ผลของสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยต่อการคงสภาพความมีชีวิตของเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ของฟันมนุษย์

Effect of Thai Propolis Crude Extracts to Preserve the Viability of Human Periodontal Ligament Cells

อัฏฐพร ปรึกษากร (Attaporn Prueksakorn)* ดร.ปัทมา ชัยเลิศวณิชกุล (Dr.Pattama Chailertvanitkul)**
สุบิน พัวศิริ (Subin Puasiri)*** ดร.สุพรรณิการ์ เรืองศรี (Dr.Supanigar Ruangsri)****

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยต่อการคงสภาพความมีชีวิตของเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ของฟันมนุษย์เปรียบเทียบกับสารละลายแฮงค์บาลานซ์ซอล์ตและนม โดยศึกษาในฟันกรามน้อยสภาพสมบูรณ์ ปลายรากปิด จำนวน 70 ซี่ หลังฟันถูกถอน ปล่อยฟันในสภาวะแห้งนาน 30 นาทีแล้วแช่ฟันในสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทย สารละลายแฮงค์บาลานซ์ซอล์ตและนม เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง สกัดแยกเซลล์จากผิวรากฟันด้วยเอนไซม์คอลลาจีเนสร่วมกับทริปซิน ประเมินความมีชีวิตของเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ด้วยวิธีย้อมสีทริปแพนบลูและนับเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับร่วมกับฮีโมไซโตมิเตอร์ ผลการทดสอบพบว่า สารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถคงสภาพความมีชีวิตของเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ของฟันมนุษย์ได้ใกล้เคียงกับสารละลายแฮงค์บาลานซ์ซอล์ต ($p>0.05$) และมากกว่านมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.001$)

ABSTRACT

The aim of this study is to evaluate the effectiveness of Thai propolis crude extracts to preserve the viability of human periodontal ligament (PDL) cells comparing with Hank's balanced salt solution (HBSS) and milk. Seventy human premolars with closed apices were used. The teeth were dried for 30 minutes after extraction and followed by a 3-hour immersion in Thai propolis crude extracts, HBSS and milk. The PDL cells were extracted from the tooth using collagenase and trypsin. The PDL cells viability was assessed by trypan blue exclusion. The numbers of viable PDL cells were counted with hemocytometer under inverted microscope. The results showed that Thai propolis crude extract concentration 2.5 mg/mL preserved percentage of viable PDL cells similar to HBSS ($p>0.05$). Thai propolis crude extract and HBSS demonstrated a significantly higher percentage of viable PDL cells than milk ($p<0.001$).

คำสำคัญ: ฟันหลุดออกจากเบ้าฟัน เซลล์เอ็นยึดปริทันต์ สารสกัดหยาบพรอพอลิสไทย

Keywords: Avulsion, PDL cells, Thai propolis crude extract

** นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาทันตกรรมบูรณะ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*

*** รองศาสตราจารย์ ภาควิชาทันตกรรมบูรณะ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*

**** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาทันตกรรมชุมชน คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*

***** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาทันตกรรมประดิษฐ์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*

บทนำ

ฟันหลุดออกจากเบ้าฟัน (avulsion) เป็นการบาดเจ็บที่มีความรุนแรงเพราะเกิดการทำลายเนื้อเยื่อปริทันต์จนฉีกขาด เซลล์เอ็นยึดปริทันต์ที่ติดมากับผิวรากฟันจะขาดสารอาหารมาเลี้ยงทำให้เกิดการตายของเซลล์ อัตราความสำเร็จภายหลังการปลูกฟันกลับคืนเบ้าฟันขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยและปัจจัยสำคัญ ได้แก่ ปริมาณและคุณภาพของเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ที่ติดมากับผิวรากฟัน (Andreasen and Kristerson, 1981) เมื่อเกิดอุบัติเหตุที่ทำให้ฟันหลุดออกจากเบ้าฟันควรรีบนำฟันปลูกกลับคืนที่เดิมทันที การปล่อยให้ฟันอยู่ในสภาวะแห้งนอกช่องปากเป็นระยะเวลานานจะทำให้เกิดการตายของเซลล์เอ็นยึดปริทันต์เพิ่มมากขึ้น ยิ่งเซลล์ถูกทำลายมาก การอักเสบจะเกิดขึ้นมากและทำลายผิวรากฟันเป็นบริเวณกว้าง ส่งผลให้เกิดการหายแบบแทนที่เคลือบรากฟันด้วยกระดูกหรือภาวะฟันยึดแข็ง (ankylosis) เพิ่มมากขึ้น ฟันที่ถูกปล่อยให้อยู่ในสภาวะแห้งนอกช่องปากนานกว่า 60 นาทีจะพบภาวะฟันยึดแข็งหลังปลูกฟันกลับคืนเบ้าฟันสูงถึงร้อยละ 100 (Cvek *et al*., 1974)

