



ผลของนมผึ้งต่อการเกิดและการทำหน้าที่ของเซลล์ออสติโอคลาสต์

ในสภาวะจำลองการหลุดของฟันออกจากเบ้า

EFFECT OF ROYAL JELLY ON THE FORMATION AND FUNCTION OF OSTEOCLASTS
IN AN IN VITRO TOOTH AVULSION MODEL

แบ่งพิมพ์ จำปาศิริ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2563

ผลของนมผึ้งต่อการเกิดและการทำหน้าที่ของเซลล์ออสติโอคลาสท์
ในสภาวะจำลองการหลุดของฟันออกจากเบ้า



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการช่องปากและแม็กซิลโลเฟเชียล
คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2563
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

EFFECT OF ROYAL JELLY ON THE FORMATION AND FUNCTION OF OSTEOCLASTS
IN AN IN VITRO TOOTH AVULSION MODEL



PANGPIM JUMPASIRI

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

Faculty of Dentistry, Srinakharinwirot University

2020

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์
เรื่อง
ผลของนมผึ้งต่อการเกิดและการทำหน้าที่ของเซลล์ออสติโอคลาสต์
ในสภาวะจำลองการหลุดของฟันออกจากเบ้า
ของ
แบ้งพิมพ์ จำปาศิริ

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการช่องปากและแม็กซิลโลเฟเชียล
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก	 ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มานิสา ศรีชลเพชร)	(รองศาสตราจารย์ ดร.กนิษฐา กิจสมานมิตร)
..... ที่ปรึกษาร่วม	 กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.อรุณวรรณ หล้าอุบล)	(รองศาสตราจารย์ ดร.สรสัณห์ รั้งสิยานนท์)

ชื่อเรื่อง	ผลของนมผึ้งต่อการเกิดและการทำหน้าที่ของเซลล์ออสติโอคลาสต์ ในสภาวะจำลองการหลุดของฟันออกจากเบ้า
ผู้วิจัย	แบ่งพิมพ์ จำปาศิริ
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2563
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มานีสา ศรีชลเพชร
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. อรุณวรรณ หล้าอุบล

การละลายของผิวรากฟันเป็นภาวะไม่พึงประสงค์ที่เกิดขึ้นภายหลังการนำฟันกลับเข้าสู่เบ้าฟัน จนถึงปัจจุบันยังไม่พบสารละลายตัวกลางสำหรับแช่ฟันที่มีความสามารถในการยับยั้งกระบวนการละลายของรากฟันได้อย่างมีประสิทธิภาพ งานวิจัยฉบับนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารละลายนมผึ้งความเข้มข้นต่างๆต่อจำนวนเซลล์ออสติโอคลาสต์ที่เกิดขึ้นและการทำหน้าที่ในการละลายเนื้อเยื่อแข็ง โดยเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอนโดปริทันต์และจำลองสภาวะฟันหลุดออกจากเบ้าฟัน จากนั้นแช่เซลล์ในสารละลายตัวกลางคือสารละลายเกลือแอสคิ นมจืด นมจืดไขมันต่ำ และสารละลายนมผึ้งความเข้มข้นต่างๆเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตามด้วยการเลี้ยงร่วมกับแมคโครฟาจเซลล์ไลน์ของหนู RAW 264.7 เป็นเวลา 12 วัน ทำการนับเซลล์ออสติโอคลาสต์ที่ย้อมติดสี Tartrate-resistant acid phosphate (TRAP) และประเมินการทำหน้าที่ของเซลล์จากการวัดพื้นที่หลุมการละลาย ผลการศึกษาพบว่าสารละลายนมผึ้งทุกความเข้มข้นทำให้เกิดจำนวนเซลล์ออสติโอคลาสต์และพื้นที่หลุมการละลายน้อยกว่ากลุ่มสารละลายเกลือแอสคิ นมจืด และนมจืดไขมันต่ำที่เป็นสารละลายแนะนำสำหรับแช่ฟัน ถึงแม้ว่าจะไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จะเห็นได้ว่าสารละลายนมผึ้งมีแนวโน้มที่ดีในการยับยั้งการเกิดและการทำหน้าที่ของเซลล์ออสติโอคลาสต์ จึงน่าจะมีศักยภาพในการพัฒนาไปเป็นสารละลายตัวกลางเพื่อแช่ฟันที่หลุดออกจากเบ้า ที่สามารถลดโอกาสการละลายของรากฟันได้

คำสำคัญ : สารละลายตัวกลาง, การเจริญของเซลล์ออสติโอคลาสต์, หลุมการละลาย

Title	EFFECT OF ROYAL JELLY ON THE FORMATION AND FUNCTION OF OSTEOCLASTS IN AN IN VITRO TOOTH AVULTION MODEL
Author	PANGPIM JUMPASIRI
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2020
Thesis Advisor	Assistant Professor Dr. Marnisa Sricholpech
Co Advisor	Associate Professor Dr. Aroonwan Lam - ubol

External root resorption is one of the unwanted complications following the replantation of an avulsed tooth. Among the tooth storage media studied to date, none of them demonstrated the capability of preventing the occurrence of root resorption. This study aims to evaluate the effect of royal jelly on osteoclast formation and their function in hard tissue resorption. Periodontal ligament fibroblasts (PDLF) were plated, subjected to tooth avulsion simulation and immersed in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), whole milk (WM), skimmed milk (SK) and varying concentrations of royal jelly (RJ) for one hour. Then, the PDLF were co-cultured with RAW 264.7 for 12 days. The number of Tartrate-Resistant Acid Phosphate (TRAP) positive osteoclasts were counted, and their function was determined by measuring the resorption of the pit area formed. On average, the results showed that, on average, all concentrations of RJ solution led to lesser numbers of osteoclasts and resorption pit area than HBSS, WM and SK, which were the recommended storage media. Although there were no statistically significant differences between the groups, this study showed that RJ solution can suppress osteoclast formation and function. Therefore, RJ solution could potentially be a tooth storage media that can reduce the occurrence of root resorption.

Keyword : Storage media, Osteoclastogenesis, Resorption pit

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความสามารถช่วยเหลือ แนะนำ ให้คำปรึกษา ตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆจาก อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มานิสา ศรีชลเพ็ชร และอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ ดร. อรุณวรรณ หล้าอุบล ผู้วิจัยกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงค่ะ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกคนสำหรับการช่วยเหลือ สอนใช้งานเครื่องมือต่างๆ ขณะทำการทดลอง ขอขอบคุณ ทพ. ธนวัฒน์ มหัทธนิยพงษ์ สำหรับการช่วยเหลือในทุกเรื่องที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยนี้ ขอขอบคุณคณะทันตแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ บุคลากรครอบครัว และ ทพ.วิทวัส วัฒนานูวัตรตลอดจนเพื่อนๆในรุ่นของผู้วิจัยที่ช่วยเหลือสนับสนุน ส่งกำลังใจให้กัน ไม่ทิ้งกันตลอดมา นอกจากนี้ยังมีผู้ที่ให้ความร่วมมือช่วยเหลืออีกหลายท่าน ซึ่งผู้วิจัยไม่สามารถกล่าวชื่อนามในที่นี้ได้หมด จึงขอขอบคุณทุกท่านเหล่านั้นไว้ ณ โอกาสนี้ด้วย

แบ้งพิมพ์ จำปาศิริ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูปภาพ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง	1
ความมุ่งหมายของงานวิจัย.....	3
ความสำคัญของงานวิจัย	3
ขอบเขตของการวิจัย	3
กรอบแนวคิดวิจัย.....	4
สมมติฐานในการวิจัย.....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
การจัดการพื้นที่ที่หลุดออกจากกระดุกไฟฟ้า และภาวะแทรกซ้อนหลังการรักษา.....	5
กลไกการเกิดรากฟันละลายหลังจากการใส่ฟันกลับเข้าสู่กระดุกไฟฟ้า	6
บทบาทของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นไนด์ปริทันต์ต่อการกระบวนการเจริญและพัฒนาของเซลล์สลายกระดูก.....	11
สารละลายตัวกลางและบทบาทในกระบวนการละลายของรากฟัน	14
สารละลายนมผึ้ง	18
การประเมินการเกิดขึ้นของเซลล์ออสติโอคลาสต์	20

การประเมินการทำหน้าที่ของเซลล์ออสติโอคลาสต์	23
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	26
การกำหนดกลุ่มประชากรและเลือกกลุ่มตัวอย่าง	26
ประชากร	26
การเลือกกลุ่มตัวอย่าง	26
ขั้นตอนการทดลอง	26
การเพาะเลี้ยงเซลล์	26
สารละลายตัวกลาง	27
การจำลองสภาวะของพื้นที่หลุดออกจากเบ้าและการเลี้ยงร่วมระหว่างเซลล์ไฟโบรบลาสต์ เอ็นดอทีรียัลกับแมคโครฟาจเซลล์ไลน์ของหนู RAW 264.7	27
การประเมินการเกิดขึ้นของเซลล์ออสติโอคลาสต์	28
การประเมินการทำหน้าที่ของเซลล์ออสติโอคลาสต์	28
การเก็บรวบรวมข้อมูล	29
สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล	29
บทที่ 4 ผลการดำเนินงานวิจัย	30
การเลี้ยงร่วมระหว่างเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นดอทีรียัลกับแมคโครฟาจเซลล์ไลน์ของหนู RAW 264.7	30
ผลการเกิดขึ้นของเซลล์ออสติโอคลาสต์ภายหลังการจำลองสภาวะของพื้นที่หลุดออกจากเบ้า	32
การสร้างหลุมการละลาย (Resorption pit)	33
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	37
สรุปผลการวิจัย	43
ข้อเสนอแนะ	43
บรรณานุกรม	44

ภาคผนวก.....	54
ประวัติผู้เขียน.....	58



สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 เซลล์ของเนื้อเยื่อพื้นที่พบการแสดงออกของ RANK/RANKL/OPG	8
ตาราง 2 การแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ออสติโอคลาสต์และเซลล์ขนาดใหญ่หลาย นิวเคลียส (+ คือมีการแสดงออก +++ คือมีการแสดงออกมาก – คือไม่มีการแสดงออก +/- คือบาง การศึกษามีการแสดงออกแต่บางการศึกษาไม่พบการแสดงออก)	13
ตาราง 3 ตัวอย่างการศึกษาสารละลายตัวกลางชนิดต่างๆ	16
ตาราง 4 แสดงค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ระหว่างตัวแปรเซลล์ออสติโอคลาสต์และพื้นที่หลุม การละลาย ในแต่ละสารละลายตัวกลาง (* $P < 0.05$ และ ** $P < 0.01$).....	35

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
ภาพประกอบ 1 กรอบแนวคิดวิจัย	4
ภาพประกอบ 2 แสดงระบบ RANK/RANKL/OPG	8
ภาพประกอบ 3 การเกิดการละลายกระดูก.....	9
ภาพประกอบ 4 แสดงหลุมการละลายของเซลล์ออสติโอคลาสท์ทั้งในภาวะปกติและการยับยั้งการ หลังกรดและ CATK.....	10
ภาพประกอบ 5 ขั้นตอนการเกิดเซลล์ออสติโอคลาสท์จากปฏิกิริยาเซลล์และเซลล์.....	12
ภาพประกอบ 6 การหดตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยิดปริทันต์ทำให้เกิดพื้นที่ว่าง (เส้นประ) และการเกิดการรวมตัวกันของเซลล์ TRAP+ (ลูกศรสีขาว)	12
ภาพประกอบ 7 นมผึ้งที่อยู่รอบๆเป็นสารอาหารแก่ตัวอ่อนราชินีผึ้ง.....	19
ภาพประกอบ 8 เซลล์หลายนิวเคลียส TRAP+ ที่ผ่านการย้อมสี TRAP.....	21
ภาพประกอบ 9 ภาพวงแหวนแอกติน (ก) ย้อมด้วยสี Rhodamine phalloidin (ข) ย้อมนิวเคลียส ด้วยสีเรืองแสง DAPI (ค) เมื่อนำภาพ ก และ ข มารวมเข้าด้วยกัน	22
ภาพประกอบ 10 ภาพพื้นที่หลุมการละลาย (เส้นประ) ที่ย้อมด้วยสี Von Kossa	24
ภาพประกอบ 11 ภาพหลุมการละลายผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscopy (SEM)).....	25
ภาพประกอบ 12 การเลี้ยงร่วมระหว่างเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยิดปริทันต์และแมคโครฟาจเซลล์ ไลน์ของหนู RAW 264.7 ในกลุ่มควบคุม (ก) เซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยิดปริทันต์ในจานเลี้ยงเซลล์ (ภาพกำลังขยาย 40X) (ข) ทำการหว่านแมคโครฟาจเซลล์ไลน์ของหนู RAW 264.7 ลงไปบนเซลล์ ไฟโบรบลาสต์เอ็นยิดปริทันต์ (ภาพกำลังขยาย 40X) (ค-ง) ภาพจากวันที่ 3 ของการเลี้ยงร่วมพบ เซลล์ขนาดใหญ่ที่ภายในมีหลายนิวเคลียส (ลูกศรสีดำ) (ภาพกำลังขยาย 200X)	30
ภาพประกอบ 13 ภาพเซลล์ออสติโอคลาสท์ (ก) ภายหลังการเลี้ยงร่วมระหว่างเซลล์ไฟโบรบลาสต์ เอ็นยิดปริทันต์และแมคโครฟาจเซลล์ไลน์ของหนู RAW 264.7 เป็นเวลา 12 วัน ในกลุ่มควบคุม (ภาพกำลังขยาย 100X) (ข) เซลล์ออสติโอคลาสท์ในกลุ่มควบคุม (ภาพกำลังขยาย 400X) (ค)	

ภายหลังการเลี้ยงแมโครฟาจเซลล์ไลน์ของหนู RAW 264.7 เป็นเวลา 12 วัน ในกลุ่ม RAW alone (ภาพกำลังขยาย 100X) (ง) เซลล์ออสติโอคลาสต์ในกลุ่ม RAW alone (ภาพกำลังขยาย 400X) 31	
ภาพประกอบ 14 กราฟแท่งแสดงจำนวนเซลล์ออสติโอคลาสต์ (แสดงเป็นเปอร์เซ็นต์กลุ่มควบคุม (%Control)) 33	
ภาพประกอบ 15 หลุมการละลาย (ลูกศรสีขาว) บนพื้นผิวจานเลี้ยง Osteo Assay ถ่ายภาพด้วย Light microscope (ภาพกำลังขยาย 200X) 33	
ภาพประกอบ 16 (ก) กราฟแท่งแสดงจำนวนเซลล์ออสติโอคลาสต์ (แสดงเป็นเปอร์เซ็นต์กลุ่มควบคุม (%Control)) และ (ข) กราฟแท่งแสดงพื้นที่หลุมการละลาย (แสดงเป็นค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) จาก 3 ชุดการทดลอง (* $P < 0.05$ และ ** $P < 0.01$)..... 34	
ภาพประกอบ 17 กลไกของกรดไขมัน 10H2DA ต่อการยับยั้งกระบวนการเจริญและพัฒนาของ เซลล์สลายกระดูก 40	
ภาพประกอบ 18 พื้นที่หลุมการละลายบนจานเลี้ยง Osteo Assay และย้อมสี Von Kossa 42	
ภาพประกอบ 19 เซลล์ออสติโอคลาสต์ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง 55	
ภาพประกอบ 20 หลุมการละลายในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง 56	

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

ฟันแท้ที่หลุดออกจากเบ้าฟันส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากการเกิดอุบัติเหตุ ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อให้เอ็นยึดปริทันต์ระหว่างรากฟันและกระดูกเบ้าฟัน เคลือบรากฟัน เนื้อเยื่อเหงือก และโพรงประสาทฟันถูกทำลาย โดยหลังจากที่ฟันหลุดออกมาภายนอกปากแล้ว ขั้นตอนแรกที่ต้องปฏิบัติคือการใส่ฟันกลับเข้าไปในกระดูกเบ้าฟันเดิมให้เร็วที่สุดเพื่อรักษาความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยึดปริทันต์เพราะเซลล์นี้มีความสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่งในการหายของฟัน แต่ในทางปฏิบัติการนำฟันกลับเข้าสู่กระดูกเบ้าฟันอาจไม่สามารถทำได้ทันที ดังนั้นเพื่อรักษาความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยึดปริทันต์ไว้ วิธีการเก็บรักษาฟันก่อนใส่กลับเข้าไปในกระดูกเบ้าฟันจึงมีความสำคัญอย่างมาก โดยสองปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จในการรักษา คือ ระยะเวลาที่ฟันถูกปล่อยแห้งและสารละลายตัวกลางที่เหมาะสมในการแช่ฟัน⁽¹⁻⁵⁾

การรักษาฟันที่หลุดจากกระดูกเบ้าฟันมักเกิดภาวะแทรกซ้อนซึ่งส่งผลกระทบต่อความสำเร็จในการรักษา โดยภาวะแทรกซ้อนที่พบได้บ่อยคือการเกิดรากฟันละลาย มีอัตราการเกิดถึง 60-80% และเป็นสาเหตุสำคัญของการสูญเสียฟัน กระบวนการเกิดรากฟันละลายนั้น มีระบบ RANK/RANKL/OPG มาเกี่ยวข้อง⁽⁶⁻⁸⁾ เมื่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยึดปริทันต์มีการตอบสนองต่อการทำลายของเนื้อเยื่อ จะเกิดการจับกันระหว่างเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยึดปริทันต์กับเซลล์ที่จะกลายเป็นเซลล์ออสติโอคลาสต์โดยสร้างโมเลกุลที่ใช้ในการยึดเกาะของเซลล์ (Cell-cell adhesion molecules) จากนั้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยึดปริทันต์จะสร้างโปรตีนเช่น Macrophage-colony stimulating factor (M-CSF), Tumor necrosis factor- α (TNF- α) และ RANKL ซึ่งส่งผลกระทบต่อเซลล์ที่จะกลายเป็นเซลล์ออสติโอคลาสต์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่ Tartrate resistant acid phosphatase positive (TRAP+) ต่อมาเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยึดปริทันต์จะเริ่มหดตัวและแยกออกจากกันทำให้เกิดช่องว่างขึ้น เซลล์ TRAP+ จะมีการเคลื่อนมาที่บริเวณนั้นและรวมตัวกันเกิดเป็นเซลล์ออสติโอคลาสต์⁽⁹⁾ ปริมาณของเซลล์ออสติโอคลาสต์ที่เกิดขึ้นนี้เป็นหนึ่งในปัจจัยที่สำคัญในกระบวนการละลายของรากฟัน

สารละลายตัวกลางที่เหมาะสมต่อการแช่ฟันควรมีคุณสมบัติคือ มีความเข้มข้นออสโมลาริตีและภาวะกรดด่างที่ใกล้เคียงร่างกายมนุษย์ ปริมาณของแบคทีเรียต่ำ มีสารอาหารที่จำเป็น ราคาไม่แพงและเข้าถึงง่าย⁽¹⁰⁾ ในปัจจุบันมีสารละลายตัวกลางที่ได้รับการแนะนำอย่างกว้างขวางคือ นม สารละลายเกลือแฮงค์ (Hank's balanced salt solution (HBSS)) น้ำลาย หรือน้ำเกลือ⁽³⁾

คุณสมบัติของสารละลายเกลือแอสค์เป็นสารละลายที่พัฒนามาเพื่อรักษาสภาพเซลล์และเนื้อเยื่อ สามารถทำให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยิดปริทันต์มีการเจริญเติบโตได้ดี แต่มีข้อจำกัดคือหาใช้งานได้ยาก ส่วนใหญ่ใช้ในห้องปฏิบัติการ และมีราคาแพง จึงแตกต่างจากนมที่หาง่าย ราคาไม่แพง และมีคุณสมบัติในการรักษาความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยิดปริทันต์เช่นกัน⁽¹¹⁾ ในการศึกษาเกี่ยวกับผลกระทบของสารละลายตัวกลางเหล่านี้ต่อกระบวนการละลายของรากฟัน มีการศึกษาของ Santos et al พบว่าเมื่อนำฟันของหนูที่แช่ในนมจืดไขมันเต็มและนมผงละลายน้ำเป็นเวลา 60 นาที และนำกลับเข้าสู่กระดูกเบ้าฟัน พบการละลายรากฟันในกลุ่มนมจืดไขมันเต็ม 38% และกลุ่มนมผงละลายน้ำ 28%⁽¹²⁾ ส่วนในการศึกษาของ Zhan et al ที่ทำการเลี้ยงร่วมระหว่างแมคโครฟาจเซลล์ไลน์ของหนู RAW 264.7 กับเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยิดปริทันต์ที่ผ่านการแช่ในสารละลายเกลือแอสค์หรือนม พบว่ามีจำนวนเซลล์หลายนิวเคลียสที่ย้อมติดสี TRAP (เซลล์ออสติโอคลาสต์) ในกลุ่มที่แช่ในนม 6 ชั่วโมง มากกว่ากลุ่มสารละลายเกลือแอสค์อย่างมีนัยสำคัญ⁽¹³⁾

นมผึ้งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากต่อมไฮโปฟาริงและต่อมแมนดินูล่าของผึ้งงาน (*Apis mellifera*) ที่มีลักษณะขาวและข้นหนืด เป็นอาหารให้แก่ราชินีผึ้ง จากหลายการศึกษาพบว่านมผึ้งมีคุณสมบัติในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย ปรับภูมิคุ้มกันของร่างกาย ด้านการอักเสบ ด้านอนุมูลอิสระ สามารถชะลอวัย บำรุงสุขภาพ และยังช่วยเรื่องกระบวนการหายของแผลอีกด้วย นอกจากนี้ยังพบว่านมผึ้งมีประสิทธิภาพในการคงความมีชีวิตและการเพิ่มจำนวนของไฟโบรบลาสต์เอ็นยิดปริทันต์ได้ดี⁽⁸⁾ และยังมีผลต่อกระบวนการสร้าง-สลายกระดูกเช่นกัน โดยพบว่านมผึ้งมีผลต่อการเพิ่มจำนวนและการทำงานของสารอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (Alkaline phosphatase) ในเซลล์กระดูกเป็นผลทำให้เกิดการกระตุ้นให้สร้างกระดูกได้ในโรคปริทันต์อักเสบหรือโรคอื่นๆ ที่พบการทำลายกระดูก^(14, 15) นอกจากนี้นมผึ้งยังมีโปรตีน Major royal jelly protein 3 ที่สามารถต้านการอักเสบโดยยับยั้งการสร้างสารตั้งต้นการอักเสบ (Proinflammatory cytokine) ได้ทั้ง Tumor necrosis factor- α (TNF- α), Interleukin-6 (IL-6) และ Interleukin-1 (IL-1) โดยยับยั้ง TNF- α ได้มากที่สุด⁽¹⁶⁾ ซึ่ง TNF- α เป็นหนึ่งในปัจจัยที่ทำให้เกิดการพัฒนาของเซลล์ออสติโอคลาสต์ (Osteoclast differentiation)⁽¹⁷⁾

