Comparison of dent-teeth saver, milk, water, NSS and HBSS on viability of PDL cells

Siriporn Timpawat[1], Suwanna Korsuwannawong[2], Ratchaporn Srichan[3]

[1] D.D.S., MS.c (Endodontics), Diplomate Thai Board (Endo) Department of Operative and Endodontics, Faculty of Dentistry, Mahidol University. 6 Yothi St., Phayathai Bangkok 10400, Thailand.

[2] B.Sc., M.Ed. (Research and Statistics) Research office, Faculty of Dentistry, Mahidol University. 6 Yothi St., Phayathai Bangkok 10400, Thailand.

[3] B.A. Research office, Faculty of Dentistry, Mahidol University 6 Yothi St., Phayathai Bangkok 10400, Thailand.

Abstract

Introduction: The choice of storage medium for preserving traumatically avulsed teeth is important for the success of future replantation. This is essential in order to quickly repopulate the denuded root surface by periodontal ligament cells and prevent osteoclasts from attaching to this area.

Objective: The objectives of this study were to evaluate the effectiveness of four different media: Dent-Teeth Saver, milk, water, Normal Saline (NSS) and Hank Balanced Salt Solution (HBSS), to preserve cultured periodontal ligament fibroblasts (PDL) in the extra-alveolar period of 40 and 90 min.

Materials and Methods: The fourth passage of PDL were used and the 2×10^4 cells of PDL in 10%FBS of DMEM were seeded in 96 well-plate, then incubated under standard cell culture conditions (in 37°C, 100% humidity, 5% CO_2, 95 % air). After incubation for 24 hrs. the storage media were applied. Each storage medium was tested 3 times at 2 different times: 40 min and 90 min. and at room temperature (37 °C) and 4°C. The MTT assay was used to determine cell viability.

Results: Result of percentage of cell viability were as follow: Dent-Teeth Saver at Room Temperature and 4°C for 40 min were 109.77±1.04% and 117.5 ±3.35%, respectively and at 90 min were 103.27±1.05% and 112.57±1.03%. Milk at room temperature and 4°C for 40 min were 103.35±1.26 % and 116.56 ±2.23% and at 90 min were 99.70±1.05% and 107.14±1.80%. Water at 37°C (Room Temperature) and 4°C for 40 min were 70.11±1.160% and 83.12±1.60% and at 90 min were 76.19±3.05% and 80.85±2.191%. NSS at Room Temperature and 4°C for 40 min were 101.95±1.760% and 104.68±1.40% and at 90 min were 98.21±1.83% and 108.57 ±1.78% respectively.

Conclusions: The result showed that the storage medium of Dent-Teeth Saver could presense PDL similar HBSS and better than milk, water or NSS ($p<0.05$). The Dent-Teeth Saver which produced by the Faculty of Dentistry Mahidol University with a rich preservation of minerals can be used as a storage medium for avulsed teeth at Room Temperature for 40 min and 90 min.

Keywords: Avulsed teeth, Dent-Teeth Saver, HBSS, MTT, PDL cells, Storage medium

How to cite: Timpawat S, Korsuwannawong S, Srichan R. Comparison of dent-teeth saver, milk, water, NSS and HBSS on viability of PDL cells. M Dent J 2014; 34: 46-54.

Correspondence author:
Suwanna Korsuwannawong
Research office
Faculty of Dentistry, Mahidol University
6 Yothi Rd., Rajthevi, Bangkok 10400
Thailand.
Tel: 02-200-7520
Fax: 02-200-7698
E-mail: Suwanna.aut@mahidol.ac.th

Research grant: Mahidol University Fund (government budget)
Received: 7 August 2012
Accepted: 7 October 2012

การเปรียบเทียบความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสในน้ำยาแช่ฟันเดนท์ น้ำยาแฮงคส์บาลาสซอลท์ น้ำนม น้ำ และน้ำเกลือ

ศิริพร ทิมปาวัฒน์[1] สุวรรรณา ก่อสุวรรณวงศ์[2] ราชพร สีจันทร์[3]

[1] ท.บ., ป.ชั้นสูง (วิทยาเอ็นโดดอนต์), M.S. (Endodontics), อ.ท. (วิทยาเอ็นโดดอนต์) ภาควิชาทันตกรรมหัตถการและวิทยาเอ็นโดดอนต์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

[2] วท.บ. (วิทยาศาสตร์ทั่วไป), กศ.ม. (การวิจัยและสถิติทางการศึกษา) สำนักงานการวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

[3] ศศ.บ. สำนักงานการวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

บทคัดย่อ

บทนำ: การเลือกชนิดของน้ำยาแช่ฟันที่เกิดอุบัติเหตุหลุดออกจากเบ้าฟัน เพื่อทำให้เซลล์ของเอ็นยึดปริทันต์คงสภาพเดิมอยู่ได้ เป็นสิ่งสำคัญที่ทำให้เกิดผลสำเร็จในการนำฟันกลับเข้าสู่เบ้าฟัน เนื่องจากทำให้เซลล์เอ็นยึดปริทันต์คงสภาพเดิม หรือฟื้นคืนสู่สภาพเดิมได้เร็วที่สุด และป้องกันไม่ให้เซลล์ละลายรากฟัน