ในสถานการณ์ที่ไม่สามารถนำฟันที่หลุดออกจากเบ้าฟันใส่กลับคืนที่เดิมได้ทันที การเลือกสารตัวกลางที่เหมาะสมสำหรับเก็บฟันก่อนที่จะได้รับการรักษาโดยทันตแพทย์จึงเป็นสิ่งที่สำคัญ สารตัวกลางแช่ฟันที่ดีจะต้องเอื้อต่อการมีชีวิตอยู่และเจริญแบ่งตัวต่อไปได้ของเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ International Association of Dental Traumatology (IADT) (2012) แนะนำให้เก็บฟันที่หลุดออกจากเบ้าฟันในสารละลายแฮงค์บาลานซ์ซอล์ต (Hank's balanced salt solution, HBSS) นม หรือสารตัวกลางอื่น ๆ ที่มีความเหมาะสม

พรอพอลิสเป็นสารเหนียวคล้ายยางไม้ มีสีเหลืองอ่อนจนถึงน้ำตาลเข้ม ผึ้งงานจะทำหน้าที่เก็บรวบรวมยางไม้หรือของเหลวจากพืชชนิดต่าง ๆ แล้วนำมาผสมกับเอนไซม์ในน้ำลายของผึ้ง (Burdock, 1998) พรอพอลิส ประกอบด้วย เรซินร้อยละ 50 ไขผึ้งร้อยละ 30 น้ำมันหอมระเหยร้อยละ 10 ละอองเกสรดอกไม้ร้อยละ 5 และสารอื่น ๆ ร้อยละ 5 (Bankova *et al*., 1995) พรอพอลิสมีองค์ประกอบทางเคมีหลักคือ ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งการอักเสบ มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านเชื้อรา และต้านไวรัส นอกจากนี้ยังพบสารกลุ่มอื่น เช่น กรดฟีนอลิก (phenolic acid) เอสเทอร์ (ester) ฟีนอลิกแอลดีไฮด์ (phenolic aldehyde) และคีโตน (ketone) องค์ประกอบเหล่านี้จะแตกต่างกันตามชนิดของพืชในแต่ละพื้นที่ซึ่งมีลักษณะภูมิประเทศและภูมิอากาศที่แตกต่างกัน (Burdock, 1998)

พรอพอลิสที่เก็บจากประเทศต่าง ๆ เช่น บราซิล อินเดียและจีน ถูกนำมาศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและพัฒนาเป็นวัสดุทางทันตกรรมหลายชนิด พรอพอลิสที่เก็บจากประเทศไทยมีองค์ประกอบทางเคมีหลักคือ ฟลาโวนอยด์และสารประกอบฟีนอลิก (Athikomkulchai *et al*., 2013) สารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสเตร็ปโตค็อคคัสมิวแทนส์ (Streptococcus mutans) เชื้อแลคโตบาซิลัสคาเซไอ (Lactobacillus casei) (Namsirikul, 2014) และเชื้อสแตปไฟโรค็อคคัสออเรียส (Staphylococcus aureus) (Siripatrawan, 2013) สารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อในของฟันมนุษย์และสามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ (Chaipanha, 2013) นอกจากนี้ ผลการศึกษาเมื่อใช้ผลิตภัณฑ์พรอพอลิสไทยปิดทับเนื้อเยื่อในโดยตรง (direct pulp capping) ในฟันมนุษย์ที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ พบว่าลักษณะการหายของแผลไม่แตกต่างจากการใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์ปิดทับเนื้อเยื่อในโดยตรง (Rungcharassaeng, 2015)

สารสกัดพรอพอลิสถูกนำมาทดสอบเพื่อเป็นสารตัวกลางแช่ฟันครั้งแรกโดย Martin and Pileggi (2004) และพบว่าสารสกัดพรอพอลิสสามารถคงสภาพความมีชีวิตของเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ได้มากกว่านม น้ำเกลือ และสารละลายแฮงค์บาลานซ์ซอล์ตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Ozan *et al*. (2007), Casaroto *et al*. (2010) และ Saxena *et al*.

(2011) การศึกษาเหล่านี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดพรอพอลิสมีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการพัฒนาเพื่อเป็นสารตัวกลางแช่ฟัน ปัจจุบันการศึกษาผลของสารสกัดพรอพอลิสเมื่อใช้เป็นสารตัวกลางแช่ฟันมักเป็นสารสกัดพรอพอลิสที่มีแหล่งกำเนิดในประเทศอื่น ๆ เช่น บราซิล ตุรกีและอินเดีย แต่ยังไม่มีการศึกษาผลของสารสกัดพรอพอลิสที่เก็บได้ในประเทศไทย การวิจัยครั้งนี้ต้องการศึกษาผลของสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยเมื่อใช้เป็นสารตัวกลางแช่ฟัน โดยประเมินผลจากจำนวนของเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ที่มีชีวิตอยู่ซึ่งมีผลต่อกระบวนการหายภายหลังจากนำฟันปลูกกลับคืนเบ้าฟัน

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อเปรียบเทียบจำนวนของเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ที่มีชีวิตอยู่หลังจากนำฟันมนุษย์ที่หลุดออกจากเบ้าฟันมาแช่ในสารตัวกลางแช่ฟันต่างชนิดกัน ได้แก่ สารสกัดหยาบพรอพอลิสไทย สารละลายแฮงค์บาลานซ์ซอล์ตและนม