จากการที่นมผึ้งมีองค์ประกอบเป็นสารที่น่าจะมีประสิทธิภาพในการกดการสร้างเซลล์ออสติโอคลาสต์ได้ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยครั้งนี้คือเพื่อศึกษาผลของสารละลายนมผึ้งที่ความเข้มข้นต่างๆต่อการเกิดเซลล์ออสติโอคลาสต์และการทำหน้าที่สร้างหลุมการละลายของ

เซลล์ออสติโอคลาสท์ในสภาวะจำลองการหลุดของฟันออกจากเบ้า ข้อมูลที่ได้จากการศึกษา
สามารถนำไปใช้ในการพัฒนานมผึ้งเป็นสารละลายตัวกลางต่อไป

ความมุ่งหมายของงานวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้ตั้งความมุ่งหมายไว้ดังนี้

1. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของนมผึ้งต่อการลดจำนวนของเซลล์ออสติโอคลาสท์ใน
สภาวะจำลองการหลุดของฟันออกจากเบ้า
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของนมผึ้งต่อการทำหน้าที่ของเซลล์ออสติโอคลาสท์ที่
เกิดขึ้นในสภาวะจำลองการหลุดของฟันออกจากเบ้า

ความสำคัญของงานวิจัย

ผลที่ได้จากการศึกษาทำให้ทราบประสิทธิภาพของนมผึ้งที่ความเข้มข้นต่างๆต่อจำนวน
และการทำหน้าที่ของเซลล์ออสติโอคลาสท์ ซึ่งจะส่งผลต่อความสามารถของนมผึ้งในการลดการ
เกิดกระบวนการละลายรากฟันที่เป็นภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรงและพบได้บ่อยหลังการใส่ฟันกลับ
เข้าสู่กระดูกเบ้าฟันเดิม ซึ่งผลจากการทดสอบนี้จะทำให้ได้ข้อมูลที่สามารถนำไปพัฒนานมผึ้งให้
เป็นสารละลายตัวกลางที่ดีต่อไปได้

ขอบเขตของการวิจัย

ประชากรที่ใช้ในการวิจัย

เซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นดอทีทนต์ของมนุษย์
แมคโครฟาจเซลล์ไลน์ RAW 264.7 ที่ผ่านการคัดแยกมาจากหนู

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

การเลี้ยงร่วมระหว่างเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นดอทีทนต์และแมคโครฟาจเซลล์ไลน์
RAW 264.7 ที่เพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ที่มีการฉาบพื้นผิวด้วยสารสังเคราะห์เลียนแบบกระดูก
(Osteo Assay)

ตัวแปรที่ศึกษา

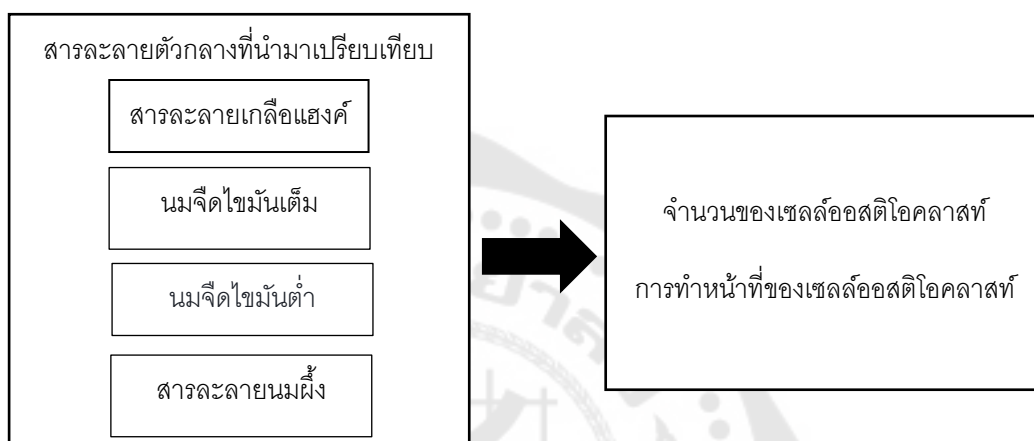
1. ตัวแปรอิสระ แบ่งเป็นดังนี้
 - 1.1 สารละลายเกลือแอสค์
 - 1.2 นมจืดไขมันเต็ม
 - 1.3 นมจืดไขมันต่ำ
 - 1.3 สารละลายนมผึ้งที่ความเข้มข้นต่างๆ

2. ตัวแปรตาม ได้แก่

2.1 จำนวนของเซลล์ออสติโอคลาสต์

2.2 การทำงานของเซลล์ออสติโอคลาสต์ในการสร้างหลุมการละลาย

กรอบแนวคิดวิจัย



ภาพประกอบ 1 กรอบแนวคิดวิจัย

สมมติฐานในการวิจัย

นมผงมีประสิทธิภาพในการลดจำนวนและการทำงานที่ของเซลล์ออสติโอคลาสต์ ในสภาวะจำลองการหลุดของฟันออกจากเบ้า

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และได้นำเสนอตามหัวข้อต่อไปนี้

1. การจัดการฟันแท้ที่หลุดออกจากกระดูกเบ้าฟัน และภาวะแทรกซ้อนหลังการรักษา
2. กลไกการเกิดรากฟันละลายหลังจากการใส่ฟันกลับเข้าสู่กระดูกเบ้าฟัน
3. บทบาทของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นไนด์ปริทันต์ต่อกระบวนการเจริญและพัฒนาของเซลล์สลายกระดูก (Osteoclastogenesis)
4. สารละลายตัวกลางและบทบาทในกระบวนการละลายของรากฟัน
5. สารละลายนมผง
6. การประเมินการเกิดขึ้นของเซลล์ออสติโอคลาสต์
7. การประเมินการทำหน้าที่ของเซลล์ออสติโอคลาสต์

การจัดการฟันแท้ที่หลุดออกจากกระดูกเบ้าฟัน และภาวะแทรกซ้อนหลังการรักษา

ฟันแท้ที่หลุดจากกระดูกเบ้าฟันพบได้ประมาณ 0.5-3% ของการบาดเจ็บของฟันจากการเกิดอุบัติเหตุ โดยส่วนมากพบในเด็กอายุประมาณ 7-10 ปี ในฟันที่ปลายรากฟันยังไม่ปิด^(10, 18, 19) ฟันแท้ที่หลุดจากกระดูกเบ้าฟันจะทำให้เกิดการทำลายส่วนประกอบต่างๆ ของฟันและอวัยวะข้างเคียง เช่น เอ็นยึดปริทันต์ เคลือบรากฟัน เนื้อเยื่อเหงือก โพรงประสาทฟัน ระบบเลือดและระบบประสาทฉีกขาด เซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นไนด์ปริทันต์ถูกทำลาย ซึ่งล้วนมีความสำคัญต่อความสำเร็จในการรักษา^(6, 10) การรักษาควมมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นไนด์ปริทันต์นั้นควรนำฟันกลับเข้าสู่กระดูกเบ้าฟันให้เร็วที่สุด โดยจับบริเวณตัวฟันและหลีกเลี่ยงการจับบริเวณรากฟัน ถ้าฟันมีสิ่งสกปรกติดอยู่ให้ล้างผ่านนม น้ำเกลือ หรือน้ำลายของคนไข้เบาๆ จากนั้นจึงสามารถใส่ฟันกลับเข้าที่ได้โดยต้องกีดผ้าไว้ให้ฟันคงตำแหน่งเดิม แต่ในทางปฏิบัติแล้วเราไม่สามารถนำฟันกลับเข้าสู่กระดูกเบ้าฟันได้ทันทีด้วยปัจจัยต่างๆ เช่น สถานที่ ความรุนแรงในการเกิดอุบัติเหตุ รวมถึงความรู้และสภาพจิตใจของผู้ประสบอุบัติเหตุ เราจึงควรนำฟันใส่ไว้ในสารละลายตัวกลางที่เหมาะสมที่หาได้ในบริเวณที่เกิดอุบัติเหตุแทนเช่น นม สารละลายเกลือแอสก์ น้ำลาย (บ้วนออกมาใส่ภาชนะไว้) หรือน้ำเกลือ โดยอย่าปล่อยให้ฟันแห้งเพื่อคงสภาพควมมีชีวิตของฟันเอาไว้ และรีบพบทันตแพทย์ให้เร็วที่สุด⁽³⁾

การรักษาฟันแท้ที่หลุดจากกระดูกเบ้าฟันส่วนใหญ่มีภาวะแทรกซ้อนและการพยากรณ์ของโรคไม่ดีนัก นอกจากการถูกทำลายของฟันและเนื้อเยื่อรอบฟันที่เป็นสาเหตุสำคัญแล้ว ยังมีปัจจัยทั้งภายนอกและภายในอื่น ๆ อีกเช่น สภาพปัจจุบันของฟันแท้ที่หลุดจากกระดูกเบ้าฟัน ระดับการเจริญเติบโตของรากฟัน สภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นไคดปริทันต์ ระยะเวลาของฟันที่อยู่ภายนอกช่องปาก สารละลายตัวกลางที่ใช้ก่อนนำฟันใส่กลับเข้ากระดูกเบ้าฟันเดิม วิธีการรักษาที่เลือกใช้หลังนำฟันกลับเข้ากระดูกเบ้าฟัน ชนิดของการยึดฟัน และระยะเวลาในการยึดฟัน ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ล้วนมีผลต่อความสำเร็จในการรักษาทั้งสิ้น ซึ่งเมื่อเกิดเหตุการณ์ที่ไม่สามารถแช่ฟันในสารละลายตัวกลางก่อนนำฟันกลับเข้ากระดูกเบ้าฟันเดิมได้ จะทำให้เกิดการตายของไฟโบรบลาสต์เอ็นไคดปริทันต์ที่ติดอยู่กับรากฟันบางส่วนหรือทั้งหมด ส่งผลให้เกิดภาวะแทรกซ้อนภายหลังการรักษาไปแล้วเป็นระยะเวลาหลายเดือนหรือเป็นปี โดยปัญหาที่พบได้บ่อยคือ โพรงประสาทฟันตาย คลองรากฟันตีบ การละลายรากฟันจากกระบวนการอักเสบ (Inflammatory root resorption) และภาวะฟันยึดแข็ง (Ankylosis)^(10, 20, 21)

จากที่กล่าวมาข้างต้นการนำฟันกลับเข้าสู่กระดูกเบ้าฟันทันทีเป็นไปได้ยาก เนื่องจากมีหลายปัจจัยที่เกิดขึ้นขณะเกิดอุบัติเหตุ ส่งผลต่อความสำเร็จในการรักษาในระยะยาว ดังนั้นการแช่ฟันในสารละลายตัวกลางที่สามารถรักษาความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นไคดปริทันต์ไว้ได้ก่อนมารับการรักษาจึงเป็นสิ่งสำคัญ ซึ่งสารละลายตัวกลางที่เหมาะสมจะมีความสามารถในการลดผลกระทบการทำลายเนื้อเยื่อที่ฉีกรากฟันและช่วยทำให้มีการพยากรณ์โรคที่ดีขึ้น⁽²²⁾

กลไกการเกิดรากฟันละลายหลังจากการใส่ฟันกลับเข้าสู่กระดูกเบ้าฟัน

การเกิดรากฟันละลายเป็นปัญหาแทรกซ้อนที่รุนแรงหลังจากการใส่ฟันกลับเข้ากระดูกเบ้าฟันเดิม และมักเกิดทั้งแบบละลายจากภายในและจากภายนอก การละลายรากฟันจากภายในเกิดจากกระบวนการอักเสบภายในโพรงประสาทฟันทำให้เกิดการสูญเสียเนื้อฟันและเคลือบรากฟันไปด้วย การละลายรากฟันจากภายในนี้จำเป็นที่จะต้องได้รับการรักษารากฟันทันที ส่วนการละลายรากฟันจากภายนอกจะเกิดขึ้นได้บ่อยกว่า แบ่งออกได้เป็น 3 ประเภท⁽²³⁾ ได้แก่

1. การละลายรากฟันแบบแทนที่ (Replacement root resorption) หรือภาวะฟันยึดแข็ง เป็นประเภทที่พบได้บ่อยที่สุด มักเกิดขึ้นจากเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นไคดปริทันต์ตายและมีกระบวนการสลายกระดูกโดยเซลล์ออสติโอคลาสต์และสร้างกระดูกขึ้นบริเวณนั้นโดยเซลล์ออสติโอบลาสต์ ผลสุดท้ายจะเกิดการเชื่อมกันระหว่างฟันและกระดูกรอบรากฟัน การละลายรากฟันแบบแทนที่นั้นถือเป็นการละลายที่ไม่พึงประสงค์มากที่สุด^(23, 24)

2. การละลายรากฟันจากกระบวนการอักเสบ (Inflammatory root resorption) เป็นประเภทที่พบได้รองลงมาจากแบบแรก บริเวณที่เกิดขึ้นจะมีลักษณะเหมือนถูกกัดกร่อน ซึ่งอาจทำให้เกิดการติดเชื้อและโพรงประสาทฟันตายได้

3. การละลายรากฟันที่ผิวฟัน (Surface root resorption) จัดเป็นการหายของเนื้อเยื่อปริทันต์ที่ดีประเภทหนึ่ง⁽²³⁾ กล่าวคือเซลล์คลาสท์สามารถหยุดการละลายรากฟันด้วยตัวเองและเซลล์ไฟโบรบลาสท์เอ็นไยด์ปริทันต์สามารถส่งเสริมการซ่อมแซมบริเวณนั้นได้อีกด้วย⁽²⁴⁾

การดำเนินไปของการละลายรากฟันแบบแทนที่จะขึ้นอยู่กับระดับความเสียหายของเนื้อเยื่อปริทันต์ขณะที่เกิดอุบัติเหตุและความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสท์เอ็นไยด์ปริทันต์ที่เหลืออยู่บนรากฟันนั้น แตกต่างจากการละลายรากฟันจากกระบวนการอักเสบ ซึ่งจะขึ้นอยู่กับระดับความเสียหายของเนื้อเยื่อปริทันต์และแบคทีเรียที่พบในโพรงประสาทฟันและท่อเนื้อฟัน⁽²⁵⁾

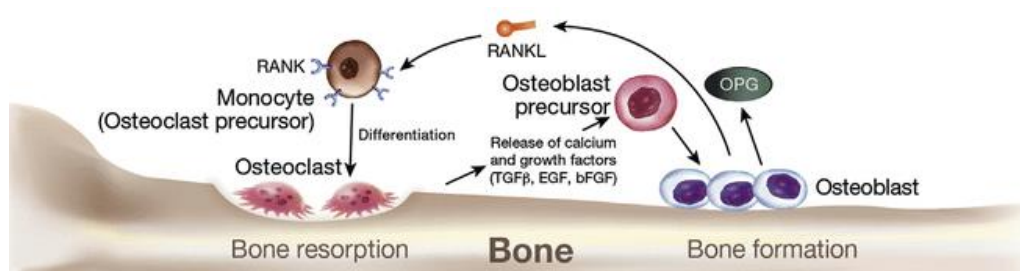
รากฟันละลายเกิดขึ้นได้จาก 2 สาเหตุคือ สาเหตุทางกายภาพ เช่น การหลุดของฟันน้ำนม และสาเหตุจากพยาธิสภาพซึ่งเกี่ยวข้องกับปัจจัยเฉพาะที่และปัจจัยทางระบบ เช่น การประสบอุบัติเหตุ การจัดฟัน การหลุดของฟันน้ำนมที่ผิดปกติ และการขยายขนาดของก้อนเนื้อและถุงน้ำ⁽²⁶⁾ เป็นผลทำให้เกิดการสูญเสียของเนื้อเยื่อแข็งคือ เนื้อฟัน เคลือบรากฟัน และกระดูกบ้ำฟัน กระบวนการเกิดการละลายของรากฟันจากทั้ง 2 สาเหตุเกิดขึ้นเมื่อมีการทำปฏิกริยากันระหว่างเซลล์อักเสบ เซลล์สร้าง-สลายกระดูก และเนื้อเยื่อแข็งของฟัน โดยถ้าเนื้อเยื่อแข็งถูกทำลายหรือมีแรงมากระทำจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีภายในเนื้อเยื่อและเกิดเซลล์ขนาดใหญ่หลายนิวเคลียส (Multinucleated giant cell) ซึ่งเซลล์นี้จะไปทำให้เกิดกระบวนการละลายรากฟันขึ้น⁽²⁷⁾

กระบวนการสร้าง-สลายกระดูก เป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับเซลล์ออสติโอเบลาสต์และเซลล์ออสติโอคลาสท์ ซึ่งถูกควบคุมโดยเอนไซม์ ฮอร์โมน และระบบ RANK/RANKL/OPG ดังภาพประกอบ 2 โดยมีหน้าที่หลักๆ ดังนี้

1. RANK (Receptor activator of nuclear factor-kB) เป็นตัวรับที่อยู่บนผิวของเซลล์ที่จะกลายเป็นเซลล์ออสติโอคลาสท์ เช่น แมคโครฟาจ และโมโนไซต์ เป็นต้น เมื่อมีการเชื่อมต่อกันของ RANK/RANKL จะทำให้เกิดการกระตุ้นให้เซลล์เจริญไปเป็นเซลล์ออสติโอคลาสท์

2. RANKL (Receptor activator of nuclear factor-kB ligand) ผ ล ิ ต ม า จ า ก เซลล์ออสติโอเบลาสต์ เมื่อไปเชื่อมต่อกับ RANK แล้ว จะสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้าง การรวมตัว การพัฒนา และการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ออสติโอคลาสท์

3. OPG (Osteoprotegerin) ทำหน้าที่หลักในการยับยั้งไม่ให้เซลล์เจริญไปเป็นเซลล์ออสติโอคลาสต์ ยับยั้งการทำงานและกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์ออสติโอคลาสต์ โดยการขัดขวางการเชื่อมต่อของ RANK/RANKL⁽²⁷⁾



ภาพประกอบ 2 แสดงระบบ RANK/RANKL/OPG

ที่ ม ๑ : E. David Crawford. (2017) . The potential role of follicle-stimulating hormone in the cardiovascular, metabolic, skeletal and cognitive effects associated with androgen deprivative therapy p. 6.

ตาราง 1 เซลล์ของเนื้อเยื่อฟันที่พบการแสดงออกของ RANK/RANKL/OPG

ยีน	เซลล์ที่พบการแสดงออกของยีน
RANK	ออสติโอคลาสต์ โอดอนโตคลาสต์ เดนติโนคลาสต์ ซีเมนโตคลาสต์ โมโนไซต์ และแมคโครฟาจ
RANKL	ออสติโอเบลาสต์ โอดอนโตบลาสต์ ซีเมนโตบลาสต์ เซลล์โพรงประสาทฟัน (Dental pulp cells) และไฟโบรบลาสต์เอ็นไดยีปริทันต์
OPG	ออสติโอเบลาสต์ โอดอนโตบลาสต์ อะมีโลบลาสต์ (Ameloblast) และเซลล์โพรงประสาทฟัน

หากมีการทำลายหรือรบกวนต่อกระดูก เนื้อฟัน และผิวรากฟัน จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีภายในเนื้อเยื่อนั้นๆ ส่งผลให้มีการสร้างเซลล์หลายนิวเคลียสขึ้นนั้นก็คือ เซลล์คลาสท์ (Clast cell) เช่น ออสติโอคลาสท์ โอดอนโตคลาสท์ เดนติโนคลาสท์ และซีเมนโตคลาสท์ ซึ่งเซลล์คลาสท์เหล่านี้ทำให้เกิดกระบวนการละลายของเนื้อเยื่อแข็งขึ้น จากตาราง 1 จะเห็นได้ว่าสามารถพบเซลล์ต่างๆของเนื้อเยื่อฟันที่เกี่ยวข้องกับระบบ RANK/RANKL/OPG ตามพื้นที่ที่เกิดการละลาย เช่น ซีเมนโตบลาสท์พบเฉพาะที่บริเวณผิวรากฟัน^(27, 28) เป็นต้น

เมื่อมีการเชื่อมต่อกันของ RANK/RANKL แล้ว จากภาพประกอบ 3 โครงสร้างภายในของเซลล์ออสติโอคลาสท์จะเปลี่ยนแปลงพร้อมที่จะละลายกระดูก เริ่มมีการสร้างรอยต่อของเซลล์ (Tight junction) ระหว่างผิวกระดูกและฐานของเนื้อเยื่อ (Basal membrane) มีลักษณะขรุขระ ยื่นออก และเว้าเข้าคล้ายนิ้วมือ (Ruffled border) เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวและเกิดเป็นบริเวณปิด (Sealing zone) ขึ้น จากนั้นเซลล์ออสติโอคลาสท์จะหลั่งกรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid) เพื่อสลายสารอินทรีย์ ผ่าน Vacuolar ATPase (V-ATPase a3) และทำการแลกเปลี่ยนคลอไรด์ผ่าน Chloride-proton antiporter (ClC-7) และหลั่งโปรตีเอส (Proteases) เช่น Cathepsin K (CATK) และ Matrix metalloproteinase (MMP) เข้าไปในหลุมการละลาย เพื่อสลายสารอินทรีย์ เอนไซม์จะสลายกระดูกและปล่อยสารต่างๆที่สลายออกนอกหลุมการละลาย เพื่อไปกระตุ้นการสร้างกระดูกต่อไป^(29, 30)

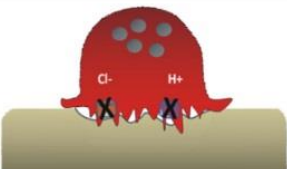
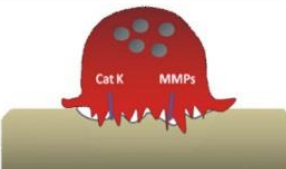
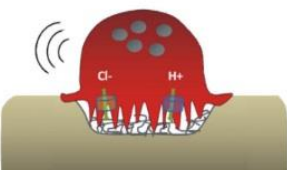
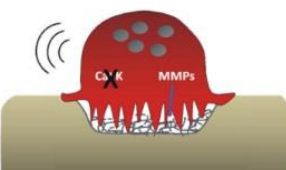


ภาพประกอบ 3 การเกิดการละลายกระดูก

ที่มา: Boyle WJ. (2003). Osteoclast differentiation and activation p. 339.