วัตถุประสงค์: การศึกษานี้เพื่อประเมินประสิทธิภาพของน้ำยาแช่ฟัน 4 ชนิด คือน้ำยาแช่ฟันเดนท์ (Dent-teeth- saver) น้ำนม น้ำ น้ำเกลือ โดยใช้น้ำยาแฮงคส์บาลาสซอลท์เป็นกลุ่มควบคุม เพื่อรักษาสภาพของเซลล์เอ็นยึดปริทันต์เมื่อแช่นาน 40 และ 90 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการศึกษา: ใช้เซลล์เอ็นยึดปริทันต์ ที่เพาะเลี้ยงจนได้เซลล์ปฐมภูมิรุ่นที่ 4 จำนวนเซลล์ 2×10^4 เซลล์ นำมาเพาะเลี้ยง ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีฟีทัลโบวายซีรั่มร้อยละ 10 และนำมาเพาะเลี้ยงต่อที่ 37 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 100 ภายใต้บรรยากาศของคาร์บอนด์ไดออกไซด์ร้อยละ 5 และอากาศร้อยละ 95 หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงนำเซลล์มาทดสอบ 3 ครั้ง แต่ละครั้งทดสอบที่ 40 และ 90 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 4 องศาเซลเซียส การวัดความมีชีวิตของเซลล์ใช้วิธี เอ็มทีที

ผลการทดลอง: ที่สภาวะอุณหภูมิห้องที่ 37 องศาเซลเซียส และ 4 องศาเซลเซียส เมื่อทดสอบที่ 40 นาที น้ำยาแช่ฟันเดนท์ ให้ค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 109.77±1.04 และ 117.50 ±3.35 น้ำนมให้ค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 103.35±1.26 และ 116.56±2.23 น้ำให้ค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 70.11±1.16 และ 83.12±1.60 น้ำเกลือให้ค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 101.95±1.76 และ 104.65±1.40 และเมื่อทดสอบที่ 90 นาที น้ำยาแช่ฟันเดนท์ ให้ค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 103.27±1.05 และ 112.57 ±1.03 น้ำนมให้ค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 99.70±1.05 และ 107.14±1.80 น้ำให้ค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 76.19±3.05 และ 80.85±2.19 น้ำเกลือให้ค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 98.21±1.83 และ 108.57±1.78

บทสรุป: การทดลองครั้งนี้พบว่าน้ำยาแช่ฟันเดนท์ มีค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตมากกว่าน้ำและน้ำเกลืออย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) และให้ประสิทธิภาพดีกว่าแฮงคส์บาลาสซอลท์ ดังนั้นน้ำยาแช่ฟันเดนท์ที่ผลิตโดยคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งมีเกลือแร่สูง เป็นน้ำยาที่สามารถนำมาใช้แช่ฟันที่หลุดจากเบ้าฟันได้เป็นอย่างดี โดยที่แช่ในอุณหภูมิห้อง (37 องศาเซลเซียส) ได้นาน 40 และ 90 นาที

รหัสคำ: ฟันอุบัติเหตุ, น้ำยาแช่ฟันเดนท์, น้ำยาแฮงคส์บาลาสซอลท์, สารเอ็มที ที, เซลล์เอ็นยึดปริทันต์, อาหารเก็บรักษาเซลล์

วิธีอ้างอิงบทความนี้: ศิริพร ทิมปาวัฒน์, สุวรรรณา ก่อสุวรรณวงศ์, ราชพร สีจันทร์. การเปรียบเทียบความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสในน้ำยาช่ฟันเดนท์น้ำยาแฮงคส์บาลาสซอลท์ น้ำนม น้ำ และน้ำเกลือ. ว ทันต มหิดล 2557; 34: 46-54.

ผู้รับผิดชอบบทความ:
ติดต่อบทความที่
สุวรรรณา ก่อสุวรรณวงศ์
สำนักงานการวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล
6 ถ.โยธี เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400
โทรศัพท์ : 02-200-7520
โทรสาร : 02-200-7698
โทรศัพท์มือถือ : 081-340-5694
อีเมล์: Suwanna.aut@mahidol.ac.th

แหล่งเงินทุน: งบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยมหิดล
วันรับเรื่อง: 7 สิงหาคม 2556
วันยอมรับการตีพิมพ์: 7 ตุลาคม 2556

บทนำ

การที่ฟันหลุดจากเบ้าฟันถือว่าเป็นอันตรายร้ายแรงที่เกิดขึ้นกับเซลล์ผิวรากฟัน แม้ว่าการเกิดอุบัติเหตุฟันหลุดจากเบ้าฟันเกิดขึ้นเพียง 1-16% ของฟันที่เกิดอุบัติเหตุทั้งหมด แต่จำเป็นที่ควรช่วยให้เซลล์ที่อยู่รอบ ๆผิวรากฟันคงสภาพเดิมและฟื้นฟูได้เร็วที่สุด ทั้งยังช่วยให้ฟันซี่นั้นยังเจริญต่อไปได้ ในกรณีรากฟันเปิดหรือสร้างไม่สมบูรณ์ ซึ่งเมื่อนำกลับเข้าเบ้าฟันแล้ว จะทำให้เนื้อเยื่อในได้รับอาหารจากเส้นเลือดและมีความรู้สึกจากเนื้อเยื่อเส้นประสาทที่เข้ามาทางปลายรากฟันได้ตามปกติ

การนำฟันกลับเข้าเบ้าฟันในทันที เป็นวิธีการทำให้เซลล์เอ็นยึดปริทันต์ (periodontal ligament) ไม่แห้งและทำให้เซลล์คงสภาพดีที่สุด แต่การนำฟันกลับเข้าที่เดิมในทันทีบางครั้งไม่สามารถทำได้ ดังนั้นการทำให้เซลล์ผิวรากฟันอยู่ในสภาพสมบูรณ์ที่สุดก่อนนำฟันเข้าสู่เบ้าฟันจึงเป็นสิ่งจำเป็น สิ่งที่มีผลต่อเซลล์ผิวรากฟันคือระยะเวลาที่ฟันอยู่นอกปากและน้ำยาที่ใช้แช่ฟันก่อนนำฟันกลับเข้าสู่เบ้าฟัน

