้ไปพบทันตแพทย์

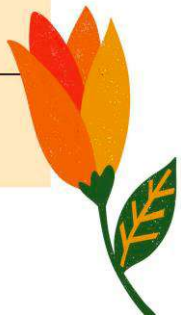
เพื่อรับคำปรึกษาในการเลือกใช้อุปกรณ์ที่เหมาะสมสำหรับช่องปากของผู้ป่วยแต่ละราย



หากผู้ดูแลต้องแปรงฟันให้ผู้ป่วย

มีวิธีทำให้ผู้ป่วยอ้าปากได้อย่างไร

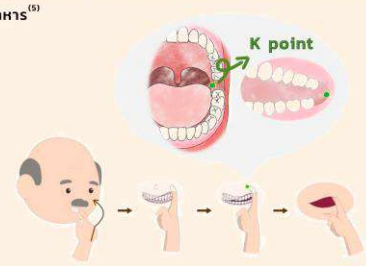
7



ควรเลือกแปรงฟันในเวลาที่ผู้ป่วยอารมณ์ดีและให้ความร่วมมือ ก่อนเริ่มแปรงฟันควรพูดคุยกับผู้ป่วยด้วยถ้อยคำที่อ่อนโยนแต่กระชับ แล้วค่อยๆให้อ้าปาก แนะนำให้นวดคลึงบริเวณแก้ม หน้ากกหู และใต้คาง เพื่อเป็นการผ่อนคลายกล้ามเนื้อและกระตุ้นต่อมน้ำลายจนกว่าผู้ป่วยรู้สึกสบายแล้วค่อยๆอ้าปากเอง



หากผู้ป่วยไม่ยอมอ้าปากหรืออ้าปากได้ลำบาก แนะนำให้สอดนิ้วเข้าไปกดบริเวณรอยต่อของขากรรไกรบนและล่าง เพื่อกระตุ้นตำแหน่ง K point (ดังรูป) จากการศึกษาในประเทศญี่ปุ่น Kojima และคณะ ยืนยันว่าการกระตุ้นบริเวณจุด K point คือ ด้านท้ายของฟันกรามซี่สุดท้าย มีประโยชน์ในการช่วยให้ผู้ป่วยอ้าปากสำหรับการดูแลสุขภาพช่องปากและการป้อนอาหาร[5]



จากผลสำรวจพบว่า **ผู้ดูแลผู้ป่วยพาร์กินสัน ร้อยละ 60 มีปัญหาในการทำความสะอาดช่องปากให้แก่ผู้ป่วยโรคพาร์กินสัน**

โดยปัญหาที่พบบ่อยสามารถแสดงได้ดังนี้



สำหรับผู้ป่วยที่มักมีการสำลักขณะแปรงฟัน

"การแปรงแห้ง"

เป็นวิธีการแปรงฟันแบบหนึ่งที่สามารถลดปัญหาการสำลักระหว่างแปรงฟันได้

"การแปรงแห้ง"

การแปรงฟันแห้ง คือการแปรงฟันด้วยยาสีฟันผสมฟลูออไรด์ที่ไม่มีส่วนประกอบของสารลดแรงตึงผิว (Sodium Lauryl Sulfate, SLS) โดยไม่มีน้ำมาเกี่ยวข้องทั้งก่อนแปรงและหลังแปรงฟัน



ก่อนแปรงฟัน:

ไม่ต้องบ้วนน้ำ ไม่ต้องเอาแปรงจุ่มน้ำก่อนบีบยาสีฟัน เพื่อที่เวลาแปรงฟันจะไม่เกิดฟองมาก โดยแนะนำให้นำแปรงสีฟันล้างน้ำก่อน 1 ครั้งและสะบัดน้ำทิ้งให้แห้งที่สุดก่อนแปรงฟัน

หลังแปรงฟัน:

ไม่ต้องบ้วนน้ำเพื่อล้างยาสีฟันออก แค่บ้วนน้ำลายและฟองยาสีฟันทิ้งหรือใช้ผ้าสะอาดเช็ดฟองออกในกรณีที่บ้วนไม่ได้ หลังจากการแปรงฟัน ควรงดน้ำ งดอาหารอย่างน้อยครึ่งชั่วโมง เพื่อให้ฟลูออไรด์ในยาสีฟันคงอยู่ในช่องปาก