เซลล์ออสติโอคลาสท์ที่เกิดขึ้นอาจมีการสูญเสียการทำงานในการละลายกระดูกได้ เนื่องจากเซลล์ออสติโอคลาสท์มีลักษณะที่ปรากฏ (Phenotype) แตกต่างกันไป ยกตัวอย่างเช่น เซลล์ออสติโอคลาสท์ที่ถูกยับยั้งไม่ให้เกิดการหลั่งกรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid) จาก

การสูญเสียการทำงานบริเวณ V-ATPase a3 หรือ CIC-7 ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคถ่ายทอดทางพันธุกรรมอย่างหนึ่ง คือโรคกระดูกหนา (Autosomal recessive osteopetrosis) ได้ หรือการขาด CATK ไปทำให้เกิดโรคทางพันธุกรรมที่มีมวลกระดูกหนาแน่นแต่กระดูกเปราะ (Pycnodysostosis) มีการศึกษาเพื่อประเมินผลจากการยับยั้งการทำงานของเซลล์ออสติโอคลาสต์โดยดูจากรูปร่างของหลุมการละลาย โดยยับยั้งการหลั่งกรดและยับยั้ง CATK พบว่าการยับยั้งการหลั่งกรดมีผลต่อการละลายทั้งสารอินทรีย์และอนินทรีย์ แต่ยังเกิดหลุมการละลายขึ้นได้ แต่ถ้ายับยั้ง CATK จะทำให้เกิดการละลายของสารอนินทรีย์ ในขณะที่การละลายของสารอินทรีย์จะถูกยับยั้งอย่างเต็มประสิทธิภาพ หลุมการละลายที่เกิดขึ้นจะพบสารอินทรีย์ที่ไม่ละลายอยู่⁽³⁰⁾ ดังภาพประกอบ 4

	Dissolution of inorganic matrix by acidification	Dissolution of organic matrix by proteolysis	Resulting pit
Normal Resorption			
Inhibition of acidification			
Inhibition of cathepsin K			

ภาพประกอบ 4 แสดงหลุมการละลายของเซลล์ออสติโอคลาสต์ทั้งในภาวะปกติและการยับยั้งการหลั่งกรดและ CATK

ที่มา : Neutzsky-Wulff. (2010). Alterations in osteoclast function and phenotype induced by different inhibitors of bone resorption-implications for osteoclast quality p. 10.

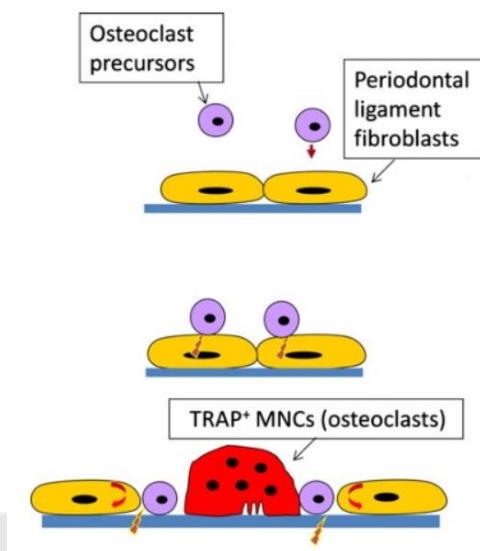
บทบาทของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยิดปริทันต์ต่อกระบวนการเจริญและพัฒนาของเซลล์สลายกระดูก

นอกเหนือจากปฏิกิริยาระหว่างเซลล์ออสติโอคลาสต์และเซลล์ออสติโอเบลาสต์แล้ว เซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยิดปริทันต์ก็มีส่วนในกระบวนการเจริญและพัฒนาของเซลล์ออสติโอคลาสต์เช่นกัน เซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยิดปริทันต์มีลักษณะหัวท้ายปลายเรียวแหลมและยาว มีต้นกำเนิดมาจากเนื้อเยื่อเอกโตมีเซนไคมอล (Ectomesenchymal tissue) จากถุงหุ้มหน่อฟัน เซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยิดปริทันต์เป็นตัวเชื่อมระหว่างผิวเคลือบรากฟันและกระดูกขากรรไกรบน ในภาวะอักเสบเรื้อรังอย่างเช่นในโรคปริทันต์ เซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยิดปริทันต์จะเปลี่ยนลักษณะที่ปรากฏออกมา (Phenotype) โดยการส่งเสริมการตอบสนองการทำลายของเนื้อเยื่อ (Tissue-destructive responses) มีผลทำให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยิดปริทันต์เกิดการหลั่งสารตั้งต้นของการอักเสบ (Proinflammatory cytokines and chemokines) จับกับตัวรับบนเซลล์ที่จะกลายเป็นเซลล์ออสติโอคลาสต์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ออสติโอคลาสต์ได้ โดยมีขั้นตอนตามลำดับดังนี้

1. เซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยิดปริทันต์จะเลือกและดึงดูดเซลล์ที่จะกลายเป็นเซลล์ออสติโอคลาสต์ก่อน จากนั้นจะสร้างโมเลกุลที่ใช้ในการยึดเกาะของเซลล์ (Cell-cell adhesion molecules) เช่น Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) เป็นต้น เพื่อจับกันไว้ โดยมีการศึกษาของ Bloemen et al ได้ทำการเลี้ยงร่วมระหว่างเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยิดปริทันต์และเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยว (Peripheral blood mononuclear cells) เมื่อทำการวัดระดับ mRNA ของโมเลกุลการยึดเกาะ (Adhesion molecule) พบว่าระดับ mRNA ของ ICAM-1 เพิ่มขึ้น 10 เท่า⁽³¹⁾

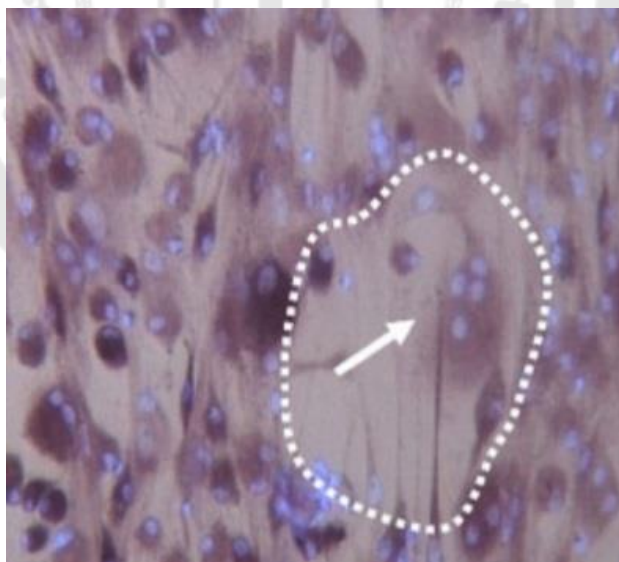
2. หลังจากที่เซลล์จับกันแล้วเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยิดปริทันต์จะสร้างโปรตีนที่มีผลต่อการเจริญและพัฒนาของเซลล์สลายกระดูก (Osteoclastogenesis-stimulatory signalling molecules) เช่น Macrophage-colony stimulating factor (M-CSF), Tumor necrosis factor- α (TNF- α) และ RANKL เป็นต้น⁽³¹⁾ เซลล์ที่จะกลายเป็นเซลล์ออสติโอคลาสต์จึงมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่ Tartrate resistant acid phosphatase positive (TRAP+)

3. จากนั้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยิดปริทันต์มีการหดตัวและแยกออกจากกันเกิดช่องว่างขึ้นที่พื้นผิวจานเลี้ยง เซลล์ TRAP+ ได้มีการเคลื่อนย้ายมาที่บริเวณนั้น และรวมตัวกันจนกลายเป็นเซลล์หลายนิวเคลียส TRAP+ ซึ่งคือเซลล์ออสติโอคลาสต์^(9, 31, 32) ดังภาพประกอบ 5 และ



ภาพประกอบ 5 ขั้นตอนการเกิดเซลล์ออสติโอคลาสต์จากปฏิกิริยาเซลล์และเซลล์

ที่ มา : Sokos D. (2015). Role of periodontal ligament fibroblasts in osteoclastogenesis: a review p. 153.



ภาพประกอบ 6 การหดตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยี่ดปรันต์ทำให้เกิดพื้นที่ว่าง (เส้นประ) และการเกิดการรวมตัวกันของเซลล์ TRAP+ (ลูกศรสีขาว)

ที่ มา : Veerle B. (2011). IL-1 β favors osteoclastogenesis via supporting human periodontal ligament fibroblasts p. 1895.

อย่างไรก็ตามแม้การรวมตัวกันของโมโนไซต์ (Monocyte) หรือเซลล์ต้นกำเนิดแมคโครฟาจ (Macrophage lineage) ทำให้เกิดเซลล์ขนาดใหญ่หลายนิวเคลียสขึ้นแต่อาจไม่ได้เป็นเซลล์ออสติโอคลาสท์เสมอไป นอกเหนือจากเซลล์ออสติโอคลาสท์ยังมีเซลล์ขนาดใหญ่หลายนิวเคลียสชนิดอื่นเช่น Langhans giant cell และ Foreign-body giant cell (FBGCs) ซึ่งสามารถแยกแยะเซลล์เหล่านี้ได้ตามการเรียงตัว ส่วนประกอบของเซลล์และการทำหน้าที่ของมัน^(33, 34) ความแตกต่างระหว่างเซลล์ออสติโอคลาสท์และเซลล์ขนาดใหญ่หลายนิวเคลียสอื่นๆ แยกได้ด้วยการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ (Cell surface marker) เช่น การแสดงออกของ TRAP โดยจะพบการแสดงออกของโมเลกุล TRAP บนผิวเซลล์ออสติโอคลาสท์มากกว่าเซลล์ขนาดใหญ่หลายนิวเคลียสอื่นๆ เป็นต้น⁽³⁵⁾ รายละเอียดแสดงตามตาราง 2 ดังนั้นการจำแนกเซลล์ขนาดใหญ่หลายนิวเคลียสนั้นจึงไม่สามารถดูเพียงรูปร่างได้ แต่ต้องมีการดูการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์และหน้าที่ของเซลล์ด้วย โดยมีการศึกษาของ Harkel et al ที่ทำการเปรียบเทียบการละลายกระดูก การเกิดขึ้นของวงแอกติน และการสร้าง Ruffled border ของเซลล์ออสติโอคลาสท์และ FBGCs โดยพบว่า FBGCs มีขนาดและรูปร่างของวงแอกตินและสร้างบริเวณปิดได้เหมือนเซลล์ออสติโอคลาสท์แต่จะไม่สามารถสร้าง Ruffled border ได้ ซึ่งเป็นเหตุให้ FBGCs ไม่สามารถละลายเนื้อเยื่อกระดูกได้แต่สามารถละลายแร่ธาตุบนผิวกระดูกได้ซึ่งแตกต่างจากเซลล์ออสติโอคลาสท์⁽³⁶⁾

ตาราง 2 การแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ออสติโอคลาสท์และเซลล์ขนาดใหญ่หลายนิวเคลียส (+ คือมีการแสดงออก +++ คือมีการแสดงออกมาก - คือไม่มีการแสดงออก +/- คือบางการศึกษาที่มีการแสดงออกแต่บางการศึกษาไม่พบการแสดงออก)

การแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ (Cell surface marker)	การแสดงออกของเซลล์ออสติโอคลาสท์	การแสดงออกของเซลล์ขนาดใหญ่หลายนิวเคลียส
TRAP	+++	+
RANK	+++	-
Cathepsin K	+++	+/-

สารละลายตัวกลางและบทบาทในกระบวนการละลายของรากฟัน

สารละลายตัวกลางคือของเหลวที่มีไว้แช่ฟันที่หลุดออกจากเบ้าฟัน คุณสมบัติของสารละลายตัวกลางที่ดีจะช่วยให้การคงสภาพการมีชีวิตและหน้าที่ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นไดยด์ปริทันต์ไว้ รวมถึงคงความมีชีวิตของเซลล์โพรงประสาทฟันด้วย โดยคุณสมบัติที่เหมาะสม ได้แก่ มีสารที่มีลักษณะจำเพาะต่อการรอดชีวิตของเซลล์ มีความเข้มข้นออสโมลาริตีและมีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับในร่างกาย มีสารต้านอนุมูลอิสระ มีปริมาณของแบคทีเรียต่ำหรือไม่มีเลย มีสารอาหารต่างๆที่เหมาะสม ไม่กระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี มีความสามารถในการต้านทานจุลชีพ ควรหาและใช้งานได้ง่ายในสถานการณ์ฉุกเฉิน ราคาถูก และมีอายุการใช้งานนาน^(8, 10, 21, 22) ในปัจจุบันนมและสารละลายเกลือแองค์เป็นสารละลายตัวกลางที่ International Association of Dental Traumatology (IADT) แนะนำให้ใช้ โดยถ้าแช่ฟันในสารละลายเหล่านี้เป็นเวลาน้อยกว่า 60 นาที จะทำให้คงความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นไดยด์ปริทันต์ไว้ได้บางส่วน⁽³⁾

สารละลายเกลือแองค์ (Hank's balanced salt solution (HBSS)) เป็นสารละลายที่พัฒนามาเพื่อรักษาสภาพเซลล์และเนื้อเยื่อได้นานถึง 24 ชั่วโมง มีสารเมแทบอลิต์และน้ำตาลกลูโคสที่จำเป็นต่อเซลล์ มีความเข้มข้นออสโมลาริตี 280 มิลลิออสโมล/กิโลกรัม และค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.4 ถือเป็นคุณสมบัติในอุดมคติ สารละลายเกลือแองค์ช่วยให้เซลล์เจริญเติบโต และสามารถคงสภาพการมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นไดยด์ปริทันต์ได้หลายชั่วโมง โดยถ้าแช่ฟันในสารละลายเกลือแองค์เป็นเวลา 30 นาที จะมีอัตราความสำเร็จสูงถึง 90% ประสิทธิภาพของสารละลายเกลือแองค์ในการคงความมีชีวิตและการเพิ่มจำนวนของเซลล์นั้นอยู่ในระดับที่ดีมาก อย่างไรก็ตามการใช้งานสารละลายเกลือแองค์ให้เกิดประสิทธิภาพที่ดีนั้น จะเหมาะกับการเตรียมเพื่อใช้ทันทีในห้องปฏิบัติการที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งนำมาประยุกต์ใช้ได้ยากในสภาพแวดล้อมที่เกิดอุบัติเหตุ ต่อมาจึงมีการผลิตสารละลายตัวกลางที่มีส่วนประกอบหลักคือสารละลายเกลือแองค์ที่มีชื่อผลิตภัณฑ์ทางการค้าว่า Save-A-Tooth® เป็นชุดเครื่องมือที่ออกแบบมาเพื่อใช้ในการเก็บรักษาฟันที่หลุดออกมาจากกระดูกเบ้าฟันโดยเฉพาะ แต่ประสิทธิภาพการใช้งานยังต่ำกว่าสารละลายเกลือแองค์แบบมาตรฐาน (ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ) แม้ว่าสารละลายเกลือแองค์จะมีคุณสมบัติที่ดีมาก แต่ด้วยข้อจำกัดของการนำมาใช้งานและราคาที่แพง ทำให้ไม่ได้รับการใช้งานอย่างแพร่หลายในชีวิตประจำวัน^(4, 8, 11, 22)

เมื่อสารละลายเกลือแองค์หาใช้งานได้ยาก สารละลายที่แนะนำตัวต่อมาก็คือนม เนื่องจากมีความเข้มข้นออสโมลาริตี 270 มิลลิออสโมล/กิโลกรัม และค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.5-

7.2 ซึ่งเป็นค่าที่เหมาะสมต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นไยด์ปริทันต์ ไม่มีแบคทีเรียหรือมีจำนวนน้อย มีโกรทแฟคเตอร์และสารอาหารที่จำเป็นต่อเซลล์ มีกรดอะมิโนและวิตามินที่ทำหน้าที่ยับยั้งเอนไซม์ที่จะมาทำลายเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นไยด์ปริทันต์ในระดับเซลล์นั้นนมถือว่ามีประสิทธิภาพในการคงความมีชีวิตของเซลล์และการแบ่งจำนวนเพิ่มเซลล์ใกล้เคียงกับสารละลายเกลือแองค์⁽¹¹⁾ มีการศึกษาพบว่านมเหมาะแก่การเป็นสารละลายตัวกลางระยะสั้นเมื่อเทียบกับสารละลายเกลือแองค์ โดยที่นมสามารถรักษาความมีชีวิตของเซลล์ได้แค่ 2 ชั่วโมงแตกต่างจากสารละลายเกลือแองค์ที่สามารถแช่ฟื้นไว้ได้นานถึง 96 ชั่วโมง⁽¹²⁾ นอกจากนี้ข้อดีของนมที่กล่าวมาแล้วยังมีการศึกษาที่พบว่าปริมาณแคลเซียมที่สูงในนมสามารถไปกระตุ้นการเปลี่ยนสภาพของเซลล์ต้นกำเนิดไฟโบรบลาสต์เอ็นไยด์ปริทันต์ให้กลายเป็นเซลล์สร้างกระดูกได้ และมีการศึกษาเกี่ยวกับการละลายของกระดูกแสดงให้เห็นว่าระดับแคลเซียมที่สูงสามารถไปยับยั้งการทำงานของเซลล์ออสติโอคลาสต์ได้อีกด้วย⁽⁶⁾ อย่างไรก็ตามนมแต่ละชนิดมีประสิทธิภาพที่แตกต่างกัน จากหลายการศึกษาพบว่า การแช่ฟื้นในนมที่มีอุณหภูมิต่ำหรือในนมจืดไขมันต่ำเป็นตัวเลือกที่ดีในการรักษา และนมควรมีความสดใหม่ด้วย ในปัจจุบันมีการนำผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติมากมายมาศึกษาเพื่อพัฒนาเป็นสารละลายตัวกลางที่ใช้ในการแช่ฟื้น แต่ด้วยที่นมมีราคาถูก มีสารอาหารมากมาย และหาได้ทั่วไป ทำให้นมถูกเลือกมาใช้ในการชีวิตประจำวันมากกว่าสารละลายตัวกลางอื่น⁽⁵⁾

ส่วนผลิตภัณฑ์ตามธรรมชาติอื่นๆ ที่ใช้เป็นสารละลายตัวกลางได้แก่ พรอพโพลิส (Propolis) น้ำมะพร้าว ไข่ขาว และเจลวุ้นหางจระเข้ ซึ่งสารละลายตัวกลางเหล่านี้สามารถรักษาความมีชีวิตของเซลล์ไว้ได้ รวมถึงหาได้ง่าย ไม่แพง และมีอายุการใช้งานนาน^(4, 5, 37) มีการศึกษาของ Babaji et al ที่ศึกษาความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นไยด์ปริทันต์ในสารละลายเกลือแองค์ พรอพโพลิส เจลวุ้นหางจระเข้ และน้ำทับทิม พบว่าพรอพโพลิสสามารถคงความมีชีวิตของเซลล์ไว้ได้มากที่สุด รองลงมาคือ สารละลายเกลือแองค์ เจลวุ้นหางจระเข้ และน้ำทับทิม ตามลำดับ ผลการศึกษานี้สนับสนุนความเป็นไปได้ที่จะนำผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติทั้ง 3 ชนิดมาเป็นสารละลายตัวกลางได้⁽¹⁰⁾ และยังมีการศึกษาที่นำฟันของหนูแช่ในไข่ขาว สารละลายเกลือแองค์และนม หลังจากนำฟันกลับเข้าสู่กระดูกบัพพบที่ชั้นของเนื้อเยื่อเอ็นไยด์ปริทันต์ในกลุ่มไข่ขาวมีความหนาแน่นมากกว่ากลุ่มที่แช่ในสารละลายเกลือแองค์และนมตามลำดับ อีกทั้งยังไม่พบการเกิดฟันยึดแข็งอีกด้วยเมื่อเทียบกับกลุ่มสารละลายเกลือแองค์และนม⁽³⁷⁾

อย่างไรก็ตามการศึกษาค้นคว้าของสารละลายตัวกลางเหล่านี้ต่อกระบวนการละลายของรากฟันยังมียังจำกัด โดยมีการศึกษาที่ทดลองในห้องปฏิบัติการได้ทำการเลี้ยงร่วมระหว่างเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นไยด์ปริทันต์และแมคโครฟาจเซลล์ไลน์ของหนู RAW 264.7 เพื่อเปรียบเทียบผลของ

การเจริญและการพัฒนาของเซลล์สลายกระดูก (Osteoclastogenesis) ในสารละลายเกลือแอสค์และนม พบว่ามีจำนวนเซลล์หลายนิวเคลียส TRAP+ มากขึ้นในเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอนไนด์ปริทันต์ที่แช่ในนม 6 ชั่วโมง ซึ่งมากกว่าสารละลายเกลือแอสค์อย่างมีนัยสำคัญ⁽¹³⁾ และมีการศึกษาที่ทำการทดลองในสิ่งมีชีวิตในการเปรียบเทียบสารละลายตัวกลางต่างๆ ในกระบวนการละลายของรากฟัน Dos Santos et al พบว่าเมื่อนำฟันของหนูที่แช่ในนมจืดไขมันเต็มและนมผงละลายน้ำเป็นเวลา 60 นาที และนำกลับเข้าสู่กระดูกเบ้าฟัน พบการละลายรากฟันในกลุ่มนมจืดไขมันเต็ม 38% และกลุ่มนมผงละลายน้ำ 28%⁽¹²⁾ นอกจากนี้ Trope et al ยังทำการเปรียบเทียบสารละลายเกลือแอสค์ นม และสารละลาย Viaspan เพื่อดูกระบวนการหายของเยื่อปริทันต์ และกระบวนการละลายรากฟันหลังการนำฟันกลับเข้าสู่กระดูกเบ้าฟันเดิมในสุนัข พบว่าเมื่อแช่ฟันในสารละลายเกลือแอสค์นาน 36, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง พบว่าที่ 36 ชั่วโมงจะเริ่มพบการเกิดการละลายรากฟันแบบแทนที่ 21.91% แต่ไม่พบการละลายรากฟันจากกระบวนการอักเสบ เมื่อแช่ฟันในนม 6, 12, 24 และ 36 ชั่วโมง พบว่าที่ 6 ชั่วโมงจะเริ่มพบการเกิดการละลายรากฟันแบบแทนที่ 1.28% และการละลายรากฟันจากกระบวนการอักเสบ 11.14% และเมื่อแช่ในสารละลาย Viaspan พบว่ามีอัตราการละลายรากฟันแบบแทนที่ 26.11%, 33.33% และ 26.07% ในช่วงเวลา 24, 36 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ และการละลายรากฟันจากกระบวนการอักเสบจะพบในช่วงเวลา 48 ชั่วโมง จากการศึกษาข้างต้นนี้จะเห็นได้ว่าสารละลายเกลือแอสค์ยังคงมีประสิทธิภาพสูงสุดเมื่อเทียบกับสารละลายชนิดอื่นที่ทดสอบ⁽²⁵⁾

