

การปรับเปลี่ยนชีวภาพเนื้อฟันด้วยสารสกัดจากเมล็ดองุ่น เมื่อใช้ร่วมกับสารยึดติดยูนิเวอร์แซล เอทซ์
แอนดรีนสีหมอด



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาทันตกรรมหัตถการ ภาควิชาทันตกรรมหัตถการ
คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2561
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Dentin biomodification with grape seed extract when using universal adhesive etch-
and-rinse mode



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Operative Dentistry

Department of Operative Dentistry

Faculty of Dentistry

Chulalongkorn University

Academic Year 2018

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การปรับเปลี่ยนชีวภาพเนื้อฟันด้วยสารสกัดจากเมล็ด องุ่น เมื่อใช้ร่วมกับสารยัดติดยูนิเวอร์แซล เอพ็อกซีแอนดรีนส์ โหมต
โดย	นายกิตติศักดิ์ สะนวนท์
สาขาวิชา	ทันตกรรมหัตถการ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.ศิริวิมล ศรีสวัสดิ์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.นිරชา สารชวนะกิจ

คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณะบดีคณะทันตแพทยศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร.สุจิต พูลทอง)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.อัญชณา พานิชอัครา)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.ศิริวิมล ศรีสวัสดิ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.นිරชา สารชวนะกิจ)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.นिरดา ธเนศวร)

กิตติศักดิ์ สะนวนท์ : การปรับเปลี่ยนชีวภาพเนื้อฟันด้วยสารสกัดจากเมล็ดองุ่น เมื่อใช้ร่วมกับสารยึดติดยูนิเวอร์แซล เอทซ์แอนด์รินส์โหมด.

(Dentin biomodification with grape seed extract

when using universal adhesive etch-and-rinse mode) อ.ที่ปรึกษาหลัก : รศ.

ทญ. ดร.ศิริวิมล ศรีสวัสดิ์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ. ทญ. ดร.นිරชา สารชวณะกิจ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการปรับเปลี่ยนชีวภาพเนื้อฟันด้วยสารสกัดจากเมล็ดองุ่นในการลดปริมาณแอคทีฟเจลาตินเนส เมื่อใช้ร่วมกับสารยึดติดยูนิเวอร์แซล เอทซ์แอนด์รินส์โหมด โดยใช้ผงเนื้อฟันที่เตรียมจากฟันกรามใหญ่ซึ่งที่สามของมนุษย์ในการวัดปริมาณแอคทีฟเอ็มเอ็มพี ชนิดที่ 2 และใช้ชิ้นตัวอย่างการยึดติดเรซินและเนื้อฟันเพื่อศึกษาดำแหน่งที่มีแอคทีฟเจลาตินเนสในชั้นไฮบริด แบ่งกลุ่มการทดลองเป็น 6 กลุ่ม คือ เนื้อฟันที่ไม่ปรับสภาพผิวใด ๆ กลุ่มเนื้อฟันที่กัดด้วยกรดฟอสฟอริก กลุ่มเนื้อฟันที่ใช้สารยึดติดยูนิเวอร์แซล เอทซ์แอนด์รินส์โหมด ซิงเกิลบอนด์ ยูนิเวอร์แซล หรือ จี พรีเมียว บอนด์ และกลุ่มที่มีการปรับสภาพเนื้อฟันด้วยสารสกัดจากเมล็ดองุ่นนาน 1 นาที หลังกัดด้วยกรดฟอสฟอริก ร่วมกับการใช้สารยึดติดดังกล่าว วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวและการทดสอบของเพอโรนี ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 พบว่า กระบวนการยึดติดเนื้อฟันด้วยสารยึดติดยูนิเวอร์แซล เอทซ์แอนด์รินส์โหมด มีผลลดปริมาณแอคทีฟเอ็มเอ็มพี ชนิดที่ 2 และการปรับเปลี่ยนชีวภาพเนื้อฟันด้วยสารสกัดจากเมล็ดองุ่นยังทำให้ลดปริมาณแอคทีฟเอ็มเอ็มพี ชนิดที่ 2 โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เมื่อใช้สารยึดติด จี พรีเมียว บอนด์ สอดคล้องกับผลจากการศึกษาดำแหน่งที่พบแอคทีฟเจลาตินเนสในชั้นไฮบริดลดลงเมื่อใช้สารสกัดจากเมล็ดองุ่นก่อนการทาสารยึดติด จี พรีเมียว บอนด์ อาจสรุปได้ว่าสารสกัดจากเมล็ดองุ่นช่วยส่งผลดีในการลดปริมาณแอคทีฟเจลาตินเนส โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อใช้ร่วมกับสารยึดติดที่มีความไม่ชอบน้ำสูง แต่อย่างไรก็ตาม ยังต้องศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับกลไกการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีน ผลต่อค่ากำลังการยึดติดและประสิทธิภาพของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นในการยึดอายุของการยึดติดเนื้อฟัน

สาขาวิชา ทันตกรรมหัตถการ

ปีการศึกษา 2561

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5875805432 : MAJOR OPERATIVE DENTISTRY

KEYWORD: active gelatinases, confocal microscope, dentin bond, etch-and-rinse universal adhesive, grape seed extract, *in situ* zymography

Kittisak Sanon : Dentin biomodification with grape seed extract when using universal adhesive etch-and-rinse mode . Advisor: Assoc. Prof. Sirivimol Srisawasdi, Ph.D. Co-advisor: Assoc. Prof. Neeracha Sanchavanakit, Ph.D.

The aim of this study was to examine the effect of grape seed extract (GSE) pretreatment on reduction of active gelatinases when using etch-and-rinse mode universal adhesive. Dentin powder was prepared for analysis of active MMP-2 by Biotrak™ assay. Resin-dentin slices were prepared for an *in situ* zymography in order to localize active gelatinases by quenched fluorescein-conjugated gelatin under a confocal microscope. Fluorescence intensity was analyzed for a quantitative analysis. Specimens were allocated into 6 groups, as a non-treated control, phosphoric acid etched (PA), PA followed by Single Bond Universal (SBU) or G-Premio Bond (GPB), and PA followed by GSE for 1 minute prior to SBU or GPB. The data were analyzed by a one-way ANOVA and Bonferroni test at the significant level of 0.05. The results demonstrated that application of etch-and-rinse mode universal adhesive by both SBU and GPB caused the reduction of active MMP-2 in dentin matrices, however only further significant reduction was found in GPB pre-treated with GSE analyzed by Biotrak™ assay. *In situ* zymography demonstrated the location of active gelatinases, and fluorescence intensity analysis confirmed the significant reduction of active gelatinases in the hybrid layer of the GPB pre-treated with GSE compared to GPB. The present study demonstrated potential advantage of applying GSE for a reduction of active gelatinases especially at the hybrid layer with more benefit on hydrophobic

Field of Study: Operative Dentistry

Student's Signature

Academic Year: 2018

Advisor's Signature

Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร. ศิริวิมล ศรีสวัสดิ์ และ รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร. นีรชา สารชวณะกิจ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณา ให้คำแนะนำทางด้านวิชาการและความช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี รวมทั้งเป็นแบบอย่างของครูและนักวิจัยที่ดี

ขอกราบขอบพระคุณคณะกรรมการสอบโครงร่างวิทยานิพนธ์และสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ทุก ท่านที่ให้คำแนะนำ ชี้แนะข้อบกพร่อง และให้แนวทางการปรับปรุงแก้ไขวิทยานิพนธ์ที่เป็นประโยชน์

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร. สรนนท์ จันทรางศุ ที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำทางด้านสถิติ

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ทันตแพทย์หญิง ญาณี ตันติเลิศอนันต์ ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับ วิธีการใช้งานอุปกรณ์และเครื่องมือทดสอบต่าง ๆ ตลอดจนการเตรียมสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

ขอขอบคุณหน่วยงานและเจ้าหน้าที่ประจำหน่วยงานที่ให้ความอนุเคราะห์ใช้สถานที่ อุปกรณ์ เครื่องมือ ตลอดจนให้คำแนะนำและอำนวยความสะดวกในการดำเนินการวิจัย ดังต่อไปนี้ หน่วยปฏิบัติการวิจัยเนื้อเยื่ออินทรีย์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โครงการจัดตั้ง ศูนย์วิจัยอณูพันธุกรรมทางทันตกรรม คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ศูนย์เครื่องมือ วิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ศูนย์วิจัยทันตวัสดุศาสตร์ คณะทันต แพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และศูนย์วิจัยชีววิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การศึกษานี้ผู้วิจัยได้รับการสนับสนุนทุนจากทุน 90 ปีจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุน รัชดาภิเษกสมโภช

สุดท้ายนี้ใคร่ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา พี่ชาย รวมทั้งผู้ที่มีส่วนร่วมอีกหลายท่านที่ไม่ สามารถกล่าวนามได้ทั้งหมดที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้เสมอมา

กิตติศักดิ์ สະนนท์

สารบัญ

	หน้า
.....	ค
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูป.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย.....	1
คำถามงานวิจัย.....	3
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
สมมติฐานของงานวิจัย.....	3
ขอบเขตของงานวิจัย.....	4
ข้อตกลงเบื้องต้น.....	4
ข้อจำกัดของงานวิจัย.....	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
สารยัตติตาทันตกรรม.....	5
การเสื่อมสลายของการยึดติระหว่างเรซินและเนื้อฟัน.....	7
วิธีการเพิ่มความคงทนและด้านการเสื่อมสลายของการยึดติระหว่างเรซินและเนื้อฟัน.....	11

สารยึดติดที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำมากขึ้น (More hydrophobic adhesive).....	11
สารยึดติดที่ไม่มี HEMA (HEMA-free adhesive)	11
สารยึดติดที่ไม่มีตัวทำละลาย (Solvent-free adhesive).....	12
การทำทับด้วยสารบอนด์เรซินที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic coat).....	12
วิธีเอทานอลเว็ทบอนด์ (Ethanol-wet bonding technique)	13
วิธีคืนแร่ธาตุเลียนแบบธรรมชาติ (Biomimetic remineralization).....	14
สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีน (proteolytic inhibitors).....	15
สารคอลลาเจนครอสลิงค์ (Collagen cross-linking agents).....	20
สารสกัดจากเมล็ดองุ่น	24
องค์ประกอบสำคัญในสารสกัดจากเมล็ดองุ่น.....	24
คุณสมบัติทางเภสัชวิทยาของสารสกัดจากเมล็ดองุ่น.....	25
ความปลอดภัยของสารสกัดจากเมล็ดองุ่น	26
การศึกษาและการใช้งานสารสกัดจากเมล็ดองุ่นในทางทันตกรรม	26
การวัดปริมาณและการวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ MMPs	28
Bioassay.....	28
Zymography assay.....	29
Immunoassay.....	31
การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีนในชั้นไฮบริด	33
การศึกษาจุลสัณฐานวิทยาบริเวณรอยต่อระหว่างเรซินและเนื้อฟัน	34
กล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอลเลเซอร์	35
ตัวอย่างฟันที่นำมาศึกษา	37
กรอบแนวคิด.....	39
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย.....	40
วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	40

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	41
เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย	42
วิธีการดำเนินวิจัย.....	44
พื้นที่ใช้ในการวิจัย	44
การเตรียมสารสกัดจากเมล็ดองุ่น.....	44
การวัดปริมาณ active MMP-2	44
การทดสอบด้วย <i>in situ</i> zymography.....	48
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	54
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	55
ผลการวัดปริมาณ active MMP-2.....	55
ผลการวิจัย <i>in situ</i> zymography.....	57
บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการวิจัย	60
อภิปรายผลการวิจัย.....	60
สรุปผลการวิจัย.....	67
บรรณานุกรม.....	68
ประวัติผู้เขียน.....	110

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่พบในเมทริกซ์นอกเซลล์ของเนื้อฟัน	10
ตารางที่ 2 แสดงช่วงความยาวคลื่นที่กระตุ้นสารสีฟลูออเรสเซนต์.....	37
ตารางที่ 3 แสดงข้อมูลของวัสดุที่ใช้ในงานวิจัย.....	51
ตารางที่ 4 แสดงค่าการดูดกลืนแสง (OD) และปริมาณ active MMP-2.....	92
ตารางที่ 5 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณ active MMP-2 ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าสูงสุดและค่าต่ำสุด ...	95
ตารางที่ 6 แสดงการกระจายข้อมูลปริมาณ active MMP-2.....	95
ตารางที่ 7 แสดงความแปรปรวนของข้อมูลปริมาณ active MMP-2.....	96
ตารางที่ 8 แสดงความแตกต่างของปริมาณ active MMP-2	96
ตารางที่ 9 แสดงความแตกต่างของปริมาณ active MMP-2 ระหว่างกลุ่มการทดลอง.....	97
ตารางที่ 10 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มฟลูออเรสเซนต์	101
ตารางที่ 11 แสดงการกระจายข้อมูลความเข้มของฟลูออเรสเซนต์	102
ตารางที่ 12 แสดงความแตกต่างความเข้มของฟลูออเรสเซนต์ในชั้นไฮบริด	102
ตารางที่ 13 แสดงความแตกต่างความเข้มของฟลูออเรสเซนต์ ระหว่างกลุ่มการทดลอง	103

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1 แสดงการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMPs.....	9
รูปที่ 2 แสดงบริเวณชั้นไฮบริดหลังแช่น้ำนาน 48 ชั่วโมง.....	11
รูปที่ 3 แสดงการแทนที่น้ำที่แทรกอยู่ระหว่างเส้นใยคอลลาเจนด้วยเอทานอล	14
รูปที่ 4 แสดงการนำสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีนมาใช้ในกระบวนการยึดติดเนื้อฟัน	15
รูปที่ 5 แสดงการใช้สารยึดติดที่ส่วนผสมของสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีน	20
รูปที่ 6 แสดงการใช้สารคอลลาเจนครอสลิงค์ร่วมกับสารยึดติดเนื้อฟัน.....	21
รูปที่ 7 แสดงการเตรียมสไลด์สำหรับ <i>in situ</i> zymography	31
รูปที่ 9 แสดงภาพจำลองการทำงานของกล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอลเลเซอร์	36
รูปที่ 10 แสดงแผนผังการทดสอบปริมาณ active MMP-2	46
รูปที่ 11 แสดงหลักการทำงานของชุดทดสอบ MMP-2 Activity Assay.....	48
รูปที่ 12 แสดงแผนผังการทดสอบด้วย <i>in situ</i> zymography.....	52
รูปที่ 13 แสดงการเตรียมสไลด์สำหรับทดสอบ <i>in situ</i> zymography.....	53
รูปที่ 14 แสดงหลักการทำงานของชุดทดสอบด้วย <i>in situ</i> zymography	54
รูปที่ 15 กราฟแท่งแสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของปริมาณ active MMP-2 (ng/ml)56	
รูปที่ 16 แสดงบริเวณรอยต่อของการยึดติดระหว่างเรซินและเนื้อฟันที่ไม่ใช้และใช้สารสกัดจาก องุ่นปรับเปลี่ยนชีวภาพเนื้อฟัน ก่อนทำการยึดติดเนื้อฟันด้วยสารยึดติด Single Bond Universal	58
รูปที่ 17 แสดงบริเวณรอยต่อของการยึดติดระหว่างเรซินและเนื้อฟันที่ไม่ใช้และใช้สารสกัดจาก เมล็ดองุ่นปรับเปลี่ยนชีวภาพเนื้อฟัน ก่อนทำการยึดติดเนื้อฟันด้วยสารยึดติด G-Premio Bond	59
รูปที่ 18 แสดงผงเนื้อฟันที่เตรียมสำหรับวัดปริมาณ active MMP-2.....	88
รูปที่ 19 แสดงวิธีปรับสภาพผงเนื้อฟันด้วยกรดฟอสฟอริก.....	88

รูปที่ 20 แสดงวิธีปรับสภาพเนื้อฟันด้วยสารยึติดั้งหลังกัดด้วยกรดฟอสฟอริก 88

รูปที่ 21 แสดงวิธีปรับสภาพผงเนื้อฟันด้วยสารสกัดจากเมล็ดองุ่น 89

รูปที่ 22 แสดงวิธีปรับสภาพเนื้อฟันด้วยสารยึติดั้งหลังปรับสภาพด้วยสารสกัดจากเมล็ดองุ่น 89

รูปที่ 23 แสดงวิธีการดึงโปรตีน (Protein extraction) ด้วย Tris-HCl 89

รูปที่ 24 แสดงของเหลวส่วนเหนือตะกอนที่นำไปวัดปริมาณ active MMP-2 90

รูปที่ 25 แสดงชุดทดสอบ Biotrak™ MMP-2 activity assay 91

รูปที่ 26 แสดง standard curve ปริมาณ active MMP-2 และค่าการดูดกลืนแสง 91

รูปที่ 27 แสดงบริเวณรอยต่อของเรซินและเนื้อฟันกลุ่ม negative control 99

รูปที่ 28 แสดงผล *in situ* zymography ของเนื้อฟันที่ไม่ปรับสภาพใด ๆ 100

รูปที่ 29 แสดงผล *in situ* zymography ของเนื้อฟันที่ถูกกัดด้วยกรดฟอสฟอริก 15 วินาที 100

รูปที่ 29 กราฟแท่งแสดงความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ 101

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

ตั้งแต่มีการค้นพบการยึดติดของสารเรซินกับโครงสร้างของฟันโดย Buonocore ปี 1955¹⁸ แม้จะมีการพัฒนาระบบสารยึดติดไปอย่างก้าวไกล แต่รอยต่อของเรซินและเนื้อฟัน (resin-dentin interface) ยังคงเป็นจุดที่อ่อนแอที่สุดของการยึดติดสารเรซินกับเนื้อฟัน เมื่อเวลาผ่านไป พบว่ามีการเสื่อมสลายบริเวณรอยต่อของเรซินและเนื้อฟัน¹¹ การยึดติดเนื้อฟัน (dentin bonding) มีความยุ่งยากซับซ้อนและเกิดความล้มเหลวได้มากกว่าการยึดติดเคลือบฟัน (enamel bonding) เนื่องจากความแตกต่างของโครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมี เคลือบฟัน (enamel) มีองค์ประกอบเป็นสารอนินทรีย์ประมาณร้อยละ 90 และสารอินทรีย์ประมาณร้อยละ 10 โดยปริมาตร แต่เนื้อฟัน (dentin) มีองค์ประกอบเป็นสารอนินทรีย์ประมาณร้อยละ 40 - 45 และสารอินทรีย์ประมาณร้อยละ 30 โดยปริมาตร ซึ่งส่วนใหญ่สารอินทรีย์ในเนื้อฟันประกอบด้วยเส้นใยคอลลาเจนชนิดที่ 1 (type I collagen) โปรตีนอื่นที่ไม่ใช่คอลลาเจน (non-collagenous protein) และน้ำประมาณร้อยละ 20 - 25 โดยปริมาตร⁴¹ นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ย่อยโปรตีน (proteolytic enzyme) ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายเมทริกซ์นอกเซลล์อยู่ในเนื้อฟัน

ในปัจจุบันสารยึดติดยูนิเวอร์แซลแอดฮีซีฟ (universal adhesive) ถูกพัฒนาและจำหน่ายในท้องตลาดมากขึ้น มีส่วนประกอบของฟังก์ชันนอลมอนอเมอร์ (functional monomer) ที่สามารถยึดติดได้กับทุกพื้นผิว (substrate) นอกจากนี้บริษัทผู้ผลิตและงานวิจัยหลายฉบับได้นำเสนอว่าสามารถใช้สารยึดติดยูนิเวอร์แซลได้ทั้ง แบบเอทซ์แอนด์รินส์โหมด (etch-and-rinse mode) เซลฟ์เอทซ์โหมด (self-etch mode) และ ซีเล็คทีฟเอทซ์โหมด (selective etch mode) ซึ่งให้ค่ากำลังยึดติดกับเนื้อฟันไม่แตกต่างกัน¹⁵¹ แต่อย่างไรก็ตาม สารยึดติดยูนิเวอร์แซลเป็นสารยึดติดที่มี

การรวมองค์ประกอบเป็นชนิดเดียวหรือเรียกว่า ออล-อิน-วัน แอดฮีซีฟ (all-in-one adhesive) ยังคงมีจุดด้อยของสารยึดติดระบบนี้ ทำให้ความคงทนของการยึดติดเนื้อฟันไม่ดี เนื่องจากสารยึดติดมีความชอบน้ำ¹⁵³ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อใช้แบบเทซแอนด์รินส์โหมด อันเป็นผลมาจากกระบวนการดึงแร่ธาตุออกด้วยกรดฟอสฟอริกที่มีผลในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีนในเนื้อฟัน¹⁰² ส่งผลให้เกิดการเสื่อมสลายบริเวณรอยต่อของเรซินและเนื้อฟัน

นักวิจัยพยายามหาวิธีการต่าง ๆ ทั้งการพัฒนาระบบสารยึดติดให้มีความคงทนต่อการเสื่อมสลายของเรซินจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส การพัฒนาสารยึดติดให้มีความชอบน้ำน้อยลง^{88, 173} และพัฒนาวิธีการยึดติดเนื้อฟัน เพื่อหยุดการเสื่อมสลายบริเวณรอยต่อของเรซินและเนื้อฟัน เช่น การใช้สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีน (proteolytic inhibitor) การใช้สารที่ทำให้คอลลาเจนครอสลิงค์ (cross-linking agent)^{81, 127, 141, 193} วิธีเอทานอลเวทบอนดิง (ethanol wet bond technique)^{63, 129, 130} และวิธีคืนแร่ธาตุเลียนแบบธรรมชาติ (biomimetic remineralization)^{59, 104} แต่วิธีการดังกล่าวมีความยุ่งยาก ใช้ระยะเวลานานและไม่สามารถหยุดการเสื่อมสลายบริเวณรอยต่อของเรซินและเนื้อฟันได้ เพียงแค่ชะลอการเสื่อมสลายให้ช้าลง

การศึกษานี้จึงมุ่งเน้นประโยชน์การปรับเปลี่ยนชีวภาพเนื้อฟัน (dentin biomodification) ด้วยสารคอลลาเจนครอสลิงค์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การใช้สารสกัดจากเมล็ดองุ่นที่เป็นสารครอสลิงค์จากธรรมชาติ มีความเป็นพิษต่ำและมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatibility) ที่ดีกว่าเมื่อเทียบกับสารครอสลิงค์สังเคราะห์ เช่น กลูตารัลดีไฮด์⁴⁹ อันมีคุณสมบัติในการทำให้เกิดการครอสลิงค์เพิ่มขึ้นของโมเลกุลคอลลาเจน⁶⁹ ทำให้เส้นใยคอลลาเจนในเนื้อฟันมีความแข็งแรงและทนต่อการถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ย่อยโปรตีน อีกทั้งยังสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MMPs^{22, 23, 143} ช่วยชะลอการเสื่อมสลายของการยึดติดเนื้อฟัน⁴⁸ นอกจากนี้การใช้สารสกัดจากเมล็ดองุ่นความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนักที่ละลายในเอทานอลร้อยละ 5 น่าจะช่วยลดความยุ่งยากของวิธีการยึดติด

เนื้อฟันแบบมอยส์ (technique sensitive of moist bonding) เนื่องจากหลังการเป่าแห้งพบว่าเนื้อฟันที่ถูกปรับเปลี่ยนชีวภาพด้วยสารสกัดจากเมล็ดตองุ่น ยังสามารถคงสภาพช่องว่างระหว่างเส้นใยคอลลาเจนไว้โดยไม่ยุบตัว เมื่อเทียบกับเนื้อฟันที่ไม่ผ่านการปรับเปลี่ยนชีวภาพด้วยสารสกัดจากเมล็ดตองุ่น การปรับเปลี่ยนชีวภาพเนื้อฟันหลังกัดด้วยกรดฟอสฟอริกด้วยสารสกัดจากเมล็ดตองุ่น ร่วมกับการยึดติดเนื้อฟันแบบเอทซ์แอนรินส์ น่าจะมีประโยชน์ในการช่วยต้านการเสื่อมสลายบริเวณรอยต่อของเรซินและเนื้อฟัน แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาผลของการใช้สารสกัดจากเมล็ดตองุ่นความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนักที่ละลายในเอทานอลร้อยละ 5 ร่วมกับสารยึดติดยูนิเวอร์แซล เอทซ์แอนดรีนส์ใหม่ยังมีไม่มาก จึงเป็นที่มาของงานวิจัยนี้

คำถามงานวิจัย

การปรับเปลี่ยนชีวภาพเนื้อฟันด้วยสารสกัดจากเมล็ดตองุ่น สามารถลดปริมาณ active gelatinases ในเนื้อฟันได้หรือไม่ เมื่อใช้ร่วมกับการยึดติดเนื้อฟันด้วยสารยึดติดยูนิเวอร์แซล เอทซ์แอนดรีนส์ใหม่

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาผลของการปรับเปลี่ยนชีวภาพเนื้อฟันด้วยสารสกัดจากเมล็ดตองุ่นต่อการลดปริมาณ active gelatinases ในเนื้อฟันเมื่อใช้ร่วมกับการยึดติดยูนิเวอร์แซล เอทซ์แอนดรีนส์ใหม่

สมมติฐานของงานวิจัย

การปรับเปลี่ยนชีวภาพเนื้อฟันด้วยสารสกัดจากเมล็ดตองุ่น สามารถลดปริมาณ active gelatinases ในเนื้อฟัน เมื่อใช้ร่วมกับการยึดติดยูนิเวอร์แซล เอทซ์แอนดรีนส์ใหม่

ขอบเขตของงานวิจัย

เป็นการศึกษาวิจัยแบบวิเคราะห์และทดลองที่ศึกษาเฉพาะผลการปรับเปลี่ยนชีวภาพเนื้อฟันด้วยสารสกัดจากเมล็ดตองุ่นต่อการลดปริมาณ active MMP-2 ในเนื้อฟัน และ active gelatinases บริเวณชั้นไฮบริดที่เกิดจากการยึดติดด้วยสารยึดติดยูนิเวอร์แซล เอพท์แอนดรีนส์โหมด

ข้อตกลงเบื้องต้น

ด้วยข้อจำกัดด้านงบประมาณจึงเลือก MMP-2 เป็นตัวแทนของเอนไซม์ย่อยโปรตีนในเนื้อฟันเพื่อทดสอบผลการปรับเปลี่ยนชีวภาพเนื้อฟันด้วยสารสกัดจากเมล็ดตองุ่น ร่วมกับการศึกษาผลของการลดปริมาณ active gelatinases ในชั้นไฮบริดที่เกิดจากการยึดติดด้วยสารยึดติดยูนิเวอร์แซล เอพท์แอนดรีนส์โหมด เพียง 2 ชนิด ที่มีความแตกต่างของค่าความเป็นกรดต่าง องค์ประกอบทางเคมี และคุณสมบัติความชอบน้ำ

ข้อจำกัดของงานวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาในห้องทดลอง ไม่สามารถจำลองสถานการณ์จริงได้ และไม่ได้ศึกษาคุณสมบัติทางกลและคุณสมบัติอื่น ๆ ของการยึดติดเนื้อฟัน แต่ผลของการศึกษานี้น่าจะสามารถบอกแนวโน้มของการเสื่อมสลาย และความคงทนของการยึดติดระหว่างเรซินและเนื้อฟันจากผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีนในเนื้อฟันได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ประสิทธิภาพของสารสกัดจากเมล็ดตองุ่นในการเพิ่มความคงทนของการยึดติดระหว่างเรซินและเนื้อฟัน และการลดปริมาณ active gelatinases ในเนื้อฟัน
2. นำไปศึกษาต่อเพื่อประยุกต์ใช้ในทางคลินิก เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและความคงทนของการยึดติดระหว่างเรซินและเนื้อฟัน
3. นำไปสู่การพัฒนาสารที่ใช้เพื่อเพิ่มความคงทนของการยึดติดระหว่างเรซินและเนื้อฟัน

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สารยึดติดทางทันตกรรม

สารยึดติดทางทันตกรรมแบ่งเป็นสองระบบตามการจัดการชั้นเสมียร์ (smear layer) คือ ระบบเอทซ์แอนด์รีนส์ (etch-and-rinse) และระบบเซลฟ์เอทซ์ (self-etch)¹⁷⁸

สารยึดติดระบบเอทซ์แอนด์รีนส์ แบ่งได้เป็นแบบ 3 ขั้นตอน (3-step etch-and-rinse) และ 2 ขั้นตอน (2-step etch-and-rinse) สารยึดติดระบบนี้มีการยึดติดกับโครงสร้างของฟันแบบ การยึดติดทางกลระดับจุลภาค (micromechanical interlocking) สารยึดติดระบบเอทซ์แอนด์รีนส์ มีประสิทธิภาพที่ดีในการยึดติดเคลือบฟันด้วยการใช้กรดฟอสฟอริก (phosphoric acid) ความเข้มข้นร้อยละ 30 - 40 ละลายผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ (hydroxyapatite crystals) บริเวณผิวเคลือบฟัน เรซินเข้าไปแทรกซึมในรูพรุนที่เกิดจากการเตรียมเคลือบฟันด้วยกรดฟอสฟอริก เกิดเป็นลักษณะ resin interlock แบบ macro-tags และ micro-tags ล้อมรอบส่วน enamel prisms¹⁷⁸

สำหรับการยึดติดเนื้อฟันด้วยสารยึดติดระบบเอทซ์แอนด์รีนส์ เกิดจากการที่กรดฟอสฟอริก ละลายส่วนอนินทรีย์ของเนื้อฟัน และกำจัดชั้นเสมียร์ออกทำให้เกิดรูพรุนขนาดเล็ก (microporosities) มีการเปิดเผยเส้นใยคอลลาเจนลงไปลึกประมาณ 5 - 10 ไมโครเมตร จากนั้นใช้สารไพรเมอร์เข้าไปแทรกซึมในส่วนของร่างแหเส้นใยคอลลาเจน และทำไฮโดรโฟบิก เรซิน (hydrophobic resin) ทำให้เกิดโพลีเมอไรเซชัน (polymerization) เกิดการผสมผสานกันระหว่างเรซินและโครงสร้างของเนื้อฟัน เรียกว่า ชั้นไฮบริด (hybrid layer)⁹⁸