น้ำยาแช่ฟันที่หลุดจากเบ้าฟันที่ให้ผลดีต่อเซลล์หุ้มรากฟันมีอาทิเช่น น้ำนม น้ำลาย น้ำเกลือ น้ำยาแฮงคส์บาลาสซอลท์ เป็นต้น ที่นิยมใช้เนื่องจากหยิบได้ง่ายใกล้ตัวและมีอยู่ประจำบ้าน ร้านค้าใกล้เคียงที่เกิดอุบัติเหตุ แต่น้ำนมสามารถเป็นอาหารให้แบคทีเรียเติบโตได้ง่าย ดังนั้นจึงควรแช่ไว้ไม่เกิน 3 ชั่วโมง[1] ถ้าแช่นานกว่านี้ทำให้เซลล์ที่ผิวรากฟันไม่แข็งแรงและการนำเข้าเบ้าฟันไม่ได้ผลดีเท่าที่ควร

ตั้งแต่ปี 1970[2-5] เป็นต้นมา มีผู้สนใจที่ใช้น้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ (culture medium) เพื่อทำให้เซลล์ผิวรากฟันมีอายุยืนยาวต่อไปได้ แต่เนื่องจากเป็นน้ำยาที่อยู่ในห้องปฏิบัติการจึงไม่มีผู้นำมาใช้ในขณะฟันเกิดอุบัติเหตุ ระยะต่อมาจึงนำน้ำยาแฮงคส์บาลาสซอลท์ (Hanks Balanced Salt Solution) มาใช้เป็นน้ำยาแช่ฟันจนกว่าสามารถนำฟันเข้าเบ้าฟันต่อไป และพยายามจัดให้น้ำยานี้ใช้อยู่ในภาชนะที่ใช้ง่าย สะดวก หยิบใช้ได้ง่าย ดังนั้น ในโรงพยาบาล โรงเรียน ร้านขายยา ในรถพยาบาลฉุกเฉิน ในบ้าน ควรจัดให้มีน้ำยานี้อยู่ประจำ นอกจากนี้ยังมีผู้แนะนำให้ใช้น้ำยาแช่อวัยวะที่ใช้เปลี่ยนถ่ายเช่น ไต หัวใจ น้ำยานี้คือ viaspan (Belzer UW-CSS, DuPont Pharmaceuticals, Wilmington, DE, USA) แต่น้ำยาชนิดนี้ค่อนข้างแพงเกินไป การเก็บรักษาน้ำยายุ่งยาก ดังนั้น น้ำนม น้ำลาย น้ำเกลือ หรือน้ำยาแฮงคส์บาลาสซอลท์ (เอชบีเอสเอส) จึงนำมาใช้เป็นน้ำยาแช่ฟันมานานระยะหนึ่งแล้ว จากการทดสอบแล้วน้ำยาแฮงคส์บาลาสซอลท์ เป็นน้ำยาที่ใช้กันกว้างขวางในการทำให้เซลล์คงสภาพเดิมได้นาน เพราะไม่เป็นพิษต่อเซลล์ มีอาหารเหมาะสมสำหรับเซลล์อยู่หลายชนิด[6-8] จึงทำให้น้ำยาแฮงคส์บาลาสซอลท์ มีข้อดีกว่าการใช้น้ำนม[1] และสามารถทำให้เซลล์มีชีวิตอยู่ได้ถึง 24 ชั่วโมง ถ้าอยู่นาน 48 ชั่วโมง จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตคงอยู่ได้ครึ่งหนึ่งของเซลล์ทั้งหมด ขณะที่ Viaspan มี pH ประมาณ 7.4 และOsmolality 320 mOSM สามารถทำให้เซลล์มีชีวิตอยู่[9-10] 33 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บเซลล์ไว้นาน 120 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามความมีชีวิตของเซลล์เมื่อแช่ในน้ำยาชนิดอื่น ๆ ยังต้องศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

ดังนั้นงานวิจัย จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบความสามารถที่เซลล์ไฟโบรบลาสท์คงความมีชีวิตอยู่ได้เมื่อแช่น้ำยาแช่ฟันเดนท์ น้ำยาแฮงคส์บาลาสซอลท์ น้ำนม น้ำ และน้ำเกลือ โดยให้น้ำยาสัมผัสกับเซลล์ที่อุณหภูมิห้องที่ 37 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลานาน 40 นาที และ90 นาที

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการศึกษา

การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์ที่ใช้เป็นเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ (periodental ligament หรือ PDL) ซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์จากฟันกรามแท้ซี่ที่สามปลายรากปิดของผู้ป่วยอายุเฉลี่ย 21-24 ปี ทั้งเพศชายและเพศหญิงที่ถูกถอนเนื่องจากฟันคุดตามเอกสารใบผ่านการรับรองจริยธรรมการวิจัยในคนหมายเลข COE.No. MU-IRB 2009/013.1610 โดยการนำฟันกรามแท้ที่เก็บไว้ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีฟีทัลโบวายซีรั่ม ซึ่งได้รับจากห้องผ่าตัด ภาควิชาศัลยศาสตร์ช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล นำมาเพาะ

เลี้ยงในห้องปฏิบัติการภายใต้ตู้กรองอากาศให้ปราศจากเชื้อ นำฟันกรามแท้ใส่ในจานแก้วล้างด้วยฟอสเฟตบัสเฟอร์ซาไรด์ (phosphate buffer saline 1x) เพื่อกำจัดเลือดและสิ่งปนเปื้อนอื่นๆ นำใบมีดผ่าตัดขูดบริเวณเนื้อเยื่อผิวรากฟันต่ำกว่าบริเวณซีเมนต์โตอีนาเมล จังชัน (Cementoenamel junction; CEJ)จากนั้นนำเนื้อเยื่อผิวรากฟันใส่น้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่มีฟีทรัลโบวายซีรั่มร้อยละ 10 (10% FBS of DMEM; Dubbecco's Modified Eagles, Gibco, USA) ในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระดับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 มีความชื้นสัมพัทธ์ 100% เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5-7 วัน เปลี่ยนถ่ายน้ำยาเลี้ยงเซลล์ทุก 2 วันและสังเกตเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ เมื่อเซลล์เริ่มเจริญเติบโตภายในวันที่ 7 เลี้ยงเซลล์จนกระทั่งได้เซลล์เรียงตัวชั้นเดียวจึงขยายเซลล์ต่อไปโดยการสับเคาน์เจอร์ (Sub culture) จนได้เซลล์ปฐมภูมิ (primary cell) รุ่นที่ 4 (passage 4th) เพื่อนำมาใช้ในการทดสอบเซลล์ต่อไป

วิธีการเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบเพื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์ ได้แก่ น้ำยาแฮงคส์บาลาสซอลท์ (HBSS) น้ำ(water) น้ำเกลือ(NSS) น้ำนมยูเอชที(Milk UHT) น้ำยาแช่ฟันเดนท์ (Dent-Teeth Saver) ตามตารางที่ 1

วิธีทดสอบ

นำเซลล์จำนวน 1 x10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใส่ในถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม(Costar, Corning Life Science, Acton, MA, USA) หลุมละ 200 ไมโครลิตร ได้เซลล์ 2 x10^4 เซลล์ต่อหลุม นำถาดเพาะเลี้ยงเซลล์อบในตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 37 °ซ , 5% ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และความชื้นสัมพัทธ์ 100% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้เซลล์เติบโตมีลักษณะเป็นเซลล์ชั้นเดียว (monolayer) จากนั้นนำมาทำการทดลอง โดยแบ่งการทดลองเป็น 5 กลุ่ม เพื่อใช้ทดสอบดังนี้ กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมใช้น้ำยาแฮงคส์บาลาสซอลท์ (HBSS) กลุ่มที่ 2 เป็นน้ำ กลุ่มที่ 3 เป็นน้ำเกลือ กลุ่มที่ 4 เป็นน้ำนม และ กลุ่มที่ 5 เป็นน้ำยาแช่ฟันเดนท์ (Dent -Teeth Saver) แต่ละกลุ่มเตรียมเซลล์ในถาดหลุมชนิด 96 หลุม จำนวน 4 ถาด โดย 2 ถาดแรกใช้ทดสอบในอุณหภูมิห้อง ให้น้ำยาสัมผัสเซลล์ที่เวลา 40 นาที และ 90 นาที ส่วนอีก 2 ถาด ใช้ทดสอบในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ให้น้ำยาสัมผัสเซลล์ที่เวลา 40 นาที และ 90 นาที เช่นกัน เมื่อครบเวลานำถาดแต่ละอุณหภูมิและเวลา นำมาหาจำนวนเซลล์มีชีวิตที่เหลือภายหลังมีการสัมผัสน้ำยาทดสอบด้วยวิธีการวิเคราะห์ด้วยสารเอ็มทีที (MTT assay: Dimethyl thiazol diphenyl tetrazolium bromide)[13] ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

Table 1 Type, brands and manufacturers of five preservative solution used in this experiment

Type	Brand name/ Cat. No./ Lot No.	Manufacturers
Control HBSS, Hank's Balance Salt Solution 1X	GIBCO™ Cat. No. 24020	Grand Island, New York, USA.
Distilled water	Klean & Kare	A.N.B. Laboratories Co., LTD. BKK Thailand.
Normal saline solution	Klean & Kare Lot No. 491551	A.N.B. Laboratories Co., LTD. BKK Thailand.
UHT, milk	Foremost UHT Low Fat Milk Lot No. 04A19:40 C1	Frieslandfoods Foremost Co., LTD. Thailand.
Dent-Teeth Saver	MU- HBSS Lot No. 01102006	Faculty of Dentistry, Mahidol University, BKK Thailand.

การสร้างกราฟมาตรฐานของเซลล์ไฟโบรบลาสท์

นำเซลล์เอ็นยึดปริทันต์จำนวน $5x10^3$, $1x10^4$, $2x10^4$, $4x10^4$, $6x10^4$, $8x10^4$และ $1x10^5$เซลล์ต่อหลุมใส่ในถาดเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม แล้วนำเข้าตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชม. หลังจากนั้นทำการวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต โดยใช้เทคนิคเอ็มทีที(MTT assay) นำข้อมูลที่ได้มาหาความสัมพันธ์เป็นกราฟเส้นตรง แสดงความสัมพันธ์ของจำนวนเซลล์กับค่าการดูดกลืนแสงที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) เข้าใกล้ 1

การทดสอบด้วยวิธีเอ็ม ที ที (MTT Assay) [13]

หลังจากตัวอย่างถูกทดสอบ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้ว นำตัวอย่างในถาดหลุมชนิด 96 หลุมมาใส่สารละลายเอ็ม ที ที [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2, 5–diphenyltetrazolium bromide) ที่ความเข้มข้น ร้อยละ 0.05 โดยใส่ 250 ไมโครลิตรต่อหลุม นำถาดทดสอบมาอบในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 37 องศาเซลเซียส, ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 และความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 100 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยหลักการของการประเมินพิษด้วยวิธีใช้สารเอ็มทีที เป็นการทำปฏิกิริยากับเอ็นไซม์ซัคซีนิล ดีไฮโดรจีเนส (Succinyl dehydrogenase) ซึ่งอยู่ในไมโตคอนเดรีย (mitochondria) ของเซลล์ที่มีชีวิต และทำให้สารละลายเอ็มทีทีตกตะกอนเปลี่ยนจากสีเหลืองกลายเป็นสีน้ำเงินของฟอร์มาแซน (formazan) เมื่อครบเวลา 2 ชั่วโมง ดูดสารละลายเอ็มทีทีออก ล้างเซลล์ด้วยฟอสเฟตบัพเฟอร์ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.9 (พีบีเอส) 200 ไมโครลิตรต่อหลุม จำนวน 2 ครั้ง ใส่ไดเมททิลซัลโฟไซด์ (ดีเอ็มเอสโอ) (Dimethyl sulfoxide, DMSO) จำนวน 200 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม เพื่อละลายฟอร์มาแซนออกมาจากเซลล์วางถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุมบนเครื่องเขย่าสารเป็นการช่วยเร่งการละลายเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำไปวัดค่าดูดกลืนแสง (optical density) ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่องไมโครไทเทอร์เพลทรีดเดอร์ (Micro titer plate reader,Ceres UV 900 HDI, Bio-Tek Instrument Inc, Verment, USA) โดยใช้ดีเอ็มเอสโอเป็น แบลงค์ (blank) ดังนั้นค่าดูดกลืนแสงจะแปรผันตามจำนวนฟอร์มาแซนที่ละลายออกมาจากเซลล์ที่มีชีวิต