ตาราง 3 ตัวอย่างการศึกษาสารละลายตัวกลางชนิดต่างๆ

Study model	Media tested	Method of assessment	Recommended media	Authors, ref No
In vitro (PDLF)	HBSS SK RJ100 RJ500 RJ900	Cell viability, Cell proliferation	SK, RJ	Sricholpech et al ⁽⁸⁾

ตาราง 3 (ต่อ)

Study model	Media tested	Method of assessment	Recommended media	Authors, ref No
In vitro (PDLF)	SK HBSS Tap water	Cell viability, Osteogenic differentiation	SK	Wang et al ⁽³⁸⁾
In vitro (PDLF)	HBSS Propolis Aloe vera Pomegranate juice	Cell viability	Propolis, Aloe vera, Pomegranate juice	Babaji et al ⁽¹⁰⁾
In vitro (PDLF)	HBSS WM SK Almond milk	Cell viability, Cell proliferation, Collagen matrix analysis	SK	Sinpreechanon et al ⁽³⁹⁾
In vitro (PDLF)	HBSS Propolis	Apoptosis assay, Cell proliferation	Propolis	Gjertsen et al ⁽⁴⁰⁾
In vitro (PDLF)	HBSS WM	Cell viability, Immunofluorescence analysis	HBSS, WM	Bag et al ⁽⁶⁾
In vitro (PBMCs)	Propolis	Osteoclast formation, Actin ring formation, rPCR, Resorption pit assay	Propolis	Wimolsantirungsri et al ⁽⁷⁾
In vitro (PDLF, RAW 264.7)	HBSS WM α -MEM	Osteoclast formation, rPCR	HBSS	Zhan et al ⁽¹³⁾

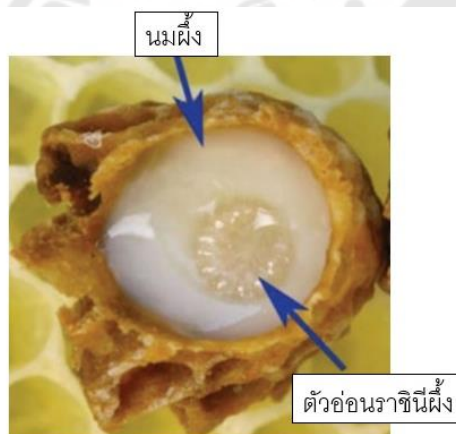
ตาราง 3 (ต่อ)

Study model	Media tested	Method of assessment	Recommended media	Authors, ref No
In vivo (Rat)	Propolis WM	Microscopic analysis	Propolis	Mori et al ⁽⁴¹⁾
In vivo (Rat)	HBSS WM Egg white	Radiographic, Histological and immunohistochemical methods	Egg white	Hasan et al ⁽⁴²⁾
In vivo (Rat)	Sweet whey WM	Histological and histomorphometric analyses	WM	Correa et al ⁽⁴³⁾
In vivo (Rat)	Powdered milk WM	Histomorphological analysis	Powdered milk, WM	Santos et al ⁽¹²⁾
In vivo (Dog)	Viaspan WM HBSS	Histological analysis	Viaspan, HBSS	Trope et al ⁽²⁵⁾

สารละลายนมผึ้ง

นมผึ้งเป็นผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติจากผึ้ง สกัดจากต่อมไฮโปฟาริงและต่อมแมนดินูล่าของผึ้งงาน (*Apis mellifera*) มีลักษณะสีเหลืองขาวขุ่นหนืด นมผึ้งถือว่าเป็น Superfood สำหรับการเจริญเติบโตของราชินีผึ้ง (ภาพประกอบ 7) ซึ่ง Superfood นี้ทำให้ราชินีผึ้งมีขนาดใหญ่กว่าผึ้งงานทั่วไป 2 เท่า มีระบบสืบพันธุ์ที่ดีและอายุยืนยาวกว่าผึ้งตัวอื่นๆ (ประมาณ 5-6 ปี) นมผึ้งประกอบด้วยน้ำ (50-60%) โปรตีน (18%) น้ำตาล (15%) ไขมัน (3-6%) เกลือแร่ (1.5%) วิตามินต่างๆ เช่น Riboflavin (วิตามิน B2), Thiamin (วิตามิน B1), Niacin (วิตามิน B3), Folic acid, Biotin และ Pyridoxine และยังมีส่วนประกอบของวิตามิน C, D, A และ E ในปริมาณเล็กน้อย รวมถึงกรดอะมิโนและแร่ธาตุต่างๆอีกด้วย นอกจากนี้ยังมีกรดไขมัน 10-Hydroxy-2-Decenoic

acid (10H2DA) ที่มีคุณสมบัติช่วยส่งเสริมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน (Immunomodulatory properties)^(8, 14, 44-46) ซึ่งจากการวิเคราะห์โปรตีนในนมผึ้งพบว่ากว่า 80% เป็น Major royal jelly proteins (MRJPs) ประกอบด้วย MRJP1-9 โดยมีสัดส่วน MRJP1 46%, MRJP2 11%, MRJP3 13% และที่เหลืออีก 30%⁽⁴⁷⁾ ซึ่งแต่ละชนิดมีประโยชน์แตกต่างกัน มีการศึกษาเปรียบเทียบ MRJP1, 2 และ 3 ในประสิทธิภาพการเพิ่มจำนวนเซลล์น้ำเหลืองของมนุษย์ (Jurkat cells) และเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้เล็กของหนู (IEC-6) พบว่า MRJP1 ที่เป็นโปรตีนหลักมีประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนของเซลล์มากกว่า MRJP2 และ 3⁽⁴⁸⁾ อย่างไรก็ตามมีการศึกษาว่า Carboxyl-terminal penta-peptide repeat (TPR) ที่พบเฉพาะใน MRJP3 มีประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์ (THP-1) และเซลล์ต้นกำเนิดจากเซลล์ไตลิง (Vero cell) ได้เช่นกัน⁽⁴⁷⁾ นอกจากนี้นมผึ้งยังมีฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆอีกมากมาย เช่น ต้านจุลชีพ เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ต้านมะเร็ง สารแก้แพ้ ส่งเสริมระบบประสาท สามารถชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ จากประโยชน์มากมายของนมผึ้ง ปัจจุบันจึงนิยมนำมาทำเป็นอาหารเสริมเพื่อบริโภค⁽⁴⁶⁾ มีการศึกษาของ Fuji et al รายงานว่าเมื่อมีภาวะอักเสบระยะเฉียบพลัน (Acute phase of inflammation) จะมีการซึมผ่านของเส้นเลือดฝอยเพิ่มขึ้น ทำให้เกิดการบวมน้ำ (Edema) นมผึ้งสามารถไปยับยั้งไม่ให้เกิดการซึมผ่านของเส้นเลือดฝอยเหมือนกับยาต้านการอักเสบได้ และยังสามารถลดการสร้างเนื้อเยื่อแกรนูเลชัน (Granulation tissue) ในภาวะอักเสบระยะเรื้อรัง (Chronic phase of inflammation) ได้อีกด้วย⁽⁴⁹⁾



ภาพประกอบ 7 นมผึ้งที่อยู่รอบๆเป็นสารอาหารแก่ตัวอ่อนราชินีผึ้ง

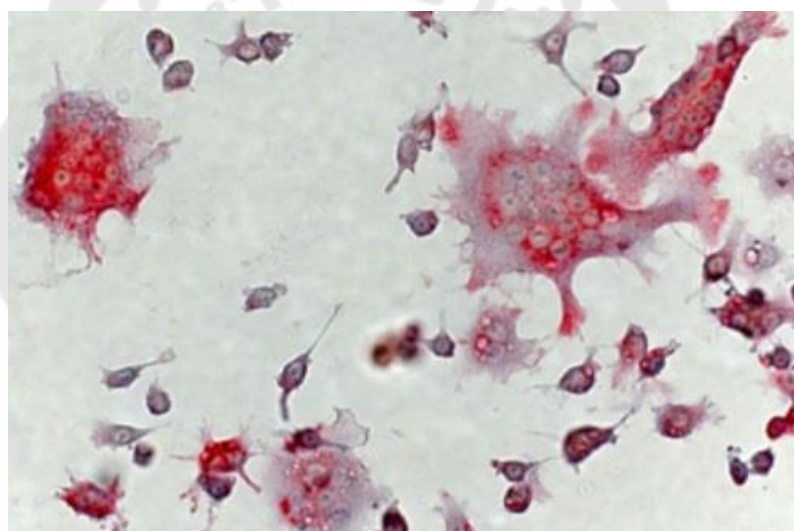
ที่ ม า : Mozafar K. (2017). New finding on biological actions and clinical applications on royal jelly: A review p. 2.

การศึกษาของ Hidaka et al พบว่านมผึ้งมีฮอร์โมนเอสโตรเจนอ่อนๆ สามารถป้องกันโรคกระดูกพรุนในหนูที่ตัดรังไข่ออกทั้งสองข้าง ซึ่งโรคกระดูกพรุนและโรคปริทันต์อักเสบมีความสอดคล้องกันในเรื่องของกลไกการสลายของกระดูก⁽⁴⁵⁾ และยังมีการศึกษาของ Narita et al พบว่านมผึ้งหรือส่วนประกอบบางอย่างในนมผึ้งสามารถกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ 1 และสามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาอื่นๆ ในกระดูกผ่านเซลล์ออสติโอคลาสต์ได้ ผลจากการศึกษานี้ทางผู้วิจัยแนะนำว่านมผึ้งสามารถนำมาผลิตเป็นอาหารเสริมตัวใหม่เพื่อป้องกันโรคกระดูกพรุนได้⁽¹⁵⁾ โดยสอดคล้องกับการศึกษาของ Dhanesuan et al ที่พบว่านมผึ้งมีผลต่อการเพิ่มจำนวนและการทำงานของสารสกัดอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในเซลล์กระดูก ซึ่งส่งผลดีต่อการกระตุ้นการสร้างกระดูกในการรักษาโรคปริทันต์อักเสบหรือโรคอื่นๆ ที่พบการทำลายกระดูก และนอกจากนี้ยังพบว่านมผึ้งที่ความเข้มข้น 100, 500 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นดอดีปรีทันต์ 116.37%, 142.17% และ 139.84% ตามลำดับ ในขณะที่นมผึ้งที่ความเข้มข้น 5000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลทำให้มีปริมาณเซลล์ลดลงเหลือ 69.03% แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของนมผึ้งที่มากเกินไปจะมีผลต่อการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นดอดีปรีทันต์⁽¹⁴⁾ ส่วนในการศึกษาที่นำสารละลายนมผึ้งมาทดสอบคุณสมบัติการเป็นสารละลายตัวกลางในการแช่ฟันยังมึ้น้อย แต่จากการสืบค้นงานวิจัยพบว่าการศึกษาที่กำลังรอพิจารณาตีพิมพ์ของ Sricholpech et al มีการนำสารละลายนมผึ้งความเข้มข้นต่างๆ (100, 500 และ 900 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) สารละลายเกลือแอสก์ และนมจืดไขมันต่ำมาใช้เป็นสารละลายตัวกลางโดยทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาทีเพื่อจำลองสภาวะการหลุดของฟัน (Tooth avulsion model) และแช่สารละลายตัวกลางที่ทดสอบเป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าสารละลายนมผึ้งมีประสิทธิภาพในการคงความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นดอดีปรีทันต์ โดยเซลล์ที่ผ่านการแช่ในสารละลายนมผึ้งความเข้มข้น 900 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความสามารถในการเพิ่มจำนวน (Cell proliferation) และการเคลื่อนที่ (Cell migration) มากกว่าเซลล์ที่ผ่านการแช่สารละลายเกลือแอสก์และนมจืดไขมันต่ำ อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการศึกษาประสิทธิภาพของสารละลายนมผึ้งในเรื่องกระบวนการละลายของรากฟัน ซึ่งต้องการการศึกษาต่อไปในอนาคต

การประเมินการเกิดขึ้นของเซลล์ออสติโอคลาสต์

จากการศึกษาที่ผ่านมา มีการประเมินการเกิดขึ้นของเซลล์ออสติโอคลาสต์โดยใช้ตัวบ่งชี้จำเพาะของเซลล์ออสติโอคลาสต์ในการประเมิน รวมถึงทำการวัดการแสดงออกของยีนด้วย ตัวบ่งชี้จำเพาะของเซลล์ออสติโอคลาสต์ที่นิยมนำมาใช้ในการทดลองในห้องปฏิบัติการคือ

1. การย้อมสี TRAP เพื่อ ดู Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) activity⁽⁵⁰⁾ ภายหลังการเลี้ยงร่วมเซลล์ในจานเลี้ยงเซลล์ขนาดต่างๆ เป็นเวลาแตกต่างกัน ประมาณ 5-21 วัน ตามด้วยย้อมสี TRAP จะเห็นการเกิดขึ้นของเซลล์หลายนิวเคลียสที่ย้อมติดสีม่วงเข้ม (TRAP+) หรือเซลล์ออสติโอคลาสท์^(9, 13, 30, 31, 51-54) โดยสามารถนับจำนวนเซลล์ออสติโอคลาสท์ผ่าน Light microscope ได้ ดังภาพประกอบ 8 และอาจมีการย้อมนิวเคลียสและโครงสร้างของเซลล์ด้วยสีเรืองแสง 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) ร่วมด้วย โดยผลที่ได้จะเห็นนิวเคลียสเป็นสีฟ้า เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอลที่ใช้เลเซอร์ในการสแกน (Confocal laser scanning microscopy)^(9, 31, 50) ผ่านกำลังขยายแตกต่างกันออกไปตั้งแต่ 20X-200X นอกจากนี้สามารถถ่ายภาพเซลล์ออสติโอคลาสท์ที่ย้อมติดสี TRAP และนำไปนับจำนวนโดยใช้โปรแกรม ImageJ ได้⁽⁵⁵⁾

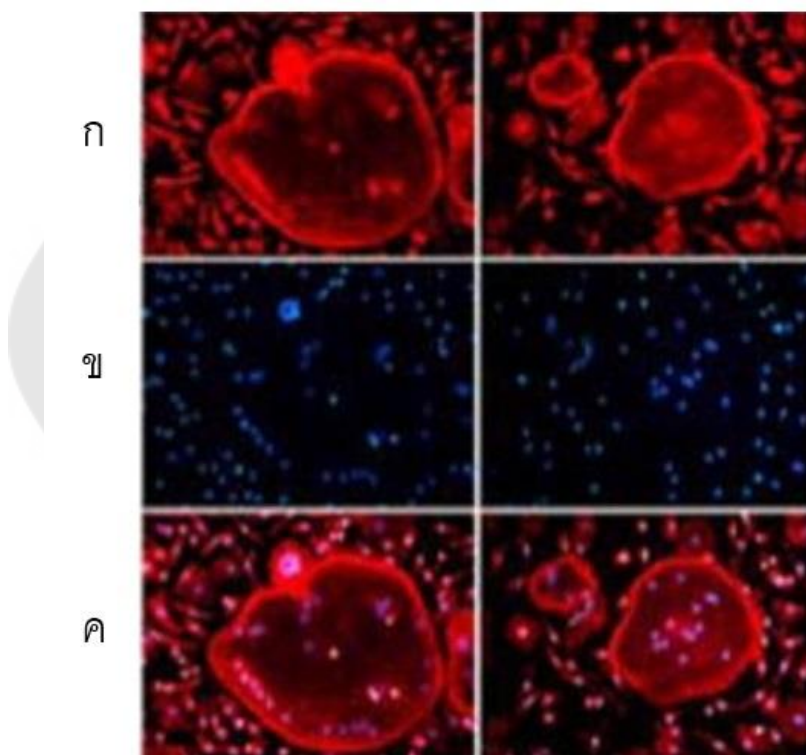


ภาพประกอบ 8 เซลล์หลายนิวเคลียส TRAP+ ที่ผ่านการย้อมสี TRAP

ที่มา: Stefan Lossdorfer. (2011). PTH (1-34)-induced changes in RANKL and OPG expression by human PDL cells modify osteoclast biology in a co-culture model with RAW 264.7 cells p. 945.

2. การตรวจวงแหวนแอกติน (F-actin ring) เป็นการอธิบายลักษณะของเซลล์ออสติโอคลาสท์ได้โดยดูจากการเกิดของวงแหวนฟิลาเมนต์ภายในเซลล์ในบริเวณที่ปิดสนิท (Sealing zone) ทำการฟิक्सเซลล์และทำให้เซลล์เป็นสภาพซึมผ่านได้ (Permeabilized cell) ด้วย 0.5% Triton X100 ใน PBS 5 นาที จากนั้นย้อมด้วย FITC- หรือ TRITC- labelled Phalloidin 0.5

ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และทิ้งไว้ในตู้อบที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที สามารถทำการนับจำนวนวงแหวนแอกตินผ่านกล้องฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence microscopy) หรือกล้องจุลทรรศน์ (Confocal microscopy) อีกทั้งยังสามารถย้อมนิวเคลียสและโครงสร้างของเซลล์ด้วยสีเรืองแสง DAPI รวมด้วยได้⁽⁵⁶⁾ ดังภาพประกอบ 9 วิธีนี้นอกจากจะสามารถนับจำนวนเซลล์ออสติโอคลาสต์แล้วยังสามารถดูหลุมการละลายได้อีกด้วย ซึ่งวงแหวนแอกตินเป็นตัวแบ่งเนื้อกระดูก (Bone matrix) ออกจากพื้นที่นอกเซลล์ (Extracellular space) เมื่อวงแหวนแอกตินแนบไปกับกระดูกก็จะสามารถปิดหลุมการละลายให้แน่นสนิท (Sealing zone) เพื่อรักษาสภาพความเป็นกรดในหลุมการละลายไม่ให้รั่วไหลออกไปสู่ภายนอก^(57, 58)



ภาพประกอบ 9 ภาพวงแหวนแอกติน (ก) ย้อมด้วยสี Rhodamine phalloidin (ข) ย้อมนิวเคลียสด้วยสีเรืองแสง DAPI (ค) เมื่อนำภาพ ก และ ข มารวมเข้าด้วยกัน

ที่ ม ๑ : Shengmei Feng. (2009). Atp6v1c1 is an essential component of the osteoclast proton pump and in F-actin ring formation in osteoclasts p. 201.

3. การวัดการแสดงออกของยีน โดยการศึกษาร่วมใหญ่ นิยมใช้วิธี Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) ซึ่ง Messenger RNA (mRNA) marker สำหรับการสังเคราะห์โปรตีนที่สัมพันธ์กับเซลล์ออสติโอคลาสต์มีหลายตัวเช่น Cathepsin-K, Calcitonin receptor (CTR), Matrix metalloproteinases-9 (MMP-9), Carbonic anhydrase (CA) II, Vacuolar H⁺-ATPase (v-ATPase), Vitronectin receptor (VNR), Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), Osteopontin (OPN), Galectin-3, C-fos และ C-fms เป็นต้น^(59, 60)

การประเมินการทำหน้าที่ของเซลล์ออสติโอคลาสต์

มีการศึกษาต่อเนื่องเพื่อประเมินการทำหน้าที่ของเซลล์ออสติโอคลาสต์ โดยการเลี้ยงร่วม เซลล์บนผิววัสดุชีวภาพ (Biomaterial surfaces) ที่ต่างกันออกไปเช่น สารกระดูกแคลเซียมฟอสเฟต (Calcium phosphate bone cement) แผ่นเนื้อฟัน (Dentin slice)⁽⁵⁰⁾ แผ่นกระดูกชนิดเนื้อแน่นของวัว (Cortical bovine bone slice)⁽³⁰⁾ เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีผลิตภัณฑ์ทางการค้าที่สังเคราะห์สารเลียนแบบกระดูกเช่น สารผลึกอนินทรีย์แคลเซียมฟอสเฟต (Inorganic crystalline calcium phosphate) นำมาฉาบลงบนจานเลี้ยงเซลล์ (Osteo Assay)⁽⁶¹⁾ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาแล้ว และสามารถนำมาใช้ได้ทันทีอีกด้วย จากนั้นทำการศึกษาน้ำที่ของเซลล์ออสติโอคลาสต์โดยมีการศึกษาที่ทำวิธีการต่างๆกันออกไป ดังนี้

1. วิเคราะห์หลุมการละลายโดยการย้อมด้วยสี ทำการกำจัดเซลล์ออสติโอคลาสต์ออก และย้อมด้วยสี เช่น Mayer's hematoxylin⁽³⁰⁾, Coomassie Brilliant blue^(31, 36), Peroxidase-conjugated WGA-lectin⁽⁶²⁾, Toluidine blue⁽⁶³⁾ และ Modified Von Kossa^(53, 64) (ภาพประกอบ 10) เป็นต้น นำมาวิเคราะห์ผลผ่าน Light microscope หรือ Darkfield microscope⁽⁵³⁾ วิเคราะห์พื้นที่หลุมการละลายผ่านโปรแกรม ImageJ^(55, 65) หรือ CAST-Grid⁽³⁰⁾

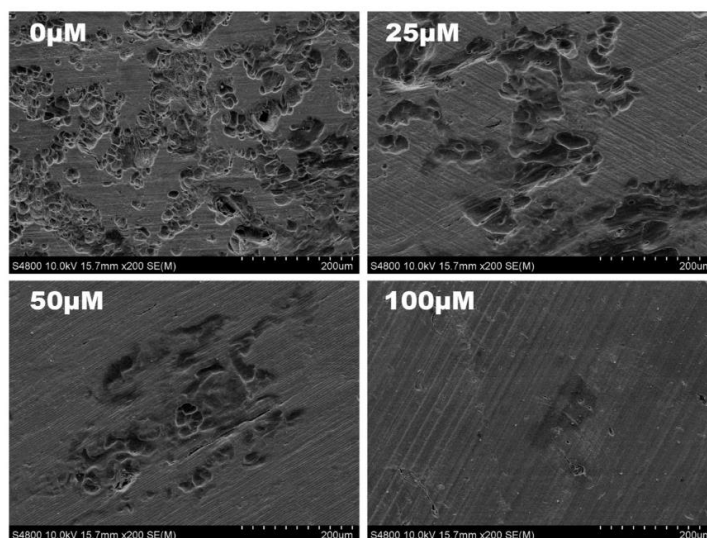


ภาพประกอบ 10 ภาพพื้นที่หลุมการละลาย (เส้นประ) ที่ย้อมด้วยสี Von Kossa

ที่มา: Ruth Tevlin. (2014). Osteoclast Derivation from Mouse Bone Marrow p. 4.