"การแปรงแห้ง"

ข้อดี

การแปรงแห้งนั้นช่วยป้องกันฟันผุได้มากกว่าการบ้วนน้ำตามหลังการแปรงฟัน โดยฟลูออไรด์ที่คงอยู่จะมีความเข้มข้นมากในครึ่งชั่วโมงแรก ฟลูออไรด์จะเกาะยึดกับผิวฟัน ทำหน้าที่ซ่อมแซมผิวฟันและป้องกันฟันผุในระยะยาว

การวิจัยของ Ghassem พบว่าการแปรงแบบแห้งและแบบเปียกไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในการกำจัดคราบจุลินทรีย์ วิธีการแปรงแบบแห้งนั้นถือว่าเป็นวิธีการแปรงที่ยอมรับได้[6]

จากงานวิจัยเปรียบเทียบยาสีฟันที่มีสาร SLS และไม่มีสาร SLS พบว่าให้ผลในการลดคราบจุลินทรีย์, ลดการอักเสบ และถลอกของเหงือกไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ[7]



“

ผู้ป่วยควรไป

ตรวจสุขภาพ

ช่องปากและฟัน

บ่อยแค่ไหน

8

8. ผู้ป่วยควรไปตรวจสุขภาพช่องปากและฟันบ่อยแค่ไหน



ควรรับการตรวจสุขภาพช่องปากและฟันทุกๆ

3 ถึง 6 เดือน

ผู้ป่วยโรคพาร์กินสันมีความเสี่ยงในการเกิดโรคในช่องปากได้ง่ายและอาจลุกลามได้รวดเร็ว ดังนั้นการไปพบทันตแพทย์อย่างเป็นประจำสม่ำเสมอ ช่วยให้เจอปัญหาช่องปากในระยะเริ่มต้นซึ่งสามารถจัดการได้ง่าย อีกทั้งทันตแพทย์ยังสามารถช่วยป้องกันการเกิดโรคในช่องปาก รวมถึงแนะนำการดูแลรักษาสุขภาพช่องปาก การใช้อุปกรณ์เครื่องมือต่างๆให้เหมาะสมกับผู้ป่วยพาร์กินสันในแต่ละราย

จากการสำรวจออนไลน์พบว่า

มีผู้ป่วยพาร์กินสันเพียงร้อยละ 26.74

ที่ไปพบทันตแพทย์เป็นประจำตามนัด





โดยร้อยละ 50

จะไปพบทันตแพทย์ก็ต่อเมื่อ

มีอาการหรือมีปัญหา

ในช่องปากและฟันแล้วเท่านั้น

“

ในผู้ป่วยที่ทาน

ยาละลายลิ่มเลือด

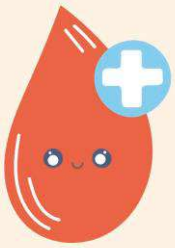
ร่วมด้วย

จำเป็นต้องงดยา 7 วัน

ก่อนไปทำฟันหรือไม่

9

9. ในผู้ป่วยที่ทานยาละลายลิ่มเลือดร่วมด้วย จำเป็นต้องงดยา 7 วันก่อนไปทำฟันหรือไม่



ความจำเป็นในการงดยาขึ้นอยู่กับหัตถการที่จะทำในวันนั้น ชนิดยาและขนาดยาที่ผู้ป่วยรับประทาน

ไม่แนะนำให้ผู้ป่วยหยุดยาด้วยตนเอง

ควรนำยาหรือสมุดยาให้ทันตแพทย์ดูก่อนเพื่อประเมินความจำเป็นในการหยุดยาเป็นกรณี



“

ในผู้สูงอายุ
ควรเลือกอย่างไรระหว่าง
การฝังรากฟันเทียม
หรือ
การใช้ฟันเทียมถอดได้

10



10. ในผู้สูงอายุ ควรเลือกอย่างไรระหว่างการฝังรากฟันเทียมหรือการใช้ฟันเทียมถอดได้



การเลือกฟันเทียมแต่ละชนิด
ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่
สภาวะกระดูก จำนวนซี่ฟันที่หายไป
ราคาฟันเทียมแต่ละชนิด โรคประจำตัว
อายุ รวมถึง ความสามารถในการดูแล
สุขภาพช่องปากและฟันเทียมแต่ละชนิดอีกด้วย