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้จากกลุ่มทดสอบ ไปหาค่าร้อยละของเซลล์มีชีวิต (% cell viability) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยใช้สูตร

ร้อยละของเซลล์มีชีวิต =

$$\frac{\text{ค่าดูดกลืนแสงของกลุ่มทดสอบ} - \text{ค่าดูดกลืนแสงดีเอ็มเอสโอ}}{\text{ค่าดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม} - \text{ค่าดูดกลืนแสงดีเอ็มเอสโอ}} \times 100$$

นำน้ำยาแช่ฟันเดนท์ มาเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความมีชีวิตของเซลล์ในน้ำยาต่างๆ (HBSS , milk, water and NSS) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส/อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและระยะเวลาที่น้ำยาสัมผัสกับเซลล์นาน 40 นาทีและ90นาที ด้วยสถิติ Three-way ANOVA และเปรียบเทียบภายหลังการวิเคราะห์สถิติด้วย Tukey's HSD (honestly significant difference) Post Hoc Tests โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปเอสพีเอสเอส รุ่น 18 (SPSS version 18) และตั้งระดับนัยสำคัญทางสถิติของการวิเคราะห์แสดงผลที่ $p<0.05$

ผลการศึกษา

ค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ของน้ำยาประเภทต่าง ๆ พบว่าที่สภาวะอุณหภูมิห้อง เมื่อน้ำยาประเภทต่าง ๆ สัมผัสกับเซลล์นาน 40 นาที และ 90 นาที กลุ่มควบคุม (control) คือ แฮงคส์บาลาสซอลท์ (HBSS) มีค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ เท่ากับ 100 ในขณะที่น้ำยาแช่ฟันเดนท์ มีค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 109.77±1.041 และ 103.27±1.050 ค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตของเซลล์มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำยาประเภทต่าง ๆ ส่วนน้ำ (water) พบว่ามีค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 70.11±1.16 และ 76.19±3.05 ซึ่งมีค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตของเซลล์น้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำยาประเภทต่าง ๆ ส่วนน้ำนม ยู เอช ที มีค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตของเซลล์

เท่ากับ 103.35±1.26 และ 99.70 ±1.05 ในขณะที่น้ำเกลือ มีค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 101.95±1.760 และ 98.21±1.83 น้ำนม ยู เอช ที กับน้ำเกลือ เมื่อสัมผัสกับเซลล์นาน 40 นาที และ 90 นาที ให้ผลไม่แตกต่างกัน (p>0.05) ส่วนน้ำยาแฮงคส์บาลาสซอลท์ (HBSS) ให้ผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) เมื่อน้ำยาสัมผัสกับเซลล์นาน 40 นาที และ90 นาที และน้ำยาแฮงคส์บาลาสซอลท์ (HBSS) กับน้ำนม ยู เอช ที เมื่อสัมผัสกับเซลล์นาน 40 นาที ให้ผลแตกต่างกัน (p<0.05) (ตามตารางที่ 2)

ที่สภาวะ 4 องศาเซลเซียส เมื่อน้ำยาประเภทต่าง ๆ สัมผัสกับเซลล์นาน 40 นาที และ 90 นาที กลุ่มควบคุม (Control) คือ แฮงคส์บาลาสซอลท์ มีค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 100 ในขณะที่น้ำยาแช่ฟันเดนท์ มีค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 117.50±3.35 และ112.57±1.03 ซึ่งเป็นค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตของเซลล์มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำยาประเภทต่าง ๆ ส่วนน้ำ พบว่ามีค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 83.12±1.61 และ 80.85±2.19 ซึ่งพบว่ามีค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตของเซลล์น้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำยาประเภทต่าง ๆ ส่วน น้ำนม ยู เอช ที มีค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 116.56±2.23 และ 107.14 ±1.80 ในขณะที่น้ำเกลือมีค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 104.68±1.40 และ 108.57±1.78 (ตามตารางที่ 3) เมื่อเปรียบเทียบน้ำนมและน้ำ ค่าเฉลี่ยความมีชีวิตของเซลล์เมื่อแช่ในน้ำนม ที่สภาวะ 4 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 40 นาที มีผลใกล้เคียงกัน แต่เมื่อระยะเวลานานถึง 90 นาทีแล้ว ค่าเฉลี่ยของเซลล์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ยังคงมีชีวิตอยู่จำนวนมากกว่าเมื่อทิ้งไว้นาน 90 นาที ($p < 0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบน้ำเกลือ และน้ำนม ค่าเฉลี่ยความมีชีวิตของเซลล์เมื่อแช่ในน้ำเกลือ น้ำนมที่สภาวะอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียสในระยะเวลา 40 นาทีและ 90 นาที ให้ผลไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) และเมื่อแช่เซลล์ในน้ำนมที่สภาวะ 4 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 40 นาที ไม่แตกต่างกับน้ำยาแช่ฟันเดนท์ แต่เมื่อเวลานานขึ้นเป็น 90 นาที พบว่า น้ำนม และน้ำยาแช่ฟันเดนท์ ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังนั้นจึงควรเลือก น้ำยาแช่ฟันเดนท์ในการเก็บรักษาเซลล์ เนื่องจากเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์ที่ผิวรากฟันมากกว่าเก็บในน้ำนม