สารยึดติดระบบเซลฟ์เอทซ์ สารยึดติดระบบนี้ใช้เซลฟ์เอทซ์ไปรเมอร์ (self-etching primer) ปรับเปลี่ยนชั้นสเมียร์และแร่ธาตุในองค์ประกอบของฟัน โดยจะรวมชั้นสเมียร์เป็นส่วนหนึ่งของชั้นไฮบริด เพื่อหวังให้เกิดการป้องกันตามธรรมชาติ (natural barrier) ในปัจจุบันสารยึดติดเซลฟ์เอทซ์แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ตามค่า pH สารยึดติดที่มีค่า pH ประมาณ 2 เรียกว่า mild self-etch adhesive และ สารยึดติดที่มีค่า pH มากกว่า 2.5 เรียกว่า ultra-mild self-etch adhesive¹⁸⁰ การยึดติดกับผิวเคลือบฟันให้ผลไม่ดีเท่าการยึดติดด้วยสารยึดติดระบบเอทซ์แอนดรีนส์ แต่การยึดติดเนื้อฟันพบว่า สามารถเกิดการยึดติดทางเคมี (chemical bond) กับไฮดรอกซีอะพาไทต์ (hydroxyapatite) เนื่องจากมีฟังก์ชันนอลมอนอเมอร์ที่เป็นอนุพันธ์ของกรดฟอสฟอริก หรือกรดคาร์บอกซิลิก เช่น 10-MDP Phenyl-P 4-MET และ PENTA เป็นต้น สารยึดติดระบบนี้สามารถแบ่งตามขั้นตอนการใช้งานได้เป็นสารยึดติดเซลฟ์เอทซ์แบบ 2 ขั้นตอน (2-step self-etch) และ สารยึดติดเซลฟ์เอทซ์แบบขั้นตอนเดียว (one-step self-etch) หรือ ออล-อิน-วัน (all-in-one)¹⁸⁰

สารยึดติดยูนิเวอร์แซลแอดฮีซีฟ (Universal adhesive) เป็นสารแอดฮีซีฟที่ถูกเรียกและถูกพัฒนาขึ้นครั้งแรกโดยบริษัท 3M ESPE โดยมุ่งหวังให้สามารถใช้ยึดติดได้กับทุกพื้นผิว ทั้งโครงสร้างของฟัน เรซิน คอมโพสิต เซรามิก และโลหะ ในปัจจุบัน 10-MDP เป็นฟังก์ชันนอลมอนอเมอร์ที่สำคัญ ที่ถูกพิสูจน์แล้วว่านอกจากสามารถเกิดการยึดติดทางเคมีกับไฮดรอกซีอะพาไทต์ของฟันแล้วยังสามารถเกิดการยึดติดทางเคมีกับ glass ceramic และ zirconia ได้เช่นกัน^{32, 189} ฉะนั้น สารยึดติดยูนิเวอร์แซลแอดฮีซีฟในปัจจุบันมักมี 10-MDP เป็นองค์ประกอบ นอกจากนี้ทางบริษัทผู้ผลิตยังแนะนำว่าสามารถใช้ได้ทั้งแบบเอทซ์แอนดรีนส์โหมด เซลฟ์เอทซ์โหมด และซีเล็คทีฟเอทซ์³² แต่อย่างไรก็ตามสารยึดติดยูนิเวอร์แซลเป็นสารยึดติดที่มีการรวมองค์ประกอบเป็นขวดเดียว ยังคงมีจุดด้อยของสารยึดติดระบบนี้ ทำให้ความคงทนของการยึดติดเนื้อฟันไม่ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อใช้

แบบเอทซ์แอนดรีนส์ใหม่ทด อันเป็นผลมาจากการดึงแร่ธาตุของเนื้อฟันออกด้วยกรดฟอสฟอริก สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีนในเนื้อฟัน ประกอบกับความชอบน้ำของสารยึดติด ส่งผลให้เกิดการเสื่อมสลายบริเวณรอยต่อของเรซินและเนื้อฟัน

การเสื่อมสลายของการยึดติดระหว่างเรซินและเนื้อฟัน

Hashimoto และคณะ ได้จำแนกการเสื่อมสลายบริเวณรอยต่อของเรซินและเนื้อฟันออกเป็น 2 ประเภท คือ การเสื่อมสลายของเรซินด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolytic degradation of resin) และการเสื่อมสลายของเส้นใยคอลลาเจนโดยเอนไซม์ย่อยโปรตีนในเนื้อฟัน (degradation of exposed collagen by endogenous proteolytic enzyme)⁴⁷

การเสื่อมสลายของเรซินโดยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

คือ กระบวนการเสื่อมสลายทางเคมี เกิดการทำลายพันธะเอสเทอร์ที่เชื่อมระหว่างพอลิเมอร์ โดยอาศัยโมเลกุลของน้ำ การเสื่อมสลายนี้สัมพันธ์กับเอนไซม์เอสเตอเรส (esterase) ซึ่งพบในน้ำลาย¹⁹ และคุณสมบัติในการดูดน้ำของสารยึดติด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระบบเซลฟ์เอทซ์ชั้นตอนเดียวที่มีความชอบน้ำสูง ยิ่งส่งผลเสียต่อรอยต่อของเรซินและเนื้อฟัน¹⁵³

ไฮดรอกซีเอทิล เมทาคริเลต (hydroxyethyl methacrylate: HEMA) เป็นองค์ประกอบสำคัญอย่างหนึ่งในระบบสารยึดติด HEMA เป็นมอนอเมอร์ขนาดเล็ก ที่มีโครงสร้างเป็นแอมฟิฟิลิก (amphiphilic structure) คือโครงสร้างด้านหนึ่งมีความชอบน้ำ (hydrophilicity) และอีกด้านมีความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity)^{99, 100} ช่วยเพิ่มการไหลแผ่ (wettability) บนเนื้อฟันได้ดี⁵² ทำให้เป็นสารช่วยการยึดติด (adhesion-promoting agent) ที่ดี แต่มีข้อด้อยคือมีการดูดน้ำได้มาก ส่งผลให้เกิดการบวมและติดสีได้ง่าย^{94, 152}

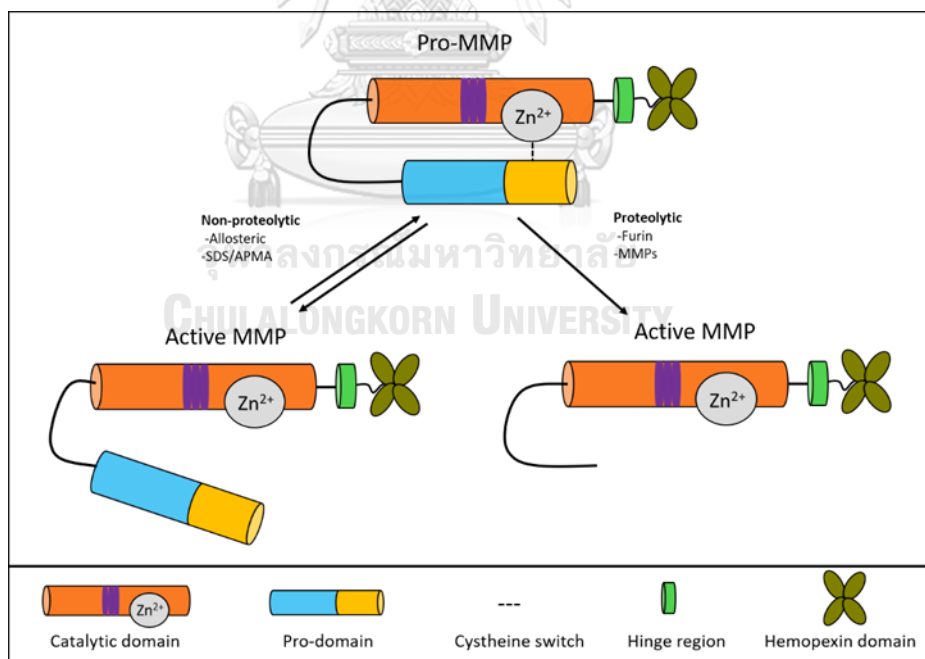
HEMA มีความสำคัญในการป้องกันการเกิดการแยกชั้น (phase separation) ของสารยึดติดระบบเซลล์เอทซ์ชั้นตอนเดียว¹⁷² เมื่อมีการระเหยของตัวทำละลาย (solvent) จะค่อย ๆ เกิดหยดน้ำ (droplet) ขึ้นมาบริเวณผิวด้านบนของสารบอนด์ หากไม่ปล่อยให้เกิดอย่างสมบูรณ์หยดน้ำจะถูกฝังอยู่ในชั้นเรซินทำให้เกิดผลเสียต่อการยึดติด แต่หากมีปริมาณ HEMA มากเกินไป ส่งผลให้มีแรงดันออสโมซิส (osmosis) เกิดหยดน้ำได้มาก ชัดขวางการเกิดพอลิเมอร์ (polymerization) ทำให้ชั้นแอดฮีซีฟ (adhesive layer) ประพฤติตัวเป็นเยื่อกึ่งซึมผ่านได้ (semi-permeable membrane)^{156, 176} ส่งผลให้มีการดูดน้ำเข้ามาสู่ชั้นแอดฮีซีฟ ยิ่งส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสมากขึ้น¹⁷⁴

ตัวทำละลาย ได้แก่ น้ำ เอทานอล (ethanol) และอะซิโตน (acetone) ทำให้สารไพรเมอร์และสารบอนด์มีความชื้นหนืดน้อยลง สามารถไหลแผ่ได้ดี หากการระเหยของตัวทำละลายไม่สมบูรณ์ น้ำและตัวทำละลายที่หลงเหลืออยู่บริเวณชั้นไฮบริดจะชัดเจนชัดขวางการเกิดพอลิเมอร์¹²² ความชื้นจากเนื้อฟันจะเข้าสู่ช่องว่างในชั้นแอดฮีซีฟ ทำให้เกิดรูพรุนในชั้นแอดฮีซีฟ กระตุ้นการเสื่อมสลายของเรซินโดยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส¹⁷⁷

การเสื่อมสลายของเส้นใยคอลลาเจนโดยเอนไซม์ย่อยโปรตีนในเนื้อฟัน

เมทริกซ์ เมทัลโลโปรตีนเนส (Matrix metalloproteinases: MMPs) เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่มีโครงสร้างหลักประกอบด้วย โพรโดเมน (prodomain) คะตะลิสต์โดเมน (catalyst domain) ส่วนบานพับ (hinge region) และ ฮีโมเพคซินโดเมน (hemopexin domain) ในส่วนโปรโดเมนมีโครงสร้างสำคัญ คือ คิสตีอินสวิตช์ (cysteine switch) ซึ่งจะจับกับไอออนของสังกะสี (Zn^{2+}) บนกะตะลิสต์โดเมน ทำให้เอนไซม์คงอยู่ในรูปไม่มีฤทธิ์ (pro-enzyme) และถูกยับยั้งการทำงานโดยทิวซอินฮิบิเตอร์ของเมทัลโลโปรตีนเนส (tissue inhibitor of metalloproteinase : TIMPs) สารเคมี ความร้อน อนุมูลอิสระ พยาธิสภาพ การทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีนตัวอื่น และสภาวะกรดสามารถกระตุ้นให้กลายเป็นเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ (active enzyme)^{117, 182} (แสดงในรูปที่ 1) นอกจากนี้

ในสภาวะปกติของร่างกายมีการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMPs เช่นกัน ในกระบวนการสร้างเนื้อฟัน เอนไซม์ MMPs ทำหน้าที่ย่อยสลายเมทริกซ์นอกเซลล์ เพื่อให้แร่ธาตุเข้ามาแทนที่ เอนไซม์ MMPs ส่วนที่เหลือจากกระบวนการสร้างเนื้อฟันถูกฝังอยู่ในเมทริกซ์นอกเซลล์ของเนื้อฟัน จากการศึกษาพบว่า ในเมทริกซ์นอกเซลล์ของเนื้อฟันมีเอนไซม์ MMPs หลายชนิด ได้แก่ MMP-2 MMP-8 MMP-9 MMP-3 MMP-20 และ TIMPs อยู่^{83, 103, 145, 148} (แสดงในตารางที่ 1) เอนไซม์ MMPs มีความสำคัญในกระบวนการเกิดโรคฟันผุและโรคปริทันต์อักเสบ^{46, 166} นอกจากนี้ เอนไซม์คิสติอิน คาเทปซิน (cysteine cathepsins) เป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีนอีกกลุ่มที่พบในเมทริกซ์นอกเซลล์ของเนื้อฟัน ถูกสร้างโดยเซลล์สร้างเนื้อฟัน (odontoblasts) ถูกกระตุ้นโดยสภาวะกรด¹⁵⁹ มีความสามารถในการย่อยสลายเส้นใยคอลลาเจนชนิดที่ 1 และ 3¹⁰⁵ (แสดงในตารางที่ 1)



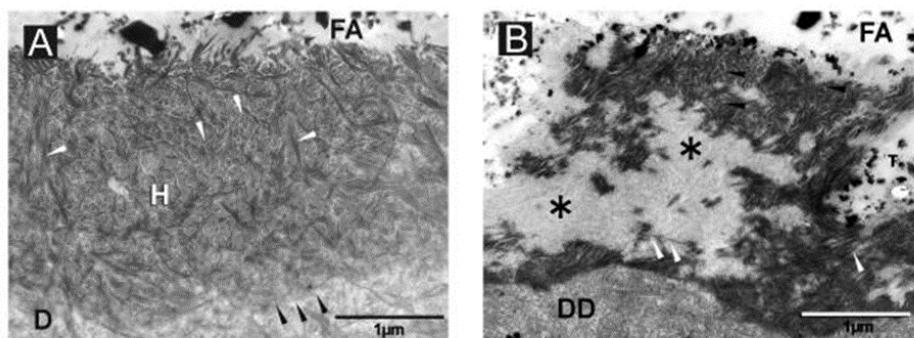
รูปที่ 1 แสดงการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMPs

ตารางที่ 1 แสดงเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่พบในเมทริกซ์นอกเซลล์ของเนื้อฟัน

Enzymes	Other Names	Substrates
MMP-2	Gelatinase A	Collagen: I, II, III, VII, VIII, X, aggrecan, elastin, fibronectin, gelatin, laminin, proteoglycan, MMP-9, -13
MMP-9	Galatinase B	Collagen: IV, V, VII, X, XIV, aggrecan, elastin, fibronectin, gelatin, laminin
MMP-8	Collagenase-2	Collagen: I, II, III, V, VII, VIII, X, aggrecan, elastin, fibronectin, gelatin, laminin
MMP-3	Stromelysin-1	Collagen: II, III, IV, IX, X, XI, aggrecan, elastin, fibronectin, gelatin, laminin, proteoglycan, MMP-7, -8, -13
MMP-20	Enamelysin	Collagen: V, aggrecan, amelogenin, COMP
Cathepsin B	-	Collagen degradation
Cathepsin K	-	Collagen degradation

ดัดแปลงจาก Tjaderhane ปี 2015¹⁶⁵

Pashley และคณะ ปี 2004 พบว่า เอนไซม์ MMPs ทำให้เกิดการย่อยสลายเส้นใยคอลลาเจนในบริเวณชั้นไฮบริด แม้ในสถานะที่ไม่มีแบคทีเรีย¹¹¹ เช่นเดียวกับผลการศึกษาของ Armstrong และคณะ ปี 2004 พบว่า ค่าความแข็งแรงของการยึดติดเนื้อฟันลดลงเมื่อเวลาผ่านไป และมีการเสื่อมสลายของเส้นใยคอลลาเจนบริเวณชั้นไฮบริด เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน⁵ (แสดงในรูปที่ 2) นอกจากนี้เอนไซม์ cysteine cathepsin มีผลต่อการย่อยสลายเมทริกซ์นอกเซลล์ของเนื้อฟันและทำให้เกิดการเสื่อมสลายของการยึดติดเนื้อฟันได้เช่นกัน การใช้กรดฟอสฟอริกกัดเนื้อฟัน การใช้เซลฟ์เอทซิงไพโรเมอร์ และกรดพอลิอะครีลิก (polyacrylic acid) สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMPs^{102, 108} และ cysteine cathepsin ได้¹⁹⁰



รูปที่ 2 แสดงบริเวณชั้นไฮบริดหลังแช่น้ำนาน 48 ชั่วโมง

ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ของการยึดติดเนื้อฟันด้วย Optibond FL (Kerr, Orange, CA, USA) หลังแช่น้ำนาน 48 ชั่วโมง (A) และ 44 เดือน (B) พบการเสื่อมสลายของเส้นใยคอลลาเจนบริเวณชั้นไฮบริด (*) คัดลอกจาก Armstrong และคณะ ปี 2004⁵

วิธีการเพิ่มความคงทนและด้านการเสื่อมสลายของการยึดติระหว่างเรซินและเนื้อฟัน

นักวิจัยได้พยายามศึกษาหาวิธีการต่าง ๆ อย่างต่อเนื่อง เพื่อเพิ่มความคงทนและด้านการเสื่อมสลายของการยึดติระหว่างเรซินและเนื้อฟัน ดังหัวข้อดังต่อไปนี้

สารยึดติดที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำมากขึ้น (More hydrophobic adhesive)

สารยึดติดที่ไม่มี HEMA (HEMA-free adhesive)

ปัญหาสำคัญของระบบสารยึดติดที่มีการรวมขวดคือ มีการผสมกันของสารที่มีคุณสมบัติชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ ทำให้สารยึดติดมีความชอบน้ำมากยิ่งขึ้น จึงมีการพัฒนาสารยึดติดให้มีความไม่ชอบน้ำมากขึ้น ทั้งในระบบเอทซ์แอนด์รินส์ เช่น cmf Adhesive System (Saremco Dental AG, Rebstein, Switzerland) และระบบเซลฟ์เอทซ์ เช่น G-Bond (GC, Tokyo, Japan) และ Go! (SDI limited, Bayswater, Victoria, Australia) เป็นต้น

การศึกษาในห้องทดลองพบว่า สารยึดติดระบบเอทซ์แอนด์รินส์สามขั้นตอนที่ไม่มี HEMA (3-step etch-and-rinse HEMA-free adhesive; cmf Adhesive System, Saremco Dental AG, Rebstein, Switzerland) เกิดชั้นไฮบริดบางกว่าและมีค่าความแข็งแรงของการยึดติด (bond strength) กับเนื้อฟัน

น้อยกว่าสารยึดติดระบบเอทซ์แอนด์รีนส์สามชั้นตอนที่มี HEMA (Optibond FL, Kerr, Orange, CA, USA)⁸⁸ แต่การศึกษาทางคลินิกพบว่า เมื่อใช้สารยึดติดระบบเอทซ์แอนด์รีนส์สามชั้นตอนที่ไม่มี HEMA (cmf Adhesive System, Saremco Dental AG, Switzerland) บำรุงคอฟฟันสึก มีอัตราความล้มเหลวน้อยกว่าการบำรุงโดยใช้สารยึดติดระบบเอทซ์แอนด์รีนส์สองชั้นตอนที่มี HEMA (XP Bond, Denstply DeTrey, Konstanz, Germany)¹⁷⁰ และเมื่อใช้สารยึดติดระบบเซลฟ์เอทซ์ชั้นตอนเดียวที่ไม่มี HEMA (G-bond, GC, Tokyo, Japan) ในการบำรุงคอฟฟันสึก พบว่าให้ผลความสำเร็จทางคลินิกไม่แตกต่างจากการใช้สารยึดติดระบบเอทซ์แอนด์รีนส์สามชั้นตอนที่มี HEMA (Optibond FL, Kerr, Orange, CA, USA) ที่เวลา 3 ปี และ 5 ปี^{171, 173} และไม่แตกต่างกับการใช้สารยึดติดระบบเซลฟ์เอทซ์สองชั้นตอนที่มี HEMA (Clearfil TriS, Kuraray, Osaka, Japan) ที่เวลา 3 ปี⁹³

สารยึดติดที่ไม่มีตัวทำละลาย (Solvent-free adhesive)

เป็นการพัฒนาระบบสารยึดติดอีกวิธีการหนึ่ง เพื่อลดคุณสมบัติชอบน้ำของสารยึดติดหวังผลให้การดูดน้ำเข้าสู่ชั้นไฮบริด ชะลอการเสื่อมสลายของการยึดติดระหว่างเรซินและเนื้อฟัน โดยไม่ใส่ตัวทำละลาย ได้แก่ น้ำ เอทานอล และอะซิโตน เรียกสารยึดติดชนิดนี้ว่า สารยึดติดที่ไม่มีตัวทำละลาย (solvent-free adhesive) มีผลิตภัณฑ์จำหน่ายชื่อ Bond 1SF (Pentron Corporation, Wallingford, CT, USA) เป็นสารยึดติดระบบเซลฟ์เอทซ์ชั้นตอนเดียว จากการศึกษาพบว่า ค่าความแข็งแรงของการยึดติดไม่ลดลงเมื่อผ่านไป 6 เดือน⁹⁷

การทำทับด้วยสารบอนด์เรซินที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic coat)

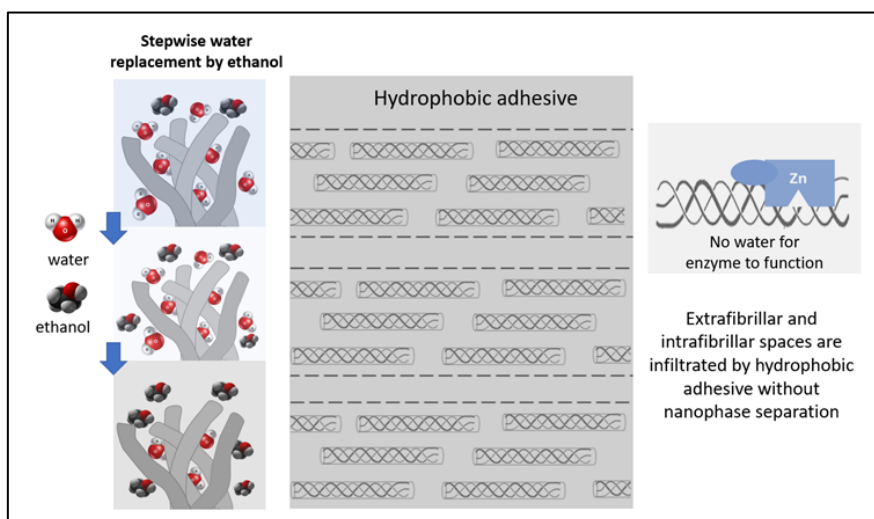
การศึกษาพบว่าเมื่อใช้สารบอนด์เรซินที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic resin) เช่น สารบอนด์เรซินชนิดที่สองของ Clearfil SE Bond (Kuraray, Osaka, Japan) ทาทับบนสารยึดติดระบบเซลฟ์เอทซ์ชั้นตอนเดียวที่ฉายแสงแล้ว แล้วทำการฉายแสงอีกครั้ง พบว่าสามารถเพิ่มค่าความ

แข็งแรงของการยึดติดโดยทันที (immediate bond strength) และลดการเสื่อมสลายของการยึดติดเนื้อฟันเมื่อแช่น้ำนาน 6 เดือน¹²¹ และการใช้สารบอนด์เรซิน Heliobond (Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein) ทาที่บนสารยึดติดยูนิเวอร์แซล ทั้งแบบเอทซ์แอนดรีนส์โหมดและแบบเซลฟ์เอทซ์โหมด พบว่าสามารถลดการเสื่อมสลายของการยึดติดระหว่างเรซินและเนื้อฟัน มีค่าความแข็งแรงของการยึดติดมากกว่าและเกิดการรั่วซึมระดับนาโน (nanoleakage) น้อยกว่ากลุ่มควบคุมเมื่อแช่น้ำนาน 6 เดือน^{95, 144} นอกจากนี้ การใช้สารบอนด์เรซิน Scotch Bond Multipurpose Adhesive (3M ESPE, St Paul, MN, USA) ทาที่หลังการใช้สารยึดติดระบบเอทซ์แอนดรีนส์สองขั้นตอน ช่วยลดอัตราการไหลผ่านของของเหลวมายังบริเวณรอยต่อของเรซินและเนื้อฟัน²⁸ แต่การศึกษาทางคลินิกพบว่า การใช้วิธีการดังกล่าว ทำให้เพิ่มขั้นตอนในกระบวนการยึดติด และไม่ช่วยเพิ่มความคงทนที่มากกว่าการไม่ใช้สารบอนด์เรซิน Scotch Bond Multipurpose Adhesive (3M ESPE, St Paul, MN, USA) ทาที่บนสารยึดติดระบบเซลฟ์เอทซ์ขั้นตอนเดียว Adper Easy Bond (3M ESPE, St Paul, MN, USA)¹³¹

วิธีเอทานอลเว็ทบอนด์ (Ethanol-wet bonding technique)

เนื่องจากปัญหาความชื้นในเนื้อฟันหลังจากการกัดด้วยกรดฟอสฟอริก นักวิจัยคิดค้นวิธีการกำจัดความชื้น โดยใช้เอทานอลไปแทนที่น้ำที่แทรกอยู่ระหว่างเส้นใยคอลลาเจน เพื่อให้เรซินมอนอเมอร์แทรกตัว ห่อหุ้มเส้นใยคอลลาเจนอย่างสมบูรณ์ และหวังผลให้ไม่มีการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีน^{154 71} (แสดงในรูปที่ 3) วิธีการทำเอทานอลเว็ทบอนด์ ใช้เอทานอลความเข้มข้นต่าง ๆ ไล่ไปจนถึงความเข้มข้นร้อยละ 100 เช่น ใช้เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 70 80 และ 95 โดยแต่ละความเข้มข้นทาทิ้งไว้ นาน 15 – 30 วินาที แล้วทาเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 100 ซ้ำ 3 รอบ รอบละ 15 – 30 วินาที รวมเวลาทั้งสิ้น 3 – 4 นาที¹³⁰ การศึกษาวิธีการดังกล่าวในห้องทดลอง

ให้ผลดีต่อการยึดติดเนื้อฟัน ลดการเกิดการรั่วซึมระดับนาโน^{129, 130} แต่ใช้เวลานานไม่เหมาะสมกับการใช้งานทางคลินิก⁶³



รูปที่ 3 แสดงการแทนที่น้ำที่แทรกอยู่ระหว่างเส้นใยคอลลาเจนด้วยเอทานอล
ดัดแปลงจาก Liu และคณะ ปี 2011⁷¹

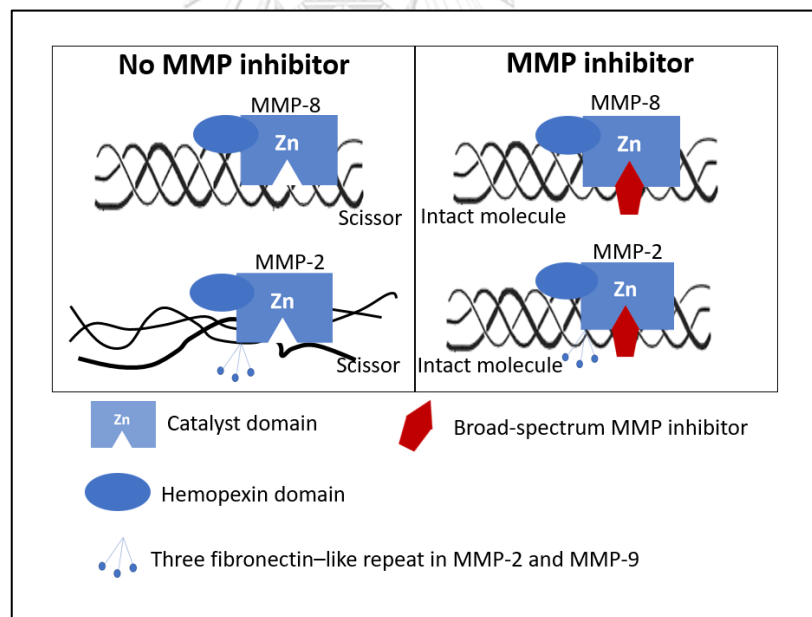
วิธีคืนแร่ธาตุเลียนแบบธรรมชาติ (Biomimetic remineralization)

กระบวนการยึดติดเนื้อฟัน มักพบปัญหาเรซินมอนอเมอร์ไม่สามารถแทรกซึมไปแทนที่น้ำระหว่างเส้นใยคอลลาเจนได้อย่างสมบูรณ์ มีช่องว่างเล็ก ๆ เกิดเป็นรอยรั่วซึมระดับนาโนและเป็นช่องทางให้น้ำเข้ามาสู่ชั้นไฮบริด โดยจะเห็นได้จากการทดสอบว่ามีซิลเวอร์ไนเตรต (silver nitrate) แทรกซึมเข้าไปในรอยต่อของเรซินและเนื้อฟัน^{73, 157} จึงมีแนวความคิดการลอกเลียนแบบการสะสมแร่ธาตุของเนื้อฟัน กระบวนการทำให้เกิดการคืนแร่ธาตุเลียนแบบธรรมชาติที่ให้ผลดี ทำโดยนำผลึกแร่ธาตุ เช่น amorphous calcium phosphate precursor ที่ผสมกับพอลิแอนไอออน (polyanions) เช่น กรดพอลิเอสพาทิก (polyaspartic acid) เพื่อให้ผลึกแร่ธาตุมีความเสถียร ประจุลบของพอลิแอนไอออนจับกับประจุบวกของเส้นใยคอลลาเจน จากนั้นมีการเหนี่ยวนำให้เกิดการสะสมและตกตะกอนของแร่ธาตุเข้าไปในช่องว่างระหว่างเส้นใยคอลลาเจนและภายในเส้นใยคอลลาเจน¹⁰⁴ วิธีการดังกล่าวมีความยุ่งยากและกำลังศึกษาพัฒนาเพื่อหวังผลว่าการสะสมแร่ธาตุนั้น สามารถไปแทนที่น้ำใน

ช่องว่างระหว่างเส้นใยคอลลาเจนและภายในเส้นใยคอลลาเจน และทำให้คอลลาเจนที่ถูกเปิดเผยโดน
ห่อหุ้มโดยแร่ธาตุอย่างสมบูรณ์ ทำให้ไม่มีการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีน ส่งผลให้เพิ่ม
ความคงทนของการยึดติดเนื้อฟัน⁵⁹

สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีน (proteolytic inhibitors)

การนำสารที่มีคุณสมบัติจับกับแร่ธาตุประจุบวก (chelating agent) มาจับกับประจุบวกของ
ไอออนสังกะสี ที่อยู่บนคะตะลิสต์โดเมนของเอนไซม์ MMPs ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและ
สูญเสียการทำงานของเอนไซม์³¹ (แสดงในรูปที่ 4) มีการศึกษานำสารที่มีคุณสมบัติจับกับแร่ธาตุประจุ
บวกมาใช้ เพื่อหวังผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีนและลดการเสื่อมสลายของการยึดติด
ระหว่างเรซินและเนื้อฟัน



รูปที่ 4 แสดงการนำสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีนมาใช้ในกระบวนการยึดติดเนื้อฟัน