รากฟันเทียมมีข้อจำกัด คือ
ไม่เหมาะกับการรับแรงจากด้านข้าง ซึ่งใน
กรณีของผู้ป่วยพาร์กินสันที่มีการขบเน้นฟัน
หรือกัดฟันมาก ไม่แนะนำให้ใช้รากเทียม
หากมีรากฟันเทียมอยู่ก่อนแล้ว
แนะนำให้ไปพบทันตแพทย์เพื่อปรับการสบฟัน
ให้เหมาะสมอยู่เสมอ



27

“

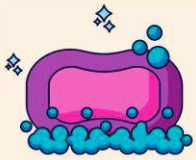
การทำความสะอาด
ฟันเทียมชนิดถอดได้
ที่ถูกวิธี
ต้องทำอย่างไร

11



28

11. การทำความสะอาดฟันเทียมชนิดถอดได้ที่ถูกวิธีต้องทำอย่างไร



สำหรับฟันเทียมชนิดถอดได้ แนะนำให้
ทำความสะอาดฟันเทียมด้วยแปรงสีฟัน
ขนนุ่ม แปรงเบาๆ ร่วมกับน้ำสบู่ หรือ
น้ำยาล้างจาน ทำความสะอาดทุกซอกมุม
รวมถึงบริเวณตะขอลวดต่างๆ ขณะทำความสะอาดฟันเทียมควรมี
ภาชนะใส่น้ำรองรับด้านล่าง เพื่อป้องกันการแตกหักของฟันเทียม
ในกรณีที่เผลอทำตกหล่น

ไม่ควรใส่ฟันเทียมขณะนอนหลับ



ควรถอดฟันเทียมออก
ทำความสะอาดและแช่น้ำ เพื่อที่เหงือกจะได้พัก
และไม่เป็นแหล่งสะสมของเชื้อโรคและกลิ่นไม่พึงประสงค์ต่างๆ



จากผลการสำรวจพบว่า
มีผู้ใช้ฟันเทียม ร้อยละ 39.53 ของจำนวนผู้ตอบแบบสอบถามทั้งหมด

97 % ทำความสะอาดฟันเทียมอย่างเป็นประจำ

85 % ไม่ใส่ฟันเทียมนอน

ซึ่งสอดคล้องกับคำแนะนำในการดูแลฟันเทียมที่ดี :)

29

เอกสารอ้างอิง

1. Atista LM, Portela de Oliveira MT, Magalhaes WB, Bastos PL. Oral Hygiene in Patients with Parkinson's Disease. R I Med J (2013). 2015;98(11):35-7.

2. Rozas NS, Sadowsky JM, Jones DJ, Jeter CB. Incorporating oral health into interprofessional care teams for patients with Parkinson's disease. Parkinsonism Relat Disord. 2017;43:9-14.

3. Lyra P, Machado V, Proenca L, Domingos J, Godinho C, Mendes JJ, et al. Parkinson's Disease, Periodontitis and Patient-Related Outcomes: A Cross-Sectional Study. Medicina (Kaunas). 2020;56(8).

4. Friedlander AH, Mahler M, Norman KM, & Ettinger RL. Parkinson disease: systemic and orofacial manifestations, medical and dental management. The Journal of the American Dental Association. 2009;140(6):658-69.

5. Kojima C, Fujishima I, Ohkuma R, Maeda H, Shibamoto I, Hojo K, et al. Jaw opening and swallow triggering method for bilateral-brain-damaged patients: K-point stimulation. Dysphagia. 2002;17(4):273-7

6. Ansari G, Torabzadeh H, Nabavi ZS, Hassani PS. Comparing the effect of dry and wet brushing on dental plaque removal in children. J Indian Soc Pedod Prev Dent. 2019 Jul-Sep;37(3):292-96.