2. การวัดการหลั่งแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) และค่าความเป็นกรด-ด่างภายในเซลล์ ซึ่งเซลล์ออสติโอคลาสท์ที่สามารถทำหน้าที่ละลายกระดูกได้ต้องมีค่าแคลเซียมไอออนต่ำและมีความเป็นกรด จึงสามารถทำการศึกษได้โดยการประเมินความเข้มข้นของแคลเซียมไอออนในอาหารเลี้ยงเซลล์ออสติโอคลาสท์ เริ่มต้นโดยการทำการละลายที่ต้องการทดสอบให้เป็นกรดและแยกแคลเซียมออกจากโปรตีนด้วยการใช้ Cresolphthalein complexone (CPC) จากนั้นเติม 8-Hydroxyquinolone ไปเพื่อเป็นการกำจัดแมกนีเซียมออก วิธีนี้จะทำให้แคลเซียมไอออนเกิดสารประกอบเชิงซ้อนสีม่วง สามารถนำไปวัดค่าดูดกลืนแสง (Colorimetry) ได้ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร⁽⁶⁶⁾ นอกจากนี้มีการศึกษาที่วัดแคลเซียมไอออนในเซลล์โดยใช้วิธี Fura-2-acetoxymethyl ester (Fura-2AM) fluorescence ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น (Excitation wavelengths) 340 และ 380 นาโนเมตร^(67, 68) และวัดค่าความเป็นกรด-ด่างภายในเซลล์โดยใช้ความยาวคลื่นกระตุ้น 495 และ 440 นาโนเมตร เมื่อได้ผลมาจะทำเป็นสัดส่วนค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340:380 และ 495:440 และแปลผลเป็นความเข้มข้นของแคลเซียมและค่าความเป็นกรด-ด่างภายในเซลล์ตามลำดับ⁽⁶⁷⁾

3. การวัดหลุมการละลายโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscopy (SEM))⁽⁶⁵⁾ และนำไปประเมินพื้นที่ผ่านโปรแกรม ImageJ (ภาพประกอบ 11)



ภาพประกอบ 11 ภาพหลุมการละลายผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscopy (SEM))

ที่มา : Wengang Wang. (2014). The Inhibition of RANKL-Induced Osteoclastogenesis through the Suppression of p38 Signaling Pathway by Naringenin and Attenuation of Titanium-Particle-Induced Osteolysis p. 21918.

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ดำเนินงานตามขั้นตอนดังนี้

1. การกำหนดประชากรและเลือกกลุ่มตัวอย่าง
2. ขั้นตอนการทดลอง
3. การเก็บรวบรวมข้อมูล
4. สถิติที่ใช้ในการทดลองข้อมูล

การกำหนดกลุ่มประชากรและเลือกกลุ่มตัวอย่าง

ประชากร

เซลล์ไฟโบร بلاสท์เอ็นไยด์ปริทันต์ที่ผ่านการคัดแยกมาจากเนื้อเยื่อเอ็นไยด์ปริทันต์จากผิวรากฟันของผู้ยินยอมตนและเก็บไว้ในคลังเก็บเซลล์ ซึ่งได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์มาแล้ว (มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เลขที่ SWUEC-451/2561X)

แมคโครฟาจเซลล์ไลน์ของหนู RAW 264.7

การเลือกกลุ่มตัวอย่าง

เลือกเซลล์ไฟโบร بلاสท์เอ็นไยด์ปริทันต์จากคลังเก็บเซลล์ในไนโตรเจนเหลว โดยเลือกเซลล์ที่เพาะเลี้ยงอยู่ในรุ่นที่ 3-8 ที่ไม่สามารถระบุตัวตนของผู้ยินยอมตนและมีการบันทึกเลขรุ่นของการขยายจำนวนอย่างชัดเจน เซลล์ในคลังเก็บนี้ถูกคัดแยกจากเนื้อเยื่อปริทันต์บริเวณผิวรากของฟันที่ถอนจากผู้ป่วยในคลินิกศัลยศาสตร์ช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ โดยได้รับความยินยอมจากผู้ป่วยและผ่านการอนุมัติจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์จากการศึกษาก่อนหน้าของผู้วิจัย โดยใช้ฟันกรามน้อยหรือฟันกรามซี่ที่สามที่ไม่มีพยาธิสภาพแต่มีความจำเป็นต้องถอนตามแผนการรักษาทางทันตกรรมอยู่แล้ว

แมคโครฟาจเซลล์ไลน์ของหนู RAW 264.7 (ได้รับการอนุเคราะห์จาก รศ.ทพญ.ดร. สมหญิง พัฒนวีรพงศ์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์)

ขั้นตอนการทดลอง

การเพาะเลี้ยงเซลล์

นำเซลล์ไฟโบร بلاสท์เอ็นไยด์ปริทันต์จากคลังมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's modified Eagle's medium alpha (DMEM/HIGH, HyClone™) ที่เติม 10% Fetal bovine serum (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), L-Glutamine 2 มิลลิโมลาร์ (Invitrogen),

Penicillin 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร, Streptomycin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Amphotericin B 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Invitrogen) และเลี้ยงในตู้บัพที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ 3 วันต่อครั้ง

แมคโครฟาจเซลล์ไลน์ของหนู RAW 264.7 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Modified Eagle's medium alpha (MEM Alpha Modification, HyClone™) ที่เติม 10% Fetal bovine serum (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), L-Glutamine 2 มิลลิโมลาร์ (Invitrogen), Penicillin 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร, Streptomycin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Amphotericin B 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Invitrogen) และเลี้ยงในตู้บัพที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ 3 วันต่อครั้ง

สารละลายตัวกลาง

สารละลายตัวกลางทั้งหมดที่นำมาทดสอบมี 6 ชนิดคือ สารละลายเกลื่อแอสก์ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), นมจืดไขมันเต็ม (Foremost, Bangkok, Thailand), นมจืดไขมันต่ำ (Foremost, Bangkok, Thailand), สารละลายนมผง 100, 500 และ 900 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สำหรับสารละลายนมผง ทำการเตรียมโดยใช้แคปซูลนมผงแช่แข็ง (ฟาร์มสุภา จังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย) ละลายด้วยสารละลายเกลื่อแอสก์ เริ่มต้นด้วยความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นนำไปปั่นแยกตะกอนโดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็ว 9660 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และนำเฉพาะส่วนใสเหนือตะกอนมากรองด้วย Syringe filtration ขนาด 0.20 ไมโครเมตร (Minisart®, Sartorius stedim, Germany) วัดความเข้มข้นของโปรตีนในสารสกัดนมผงด้วยวิธี Bradford assay ตามด้วยการแบ่งใส่หลอดทดลองพลาสติกในปริมาณที่เพียงพอต่อการทดลอง 1 ครั้ง และเก็บไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เมื่อจะทำการทดลองนำไปละลายในสารละลายเกลื่อแอสก์ให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ โดยไม่มีการใช้ซ้ำ

การจำลองสภาวะของฟันที่หลุดออกจากบ้าและการเลี้ยงร่วมระหว่างเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยิดปริทันต์กับแมคโครฟาจเซลล์ไลน์ของหนู RAW 264.7

นำเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยิดปริทันต์มาหว่านลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบปกติ 24 หลุม และจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ที่มีการฉาบพื้นผิวด้วยผลึกสารอนินทรีย์แคลเซียมฟอสเฟต (Inorganic crystalline calcium phosphate) (Osteo Assay Surface Multiwell plate, Corning) จำนวน 2.5×10^4 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ในตู้บัพที่มี

คาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง จากนั้นในกลุ่มทดลองดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกทั้งหมดเพื่อจำลองสภาวะของพื้นที่หลุดออกจากเบ้าทิ้งไว้ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และทำการเติมสารละลายตัวกลางชนิดต่างๆที่เตรียมไว้คือ 1. สารละลายเกลือเฮกซ์ (HBSS) 2. นมจืดไขมันเต็ม (WM) 3. นมจืดไขมันต่ำ (SK) 4. สารละลายนมผง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (RJ100) 5. สารละลายนมผง 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (RJ500) 6. สารละลายนมผง 900 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (RJ900) ชนิดละ 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง โดยกลุ่มควบคุมจะไม่ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก และล้างเซลล์ด้วย PBS 2 ครั้ง จากนั้นนำแมคโครฟาจเซลล์ไลน์ของหนู RAW 264.7 จำนวน 5×10^4 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร มาหว่านลงบนเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นอีบีทีทีนส์ ทำการเลี้ยงร่วมเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ α -MEM เป็นเวลา 12 วัน เพื่อวิเคราะห์การเกิดขึ้นของเซลล์ออสติโอคลาสต์

การประเมินการเกิดขึ้นของเซลล์ออสติโอคลาสต์

เมื่อทำการเลี้ยงร่วมระหว่างเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นอีบีทีทีนส์ที่ผ่านการจำลองสภาวะของพื้นที่หลุดออกจากเบ้ากับแมคโครฟาจเซลล์ไลน์ของหนู RAW 264.7 เป็นเวลา 12 วันแล้ว จะทำการวิเคราะห์จำนวนเซลล์ออสติโอคลาสต์ โดยทำการฟิक्सเซลล์ด้วย 3% Formaldehyde ใน Citrate buffer และ Acetone จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น และย้อม TRAP ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้เฉพาะในการเกิดออสติโอคลาสต์ โดยใช้ Leukocyte acid phosphatase kit (386-A; Sigma) ทิ้งไว้ในตู้เย็นที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายภาพด้วย Light microscope (Motic® BA310E, Spain) เซลล์ที่ติดสี TRAP จะมีสีม่วงเข้ม และมีหลายนิวเคลียส (มากกว่าหรือเท่ากับ 3 นิวเคลียส) ทำการนับจำนวนแบบสุ่มในห้าบริเวณในจานเลี้ยง ผ่าน Light microscope ผ่านกำลังขยาย 100X แสดงข้อมูลเป็นเปอร์เซ็นต์กลุ่มควบคุม (%Control)

การประเมินการทำหน้าที่ของเซลล์ออสติโอคลาสต์

เมื่อวิเคราะห์จำนวนเซลล์ออสติโอคลาสต์ได้แล้ว จะทำการประเมินการเกิดหลุมการละลาย (Resorption pit) ในจานเลี้ยง Osteo Assay โดยการกำจัดเซลล์ออกทั้งหมดด้วยสารละลาย 50% Sodium hypochlorite ทิ้งไว้ 10 นาที และล้างด้วย PBS 4 ครั้ง ทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นถ่ายภาพด้วย Light microscope (Motic® AE2000, Spain) ผ่านกำลังขยาย 200X และทำการสุ่ม 20 บริเวณเพื่อนำมาวิเคราะห์พื้นที่หลุมการละลายโดยใช้โปรแกรม ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA) โดยคำนวณพื้นที่ที่มีการละลายหายไปของผลิตภัณฑ์รีแคลเซียมฟอสเฟต เป็นเปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ทั้งหมด และแสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย (Mean) $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

การเก็บรวบรวมข้อมูล

1. ประเมินจำนวนเซลล์ออสติโอคลาสท์ โดยการนับจำนวนผ่าน Light microscope
2. ประเมินหลุมการละลายที่สร้างโดยเซลล์ออสติโอคลาสท์ ถ่ายภาพด้วยกล้อง Light microscope เพื่อนำมาวิเคราะห์พื้นที่หลุมการละลายผ่านโปรแกรม ImageJ

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

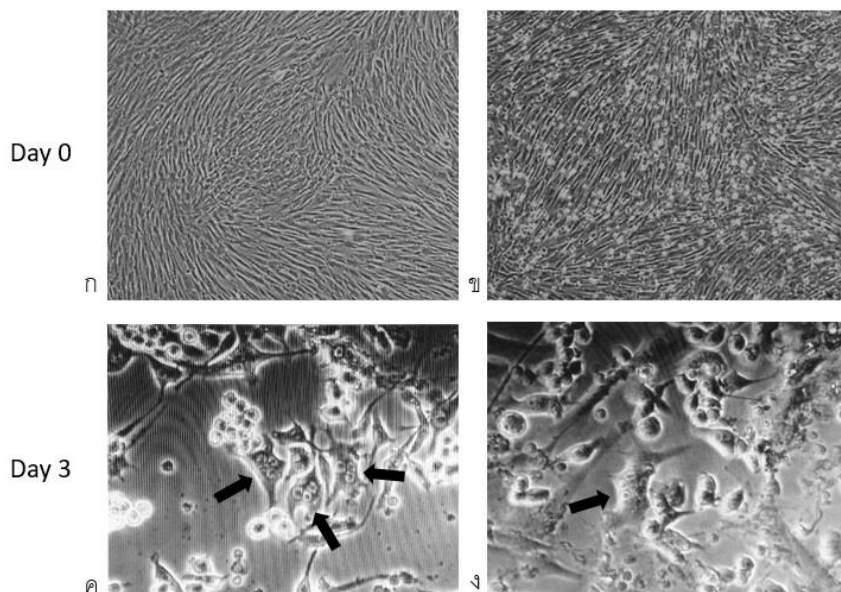
การทดลองเปรียบเทียบความแตกต่างของการเกิดขึ้นของเซลล์ออสติโอคลาสท์และหลุมการละลาย จะถูกประเมินด้วยสถิติ Kruskal-Wallis ตามด้วย Dunn's multiple comparison post test ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism version 8.3.1 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California USA) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ออสติโอคลาสท์และพื้นที่หลุมการละลายด้วยสหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน (Pearson correlation) ด้วยโปรแกรม SPSS (IBM, Armonk, NY, USA) โดยค่า $P < 0.05$ ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

บทที่ 4

ผลการดำเนินงานวิจัย

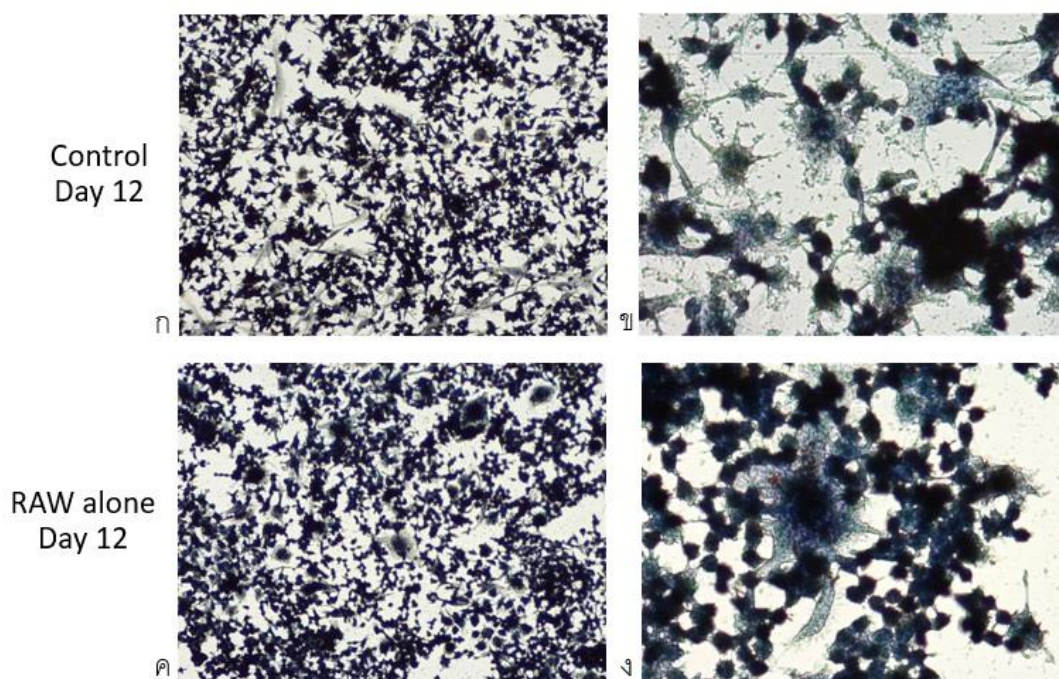
การเลี้ยงร่วมระหว่างเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นดอทีเลียลกับแมคโครฟาจเซลล์ไลน์ของหนู RAW 264.7

จากการศึกษาที่ผู้วิจัยได้ทำการเลี้ยงร่วมระหว่างเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นดอทีเลียลและแมคโครฟาจเซลล์ไลน์ของหนู RAW 264.7 (ภาพประกอบ 12ก-ข) โดยไม่ผ่านการจำลองสภาวะของพื้นที่หลุดออกจากเบ้า (กลุ่มควบคุม) ในวันที่ 3 ของการเลี้ยงร่วม ผู้วิจัยเริ่มพบการเกิดขึ้นของเซลล์ขนาดใหญ่ที่มีหลายนิวเคลียส (ภาพประกอบ 12ค-ง) ในบริเวณที่ว่างบนพื้นของจานเลี้ยงที่เกิดจากการที่เซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นดอทีเลียลที่ได้รับการหว่านลงไปก่อน เกิดการหดตัวและแยกตัวออกจากกันจนเกิดพื้นที่ว่างบนจานเลี้ยงและส่งผลให้แมคโครฟาจเซลล์ไลน์ของหนู RAW 264.7 ถูกกระตุ้นให้รวมตัวกันจนกลายเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ที่มีหลายนิวเคลียส (ภาพประกอบ 13ก-ข) หลังจากนั้นในวันที่ 12 วัน ได้ทำการย้อม TRAP และพบการเกิดเซลล์ออสติโอคลาสต์



ภาพประกอบ 12 การเลี้ยงร่วมระหว่างเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นดอทีเลียลและแมคโครฟาจเซลล์ไลน์ของหนู RAW 264.7 ในกลุ่มควบคุม (ก) เซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นดอทีเลียลในจานเลี้ยงเซลล์ (ภาพกำลังขยาย 40X) (ข) ทำการหว่านแมคโครฟาจเซลล์ไลน์ของหนู RAW 264.7 ลงไปบนเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นดอทีเลียล (ภาพกำลังขยาย 40X) (ค-ง) ภาพจากวันที่ 3 ของการเลี้ยงร่วมพบเซลล์ขนาดใหญ่ที่ภายในมีหลายนิวเคลียส (ลูกศรสีดำ) (ภาพกำลังขยาย 200X)

นอกจากนี้ทางผู้วิจัยได้ทำการเลี้ยงแมคโครฟาจเซลล์ไลน์ของหนู RAW 264.7 เดี่ยวๆ (RAW alone) เป็นเวลา 12 วัน และทำการย้อม TRAP (ภาพประกอบ 13ค-ง) พบว่าเกิดเซลล์ออกซิไดคลาสท์ขึ้น ดังนั้นแมคโครฟาจเซลล์ไลน์ของหนู RAW 264.7 ที่เลี้ยงเดี่ยวๆ สามารถกระตุ้นให้เกิดการรวมตัวกันจนกลายเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ที่มีหลายนิวเคลียสได้เช่นกัน เมื่อทำการนับจำนวนเซลล์ออกซิไดคลาสท์ทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่ม RAW alone แล้วพบว่าเซลล์ออกซิไดคลาสท์ในกลุ่ม RAW alone (153.76%) มีจำนวนมากกว่าในกลุ่มควบคุม (100%) แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพประกอบ 14)

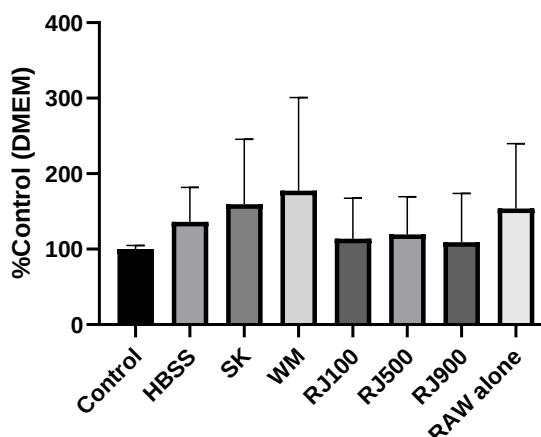


ภาพประกอบ 13 ภาพเซลล์ออกซิไดคลาสท์ (ก) ภายหลังการเลี้ยงร่วมระหว่างเซลล์ไฟโบรบลาสต์ เอ็นดอทีลียัลและแมคโครฟาจเซลล์ไลน์ของหนู RAW 264.7 เป็นเวลา 12 วัน ในกลุ่มควบคุม (ภาพกำลังขยาย 100X) (ข) เซลล์ออกซิไดคลาสท์ในกลุ่มควบคุม (ภาพกำลังขยาย 400X) (ค) ภายหลังการเลี้ยงแมคโครฟาจเซลล์ไลน์ของหนู RAW 264.7 เป็นเวลา 12 วัน ในกลุ่ม RAW alone (ภาพกำลังขยาย 100X) (ง) เซลล์ออกซิไดคลาสท์ในกลุ่ม RAW alone (ภาพกำลังขยาย 400X)

ผลการเกิดขึ้นของเซลล์ออสติโอคลาสต์ภายหลังการจำลองสภาวะของพื้นที่หลุดออกจากเบ้า

ผู้วิจัยได้ทำการจำลองสภาวะของพื้นที่หลุดออกจากเบ้าของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นดอทีเรียลเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการแช่เซลล์ไว้ในสารละลายตัวกลางชนิดต่างๆ ที่ทำการทดสอบเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และหว่านแมคโครฟาจเซลล์ไลน์ RAW 264.7 ลงไป ทำการเลี้ยงร่วมเซลล์เป็นเวลา 12 วัน จากนั้นทำการย้อม TRAP และทำการนับเซลล์ที่ติดสีม่วงเข้ม (TRAP+) และมีหลายนิวเคลียส (มากกว่าหรือเท่ากับ 3 นิวเคลียส) ในจานเลี้ยงเซลล์แต่ละหลุม โดยทำการนับจำนวนแบบสุ่มใน 5 บริเวณของจานเลี้ยง ถึงแม้จะผ่านการจำลองสภาวะของพื้นที่หลุดออกจากเบ้า เซลล์หลายนิวเคลียสที่ติดสีม่วงเข้ม (TRAP+) ที่เกิดขึ้นมีลักษณะเช่นเดียวกับเซลล์ในกลุ่มควบคุมและกลุ่ม RAW alone ดังภาพประกอบ 13