ดัดแปลงจาก Liu และคณะ ปี 2011⁷¹

คลอร์เฮกซิดีน (Chlorhexidine)

เป็นน้ำยาฆ่าเชื้อที่มีผลต่อแบคทีเรียหลายชนิดมาก (broad spectrum antimicrobial agent) ที่ใช้แพร่หลายในงานรักษาคอลงรากฟันและปริทันต์ แต่เดิมในทางทันตกรรมหัตถการใช้เป็นสารฆ่าเชื้อเพื่อทำความสะอาดโพรงฟันก่อนการบูรณะ Pashley และคณะ ปี 2004 พบว่าคลอร์เฮกซิดีนสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MMPs แบบไม่จำเพาะ (non-specific MMPs inhibitor)¹¹¹ และสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ cysteine cathepsin ได้¹³⁴

การศึกษาในห้องทดลอง เมื่อใช้คลอร์เฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 0.2 – 2 ที่ละลายในน้ำหรือเอทานอล ทาเนื้อฟันที่ถูกกัดด้วยกรดฟอสฟอริก ก่อนทาสารไพรเมอร์หรือสารบอนด์ เป็นเวลา 30 วินาที ให้ผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีน ลดการเสื่อมสลายของการยึดติดระหว่างเรซินและเนื้อฟันได้ เมื่อเวลาผ่านไป 2 ปี โดยไม่มีผลกระทบต่อค่าความแข็งแรงของการยึดติด^{16, 29}

การศึกษาทางคลินิก พบว่าการใช้คลอร์เฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 2 ปรับสภาพผิวเนื้อฟันหลังถูกกัดด้วยกรดฟอสฟอริก นาน 30 วินาที ก่อนทาสารบอนด์ระบบเอทซ์แอนดรีนส์สองชั้นตอน Single Bond Plus (3M ESPE, St Paul, MN, USA) และ Prime&Bond NT (Dentsply DeTrey, Konstanz, Germany) ในการบูรณะโพรงฟันคลาสวันด้วยเรซินคอมโพสิต (Class I resin composite) สามารถลดการเสื่อมสลายของการยึดติดเนื้อฟัน เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ใช้คลอร์เฮกซิดีนที่ระยะเวลา 6 เดือน และ 1 ปี โดยที่ไม่มีผลกระทบต่อค่าความแข็งแรงของการยึดติดโดยทันที^{13, 14} และมีลักษณะทางคลินิกที่ดีเมื่อเวลาผ่านไป 3 ปี¹³² แต่บางการศึกษาทางคลินิกมีผลขัดแย้ง พบว่าการใช้คลอร์เฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 2 ทาเนื้อฟันนาน 20 วินาที ก่อนทาสารบอนด์ระบบเอทซ์แอนดรีนส์สองชั้นตอน XP Bond (Dentsply DeTrey, Konstanz, Germany) ในการบูรณะคอฟันสีก็ ไม่มีผลแตกต่างจากกลุ่มควบคุม⁷⁶

สำหรับการใช้คลออร์เฮ็กซีดีนกับสารยึดติดระบบเซลฟ์เอทซ์ มีการศึกษาในห้องทดลองพบว่า เมื่อใช้คลออร์เฮ็กซีดีน ความเข้มข้นร้อยละ 2 ทาเนื้อฟันนาน 60 วินาที ก่อนทาสารไพรเมอร์และ บอนดิงของระบบเซลฟ์เอทซ์สองชั้นตอน Clearfil SE Bond (Kuraray, Osaka Japan) ไม่มีผลลดค่า ความแข็งแรงของการยึดติดโดยทันที และเมื่อแช่น้ำไว้นาน 6 เดือน⁷⁵ การศึกษาทางคลินิกพบว่า การใช้คลออร์เฮ็กซีดีนความเข้มข้นร้อยละ 2 ทาเนื้อฟันนาน 20 วินาที ก่อนการทาสารยึดติดระบบ เซลฟ์เอทซ์ชั้นตอนเดียว Xeno V (DeTrey Dentsply, Konstanz, Germany) ในการบูรณะ คอฟฟันสีก็มีผลไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม⁷⁶

การใช้สารยึดติดระบบเซลฟ์เอทซ์สองชั้นตอน Clearfil SE Bond (Kuraray, Osaka, Japan) และสารยึดติดระบบยูนิเวอร์แซล AdheSE (Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein) ที่ผสมคลออร์เฮ็กซีดีนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักในไพรเมอร์ในการบูรณะคอฟฟันสี ไม่มีผล แตกต่างกันทางคลินิกเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เวลา 2 ปี³ เช่นเดียวกับการใช้สารยึดติดที่มี ส่วนผสมของคลออร์เฮ็กซีดีน Peak Universal (Ultradent, South Jordan, Utah, USA) พบว่าไม่มี ความแตกต่างกับการใช้สารยึดติดที่ไม่มีส่วนผสมของคลออร์เฮ็กซีดีน เมื่อเวลาผ่านไป 6 เดือน¹²⁴

คลออร์เฮ็กซีดีนสามารถยึดติดกับเนื้อฟันโดยแรงดึงดูดระหว่างประจุบวกของคลออร์เฮ็กซีดีนกับ ประจุลบของเนื้อฟัน⁵⁸ เมื่อเวลาผ่านไปคลออร์เฮ็กซีดีนจะค่อย ๆ หมดฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ย่อยโปรตีน¹²⁸ แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาของ Loguerio และคณะ ปี 2016 พบว่า การใช้กรด ฟอสฟอริกที่ผสมคลออร์เฮ็กซีดีน หรือสารละลายคลออร์เฮ็กซีดีนความเข้มข้นร้อยละ 2 ร่วมกับสารยึด ติดระบบเอทซ์แอนด์ริบส์สองชั้นตอน Prime&Bond NT (Dentsply DeTrey, Konstanz, Germany) และ Adper SingleBond 2 (3M ESPE, St Paul, MN, USA) สามารถชะลอการเสื่อม สลายของการยึดติดระหว่างเรซินและเนื้อฟัน และคลออร์เฮ็กซีดีนยังเกาะอยู่ในเนื้อฟันหลังแช่น้ำนาน 5 ปี⁷² นอกจากนี้ มีรายงานผลอันไม่พึงประสงค์เมื่อใช้คลออร์เฮ็กซีดีนความเข้มข้นร้อยละ 2

Consepsis (Ultradent, , South Jordan, Utah, USA) ในกระบวนการยึดติดเนื้อฟัน พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงสีของเรซินคอมโพสิตชนิดนาโนฟิลมากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ใช้คลอร์เฮกซิดีนอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อใช้ร่วมกับเรซินคอมโพสิตสีเข้มจะเกิดการเปลี่ยนแปลงสีน้อยกว่าใช้ร่วมกับเรซินคอมโพสิตสีอ่อน⁵⁴

สารสังเคราะห์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MMPs

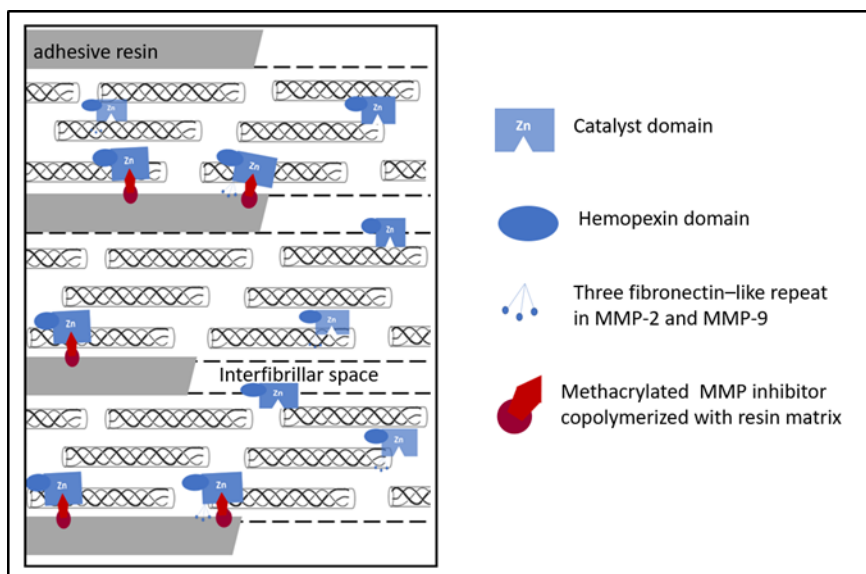
เป็นสารที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นเพื่อรักษาโรคมะเร็ง มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MMPs ได้หลายชนิด (broad spectrum MMPs inhibitor) มีความเป็นพิษน้อย และมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพที่ดี มีการศึกษาพบว่าเมื่อนำสารสังเคราะห์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MMPs โดยนำ Batismastat และ Galardin มาผสมในไพรเมอร์ของ Optibond FL (Kerr, Orange, CA, USA) Prime&Bond NT (Dentsply DeTrey, Konstanz, Germany) และ G-Bond (GC, Tokyo, Japan) ให้มีความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MMPs ได้ แต่ไม่ลดการเสื่อมสลายของการยึดติดระหว่างเรซินและเนื้อฟัน เมื่อเวลาผ่านไป 3 เดือน² แต่เมื่อใช้ Galardin ทาเนื้อฟันที่ถูกกัดด้วยกรดฟอสฟอริก ก่อนทาสารบอนด์ติงระบบเอทซ์แอนดรีนส์สองชั้นตอน Adper Scotchbond 1XT (3M ESPE, St Paul, MN, USA) พบว่าสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MMPs และลดการเสื่อมสลายของการยึดติดเนื้อฟัน เมื่อเวลาผ่านไป 1 ปี หลังแช่ในน้ำลายเทียม¹⁵

สารประกอบควอเทอนารีแอมโมเนียม (Quaternary ammonium)

มีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อ¹¹⁴ ที่ถูกนำมาใช้ในกระบวนการยึดติดเนื้อฟัน ด้วยคุณสมบัติเป็นประจุบวก สามารถจับกับประจุลบของหมู่ฟอสเฟต (phosphate group) บนอะพาไทต์ (apatite) และหมู่คาร์บอกซิลิก (carboxylic group) ของคอลลาเจนในเนื้อฟัน⁷⁷ สารที่นิยมนำมาใช้เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MMPs ในการกระบวนการยึดติดเนื้อฟัน คือ เบนซัลโคเนียมคลอไรด์ (benzalkonium chloride) และ ควอเทอนารี แอมโมเนียม เมทาคริเลต (quaternary ammonium methacrylate)

เบนซัลโคเนียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.5-1.0 สามารถจับบนผิวเนื้อฟันที่กัดด้วยกรด ฟอสฟอริกได้ดี และสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MMPs ได้¹⁶⁴ บริษัทผู้ผลิตจำหน่ายผลิตภัณฑ์กรดฟอสฟอริกที่ผสมเบนซัลโคเนียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 1 เพื่อหวังผลในการฆ่าเชื้อ ได้แก่ ETCH 37™ w/BAC (Bisco, Schaumburg, USA) และ UNI-ETCH™ w/BAC (Bisco, Schaumburg, IL, USA) โดยไม่มีผลต่อค่าความแข็งแรงของการยึดติด¹²⁶ นอกจากนี้นักวิจัยมีความพยายามนำเบนซัลโคเนียมคลอไรด์ผสมในสารยึดติด เพื่อหวังผลในการเพิ่มความคงทนของการยึดติดเนื้อฟัน พบว่านอกจากความเข้มข้นของเบนซัลโคเนียมคลอไรด์ที่มีผลต่อฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MMPs และลดการเสื่อมสลายของการยึดติดระหว่างเรซินและเนื้อฟัน ยังขึ้นกับชนิดของสารยึดติดด้วย^{125, 126}

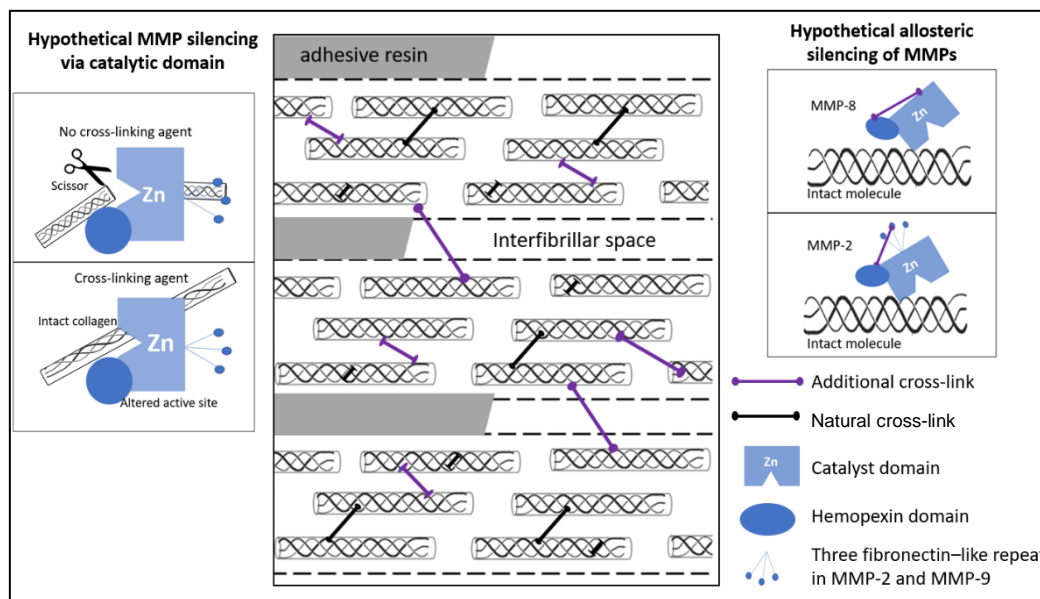
ควอเทอนารี แอมโมเนียม เมทาคริเลต มีการผลิตมอนอเมอร์ที่มีคุณสมบัติฆ่าเชื้อคือ เมทาคริลอิลออกซิโดเดซิลไพริดีเนียม โบรไมด์ (12-methacryloyloxydodecylpyridinium bromide: MDPB) โดยบริษัท Kuraray ,Osaka, Japan ผสมอยู่ในสารไพรเมอร์ของผลิตภัณฑ์สารยึดติดระบบเซลฟ์เอทซ์สองชั้นตอน Clearfil Protect Bond (Kuraray, Osaka, Japan) ซึ่งพบว่า MDPB มีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MMPs¹⁶² (แสดงในรูปที่ 5) การศึกษาในห้องทดลองและทางคลินิกพบว่า ประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MMPs ไม่ลดลงเมื่อเวลาผ่านไป 1 ปี³⁶ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเพื่อผลิตมอนอเมอร์ชนิดใหม่ ที่มีคุณสมบัติฆ่าเชื้อและต้านการทำงานของเอนไซม์ MMPs เพื่อช่วยเพิ่มความคงทนให้กับการยึดติดเนื้อฟัน เช่น ไดเมทิลอะมิโนโดเดซิล เมทาคริเลต (dimethylaminododecyl methacrylate : DMADDM) ซึ่งมีการศึกษาในห้องทดลองพบว่า สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MMPs และลดการเสื่อมสลายบริเวณรอยต่อของเรซินและเนื้อฟันได้⁶⁷



รูปที่ 5 แสดงการใช้สารยึดติดที่ส่วนผสมของสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีน
ดัดแปลงจาก Liu และคณะ ปี 2011⁷¹

สารคอลลาเจนครอสลิงค์ (Collagen cross-linking agents)

การใช้สารคอลลาเจนครอสลิงค์เพื่อเพิ่มการครอสลิงค์ โดยเกิดพันธะโควาเลนต์เชื่อมระหว่างสายเปปไทด์ (peptide chain) ของเส้นใยคอลลาเจน สามารถเพิ่มความแข็งแรงและความต้านทานต่อการถูกทำลายโดยเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้ นอกจากนี้ สารคอลลาเจนครอสลิงค์บางชนิดมีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีนในเนื้อฟัน^{70, 81, 127} (แสดงในรูปที่ 6) มีการนำสารคอลลาเจนครอสลิงค์ที่เป็นสารสังเคราะห์และสารสกัดจากธรรมชาติมาใช้ในกระบวนการยึดติดเนื้อฟัน เช่น กลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) คาร์โบไดไฮโดรไมด์ ไฮโดรคลอไรด์ (carbodiimide hydrochloride) สารสกัดจากเมล็ดองุ่น และสารสกัดจากชาเขียว เป็นต้น¹



รูปที่ 6 แสดงการใช้สารคอลลาเจนครอสลิงค์ร่วมกับสารยึดติดเนื้อฟัน

ด้านขวา แสดงสมมติฐานการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีนโดยสารคอลลาเจนครอสลิงค์
ด้านซ้าย แสดงคอลลาเจนที่แข็งแรงขึ้นและต้านทานการทำลายโดยเอนไซม์
ดัดแปลงจาก Liu และคณะ ปี 2011⁷¹

กลูตารัลดีไฮด์

นอกจากมีคุณสมบัติเป็นสารคอลลาเจนครอสลิงค์ ยังมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MMPs และ cysteine cathepsin K^{127, 143} เมื่อใช้กลูตารัลดีไฮด์ปรับสภาพเนื้อฟันที่ถูกกัดด้วยกรดฟอสฟอริก ก่อนทาสารบอนด์ระบบเอทซ์แอนดรินส์สองชั้น Adper Single Bond Plus (3M ESPE, Paul, MN, USA) สามารถเพิ่มค่าความแข็งแรงของการยึดติดโดยทันที¹

กลูตารัลดีไฮด์ เป็นส่วนประกอบสำคัญในสารลดอาการเสียวฟัน Gluma Desensitizer (Heraeus Kulzer, South Bend, IN, USA) ซึ่งมีส่วนประกอบคือ กลูตารัลดีไฮด์ร้อยละ 5 HEMA ร้อยละ 35 และน้ำ³⁸ การศึกษาพบว่า เมื่อใช้ Gluma Desensitizer (Heraeus Kulzer, South Bend, IN, USA) ปรับสภาพเนื้อฟันที่ถูกกัดด้วยกรดฟอสฟอริก นาน 60 วินาที สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MMPs ได้ถึงร้อยละ 86¹²⁷ อีกทั้งการที่มีน้ำและ HEMA เป็นองค์ประกอบช่วยให้กลูตารัลดีไฮด์แทรกซึมได้ดีและช่วยฟื้นฟูเส้นใยคอลลาเจนที่ฟุบตัว¹¹³ นอกจากนี้

กสูตรอัลดีไฮด์เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์สารยึดติด ได้แก่ Syntac Adhesive (Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein) และ Glumabond Universal (Heraeus Kulzer, Webrheim, Germany)

คาร์โบไดอิมด์ ไฮโดรคลอไรด์

คาร์โบไดอิมด์ ไฮโดรคลอไรด์ (1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride: EDC) สามารถเพิ่มการครอสลิงค์ของคอลลาเจนในเมทริกซ์นอกเซลล์ของเนื้อฟันได้อย่างมีประสิทธิภาพ ส่งผลให้เพิ่มความต้านทานต่อการถูกทำลายโดยเอนไซม์ย่อยโปรตีนและเพิ่มความคงทนให้การยึดติดเนื้อฟัน⁹ นอกจากนี้ EDC มีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 เมื่อใช้ร่วมกับสารยึดติดระบบเอทซ์แอนดรีนส์สามชั้นตอน Optibond FL (Kerr, Orange, CA, USA) และสารยึดติดระบบเอทซ์แอนดรีนส์สองชั้นตอน Scotchbond 1XT, (3M ESPE, St Paul, MN, USA)⁸¹ และเมื่อใช้ EDC ความเข้มข้น 0.5 โมลลาร์ ปรับสภาพเนื้อฟันที่ถูกกัดด้วยกรดฟอสฟอริก เป็นเวลา 60 วินาที ก่อนทาสารบอนด์ระบบเอทซ์แอนดรีนส์สองชั้นตอน Adper Single Bond 2 (3M ESPE, St Paul, MN, USA) สามารถป้องกันการเสื่อมสลายบริเวณรอยต่อของเรซินและเนื้อฟันได้ เมื่อเวลาผ่านไป 12 เดือน โดยไม่มีผลลดความแข็งแรงของการยึดติดโดยทันที¹³⁵ และไม่เป็นอันตรายต่อโอดอนโทบลาสต์ไลค์เซลล์ (odontoblast-like cell)¹³⁶

ไรโบฟลาวิน (Riboflavin)

ไรโบฟลาวิน หรือ วิตามินบี 2 เมื่อถูกกระตุ้นด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตหรือแสงสีฟ้า ทำให้เกิดพันธะโควาเลนต์เชื่อมระหว่างกลุ่มเอมีน (amine) ของไกลซีน (glycine) ของสายโปรตีนหนึ่งกับกลุ่มคาร์บอนิล (carbonyl) ของโพรลีน (proline) และไฮดรอกซีโพรลีน (proline) ของอีกสายโปรตีนหนึ่ง⁴⁰ การศึกษาพบว่า การใช้ไรโบฟลาวินความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปรับสภาพเนื้อฟันที่ถูกกัดด้วยกรดฟอสฟอริก แล้วกระตุ้นด้วยรังสียูวีเอ (UVA) เป็นเวลา 2 นาที หรือกระตุ้นด้วยเครื่องฉายแสง

ชนิดแสงสีฟ้า (blue light) เป็นเวลา 20 นาที ก่อนทาสารบอนด์ สามารถเพิ่มค่าความแข็งแรงของการยึดติด อีกทั้งสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MMPs และลดการเสื่อมสลายของการยึดติดระหว่างเรซินและเนื้อฟัน^{27, 37} แต่ยังคงมีความยุ่งยากในการใช้รังสีอัลตราไวโอเล็ต หรือจำเป็นต้องทำการฉายแสงเพิ่มขึ้นอีกหนึ่งขั้นตอน

สารคอลลาเจนเกิดครอสลิงค์จากธรรมชาติ

สารสกัดจากชาเขียว

สารพอลิฟีนอล (polyphenol) ที่สกัดจากชาเขียว โดยเฉพาะสารเอพิแกลโลคาเทชิน (epigallocatechin : EGCG) นอกจากเป็นสารคอลลาเจนครอสลิงค์แล้ว ยังมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 โดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์³³ จากการทดลองพบว่า เมื่อใช้สารสกัดจากชาเขียวความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ปรับสภาพเนื้อฟันที่ถูกกัดด้วยกรดฟอสฟอริก ก่อนทาสารไพรเมอร์และบอนด์ระบบเอทซ์แอนด์รินส์สามขั้นตอน Optibond FL (Kerr, Orange, CA, USA) สามารถลดการเสื่อมสลายของการยึดติดระหว่างเรซินและเนื้อฟัน เมื่อทำการแช่ในน้ำลายเทียมนาน 9 เดือน แต่ไม่มีผลเมื่อใช้ร่วมกับสารยึดติดระบบเซลฟ์เอทซ์สองขั้นตอน Clearfil SE Bond (Kuraray, Osaka, Japan)¹⁹² และ เมื่อใช้สาร EGCG ความเข้มข้นร้อยละ 0.02 และ 0.1 ละลายในเอทานอล ปรับสภาพเนื้อฟันหลังถูกกัดด้วยกรดฟอสฟอริก ก่อนทาสารบอนด์ระบบเอทซ์แอนด์รินส์สองขั้นตอน Adper Single Bond 2 (3M ESPE, St Paul, MN, USA) ช่วยลดการเสื่อมสลายของการยึดติดเนื้อฟันและพบการรั่วซึมระดับนาโนน้อยกว่ากลุ่มควบคุม¹⁸⁵ เมื่อนำสาร EGCG ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ผสมในสารไพรเมอร์ของ Clearfil SE Bond (Kuraray, Osaka, Japan) ช่วยลดการเสื่อมสลายของการยึดติดเนื้อฟันได้เมื่อแช่น้ำนาน 6 เดือน

สารสกัดจากเมล็ดองุ่น

สารสกัดจากเมล็ดองุ่นมีสารประกอบพอลิฟีนอลหลายชนิดเป็นองค์ประกอบ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารโพรแอนโทไซยานิดิน (proanthocyanid) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารคอลลาเจนครอสลิงค์ และสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีน ทั้งเอนไซม์ MMPs และ cysteine cathepsin การศึกษาพบว่าสารสกัดจากเมล็ดองุ่นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ cysteine cathepsin ได้ดีกว่าคลอร์เฮกซิดิน^{70, 143} จึงมีการศึกษาเพื่อนำสารสกัดจากเมล็ดองุ่นมาใช้ปรับเปลี่ยนชีวภาพเนื้อฟันเพื่อหวังผลช่วยลดการเสื่อมสลายของการยึดติดระหว่างเรซินและเนื้อฟัน

สารสกัดจากเมล็ดองุ่น

องค์ประกอบสำคัญในสารสกัดจากเมล็ดองุ่น

ผลิตภัณฑ์จากองุ่น ได้แก่ ไวน์ สารสกัดจากเมล็ดองุ่น และสารสกัดจากเปลือกองุ่น ประกอบด้วยสารประกอบโพลีฟีนอลหลายชนิดที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) สารประกอบโพลีฟีนอลมีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนแอโรแมติก (aromatic ring) ที่มีจำนวนหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) รวมอยู่ในโมเลกุล ตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป สารประกอบโพลีฟีนอลเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolite) ของพืช ทำหน้าที่ในการป้องกันพืชจากรังสีอัลตราไวโอเล็ตและพยาธิสภาพ โดยสามารถจำแนกสารประกอบพอลิฟีนอลได้มากกว่า 8,000 ชนิด แบ่งเป็นกลุ่มตามลักษณะโครงสร้างทางเคมี คือ กรดฟีนอลิก (phenolic acids) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) สติลเบิน (stilbenes) และ ลิกแนน (lignans)¹¹⁰

สารประกอบโพลีฟีนอลที่พบในสารสกัดจากเมล็ดองุ่น เช่น กรดฟีนอลิก (phenolic acids) แอนโทไซยานิน (anthocyanins) และ โพรแอนโทไซยานิดิน (proanthocyanidins) เป็นต้น โพรแอนโทไซยานิดิน เป็นสารประกอบในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoid) มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (high-

molecular-weight) ประกอบด้วยโมโนเมอร์ฟลาแวนไตรออล (flavan-3-ol) คาเตชิน ((+)-catechin) และ อีพิกคาเตชิน ((-)-epicatechin) ประมาณ 2.3 – 8.2 mg/g ซึ่งมากกว่าในเปลือกองุ่น 20 เท่า โพรแอนโทไซยานิดินในเมล็ดองุ่นมีโครงสร้างเฉพาะที่เรียกว่า oligomeric proanthocyanidin complexes (OPCs) คือ มีโครงสร้างโพลิเมอร์ที่เกิดจากการเชื่อมกันของคาเตชินและอีพิกคาเตชิน 2 หรือ 3 โมเลกุล ซึ่งต่างจากในเปลือกองุ่นที่มักพบการเชื่อมกันของคาเตชินและอีพิกคาเตชิน 4 โมเลกุล³⁹ ทั้งนี้ปริมาณและโครงสร้างของโพรแอนโทไซยานิดินแตกต่างกันในแต่ละส่วนขององุ่น สายพันธุ์ สภาพภูมิศาสตร์และภูมิอากาศที่เพาะปลูกองุ่น^{90, 118}

คุณสมบัติทางเภสัชวิทยาของสารสกัดจากเมล็ดองุ่น

จากการศึกษาในห้องทดลองโดยใช้ peroxy และ hydroxyl radical scavenging assay พบว่าสารสกัดจากเมล็ดองุ่นมีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าวิตามินซี 20 เท่า และวิตามินอี 50 เท่า ซึ่งความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระแปรผันตรงกับความเข้มข้น¹³³ สารสกัดจากเมล็ดองุ่นจึงถูกนำมาใช้รักษาโรคที่เป็นผลมาจากการมีอนุมูลอิสระ (free radical) และใช้ในการป้องกันการทำลายเซลล์โดยอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ สารสกัดจากเมล็ดองุ่นยังมีผลทางเภสัชวิทยาอีกมากมาย เช่น ต้านเซลล์มะเร็ง ลดระดับน้ำตาลในเลือด ลดความดันโลหิต เพิ่มความแข็งแรงของหลอดเลือด เพิ่มความยืดหยุ่นของข้อต่อ ป้องกันผิวจากแสงแดด ช่วยการหายของแผล ลดการอักเสบ การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและไวรัส^{24, 53} การศึกษาในห้องทดลองพบว่า สารสกัดจากเมล็ดองุ่นความเข้มข้น 2 mg/ml ขึ้นไป สามารถยับยั้งการสร้างแผ่นฟิล์มชีวภาพ (biofilm) ของเชื้อ *S. Mutans* และยับยั้งการเกิดฟันผุในชั้นเคลือบฟัน (enamel caries) ทั้งนี้ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรคเป็นผลจากองค์ประกอบที่อยู่ในเมล็ดองุ่น ได้แก่ gallic acid, hydroxyl cinnamic acid, flavonols, trans-resveratrol และ tannins¹⁹¹

ความปลอดภัยของสารสกัดจากเมล็ดองุ่น

จากการศึกษาในระยะยาวในสัตว์ทดลองและการศึกษาทางคลินิก ซึ่งศึกษาโดยให้บริโภคสารสกัดจากเมล็ดองุ่นในรูปแบบอาหารเสริม การใช้ร่วมกับยารักษาโรค การผสมในเครื่องดื่ม และการใช้เป็นยาทาภายนอก พบว่าสารสกัดจากเมล็ดองุ่นมีความปลอดภัย ไม่มีรายงานความเป็นพิษของสารสกัดจากเมล็ดองุ่น^{7, 35, 55, 87, 116, 158} สารสกัดจากเมล็ดองุ่นถูกจำหน่ายเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริม สามารถรับประทานได้อย่างปลอดภัยถึง 720 mg/day โดยไม่มีผลข้างเคียง⁵⁷