วิธีการวิจัย

รูปแบบการวิจัย

การวิจัยเชิงทดลองในห้องปฏิบัติการ

เกณฑ์การเลือกตัวอย่างที่ศึกษา

ฟันกรามน้อยบนและล่างที่มีสภาพตัวฟันและรากฟันสมบูรณ์ ปลายรากปิด ถูกถอนจากผู้ป่วยอายุระหว่าง 18 ถึง 30 ปีที่จำเป็นต้องได้รับการถอนฟันซี่นั้น ๆ ออกเพื่อการจัดฟัน จำนวน 70 ซี่

1. การเตรียมสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทย

1.1 นำรังผึ้งที่เก็บจากจังหวัดหนองคาย มาขูดแยกเฉพาะยางเหนียวสีน้ำตาลเข้มที่พอกปิดตามรูของรังผึ้งซึ่งเป็นส่วนของพรอพอลิสรวมไว้เป็นก้อน ปั่นก้อนพรอพอลิสให้เป็นชิ้นขนาดเล็ก และแช่ในเอทานอลร้อยละ 95 ในอัตราส่วนสารตั้งต้นพรอพอลิส 1 กรัมต่อเอทานอล 5 มิลลิลิตร ในขวดแก้วขนาด 1 ลิตร ห่อภาชนะบรรจุด้วยกระดาษฟอยล์

1.2 เขย่าส่วนผสมข้างต้นด้วยเครื่องเขย่าสาร (orbital shaker incubator, MRC lab, Hagavish st., Israel) ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน กรองสารสกัดด้วยกระดาษกรองวัตแมนเบอร์ 1 และชุดกรวยกรองบุชเนอร์ เพื่อแยกกาก ไข เศษผงและขี้ผึ้งออก

1.3 นำสารสกัดที่ได้จากการกรองในข้อ 1.2 มาแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมากรองไขผึ้งออกด้วยกระดาษวัตแมนเบอร์ 1 ทำซ้ำจนได้สารสกัดที่มีลักษณะใส

1.4 ระเหยตัวทำละลายเอทานอลในสารสกัดออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (rotary evaporator, EYELA OIL BATH OSB-2000, Tokyo RIKAKIKAI Co., Japan) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เก็บสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยชนิดเหลวที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ป้องกันไม่ให้ถูกแสงด้วยการห่อด้วยกระดาษฟอยล์จนกว่าจะนำมาใช้ทดสอบ และนำสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยบางส่วนไปทำให้แห้ง (freeze dryer, รุ่น Alpha 2-4 LD plus, Martin Christ, Germany) ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสเพื่อหาความเข้มข้น ซึ่งพบว่าสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยในรูปกึ่งของเหลว (semi-solid) มีความเข้มข้น 908.77 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและคำนวณเป็นร้อยละของปริมาณสารที่สกัดได้ (%Yield) เท่ากับร้อยละ 3.26 โดยน้ำหนัก

2. ขั้นตอนการทดลอง

พรอพอลิสเป็นสารสกัดจากธรรมชาติ จึงยังไม่มีการกำหนดค่าความเข้มข้นมาตรฐานเพื่อเป็นสารตัวกลางแช่ฟัน การทดสอบจึงแบ่งออกเป็นข้อ 2.1 (หาความเข้มข้นของสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยที่เหมาะสมเพื่อเป็นสารตัวกลางแช่ฟัน) และ 2.2 (เปรียบเทียบกับสารละลายแฮงค์บาลานซ์ซอล์ตและนม) ซึ่งใช้วิธีการทดสอบแบบเดียวกัน ขั้นตอนการทดสอบและสกัดแยกเซลล์จะทำโดยผู้วิจัยเพียงคนเดียว เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการวิจัยจะเป็นผู้นับจำนวนเซลล์และบันทึกผล โดยผู้นับจะไม่ทราบว่ากำลังนับ

เซลล์จากกลุ่มการทดลองใด ผู้นับเซลล์จะถูกทดสอบเพื่อประเมินความน่าเชื่อถือภายในตัว (intra-examiner reliability) ด้วยสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ภายในชั้น (Intraclass Correlation Coefficients, ICC)

2.1 การหาความเข้มข้นของสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยที่สามารถคงความมีชีวิตของเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ของฟันมนุษย์ที่ถูกถอนออกจากเบ้าฟันได้สูงที่สุด

2.1.1 นำฟันกรามน้อยที่ถูกถอนอย่างระมัดระวังมาขูดเนื้อเยื่อส่วนบนเป็นระยะประมาณ 3 มิลลิเมตรจากส่วนคอฟันด้วยมีดเบอร์ 15 เพื่อกำจัดเซลล์เนื้อเยื่อเหงือกออก ล้างฟันด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ (Gibco®, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) ความเข้มข้น 1 เท่า เพื่อกำจัดเลือดและเศษสิ่งตกค้างออก

2.1.2 เก็บฟันในภาชนะที่มีฝาปิดให้อยู่ในสภาวะแห้งต่อจนครบ 30 นาที (นับเวลาตั้งแต่ขูดเนื้อเยื่อ) แบ่งฟันออกเป็นฟันกรามน้อยบนและล่าง แล้วจัดเข้ากลุ่มทดลองด้วยวิธีการสุ่มอย่างง่าย ดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมสิ่งแวดล้อม จำนวน 4 ซี่ แช่ฟันในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ความเข้มข้น 1 เท่า ปริมาตร 1 มิลลิลิตรเป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง

กลุ่มที่ 2 จำนวน 24 ซี่ แบ่งออกเป็นกลุ่มสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้นต่าง ๆ (0.25, 0.5, 1, 2.5, 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จำนวนกลุ่มละ 4 ซี่ แช่ฟันในสารละลายปริมาตร 1 มิลลิลิตรเป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง

กลุ่มที่ 3 กลุ่มควบคุมบวก จำนวน 4 ซี่ คือฟันที่ถูกถอนออกจากเบ้าฟันแล้วนำไปทดสอบหาปริมาณเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ที่มีชีวิตอยู่ทันที

กลุ่มที่ 4 กลุ่มควบคุมลบ จำนวน 4 ซี่ คือฟันที่ถูกถอนออกจากเบ้าฟันแล้วปล่อยให้อยู่ในสภาวะแห้งเป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง และนำไปทดสอบหาปริมาณเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ที่มีชีวิตอยู่

2.1.3 นำฟันในกลุ่มทดลอง กลุ่มควบคุมบวกและกลุ่มควบคุมลบมาประเมินจำนวนของเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ที่มีชีวิตอยู่ตามวิธีของ Rajendran *et al*. (2011) โดยแช่ฟันลงในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตรซึ่งบรรจุสารละลายปริมาตร 1 มิลลิลิตร ประกอบด้วยเอนไซม์คอลลาจีเนส (Sigma-Aldrich®, Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, USA) ที่มีความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและเอนไซม์ทริปซิน (Sigma-Aldrich®, Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, USA) ที่มีความเข้มข้น 2.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ความเข้มข้น 1 เท่า เป็นระยะเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วเติมซีรัม (Gibco®, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลองทุกหลอด

2.1.4 ปั่นแยกเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงสารตกตะกอน (temperature adjustable centrifuge, รุ่น MPW-350R, MPW Med. Instruments, Warsaw, Poland) ที่ความเร็ว 1000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 5 นาที จากนั้นนำฟันออกจากหลอดทดลองและกำจัดส่วนที่ลอยอยู่เหนือผิวสารละลายด้วยไมโครปิเปตต์

2.1.5 นำเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ที่ได้มาติดฉลากด้วยสีย้อมทริปแพนบลู ความเข้มข้นร้อยละ 0.4 (Gibco®, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) ตามวิธีของ Pant *et al*. (2001) ในอัตราส่วนสีย้อมต่อความเข้มข้นของสารละลายเท่ากับ 1 ต่อ 1 ทิ้งไว้ 5 นาที นำสารละลายปริมาตร 10 ไมโครลิตรมาตรวจนับปริมาณเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (inverted microscope, รุ่น Axiovert 25, Zeiss Frankfurt, Germany) ร่วมกับเครื่องมือนับจำนวนเซลล์ฮีโมไซโตมิเตอร์ที่กำลังขยาย 10 เท่า คำนวณจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ด้วยสมการ (Phelan, 2007)

ปริมาณเซลล์ทั้งหมดที่มีชีวิตอยู่ = [จำนวนของเซลล์ที่ไม่ติดสี (มีชีวิตอยู่) × (ปริมาณของสารละลายเซลล์ + ปริมาณของสีย้อมทริปแพนบลู) × 10^4] / (จำนวนของช่องฮีโมไซโตมิเตอร์ที่ใช้ในการนับ × ปริมาณของสารละลายเซลล์)

ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ = (จำนวนของเซลล์ที่ไม่ติดสี / จำนวนเซลล์ที่นับได้ทั้งหมด) × 100

2.2 การทดสอบผลของสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทย สารละลายแฮงบาลานซ์ซอล์ตและนมต่อความมีชีวิตของเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ของฟันมนุษย์ที่ถูกถอนออกจากเบ้าฟันด้วยวิธีทริปแพนบลู

2.2.1 เตรียมฟันกรามน้อยที่จะนำมาทดสอบเช่นเดียวกับขั้นตอนข้อ 2.1.1 และ 2.1.2 แบ่งฟันออกเป็นฟันกรามน้อยบนและล่างแล้วจัดเข้ากลุ่มทดลองด้วยวิธีการสุ่มอย่างง่าย ดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทย ซึ่งจะใช้ความเข้มข้นที่สามารถคงสภาพความมีชีวิตของเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ได้ดีที่สุดจากผลการทดลองข้อ 2.1 จำนวน 10 ซี่ แช่ฟันในสารละลายปริมาตร 1 มิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง

กลุ่มที่ 2 กลุ่มสารละลายแฮงค์บาลานซ์ซอล์ต (Gibco®, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) จำนวน 10 ซี่ แช่ฟันในสารละลายปริมาตร 1 มิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง

กลุ่มที่ 3 กลุ่มนม (UHT milk, Thai-Danish®, D.P.O. Thai-Danish Co., Ltd., Bangkok, Thailand) จำนวน 10 ซี่ แช่ฟันในสารละลายปริมาตร 1 มิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง

กลุ่มที่ 4 กลุ่มควบคุมบวก จำนวน 6 ซี่ (นับรวมผลจากการทดลองข้อ 2.1 แล้ว)

กลุ่มที่ 5 กลุ่มควบคุมลบ จำนวน 6 ซี่ (นับรวมผลจากการทดลองข้อ 2.1 แล้ว)

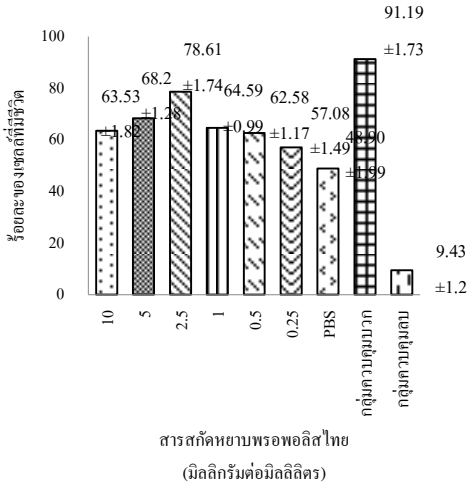
2.2.2 นำฟันในกลุ่มทดลอง กลุ่มควบคุมบวกและกลุ่มควบคุมลบมาประเมินจำนวนของเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ที่มีชีวิตอยู่ตามขั้นตอนข้อ 2.1.3 ถึงข้อ 2.1.5 ดังกล่าวมาแล้วข้างต้น

การวิเคราะห์ทางสถิติ

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยละของจำนวนเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ที่มีชีวิตของฟันที่หลุดออกจากเบ้าฟันในกลุ่มทดลองที่แช่ฟันในสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้นต่าง ๆ และกลุ่มควบคุมสิ่งแวดล้อม ที่ระยะเวลา 3 ชั่วโมง และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยละของจำนวนเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ที่มีชีวิตของฟันที่หลุดออกจากเบ้าฟันในกลุ่มทดลองที่แช่ฟันในสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทย สารละลายแฮงค์บาลานซ์ซอล์ตและนม ที่ระยะเวลา 3 ชั่วโมง ด้วยสถิติการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One Way ANOVA) เมื่อพบความแตกต่างระหว่างกลุ่มจึงทดสอบความแตกต่างระหว่างคู่โดยใช้การวิเคราะห์แบบ Bonferroni ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS for windows version 19 ทดสอบแบบสองทางที่ $\alpha = 0.05$

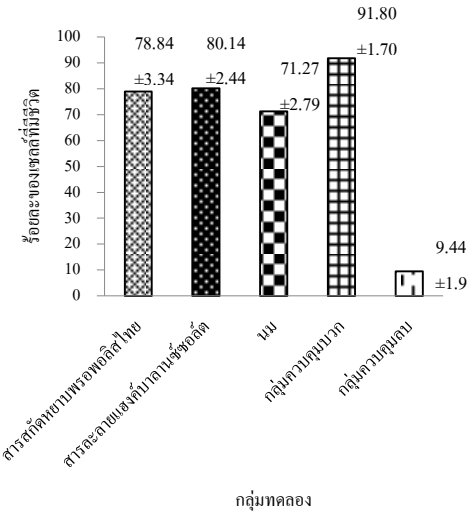
ผลการวิจัย

ความน่าเชื่อถือภายในตัวผู้นับเซลล์มีค่าเท่ากับ 0.990 ที่ช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (0.893, 0.999) ซึ่งจัดอยู่ในระดับสูง (Shrout, 1998)



ภาพที่ 1 ร้อยละของจำนวนเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ที่มีชีวิตหลังปล่อยฟันในสภาวะแห้ง 30 นาที แล้วแช่ฟันในสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้นต่าง ๆ 3 ชั่วโมง กลุ่มควบคุมบวกและลบ

ผลการทดสอบเพื่อหาความเข้มข้นของสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยที่สามารถคงความมีชีวิตของเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ของฟันมนุษย์ที่ถูกถอนออกจากเบ้าฟันได้สูงที่สุดแสดงดังภาพที่ 1 พบว่าสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถคงความมีชีวิตของเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ได้สูงที่สุดเท่ากับ ร้อยละ 78.61±1.74 ซึ่งแตกต่างจากสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้นอื่น ๆ และกลุ่มควบคุมสิ่งแวดล้อม (ร้อยละ 48.90±1.99) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.001$) รองลงมาคือ สารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ร้อยละ 68.27±1.28) สารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ร้อยละ 64.59±0.99) สารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ร้อยละ 63.53±1.82) สารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ร้อยละ 62.58±1.17) และสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ร้อยละ 57.08±1.49) ตามลำดับ



ภาพที่ 2 ร้อยละของจำนวนเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ที่มีชีวิตหลังปล่อยฟันในสภาวะแห้ง 30 นาที แล้วแช่ฟันในสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารละลายแฮงค์บาลานซ์ซอล์ตและนม 3 ชั่วโมง กลุ่มควบคุมบวกและลบ