Table 2 Percentage of cell viability in different preservative mediums at room temperature

ประเภทน้ำยา	สภาวะอุณหภูมิห้อง (Room temperature) 37 องศาเซลเซียส		
	40 min.		90 min.
	O.D.±S.D.	*	O.D.±S.D.
Control	0.400±0.004 [1] (100±1.000)		0.383±0.004 (100±1.000)
Water	0.295±0.004 (70.11±1.160)		0.300±0.012 (76.19±3.050)
NSS	0.404±0.003 (101.95±1.760)		0.376±0.007 (98.21±1.830)
Milk (UHT)	0.409±0.005 [1] (103.35±1.260)	*	0.379±0.004 (99.70±1.050)
Dent-Teeth Saver	0.429±0.0039 (109.77±1.040)		0.394±0.004 (103.27±1.050)

* showed that $p<0.05$, the same number was significantly different

ส่วนค่าเฉลี่ยความมีชีวิตของเซลล์เมื่อแช่ในน้ำยาแฮงคส์บาลาสซอลท์ ที่อุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียสในเวลา 40 นาที แตกต่างจากที่แช่นาน 90 นาที และเช่นเดียวกับที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 40 นาที และ 90 นาที ค่าเฉลี่ยของเซลล์ที่มีชีวิตแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน ($p < 0.05$) เซลล์ที่มีชีวิตในอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เมื่อแช่ในน้ำนมเป็นเวลา 40 นาทีมีจำนวนน้อยกว่าที่แช่ในน้ำยา แฮงคส์บาลาสซอลท์ อย่างมาก ($p < 0.05$) แต่ถ้าแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที เซลล์ที่มีชีวิตในน้ำยาทั้งสองแตกต่างกัน ($p < 0.05$)

สรุปผลคือ น้ำยาแช่ฟันเดนท์ สามารถแช่ฟันในสภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่เวลา 40 นาที เหมือนน้ำยาแฮงคส์บาลาสซอลท์และน้ำนม แต่ถ้าแช่นานถึง 90 นาที ควรใช้น้ำยาแช่ฟันเดนท์ ในสภาวะอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เนื่องจากให้ค่าความมีชีวิตของเซลล์มากกว่าน้ำยาประเภทอื่นๆ

บทวิจารณ์

การทดลองนี้เพื่อเปรียบเทียบน้ำยาที่ใช้รักษาสภาพเซลล์ผิวรากฟันที่เป็นที่ยอมรับในสถาบันต่าง ๆ หลายๆ ชนิดด้วยกัน เพื่อนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์กับการรักษาเซลล์ที่หุ้มผิวรากฟันเมื่อฟันนั้นได้รับอุบัติเหตุ หลุดออกจากเบ้าฟันเพื่อให้คงสภาพอยู่ได้นานที่สุดก่อนนำกลับเข้าสู่เบ้าฟัน โดยที่ใช้เซลล์เอ็นยึดปริทันต์ซึ่งเป็นเซลล์ปฐมภูมิ เพื่อให้ใกล้เคียงกับเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ ที่ผิวรากฟันมากที่สุด การทดลองนี้ได้จัดสภาวะให้เซลล์อยู่ที่อุณหภูมิของห้องที่ 37 องศาเซลเซียส และที่ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เย็นกว่าบรรยากาศของห้องทั่ว ๆ ไป ทั้งนี้จากการทดลองของ Blomlof และคณะ [1] ให้ผลการทดลองที่แสดงว่าในอุณหภูมิที่เย็นสามารถช่วยลดการบวมของเซลล์และทำให้ความคงอยู่ของเซลล์ยาวนานขึ้น ซึ่งเป็นผลให้เมื่อนำเซลล์กลับเข้าสู่เบ้าฟันแล้วเซลล์ที่หุ้มรอบๆ รากฟันมีจำนวนเซลล์ดีมากกว่าร้อยละ 80 ทำให้การเกาะติดกับเบ้าฟันเป็นไปอย่างรวดเร็วและลดการละลายของผิวรากฟันในเวลาต่อมา

น้ำยาตัวกลางแต่ละชนิดที่ทำให้เซลล์ผิวรากฟันคงมีชีวิตอยู่ในสภาวะนอกปากมีคุณสมบัติที่แตกต่างกันอยู่บ้าง ในกรณีของน้ำยาแฮงคส์บาลาสซอลท์นั้นเป็นที่นิยมใช้แพร่หลาย เนื่องจากมีผลให้เซลล์ที่หุ้มผิวรากฟันคงความมีชีวิตอยู่นอกปากได้นานถึง 24 ชั่วโมง [11] น้ำนมเป็นน้ำยาตัวกลางที่มีความสำคัญรองลงมา การทดลองที่

Table 3 Percentage of cell viability in different preservative mediums at 4°C

ประเภทน้ำยา	4 องศาเซลเซียส (4 ° Celcius)	
	40 min.	90 min.
	O.D.±S.D. *	O.D.±S.D.
Control	0.366±0.008 (100±2.185)	0.389±0.020 [1] (100±5.141)
Water	0.310±0.006 (83.12±1.608)	0.332±0.009 [2] (80.85±2.191)
NSS	0.375±0.005 (104.68±1.395)	0.424±0.007 (108.57±1.779)
Milk (UHT)	0.417±0.008 (116.56±2.230) *	0.416±0.007 [1, 2, 3] (107.14±1.802)
Dent-Teeth Saver	0.420±0.012 (117.5±3.357)	0.437±0.004 [2, 3] (112.57±1.030)