การศึกษาและการใช้งานสารสกัดจากเมล็ดองุ่นในทางทันตกรรม

ความคาดหวังในการทำให้เนื้อฟันมีความแข็งแรงคงทนมากขึ้น สามารถต้านทานหรือหยุดพยาธิสภาพของเนื้อฟันได้ จึงมีแนวคิดการปรับเปลี่ยนชีวภาพของเนื้อฟันโดยทำให้เกิดการครอสลิงค์ภายนอก (exogeneous cross-linking) ของเส้นใยคอลลาเจนจากการใช้สารเคมีที่ทาบนเนื้อฟันทั้งสารสังเคราะห์ เช่น กลูตารัลดีไฮด์ คาร์โบไดอิมൈด์ และสารสกัดจากธรรมชาติ เช่น สารอีพิแกลโลคาเทชินจากชาเขียว สารสกัดจากเมล็ดองุ่น เป็นต้น เนื่องจากความเป็นพิษของสารสังเคราะห์จำพวกกลูตารัลดีไฮด์ และความนิยมใช้ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติมากขึ้น^{138, 169} สารสกัดจากเมล็ดองุ่นจึงถูกนำมาศึกษาเพื่อในการปรับเปลี่ยนชีวภาพของเนื้อฟัน พบว่าสารสกัดจากเมล็ดองุ่นมีคุณสมบัติทำให้เกิดการครอสลิงค์ของเส้นใยคอลลาเจน โดยเกิดการเชื่อมพันธะเคมีกับโพรลีน (proline) ได้ทั้งแบบโคเวเลนต์ (covalent) ไอออนิก (ionic) ไฮโดรเจน (hydrogen) และไฮโดรโฟบิกบอนด์ (hydrophobic bonding) ซึ่งต่างจากการเกิดครอสลิงค์โดยกลูตารัลดีไฮด์ที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาเชื่อมพันธะเคมีระหว่างไลซีน (lysine) หรือ ไฮดรอกซีไลซีน (hydroxylysine) ของคอลลาเจนเปปไทด์เชน (collagen peptide chain)^{101, 115} จากการวิเคราะห์ระดับการครอสลิงค์ (cross-linking degree) โดยปฏิกิริยานินไฮดริน (ninhydrin) เป็นหลักฐานหนึ่ง que แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเมล็ดองุ่นเพิ่มการครอสลิงค์ของเส้นใยคอลลาเจนในเนื้อฟันได้จริง

การปรับเปลี่ยนชีวภาพเนื้อฟันด้วยสารสกัดจากเมล็ดองุ่น ทำให้เนื้อฟันมีคุณสมบัติทางกลที่ดีขึ้น จากการศึกษาในห้องทดลอง พบว่าการปรับเปลี่ยนชีวภาพเนื้อฟันที่ถูกดึงแร่ธาตุออกด้วยสารสกัดจากเมล็ดองุ่นสามารถเพิ่มค่าอิลาสติก โมดูลัส (elastic modulus)^{22, 23} และค่าความแข็งแรงดึงสูงสุด (ultimate tensile strength) ของเนื้อฟันได้^{10, 50, 68} ทั้งนี้ความสามารถในการเพิ่มคุณสมบัติทางกลแปรผันตามความเข้มข้นและระยะเวลาที่สารสัมผัสกับเนื้อฟัน^{10, 22}

การศึกษาศักส่วนการขยายตัว (swelling ratio) คือ สัดส่วนน้ำหนักขึ้นตัวอย่างที่ดูน้ำอย่างเต็มที่ต่อน้ำหนักขึ้นตัวอย่างแห้ง พบว่าการปรับเปลี่ยนชีวภาพเนื้อฟันที่ถูกดึงแร่ธาตุออกด้วยสารสกัดจากเมล็ดองุ่น ทำให้มีสัดส่วนการขยายตัวต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ปรับเปลี่ยนชีวภาพเนื้อฟันด้วยสารสกัดจากเมล็ดองุ่น^{23, 50} การมีสัดส่วนการขยายตัวต่ำอาจบ่งบอกถึงความเชื่อมแน่นของโครงข่ายเส้นใยคอลลาเจนที่สามารถป้องกันการดูดน้ำและคงสภาพไม่ให้ยุบตัว เนื้อฟันที่ถูกปรับเปลี่ยนชีวภาพด้วยสารสกัดจากเมล็ดองุ่นยังคงสภาพช่องว่างระหว่างเส้นใยคอลลาเจนไม่ยุบตัวหลังจากเป่าเนื้อฟันให้แห้ง⁶⁸ ดังนั้นการปรับเปลี่ยนชีวภาพเนื้อฟันด้วยสารสกัดจากเมล็ดองุ่นน่าจะเป็นวิธีการหนึ่งซึ่งช่วยลดความยุ่งยากของการยึดติดเนื้อฟันแบบมอยส์บอนดิง (moist bonding) นอกจากนี้ การปรับสภาพเนื้อฟันด้วยโปรแอนโทไซยานินทำให้ปริมาณโปรตีโอไกลแคน (proteoglycans) ในเมทริกซ์เนื้อฟัน (dentin matrix) ลดลง¹⁰

การศึกษาโดยใช้เอนไซม์ MMPs สำเร็จรูปและการใช้ MMPs ในเนื้อฟัน พบว่าสารสกัดจากเมล็ดองุ่นความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9¹⁴³ การใช้สารสกัดจากองุ่น MegaNatural™ Gold Grape Seed Extract (California, USA) ความเข้มข้นร้อยละ 6.5 ปรับสภาพเนื้อฟันหลังถูกกัดด้วยกรดฟอสฟอริก นาน 10 นาที ก่อนทาสารยึดติดระบบเอทซ์แอนดรีนส์สองขั้นตอน One Step Plus (Bisco, Schaumburg, IL, USA) และ Adper Single Bond Plus (3M ESPE, St Paul, MN, USA) สามารถลดการเสื่อมสลาย

ของการยึดติดระหว่างเรซินและเนื้อฟันได้ เมื่อแช่ในน้ำนาน 30 เดือน⁶⁶ ถึงแม้ระยะเวลาดังกล่าวไม่เหมาะสมต่อการใช้งานจริงทางคลินิก แต่มีการศึกษาพบว่าสารสกัดจากเมล็ดองุ่นความเข้มข้นร้อยละ 1 และ 5 โดยน้ำหนัก ปรับสภาพเนื้อฟันนาน 60 วินาที ก่อนการทาสารยึดติดในการยึดติดเนื้อฟันด้วยสารยึดติดระบบเอทซ์แอนดรีนส์ ซึ่งเป็นเวลาที่เหมาะสมสำหรับการใช้งานทางคลินิก สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ย้อยโปรตีนบริเวณชั้นไฮบริด และเพิ่มความคงทนบริเวณระหว่างเรซินและเนื้อฟัน¹⁴¹ นอกจากนี้ Zhou และคณะ ปี 2016 ได้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากเมล็ดองุ่นความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก ที่ถูกละลายในน้ำเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 5 นอกจากสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MMPs เพิ่มความคงทนของการยึดติดแล้วยังช่วยคงสภาพช่องว่างระหว่างเส้นใยคอลลาเจนหลังทำการเป่าแห้ง อันน่าจะเป็นประโยชน์ต่อการลดความยุ่งยากของการยึดติดแบบมอยส์บอนด์

การวัดปริมาณและการวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ MMPs

Bioassay

เป็นวิธีการวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ (enzyme activity) โดยวัดจากการสลายสารตั้งต้น (substrate) วิธีการนี้คือมีข้อจำกัดเรื่องความจำเพาะ (specificity) ไม่สามารถแยกแยะการทำงานของเอนไซม์ต่างชนิดที่สามารถย่อยสลายสารตั้งต้นชนิดเดียวกันได้ ฉะนั้นจึงมีข้อผิดพลาดในการวัดปริมาณการทำงานของเอนไซม์²⁶ ประเภทของ bioassay แบ่งตามชนิดของสารตั้งต้นที่ใช้ได้แก่ การใช้ biotinylated gelatin ที่มีการเติม biotin ลงไปใน gelatin เพื่อเพิ่มความไวในการวัดปริมาณ activity of MMP-2 and MMP-9 โดยวิเคราะห์จากการเพิ่มขึ้นของ gelatin fragments และการลดลงของ biotin ใช้เวลาในการตรวจวัด 2 ชั่วโมง วัดปริมาณเอนไซม์น้อยสุด 0.16 นาโนกรัม^{26, 119} และการใช้ succinylated gelatin วิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์จากการตรวจวัดปริมาณ primary amines ที่เกิดจากการสลาย gelatin จากเอนไซม์ gelatinase ซึ่งจะปรากฏสีที่

ความเข้มแสง 450 นาโนเมตร ใช้เวลา 30 นาที สามารถวิเคราะห์ MMP-2 and -9 แต่ต้องมีปริมาณ MMP-9 อย่างน้อย 12.5 นาโนกรัม และ MMP-2 อย่างน้อย 20 นาโนกรัม⁸

Zymography assay

เป็นวิธีการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ที่ถูกคิดค้น โดย Gross และ Lapière ปี 1962 เพื่อการศึกษาวิเคราะห์การเสื่อมสลายของคอลลาเจนและ MMPs ในลูกกบขึ้นเป็นครั้งแรก⁴² โดยวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์จากการตรวจวัดผลผลิตจากการเกิดปฏิกิริยาเคมีหรือการสูญหายไปของสารตั้งต้น เป็นวิธีการวัดเชิงปริมาณของ MMPs และ MMP inhibitors ที่มีความเที่ยงตรงและมีความไวสูง (accurate and sensitive quantitative technique) เหมาะสำหรับการตรวจคัดกรอง (screening) การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ แต่มีความจำเพาะและความไวในการทดสอบน้อยกว่า และใช้เวลานานกว่าวิธี ELISA สามารถแบ่ง zymography assay ออกเป็นเทคนิคต่าง ๆ ดังนี้

In gel zymography เป็นศึกษาการทำงานของเอนไซม์โดยใช้กระบวนการ gel electrophoresis นิยมใช้ gelatin sodium dodecyl sulfate (SDS) หรือ ที่เรียกว่า sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ซึ่งมีการผสมสารตั้งต้นที่จะถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ที่ทำการศึกษาลงไปใน SDS-PAGE เช่น เจลาติน (gelatin) เคซีน (casein) หรือ คอลลาเจน (collagen)^{141, 181} จากนั้นทำการวิเคราะห์โดยนำสารตัวอย่างมาผ่านกระบวนการ gel electrophoresis และ วิเคราะห์เชิงคุณภาพและเชิงปริมาณของเอนไซม์เทียบกับสารละลายมาตรฐาน (standard) สามารถวัดได้ทั้ง active enzyme pro-enzyme และ enzyme inhibitor^{122, 128}

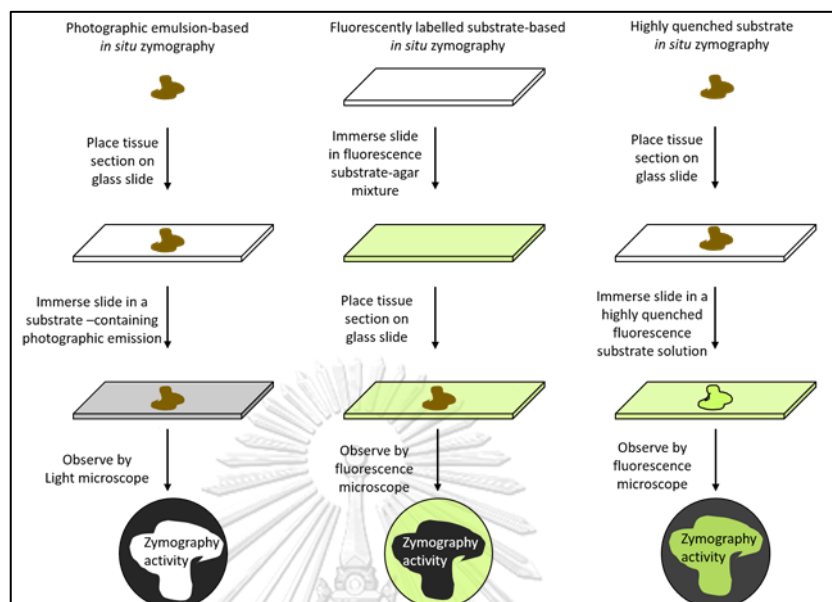
In situ zymography ใช้ตรวจวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ในชิ้นเนื้อเยื่อ (tissue section) โดยวัดได้เฉพาะเอนไซม์มีฤทธิ์ (active enzyme) ไม่สามารถตรวจวัดปริมาณเอนไซม์ในรูปไม่มีฤทธิ์ (pro-enzyme) และตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (enzyme inhibitor) วิธีนี้จึง

สามารถบอกความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ที่แท้จริง (net activity) ที่เกิดขึ้นบนเนื้อเยื่อนั้น สามารถทำได้ 3 วิธี (แสดงในรูปที่ 6) ดังนี้¹⁸¹

photographic emulsion-based approach นำชิ้นตัวอย่างยึดบนสไลด์แก้วไปแช่ในสารละลายที่มีสารตั้งต้นที่ถูกย้อมด้วยเงิน (silver-coated substrate) ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์และสารตั้งต้น จากนั้นส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง บริเวณที่มีการทำงานของเอนไซม์แสดงเป็นสีขาวบนพื้นหลังสีดำ เนื่องจากสารตั้งต้นที่ถูกย้อมด้วยเงินถูกย่อยสลายไป วิธีการนี้มีความยากในการย้อมสารตั้งต้นให้เหมือนกันทุกชิ้นตัวอย่าง¹⁸¹

fluorescently labeled substrate technique นำชิ้นตัวอย่างมายึดบนสไลด์แก้วที่ถูเคลือบด้วยสารตั้งต้นที่มีสารฟลูออเรสเซนต์ผสมอยู่ (fluorescent labeled substrate) ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์และสารตั้งต้น จากนั้นส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนต์ บริเวณที่มีการทำงานของเอนไซม์แสดงสีดำบนพื้นหลังสีฟลูออเรสเซนต์ เนื่องจากสารตั้งต้นที่มีสารฟลูออเรสเซนต์ผสมอยู่นั้นถูกย่อยสลายไป ความไวของวิธีการนี้ขึ้นอยู่กับความสามารถในการถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ของสารตั้งต้นที่ใช้¹⁸¹

highly quenched fluorescently labeled substrate analysis นำชิ้นตัวอย่างยึดบนสไลด์แก้ว แล้วนำไปแช่ในสารละลายที่มีสารตั้งต้นผสมกับสารไฮลิควีนซ์ฟลูออเรสเซนต์ (highly quenched fluorescent labeled substrate) ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์และสารตั้งต้น เมื่อสารตั้งต้นนั้นถูกเอนไซม์ในชิ้นตัวอย่างย่อยสลาย ทำให้สูญเสียสภาพของควีนซ์ฟลูออเรสเซนต์ เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนต์ บริเวณที่มีการทำงานของเอนไซม์จะปรากฏสีของฟลูออเรสเซนต์บนพื้นหลังสีดำ วิธีนี้มีความไวสูงและสามารถเตรียมสารตั้งต้นให้มีมาตรฐานเหมือนกันได้ง่าย จึงเป็นวิธีที่นิยมใช้ศึกษา



รูปที่ 7 แสดงการเตรียมสไลด์สำหรับ *in situ* zymography

ดัดแปลงจาก Vandooren และคณะ ปี 2013¹⁸¹

Immunoassay

เป็นวิธีการตรวจวัดปริมาณโมเลกุลทางชีววิทยา โดยใช้หลักการจับกันของแอนติบอดี

(antibody) ที่จำเพาะต่อแอนติเจน (antigen) สามารถใช้วัดปริมาณเอนไซม์โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อเอนไซม์ที่ต้องการตรวจวัด

Immunocapture assay วิธีการนี้ถูกเริ่มใช้ครั้งแรกโดย Verheijen และคณะ ปี 1997 หลักการทดสอบ คือ การเคลือบผิวเพลท (plate) ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ MMP ที่ต้องการทดสอบ เมื่อใส่สารตัวอย่างลงไป MMP จะถูกยึดตรึงไว้ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะนั้น ทำการตรวจวัด active form โดย active MMP จะไปกระตุ้นให้ pro-urokinase ที่อยู่ในชุดทดสอบเปลี่ยนเป็น urokinase ซึ่งไปกระตุ้นให้สาร chromogenic peptide เกิดการเกิดสีเกิดขึ้น เช่น ตัวอย่างชุด

ทดสอบ Biotrak™ MMP-2 activity assay (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) (แสดงในรูปที่ 8) แต่หากต้องการวัดปริมาณเอนไซม์ทั้งหมดในตัวอย่าง สามารถทำได้โดยกระตุ้น pro-enzyme ด้วย 4-aminophenylmercuric acetate (APMA) ก่อนตรวจวัดปริมาณเอนไซม์ วิธีการนี้ใช้เวลาในการทดสอบไม่นาน สามารถวัดปริมาณการทำงานของเอนไซม์ MMP ที่จำเพาะได้ตามชนิดที่ต้องการทดสอบ ทำงาน ใช้เวลาน้อย มีความไวสูงกว่าวิธี zymography สามารถตรวจวัดปริมาณ MMP-2 ได้น้อยที่สุด 0.5 ng/mL และมีความจำเพาะสูง ไม่เกิดปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) กับเอ็มเอ็มพีส์ชนิดอื่น

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) อาศัยหลักการจับกันอย่างจำเพาะของแอนติเจนและแอนติบอดี ซึ่งแอนติบอดีถูกติดฉลากด้วยเอนไซม์คอนจูเกต (enzyme conjugate) วัดปริมาณสิ่งที่ต้องการตรวจวัดจากการเปลี่ยนสีของสารตั้งต้นที่เติมลงไปเพื่อเกิดปฏิกิริยากับเอนไซม์คอนจูเกต ชนิดของ ELISA แบ่งเป็น direct ELISA sandwich ELISA และ competitive ELISA วิธี ELISA มีความไวและความจำเพาะสูง แต่ใช้เวลาทดสอบค่อนข้างนาน²⁶

Western blotting หรือ immunoblotting เป็นวิธีการที่มีสมรรถภาพและความจำเพาะสูง แต่มีข้อด้อยคือ ราคาแพง มีขั้นตอนหลายขั้นตอนและใช้เวลานาน¹⁹⁴

นอกจากนี้วิธีการวัดปริมาณเอนไซม์ด้วยวิธีอื่น ๆ เช่น **Radio isotopic assay** โดยใส่ radioisotope เข้าไปเกาะกับเอนไซม์ สามารถตรวจวัดโมเลกุลทางชีววิทยาจำพวกโปรตีนได้แม้มีปริมาณน้อย แต่มีข้อเสียของสารกัมมันตภาพรังสี หรือ วิธีการ **fluorimetric assay** โดยการใช้สารตั้งต้นที่ถูกติดฉลากด้วยสารฟลูออเรสเซนต์ในการตรวจวัด เป็นต้น²⁶

การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีนในชั้นไฮบริด

Mazzoni และคณะ ปี 2012 ได้แนะนำว่าวิธีการทดสอบการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMPs จากกระบวนการยึดติดเนื้อฟันโดยใช้ชุดทดสอบ Biotrak™ MMP-2 and MMP-9 activity assay (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) และทดสอบทำงานของเอนไซม์ MMPs บริเวณชั้นไฮบริดด้วยวิธี *in situ* zymography ที่ใช้ highly quenched fluorescent-gelatin (E12055 EnzCheck Gelatinase/Collagenase assay Kit, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) เป็นสารตั้งต้นในการทดสอบ⁸⁴

ชุดทดสอบ Biotrak™ MMP activity assay (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) ใช้ในการวัดปริมาณ active enzyme จากการจำลองกระบวนการยึดติดเนื้อฟันด้วยการใช้ผงเนื้อฟันจากฟันมนุษย์ ผ่านกระบวนการดึงแร่ธาตุออกด้วยกรดฟอสฟอริก แล้วผสมสารยึดติดลงไป ทำการดึงโปรตีน (protein extraction) จากนั้นนำของเหลวส่วนเหนือตะกอน (supernatant) ไปวัดปริมาณ active MMP⁸⁴ วิธีการทดสอบนี้ใช้อธิบายกระบวนการยึดติดเนื้อฟันนั้นสามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP ในเนื้อฟัน

สำหรับการทดสอบด้วยวิธี *in situ* zymography หลังจากทำการยึดติดเนื้อฟันด้วยสารยึดติดแล้ว ทำการตัดชิ้นงานเป็นแผ่น (slab) ความหนาไม่เกิน 0.5 มิลลิเมตร ยึดติดบนสไลด์แก้ว (glass sild) ย้อมด้วยสารละลาย highly quenched fluorescent-gelatin (E12055 EnzCheck Gelatinase/Collagenase assay Kit, Molecular Probes, Eugene, OR, USA)^{81, 84, 141} ซึ่งชุดทดสอบนี้ใช้ high-quenched fluorescein-gelatin substrate เป็นสารตั้งต้นให้เกิดปฏิกิริยาการย่อยโดยเอนไซม์ MMPs บ่มในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หากมีการทำงานของเอนไซม์ สารตั้งต้นจะถูกย่อยสลายและสูญเสียสภาพ quenched fluorescent โดยจะปรากฏการเรืองแสงของสารฟลูออเรสเซนต์ เมื่อนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบคอลโพคอล ชุดทดสอบ

นี้มีความไวสูง เหมาะสำหรับการทดสอบการทำงานของเอนไซม์ MMPs กลุ่ม gelatinase และ collagenase ในเนื้อเยื่อตัวอย่าง แต่ไม่สามารถระบุได้อย่างจำเพาะว่าการย่อยสลายสารตั้งต้นนั้นเป็นผลมาจากเอนไซม์ MMPs ชนิดใด รวมทั้งอาจเป็นผลจากการย่อยสลายโดยเอนไซม์ย่อยโปรตีนชนิดอื่นที่อยู่ในเนื้อเยื่อตัวอย่าง ในชุดทดสอบมี *Clostridium gelatinase* เพื่อใช้เป็น positive control และมี MMP inhibitor คือ 1, 10 – phenanthroline เพื่อใช้เป็น negative control การทดสอบด้วยวิธีนี้ใช้อธิบายว่าเมื่อทำการยึดติดเนื้อฟันแล้วบริเวณชั้นไฮบริดยังคงมี active enzyme อยู่มากน้อยเพียงใด และสามารถศึกษาตำแหน่งที่การทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีนบริเวณชั้นไฮบริด เพื่อเป็นการประเมินการเสื่อมสลายของการยึดติดระหว่างเรซินและเนื้อฟัน

การศึกษาจุลสัณฐานวิทยาบริเวณรอยต่อระหว่างเรซินและเนื้อฟัน

การศึกษาลักษณะจุลสัณฐานวิทยาของรอยต่อระหว่างเรซินและเนื้อฟัน สามารถดูได้จากหลายวิธี นอกจากวิธีที่นิยมคือ การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน (transmission electron microscopy; TEM) และ กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (scanning electron microscopy; SEM) แล้วยังสามารถศึกษาได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอลเลเซอร์ (confocal laser microscopy)¹⁷⁹ วิธีการย้อมฮิสโตเคมี (histochemistry) และอิมมูโนพยาธิวิทยา (immunohistochemistry)¹⁴⁶

กล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอลแบบเลเซอร์ ถูกนำเสนอให้ใช้ในการศึกษาจุลสัณฐานวิทยาของรอยต่อระหว่างเรซินและเนื้อฟัน โดยการใช้สีย้อมฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent dye) เช่น โรดามีน บี (rhodamine B)⁶⁴ ฟลูออเรสซิน (fluorescein)⁶ ผสมในสารไพรเมอร์หรือแอตชีฟก่อนนำไปทำการยึดติดเนื้อฟัน จุลสัณฐานวิทยาของการยึดติดเนื้อฟันจากกล้องคอนโฟคอลแบบเลเซอร์มีความสอดคล้องกับภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด¹² แสดงลักษณะการแพร่ของสารยึดติดในชั้นไฮบริดและท่อเนื้อฟัน^{6, 30, 64} และใช้ศึกษาการรั่วซึมระดับนาโนได้¹⁸⁶ แต่อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยรายงานถึงผลของสีย้อมฟลูออเรสเซนต์ต่อการลดค่ากำลังการยึดติด¹⁸⁴ หากสีย้อมฟลูออเรสเซนต์ที่

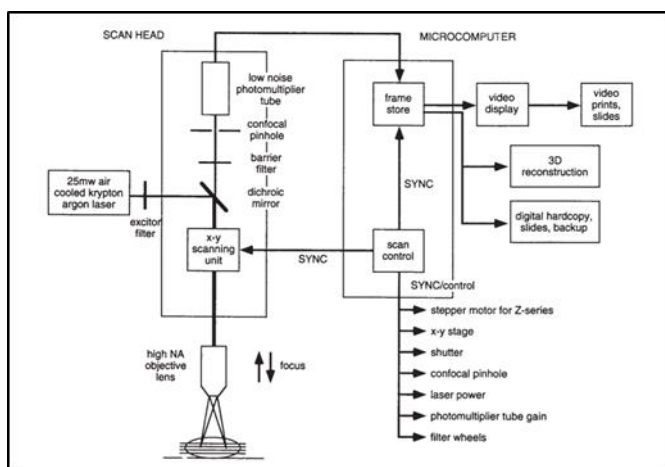
ผสมในสารยึดติดมีการแทรกซึมไปในเนื้อฟันจะส่งผลให้การแปรผลผิดพลาด¹² ดังนั้นพึงพิจารณาถึงผลเสียนี้เมื่อใช้สีฟลูออเรสเซนต์ผสมในสารไพรเมอร์หรือแอตชีซีฟ อีกทั้งกล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอลสามารถใช้ในการศึกษาการทำงานของเอนไซม์บริเวณชั้นไฮบริด^{81, 84}

นอกจากนี้วิธีการศึกษาจุลสัณฐานวิทยาบริเวณรอยต่อระหว่างเรซินและเนื้อฟัน เพื่อศึกษาลักษณะเส้นใยคอลลาเจนที่ไม่ถูกหุ้มด้วยเรซินด้วยวิธีย้อมสีฮิสโตเคมี (histochemistry) และ อิมมูโนฮิสโตเคมี (Immunohistochemistry) เช่น วิธีย้อมสีโกลด์เนอร์ ไทรโครม (Goldner's trichrome stain) ร่วมกับการใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) เส้นใยคอลลาเจนที่ไม่ถูกหุ้มจะปรากฏสีแดง¹⁴⁶ วิธีย้อมสีอิมมูโนโกลด์ (immunogold) อนุภาคทองจะจับกับเส้นใยคอลลาเจนที่ไม่ถูกหุ้ม¹⁶ แต่วิธีย้อมสีฮิสโตเคมีและอิมมูโนฮิสโตเคมีมีความยากในการเตรียมชิ้นงานให้มีความหนาประมาณ 3-5 ไมโครเมตร¹⁴⁶

กล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอลเลเซอร์



กล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอลแบบเลเซอร์มีหลักการเหมือนกล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอลแบบใช้แสง คือ แสงจากแหล่งกำเนิดผ่านรูขนาดเล็ก (pin hole) สะท้อนผ่านเลนส์ใกล้วัตถุ (objective lens) ตัวที่หนึ่งผ่านไปยังชิ้นตัวอย่าง จากนั้นแสงจากชิ้นตัวอย่างจะสะท้อนผ่านเลนส์ใกล้วัตถุตัวที่สองผ่านเข้ารูขนาดเล็กเพื่อเข้าตัวรับแสง (photodetector) แต่กล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอลเลเซอร์ใช้เลเซอร์เป็นแหล่งกำเนิดแสง และใช้คอมพิวเตอร์ควบคุมการสแกนภาพ ใช้คอมพิวเตอร์ในการจัดเก็บข้อมูลและวิเคราะห์ภาพโดยใช้ซอฟต์แวร์ (computer software)¹⁰⁹ (แสดงในรูปที่ 9)



รูปที่ 8 แสดงภาพจำลองการทำงานของกล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอลเลเซอร์
คัดลอกจาก Paddock ปี 2000¹⁰⁹

กล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอลแบบเลเซอร์เป็นเครื่องมือที่สำคัญในการศึกษาภาพถ่ายทางชีวการแพทย์ (biomedical imaging) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อต้องการศึกษาชิ้นตัวอย่างที่มีความหนา มากกว่า 2 ไมโครเมตร⁸⁴ ข้อดีของกล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอลเลเซอร์ คือ สามารถให้กำเนิดเลเซอร์ที่มีความเสถียรหลากหลายความยาวคลื่น แสงรบกวนในการส่องภาพน้อย ภาพที่ได้มีความละเอียดชัดเจน มีสิ่งรบกวนน้อย มีการประมวลผลภาพสู่ระบบคอมพิวเตอร์อย่างรวดเร็ว ประกอบกับซอฟต์แวร์ที่มีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ข้อมูล สามารถถ่ายภาพได้ทั้ง ภาพเดี่ยว (single optical section) การถ่ายภาพในช่วงเวลาหนึ่งๆ (time-lapse) ภาพถ่ายเซลล์มีชีวิต (living cell) ซี ซีรีส์ (Z series) และภาพสามมิติ (three-dimensional imaging)¹⁰⁹

การย้อมสีฟลูออเรสเซนซ์สำหรับกล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอลแบบเลเซอร์ จำเป็นต้องเลือกสีให้เหมาะสมกับตัวอย่างที่ต้องการศึกษา พร้อมทั้งเลือกช่วงความยาวคลื่นที่ไปกระตุ้นและทำให้ปรากฏสีของสารฟลูออเรสเซนซ์ที่เลือกใช้ (แสดงในตารางที่ 2) อีกทั้งจำเป็นต้องพิจารณาคุณสมบัติการเรืองแสงตามธรรมชาติ (autofluorescence) ของชิ้นตัวอย่าง หากตัวอย่างมีการเรืองแสงตาม

ธรรมชาติจะส่งผลต่อ background วิธีการดูปริมาณการเรืองแสงตามธรรมชาติทำได้โดยส่องขึ้น ตัวอย่างที่ไม่ย้อมสีฟลูออเรสเซนต์ด้วยความยาวคลื่นหลาย ๆ ค่า แล้วจดบันทึกไว้ แล้วเลือกใช้ความยาวคลื่นที่ไม่ก่อให้เกิดการเรืองแสงตามธรรมชาติ นอกจากนี้สามารถปรับแต่งภาพโดยการลบออกด้วยโปรแกรมซอฟต์แวร์ (digital subtraction)¹⁰⁹

ตารางที่ 2 แสดงช่วงความยาวคลื่นที่กระตุ้นสารสีฟลูออเรสเซนต์

Dye	Excitstion (nm)	Emission (nm)
Coumarin	350	440
DAPI	359	461
Fluorescien	496	518
Bodipy	503	511
Tetramethylrhodamine	554	576
Lissamine rhodamine	572	590