ดังนั้นการทดสอบสมมติฐานการวิจัยจึงเลือกเตรียมสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเพื่อเปรียบเทียบกับสารละลายแฮงค์บาลานซ์ซอล์ตและนม ผลการทดสอบแสดงดังภาพที่ 2 พบว่า สารละลายแฮงค์บาลานซ์ซอล์ตและสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถคงความมีชีวิตของเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) โดยสารละลายแฮงค์บาลานซ์ซอล์ตสามารถคงความมีชีวิตของเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ได้สูงที่สุดเท่ากับร้อยละ 80.14±3.34 ใกล้เคียงกับสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งสามารถคงความมีชีวิตของเซลล์เอ็นยึดปริ

ทันต์ได้ร้อยละ 78.84±3.34 ส่วนนมสามารถคงความมีชีวิตของเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ได้น้อยที่สุดเท่ากับร้อยละ 71.27±2.79 ซึ่งน้อยกว่าสารละลายแฮงค์บาลานซ์ซอล์ตและสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.001$)

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

ฟันหลุดออกจากเบ้าฟันเป็นอุบัติเหตุที่มีความรุนแรงและทำลายอวัยวะปริทันต์ที่รองรับบริเวณรากฟันมากที่สุด อัตราความสำเร็จหลังการใส่ฟันกลับคืนเบ้าฟันขึ้นอยู่กับปริมาณและคุณภาพของเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ที่ติดมากับรากฟัน (Andreasen and Kristerson, 1981) ซึ่งสัมพันธ์กับกระบวนการหายหลังการรักษา หากเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ที่ติดมากับผิวรากฟันถูกทำลายเพียงเล็กน้อย การซ่อมแซมอวัยวะปริทันต์รอบปลายรากฟันจะสร้างเคลือบรากฟันขึ้นใหม่และป้องกันการละลายของผิวรากฟัน เมื่อฟันหลุดออกจากเบ้าฟันจึงไม่ควรเก็บฟันแบบแห้งนอกช่องปาก เพราะจะทำให้เซลล์เอ็นยึดปริทันต์ถูกทำลายมาก การเก็บรักษาฟันในสารตัวกลางแช่ฟันที่เหมาะสมต่อการคงสภาพความมีชีวิตของเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ก่อนมาพบทันตแพทย์จึงมีความสำคัญสารละลายแฮงค์บาลานซ์ซอล์ตเป็นสารตัวกลางที่แนะนำให้เลือกใช้เป็นตัวแรกในการเก็บรักษาฟันที่หลุดออกจากเบ้าฟัน (Udoye *et al.*, 2012) เพราะมีคุณสมบัติที่เหมาะสมและมีสารอาหารที่จำเป็นต่อการมีชีวิตของเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ส่วนที่ติดมากับผิวรากฟัน ในประเทศไทยมีการผลิตน้ำยารักษาสภาพเซลล์ผิวรากฟัน (Timpawat, 2014) ซึ่งเป็นสารละลายแฮงค์บาลานซ์ซอล์ต ผลิตและจำหน่ายโดยคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล แต่ราคาค่อนข้างสูงและไม่มีวางจำหน่ายโดยทั่วไปในท้องตลาด จึงมีข้อจำกัดในการนำมาใช้งาน นมมีคุณสมบัติและสารอาหารบางอย่างซึ่งเพียงพอต่อการคงสภาพความมีชีวิตของเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ ราคาไม่แพงและมีจำหน่ายทั่วไปในท้องตลาด จึงถูกนำมาใช้เป็นสารตัวกลางแช่ฟันอย่างแพร่หลาย นมสามารถคงความมีชีวิตของเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ได้อย่างมีประสิทธิภาพในระยะเวลาไม่เกิน 2 ชั่วโมง (Lekic *et al.*, 1998) ปัจจุบันมีสารตัวกลางอื่นๆ ที่ถูกนำมาทดสอบและพบว่ามีแนวโน้มในการเป็นสารตัวกลางแช่ฟันที่ดี อย่างเช่น พรอพอลิส

การศึกษานี้เลือกพรอพอลิสที่เก็บจากจังหวัดหนองคาย สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 95 มาทดสอบผลต่อการคงสภาพความมีชีวิตของเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ เนื่องจาก Namsirikul (2014) ศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพรอพอลิสจากแหล่งเดียวกัน พบว่าพรอพอลิสจากจังหวัดหนองคายที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 95 มีองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญ คือ ฟลาโวนอยด์ร้อยละ 10 และสารประกอบฟีนอลิก ร้อยละ 2.95 โดยน้ำหนัก ซึ่งทำให้สารสกัดหยาบพรอพอลิสมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ต้านเชื้อแบคทีเรีย และต้านการอักเสบ (Burdock, 1998)

การศึกษานี้ใช้ฟันกรามน้อยทั้งซี่ในการทดสอบเพื่อจำลองให้คล้ายกับสถานการณ์จริงที่ฟันหลุดออกจากเบ้าฟันแล้วนำมาเก็บในสารตัวกลางแช่ฟัน ฟันทุกซี่ถูกถอนโดยทันตแพทย์คนเดียวกัน แรงที่กระทำต่อเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ขณะถอนฟันจึงใกล้เคียงกัน ขั้นตอนการทดสอบและการสกัดแยกเซลล์จะทำโดยผู้วิจัยเพียงคนเดียว เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการวิจัยจะเป็นผู้นับจำนวนเซลล์และบันทึกผล ซึ่งมีข้อดีคือ ผู้นับจะไม่ทราบว่าตัวอย่างที่กำลังนับเซลล์เป็นตัวอย่างในกลุ่มการทดลองใด เพื่อลดอคติในการนับจำนวนเซลล์ที่ติดสีย้อมและไม่ติดสีย้อม