* showed that $p<0.05$, the same number was significantly different

ผ่านมาให้ผลสรุปว่าน้ำนมสามารถทำให้เซลล์ผิวรากฟันคงสภาพอยู่ได้ดีนาน 24 ชั่วโมง [12] ทั้งนี้เพราะน้ำนมมีวิตามิน และแร่ธาตุเช่น กรด อะมิโน คาร์โบไฮเดรต ที่จำเป็นต่อความมีชีวิตของเซลล์รอบรากฟันอยู่มาก แต่อย่างไรก็ตาม น้ำนมเป็นสารที่บูดเน่าได้ในอุณหภูมิของห้อง หรือแม้แต่ในสภาวะที่เย็นขนาด 4 องศาเซลเซียส ดังนั้นน้ำนมที่สามารถนำมาใช้ในการแช่ได้จึงต้องผ่านขบวนการความร้อนเพื่อให้น้ำนมคงในสภาวะที่ไม่มีแบคทีเรีย ซึ่งขบวนการความร้อนนี้อาจทำลายสารบางตัวเช่นเอ็นไซม์ที่จำเป็นสำหรับการเจริญของเซลล์ ซึ่งจากการทดลองนี้เห็นได้ว่าที่สภาวะอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียสและในเวลา 40 นาที ค่าความมีชีวิตของเซลล์ในน้ำยาแช่ฟันเดนท์ และในน้ำนมมีค่าค่อนข้างใกล้เคียงกัน แต่ในขณะที่เซลล์เมื่ออยู่ในอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียสและสภาวะอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสแช่นานขึ้นถึง 90 นาที พบว่าความมีชีวิตของเซลล์เมื่ออยู่ในน้ำยาแช่ฟันเดนท์ (103.27 ± 1.05 และ 112.57±1.03) ซึ่งมีเซลล์ที่มีชีวิตที่มากกว่าที่แช่ในน้ำนม ดังนั้น จึงเห็นได้ว่า การแช่ในน้ำนมจึงควรเป็นทางเลือกที่สอง

การประเมินความเป็นพิษของวัสดุทันตกรรมตามเกณฑ์มาตรฐาน ISO 7405 (ISO/FDIS 7405:2008) ได้ยอมรับให้ใช้แบบจำลองในห้องปฏิบัติการที่สามารถนำมาใช้เปรียบเทียบกับการดำเนินการในทางคลินิกได้ ดังนั้นการนำเซลล์ปฐมภูมิของเซลล์เอ็นยึดปริทันต์มาทดลองในครั้งนี้ เพื่อให้ใกล้เคียงกับฟันธรรมชาติที่รอบ ๆ รากมีเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ล้อมรอบอยู่ เพื่อป้องกันไม่ให้เซลล์ละลายกระดูกมาประชิดเนื้อฟัน (dentin) และทำให้เกิดการยึดติดของกระดูกรอบๆ รากฟัน ซึ่งอาจเกิดการละลายของรากฟันและรากฟันยึดติด (ankylosis) ตามมาภายหลังได้ แม้ข้อเสียของเซลล์ปฐมภูมิคือ มีความคงทนน้อยกว่าเซลล์สายพันธุ์ (cell line) ดังนั้นการใช้เซลล์สายพันธุ์ปฐมภูมิชนิดนี้จึงมีความไวต่อการทดสอบมาก ซึ่งมีความเหมาะสมสำหรับการทดสอบน้ำยาที่ใช้รักษาสภาพเซลล์ผิวรากฟันในครั้งนี้กว่าเซลล์สายพันธุ์อื่น ๆ

น้ำยาที่ใช้รักษาสภาพเซลล์ผิวรากฟันควรมี Osmolarity ที่พอเหมาะสำหรับคงสภาพความมีชีวิตของเซลล์ผิวรากฟันสำหรับ intracellular osmolarity เกิน 450 mOsm และทิ้งให้อยู่ในระยะเวลา 2-3 ชั่วโมง สามารถทำให้เซลล์ตายได้ ดังนั้นการมีอิเลคโตรไลท์ (electrolyte) และ ออสโบลาลิตี้(Osmolarity) ที่เหมาะสมจึงเป็นสิ่งจำเป็น การที่น้ำ น้ำลาย น้ำเกลือ ที่นำมาใช้แช่ฟันที่หลุดจากเบ้า แล้วทำให้เกิดการละลายของรากฟันมากกว่าเมื่อนำฟันแช่ในน้ำนมหรือในน้ำยาแฮงคส์บาลาสซอลท์ เนื่องมาจาก ออสโบลาลิตี้ (Osmolarity) ของน้ำ น้ำลาย น้ำเกลือ ไม่เหมาะสมจึงเกิดการสูญเสียเซลล์ผิวรากฟันอย่างมาก Andreasen J O. [7,14] ทำการทดลองในฟันลิง พบว่าเมื่อเปรียบเทียบการแช่ฟันในน้ำเกลือ น้ำลาย และในน้ำประปา ซึ่งน้ำประปามี electrolyte และ Osmolarity (28 mOsm) ส่วนน้ำเกลือ และน้ำลาย มี อิเลคโตรไลท์ (electrolyte) มากกว่าน้ำประปาและ ออสโบลาลิตี้(Osmolarity) อยู่ในช่วง 285 mOsm และ 110-120 mOsm ตามลำดับเมื่อแช่ในตัวกลางเหล่านี้แล้ว ก็ยังเกิดการละลายที่ผิวรากฟันได้ใกล้เคียงกัน และเกี่ยวข้องกับระยะเวลาที่อยู่นอกเบ้าฟันนานใกล้เคียงกันด้วย พบว่าในระยะเวลา 30 นาทีที่อยู่นอกเบ้าฟัน แม้แช่ในตัวกลางทั้ง 3 ชนิด คือ น้ำเกลือ น้ำลาย น้ำประปา ก็สามารถเกิดการละลายของรากฟันสูงมาก และเมื่อเกินระยะเวลา 60 นาที และยังปล่อยให้รากฟันแห้ง หรือแม้แต่แช่ในน้ำยาทั้งสามชนิดแล้ว พบว่ามีการละลายของรากฟันหลังนำกลับเข้าเบ้าฟันเกิดขึ้นได้เกือบทั้งราก [3] ดังนั้นการเลือกใช้น้ำยาแช่ฟันเดนท์ จึงเป็นทางเลือกแรกที่ทันตแพทย์จะเลือกใช้แช่น้ำยาชนิดนี้