ตัวอย่างฟันที่นำมาศึกษา

ในการศึกษาประสิทธิภาพของการยึดติดเนื้อฟันหรือเคลือบฟันในห้องทดลอง มีทั้งการศึกษาโดยใช้ฟันสัตว์และฟันมนุษย์ ฟันวัวเป็นฟันสัตว์ที่นิยมนำมาใช้ศึกษาเนื่องจากสามารถหาได้ง่าย มีลักษณะค่อนข้างแบน ซี่ใหญ่ มักไม่พบรอยผุและความผิดปกติบนตัวฟัน¹⁸⁷ มีรายงานว่าฟันวัวมีองค์ประกอบทางเคมีและสัดส่วนแคลเซียมฟอสเฟตไม่แตกต่างจากฟันมนุษย์¹⁶⁰ แต่การศึกษาโดยใช้ฟันวัวยังมีข้อจำกัดเรื่องโครงสร้างของฟันวัวที่แตกต่างจากฟันมนุษย์ พบว่าฟันวัวมีผลึกเคลือบฟัน (enamel crystal) ขนาดใหญ่กว่าฟันมนุษย์⁴ และมีปริมาณท่อเนื้อฟัน (dentinal tubule) มากกว่าฟันมนุษย์^{74, 139} ฉะนั้น การแปลผลการศึกษาที่ใช้ฟันวัวจำเป็นต้องแปลผลด้วยความระมัดระวัง สำหรับการศึกษโดยใช้ฟันมนุษย์ ถึงแม้จะมีความยากลำบากในการจัดเก็บตัวอย่างฟันมนุษย์ที่ถูกถอนส่วนใหญ่เป็นฟันที่ผุใหญ่หรือมีพยาธิสภาพอื่น ๆ ยกเว้น ฟันที่ถอนเพื่อการจัดฟัน

และฟันกรามแท้ซี่ที่สาม ฟันมนุษย์ที่มาจากผู้ป่วยที่มีภูมิลำเนาแตกต่างกันหรืออายุแตกต่างกันส่งผลต่อความหลากหลายทางคุณภาพของฟัน อันจะส่งผลต่อความแปรปรวนของข้อมูล ฟันมนุษย์มีฟันที่จำกัดในการนำมาใช้ศึกษาเนื่องจากมีขนาดเล็กกว่า และมีความโค้งงอของปุ่มฟันมากกว่าฟันวัว¹⁸⁷ แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาโดยใช้ฟันมนุษย์ให้ผลการทดลองที่เสมือนสภาพจริงทางคลินิกมากที่สุด

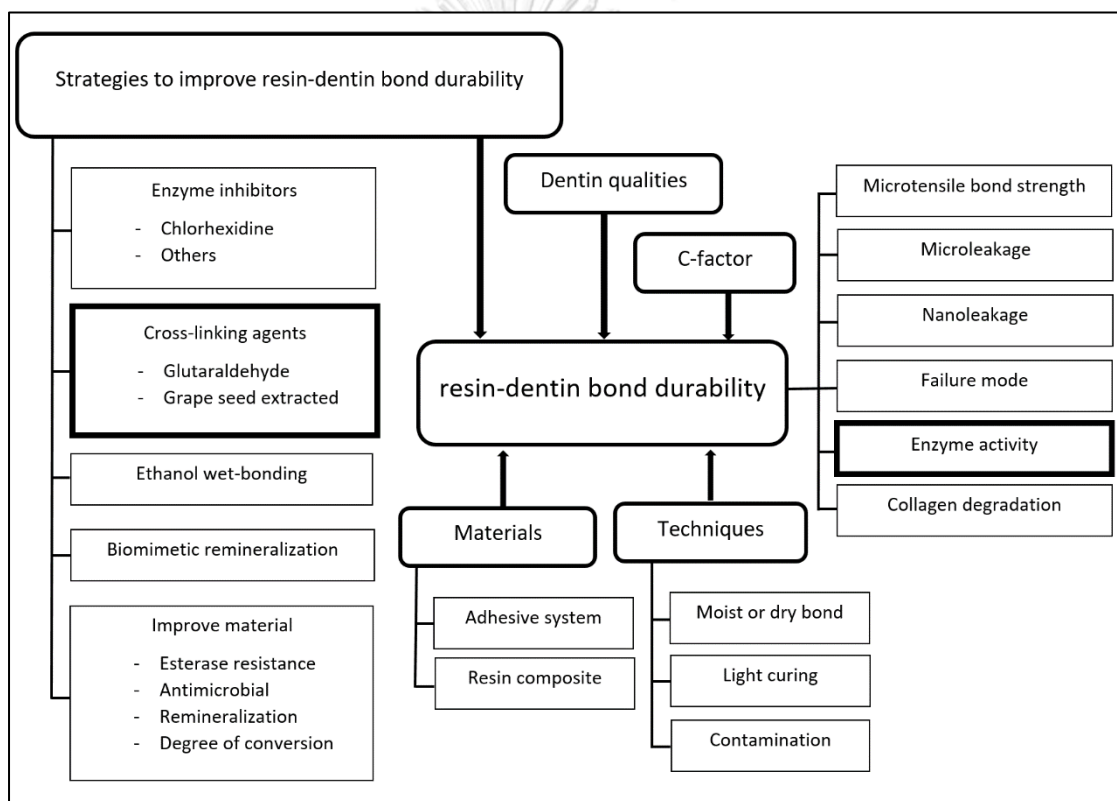
ฟันมนุษย์มีการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างอยู่เสมอ เนื่องจากกระบวนการตกตะกอนแร่ธาตุ (mineralization process) เนื้อฟันบริเวณตัวฟัน (coronal dentin) มีความหนาเพิ่มขึ้นเฉลี่ยปีละ 6.5 ไมโครเมตร ในขณะที่มีการลดลงของโอไดตอนโตบลาสต์ (odontoblast) ซับโอไดตอนโตบลาสต์ (sub-odontoblast) และ ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast)⁹⁶ สัดส่วนของปริมาณแร่ธาตุต่อปริมาณเส้นใยคอลลาเจนของเนื้อฟันบริเวณตัวฟันเพิ่มขึ้นตามอายุ⁹² ถึงแม้ปริมาณท่อเนื้อฟัน (dentinal tubule) ไม่สัมพันธ์กับอายุ โดยมีปริมาณท่อเนื้อฟันร้อยละ 10 โดยปริมาตร แต่เมื่ออายุมากขึ้นท่อเนื้อฟันมีขนาดเล็กส่งผลให้ลดปริมาณน้ำและลดการซึมผ่านของของเหลว (permeability)^{61, 92} สรุปได้ว่าโครงสร้างและองค์ประกอบของเนื้อฟันมีการเปลี่ยนแปลงไปตามอายุ แต่จากงานวิจัยยังไม่มีข้อสรุปที่แน่ชัดถึงความสัมพันธ์ของอายุและค่ากำลังการยึดติด^{106, 112, 150}

การเก็บฟันไว้นานส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในฟันมากขึ้น อันจะส่งผลต่อคุณภาพและค่ากำลังการยึดติด⁸⁹ ISO/TS11405 แนะนำช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บฟันเพื่อนำมาศึกษาไม่เกิน 1 ถึง 6 เดือนหลังการถอนฟัน และใช้สารละลายคลอรามิน (chloramine) ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ในการจัดเก็บฟันระหว่างรอทำการทดลอง นอกจากนี้ยังมีสารเคมีหลายชนิดที่ถูกแนะนำให้ใช้เพื่อจัดเก็บฟันระหว่างรอทำการทดลอง การแช่ในสารละลายไทมอล (thymol) ความเข้มข้น ร้อยละ 0.1 สามารถฆ่าเชื้อได้และไม่ส่งผลต่อค่ากำลังการยึดติด¹²³ การแช่ในน้ำเกลือหรือน้ำกลั่นยังไม่มีข้อสรุปแน่ชัดต่อค่ากำลังการยึดติด การแช่ในสารละลายฟอร์มอลิน (formalin) หรือ แอลกอฮอล์ (alcohol) และการฆ่าเชื้อด้วยออโตคลอว์ (autoclave) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง

ของอินทรียสารและส่งผลต่อค่ากำลังการยึดติด^{60, 123} นอกจากนี้ ในการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีนในเนื้อฟัน นิยมจัดเก็บฟันโดยการแช่แข็งเพื่อคงสภาพโครงสร้างและองค์ประกอบของฟันก่อนนำมาใช้ในการทดลอง^{127, 137} หรือนักวิจัยบางกลุ่มจัดเก็บโดยแช่ในน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.9 ที่ผสมโซเดียมเอไซด์ (sodium azide) ความเข้มข้นร้อยละ 0.02 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส^{142,}

143

กรอบแนวคิด



บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. ฟันกรามใหญ่ซี่ที่สามของมนุษย์บนหรือล่างที่ไม่มีรอยผุและพยาธิสภาพใด ๆ จำนวน 86 ซี่ ซึ่งผ่านการพิจารณาจริยธรรมการศึกษาวิจัยในมนุษย์ จากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการศึกษาวิจัยในมนุษย์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย วันที่ 9 มิถุนายน พ.ศ. 2560 (HREC-DCU 2017-056)
2. ไมโครปิเปตต์ และ ทิป (Micropipette and micropipette tip, Eppendorf aut pipette)
3. ไมโครทิวบ์ (Microtube, Invitrogen, CA, USA)
4. กระจกสไลด์ (Glass slide, sail brand CATNo.7101, UK)
5. กระจกปิดสไลด์ (Cover glass, Menzel-Glaser 22x22 mm #1, Germany)
6. น้ำยาเคลือบเล็บ (Nail vanish, Revlon, USA)
7. ชี้ผึ้งเหนียว (Sticky wax, KSD, Thailand)
8. ชี้ผึ้งตามขอบ (Periphery wax, Surgident, Korea)
9. กล่องดำที่มีฝาปิดสนิท (Generic)
10. เอ็นโดดอนติกไฟล์ (Endodontic file, K-file SybronEndo, Kerr, Orange, CA, USA)
11. หลอดเซนติฟิวก์พลาสติกชนิดพอลิโพรไพลีน (Polypropylene centrifuge tube, Invitrogen, CA, USA)
12. พู่กันปลายเล็ก (Microbrush; Ball-Point applicators, Kerr Orange, CA, USA)

13. กระดาษทรายซิลิกอนคาร์ไบด์ เบอร์ 600 (600-grit silicon-carbide paper, Pace Technologies, USA)
14. หัวกรอกากเพชรทรงกระบอก ขนาดหน้าตัด 1 มิลลิเมตร (Diamond cylinder bur, Intensiv Swiss Dental Products, Switzerland)
15. เครื่องมือสำหรับบูรณะเรซินคอมโพสิต (Composite filling instrument CVIPC, Hu-Friedy, USA)
16. กาวไซยาโนอะคริเลท (Cyanoacrylate glue; Loctite super glue, Henkel, USA)
17. น้ำกลั่น (Distilled water, ศูนย์วิจัยชีววิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)
18. น้ำปราศจากไอออน (Deionized water, ศูนย์วิจัยชีววิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. กรดฟอสฟอริกความเข้มข้นร้อยละ 32 (Scotchbond™ Universal Etchant, 3M ESPE, St Paul, MN, USA)
2. สารยึดติดยูนิเวอร์แซลแอดฮีซีฟ
 - 2.1 Single Bond Universal (3M ESPE, St Paul, MN, USA)
 - 2.2 G-Premio bond (GC, Tokyo, Japan)
3. เรซิน คอมโพสิต (Filtek Z350 XT, 3M ESPE, St Paul, MN, USA)
4. สารสกัดจากเมล็ดองุ่น (MegaNatural BP Grape Seed Extract, Health Origins, Pittsburgh, PA, USA) จากข้อมูลบริษัทผู้ผลิตรายงานว่า เป็นสารสกัดจากเมล็ดองุ่นพันธุ์ *Vitis vinifera* โดยสกัดด้วยไอน้ำอุณหภูมิสูง (hot water extraction) มีสารประกอบ

โพลีฟินอลทั้งหมดร้อยละ 90 - 95 องค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (food and drug administration; FDA) ได้จำแนกให้อยู่ในสถานะสารที่ยอมรับโดยทั่วไปว่าปลอดภัย (Generally Recognized As Safe; GRAS)

5. ไนโตรเจนเหลว (Liquid nitrogen, Linde, Thailand)
6. ชุดทดลอง Biotrak™ MMP-2 activity assay (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)
7. ชุดทดสอบ E12055 EnzCheck Gelatinase/Collagenase assay Kit (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)
8. สารเตรียมสไลด์ (Anti-fade; Mounting medium with Dapi H-1200, Vestashield, Vector Laboratories LTD, Cambridgeshire, UK)
9. โซเดียมเอไซด์ (Sodium azide, Sigma-Aldrich, MO, USA)
10. อะซิโตน (Acetone, Sigma-Aldrich, MO, USA)
11. 50 mM Tris-HCl (pH 6 ที่มือนักประกอบของ 5mM CaCl₂, 100 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 0.1% non-ionic detergent P-40, 0.1 mM ZnCl₂ และ 0.02% NaN₃)

เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

1. เครื่องฉายแสงเอลอีดี (LED light curing unite, Elipar S10, 3M ESPE, St Paul, MN, USA) ความยาวคลื่น 430 – 480 นาโนเมตร ความเข้มแสง 300 - 400 มิลลิวัตต์ต่อตารางเซนติเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของปลายหลอดฉายแสง 10 มิลลิเมตร
2. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ -80 องศาเซลเซียส (Binder, Germany)
3. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียส (Severin, Belgium)
4. ตู้แช่เย็นอุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส (Sanden Intercool, Japan)

5. เครื่องตัดฟันความเร็วต่ำ (low speed cutting machine; IsoMet™ 1000, Buehler, IL, USA)
6. เครื่องขัดผิววัสดุ (Polishing machine; NANO 2000, Pace Technologies, USA)
7. เครื่องชั่งละเอียดแบบดิจิทัล (Fine digital balance; 40SM-200A, Precisa, Germany)
8. เครื่องกวนผสมแบบแม่เหล็ก (Magnetic stirrer; MR 303 SD, HEIDOLPH, Germany)
9. เครื่องบดชิ้นตัวอย่าง (Miller; Freezer/Mill 6770, SPEX SamplePrep, Metuchen, NJ, USA)
10. ตู้บ่มอุณหภูมิ (Incubator; Contherm Scientific Ltd, New Zealand)
11. ด้ามกรอเร็ว (Airotor handpieces; Mach-Lite XT, NSK, Japan.
12. กล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอ (Stereomicroscope; ML 9300, Meiji, Japan)
13. เครื่องวัดความเข้มแสง (Radiometer; Demetron L.E.D. Radiometers, Kerr, USA)
14. ยูนิตทันตกรรมเคลื่อนที่ (Mobile dental Unit; Supermobile 85, Thai Dental Products, Thailand)
15. เครื่องเซนติฟิวจ์แบบควบคุมอุณหภูมิได้ (Refrigerated centrifuge; Allegra X-30R, Beckman coulter, CA, USA)
16. สเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์ (Spectrofluorometer; Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Reade, BioTek, USA)
17. กล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอลชนิดใช้แสงเลเซอร์ (Confocal laser microscope; Fluoview FV10I, Olympus, Tokyo, Japan)

วิธีการดำเนินวิจัย

ฟันที่ใช้ในการวิจัย

ทำความสะอาดฟันกรามใหญ่ซี่ที่สามของมนุษย์บนหรือล่างที่ถูกถอนแล้ว ที่ไม่มีรอยผุและพยาธิสภาพใด ๆ ด้วยเครื่องขูดมือ (hand scaler) กำจัดเนื้อเยื่ออ่อน และใช้เอ็นโดดอนติกไฟล์ (endodontic file) กำจัดเนื้อเยื่อในฟัน (pulp tissue) ออกจากปลายรากฟัน จากนั้นจัดเก็บฟันที่ถอนแล้วไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ฟันที่นำมาใช้ถูกถอนก่อนทำการศึกษาไม่เกิน 6 เดือน โดยมีเกณฑ์ในการคัดออก คือ ฟันที่มีรอยผุ รอยสึก รอยร้าว หรือมีวัสดุบูรณะ ซึ่งตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอ (SZ 61, Olympus, Japan) กำลังขยาย 10 เท่า

การเตรียมสารสกัดจากเมล็ดองุ่น

เตรียมสารสกัดจากเมล็ดองุ่น โดยใช้สารสกัดจากเมล็ดองุ่นยี่ห้อ MegaNatural BP Grape Seed Extract (Healthy Origins, California, USA) ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก ละลายในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 5 ผสมให้ละลายด้วยเครื่องกวนผสมแบบแม่เหล็ก (MR 303 SD, HEIDOLPH, Germany) นาน 5 นาที

การวัดปริมาณ active MMP-2

การเตรียมผงเนื้อฟัน โดยใช้ฟันกรามใหญ่ซี่ที่สามของมนุษย์ (coronal dentin of human third molar) ที่ถูกถอนแล้ว ไม่มีรอยผุและพยาธิสภาพใด ๆ จำนวน 68 ซี่ กำจัดส่วนเคลือบฟันด้วยหัวกรอกากเพชรทรงกระบอกและด้ามกรอเร็ว ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอ (SZ 61, Olympus, Japan) กำลังขยาย 10 เท่า จากนั้นตัดเนื้อฟันส่วนตัวฟัน (mid-coronal dentin) ขนาดไม่เกิน 3x3x3 มิลลิเมตร แล้วบดให้เป็นผงด้วยเครื่องบดขึ้นตัวอย่าง (Freezer/Mill 6770, SPEX SamplePrep, Metuchen, NJ, USA) การบดอาศัยหลักการทำให้ชิ้นตัวอย่างแข็งด้วยความเย็นแล้วใช้แรงอัดกระแทกโดยแรงแม่เหล็ก ทำให้วัสดุแตกละเอียดด้วยความเร็ว 10 รอบต่อนาที นาน 2 นาที

สลักระยะพัก 2 นาที เป็นเวลา 3 ครั้ง โดยมีระบบหล่อเย็นด้วยไนโตรเจนเหลวตลอดการบดชิ้นงาน นำผงเนื้อฟันที่ได้แช่เย็นไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำออกมาใช้ทดลอง โดยใช้ผงเนื้อฟันปริมาณ 250 mg ต่อ 1 ตัวอย่าง กลุ่มการทดลอง 5 ตัวอย่าง^{83, 84, 86} ดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1 mineralized dentin; MIN

กลุ่มที่ 2 demineralized dentin powder; DDP

กลุ่มที่ 3 สารยึดติด Single Bond Universal (3M ESPE, St Paul, MN, USA); SBU

กลุ่มที่ 4 ปรับเปลี่ยนชีวภาพเนื้อฟันด้วยสารสกัดจากเมล็ดองุ่น

ร่วมกับสารยึดติด Single Bond Universal (3M ESPE, St Paul, MN, USA); GSE+SBU

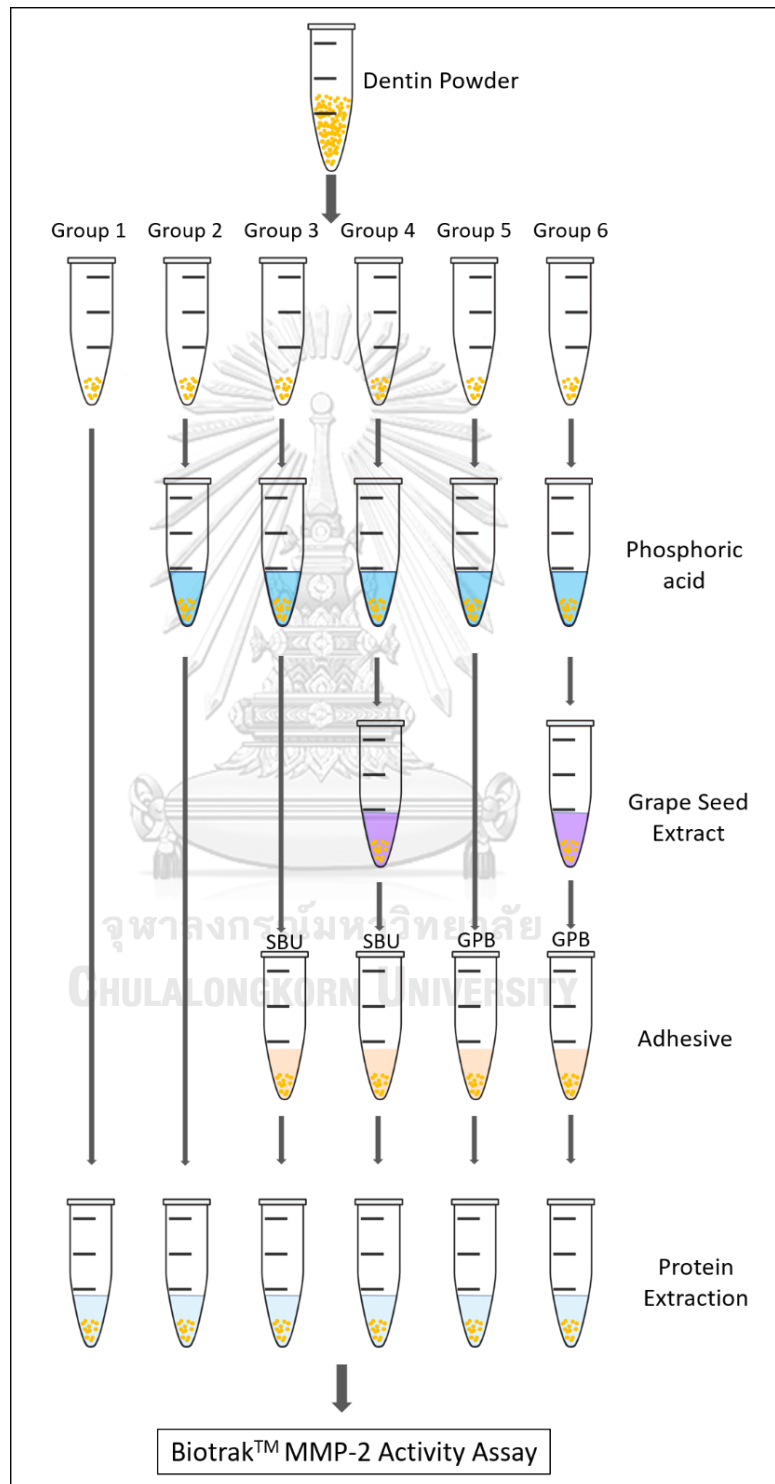
กลุ่มที่ 5 สารยึดติด G-Premio Bond (GC, Tokyo, Japan); GPB

กลุ่มที่ 6 ปรับเปลี่ยนชีวภาพเนื้อฟันด้วยสารสกัดจากเมล็ดองุ่น

ร่วมกับสารยึดติด G-Premio Bond (GC, Tokyo, Japan); GSE+GPB

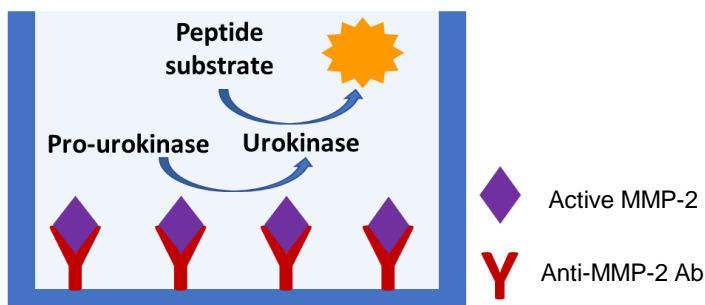
กลุ่มที่ 1 ใช้ผงเนื้อฟันโดยไม่มีการปรับสภาพใด ๆ **กลุ่มที่ 2** ใช้กรดฟอสฟอริกความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก ปริมาณ 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันนาน 10 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น ปริมาณ 1,500 ไมโครลิตร แล้วปั่น (centrifuge) ด้วยความเร็ว 18,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ตู้น้ำเหนือตะกอนทิ้ง ทำซ้ำ 3 ครั้ง **กลุ่มที่ 3 และ 5** เตรียมตัวอย่างเหมือนกลุ่มที่ 2 จากนั้นเติมสารยึดติดเนื้อฟันตามกลุ่มการทดลอง ปริมาณ 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันนาน 1 นาที จากนั้นกำจัดสารยึดติดส่วนเกินออก โดยเติมอะซิโตนปริมาณ 500 ไมโครลิตร แล้วปั่นด้วยความเร็ว 18,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง **กลุ่มที่ 4 และ 6** เตรียมตัวอย่างเหมือนกลุ่มที่ 2 จากนั้นเติมสารสกัดจากเมล็ดองุ่น ปริมาณ 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันนาน 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปริมาณ 1,500 ไมโครลิตร แล้วปั่นด้วยความเร็ว 18,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ตู้น้ำเหนือตะกอนทิ้ง

ทำซ้ำ 3 ครั้ง แล้วเติมสารยึดติดเนื้อฟันและกำจัดสารยึดติดเนื้อฟันส่วนเกินออกตามกลุ่มการทดลอง เช่นเดียวกับการเตรียมตัวอย่างในกลุ่มที่ 3 และ 4 (แสดงในรูปที่ 10)



รูปที่ 9 แสดงแผนผังการทดสอบปริมาณ active MMP-2

จากนั้นทำการดึงโปรตีน (Protein extraction) ด้วย Tris-HCl ความเข้มข้น 50 mM⁸⁶ ปริมาณ 500 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 96 ชั่วโมง แล้วปั่นด้วยความเร็ว 18,000 รอบ นาน 10 นาที แล้วนำของเหลวส่วนเหนือตะกอน ไปวัดปริมาณ active MMP-2 ด้วย ชุดทดสอบ Biotrak™ MMP-2 Activity Assay (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) โดยใช้ ของเหลวเหนือตะกอนปริมาณ 400 ไมโครลิตร หยดลงในหลุมทดสอบ (microplate) ตัวอย่างละ 2 หลุม หลุมละ 200 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ ก่อนบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืดและมีความชื้นสัมพัทธ์สมบูรณ์เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย wash buffer (0.01 M sodium phosphate buffer pH = 7.0) 4 ครั้ง ซับให้แห้ง เติมสารละลาย detection reagent ซึ่ง ประกอบด้วยเอนไซม์ urokinase และ peptide substrate (S-2444 peptide substrate) ใน อัตราส่วน 1 ต่อ 5 ปริมาณ 50 ไมโครลิตร และ เติม assay buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.6) ปริมาณ 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในที่มืดและมีความชื้นสัมพัทธ์สมบูรณ์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสง (optical absorbancy) ด้วยเครื่อง spectrophotometer (Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Reader, BioTek, USA) ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ใน กลุ่มทดลองที่มี active MMP-2 จะเกิดปฏิกิริยาและเกิดการเปลี่ยนแปลงสี (แสดงในรูปที่ 11) ทำ การสร้างกราฟ standard curve และคำนวณปริมาณ active enzyme เป็นข้อมูลเชิงปริมาณ



รูปที่ 10 แสดงหลักการทำงานของชุดทดสอบ MMP-2 Activity Assay

active MMP-2 ที่ถูกสกัดจากกลุ่มตัวอย่างจับกับ anti-MMP-2 ในหลุมทดสอบ เมื่อเติมสาร detective reagent active MMP-2 จะเปลี่ยน pro-urokinase ให้เป็น urokinase ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ peptide substrate ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสี สามารถตรวจวัดด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 405 nm

การทดสอบด้วย *in situ* zymography

การยึดติดเนื้อฟัน

ใช้ฟันกรามใหญ่ซี่ที่สามของมนุษย์ที่ถูกถอนแล้ว ไม่มีรอยผุและพยาธิสภาพใด ๆ จำนวน 18 ซี่ เตรียม dentin disc โดยตัดฟันบริเวณกึ่งกลางของตัวฟัน (mid-coronal) ให้ตั้งฉากกับแนวแกนฟัน ด้วยเครื่องตัดความเร็วต่ำหล่อเย็น (low speed cutting machine, Isomet 1000, Buehler, USA) กำจัดเคลือบฟันออกและตัดให้ได้ dentin disc ขนาด 6x7 มิลลิเมตร ทำการสร้างชั้นเสมียร์ให้ได้มาตรฐาน (standardized smear layer) ด้วยกระดาษทรายซิลิกอนคาร์ไบด์ (600-grit wet silicon-carbide paper) ด้วยเครื่องขัดผิววัสดุ (polishing machine, NANO 2000, Pace Technologies, USA) เป็นเวลา 1 นาที ทำการสั่มชิ้นตัวอย่างด้วยวิธีสั่มตัวอย่างแบบง่าย ออกเป็น 6 กลุ่มการทดลอง (แสดงในรูปที่ 12) กลุ่มการทดลองละ 3 ซี่ ดังนี้

กลุ่มที่ 1 mineralized dentin; MIN

กลุ่มที่ 2 demineralized dentin powder; DDP

กลุ่มที่ 3 ยึดติดเนื้อฟันด้วยสารยึดติด Single Bond Universal (3M ESPE, St Paul, MN, USA); SBU

กลุ่มที่ 4 ปรับเปลี่ยนชีวภาพเนื้อฟันด้วยสารสกัดจากเมล็ดองุ่น ก่อนยึดติดเนื้อฟันด้วยสาร

ยึดติด SingleBond Universal (3M ESPE, St Paul, MN, USA); GSE+SBU

กลุ่มที่ 5 ยึดติดเนื้อฟันด้วยสารยึดติด G-Premio Bond (GC, Tokyo, Japan); GPB

กลุ่มที่ 6 ปรับเปลี่ยนชีวภาพเนื้อฟันด้วยสารสกัดจากเมล็ดองุ่น ก่อนยึดติดเนื้อฟันด้วยสาร

ยึดติด G-Premio Bond (GC, Tokyo, Japan); GSE+GPB

กลุ่มที่ 1 ไม่มีการปรับสภาพใด ๆ **กลุ่มที่ 2** ทากรดฟอสฟอริกความเข้มข้นร้อยละ 32

(Scotchbond Universal Etchant, 3M ESPE, St Paul, MN, USA) 15 วินาที ล้างน้ำเป็นเวลา 30

วินาที เป่าด้วยลมสะอาดเบา ๆ นาน 10 วินาที ห่างจากโพรงฟัน 2 เซนติเมตร นาน 3 วินาที ระวัง

ไม่ให้เนื้อฟันแห้ง **กลุ่มที่ 3** และ **5** ทำเช่นเดียวกับกลุ่มที่ 2 จากนั้นทาสารยึดติดตามกลุ่มการทดลอง

ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต ดังแสดงในตารางที่ 3 ฉายแสงด้วยเครื่องฉายแสงแอลอีดี (Elipar

S10, 3M ESPE, St Paul, MN, USA) เป็นเวลา 20 วินาที โดยปลายเครื่องฉายแสงห่างฟัน 1

มิลลิเมตร **กลุ่มที่ 4** และ **6** ทำเช่นเดียวกับกลุ่มที่ 2 จากนั้นปรับสภาพเนื้อฟันด้วยสารสกัดจากเมล็ด

องุ่นปริมาณ 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้นาน 1 นาที ล้างน้ำด้วย air-water spray 10 วินาที แล้วเป่าแห้ง