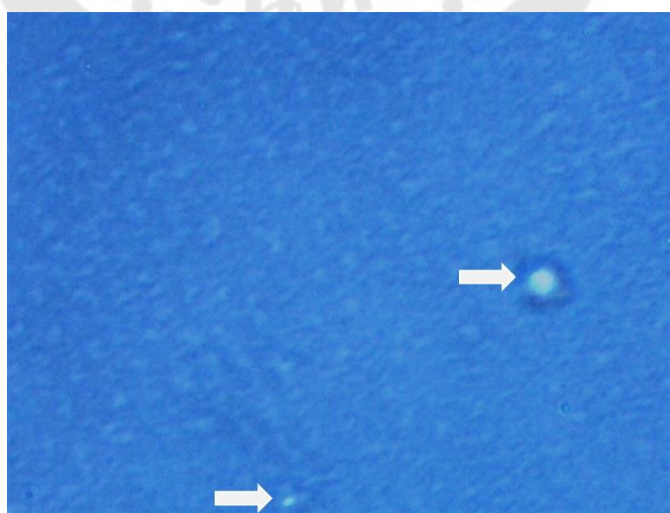
จากการทดลองทั้งหมดจำนวน 5 ชุดการทดลอง (ในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม จำนวน 2 การทดลอง และ ในจานเลี้ยง Osteo Assay จำนวน 3 การทดลอง) ดังภาพประกอบ 14 พบว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นดอทีเรียลที่ทำการจำลองสภาวะของพื้นที่หลุดออกจากเบ้าและแช่สารละลายตัวกลางชนิดต่างๆ เมื่อเลี้ยงร่วมกับแมคโครฟาจเซลล์ไลน์ของหนู RAW 264.7 แล้วสามารถทำให้เกิดเซลล์ออสติโอคลาสต์ขึ้น โดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นดอทีเรียลที่ผ่านการแช่สารละลายทุกชนิด เกิดเซลล์ออสติโอคลาสต์มากกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นดอทีเรียลที่ผ่านการแช่ RJ900 ทำให้เกิดเซลล์ออสติโอคลาสต์โดยเฉลี่ยน้อยที่สุด (109.04%) ในบรรดาสารละลายตัวกลางชนิดต่างๆ ตามด้วย RJ100 (113.85%) และ RJ500 (119.49%) ตามลำดับ ส่วนเซลล์ที่แช่ใน WM ทำให้เกิดเซลล์ออสติโอคลาสต์โดยเฉลี่ยมากที่สุด (177.53%) รองลงมาคือ SK (159.63%) และ HBSS (136.02%) จากการวิเคราะห์ทางสถิติแล้วไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ จากผลการศึกษานี้พบว่ากลุ่ม RJ มีจำนวนเซลล์ออสติโอคลาสต์โดยเฉลี่ยใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม และน้อยกว่าในกลุ่ม HBSS, SK และ WM อย่างไรก็ตามจำนวนเซลล์ออสติโอคลาสต์ที่เกิดขึ้นไม่แปรผันตรงกับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของ RJ (Dose-dependent) ในขณะที่กลุ่ม HBSS, SK และ WM มีแนวโน้มของจำนวนเซลล์ออสติโอคลาสต์โดยเฉลี่ยสูงกว่าในกลุ่มควบคุม



ภาพประกอบ 14 กราฟแท่งแสดงจำนวนเซลล์ออสติโอคลาสท์ (แสดงเป็นเปอร์เซ็นต์กลุ่มควบคุม (%Control))

การสร้างหลุมการละลาย (Resorption pit)

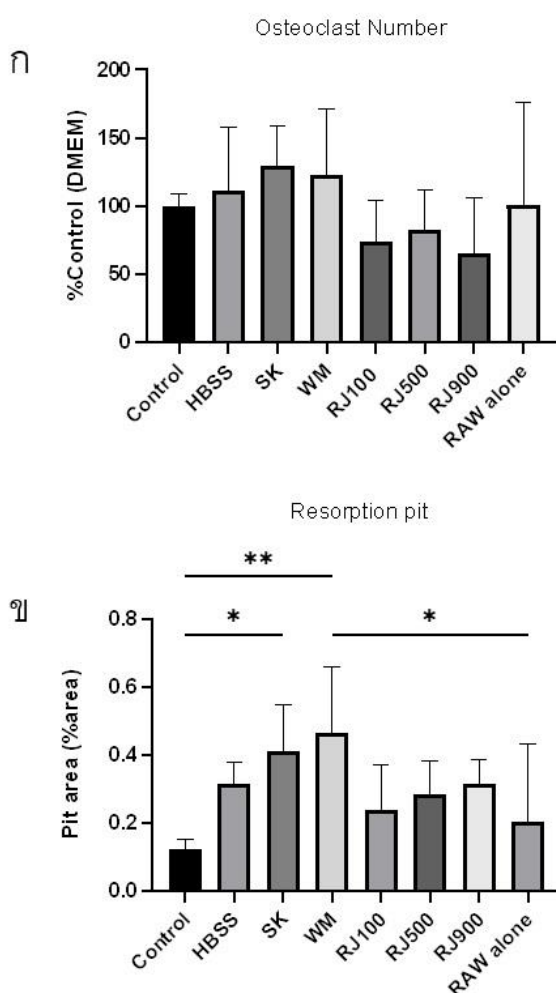
หลังจากการวิเคราะห์การเกิดขึ้นของเซลล์ออสติโอคลาสท์เรียบร้อยแล้ว จะทำการประเมินหน้าที่ของเซลล์ออสติโอคลาสท์ในจานเลี้ยง Osteo Assay โดยทำการกำจัดเซลล์ออกทั้งหมดด้วยสารละลาย 50% Sodium hypochlorite และล้างด้วย PBS จากนั้นทิ้งไว้ให้แห้ง ทำการถ่ายภาพหลุมการละลายภายใต้ Light microscope โดยการซูม 20 บริเวณ เพื่อนำมาวัดพื้นที่ที่มีการละลายหายไปของผลึกสารอนินทรีย์แคลเซียมฟอสเฟต โดยใช้โปรแกรม ImageJ ดังภาพประกอบ 15



ภาพประกอบ 15 หลุมการละลาย (ลูกศรสีขาว) บนพื้นผิวจานเลี้ยง Osteo Assay ถ่ายภาพด้วย Light microscope (ภาพกำลังขยาย 200X)

จากการทดลองใน Osteo Assay ทั้งหมดจำนวน 3 ชุดการทดลอง ดังภาพประกอบ 16 พบว่าเซลล์ออสติโอคลาสท์ที่เกิดขึ้นจากการแช่เซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นดอทีรียัลในสารละลาย กลุ่ม WM, SK และ HBSS มีแนวโน้มทำให้เกิดพื้นที่หลุมการละลายมากกว่ากลุ่มควบคุม โดยในกลุ่ม SK และ WM แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ส่วนในกลุ่มของสารละลาย RJ ในทุกความเข้มข้น เซลล์ออสติโอคลาสท์ที่เกิดขึ้นมีแนวโน้มทำให้เกิดพื้นที่หลุมการละลายน้อยกว่าสารละลายในกลุ่ม WM, SK และ HBSS แต่มีแนวโน้มทำให้เกิดพื้นที่หลุมการละลายมากกว่ากลุ่มควบคุม แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



ภาพประกอบ 16 (ก) กราฟแท่งแสดงจำนวนเซลล์ออสติโอคลาสท์ (แสดงเป็นเปอร์เซ็นต์กลุ่มควบคุม (%Control)) และ (ข) กราฟแท่งแสดงพื้นที่หลุมการละลาย (แสดงเป็นค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) จาก 3 ชุดการทดลอง (* $P < 0.05$ และ ** $P < 0.01$)

จากภาพประกอบ 16ก-ข เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ออสติโอคลาสท์และพื้นที่หลุมการละลาย พบว่าจำนวนเซลล์ออสติโอคลาสท์ที่เกิดขึ้นในสารละลายตัวกลางชนิดต่างๆ ทำให้เกิดพื้นที่หลุมการละลายมากขึ้นแตกต่างกันไปแต่มีความสัมพันธ์ไปในทางเดียวกัน โดยเซลล์ออสติโอคลาสท์ที่เกิดขึ้นจำนวนมาก มีแนวโน้มทำให้เกิดพื้นที่หลุมการละลายมากขึ้น ยกตัวอย่างเช่น เซลล์ออสติโอคลาสท์ที่เกิดขึ้นในสารละลาย HBSS, SK และ WM มีจำนวนมาก จะพบการเกิดพื้นที่หลุมการละลายมากขึ้นไปด้วยหรือเซลล์ออสติโอคลาสท์ที่เกิดขึ้นจำนวนน้อย มีแนวโน้มทำให้เกิดพื้นที่หลุมการละลายน้อย ยกตัวอย่างเช่น เซลล์ออสติโอคลาสท์ที่เกิดขึ้นในสารละลาย RJ ความเข้มข้นต่างๆ มีจำนวนน้อย ก็ทำให้เกิดพื้นที่หลุมการละลายน้อยเช่นกัน แต่ในทางตรงกันข้ามจำนวนเซลล์ออสติโอคลาสท์ที่เกิดขึ้นในกลุ่มควบคุมไม่สัมพันธ์กับการเกิดพื้นที่หลุมการละลาย กล่าวคือจำนวนเซลล์ออสติโอคลาสท์ที่มากทำให้เกิดพื้นที่หลุมการละลายน้อยอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับสารละลายตัวกลางชนิดอื่นๆ

จากความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ออสติโอคลาสท์และพื้นที่หลุมการละลายที่เกิดขึ้นข้างต้น เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์สหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน (Pearson correlation) เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร พบว่ามีจำนวนเซลล์ออสติโอคลาสท์ที่เกิดในสารละลาย HBSS, WM, RJ900 และ RAW alone เท่านั้นที่มีความสัมพันธ์เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับพื้นที่หลุมการละลายที่เกิดขึ้น ตามตาราง 4

ตาราง 4 แสดงค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ระหว่างตัวแปรเซลล์ออสติโอคลาสท์และพื้นที่หลุมการละลาย ในแต่ละสารละลายตัวกลาง (* $P < 0.05$ และ ** $P < 0.01$)

ความสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ออสติโอคลาสท์ และพื้นที่หลุมการละลาย	r	P
Control	.41	.419
HBSS	.881	.02*
SK	.342	.507
WM	.953	.003**
RJ100	.509	.303

ตาราง 4 (ต่อ)

ความสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ออกสตีโอคลาสต์ และพื้นที่หลุมการละลาย	r	P
RJ500	.181	.732
RJ900	.968	.001**
RAW alone	.936	.006**



บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การพยากรณ์โรคในฟันที่หลุดออกจากเบ้าขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายชนิด แต่ปัจจัยที่สำคัญคือระยะเวลาที่ฟันถูกปล่อยแห้งและสารละลายตัวกลางที่ใช้ในการแช่ฟันที่หลุดออกจากเบ้าฟัน ซึ่งสองปัจจัยนี้สามารถลดการเกิดความเสียหายแก่เซลล์ไฟโบร بلاสท์เอ็นไยด์ปริทันต์ และป้องกันการเกิดการละลายรากฟันหลังการนำฟันกลับเข้าสู่กระดูกเบ้าฟันได้^(10, 69) โดยมีการศึกษาในห้องปฏิบัติการที่แนะนำว่าระยะเวลาของฟันที่อยู่นอกช่องปากไม่ควรเกิน 30 นาที เนื่องจากอาจทำให้เซลล์ไฟโบร بلاสท์เอ็นไยด์ปริทันต์ถูกทำลายและไม่สามารถกลับมาใช้ชีวิตอยู่ได้^(40, 70) และมีการศึกษาที่ทำการทดลองในสิ่งมีชีวิตเกี่ยวกับระยะเวลาของฟันที่อยู่นอกช่องปากกับการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ไฟโบร بلاสท์เอ็นไยด์ปริทันต์ พบว่าฟันที่อยู่นอกช่องปากเป็นเวลา 20 นาที ทำให้การมีชีวิตของเซลล์ไฟโบร بلاสท์เอ็นไยด์ปริทันต์ลดลง^(71, 72) แต่จากการศึกษาส่วนใหญ่มักจะไม่มี การปล่อยให้เซลล์ไฟโบร بلاสท์เอ็นไยด์ปริทันต์แห้งสนิทแต่จะใส่สารละลายตัวกลางลงไปทันที หลังจากดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก หรือดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกร้อยละ 50 แล้วจึงทิ้งเซลล์ไว้นาน 30 นาทีก่อนใส่สารละลายตัวกลางลงไป^(7, 13, 40, 73) ในขณะที่การศึกษาของ Sricholpech et al ได้ทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบร بلاสท์เอ็นไยด์ปริทันต์ โดยทำการทดลองดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกร้อยละ 80 และทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นใส่สารละลายตัวกลางตามลงไป พบว่าเซลล์ไฟโบร بلاสท์เอ็นไยด์ปริทันต์ที่มีชีวิตอยู่เหลือแค่บริเวณขอบของหลุมเลี้ยงเซลล์ ซึ่งจากรูปแบบการทดลองนี้แม้จะสามารถศึกษาการมีชีวิตของเซลล์ไฟโบร بلاสท์เอ็นไยด์ปริทันต์ได้ แต่ไม่สามารถศึกษาหน้าที่อื่นๆได้⁽⁸⁾ ต่อมาจึงได้ทำการปรับการทดลองในการศึกษาของ Sricholpech et al ที่กำลังรอพิจารณาตีพิมพ์ โดยทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกทั้งหมดและทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นจึงทำการใส่สารละลายตัวกลางลงไป พบว่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบร بلاสท์เอ็นไยด์ปริทันต์เพิ่มขึ้นจากการศึกษาเดิม ดังนั้นการปรับใช้สภาวะจำลองฟันหลุดออกจากเบ้าวิธีนี้จะทำให้มีปริมาณเซลล์ไฟโบร بلاสท์เอ็นไยด์ปริทันต์มากพอเพื่อที่จะสามารถศึกษาต่อในเรื่องการทำหน้าที่ในกระบวนการกระตุ้นการสร้างเซลล์ออสติโอคลาสต์ต่อไป

นอกจากระยะเวลาที่ฟันอยู่นอกช่องปากจะเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการพยากรณ์โรคแล้ว ยังมีอีกหนึ่งปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จในการรักษาฟันขึ้นนั้นๆไว้ซึ่งก็คือสารละลายตัวกลางที่เหมาะสม นมเป็นสารละลายที่ International Association of Dental Traumatology แนะนำ เนื่องจากหาใช้งานได้ง่าย และยังมีค่าความเป็นกรด-ด่าง และความเข้มข้นออสโมลาริตีที่เหมาะสมต่อเซลล์ไฟโบร بلاสท์เอ็นไยด์ปริทันต์อีกด้วย นอกจากนี้ยังมีสารอาหารต่างๆ และไม่มี

แบบที่เรียกว่าแป้น^(3, 4) อย่างไรก็ตามมีหลายการศึกษาที่พบว่านมส่งผลกระทบต่อในเชิงลบเมื่อใช้เป็นสารละลายตัวกลางเช่นกัน จากการศึกษาของ Hasan et al พบว่าฟันของหนูที่ผ่านการแช่ในนมจืดไขมันเต็ม มีความหนาของชั้นเนื้อเยื่อไฟโบรบลาสต์เอ็นไดยีปริทันต์ (PDL thickness) หลังนำฟันกลับเข้าสู่กระดูกเบ้าฟันน้อยที่สุด (57.53 ± 0.36 ไมโครเมตร) เมื่อเทียบกับฟันที่แช่ในไข่ขาว (115.12 ± 0.62 ไมโครเมตร) และสารละลายเกลือแอสค์ (113.51 ± 0.78 ไมโครเมตร) และมีโอกาสเกิดภาวะฟันยึดแน่นตามมามากกว่าฟันที่แช่ในไข่ขาวและสารละลายเกลือแอสค์ด้วย⁽³⁷⁾ เช่นเดียวกับ Choi et al ที่พบว่านมจืดไขมันเต็มสามารถกระตุ้นให้เกิดการหลั่งสารอักเสบและสารที่ทำให้เกิดกระบวนการสลายกระดูกได้⁽⁷⁴⁾ เป็นที่น่าสังเกตว่าจากการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้นพบว่าผลกระทบเชิงลบของนมที่นำมาเป็นสารละลายตัวกลางที่เกิดขึ้นนั้น เกิดจากการนำนมจืดไขมันเต็มมาทำการทดสอบ มีการศึกษาที่ได้ทำการเปรียบเทียบผลของไขมันในนม เมื่อนำเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นไดยีปริทันต์มาเพาะเลี้ยงในนมจืดไขมันสูง (มีไขมันเป็นส่วนประกอบ 4.5%), กลาง (มีไขมันเป็นส่วนประกอบ 3.5%) และต่ำ (มีไขมันเป็นส่วนประกอบ 3%) พบว่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นไดยีปริทันต์ที่เพาะเลี้ยงในนมจืดไขมันต่ำมีปริมาณมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ⁽⁷⁵⁾ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Sinpreechanon et al ที่พบว่านมจืดไขมันต่ำมีประสิทธิภาพในการคงความมีชีวิตและการสร้างคอลลาเจนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นไดยีปริทันต์มากกว่านมจืดไขมันเต็มและสารละลายเกลือแอสค์⁽³⁹⁾

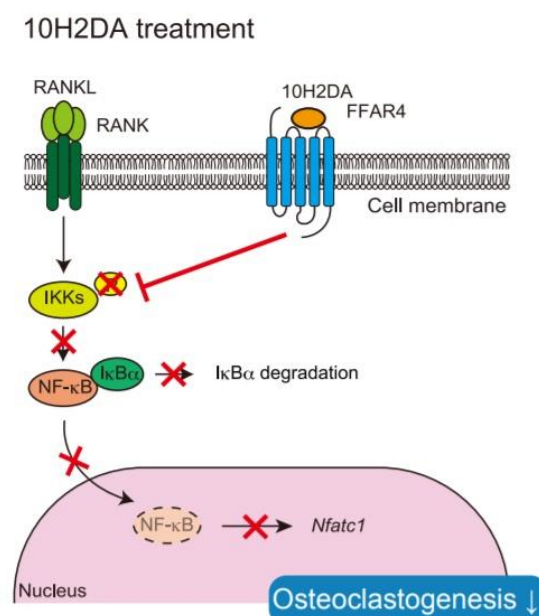
สารละลายที่ International Association of Dental Traumatology แนะนำให้ใช้ตัวต่อมาคือสารละลายเกลือแอสค์ ถึงแม้ว่าคุณสมบัติของสารละลายเกลือแอสค์จะเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลล์และรักษาความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นไดยีปริทันต์ได้ แต่สารละลายเกลือแอสค์ยังหาใช้งานได้ยากและมีราคาแพง จึงไม่นิยมใช้ในปัจุบัน^(1, 4, 19) การศึกษาส่วนใหญ่ที่นำสารละลายเกลือแอสค์และนมมาเป็นสารละลายตัวกลางเพื่อทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นไดยีปริทันต์ พบว่าเซลล์ที่แช่ในสารละลายเกลือแอสค์รักษาความมีชีวิตของเซลล์ได้มากกว่าเซลล์ที่แช่ในนม^(73, 76, 77) แต่เมื่อเทียบกับนมจืดไขมันต่ำกลับพบว่านมจืดไขมันต่ำมีประสิทธิภาพในการคงความมีชีวิตและการแบ่งจำนวนเพิ่มเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นไดยีปริทันต์ได้มากกว่าสารละลายเกลือแอสค์^(8, 38, 78)

นอกจากนมและสารละลายเกลือแอสค์ ยังมีสารละลายตัวกลางทางธรรมชาติที่การศึกษานี้เลือกใช้คือสารละลายนมผง ซึ่งประกอบด้วยสารอาหารมากมาย อีกทั้งยังมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และกำลังเป็นที่นิยมในปัจุบัน⁽⁴⁶⁾ โดยจากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Sricholpech et al พบว่าสารละลายนมผงมีประสิทธิภาพในการคงความมีชีวิตและทำให้มีอัตราการเพิ่มจำนวน

ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นดอทีรียัลได้มากกว่าสารละลายเกลือแอสค์⁽⁸⁾ และจากการศึกษาของ Stricholpech et al ที่กำลังรอพิจารณาตีพิมพ์พบว่าประสิทธิภาพในการคงความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นดอทีรียัลของสารละลายนมผึ้งในทุกความเข้มข้นคือ 100, 500 และ 900 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ต่ำกว่านมจืดไขมันต่ำเล็กน้อย แต่มีอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นดอทีรียัลได้มากกว่านมไขมันต่ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทางผู้วิจัยเห็นว่าประสิทธิภาพของสารละลายนมผึ้งมีแนวโน้มที่ดีในการเป็นสารละลายตัวกลาง จึงได้ทำการศึกษาต่อในเรื่องความสามารถในการกวดการสร้างเซลล์ออสติโอคลาสท์ที่ทำหน้าที่ละลายรากฟัน โดยใช้ความเข้มข้น 100, 500 และ 900 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรตามการศึกษาก่อนหน้าที่สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นดอทีรียัลได้ ว่าสามารถกวดการสร้างและการทำหน้าที่ของเซลล์ออสติโอคลาสท์ได้หรือไม่ ซึ่งการเกิดรากฟันละลายภายหลังจากการใส่ฟันกลับเข้าสู่กระดูกเบ้าฟันเดิมถือเป็นปัญหาแทรกซ้อนที่รุนแรงอย่างหนึ่ง