Andreasen and Hjørting-Hansen (1966) พบว่าฟันที่ปลูกกลับคืนเบ้าฟันภายในระยะเวลา 30 นาทีจะมีอัตราความสำเร็จหลังการรักษาสูง การศึกษานี้เลือกปล่อยให้ฟันอยู่ในสภาวะแห้ง 30 นาทีก่อนแช่ฟันในสารตัวกลาง เพราะในสถานการณ์จริงเมื่อฟันหลุดออกจากเบ้าฟัน ฟันมักจะถูกปล่อยให้อยู่ในสภาวะแห้งระหว่างรอการจัดหาสารตัวกลางเพื่อแช่ฟันประมาณ 30 นาที ฟันที่ถูกปล่อยให้อยู่ในสภาวะแห้ง 30 นาทีจะ

เกิดการตายของเซลล์เอ็นยึดปริทันต์บางส่วนแต่ยังมีจำนวนเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ที่มีชีวิตเหลืออยู่เพียงพอต่อการทดสอบ การศึกษานี้แช่ฟันในสารตัวกลางต่าง ๆ นาน 3 ชั่วโมง เพื่อให้ครอบคลุมระยะเวลาที่ฟันถูกแช่ในสารตัวกลางแช่ฟันก่อนผู้ป่วยจะพบทันตแพทย์และได้รับการปลูกฟันกลับคืนเบ้าฟัน

การสกัดแยกเซลล์จากเนื้อเยื่อปริทันต์รอบปลายรากฟันพบว่ามีเซลล์หลากหลายชนิดปะปนกัน การนับเซลล์จะเลือกนับเฉพาะเซลล์เอ็นยึดปริทันต์เพียงอย่างเดียว โดยนับเซลล์ที่มีขนาดและรูปร่างใกล้เคียงกับเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ต้นแบบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบริเวณปลายรากฟันและทำให้หลุดจากถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยเอนไซม์ทริปซิน การประเมินความมีชีวิตของเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ด้วยการย้อมสีทริปแพนบลูเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย ราคาไม่แพง มีความไวสูงเพราะวัดการสูญเสียความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์โดยตรง แต่การย้อมสีทริปแพนบลูประเมินได้เฉพาะความมีชีวิตของเซลล์แต่ไม่สามารถบอกความสมบูรณ์หรือกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ได้

การศึกษานี้พบว่า หลังปล่อยฟันให้อยู่ในสภาวะแห้ง 30 นาทีแล้วแช่ฟันเป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง สารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถคงความมีชีวิตของเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ได้ดีที่สุด และเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายแฮงค์บาลานซ์ซอล์ตและนมพบว่าสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถคงความมีชีวิตของเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ไม่แตกต่างจากสารละลายแฮงค์บาลานซ์ซอล์ตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ทั้งสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและสารละลายแฮงค์บาลานซ์ซอล์ตสามารถคงความมีชีวิตของเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ได้สูงกว่านมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการศึกษานี้คล้ายคลึงกับการศึกษาของ Gopikrishna *et al*. (2008) ซึ่งทดสอบสารสกัดพรอพอลิสจากประเทศอินเดีย อย่างไรก็ตาม การศึกษาของ Martin and Pileggi (2004) พบว่า สารสกัดพรอพอ ลิสจากประเทศบราซิลสามารถคงความมีชีวิตของเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ได้มากกว่าสารละลายแฮงค์บาลานซ์ซอล์ต อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการศึกษาที่แตกต่างกันอาจเกิดจากความหลากหลายของปริมาณสารสำคัญและองค์ประกอบทางเคมีซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของพันธุ์ไม้ที่ผึ้งเก็บรวบรวมมาผลิตเป็นพรอพอลิส การศึกษาของ Ozan *et al*. (2007) Casaroto *et al*. (2010) และ Saxena *et al*. (2011) ทดสอบกับเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ของมนุษย์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง พบว่าสารสกัดพรอพอลิสสามารถคงความมีชีวิตของเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ได้สูงกว่าสารละลายแฮงค์บาลานซ์ซอล์ตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระยะเวลา 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง การศึกษาเหล่านี้ทดสอบกับกลุ่มตัวอย่างคือเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ของฟันมนุษย์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง เซลล์เหล่านี้มีความสมบูรณ์มากกว่าเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ที่ติดมากับผิวรากฟันของฟันกรามน้อยที่ถูกถอนแล้วนำมาทดสอบทันที เพราะเซลล์ที่ติดมากับผิวรากฟันได้รับบาดเจ็บจากแรงดึงขณะถอนฟัน ดังนั้นการตอบสนองของเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ต่อสารตัวกลางที่นำมาทดสอบจึงแตกต่างกันด้วย

ผลจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยจากจังหวัดหนองคายที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 95 ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถคงความมีชีวิตของเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ของฟันมนุษย์ได้ใกล้เคียงกับสารละลายแฮงค์บาลานซ์ซอล์ตและสูงกว่านม ดังนั้นสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยจึงมีแนวโน้มที่จะเป็นสารตัวกลางแช่ฟันที่ดี การศึกษานี้ใช้สารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยที่ยังไม่มีการเติมสารเคมีใด ๆ เพื่อคงคุณภาพของสารสกัด จึงจำเป็นต้องเก็บรักษาในสภาวะเย็นและปราศจากแสงก่อนนำมาทดสอบ ทั้งนี้ต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมทั้งในห้องปฏิบัติการและในทางคลินิกเพื่อกำหนดค่าความเข้มข้นมาตรฐานที่จะใช้เป็นสารตัวกลางแช่ฟัน รวมถึงการเติมสารต่าง ๆ เพื่อให้สารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยสามารถเก็บไว้ได้นานที่อุณหภูมิห้องและอยู่ในรูปแบบที่สะดวกต่อการนำมาใช้งาน การศึกษานี้เป็น

การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับฤทธิ์ของสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยจึงยังไม่สามารถประเมินต้นทุนการผลิตน้ำยาแช่ฟันจากสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ขอขอบคุณ นายพิบูรณ์ เหง้าณี ผู้นับเซลล์และช่วยเก็บข้อมูลงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

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. Dent Traumatol 2012; 28(2): 88-96.

Andreasen JO, Hjorting-Hansen E. Replantation of teeth. I. Radiographic and clinical study of 110 human teeth replanted after accidental loss. Acta Odontol Scand 1966; 24(3): 263-86.

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 Odontol Scand 1981; 39(1): 1-13.

Athikomkulchai S, Awale S, Ruangrungsi N, Ruchirawat S, Kadota S. Chemical constituents of Thai propolis. Fitoterapia 2013; 88: 96-100.

Bankova V, Christov R, Kujumgiev A, Marcucci MC, Popov S. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. Z Naturforsch C 1995; 50(3-4): 167-72.

Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). Food Chem Toxicol 1998; 36(4): 347-63.

Casaroto AR, Hidalgo MM, Sell AM, Francom SL, Cuman RK, Moreschi E, *et al*. Study of the effectiveness of propolis extract as a storage medium for avulsed teeth. Dent Traumatol 2010; 26(4): 323-31.

Chaipanha P. Effect of Thai propolis crude extracts on the cytotoxicity and proliferation of human dental pulp cells, *in vitro* [Master Thesis in Restorative Dentistry]. Khon Kaen: The Graduate School, Khon Kaen University; 2013 [in Thai].

Cvek M, Granath LE, Hollender L. Treatment of non-vital permanent incisors with calcium hydroxide. 3. Variation of occurrence of ankylosis of reimplanted teeth with duration of extra-alveolar period and storage environment. Odontol Revy 1974; 25(1): 43-56.

Gopikrishna V, Thomas T, Kandaswamy D. A quantitative analysis of coconut water: a new storage media for avulsed teeth. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2008; 105(2): e61-5.

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(2): 137-40.

Martin MP, Pileggi R. A quantitative analysis of Propolis: a promising new storage media following avulsion. Dent Traumatol 2004; 20(2): 85-9.

Namsirikul T. Manufacturing of Thai propolis product for human pulp capping material [Master Thesis in Restorative Dentistry]. Khon Kaen: The Graduate School, Khon Kaen University; 2014 [in Thai]

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(5): 570-3.

Pant AB, Agarwal AK, Sharma VP, Seth PK. *In vitro* cytotoxicity evaluation of plastic biomedical devices. Hum Exp Toxicol 2001; 20(8): 412-7.

Phelan MC. Basic techniques in mammalian cell tissue culture. Curr Protoc Cell Biol 2007; 36: 1.1.1-1.1.18.

Rajendran P, Varghese NO, Varughese JM, Murugaian E. Evaluation, using extracted human teeth, of Ricetral as a storage medium for avulsions - an *in vitro* study. Dent Traumatol 2011; 27(3): 217-20.

Rungcharassaeng N. A Comparative Wound Healing Effect of Direct Pulp Capping with Thai Propolis Product and Calcium Hydroxide using Whole Tooth Culture Model [Master Thesis in Restorative Dentistry]. Khon Kaen: The Graduate School, Khon Kaen University; 2015 [in Thai]

Saxena P, Pant VA, Wadhwani KK, Kashyap MP, Gupta SK, Pant AB. Potential of the propolis as storage medium to preserve the viability of cultured human periodontal ligament cells: an *in vitro* study. Dent Traumatol 2011; 27(2): 102-8.

Shrout PE. Measurement reliability and agreement in psychiatry. Stat Methods Med Res 1998; 7(3): 301-17.

Siripatrawan U, Vitchayakitti W, Sanguandeekul R. Antioxidant and antimicrobial properties of Thai propolis extracted using ethanol aqueous solution. Int J Food SCi Tech 2013; 48: 22-27.

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.

Udoye CI, Jafarzadeh H, Abbott PV. Transport media for avulsed teeth: a review. Aust Endod J 2012; 38(3): 129-36.