ด้วยลมจาก triple syringe แรงสุด ที่ระยะห่าง 2 เซนติเมตร นาน 30 วินาที จากนั้นทาสารยึด

ติดตามกลุ่มการทดลอง ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต (แสดงในตารางที่ 3) หลังจากทาสารยึดติด

ทำการฉายแสงด้วยเครื่องฉายแสงแอลอีดี (Elipar S10, 3M ESPE, St Paul, MN, USA) เป็นเวลา

20 วินาที โดยปลายเครื่องฉายแสงห่างฟัน 1 มิลลิเมตร จากนั้นยึดติด เรซิน คอมโพสิต (Filtek Z350

XT, 3M ESPE, St Paul, MN, USA) ให้มีความหนา 2 มิลลิเมตร ทำการฉายแสงด้วยเครื่องฉายแสง

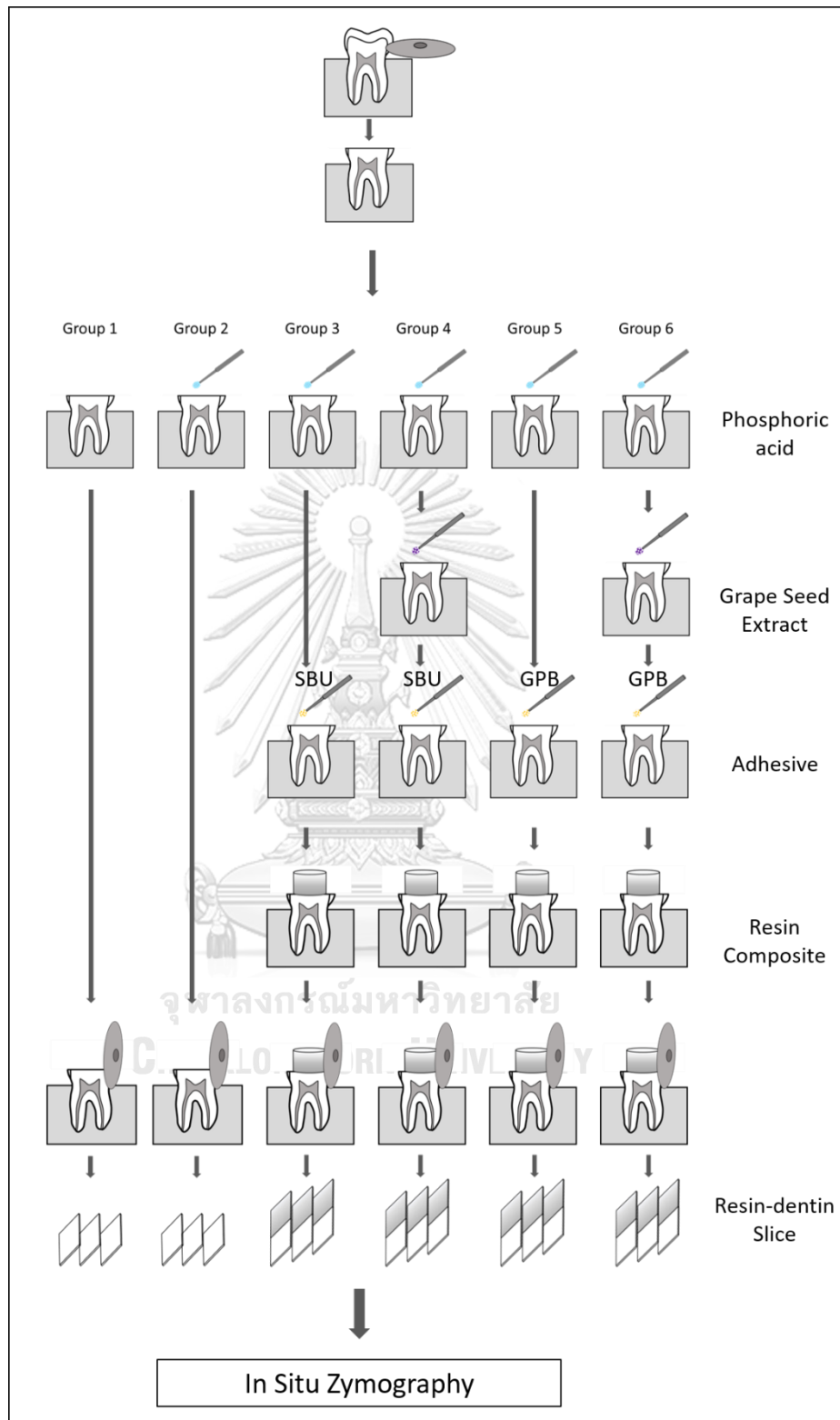
แอลอีดี (Elipar S10, 3M ESPE, St Paul, MN, USA) เป็นเวลา 40 วินาที โดยเครื่องฉายแสงจะถูก

ควบคุมความเข้มแสงด้วยเครื่องวัดความเข้มแสง (Demetron LED Radiometer, Kerr, USA)

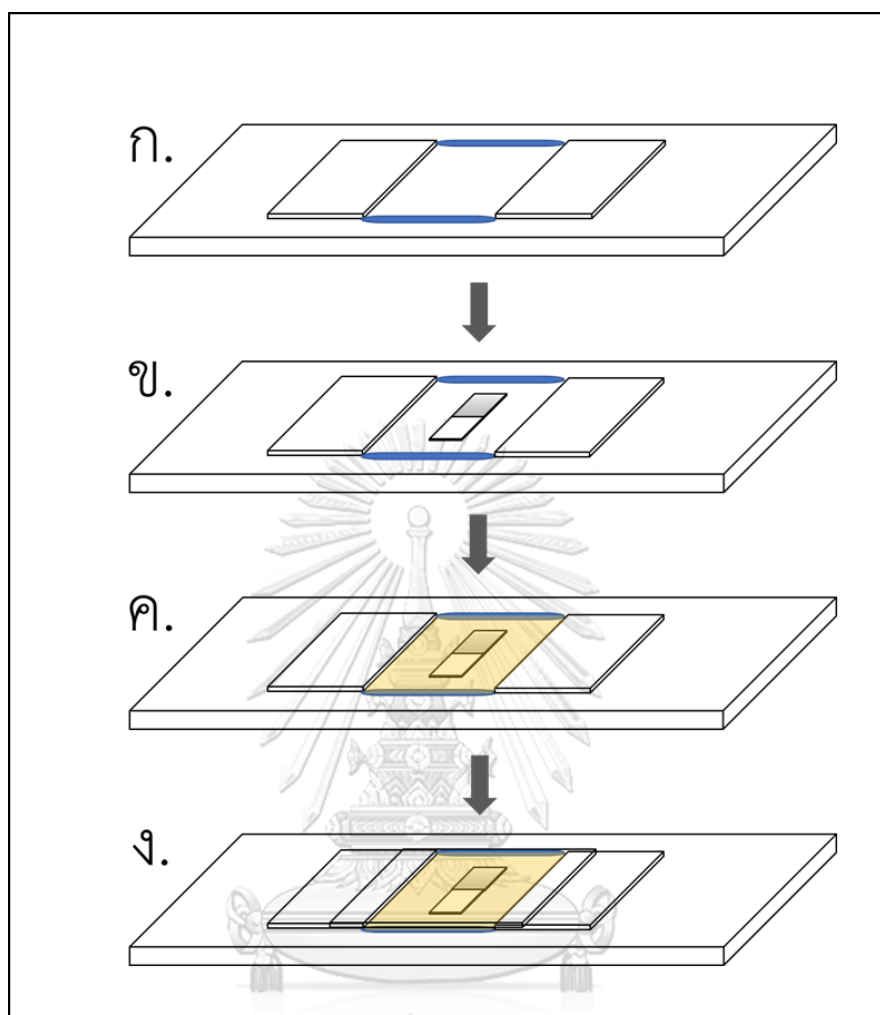
ทำการตัดชิ้นตัวอย่างขนานแนวแกนฟันให้เป็นแผ่น (slab) ด้วยเครื่องตัดความเร็วต่ำหล่อ่น้ำ (Low Speed Cutting Machine รุ่น Isomet 1000, Buehler, USA) ให้มีความหนา 0.3 มิลลิเมตร วัดความหนาด้วยเครื่องวัดขนาดแบบดิจิทัล (Digital Caliper, Micrometer, Mitutoyo, Japa) ที่มีความละเอียด 0.001 มิลลิเมตร ให้ได้ชิ้นตัวอย่าง 4 ชิ้นต่อฟันหนึ่งซี่ ยึดชิ้นตัวอย่างที่ตัดแล้วด้วยกาวไซยาโนอะคริเลต (Loctite super glue, Henkel, USA) บนแผ่นสไลด์ (แสดงในรูปที่ 13) ย้อมชิ้นตัวอย่างด้วยสารละลาย fluorescein-gelatin mixer ที่มีส่วนผสมของสารตั้งต้นเจลาติน quenched fluorescein-gelatin ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อ anti-fade (Mounting medium with Dapi H-1200 (Vestashield, Vector Laboratories LTD, Cambridgeshire, UK) ต่อสารละลาย Reaction buffer เท่ากับ 1 : 1 : 8 ปริมาตรชิ้นตัวอย่างละ 50 ไมโครลิตร จากนั้นปิดทับด้วยแผ่นปิดสไลด์ (cover slip) (แสดงในรูปที่ 12 และ 13) นำไปบ่ม (incubate) ในตู้มืดที่มีความชื้นสัมพัทธ์สมบูรณ์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง นำชิ้นงานไปส่องกล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอล (Fluoview FV10I, Olympus, Tokyo, Japan) ที่ความยาวคลื่น excitation 488 และ emission 530 นาโนเมตร เพื่อศึกษาตำแหน่งที่มี active gelatinases บริเวณชั้นไฮบริด บริเวณที่มี active gelatinase จะปรากฏเป็นสีเขียวของฟลูออเรสเซนซ์ (แสดงในรูปที่ 14) โดยทำการวิเคราะห์ชิ้นตัวอย่างละ 3 ตำแหน่ง บริเวณกึ่งกลางระหว่างรอยต่อของเนื้อฟันและเคลือบฟัน (dentinoenamel junction) โดยกำหนดให้บันทึกภาพเป็นชั้น ๆ ของแต่ละตำแหน่งที่ทำการวิเคราะห์ทั้งหมด 20 ชั้น (20 optical sections) ความหนาชั้นละ 350 นาโนเมตร (350 nm thick) บันทึกและวิเคราะห์ภาพด้วยซอฟต์แวร์ FV10-ASW 4.2 (Olympus, Tokyo, Japan) ทั้งนี้ได้ทำกลุ่มควบคุมโดยใช้สารยับยั้งการทำงานของ MMPs (1,10 phenanthroline) เป็น negative control และวิเคราะห์ข้อมูลเชิงปริมาณเพื่อเปรียบเทียบความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence intensity) ด้วยโปรแกรม ImageJ (National Institutes of Health)

ตารางที่ 3 แสดงข้อมูลของวัสดุที่ใช้ในงานวิจัย

Material	Composition	Adhesive used according to the manufacturer's instruction (etch-and-rinse mode)
Single Bond Universal, pH = 2.7 (3M ESPE, St Paul, MN, USA) LOT 663412	Bis-GMA, HEMA, dimethacrylate resin, Vitrebond copolymer, filler, ethanol, water, initiator, silane	1. Apply the etchant for 15 s. 2. Rinse with water for 15 s. 3. Apply the adhesive and rub for 20 s. 4. Dry with gentle air stream for 5 s, until it no longer moves. 5. Light cure for 10 s.
G-Premio Bond, pH = 1.5 (GC, Tokyo, Japan) LOT 1708023	MDP, 4MET, MDPT, BHT, methacrylate monomer, acetone, water, initiator, silica	1. Apply the etchant for 15 s. 2. Rinse with water for 5 s. 3. Apply adhesive and leave undisturbed for 10 s. 4. Dry with maximum air pressure for 5 s. 5. Light cure for 10 s.
Filtek Z350 XT (3M ESPE, St Paul, MN, USA) LOT N889377	Bis-EMA, TEG-DMA, UDMA, zirconium, silica	
Scotchbond Universal Etchant (3M ESPE, St Paul, MN, USA) LOT N767038	32% H ₃ PO ₄ , water, synthetic amorphous silica, polyethylene glycol, alumina	
MegaNatural-BP Grape Seed Extract (Healthy Origins, Pittsburgh, PA, USA) LOT 1715601	Vitis vinifera seed- minimum 90% polyphenol	
Abbreviations: Bis-GMA: bisphenyl A glycidyl methacrylate; H ₃ PO ₄ : phosphoric acid; HEMA: 2-hydroxyethyl methacrylate; MDP: 10-methacryloyloxydecyl di-hydrogen phosphate; 4-MET: 4-methacryloyloxyethyl trimellitate; MDTP: 10-methacryloyloxydecyl dihydrogen thiophosphate; MDPT: methacryloyloxydecyl dihydrogen thiophosphate; BHT: butylated hydroxytoluene; Bis-EMA: ethoxylated bisphenol A glycol dimethacrylate; TEG-DMA: triethylene glycol dimethacrylate; UDMA: urethane dimethacrylate		

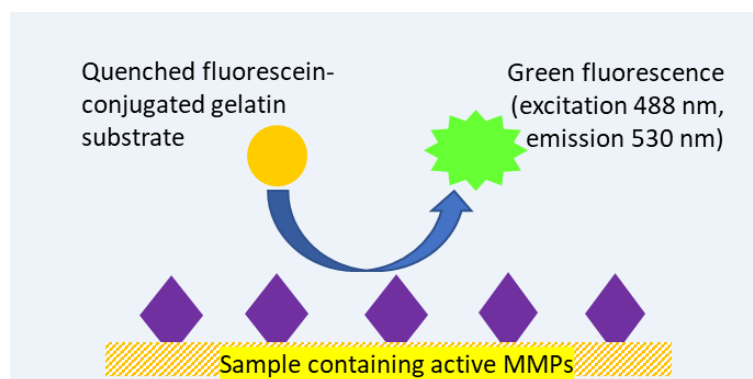


รูปที่ 11 แสดงแผนผังการทดสอบด้วย in situ zymography



รูปที่ 12 แสดงการเตรียมสไลด์สำหรับทดสอบ in situ zymography

- ก. วางกระจกปิดสไลด์หนา 2 ชั้น บริเวณกลางแผ่นสไลด์ ห่างกันประมาณ 1 เซนติเมตร ทาทับบริเวณขอบด้วยน้ำยาเคลือบเล็บ วางซีฟี่งักันขอบบาง ๆ เพื่อให้มีพื้นที่สำหรับยึดติดชิ้นตัวอย่าง
- ข. ติดชิ้นตัวอย่างด้วยกาวไซยาโนอะคริเลต บริเวณกึ่งกลางสไลด์
- ค. ย้อมชิ้นตัวอย่างด้วย fluorescein-gelatin mixer
- ง. ปิดทับด้วยแผ่นปิดสไลด์ และเคลือบด้วยน้ำยาเคลือบเล็บ



รูปที่ 13 แสดงหลักการทำงานของ การทดสอบด้วย in situ zymography บริเวณที่มีการทำงานของเอนไซม์ gelatinase จะเกิดการย่อย quenched fluorescein conjugated gelatin substrate ปรากฏเป็นสีเขียวของ fluorescein

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

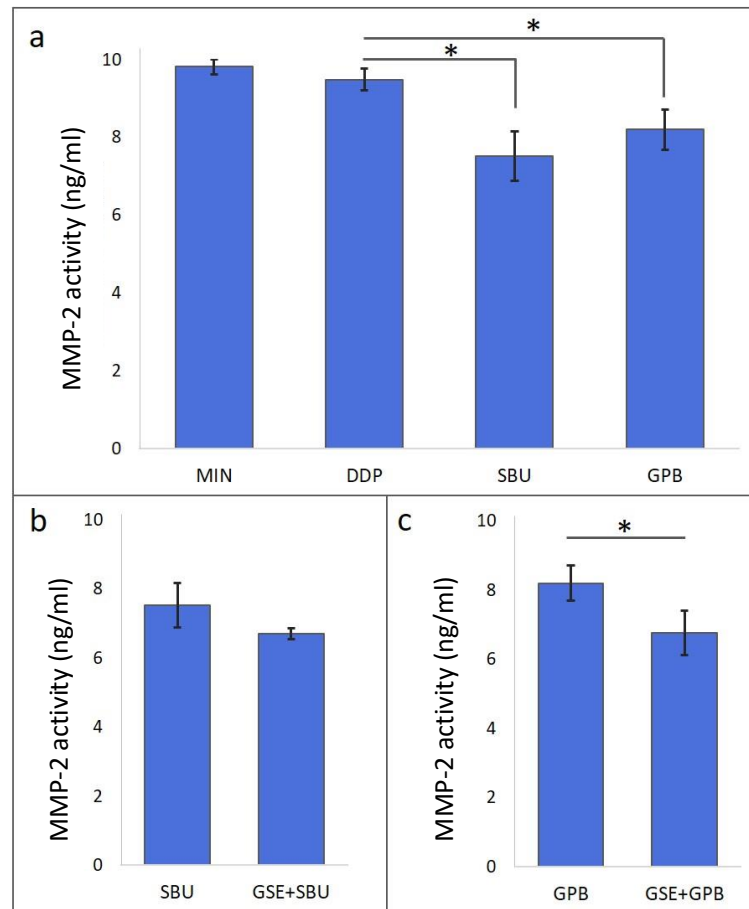
การวิเคราะห์ความแตกต่างของปริมาณ active MMP-2 และความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป (SPSS for windows version 17.0) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เนื่องจากทดสอบด้วยสถิติทดสอบ Kolmogorov-Smirnov test และ levene's test พบว่าข้อมูลมีการกระจายตัวแบบปกติ (normal distribution) และมีความแปรปรวนเท่ากัน (equal variances) จึงทดสอบสมมติฐานการทดลองด้วย one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม การทดลองด้วย Bonferroni test

บทที่ 4

ผลการวิจัย

ผลการวัดปริมาณ active MMP-2

จากการวัดปริมาณ active MMP-2 พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณ active MMP-2 (ng/ml) หลังการดิ่งแร่ธาตุออกด้วยกรดฟอสฟอริก (DDP: กลุ่มที่ 2) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ผ่านการดิ่งแร่ธาตุด้วยกรดฟอสฟอริก (MIN: กลุ่มที่ 1) ในขณะที่ปริมาณ active MMP-2 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อใช้สารยึดติด Single Bond Universal (3M ESPE, St Paul, MN, USA) และ G-Premio Bond (GC, Tokyo, Japan) (แสดงในรูปที่ 15a) และการปรับเปลี่ยนชีวภาพเนื้อฟันด้วยสารสกัดจากเมล็ดองุ่นส่งผลให้ลดปริมาณ active MMP-2 อย่างมีนัยสำคัญเมื่อใช้ร่วมกับสารยึดติด G-Premio Bond (GC, Tokyo, Japan) (แสดงในรูปที่ 15c) แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อใช้ร่วมกับสารยึดติด Single Bond Universal (3M ESPE, St Paul, MN, USA) (แสดงในรูปที่ 15b)



รูปที่ 14 กราฟแท่งแสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของปริมาณ active MMP-2 (ng/ml) จากการทดลองด้วย Biotrak™ MMP-2 Activity Assay ตัวอย่าง MIN คือ ผงเนื้อฟันที่ไม่ปรับสภาพผิวใด ๆ DDP คือ MIN ที่ถูกปรับสภาพด้วยกรดฟอสฟอริก SBU คือ DDP ที่ถูกปรับสภาพด้วย Single Bond Universal GSE+SBU คือ DDP ที่ถูกปรับเปลี่ยนชีวภาพด้วยสารสกัดจากเมล็ดตองุ่นก่อนปรับสภาพด้วย SBU GPB คือ DDP ที่ถูกปรับสภาพด้วย G-Premio Bond GSE+GPB คือ DDP ที่ถูกปรับเปลี่ยนชีวภาพด้วยสารสกัดจากเมล็ดตองุ่นก่อนปรับสภาพด้วย GPB เส้นและเครื่องหมายดอกจันท์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มการทดลอง ($p < 0.05$)

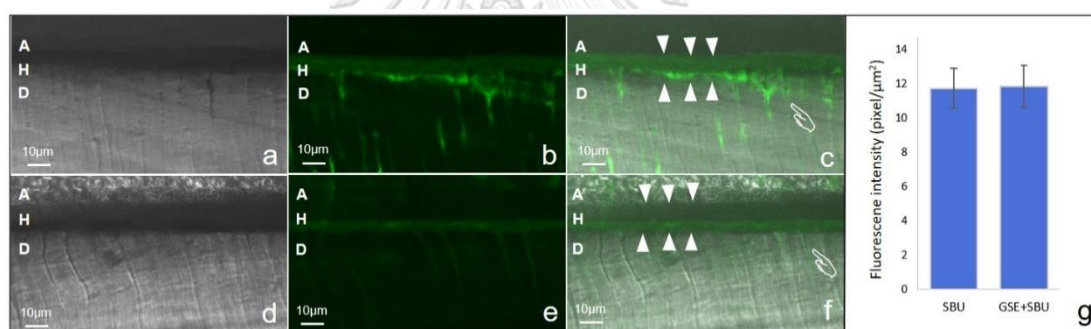
ผลการวิจัย *in situ* zymography

รูปที่ 16 และ 17 แสดงตำแหน่งที่มีการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีนบริเวณชั้นไฮบริดจากการทดสอบด้วยวิธี *in situ* zymography หลังบ่มชิ้นงานที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 96 ชั่วโมง พบว่ากลุ่มที่ยึดติดเนื้อฟันด้วยสารยึดติด Single Bond Universal (3M ESPE, St Paul, MN, USA) และกลุ่มที่ปรับเปลี่ยนชีวภาพเนื้อฟันด้วยสารสกัดจากเมล็ดตองุ่นก่อนการยึดติดเนื้อฟันด้วย Single Bond Universal (3M ESPE, St Paul, MN, USA) มีความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์ใกล้เคียงกัน โดยกลุ่มที่ยึดติดเนื้อฟันด้วยสารยึดติด Single Bond Universal (3M ESPE, St Paul, MN, USA) ปรากฏสีเขียวจาง ๆ ของฟลูออเรสเซนซ์ (faint green fluorescence) ในบริเวณชั้นไฮบริดและบางตำแหน่งของท่อเนื้อฟัน (แสดงในรูปที่ 16b และ 16c) ในขณะที่กลุ่มที่ปรับเปลี่ยนชีวภาพเนื้อฟันด้วยสารสกัดจากเมล็ดตองุ่นก่อนการยึดติดเนื้อฟันด้วย Single Bond Universal (3M ESPE, St Paul, MN, USA) ปรากฏสีเขียวจาง ๆ ของฟลูออเรสเซนซ์ที่บริเวณส่วนล่างของชั้นไฮบริดและแทบจะไม่ปรากฏในท่อเนื้อฟัน (แสดงในรูปที่ 16e และ 16f) สอดคล้องกับการวิเคราะห์เชิงปริมาณพบว่าความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่ทำและไม่ทำการปรับเปลี่ยนชีวภาพเนื้อฟันด้วยสารสกัดจากเมล็ดตองุ่นก่อนการยึดติดเนื้อฟันด้วย Single Bond Universal (3M ESPE, St Paul, MN, USA)

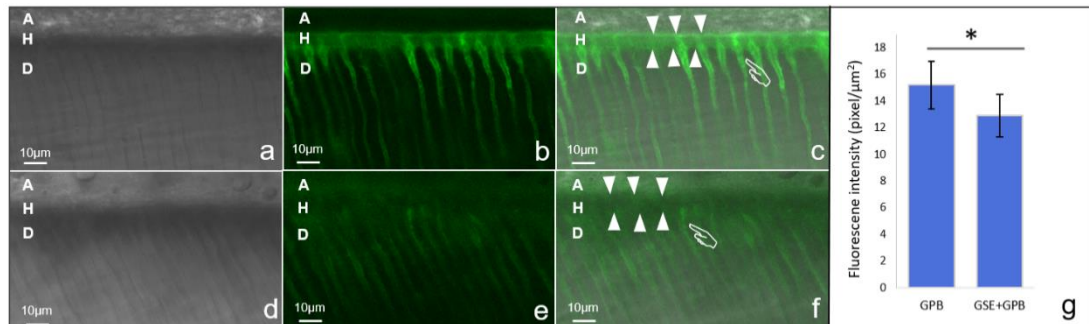
กลุ่มที่ยึดติดเนื้อฟันด้วยสารยึดติด G-Premio Bond (GC, Tokyo, Japan) หลังจากบ่มชิ้นงานที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 96 ชั่วโมง ปรากฏสีเขียวของฟลูออเรสเซนซ์ที่บริเวณชั้นไฮบริดและท่อเนื้อฟัน แต่มีความเข้มมากกว่ากลุ่มที่ยึดติดเนื้อฟันด้วยสารยึดติด Single Bond Universal (3M ESPE, St Paul, MN, USA) แสดงให้เห็นถึงการทำงานของ active gelatinases ที่มากกว่า (แสดงในรูปที่ 16c และ 17c) แต่เมื่อทำการปรับเปลี่ยนชีวภาพเนื้อฟันด้วยสารสกัดจากเมล็ดตองุ่นก่อนการยึดติด G-Premio Bond (GC, Tokyo, Japan) พบว่าปรากฏสีเขียวของ

ฟลูออเรสเซนซ์ที่มีความเข้มน้อยลงอย่างเห็นได้ชัดและการวิเคราะห์เชิงปริมาณพบว่า การปรับเปลี่ยนชีวภาพเนื้อฟันด้วยสารสกัดจากเมล็ดตองุ่นก่อนยึดติดเนื้อฟันด้วยสารยึดติด G-Premio Bond (GC, Tokyo, Japan) ทำให้ความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ทำการปรับเปลี่ยนชีวภาพเนื้อฟันด้วยสารสกัดจากเมล็ดตองุ่น (แสดงในรูปที่ 17c และ 17f)

สำหรับเนื้อฟันที่ไม่มีการปรับสภาพผิวใด ๆ และเนื้อฟันที่ถูกกัดด้วยกรดฟอสฟอริก พบมีการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีนบริเวณท่อนเนื้อฟัน (รูปแสดงในภาคผนวก) แต่ไม่พบการปรากฏสีเขียวของฟลูออเรสเซนซ์ในกลุ่มควบคุมที่ใช้สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีน (รูปแสดงในภาคผนวก)



รูปที่ 15 แสดงบริเวณรอยต่อของการยึดติดระหว่างเรซินและเนื้อฟันที่ไม่ใช้และใช้สารสกัดจากเมล็ดตองุ่นปรับเปลี่ยนชีวภาพเนื้อฟัน ก่อนทำการยึดติดเนื้อฟันด้วยสารยึดติด Single Bond Universal (a-c) ไม่ใช้ และ (d-f) ใช้ สารสกัดจากเมล็ดตองุ่น (GSE) ปรับเปลี่ยนชีวภาพเนื้อฟันก่อนทาสารยึดติด Single Bond Universal (SBU) ตัวย่อ **A** คือ Adhesive layer **H** คือ Hybrid layer (ระหว่างหัวลูกศร) **D** คือ เนื้อฟัน (a) ภาพขาวดำ แสดงตำแหน่งของการยึดติดด้วย SBU (b) ภาพช่วงสีเขียว (c) ภาพผสมสี a และ b แสดงสีเขียวจาง ๆ ของฟลูออเรสเซนซ์บริเวณชั้นไฮบริด (ระหว่างหัวลูกศร) และสีเขียวเข้มของฟลูออเรสเซนซ์บางตำแหน่งของท่อนเนื้อฟัน (นิ้วชี้) (d) ภาพขาวดำ แสดงตำแหน่งของการยึดติดด้วย SBU ที่ใช้ GSE ปรับเปลี่ยนชีวภาพเนื้อฟันก่อนทาสารยึดติด (e) ภาพช่วงสีเขียว (f) ภาพผสมสี a และ b แสดงสีเขียวจาง ๆ ของฟลูออเรสเซนซ์บริเวณส่วนล่างของชั้นไฮบริด (ระหว่างหัวลูกศร) และท่อนเนื้อฟัน (นิ้วชี้) (g) กราฟแท่งแสดงความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ในชั้นไฮบริด (pixel/μm²) ไม่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลอง



รูปที่ 16 แสดงบริเวณรอยต่อของการยึดติดระหว่างเรซินและเนื้อฟันที่ไม่ใช้และใช้สารสกัดจากเมล็ดองุ่นปรับเปลี่ยนชีวภาพเนื้อฟัน ก่อนทำการยึดติดเนื้อฟันด้วยสารยึดติด G-Premio Bond (a-c) ไม่ใช้ และ (d-f) ใช้ สารสกัดจากเมล็ดองุ่น (GSE) ปรับเปลี่ยนชีวภาพเนื้อฟันก่อนทาสารยึดติด G-Premio Bond (GPB) ตัวย่อ **A** คือ Adhesive layer **H** คือ Hybrid layer (ระหว่างหัวลูกศร) **D** คือ เนื้อฟัน (a) ภาพขาวดำ แสดงตำแหน่งของการยึดติดด้วย GPB (b) ภาพช่วงสีเขียว (c) ภาพผสมสี a และ b แสดงสีเขียวเข้มของฟลูออเรสเซนต์บริเวณชั้นไฮบริด (ระหว่างหัวลูกศร) และต่อเนื้อฟัน (นิวซี) (d) ภาพขาวดำ แสดงตำแหน่งของการยึดติดด้วย GPB ที่ใช้ GSE ปรับเปลี่ยนชีวภาพเนื้อฟันก่อนทาสารยึดติด (e) ภาพช่วงสีเขียว (f) ภาพผสมสี a และ b แทบจะไม่แสดงสีเขียวของฟลูออเรสเซนต์บริเวณชั้นไฮบริด (ระหว่างหัวลูกศร) และแสดงสีเขียวจาง ๆ ของฟลูออเรสเซนต์ในต่อเนื้อฟัน (นิวซี) (g) กราฟแท่งแสดงความเข้มฟลูออเรสเซนต์ในชั้นไฮบริด (pixel/ μm^2) เส้นและเครื่องหมายดอกจัน (*) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มการทดลอง ($p < 0.05$)