จากการศึกษาที่ทำการเลี้ยงร่วมระหว่างเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นดอทีรียัลร่วมกับแมคโครฟาจเซลล์ไลน์ของหนู RAW 264.7 พบว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นดอทีรียัลที่แช่ในนมจืดไขมันเต็มและสารละลายเกลือแอสค์เป็นเวลา 1 ชั่วโมงทำให้เกิดเซลล์ออสติโอคลาสท์ มากกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Zhan et al ที่พบว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นดอทีรียัลที่ผ่านการแช่ใน WM และ HBSS เป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้วเลี้ยงร่วมกับแมคโครฟาจเซลล์ไลน์ของหนู RAW 264.7 ทำให้เกิดเซลล์ออสติโอคลาสท์ในจำนวนที่ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม แต่เมื่อแช่ใน WM เป็นเวลา 6 ชั่วโมงจึงพบจำนวนเซลล์ออสติโอคลาสท์สูงขึ้นและแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ⁽¹³⁾ โดยความแตกต่างของผลการทดลองที่เวลาแช่ 1 ชั่วโมงเช่นเดียวกันนี้ อาจเกิดจากการที่ในการศึกษานี้มีการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกทั้งหมดเป็นเวลา 5 นาที ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นดอทีรียัลในกลุ่ม WM และ HBSS ในการกระตุ้นการเกิดจำนวนเซลล์ออสติโอคลาสท์ที่มากกว่าในกลุ่มควบคุม และในการศึกษานี้นอกจากจะประเมินการเกิดขึ้นของเซลล์ออสติโอคลาสท์แล้ว ผู้วิจัยยังประเมินการทำหน้าที่ของเซลล์อีกด้วย โดยพบว่าพื้นที่หลุมการละลายที่เกิดขึ้นในกลุ่มนมจืดไขมันเต็มพบมากที่สุด ตามมาด้วยนมจืดไขมันต่ำและสารละลายเกลือแอสค์เกิดน้อยที่สุด แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในสิ่งมีชีวิตของ Trope et al ที่พบว่าถ้าแช่ฟันสุนัขในนมจะเกิดรากฟันละลายมากกว่าสารละลายเกลือแอสค์ในเวลาเท่ากัน⁽²⁵⁾ แต่อย่างไรก็ตามยังมีการศึกษาของ Casaroto et al รายงานว่าฟันที่แช่ในสารละลายเกลือแอสค์หลังจากนำฟันกลับเข้าสู่กระดูกเบ้าฟันทำให้เกิดรากฟันละลายมากกว่าในนมจืดไขมันเต็ม⁽⁷⁹⁾

ที่ผ่านมายังไม่พบการนำสารละลายนมผึ้งมาเป็นสารละลายตัวกลางเพื่อประเมินการเกิดขึ้นของเซลล์ออสติโอคลาสต์ อย่างไรก็ตามมีการศึกษาที่พบว่าเมื่อองค์ประกอบในสารละลายนมผึ้งได้แก่ กรดไขมันสายกลาง 10-hydroxy-2-decenoic acid (10H2DA) ซึ่งพบได้ในสารละลายนมผึ้งเท่านั้น สามารถจับกับ FFAR4 receptor ทำให้ขัดขวาง NF- κ B signaling pathway มีผลยับยั้งกระบวนการเจริญและพัฒนาของเซลล์สลายกระดูกรวมถึงหน้าที่ของเซลล์สลายกระดูกด้วย ดังภาพประกอบ 17 โดยจากการศึกษาของ Tsuchiya et al ที่ทำการเลี้ยงเซลล์ออสติโอคลาสต์ร่วมกับ Macrophage colony stimulating factor (M-CSF) 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร และ RANKL 50 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ในจานเลี้ยง Osteo Assay โดยกลุ่มทดลองใส่กรดไขมัน 10H2DA และกลุ่มควบคุมไม่ใส่กรดไขมัน 10H2DA ในหลุมเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 3 วัน ผลการศึกษาพบว่าหลุมที่ใส่กรดไขมัน 10H2DA เกิดพื้นที่หลุมการละลายน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ⁽⁸⁰⁾



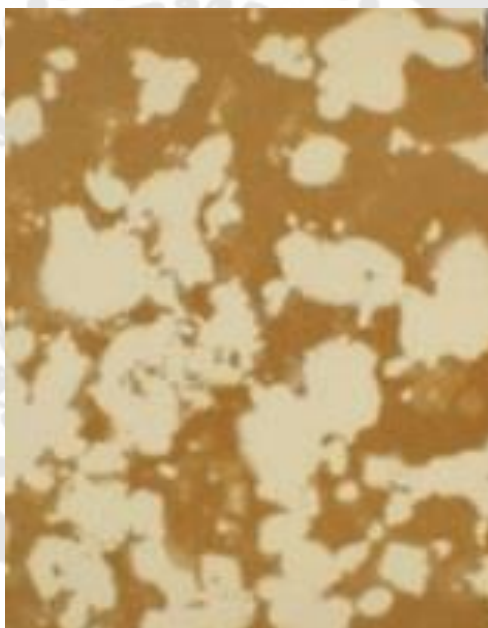
ภาพประกอบ 17 กลไกของกรดไขมัน 10H2DA ต่อการยับยั้งกระบวนการเจริญและพัฒนาของเซลล์สลายกระดูก

ที่มา : Yosuke Tsuchiya. (2020). The key royal jelly component 10-Hydroxy-2-decenoic acid protects against bone loss by inhibiting NF- κ B signaling downstream of FFAR4 p. 21.

นอกจาก 10H2DA แล้วสารละลายนมผงยังมี MRJP3 ที่สามารถต้านการอักเสบได้โดยยับยั้งการสร้างสารตั้งต้นการอักเสบ (Proinflammatory cytokine) โดยในการศึกษาของ Kohno et al ได้ทำการเลี้ยงแมคโครฟาจเซลล์ไลน์ของหนู RAW 264.7 ในสารละลายนมผงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าสารละลายนมผงยับยั้งสารตั้งต้นการอักเสบได้ทั้ง Tumor necrosis factor- α (TNF- α), Interleukin-6 (IL-6) และ Interleukin-1 (IL-1) โดยยับยั้ง TNF- α ได้มากที่สุด นอกจากนี้โปรตีน MRJP3 ที่สกัดแยกออกมาจากสารละลายนมผงสามารถยับยั้ง TNF- α ได้โดยแปรผันตรงกับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น⁽¹⁶⁾ ซึ่ง TNF- α เป็นหนึ่งในปัจจัยที่ทำให้เกิดการพัฒนาด้านของเซลล์ออสติโอคลาสต์ (Osteoclast differentiation)⁽¹⁷⁾ ส่วนการศึกษานี้พบว่าเซลล์ที่ผ่านการแช่สารละลายนมผงทำให้เกิดเซลล์ออสติโอคลาสต์น้อยกว่าทั้งในกลุ่มนมทั้ง 2 ประเภทและสารละลายเกลือแอสค์ และยังเกิดพื้นที่หลุมการละลายน้อยกว่าเช่นกัน ในการศึกษาครั้งนี้ผงนมผงถูกละลายด้วยสารละลายเกลือแอสค์ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างที่เป็นกลาง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Kohno et al ที่ละลายสารละลายนมผงด้วย PBS ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างที่เป็นกลางเช่นกัน⁽¹⁶⁾ แต่แตกต่างจากการศึกษาของ Tsuchiya et al ที่กรดไขมัน 10H2DA นั้นมาจากการที่สารละลายนมผงถูกละลายโดยเอทานอลในน้ำมันข้าวโพด⁽⁸⁰⁾ จากความสามารถในการละลายที่แตกต่างกันขององค์ประกอบในนมผงในสารละลายต่างๆ จึงมีความเป็นไปได้ว่าส่วนประกอบของสารละลายนมผงที่ละลายออกมาได้ในการศึกษานี้ส่วนใหญ่นั้นน่าจะเป็นโปรตีน โดยที่ MRJP3 จากสารละลายนมผงน่าจะมีส่วนทำให้อัตราจำนวนการเกิดเซลล์ออสติโอคลาสต์ได้ ทำให้เซลล์ออสติโอคลาสต์ที่เกิดในกลุ่มสารละลายนมผงมีจำนวนน้อยกว่ากลุ่มทดลองอื่นๆ และจากการศึกษานี้ละลายผงนมผงด้วยสารละลายเกลือแอสค์นั้น เพื่อจะได้เห็นผลของสารละลายนมผงที่เกิดขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายเกลือแอสค์ที่เป็นสารละลายตัวกลางที่ทดสอบเช่นกัน อย่างไรก็ตามกลไกของสารละลายนมผงในการลดจำนวนการเกิดเซลล์ออสติโอคลาสต์ในการศึกษานี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดและจำเป็นต้องทำการศึกษาต่อไป

เมื่อทำการหาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ออสติโอคลาสต์และพื้นที่หลุมการละลายที่เกิดขึ้น ในการศึกษาพบว่าเซลล์ออสติโอคลาสต์ที่เกิดขึ้นในทุกกลุ่มการทดลองมีแนวโน้มที่ทำให้เกิดพื้นที่หลุมการละลายที่แปรผันตรงกับจำนวนเซลล์ที่เกิดขึ้น ยกเว้นกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เลี้ยงแมคโครฟาจเซลล์ไลน์ของหนู RAW 264.7 เดียวๆ (RAW alone) ที่มีจำนวนเซลล์ออสติโอคลาสต์มากพอๆกับสารละลายเกลือแอสค์ แต่ทำให้เกิดพื้นที่หลุมการละลายน้อยกว่าเมื่อเทียบกับพื้นที่หลุมการละลายที่เกิดขึ้นในสารละลายเกลือแอสค์ ซึ่งเซลล์ออสติโอคลาสต์ที่เกิดขึ้นจำนวนมากนั้น น่าจะเป็นเซลล์ขนาดใหญ่หลายนิวเคลียสมากกว่าที่จะเป็นเซลล์ออสติโอคลาสต์

เนื่องจากการศึกษานี้เซลล์ไม่ได้ถูกกระตุ้นด้วย RANKL หรือ M-CSF ซึ่งเป็นไซโตไคน์ที่จะทำให้พัฒนาไปเป็นเซลล์ออสติโอคลาสท์ที่สมบูรณ์ แตกต่างจากการศึกษาของ Song et al ที่ทำการกระตุ้นแมคโครฟาจเซลล์ไลน์ของหนู RAW 264.7 ด้วย RANKL ความเข้มข้นต่างๆตั้งแต่ 0-100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรบนแผ่นกระดูกวัว (Slice bovine bone) พบว่าจะเกิดมีการเปลี่ยนแปลงสภาพเซลล์เป็นเซลล์ออสติโอคลาสท์เมื่อกระตุ้นด้วย RANKL ที่ความเข้มข้น 30 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นต้นไป และเกิดพื้นที่หลุมการละลายมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ⁽⁸¹⁾ ต่างจากการศึกษาที่เลี้ยงแมคโครฟาจเซลล์ไลน์ของหนู RAW 264.7 และกระตุ้นด้วย RANKL 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร บนจานเลี้ยง Osteo Assay 3 วัน และย้อมด้วย Von Kossa จะพบว่าเกิดหลุมการละลายขนาดใหญ่จำนวนมาก⁽⁸²⁾ ดังภาพประกอบ 18



ภาพประกอบ 18 พื้นที่หลุมการละลายบนจานเลี้ยง Osteo Assay และย้อมสี Von Kossa

ที่มา : Haijun Z. (2019). Hippuric acid and 3-(3-hydroxyphenyl) propionic acid inhibit murine osteoclastogenesis through RANKL -RANK independent pathway p. 5.

และจากการศึกษานี้พบว่าพื้นที่หลุมการละลายที่เกิดขึ้นมีปริมาณน้อย อาจเกิดจากการทำหน้าที่ของเซลล์หลายนิวเคลียสที่เกิดขึ้นละลายแร่ธาตุแค่พื้นผิวส่วนบนของจานเลี้ยง Osteo Assay เท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในห้องปฏิบัติการที่แยกความแตกต่างระหว่างการเลี้ยงเซลล์ออสติโอคลาสท์และ Foreign-body giant cell (FBGCs) บนแผ่นกระดูกวัวโดยใช้ไซโตไคน์

กระตุ้น เพื่อดูการละลายของแผ่นกระดูกและการแสดงออกของยีนพบว่า FBGCs ไม่สามารถสร้าง Ruffled border จนเกิดเป็นบริเวณปิดขึ้นได้ กรณีที่หลังออกมาจะไหลออกจากบริเวณนั้นทำให้มีความเข้มข้นไม่พอที่จะละลายสารอินทรีย์ จึงทำได้เพียงละลายแร่ธาตุที่อยู่บนผิวของกระดูก (HA coating) เท่านั้น ต่างจากเซลล์ออสติโอคลาสต์ที่สามารถละลายแผ่นกระดูกได้ถึง 20% ของพื้นผิว ถึงแม้ว่า FBGCs จะมีเซลล์ขนาดใหญ่และมีหลายนิวเคลียสกว่าเซลล์ออสติโอคลาสต์ก็ตาม⁽³⁶⁾

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษานี้และการศึกษาที่กำลังรอพิจารณาตีพิมพ์ของ Sricholpech et al สามารถสรุปได้ว่าสารละลายนมผงมีประสิทธิภาพในการคงความมีชีวิตและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นดอปรีตันต์ และยังสามารถในการลดจำนวนและการทำหน้าที่ของเซลล์ออสติโอคลาสต์ในสภาวะจำลองการหลุดของฟันออกจากเบ้าได้ดีกว่าสารละลายตัวกลางที่แนะนำสำหรับการแช่ฟันคือนมและสารละลายเกลือแอสค์ ดังนั้นสารละลายนมผงจึงน่าจะมีศักยภาพในการพัฒนาไปเป็นสารละลายตัวกลางเพื่อแช่ฟันที่หลุดออกจากเบ้าที่สามารถลดโอกาสการละลายของรากฟันได้

ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาผลของสารละลายนมผงต่อจำนวนและการทำหน้าที่ของเซลล์ออสติโอคลาสต์ในสภาวะจำลองการหลุดของฟันออกจากเบ้า พบว่าสารละลายนมผงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดเซลล์ออสติโอคลาสต์และเกิดหลุมการละลายน้อยเมื่อเทียบกับสารละลายตัวกลางที่แนะนำ อย่างไรก็ตามเซลล์ออสติโอคลาสต์ที่เกิดขึ้นสามารถละลายหลุมบนจาน Osteo Assay ได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น เนื่องจากวิธีการศึกษานี้ไม่ได้กระตุ้นเซลล์ด้วยไซโตไคน์ที่จะทำให้พัฒนาไปเป็นเซลล์ออสติโอคลาสต์ที่สมบูรณ์ ดังนั้นเพื่อเป็นการพัฒนาวิธีการศึกษาต่อไปควรต้องทำการเติมไซโตไคน์ RANKL หรือ M-CSF กระตุ้นให้เกิดเซลล์ออสติโอคลาสต์และการทำหน้าที่อย่างสมบูรณ์ เพื่อพิสูจน์ว่าสารละลายนมผงมีศักยภาพในการลดการสร้างและการทำหน้าที่ของเซลล์ออสติโอคลาสต์หรือไม่ และประเมินความเหมาะสมในการพัฒนาเป็นสารละลายตัวกลางที่เหมาะสมในการแช่ฟันต่อไป

บรรณานุกรม

1. Osmanovic A, Halilovic S, Kurtovic-Kozaric A, Hadziabdic N. Evaluation of periodontal ligament cell viability in different storage media based on human PDL cell culture experiments-A systematic review. Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology. 2018 Dec; 34(6): 384-93.
2. Andersson L, Andreasen JO, Day P, Heithersay G, Trope M, DiAngelis AJ, et al. Guidelines for the Management of Traumatic Dental Injuries: 2. Avulsion of Permanent Teeth. Pediatric dentistry. 2017 Sep 15; 39(6): 412-9.
3. Fouad AF, Abbott PV, Tsilingaridis G, Cohenca N, Lauridsen E, Bourguignon C, et al. International Association of Dental Traumatology guidelines for the management of traumatic dental injuries: 2. Avulsion of permanent teeth. Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology. 2020 Aug; 36(4): 331-42.
4. De Brier N, O D, Borra V, Singletary EM, Zideman DA, De Buck E. Storage of an avulsed tooth prior to replantation: A systematic review and meta-analysis. Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology. 2020 Oct; 36(5): 453-76.
5. Adnan S, Lone MM, Khan FR, Hussain SM, Nagi SE. Which is the most recommended medium for the storage and transport of avulsed teeth? A systematic review. Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology. 2018 Apr; 34(2): 59-70.
6. Bag I, Yildirim S. Effect of avulsion storage media on periodontal ligament fibroblast differentiation. Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology. 2017 Dec; 33(6): 458-64.
7. Wimolsantirungsri N, Makeudom A, Louwakul P, Sastraruji T, Chailertvanitkul P, Supanchart C, et al. Inhibitory effect of Thai propolis on human osteoclastogenesis. Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology. 2018 Apr 3.
8. Sricholpech M, Srisupabh D. Royal jelly promotes the viability and proliferation of

periodontal ligament fibroblasts in an In Vitro tooth avulsion simulation. *Mahidol Dental Journal*. 2015; 35(1).

9. Sokos D, Everts V, de Vries TJ. Role of periodontal ligament fibroblasts in osteoclastogenesis: a review. *J Periodontal Res*. 2015 Apr; 50(2): 152-9.
10. Babaji P, Melkundi M, Devanna R, Suresh BS, Chaurasia VR, Gopinath PV. In vitro comparative evaluation of different storage media (hank's balanced salt solution, propolis, Aloe vera, and pomegranate juice) for preservation of avulsed tooth. *European journal of dentistry*. 2017 Jan-Mar; 11(1): 71-5.
11. Udoeye CI, Jafarzadeh H, Abbott PV. Transport media for avulsed teeth: a review. *Australian endodontic journal : the journal of the Australian Society of Endodontology Inc*. 2012 Dec; 38(3): 129-36.
12. dos Santos CL, Sonoda CK, Poi WR, Panzarini SR, Sundefeld ML, Negri MR. Delayed replantation of rat teeth after use of reconstituted powdered milk as a storage medium. *Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology*. 2009 Feb; 25(1): 51-7.
13. Zhan X, Zhang C, Dissanayaka WL, Cheung GS, Jin L, Yang Y, et al. Storage media enhance osteoclastogenic potential of human periodontal ligament cells via RANKL-independent signaling. *Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology*. 2013 Feb; 29(1): 59-65.
14. Nirada Dhanesuan DS, Siriluck Tiranathanagul, Sorasun Rungsiyanont. The In Vitro Effect of Royal Jelly, *Apis mellifera*, on Proliferation of Human Gingival, Periodontal Ligament Fibroblasts and Human Bone Cells. *Thai Pharmaceutical and Health Science Journal*. 2011; 6(3).
15. Narita Y, Nomura J, Ohta S, Inoh Y, Suzuki KM, Araki Y, et al. Royal jelly stimulates bone formation: physiologic and nutrigenomic studies with mice and cell lines. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 2006 Oct; 70(10): 2508-14.
16. Kohno K, Okamoto I, Sano O, Arai N, Iwaki K, Ikeda M, et al. Royal jelly inhibits the production of proinflammatory cytokines by activated macrophages. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 2004 Jan; 68(1): 138-45.

17. Asagiri M, Takayanagi H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone*. 2007 Feb; 40(2): 251-64.
18. Petrovic B, Markovic D, Peric T, Blagojevic D. Factors related to treatment and outcomes of avulsed teeth. *Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology*. 2010 Feb; 26(1): 52-9.
19. Andersson L, Andreasen JO, Day P, Heithersay G, Trope M, Diangelis AJ, et al. International Association of Dental Traumatology guidelines for the management of traumatic dental injuries: 2. Avulsion of permanent teeth. *Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology*. 2012 Apr; 28(2): 88-96.
20. Bendoraitiene E, Zemgulyte S, Borisovaite M. Reasonable Outcome of Avulsed Permanent Upper Incisor after Seven Years Follow-Up Period: a Case Report. *Journal of oral & maxillofacial research*. 2017 Oct-Dec; 8(4): e6.
21. Tuna EB, Yaman D, Yamamoto S. What is the Best Root Surface Treatment for Avulsed Teeth? *Open Dent J*. 2014; 8: 175-9.
22. Poi WR, Sonoda CK, Martins CM, Melo ME, Pellizzer EP, de Mendonca MR, et al. Storage media for avulsed teeth: a literature review. *Brazilian dental journal*. 2013 Sep-Oct; 24(5): 437-45.
23. Souza BDM, Dutra KL, Kuntze MM, Bortoluzzi EA, Flores-Mir C, Reyes-Carmona J, et al. Incidence of Root Resorption after the Replantation of Avulsed Teeth: A Meta-analysis. *Journal of endodontics*. 2018 Aug; 44(8): 1216-27.
24. Oliveira B, Santos A, de Mendonça D, Sousa DL, Jeová J, Neto S, et al. Root resorption after dental traumas: classification and clinical, radiographic and histologic aspects. *RSBO*. 2011 10/01; 8.
25. Trope M, Friedman S. Periodontal healing of replanted dog teeth stored in Viaspan, milk and Hank's balanced salt solution. *Endodontics & dental traumatology*. 1992 Oct; 8(5): 183-8.
26. Laux M, Abbott PV, Pajarola G, Nair PN. Apical inflammatory root resorption: a correlative radiographic and histological assessment. *International endodontic journal*. 2000 Nov; 33(6): 483-93.

27. Kamat M, Puranik R, Vanaki S, Kamat S. An insight into the regulatory mechanisms of cells involved in resorption of dental hard tissues. *Journal of oral and maxillofacial pathology : JOMFP*. 2013 May; 17(2): 228-33.
28. Ne RF, Witherspoon DE, Gutmann JL. Tooth resorption. *Quintessence international* (Berlin, Germany : 1985). 1999 Jan; 30(1): 9-25.
29. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003 May 15; 423(6937): 337-42.
30. Neutsky-Wulff AV, Sorensen MG, Kocijancic D, Leeming DJ, Dziegiel MH, Karsdal MA, et al. Alterations in osteoclast function and phenotype induced by different inhibitors of bone resorption--implications for osteoclast quality. *BMC musculoskeletal disorders*. 2010 Jun 1; 11: 109.
31. Bloemen V, Schoenmaker T, de Vries TJ, Everts V. Direct cell-cell contact between periodontal ligament fibroblasts and osteoclast precursors synergistically increases the expression of genes related to osteoclastogenesis. *Journal of cellular physiology*. 2010 Mar; 222(3): 565-73.
32. Bloemen V, Schoenmaker T, de Vries TJ, Everts V. IL-1 β favors osteoclastogenesis via supporting human periodontal ligament fibroblasts. *Journal of cellular biochemistry*. 2011 Jul; 112(7): 1890-7.
33. Pereira M, Petretto E, Gordon S, Bassett JHD, Williams GR, Behmoaras J. Common signalling pathways in macrophage and osteoclast multinucleation. *Journal of cell science*. 2018 Jun 5; 131(11).
34. Miron RJ, Bosshardt DD. Multinucleated Giant Cells: Good Guys or Bad Guys? *Tissue engineering Part B, Reviews*. 2018 Feb; 24(1): 53-65.
35. Miron RJ, Zohdi H, Fujioka-Kobayashi M, Bosshardt DD. Giant cells around bone biomaterials: Osteoclasts or multi-nucleated giant cells? *Acta biomaterialia*. 2016 Dec; 46: 15-28.
36. ten Harkel B, Schoenmaker T, Picavet DI, Davison NL, de Vries TJ, Everts V. The Foreign Body Giant Cell Cannot Resorb Bone, But Dissolves Hydroxyapatite Like Osteoclasts. *PloS one*. 2015; 10(10): e0139564.