7. Sälzer S, Rosema NA, Martin EC, et al. The effectiveness of dentifrices without and with sodium lauryl sulfate on plaque, gingivitis and gingival abrasion-a randomized clinical trial. Clin Oral Investig. 2016;20(3):443-50.

30

ส่วนประกอบตอนท้าย ประวัติคณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) รศ.ทญ.ดร.ฑัณฑริรา พรทวีทัศน์,
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Assoc.Prof.Dr.Thantrira Porntaveetus
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน
3. ตำแหน่งปัจจุบัน

รองศาสตราจารย์ สาขา ชีววิทยาช่องปาก

หัวหน้าหน่วยปฏิบัติการวิจัยทางจีโนมิกส์และทันตกรรมแม่นยำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการบริหาร และคณะกรรมการวิชาการ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลขานุการและกรรมการบริหารหลักสูตรทันตกรรมผู้สูงอายุและผู้ป่วยพิเศษ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก

ภาควิชา สรีรวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 34 ถ.อังรีดูนังต์ ปทุมวัน กรุงเทพ 10330

โทรศัพท์ 02-218-8695 โทรศัพท์มือถือ

โทรสาร 02-218-8691 E-mail thantrira.p@chula.ac.th

ผู้ร่วมวิจัย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) ศาตราจารย์ ดร. ทันตแพทย์ ธนภูมิ โอสถานนท์
   (ภาษาอังกฤษ) Prof. Thanaphum Osathanon
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน
3. ตำแหน่งปัจจุบัน ศาสตราจารย์ ดร. ทันตแพทย์
4. ที่อยู่หน่วยงาน ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์ความเป็นเลิศด้านการฟื้นฟูและทดแทนทางทันตกรรม และหน่วยปฏิบัติการวิจัยทางจีโนมิกส์และทันตกรรมแม่นยำ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาคารพรีคลินิก ชั้น 5 34 ถนนอังรีดูนังค์ แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-218-8885 โทรศัพท์มือถือ083-494-0005

E-mail thanaphum.o@chula.ac.th

ผู้ร่วมวิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) ดร. นรินทร์ อินทรักษ์
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Dr. Narin Intarak
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน

3. ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิจัยหลังปริญญาเอก

4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก

หน่วยปฏิบัติการวิจัยทางจีโนมิกส์และทันตกรรมแม่นยำ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

34 ถ.อังรีดูนังต์ ปทุมวัน กรุงเทพ 10330

โทรศัพท์ 02-218-8690 โทรศัพท์มือถือ 089-515-9650

โทรสาร 02-218-8691 E-mail narin.i@chula.ac.th

ผู้ร่วมวิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) ดร. ชวัล มนัสพล

   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Dr. Chawan Manaspon

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน

3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก

สถาบันวิศวกรรมชีวการแพทย์, มหาวิทยาลัยเลียงใหม่

239 ถนนห้วยแก้ว ตำบลสุเทพ อำเภอเมืองเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ 50200

โทรศัพท์ 0-5394-2083-4 โทรศัพท์มือถือ 082-323-2834

โทรสาร 0-534-2083 ext. 18 E-mail chawan.m@cmu.ac.th

ผู้ร่วมวิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) ดร. กนกวรรณ ศรีวัฒนพงศ์

   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Dr. Kanokwan Sriwattanapong

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน

3. ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิจัยหลังปริญญาเอก

4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก

หน่วยปฏิบัติการวิจัยทางจีโนมิกส์และทันตกรรมแม่นยำ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

34 ถ.อังรีดูนังต์ ปทุมวัน กรุงเทพ 10330

โทรศัพท์ 02-218-8690 โทรศัพท์มือถือ 080-951-7942

โทรสาร 02-218-8691 Email ksriwatt@gmail.com

ผู้ร่วมวิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นาย ธนากร ธีรภานนท์

   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Thanakorn Theerapanon

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน

3. ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิจัย

4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก

ศูนย์ความเป็นเลิศทางจีโนมิกส์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถ.พระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพ 10330

โทรศัพท์ 02-256-4000 ext. 3354 โทรศัพท์มือถือ 089-668-0314

โทรสาร 02-256-4455 ext. 17 Email theerapanon.t@gmail.com