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

อภิปรายผลการวิจัย

งานวิจัยนี้พบว่า การดึงแร่ธาตุออกจากผนังเนื้อฟันด้วยกรดฟอสฟอริก ไม่มีผลในการเพิ่มปริมาณ active MMP-2 เมื่อเทียบกับผนังเนื้อฟันที่ไม่ผ่านการปรับสภาพใด ๆ ในขณะที่สารยึดติดยูนิเวอร์แซลทั้งสองชนิด คือ Single Bond Universal (3M ESPE, St Paul, MN, USA) และ G-Premio Bond (GC, Tokyo, Japan) มีผลในการลดปริมาณ active MMP-2 และเป็นที่น่าสนใจว่า ปริมาณ active MMP-2 ลดลงเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อทำการปรับเปลี่ยนชีวภาพเนื้อฟันด้วยสารสกัดจากเมล็ดตองุ่นก่อนใช้สารยึดติด G-Premio Bond (GC, Tokyo, Japan) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการทดสอบ *in situ* zymography ที่แสดงให้เห็นว่าการปรับเปลี่ยนชีวภาพเนื้อฟันด้วยสารสกัดจากเมล็ดตองุ่นทำให้มีการลดปริมาณ active gelatinases บริเวณชั้นไฮบริด

สารยึดติดยูนิเวอร์แซล เป็นสารยึดติดชนิดขวดเดียวที่ถูกผลิตเพื่อให้สะดวกต่อการใช้งาน สามารถยึดติดได้กับทุกพื้นผิวและใช้งานได้หลายรูปแบบ ทั้งแบบเอทซ์แอนดรีนส์โหมด เซลฟ์เอทซ์โหมด และซีเลคทีฟเอทซ์โหมด โดยไม่ส่งผลต่อค่ากำลังการยึดติด^{25, 45, 65} แต่อย่างไรก็ตาม รอยต่อของการยึดติดระหว่างเรซินและเนื้อฟันยังเป็นจุดอ่อนของการยึดติด ไม่ว่าจะใช้สารยึดติดระบบเอทซ์แอนดรีนส์หรือเซลฟ์เอทซ์ เมื่อเวลาผ่านไปพบการเสื่อมสลายบริเวณรอยต่อระหว่างเรซินและเนื้อฟัน^{85, 102, 111} นักวิจัยจึงคิดค้นวิธีการต่าง ๆ เพื่อต้านการเสื่อมสลายบริเวณรอยต่อของเรซินและเนื้อฟัน โดยวิธีการหนึ่งที่น่าสนใจคือการเพิ่มความแข็งแรงให้แก่เส้นใยคอลลาเจนและลดการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีนบริเวณชั้นไฮบริด¹⁷

เอนไซม์ MMPs และ cysteine cathepsin เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายองค์ประกอบต่าง ๆ ของเมทริกซ์นอกเซลล์ รวมถึงเส้นใยคอลลาเจน ชนิดที่ 1 ในเมทริกซ์นอกเซลล์

ของเนื้อฟัน¹⁶⁸ เอนไซม์ MMPs ถูกผลิตจาก odontoblast ขณะที่เกิดกระบวนการสร้างเนื้อฟัน (dentinogenesis) และยังคงเหลืออยู่ในเนื้อฟัน^{103, 183} ถึงแม้ว่า เอนไซม์ MMP-2 ถูกจัดอยู่ในเอนไซม์กลุ่ม gelatinase แต่มีรายงานว่าเอนไซม์ MMP-2 สามารถย่อยสลายเส้นใยคอลลาเจนชนิดที่ 1 ได้ทั้ง native และ denatured form¹¹ อีกทั้งมีรายงานว่า ในเนื้อฟันมีปริมาณ เอนไซม์ MMP-2 มากกว่าชนิดอื่น ๆ¹⁴¹ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกทำการศึกษาปริมาณ active MMP-2 เพื่อเป็นตัวแทนของเอนไซม์ย่อยโปรตีนในเนื้อฟัน และ ทดสอบ *in situ* zymography เพื่อศึกษาดำแหน่งที่มีการทำงานของเอนไซม์ active gelatinases ในชั้นไฮบริด ทั้งนี้สัดส่วนของปริมาณเอนไซม์ย่อยโปรตีนในเนื้อฟันผันแปรไปตามอายุและพยาธิสภาพต่าง ๆ¹⁸³

เอนไซม์ MMPs เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่มีโครงสร้างหลักประกอบด้วย โพรโดเมน คะตะลิสต์ โดเมน ส่วนบานพับ และ ฮีโมแพคซินโดเมน ในส่วนโพรโดเมนมีโครงสร้างสำคัญคือคิสติอินสวิตช์ ซึ่งจับกับไอออนของสังกะสีบนกะตะลิสต์โดเมน ทำให้เอนไซม์คงอยู่ในรูปไม่มีฤทธิ์ เมื่อคิสติอินสวิตช์ถูกเปิดออกโดยการกระตุ้นจากเอนไซม์ย่อยโปรตีนชนิดอื่น อนุมูลอิสระ ความร้อน สารเคมี พยาธิสภาพ หรือสภาวะกรด เอนไซม์จะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปพร้อมทำงาน^{140, 166} นอกจากนี้ สามารถถูกกระตุ้นได้โดยสารยึดติดทางทันตกรรมทั้งระบบเอนท์แอนดรีนส์และเซลฟ์เอนท์^{85, 86, 102, 155}

ถึงแม้ผลการวัดปริมาณ active MMP-2 ของงานวิจัยนี้ พบว่า การดึงแร่ธาตุออกด้วยกรดฟอสฟอริกไม่ส่งผลให้เพิ่มปริมาณ active MMP-2 ซึ่งขัดแย้งกับบางการศึกษาที่รายงานว่ากรดฟอสฟอริกสามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMPs^{86, 107} แต่ยังมีการศึกษาจำนวนหนึ่งแสดงให้เห็นว่าการดึงแร่ธาตุออกด้วยกรดฟอสฟอริกไม่มีผลหรือส่งผลให้ลดปริมาณ active MMPs^{82, 85, 102} เนื่องจากกรดฟอสฟอริกทำให้เกิดการกระตุ้นและทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์ MMPs ไปในขณะเดียวกัน^{85, 102} แต่ประเด็นสำคัญของการวัดปริมาณ active MMP-2 ในการศึกษาครั้งนี้เพื่อใช้เป็นค่าเปรียบเทียบกับผลของการใช้สารสกัดจากเมล็ดต้องุ่นต่อการลดปริมาณ active MMP-2

ซึ่งความแตกต่างของผลการศึกษานี้ อาจเป็นผลจากความแตกต่างของความเข้มข้น ค่าความเป็นกรดต่าง และระยะเวลาที่ใช้กรดฟอสฟอริกในการดึงแร่ธาตุออกจากผนังเนื้อฟัน^{34, 85, 102, 167} อีกทั้งความแตกต่างของฟัน ปริมาณผนังเนื้อฟัน ชนิดและปริมาณของ extraction buffer ระยะเวลาที่ใช้ในการดึงโปรตีน ที่แตกต่างกันไปในแต่ละการศึกษา^{79-82, 85, 86} แต่อย่างไรก็ดี การศึกษาที่ทำการดึงแร่ธาตุออกจากผนังเนื้อฟันด้วยกรดฟอสฟอริกที่มีความเข้มข้นและระยะเวลาเท่ากัน ยังให้ผลการศึกษาที่แตกต่างกันของปริมาณ active MMPs^{79-81, 107}

เป็นที่น่าสนใจมากยิ่งขึ้น เมื่อพบว่าสารยึดติดยูนิเวอร์แซลทั้ง 2 ชนิดที่ใช้ในงานวิจัยนี้ มีความแตกต่างของค่าความเป็นกรดต่างและองค์ประกอบสำคัญ (แสดงในตารางที่ 3) สามารถลดปริมาณ active MMP-2 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าที่แสดงให้เห็นว่าสารยึดติดบางชนิดมีผลลดปริมาณ active MMPs^{86, 107} ทั้งนี้ อาจเป็นผลมาจากการเกิดปฏิกิริยาของสารเคมีกับโปรตีนในเนื้อฟัน ซึ่งมีรายงานว่า MDP, 4-MET และ Vitrebond® co-polymer เกิดปฏิกิริยาเคมีกับเส้นใยคอลลาเจนและไฮดรอกซีอะพาไทต์ได้^{51, 188} นอกจากนี้ยังพบว่า HEMA และ ethanol ที่เป็นองค์ประกอบในสารยึดติด มีผลในการยับยั้งการทำงานของ MMPs^{21, 86, 149}

ผลจากการศึกษา *in situ* zymography ของงานวิจัยนี้พบว่า บริเวณชั้นไฮบริดที่เกิดจากการใช้สารยึดติด G-Premio Bond (GC, Tokyo, Japan) มีความเข้มของสีฟลูออเรสเซนต์มากกว่าบริเวณชั้นไฮบริดที่เกิดจากการใช้สารยึดติด Single Bond Universal (3M ESPE, St Paul, MN, USA) ทั้งนี้ อาจเป็นผลมาจาก HEMA ที่ช่วยส่งเสริมการแทรกซึมของเรซินมอนอเมอร์^{86, 175} จึงทำให้ Single Bond Universal (3M ESPE, St Paul, MN, USA) แทรกซึมไปห่อหุ้มเส้นใยคอลลาเจนเกิดชั้นไฮบริดที่สมบูรณ์กว่า G-Premio Bond (GC, Tokyo, Japan) ดังมีผลการศึกษายืนยันว่าการใช้สารยึดติดที่ไม่มีส่วนประกอบของ HEMA ให้ประสิทธิภาพการยึดติดดีกว่าสารยึดติดที่มีส่วนประกอบของ HEMA⁹¹ ดังนั้น หากใช้สารยึดติดที่มีประสิทธิภาพในการเกิดไฮบริดได้ดีจะไม่เห็น

ความแตกต่างของการปรับเปลี่ยนชีวภาพเนื้อฟันด้วยสารสกัดจากเมล็ดองุ่นก่อนการใช้สารยึดติด ดังเช่นการยึดติดเนื้อฟันด้วย Single Bond Universal (3M ESPE, St Paul, MN, USA) ในงานวิจัยนี้ แต่ในทางตรงข้าม หากใช้สารยึดติดที่มีประสิทธิภาพในการเกิดไฮบริดไมต์ จะเห็นประสิทธิภาพของการลดปริมาณ active gelatinases จากการปรับเปลี่ยนชีวภาพเนื้อฟันด้วยสารสกัดจากเมล็ดองุ่นได้อย่างชัดเจน ดังเช่นการยึดติดเนื้อฟันด้วยสารยึดติด G-Premio Bond (GC, Tokyo, Japan) ในงานวิจัยนี้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการวัดปริมาณ active MMP-2 ที่พบว่า สารสกัดจากเมล็ดองุ่นส่งผลในการลดปริมาณ active MMP-2 อย่างมีนัยสำคัญเมื่อใช้ร่วมกับสารยึดติด G-Premio Bond (GC, Tokyo, Japan) จากผลดังกล่าว สนับสนุนแนวคิดที่ว่า ประสิทธิภาพของการยึดติดและการกระตุ้นเอนไซม์ย่อยโปรตีนขึ้นกับชนิดของสารยึดติดที่เลือกใช้⁸⁶

สารสกัดจากเมล็ดองุ่นเป็นสารสกัดจากธรรมชาติที่มีองค์ประกอบของพอลิฟีนอลและมีความเป็นพิษต่ำ โปรแอนโทไซยานิดินเป็นพอลิฟีนอลหลักที่พบในสารสกัดจากเมล็ดองุ่น มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้านการอักเสบ และฆ่าเชื้อ^{24, 39, 48, 53, 90, 110, 118, 120, 133, 191} ถูกนำมาใช้ในการศึกษาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการยึดติดเนื้อฟัน การใช้สารสกัดจากเมล็ดองุ่นปรับสภาพผิวเนื้อฟันนาน 1 นาที สามารถเพิ่มการครอสลิงค์ของเส้นใยคอลลาเจนในเนื้อฟัน ทำให้ลดปริมาณการสกัดโปรตีนและเพิ่มความต้านทานของเส้นใยคอลลาเจนจากการย่อยสลายจากเอนไซม์ย่อยโปรตีน^{68, 141, 143} ถึงแม้ยังไม่พบกลไกการทำงานที่แน่ชัด แต่เชื่อว่าเส้นใยคอลลาเจนหรือสารโปรตีนชีวภาพที่มีโปรลีนเป็นโครงสร้างสำคัญสามารถเกิดปฏิกิริยากับสารโปรแอนโทไซยานิดินในเมล็ดองุ่นได้ดี โดยเกิดการเชื่อมพันธะเคมีระหว่างหมู่เอไมด์ คาร์บอนิล (amide carbonyl group) ของโปรลีน กับ หมู่ฟีนอลไฮโดรเจน (phenolic hydrogen residues) ของสารพอลิฟีนอล ได้ทั้งพันธะโคเวเลนต์ ไฮโดรเจน และไฮโดรโฟบิก อีกทั้งยังสามารถเกิดการเชื่อมกันระหว่างเส้นใยคอลลาเจนได้ด้วยพันธะไอออนิก^{43, 62, 101, 115} ผลการศึกษาจากงานวิจัยนี้ พบว่าสารสกัดจากเมล็ดองุ่นยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ย่อย

โปรตีนได้ สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าที่พบว่า การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีนของสารกลุ่มคอลลาเจนโครสลิงค์เกิดจากการทำให้เอนไซม์เปลี่ยนแปลงรูปร่างอย่างถาวร (irreversible conformation change)^{44, 68, 140-142}

ถึงแม้มีรายงานว่าสารสกัดจากเมล็ดองุ่นสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MMPs ได้^{20, 78, 79, 141, 163} แต่ยังไม่มีการศึกษาที่แสดงผลของการปรับเปลี่ยนชีวภาพเนื้อฟันด้วยสารสกัดจากเมล็ดองุ่นต่อการลดปริมาณ active enzyme บริเวณชั้นไฮบริดที่เกิดจากการใช้สารยึดติด Single Bond Universal (3M ESPE, St Paul, MN, USA) และ G-Premio Bond (GC, Tokyo, Japan) ซึ่งมีความแตกต่างขององค์ประกอบทางเคมีและความชอบน้ำ มีการศึกษาพบว่าประสิทธิภาพในการเกิดโครสลิงค์ และการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ด้วยสารสกัดจากเมล็ดองุ่นขึ้นกับความเข้มข้น ระยะเวลา และตัวทำละลายที่ใช้เตรียมสารสกัดจากเมล็ดองุ่น การปรับเปลี่ยนชีวภาพเนื้อฟันด้วยสารสกัดจากเมล็ดองุ่น เป็นเวลา 1 ถึง 5 นาที ให้ประสิทธิภาพในการเพิ่มโครสลิงค์ และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีนโดยไม่มีผลกระทบต่อค่ากำลังการยึดติดระหว่างเรซินและเนื้อฟัน^{48, 49, 141, 143} ซึ่งความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์น่าจะเป็นผลมาจากสารสกัดจากเมล็ดองุ่นทำให้เกิดการเปลี่ยนโครงสร้างโมเลกุลของเอนไซม์อย่างถาวรหรือทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงบริเวณโดเมนที่มีความสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์^{44, 140-142} นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเอทานอลที่ใช้เป็นตัวทำละลายในการเตรียมสารสกัดจากเมล็ดองุ่นที่ใช้ในงานวิจัยนี้ สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MMPs ได้เช่นกัน¹⁶¹

งานวิจัยนี้ได้นำเสนอการปรับเปลี่ยนชีวภาพเนื้อฟันด้วยสารสกัดจากเมล็ดองุ่นความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก เป็นเวลา 1 นาที ซึ่งน่าจะเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมในการใช้งานทางคลินิก และสามารถลดปริมาณ active MMP-2 ได้ อันน่าจะเป็นวิธีการหนึ่งในการยืดอายุของการยึดติดเนื้อฟันโดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MMPs นอกจากนี้ Zhou และคณะ ปี 2016 ได้แสดง

ประสิทธิภาพของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นในการช่วยป้องกันการยุบตัวของเส้นใยคอลลาเจนหลังการเป่าก้ำจัดน้ำ¹⁹³ หากสามารถก้ำจัดน้ำที่อยู่ระหว่างเส้นใยคอลลาเจนออกได้โดยไม่ทำให้คอลลาเจนยุบตัวจะส่งผลดีต่อการแทรกซึมของเรซินแอตฮีซีฟที่มีความไม่ชอบน้ำสูง เช่น สารยึดติดที่ไม่มี HEMA เป็นองค์ประกอบ โดยไม่เกิดปรากฏการณ์แยกชั้นของสารยึดติด¹⁴⁷ แต่อย่างไรก็ตามบริเวณชั้นไฮบริดยังคงเป็นจุดอ่อนของการยึดติด ไม่สามารถทำให้เกิดการห่อหุ้มเส้นใยคอลลาเจนได้อย่างสมบูรณ์ ดังนั้น การชะลอการเสื่อมสลายของเส้นใยคอลลาเจนที่ไม่ถูกห่อหุ้มด้วยเรซินอย่างสมบูรณ์ด้วยการเพิ่มความทนทานต่อการย่อยสลายโดยเอนไซม์ย่อยโปรตีนและการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีนจึงเป็นวิธีการสำคัญวิธีการหนึ่งที่จะช่วยเพิ่มความคงทนของการยึดติดเนื้อฟันได้ และยังคงต้องศึกษาต่อไปถึงประสิทธิภาพของการเพิ่มความคงทนของการยึดติดระหว่างเรซินและเนื้อฟัน รวมทั้งการศึกษาทางคลินิก

งานวิจัยนี้ใช้ฟันกรามแท้ซี่ที่สามของมนุษย์เป็นกลุ่มตัวอย่าง หลังถูกถอนจะถูกก้ำจัดเนื้อเยื่ออ่อนและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C โดยไม่ผ่านการแช่น้ำยาฆ่าเชื้อใด ๆ เนื่องจากไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับผลของน้ำยาฆ่าเชื้อต่อการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีนในเนื้อฟัน ฉะนั้นในการทำวิจัยต้องระมัดระวังและป้องกันการแพร่กระจายเชื้อ แต่ภายหลังพบว่า บางการศึกษาที่ทำการทดลองในลักษณะเดียวกันนี้ ทำการฆ่าเชื้อฟันที่ถอนแล้วด้วยยาฆ่าเชื้อ เช่น thymol และ sodium azide ก่อนนำมาศึกษา สำหรับกระบวนการเตรียมเนื้อฟัน มีการใช้เครื่องตัดชิ้นงานความเร็วต่ำ หัวกรอเร็ว และเครื่องขัดชิ้นงานด้วยกระดาษทราย อันส่งผลให้เกิดความร้อนที่สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้ ฉะนั้นผลการศึกษาอาจพบการทำงานของเอนไซม์มากกว่าสภาวะจริงทางคลินิก

จากการสำรวจก่อนการดำเนินงานวิจัย พบว่าสารสกัดจากเมล็ดองุ่นที่จำหน่ายในท้องตลาดมีหลากหลายผลิตภัณฑ์ สารสกัดจากเมล็ดองุ่นบางผลิตภัณฑ์ไม่ละลายน้ำ อีกทั้งมีปริมาณโพลีฟีนอลและโปรแอนโทไซยานินดินที่แตกต่างกัน การศึกษาต่อไป อาจจำเป็นต้องวัดปริมาณองค์ประกอบสำคัญ

ของผลิตภัณฑ์ที่เลือกใช้ร่วมด้วย อีกทั้งจะเป็นประโยชน์ต่อการวิเคราะห์ข้อมูลเพิ่มเติมหากมีการวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่สกัดได้

ในอนาคตยังมีความจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับกลไกการทำงานของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นในการเพิ่มความแข็งแรงแก่เส้นใยคอลลาเจน และการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีนในเนื้อฟัน ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีนในระยะยาว การศึกษาผลของการต้านการเสื่อมสลายของการยึดติระหว่างเรซินและเนื้อฟันในระยะยาว การใช้งานกับสารยึดติดระบบอื่น รวมถึงการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ทางทันตกรรม ทั้งการศึกษาในห้องทดลองและการศึกษาทางคลินิก อันจะเป็นประโยชน์ในการพัฒนาเทคนิคการรักษาและการยืดอายุของการยึดติระหว่างเรซินและเนื้อฟัน

จากข้อจำกัดจากงานวิจัย ผลการศึกษาจาก *in situ* zymography และการวัดปริมาณ active MMP-2 แสดงให้เห็นว่า การปรับเปลี่ยนชีวภาพเนื้อฟันด้วยสารสกัดจากเมล็ดองุ่นลดปริมาณ active enzyme ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อใช้สารยึดติด G-Premio bond (GC, Tokyo, Japan) แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อใช้สารยึดติด Single Bond Universal (3M ESPE, St Paul, MN, USA) ทั้งนี้ อาจเป็นผลจากความสามารถในการแทรกซึมของเรซินมอนอเมอร์ลงไปห่อหุ้มเส้นใยคอลลาเจนที่แตกต่างกัน ดังนั้น การใช้สารสกัดจากเมล็ดองุ่นอาจไม่มีความจำเป็นเมื่อใช้สารยึดติด Single Bond Universal (3M ESPE, St Paul, MN, USA) แต่จะส่งผลดีเมื่อใช้สารยึดติด G-Premio bond (GC, Tokyo, Japan) เป็นที่น่าสังเกตว่าการใช้ปรับเปลี่ยนชีวภาพเนื้อฟันด้วยสกัดจากเมล็ดองุ่นอาจไม่จำเป็นสำหรับการใช้สารยึดติดทุกชนิด เพื่อช่วยลดการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีนบริเวณชั้นไฮบริด ฉะนั้น อาจแนะนำให้ใช้สารสกัดจากเมล็ดองุ่นปรับเปลี่ยนชีวภาพเนื้อฟันก่อนการใช้สารยึดติดยูนิเวอร์แซล เอทซ์แอนด์รีนส์โหมด โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อใช้สารยึดติดที่มีความสามารถในการแทรกซึมของเรซินมอนอเมอร์ลงไปห่อหุ้มเส้นใยคอลลาเจนได้ไม่ดี

สรุปผลการวิจัย

จากข้อจำกัดของการศึกษานี้ สามารถสรุปผลการศึกษาได้ว่าการปรับเปลี่ยนชีวภาพเนื้อฟันด้วยสารสกัดจากเมล็ดตองุ่นสามารถลดปริมาณ active gelatinases ในบริเวณชั้นไฮบริด ทั้งนี้ประสิทธิภาพดังกล่าวขึ้นกับชนิดของสารยึดติด ซึ่งประสิทธิภาพในการลดปริมาณ active gelatinases อย่างชัดเจนเมื่อใช้ร่วมกับสารยึดติดที่มีความไม่ชอบน้ำสูง

อาจกล่าวได้ว่า การใช้สารสกัดจากเมล็ดตองุ่นให้ผลดีในการลดปริมาณ active gelatinases บริเวณชั้นไฮบริดเมื่อใช้ร่วมกับสารยึดติดบางชนิด เพื่อหวังผลในการเพิ่มความคงทนของการยึดติดระหว่างเรซินและเนื้อฟัน แต่อย่างไรก็ตาม ต้องศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับกลไกในการลดปริมาณเอนไซม์เอนไซม์ ผลต่อค่ากำลังการยึดติด และประสิทธิภาพในการช่วยเพิ่มความคงทนของการยึดติดระหว่างเรซินและเนื้อฟันในระยะยาว

บรรณานุกรม

1. Al-Ammar A, Drummond JL, Bedran-Russo AK. The use of collagen cross-linking agents to enhance dentin bond strength. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials* 2009;91:419-424.
2. Almahdy A, Koller G, Sauro S, Bartsch JW, Sherriff M, Watson TF, Banerjee A. Effects of MMP inhibitors incorporated within dental adhesives. *Journal of dental research* 2012;91:605-611.
3. Araujo MS, Souza LC, Apolonio FM, Barros LO, Reis A, Loguercio AD, Saboia VP. Two-year clinical evaluation of chlorhexidine incorporation in two-step self-etch adhesive. *Journal of dentistry* 2015;43:140-148.
4. Arends J, Jongebloed W. Crystallites dimensions of enamel. *Journal de biologie buccale* 1978;6:161-171.
5. Armstrong SR, Vargas MA, Chung I, Pashley DH, Campbell JA, Laffoon JE, Qian F. Resin-dentin interfacial ultrastructure and microtensile dentin bond strength after five-year water storage. *Operative dentistry* 2004;29:705-712.
6. Arrais CA, Miyake K, Rueggeberg FA, Pashley DH, Giannini M. Micromorphology of resin/dentin interfaces using 4th and 5th generation dual-curing adhesive/cement systems: a confocal laser scanning microscope analysis. *The journal of adhesive dentistry* 2009;11:15-26.
7. Banerjee B, Bagchi D. Beneficial effects of a novel IH₆₃₆ grape seed proanthocyanidin extract in the treatment of chronic pancreatitis. *Digestion* 2001;63:203-206.
8. Baragi VM, Shaw BJ, Renkiewicz RR, Kuipers PJ, Welgus HG, Mathrubutham M, Cohen JR, Rao SK. A versatile assay for gelatinases using succinylated gelatin. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 2000;19:267-273.
9. Bedran-Russo AK, Vidal CM, Dos Santos PH, Castellan CS. Long-term effect of carbodiimide on dentin matrix and resin-dentin bonds. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials* 2010;94:250-255.
10. Bedran-Russo AKB, Castellan CS, Shinohara MS, Hassan L, Antunes A. Characterization of biomodified dentin matrices for potential preventive and reparative

therapies. *Acta biomaterialia* 2011;7:1735-1741.

11. Bertelsen DM, Neergaard JS, Bager CL, Nielsen SH, Secher NH, Svendsen JH, Bihlet AR, Andersen JR, Karsdal MA, Christiansen C, Nielsen HB. Matrix Metalloproteinase Mediated Type I Collagen Degradation is an Independent Predictor of Increased Risk of Acute Myocardial Infarction in Postmenopausal Women. *Scientific reports* 2018;8:5371.
12. Bitter K, Paris S, Mueller J, Neumann K, Kielbassa AM. Correlation of scanning electron and confocal laser scanning microscopic analyses for visualization of dentin/adhesive interfaces in the root canal. *The journal of adhesive dentistry* 2009;11:7-14.
13. Brackett MG, Tay FR, Brackett WW, Dib A, Dipp FA, Mai S, Pashley DH. In vivo chlorhexidine stabilization of hybrid layers of an acetone-based dentin adhesive. *Operative dentistry* 2009;34:379-383.
14. Brackett WW, Tay FR, Brackett MG, Dib A, Sword RJ, Pashley DH. The effect of chlorhexidine on dentin hybrid layers in vivo. *Operative dentistry* 2007;32:107-111.
15. Breschi L, Martin P, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Tjaderhane L, Visintini E, Cadenaro M, Tay FR, De Stefano Dorigo E, Pashley DH. Use of a specific MMP-inhibitor (galardin) for preservation of hybrid layer. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 2010;26:571-578.
16. Breschi L, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Visintini E, Tjaderhane L, Ruggeri A, Jr., Tay FR, Dorigo Ede S, Pashley DH. Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: a 2-year in vitro study. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 2010;26:320-325.
17. Breschi L, Mazzoni A, Ruggeri A, Cadenaro M, Di Lenarda R, De Stefano Dorigo E. Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 2008;24:90-101.
18. Buonocore MG. A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces. *Journal of dental research* 1955;34:849-853.
19. Cai K, Delaviz Y, Banh M, Guo Y, Santerre JP. Biodegradation of composite resin with ester linkages: identifying human salivary enzyme activity with a potential role in the esterolytic process. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 2014;30:848-860.
20. Calero P, Jorge-Herrero E, Turnay J, Olmo N, Lopez de Silanes I, Lizarbe MA,

- Maestro MM, Arenaz B, Castillo-Olivares JL. Gelatinases in soft tissue biomaterials. Analysis of different crosslinking agents. *Biomaterials* 2002;23:3473-3478.
21. Carvalho RV, Ogliari FA, de Souza AP, Silva AF, Petzhold CL, Line SR, Piva E, Etges A. 2-hydroxyethyl methacrylate as an inhibitor of matrix metalloproteinase-2. *European journal of oral sciences* 2009;117:64-67.
22. Castellan CS, Bedran-Russo AK, Karol S, Pereira PNR. Long-term stability of dentin matrix following treatment with various natural collagen cross-linkers. *J Mech Behav Biomed Mater* 2011;4:1343-1350.
23. Castellan CS, Pereira PN, Grande RHM, Bedran-Russo K. Mechanical characterization of proanthocyanidin-dentin matrix interaction. *Dental Materials* 2010;26:968-973.
24. Chedea VS, Braicu C. Antioxidant/Prooxidant and antibacterial/probacterial effects of a grape seed extract in complex with lipoxygenase. 2014;2014:313684.
25. Chen C, Niu LN, Xie H, Zhang ZY, Zhou LQ, Jiao K, Chen JH, Pashley DH, Tay FR. Bonding of universal adhesives to dentine--Old wine in new bottles? *Journal of dentistry* 2015;43:525-536.
26. Cheng XC, Fang H, Xu WF. Advances in assays of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry* 2008;23:154-167.
27. Cova A, Breschi L, Nato F, Ruggeri A, Jr., Carrilho M, Tjaderhane L, Prati C, Di Lenarda R, Tay FR, Pashley DH, Mazzoni A. Effect of UVA-activated riboflavin on dentin bonding. *Journal of dental research* 2011;90:1439-1445.
28. de Andrade e Silva SM, Carrilho MR, Marquezini Junior L, Garcia FC, Manso AP, Alves MC, de Carvalho RM. Effect of an additional hydrophilic versus hydrophobic coat on the quality of dentinal sealing provided by two-step etch-and-rinse adhesives. *Journal of applied oral science : revista FOB* 2009;17:184-189.
29. de Castro FL, de Andrade MF, Duarte Junior SL, Vaz LG, Ahid FJ. Effect of 2% chlorhexidine on microtensile bond strength of composite to dentin. *The journal of adhesive dentistry* 2003;5:129-138.
30. de Oliveira MT, Arrais CA, Aranha AC, de Paula Eduardo C, Miyake K, Rueggeberg FA, Giannini M. Micromorphology of resin-dentin interfaces using one-bottle etch&rinse

and self-etching adhesive systems on laser-treated dentin surfaces: a confocal laser scanning microscope analysis. *Lasers in surgery and medicine* 2010;42:662-670.