น้ำยาตัวกลางที่นิยมและให้ผลดีในปัจจุบันนี้คือ น้ำนม น้ำยาแฮงคส์บาลาสซอลท์ น้ำนมที่ใช้เป็นน้ำยาแช่ฟันมักผ่านการฆ่าเชื้อมาแล้วที่อุณหภูมิ 70-75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และมีส่วนประกอบที่เป็นโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต แคลเซียม หรือริโบฟลาวิน จึงทำให้เซลล์คงสภาพได้ดีเช่นเดิม น้ำยารักษาสภาพเซลล์ผิวรากฟัน เมื่อสัมผัสกับเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ (periodontal ligament: PDL) ณ อุณหภูมิห้องที่ 37 องศาเซลเซียสและที่สภาวะ 4 องศาเซลเซียส หรือที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส และ -18 องศาเซลเซียส มีผลต่อการมีชีวิตของเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ ดังมีการทดลอง [1]

ที่พบว่าฟันที่ยังเจริญไม่สมบูรณ์ของฟันสุนัข เมื่อแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หรือ 7 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 และ 120 นาที เกิดมีการละลายที่รากฟันมากกว่าเมื่อแช่ไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส ทั้งนี้เพราะเซลล์มีการเผาผลาญ (metabolism) ลดลงประมาณ 5% เมื่อเนื้อเยื่อแช่ในอุณหภูมิที่เย็นลงทุก 5 องศาเซลเซียส จากอุณหภูมิร่างกาย ซึ่งจากการทดลองนี้การแช่เซลล์ในน้ำนม หรือ น้ำยาแฮงคส์บาลาสซอลท์ แช่ที่ 4 องศาเซลเซียสนาน 90 นาที แตกต่างกัน ดังนั้นจึงแช่ในน้ำยาแฮงคส์บาลาสซอลท์ เนื่องจากค่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์มากกว่าในน้ำนม และถ้าจะแช่ที่ 37 องศาเซลเซียส ในเวลา 40 และ 90 นาที สมควรแช่ในน้ำยาแฮงคส์บาลาสซอลท์ เช่นกันเพื่อกันการละลายของรากฟันในเวลาต่อมา

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยมหิดลประจำปี พ.ศ. 2553-2555

Funding : This research project is Supported by Mahidol University

Competing interests : Nocompeting interests

Ethical approval : COE No. MU - IRB 2009/013.1610

เอกสารอ้างอิง

1. Blomlof L, Lindskog S, Andersson L, Hedstrom KG, Hammarstrom I. Storage of experimentally avulsed teeth in milk prior to replantation. ***J Dent Res*** 1983; 62: 912-6.
2. Nasjleti CE, Castelli WA, Blankenship JR. The storage of teeth before reimplantation in monkeys. A histologic study. ***Oral Surg Oral med Oral Pathol*** 1975; 39: 20-9.
3. Lekic PC, Kenny DJ, Barrett EJ. The influence of storage conditions on the clonogenic capacity of periodontal ligament cells: implications for tooth replantation. ***Int Endod J*** 1998; 31: 137-40.
4. Nordenvall KJ. Milk as storage medium for exarticulated teeth: report of a case. ***ASDC J Dent*** Child 1992; 59: 150-5.
5. Martin MP, Pileggi R. A quantitative analysis of Propolis: a promising new storage media following avulsion. ***Dent Traumatol*** 2004;20:85-9.
6. Andreasen JO. Treatment of intra-alveolar root fractures by cobalt-chromium implants. B***r J Oral Surg***. 1968; 6: 141-6.
7. Andreasen JO. Relationship between cell damage in the periodontal ligament after replant or removal of the periodontal ligament. Periodontal healing after replantation of mature permanent incisors in monkeys. ***Acta Odont Scand*** 1981; 39: 15-25.
8. Hiltz J, Trope M. Vitality of human lip fibroblasts in milk, Hank's balanced salt solution and ViaSpan storage media. ***Endod Dent Traumatol***. 1991; 7: 69-72.
9. Soder PO, Otteskog P, Andeasen JO, Modeer T. Effect of drying on vitality of periodontal membrane. ***Scand J Dent Res*** 1977; 87-5: 164-8.
10. Trope M, Friedman S. Periodontal healing of replanted dog teeth stored in ViaSpan, milk and Hank's balanced salt solution. ***Endod Dent Traumatol*** 1992; 8: 183-8.
11. Ashkenazi M,Sarnat H, Keila S.Invitro viability, mitogenicity and clonogenic capacity of periodontal ligament cells after storage in six different media. ***Endod Dent Traumatol*** 1999; 15: 149-56.
12. Vajrabhaya L, Jatulabundit W. and Surarit R. Effect of Thai milk product on the viability of PDL cells. ***J Dent Assoc Thai*** 2000; 50: 203-9.
13. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. ***J Immunol Methods*** 1983; 65: 55-63.
14. Ozan F, Polat ZA, Er K, Ozan U, Deger O. Effect of propolis on survival of periodontal ligament cells: new storage media for avulsed teeth. ***J Endod*** 2007; 33: 570-3.