37. Hasan MR, Takebe H, Shalehin N, Obara N, Saito T, Irie K. Effects of tooth storage media on periodontal ligament preservation. *Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology*. 2017 Oct; 33(5): 383-92.
38. Wang WJ, Zhao YM, Feng XY, Jia WQ, Ge LH. Effect of skimmed pasteurized milk and Hank's balanced salt solution on viability and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells. *Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology*. 2013 Oct; 29(5): 365-71.
39. Sinpreechanon P, Boonzong U, Sricholpech M. Comparative evaluation of periodontal ligament fibroblasts stored in different types of milk: effects on viability and biosynthesis of collagen. *European journal of oral sciences*. 2019 Aug; 127(4): 323-32.
40. Gjertsen AW, Stothz KA, Neiva KG, Pileggi R. Effect of propolis on proliferation and apoptosis of periodontal ligament fibroblasts. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2011 Dec; 112(6): 843-8.
41. Mori GG, Nunes DC, Castilho LR, de Moraes IG, Poi WR. Propolis as storage media for avulsed teeth: microscopic and morphometric analysis in rats. *Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology*. 2010 Feb; 26(1): 80-5.
42. Qian H, Ding Y, Wu Y, Li S. The effects of three modified Hank's balanced salt solutions on root resorption of late replanted teeth: A pilot study. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery*. 2018 May; 46(5): 808-14.
43. Correa APS, Ferreira P, Panzarini SR, Sonoda CK, Caliente EA, Poi WR. Histomorphometric analysis of the healing process after the replantation of rat teeth maintained in bovine milk whey and whole milk. *Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology*. 2017 Dec; 33(6): 472-81.
44. Khazaei M, Ansarian A, Ghanbari E. New Findings on Biological Actions and Clinical Applications of Royal Jelly: A Review. *Journal of dietary supplements*. 2018 Sep 3; 15(5): 757-75.
45. Yanagita M, Kojima Y, Mori K, Yamada S, Murakami S. Osteoinductive and anti-

inflammatory effect of royal jelly on periodontal ligament cells. *Biomedical research* (Tokyo, Japan). 2011 Aug; 32(4): 285-91.

46. Pasupuleti VR, Sammugam L, Ramesh N, Gan SH. Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2017; 2017: 1259510.

47. Minegaki N, Koshizuka T, Nishina S, Kondo H, Takahashi K, Sugiyama T, et al. The Carboxyl-Terminal Penta-Peptide Repeats of Major Royal Jelly Protein 3 Enhance Cell Proliferation. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2020; 43(12): 1911-6.

48. Moriyama T, Ito A, Omote S, Miura Y, Tsumoto H. Heat Resistant Characteristics of Major Royal Jelly Protein 1 (MRJP1) Oligomer. *PloS one*. 2015; 10(5): e0119169.

49. Fujii A, Kobayashi S, Kuboyama N, Furukawa Y, Kaneko Y, Ishihama S, et al. Augmentation of wound healing by royal jelly (RJ) in streptozotocin-diabetic rats. *Japanese journal of pharmacology*. 1990 Jul; 53(3): 331-7.

50. Bernhardt A, Koperski K, Schumacher M, Gelinsky M. Relevance of osteoclast-specific enzyme activities in cell-based in vitro resorption assays. *European cells & materials*. 2017 Jan 18; 33: 28-42.

51. Kreja L, Brenner RE, Tautzenberger A, Liedert A, Friemert B, Ehrnthaller C, et al. Non-resorbing osteoclasts induce migration and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Journal of cellular biochemistry*. 2010 Feb 1; 109(2): 347-55.

52. Coon D, Gulati A, Cowan C, He J. The role of cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory bone resorption. *Journal of endodontics*. 2007 Apr; 33(4): 432-6.

53. Brito C, Stavroullakis AT, Ferreira AC, Li K, Oliveira T, Nogueira-Filho G, et al. Extract of acai-berry inhibits osteoclast differentiation and activity. *Archives of oral biology*. 2016 Aug; 68: 29-34.

54. Lossdörfer S, Götz W, Jäger A. PTH(1-34)-induced changes in RANKL and OPG expression by human PDL cells modify osteoclast biology in a co-culture model with RAW 264.7 cells. *Clinical oral investigations*. 2011 Dec; 15(6): 941-52.

55. Shi L, Zhao S, Chen Q, Wu Y, Zhang J, Li N. Crocin inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis by regulating JNK and NFκB signaling pathways. *Molecular*

medicine reports. 2018 Jun; 17(6): 7947-51.

56. Feng S, Deng L, Chen W, Shao J, Xu G, Li YP. Atp6v1c1 is an essential component of the osteoclast proton pump and in F-actin ring formation in osteoclasts. *The Biochemical journal*. 2009 Jan 1; 417(1): 195-203.
57. Thirukonda GJ, Uehara S, Nakayama T, Yamashita T, Nakamura Y, Mizoguchi T, et al. The dynamin inhibitor dynasore inhibits bone resorption by rapidly disrupting actin rings of osteoclasts. *Journal of bone and mineral metabolism*. 2016 Jul; 34(4): 395-405.
58. Marino S, Logan JG, Mellis D, Capulli M. Generation and culture of osteoclasts. *Bonekey Rep*. 2014; 3: 570-.
59. Higuchi Y, Ito M, Tajima M, Higuchi S, Miyamoto N, Nishio M, et al. Gene expression during osteoclast-like cell formation induced by antifusion regulatory protein-1/CD98/4F2 monoclonal antibodies (MAbs): c-src is selectively induced by anti-FRP-1 MAb. *Bone*. 1999 Jul; 25(1): 17-24.
60. Takeshita S, Kaji K, Kudo A. Identification and characterization of the new osteoclast progenitor with macrophage phenotypes being able to differentiate into mature osteoclasts. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2000 Aug; 15(8): 1477-88.
61. Iwaki F, Amano H, Ohura K. Nicorandil inhibits osteoclast differentiation in vitro. *European journal of pharmacology*. 2016 Dec 15; 793: 14-20.
62. Parikka V, Lehenkari P, Sassi ML, Halleen J, Risteli J, Harkonen P, et al. Estrogen reduces the depth of resorption pits by disturbing the organic bone matrix degradation activity of mature osteoclasts. *Endocrinology*. 2001 Dec; 142(12): 5371-8.
63. Ghayor C, Correro RM, Lange K, Karfeld-Sulzer LS, Gratz KW, Weber FE. Inhibition of osteoclast differentiation and bone resorption by N-methylpyrrolidone. *The Journal of biological chemistry*. 2011 Jul 8; 286(27): 24458-66.
64. Tevlin R, McArdle A, Chan CKF, Pluvinage J, Walmsley GG, Wearda T, et al. Osteoclast derivation from mouse bone marrow. *J Vis Exp*. 2014; (93): e52056-e.
65. Wang W, Wu C, Tian B, Liu X, Zhai Z, Qu X, et al. The inhibition of RANKL-induced osteoclastogenesis through the suppression of p38 signaling pathway by naringenin and

attenuation of titanium-particle-induced osteolysis. *International journal of molecular sciences*. 2014 Nov 28; 15(12): 21913-34.

66. Meghji S, Morrison MS, Henderson B, Arnett TR. pH dependence of bone resorption: mouse calvarial osteoclasts are activated by acidosis. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2001 Jan; 280(1): E112-9.

67. Lehenkari P, Hentunen TA, Laitala-Leinonen T, Tuukkanen J, Vaananen HK. Carbonic anhydrase II plays a major role in osteoclast differentiation and bone resorption by effecting the steady state intracellular pH and Ca^{2+} . *Experimental cell research*. 1998 Jul 10; 242(1): 128-37.

68. Suh KS, Chon S, Jung WW, Choi EM. Effects of methylglyoxal on RANKL-induced osteoclast differentiation in RAW264.7 cells. *Chemico-biological interactions*. 2018 Dec 25; 296: 18-25.

69. Barbizam JV, Massarwa R, da Silva LA, da Silva RA, Nelson-Filho P, Consolaro A, et al. Histopathological evaluation of the effects of variable extraoral dry times and enamel matrix proteins (enamel matrix derivatives) application on replanted dogs' teeth. *Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology*. 2015 Feb; 31(1): 29-34.

70. Doyle DL, Dumsha TC, Sydiskis RJ. Effect of soaking in Hank's balanced salt solution or milk on PDL cell viability of dry stored human teeth. *Endodontics & dental traumatology*. 1998 Oct; 14(5): 221-4.

71. Andreasen JO. Effect of extra-alveolar period and storage media upon periodontal and pulpal healing after replantation of mature permanent incisors in monkeys. *International journal of oral surgery*. 1981 Feb; 10(1): 43-53.

72. Andreasen JO, Kristerson L. The effect of limited drying or removal of the periodontal ligament. Periodontal healing after replantation of mature permanent incisors in monkeys. *Acta odontologica Scandinavica*. 1981; 39(1): 1-13.

73. Prueksakorn A, Puasiri S, Ruangsri S, Makeudom A, Sastraruji T, Krisanaprakornkit S, et al. The preservative effect of Thai propolis extract on the viability of human periodontal ligament cells. *Dental traumatology : official publication of International*

Association for Dental Traumatology. 2016 Dec; 32(6): 495-501.

74. Choi SC, Seo YH, Bae WJ, Lee HS, Choi YC, Kim EC. Milk activates the expression of cytokines via Nrf2/HO-1 pathway in human periodontal ligament cells.

Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology. 2015 Dec; 31(6): 457-64.

75. Saluja KS, Anegundi R, editors. Assessment of Viability of Human Periodontal Ligament Cells in Different Fat Content of Milk at Different Time Intervals 2016.

76. Subramaniam P, Girija P, Eswara U, Girish Babu KL. Oral rehydration salt-liquid as a storage medium for avulsed tooth. Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology. 2015 Feb; 31(1): 62-6.

77. Gopikrishna V, Thomas T, Kandaswamy D. A quantitative analysis of coconut water: a new storage media for avulsed teeth. Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics. 2008 Feb; 105(2): e61-5.

78. Harkacz OM, Sr., Carnes DL, Jr., Walker WA, 3rd. Determination of periodontal ligament cell viability in the oral rehydration fluid Gatorade and milks of varying fat content. Journal of endodontics. 1997 Nov; 23(11): 687-90.

79. Casaroto AR, Hidalgo MM, Sell AM, Franco SL, Cuman RK, Moreschi E, et al. Study of the effectiveness of propolis extract as a storage medium for avulsed teeth. Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology. 2010 Aug; 26(4): 323-31.

80. Tsuchiya Y, Hayashi M, Nagamatsu K, Ono T, Kamakura M, Iwata T, et al. The key royal jelly component 10-hydroxy-2-decenoic acid protects against bone loss by inhibiting NF- κ B signaling downstream of FFAR4. The Journal of biological chemistry. 2020 Aug 21; 295(34): 12224-32.

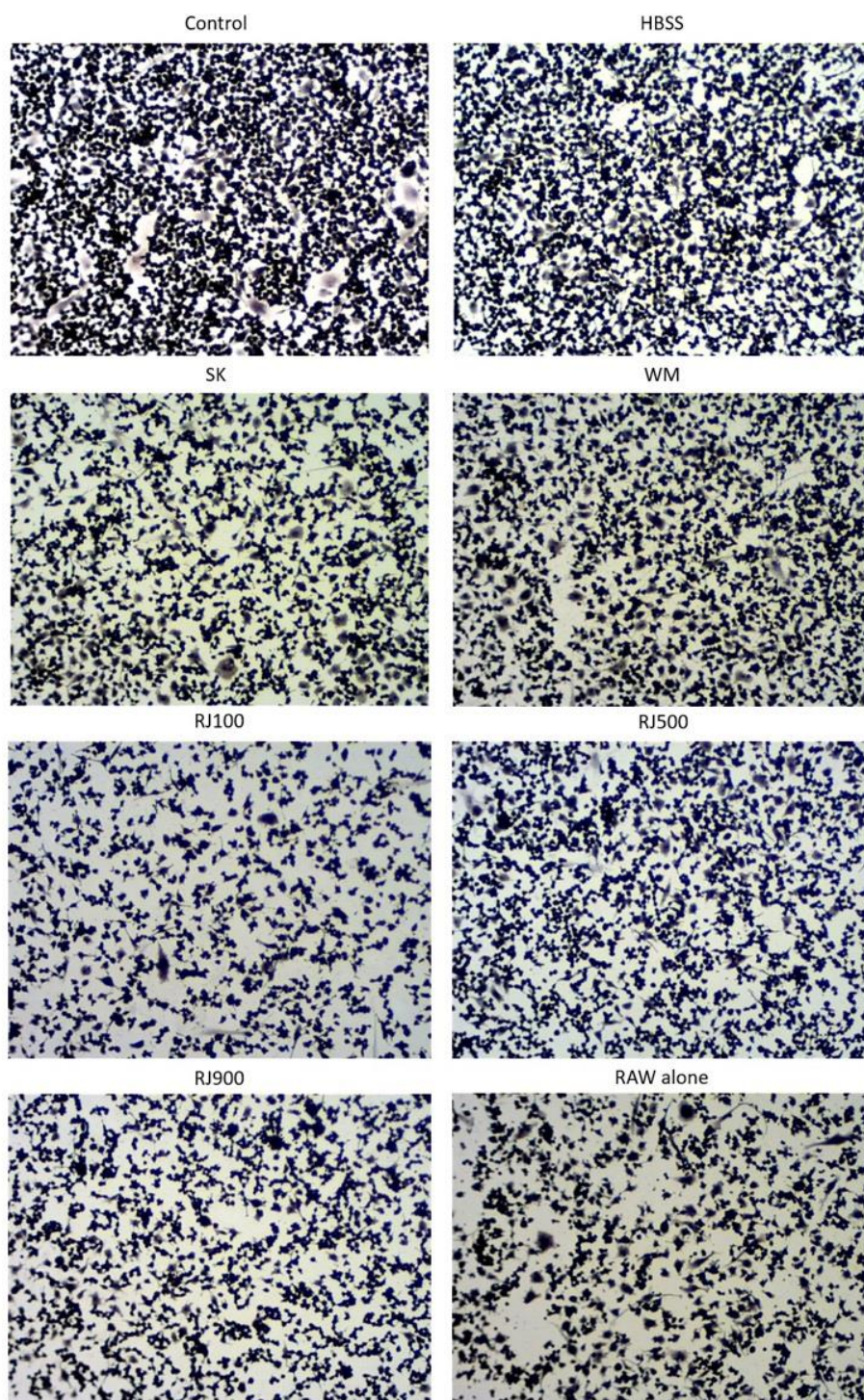
81. Song C, Yang X, Lei Y, Zhang Z, Smith W, Yan J, et al. Evaluation of efficacy on RANKL induced osteoclast from RAW264.7 cells. Journal of cellular physiology. 2019 Jul; 234(7): 11969-75.

82. Zhao H, Lazarenko OP, Chen JR. Hippuric acid and 3-(3-hydroxyphenyl) propionic acid inhibit murine osteoclastogenesis through RANKL-RANK independent

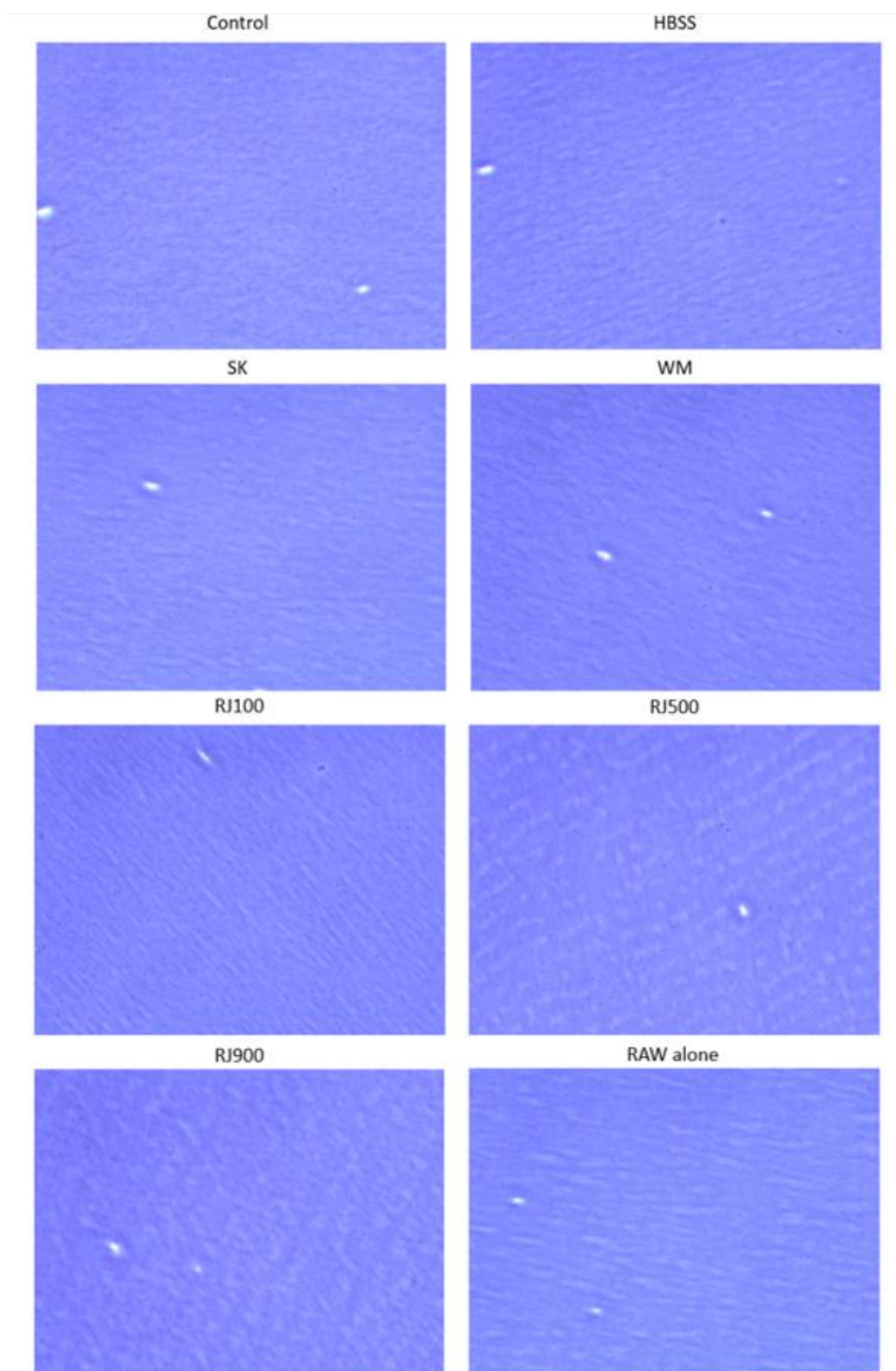
pathway. Journal of cellular physiology. 2020 Jan; 235(1): 599-610.







ภาพประกอบ 19 เซลล์ออสติโอคลาสต์ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง



ภาพประกอบ 20 หลุมการละลายในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง



**หนังสือยืนยันการยกเว้นการรับรอง
คณะกรรมการจริยธรรมสำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ**

(เอกสารนี้เพื่อแสดงว่าคณะกรรมการจริยธรรมสำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์ ได้พิจารณาโครงการวิจัยนี้)

ชื่อโครงการวิจัย : ผลของนมผึ้งต่อการทำหน้าที่ของเซลล์ออสติโอคลาสตในสภาวะจำลองการหลุด
ของฟันออกจากเบ้า
ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทันตแพทย์หญิงมานิสา ศรีชลเพชร
หน่วยงานต้นสังกัด : คณะทันตแพทยศาสตร์
รหัสโครงการวิจัย : 451/61X

โครงการวิจัยนี้เป็นโครงการวิจัยที่เข้าข่ายยกเว้น (Research with Exemption from SWUEC)

วันที่ยืนยัน : 29 พฤศจิกายน 2561
ยืนยันโดย : คณะกรรมการจริยธรรมสำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

คณะกรรมการจริยธรรมสำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ดำเนินการ
รับรองโครงการวิจัยตามแนวทางหลักจริยธรรมการวิจัยในคนที่เป็นสากล ได้แก่ Declaration of Helsinki, the
Belmont Report, CIOMS Guidelines และ the International Conference on Harmonization in Good Clinical
Practice (ICH-GCP)

ออกให้ ณ วันที่ 27 ธันวาคม 2561

(ลงชื่อ).....

(นายปิยชาติ บุญเพ็ญ)

กรรมการและผู้ช่วยเลขานุการคณะกรรมการจริยธรรม
สำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์

(ลงชื่อ).....

(แพทย์หญิงสุรพร ภัทรสุวรรณ)

ประธานคณะกรรมการจริยธรรม
สำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์

หมายเลขรับรอง : SWUEC/X-451/2561

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	แป้งพิมพ์ จำปาศิริ
วัน เดือน ปี เกิด	24 มกราคม พ.ศ. 2532
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	ทันตแพทยศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ปีการศึกษา 2556
ที่อยู่ปัจจุบัน	77/10 หมู่บ้านดิเอ็มเมอรัลด์ การ์ดैन1 ตำบลบางพลับ อำเภอปากเกร็ด จังหวัดนนทบุรี 11120
ผลงานตีพิมพ์	Jirawattanakul Y, Limlawan T, Jumpasiri P. (2014). Zirconia and Surface Treatment of Zirconia. Srinakharinwirot University Dental Journal. 80-7.