31. de Souza AP, Gerlach RF, Line SR. Inhibition of human gingival gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by metal salts. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 2000;16:103-108.
32. de Souza G, Hennig D, Aggarwal A, Tam LE. The use of MDP-based materials for bonding to zirconia. *The Journal of prosthetic dentistry* 2014;112:895-902.
33. Demeule M, Brossard M, Page M, Gingras D, Beliveau R. Matrix metalloproteinase inhibition by green tea catechins. *Biochimica et biophysica acta* 2000;1478:51-60.
34. DeVito-Moraes AG, Francci C, Vidal CM, Scaffa PM, Nesadal D, Yamasaki LC, Nicolau J, Nascimento FD, Pashley DH, Carrilho MR. Phosphoric acid concentration affects dentinal MMPs activity. *Journal of dentistry* 2016;53:30-37.
35. Dixon RA, Xie DY, Sharma SB. Proanthocyanidins--a final frontier in flavonoid research? *The New phytologist* 2005;165:9-28.
36. Donmez N, Belli S, Pashley DH, Tay FR. Ultrastructural correlates of in vivo/in vitro bond degradation in self-etch adhesives. *Journal of dental research* 2005;84:355-359.
37. Fawzy AS, Nitisusanta LI, Iqbal K, Daood U, Neo J. Riboflavin as a dentin crosslinking agent: ultraviolet A versus blue light. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 2012;28:1284-1291.
38. Felton DA, Bergenholtz G, Kanoy BE. Evaluation of the desensitizing effect of Gluma Dentin Bond on teeth prepared for complete-coverage restorations. *The International journal of prosthodontics* 1991;4:292-298.
39. Fine AM. Oligomeric proanthocyanidin complexes: history, structure, and phytopharmaceutical applications. *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic* 2000;5:144-151.
40. Fraser RD, MacRae TP, Suzuki E. Chain conformation in the collagen molecule. *Journal of molecular biology* 1979;129:463-481.
41. Goldberg M, Kulkarni AB, Young M, Boskey A. Dentin: structure, composition and mineralization. *Frontiers in bioscience (Elite edition)* 2011;3:711-735.
42. Gross J, Lapiere CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1962;48:1014-1022.

43. Hagerman AE, Butler LG. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *The Journal of biological chemistry* 1981;256:4494-4497.
44. Han B, Jaurequi J, Tang BW, Nimni ME. Proanthocyanidin: a natural crosslinking reagent for stabilizing collagen matrices. *Journal of biomedical materials research Part A* 2003;65:118-124.
45. Hanabusa M, Mine A, Kuboki T, Momoi Y, Van Ende A, Van Meerbeek B, De Munck J. Bonding effectiveness of a new 'multi-mode' adhesive to enamel and dentine. *Journal of dentistry* 2012;40:475-484.
46. Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjaderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta odontologica Scandinavica* 2007;65:1-13.
47. Hashimoto M, Ohno H, Sano H, Kaga M, Oguchi H. In vitro degradation of resin-dentin bonds analyzed by microtensile bond test, scanning and transmission electron microscopy. *Biomaterials* 2003;24:3795-3803.
48. Hass V, Luque-Martinez I, Munoz MA, Reyes MFG, Abuna G, Sinhoreti MAC, Liu AY, Loguercio AD, Wang Y, Reis A. The effect of proanthocyanidin-containing 10% phosphoric acid on bonding properties and MMP inhibition. *Dental Materials* 2016;32:468-475.
49. Hass V, Luque-Martinez IV, Gutierrez MF, Moreira CG, Gotti VB, Feitosa VP, Koller G, Otuki MF, Loguercio AD, Reis A. Collagen cross-linkers on dentin bonding: Stability of the adhesive interfaces, degree of conversion of the adhesive, cytotoxicity and in situ MMP inhibition. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 2016;32:732-741.
50. Hiraishi N, Sono R, Sofiqul I, Yiu C, Nakamura H, Otsuki M, Takatsuka T, Tagami J. In vitro evaluation of plant-derived agents to preserve dentin collagen. *Dental Materials* 2013;29:1048-1054.
51. Hiraishi N, Tochio N, Kigawa T, Otsuki M, Tagami J. Monomer-collagen interactions studied by saturation transfer difference NMR. *Journal of dental research* 2013;92:284-288.
52. Hitmi L, Bouter D, Degrange M. Influence of drying and HEMA treatment on dentin wettability. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 2002;18:503-511.

53. Ignea C, Dorobantu CM, Mintoff CP, Branza-Nichita N, Ladomery MR, Kefalas P, Chedea VS. Modulation of the antioxidant/pro-oxidant balance, cytotoxicity and antiviral actions of grape seed extracts. *Food Chemistry* 2013;141:3967-3976.
54. Iskander M, Elkassas D, Mohsen MA. Effect of two matrix metalloproteinase inhibitors on the color stability of a nanofilled resin composite. *Operative dentistry* 2015;40:E11-20.
55. Ivey KL, Lewis JR, Lim WH, Lim EM, Hodgson JM, Prince RL. Associations of proanthocyanidin intake with renal function and clinical outcomes in elderly women. *PloS one* 2013;8:e71166.
56. Khamverdi Z, Rezaei-Soufi L, Rostamzadeh T. The Effect of Epigallocatechin Gallate on the Dentin Bond Durability of Two Self-etch Adhesives. *Journal of dentistry (Shiraz, Iran)* 2015;16:68-74.
57. Kiesewetter H, Koscielny J, Kalus U, Vix JM, Peil H, Petrini O, van Toor BS, de Mey C. Efficacy of orally administered extract of red vine leaf AS 195 (folia vitis viniferae) in chronic venous insufficiency (stages I-II). A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arzneimittel-Forschung* 2000;50:109-117.
58. Kim J, Uchiyama T, Carrilho M, Agee KA, Mazzoni A, Breschi L, Carvalho RM, Tjaderhane L, Looney S, Wimmer C, Tezvergil-Mutluay A, Tay FR, Pashley DH. Chlorhexidine binding to mineralized versus demineralized dentin powder. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 2010;26:771-778.
59. Kim YK, Mai S, Mazzoni A, Liu Y, Tezvergil-Mutluay A, Takahashi K, Zhang K, Pashley DH, Tay FR. Biomimetic remineralization as a progressive dehydration mechanism of collagen matrices--implications in the aging of resin-dentin bonds. *Acta biomaterialia* 2010;6:3729-3739.
60. Kimura S, Shimizu T, Fujii B. Influence of dentin on bonding of composite resin. Part 1. Effect of fresh dentin and storing conditions. *Dental materials journal* 1985;4:68-80.
61. Kontakiotis EG, Tsatsoulis IN, Filippatos CG, Agrafioti A. A quantitative and diametral analysis of human dentinal tubules at pulp chamber ceiling and floor under scanning electron microscopy. *Australian endodontic journal : the journal of the Australian Society of Endodontology Inc* 2015;41:29-34.

62. Ku CS, Sathishkumar M, Mun SP. Binding affinity of proanthocyanidin from waste *Pinus radiata* bark onto proline-rich bovine achilles tendon collagen type I. *Chemosphere* 2007;67:1618-1627.
63. Kuhn E, Farhat P, Teitelbaum AP, Mena-Serrano A, Loguercio AD, Reis A, Pashley DH. Ethanol-wet bonding technique: Clinical versus laboratory findings. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 2015;31:1030-1037.
64. Langer A, Ilie N. Dentin infiltration ability of different classes of adhesive systems. *Clinical oral investigations* 2013;17:205-216.
65. Lawson NC, Robles A, Fu CC, Lin CP, Sawlani K, Burgess JO. Two-year clinical trial of a universal adhesive in total-etch and self-etch mode in non-carious cervical lesions. *Journal of dentistry* 2015;43:1229-1234.
66. Leme AA, Vidal CM, Hassan LS, Bedran-Russo AK. Potential role of surface wettability on the long-term stability of dentin bonds after surface biomodification. *Journal of biomechanics* 2015;48:2067-2071.
67. Li F, Majd H, Weir MD, Arola DD, Xu HH. Inhibition of matrix metalloproteinase activity in human dentin via novel antibacterial monomer. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 2015;31:284-292.
68. Liu R, Fang M, Xiao Y, Li F, Yu L, Zhao S, Shen L, Chen J. The effect of transient proanthocyanidins preconditioning on the cross-linking and mechanical properties of demineralized dentin. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2011;22:2403-2411.
69. Liu RR, Fang M, Zhang L, Tang CF, Dou Q, Chen JH. Anti-proteolytic capacity and bonding durability of proanthocyanidin-biomodified demineralized dentin matrix. *International journal of oral science* 2014;6:168-174.
70. Liu Y, Dusevich V, Wang Y. Proanthocyanidins rapidly stabilize the demineralized dentin layer. *Journal of dental research* 2013;92:746-752.
71. Liu Y, Tjaderhane L, Breschi L, Mazzoni A, Li N, Mao J, Pashley DH, Tay FR. Limitations in bonding to dentin and experimental strategies to prevent bond degradation. *Journal of dental research* 2011;90:953-968.
72. Loguercio AD, Hass V, Gutierrez MF, Luque-Martinez IV, Szezs A, Stanislawczuk R, Bandeca MC, Reis A. Five-year Effects of Chlorhexidine on the In Vitro Durability of Resin/Dentin Interfaces. *The journal of adhesive dentistry* 2016;18:35-42.

73. Loguercio AD, Luque-Martinez I, Munoz MA, Szesz AL, Cuadros-Sanchez J, Reis A. A comprehensive laboratory screening of three-step etch-and-rinse adhesives. *Operative dentistry* 2014;39:652-662.
74. Lopes MB, Sinhoreti MA, Gonini Junior A, Consani S, McCabe JF. Comparative study of tubular diameter and quantity for human and bovine dentin at different depths. *Brazilian dental journal* 2009;20:279-283.
75. Mariana de Faia Teixeira Bueno RTB, Cecilia Pedroso Turssi, Fabiana Mantovani Gomes Franca, Flavia Lucisano Botelho Amaral. effect of 2% chlorhexidine digluconate application and water storage on the bond strength to superficial and deep dentin. *Journal of adhesion science and technology* 2016;29:1258-1267.
76. Maristela Dutra-Correaa CHCS, Márcia Tonetti Ciaramicoli, Vanessa Harumi Kiyand, Celso Silva Queiroze. Effect of Chlorhexidine on the 18-month Clinical Performance of Two Adhesives. *The journal of adhesive dentistry* 2013;15:287-292.
77. Markowitz K, Rosenblum MA. The effect of cationic polymer treatment on dye staining and on the adhesion of charged particles to dentin. *Archives of oral biology* 2010;55:60-67.
78. Matchett MD, MacKinnon SL, Sweeney MI, Gottschall-Pass KT, Hurta RA. Blueberry flavonoids inhibit matrix metalloproteinase activity in DU145 human prostate cancer cells. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 2005;83:637-643.
79. Mazzoni A, Angeloni V, Apolonio FM, Scotti N, Tjaderhane L, Tezvergil-Mutluay A, Di Lenarda R, Tay FR, Pashley DH, Breschi L. Effect of carbodiimide (EDC) on the bond stability of etch-and-rinse adhesive systems. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 2013;29:1040-1047.
80. Mazzoni A, Angeloni V, Comba A, Maravic T, Cadenaro M, Tezvergil-Mutluay A, Pashley DH, Tay FR, Breschi L. Cross-linking effect on dentin bond strength and MMPs activity. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 2018;34:288-295.
81. Mazzoni A, Apolonio FM, Saboia VP, Santi S, Angeloni V, Checchi V, Curci R, Di Lenarda R, Tay FR, Pashley DH, Breschi L. Carbodiimide inactivation of MMPs and effect on dentin bonding. *Journal of dental research* 2014;93:263-268.
82. Mazzoni A, Carrilho M, Papa V, Tjaderhane L, Gobbi P, Nucci C, Di Lenarda R,

- Mazzotti G, Tay FR, Pashley DH, Breschi L. MMP-2 assay within the hybrid layer created by a two-step etch-and-rinse adhesive: biochemical and immunohistochemical analysis. *Journal of dentistry* 2011;39:470-477.
83. Mazzoni A, Mannello F, Tay FR, Tonti GA, Papa S, Mazzotti G, Di Lenarda R, Pashley DH, Breschi L. Zymographic analysis and characterization of MMP-2 and -9 forms in human sound dentin. *Journal of dental research* 2007;86:436-440.
84. Mazzoni A, Nascimento FD, Carrilho M, Tersariol I, Papa V, Tjaderhane L, Di Lenarda R, Tay FR, Pashley DH, Breschi L. MMP activity in the hybrid layer detected with in situ zymography. *Journal of dental research* 2012;91:467-472.
85. Mazzoni A, Pashley DH, Nishitani Y, Breschi L, Mannello F, Tjaderhane L, Toledano M, Pashley EL, Tay FR. Reactivation of inactivated endogenous proteolytic activities in phosphoric acid-etched dentine by etch-and-rinse adhesives. *Biomaterials* 2006;27:4470-4476.
86. Mazzoni A, Scaffa P, Carrilho M, Tjaderhane L, Di Lenarda R, Polimeni A, Tezvergil-Mutluay A, Tay FR, Pashley DH, Breschi L. Effects of etch-and-rinse and self-etch adhesives on dentin MMP-2 and MMP-9. *Journal of dental research* 2013;92:82-86.
87. Mellen PB, Daniel KR, Brosnihan KB, Hansen KJ, Herrington DM. Effect of muscadine grape seed supplementation on vascular function in subjects with or at risk for cardiovascular disease: a randomized crossover trial. *Journal of the American College of Nutrition* 2010;29:469-475.
88. Mine A, De Munck J, Van Landuyt KL, Poitevin A, Kuboki T, Yoshida Y, Suzuki K, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Bonding effectiveness and interfacial characterization of a HEMA/TEGDMA-free three-step etch&rinse adhesive. *Journal of dentistry* 2008;36:767-773.
89. Mitchem JC, Gronas DG. Effects of time after extraction and depth of dentin on resin dentin adhesives. *Journal of the American Dental Association* (1939) 1986;113:285-287.
90. Monagas M, Gomez-Cordoves C, Bartolome B, Laureano O, Ricardo da Silva JM. Monomeric, oligomeric, and polymeric flavan-3-ol composition of wines and grapes from *Vitis vinifera* L. Cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon. *J Agric Food Chem* 2003;51:6475-6481.
91. Monticelli F, Osorio R, Pisani-Proenca J, Toledano M. Resistance to degradation of resin-dentin bonds using a one-step HEMA-free adhesive. *Journal of dentistry*

2007;35:181-186.

92. Montoya C, Arango-Santander S, Pelaez-Vargas A, Arola D, Ossa EA. Effect of aging on the microstructure, hardness and chemical composition of dentin. *Archives of oral biology* 2015;60:1811-1820.
93. Moretto SG, Russo EM, Carvalho RC, De Munck J, Van Landuyt K, Peumans M, Van Meerbeek B, Cardoso MV. 3-year clinical effectiveness of one-step adhesives in non-carious cervical lesions. *Journal of dentistry* 2013;41:675-682.
94. Moszner N, Salz U, Zimmermann J. Chemical aspects of self-etching enamel-dentin adhesives: a systematic review. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 2005;21:895-910.
95. Munoz MA, Sezinando A, Luque-Martinez I, Szesz AL, Reis A, Loguercio AD, Bombarda NH, Perdigao J. Influence of a hydrophobic resin coating on the bonding efficacy of three universal adhesives. *Journal of dentistry* 2014;42:595-602.
96. Murray PE, Stanley HR, Matthews JB, Sloan AJ, Smith AJ. Age-related odontometric changes of human teeth. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 2002;93:474-482.
97. Nagi SM. Durability of solvent-free one-step self-etch adhesive under simulated intrapulpal pressure. *Journal of clinical and experimental dentistry* 2015;7:e466-470.
98. Nakabayashi N, Kojima K, Masuhara E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. *Journal of biomedical materials research* 1982;16:265-273.
99. Nakabayashi N, Takarada K. Effect of HEMA on bonding to dentin. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 1992;8:125-130.
100. Nakabayashi N, Watanabe A, Gendusa NJ. Dentin adhesion of "modified" 4-META/MMA-TBB resin: function of HEMA. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 1992;8:259-264.
101. Nimni ME. The Cross - Linking and Structure Modification of the Collagen Matrix in the Design of Cardiovascular Prosthesis. *Journal of cardiac surgery* 1988;3:523-533.
102. Nishitani Y, Yoshiyama M, Wadgaonkar B, Breschi L, Mannello F, Mazzoni A, Carvalho RM, Tjaderhane L, Tay FR, Pashley DH. Activation of

- gelatinolytic/collagenolytic activity in dentin by self-etching adhesives. *European journal of oral sciences* 2006;114:160-166.
103. Niu LN, Zhang L, Jiao K, Li F, Ding YX, Wang DY, Wang MQ, Tay FR, Chen JH. Localization of MMP-2, MMP-9, TIMP-1, and TIMP-2 in human coronal dentine. *Journal of dentistry* 2011;39:536-542.
104. Niu LN, Zhang W, Pashley DH, Breschi L, Mao J, Chen JH, Tay FR. Biomimetic remineralization of dentin. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 2014;30:77-96.
105. Obermajer N, Jevnikar Z, Doljak B, Kos J. Role of cysteine cathepsins in matrix degradation and cell signalling. *Connective tissue research* 2008;49:193-196.
106. Oliveira GC, Oliveira GM, Ritter AV, Heymann HO, Swift EJ, Yamauchi M. Influence of tooth age and etching time on the microtensile bond strengths of adhesive systems to dentin. *The journal of adhesive dentistry* 2012;14:229-234.
107. Ou Q, Hu Y, Yao S, Wang Y, Lin X. Effect of matrix metalloproteinase 8 inhibitor on resin-dentin bonds. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 2018;34:756-763.
108. Ozcan S, Seseogullari-Dirihan R, Uctasli M, Tay FR, Pashley DH, Tezvergil-Mutluay A. Effect of polyacrylic acid on dentin protease activities. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 2015;31:901-906.
109. Paddock SW. Principles and practices of laser scanning confocal microscopy. *Molecular biotechnology* 2000;16:127-149.
110. Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2009;2:270-278.
111. Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, Ito S. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *Journal of dental research* 2004;83:216-221.
112. Perdigao J, Sezinando A, Monteiro PC. Effect of substrate age and adhesive composition on dentin bonding. *Operative dentistry* 2013;38:267-274.
113. Perdigao J, Van Meerbeek B, Lopes MM, Ambrose WW. The effect of a re-wetting agent on dentin bonding. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 1999;15:282-295.

114. Pernak J, Rogoza J, Mirska I. Synthesis and antimicrobial activities of new pyridinium and benzimidazolium chlorides. *European journal of medicinal chemistry* 2001;36:313-320.
115. Pierpoint W. o-Quinones formed in plant extracts. Their reactions with amino acids and peptides. *Biochemical Journal* 1969;112:609-616.
116. Preuss HG, Wallerstedt D, Talpur N, Tutuncuoglu SO, Echard B, Myers A, Bui M, Bagchi D. Effects of niacin-bound chromium and grape seed proanthocyanidin extract on the lipid profile of hypercholesterolemic subjects: a pilot study. *Journal of medicine* 2000;31:227-246.
117. Ra HJ, Parks WC. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 2007;26:587-596.
118. Rathel TR, Samtleben R, Vollmar AM, Dirsch VM. Activation of endothelial nitric oxide synthase by red wine polyphenols: impact of grape cultivars, growing area and the vinification process. *Journal of hypertension* 2007;25:541-549.
119. Ratnikov B, Deryugina E, Leng J, Marchenko G, Dembrow D, Strongin A. Determination of matrix metalloproteinase activity using biotinylated gelatin. *Analytical biochemistry* 2000;286:149-155.
120. Ray S, Bagchi D, Lim PM, Bagchi M, Gross SM, Kothari SC, Preuss HG, Stohs SJ. Acute and long-term safety evaluation of a novel IH₆₃₆ grape seed proanthocyanidin extract. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 2001;109:165-197.
121. Reis A, Albuquerque M, Pegoraro M, Mattei G, Bauer JR, Grande RH, Klein-Junior CA, Baumhardt-Neto R, Loguercio AD. Can the durability of one-step self-etch adhesives be improved by double application or by an extra layer of hydrophobic resin? *Journal of dentistry* 2008;36:309-315.
122. Reis AF, Oliveira MT, Giannini M, De Goes MF, Rueggeberg FA. The effect of organic solvents on one-bottle adhesives' bond strength to enamel and dentin. *Operative dentistry* 2003;28:700-706.
123. Rueggeberg FA. Substrate for adhesion testing to tooth structure - review of the literature. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 1991;7:2-10.
124. Sabatini C. Effect of a chlorhexidine-containing adhesive on dentin bond

strength stability. *Operative dentistry* 2013;38:609-617.

125. Sabatini C, Ortiz PA, Pashley DH. Preservation of resin-dentin interfaces treated with benzalkonium chloride adhesive blends. *European journal of oral sciences* 2015;123:108-115.

126. Sabatini C, Patel SK. Matrix metalloproteinase inhibitory properties of benzalkonium chloride stabilizes adhesive interfaces. *European journal of oral sciences* 2013;121:610-616.

127. Sabatini C, Scheffel DL, Scheffel RH, Agee KA, Rouch K, Takahashi M, Breschi L, Mazzoni A, Tjaderhane L, Tay FR, Pashley DH. Inhibition of endogenous human dentin MMPs by Gluma. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 2014;30:752-758.

128. Sadek FT, Braga RR, Muench A, Liu Y, Pashley DH, Tay FR. Ethanol wet-bonding challenges current anti-degradation strategy. *Journal of dental research* 2010;89:1499-1504.

129. Sadek FT, Castellan CS, Braga RR, Mai S, Tjaderhane L, Pashley DH, Tay FR. One-year stability of resin-dentin bonds created with a hydrophobic ethanol-wet bonding technique. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 2010;26:380-386.

130. Sadek FT, Mazzoni A, Breschi L, Tay FR, Braga RR. Six-month evaluation of adhesives interface created by a hydrophobic adhesive to acid-etched ethanol-wet bonded dentine with simplified dehydration protocols. *Journal of dentistry* 2010;38:276-283.

131. Sartori N, Peruchi LD, Guimaraes JC, Silva SB, Monteiro S, Jr., Baratieri LN, Belli R. Clinical effectiveness of a hydrophobic coating used in conjunction with a one-step self-etch adhesive: an 18-month evaluation. *Operative dentistry* 2013;38:249-257.

132. Sartori N, Stolf SC, Silva SB, Lopes GC, Carrilho M. Influence of chlorhexidine digluconate on the clinical performance of adhesive restorations: a 3-year follow-up. *Journal of dentistry* 2013;41:1188-1195.

133. Sato M, Maulik G, Ray PS, Bagchi D, Das DK. Cardioprotective effects of grape seed proanthocyanidin against ischemic reperfusion injury. *Journal of molecular and cellular cardiology* 1999;31:1289-1297.

134. Scaffa PM, Vidal CM, Barros N, Gesteira TF, Carmona AK, Breschi L, Pashley DH, Tjaderhane L, Tersariol IL, Nascimento FD, Carrilho MR. Chlorhexidine inhibits the

- activity of dental cysteine cathepsins. *Journal of dental research* 2012;91:420-425.
135. Scheffel D, Delgado CC, Soares DG, Basso FG, de Souza Costa CA, Pashley DH, Hebling J. Increased Durability of Resin-Dentin Bonds Following Cross-Linking Treatment. *Operative dentistry* 2015;40:533-539.
136. Scheffel DL, Bianchi L, Soares DG, Basso FG, Sabatini C, de Souza Costa CA, Pashley DH, Hebling J. Transdental cytotoxicity of carbodiimide (EDC) and glutaraldehyde on odontoblast-like cells. *Operative dentistry* 2015;40:44-54.
137. Scheffel DL, Hebling J, Scheffel RH, Agee K, Turco G, de Souza Costa CA, Pashley D. Inactivation of matrix-bound metalloproteinases by cross-linking agents in acid-etched dentin. *Operative dentistry* 2014;39:152-158.
138. Scheffel DLS, Soares DG, Basso FG, de Souza Costa CA, Pashley D, Hebling J. Transdental cytotoxicity of glutaraldehyde on odontoblast-like cells. *Journal of dentistry* 2015;43:997-1006.
139. Schilke R, Lisson JA, Bauss O, Geurtsen W. Comparison of the number and diameter of dentinal tubules in human and bovine dentine by scanning electron microscopic investigation. *Archives of oral biology* 2000;45:355-361.
140. Sela-Passwell N, Rosenblum G, Shoham T, Sagi I. Structural and functional bases for allosteric control of MMP activities: can it pave the path for selective inhibition? *Biochimica et biophysica acta* 2010;1803:29-38.
141. Seseogullari-Dirihan R, Apollonio F, Mazzoni A, Tjaderhane L, Pashley D, Breschi L, Tezvergil-Mutluay A. Use of crosslinkers to inactivate dentin MMPs. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 2016;32:423-432.
142. Seseogullari-Dirihan R, Mutluay MM, Pashley DH, Tezvergil-Mutluay A. Is the inactivation of dentin proteases by crosslinkers reversible? *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 2017;33:e62-e68.
143. Seseogullari-Dirihan R, Mutluay MM, Vallittu P, Pashley DH, Tezvergil-Mutluay A. Effect of pretreatment with collagen crosslinkers on dentin protease activity. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 2015;31:941-947.
144. Sezinando A, Luque-Martinez I, Munoz MA, Reis A, Loguercio AD, Perdigao J. Influence of a hydrophobic resin coating on the immediate and 6-month dentin bonding of three universal adhesives. *Dental materials : official publication of the Academy of*

Dental Materials 2015;31:e236-246.

145. Shimada Y, Ichinose S, Sadr A, Burrow MF, Tagami J. Localization of matrix metalloproteinases (MMPs-2, 8, 9 and 20) in normal and carious dentine. Australian dental journal 2009;54:347-354.
146. Spencer P, Swafford JR. Unprotected protein at the dentin-adhesive interface. Quintessence international 1999;30:501-507.
147. Spencer P, Wang Y. Adhesive phase separation at the dentin interface under wet bonding conditions. Journal of biomedical materials research 2002;62:447-456.
148. Sulkala M, Tervahartiala T, Sorsa T, Larmas M, Salo T, Tjaderhane L. Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) is the major collagenase in human dentin. Archives of oral biology 2007;52:121-127.
149. Sun S, Wang GL, Huang Y, Diwu HL, Luo YC, Su J, Xiao YH. The effects of 2-hydroxyethyl methacrylate on matrix metalloproteinases 2 and 9 in human pulp cells and odontoblast-like cells in vitro. International endodontic journal 2018;51 Suppl 2:e157-e166.
150. Tagami J, Nakajima M, Shono T, Takatsu T, Hosoda H. Effect of aging on dentin bonding. Am J Dent 1993;6:145-147.
151. Takamizawa T, Barkmeier WW, Tsujimoto A, Berry TP, Watanabe H, Erickson RL, Latta MA, Miyazaki M. Influence of different etching modes on bond strength and fatigue strength to dentin using universal adhesive systems. Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials 2016;32:e9-21.
152. Tay FR, King NM, Chan KM, Pashley DH. How can nanoleakage occur in self-etching adhesive systems that demineralize and infiltrate simultaneously? The journal of adhesive dentistry 2002;4:255-269.
153. Tay FR, Pashley DH. Have dentin adhesives become too hydrophilic? Journal (Canadian Dental Association) 2003;69:726-731.
154. Tay FR, Pashley DH, Kapur RR, Carrilho MR, Hur YB, Garrett LV, Tay KC. Bonding BisGMA to dentin--a proof of concept for hydrophobic dentin bonding. Journal of dental research 2007;86:1034-1039.
155. Tay FR, Pashley DH, Loushine RJ, Weller RN, Monticelli F, Osorio R. Self-etching adhesives increase collagenolytic activity in radicular dentin. Journal of endodontics

2006;32:862-868.

156. Tay FR, Pashley DH, Suh BI, Carvalho RM, Itthagarun A. Single-step adhesives are permeable membranes. *Journal of dentistry* 2002;30:371-382.
157. Tay FR, Pashley DH, Yoshiyama M. Two modes of nanoleakage expression in single-step adhesives. *Journal of dental research* 2002;81:472-476.
158. Terauchi M, Horiguchi N, Kajiyama A, Akiyoshi M, Owa Y, Kato K, Kubota T. Effects of grape seed proanthocyanidin extract on menopausal symptoms, body composition, and cardiovascular parameters in middle-aged women: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *Menopause (New York, NY)* 2014;21:990-996.
159. Tersariol IL, Geraldeli S, Minciotti CL, Nascimento FD, Paakkonen V, Martins MT, Carrilho MR, Pashley DH, Tay FR, Salo T, Tjaderhane L. Cysteine cathepsins in human dentin-pulp complex. *Journal of endodontics* 2010;36:475-481.
160. Teruel Jde D, Alcolea A, Hernandez A, Ruiz AJ. Comparison of chemical composition of enamel and dentine in human, bovine, porcine and ovine teeth. *Archives of oral biology* 2015;60:768-775.
161. Tezvergil-Mutluay A, Agee KA, Hoshika T, Uchiyama T, Tjaderhane L, Breschi L, Mazzoni A, Thompson JM, McCracken CE, Looney SW, Tay FR, Pashley DH. Inhibition of MMPs by alcohols. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 2011;27:926-933.
162. Tezvergil-Mutluay A, Agee KA, Uchiyama T, Imazato S, Mutluay MM, Cadenaro M, Breschi L, Nishitani Y, Tay FR, Pashley DH. The inhibitory effects of quaternary ammonium methacrylates on soluble and matrix-bound MMPs. *Journal of dental research* 2011;90:535-540.
163. Tezvergil-Mutluay A, Mutluay MM, Agee KA, Seseogullari-Dirihan R, Hoshika T, Cadenaro M, Breschi L, Vallittu P, Tay FR, Pashley DH. Carbodiimide cross-linking inactivates soluble and matrix-bound MMPs, in vitro. *Journal of dental research* 2012;91:192-196.
164. Tezvergil-Mutluay A, Mutluay MM, Gu LS, Zhang K, Agee KA, Carvalho RM, Manso A, Carrilho M, Tay FR, Breschi L, Suh BI, Pashley DH. The anti-MMP activity of benzalkonium chloride. *Journal of dentistry* 2011;39:57-64.
165. Tjaderhane L. Dentin bonding: can we make it last? *Operative dentistry* 2015;40:4-18.

166. Tjaderhane L, Buzalaf MA, Carrilho M, Chaussain C. Matrix metalloproteinases and other matrix proteinases in relation to cariology: the era of 'dentin degradomics'. *Caries research* 2015;49:193-208.
167. Tjaderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *Journal of dental research* 1998;77:1622-1629.
168. Tjaderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol IL, Geraldeli S, Tezvergil-Mutluay A, Carrilho M, Carvalho RM, Tay FR, Pashley DH. Strategies to prevent hydrolytic degradation of the hybrid layer-A review. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 2013;29:999-1011.
169. Tsai CL, Hsu Sh, Cheng WL. Effect of different solvents and crosslinkers on cytocompatibility of Type II collagen scaffolds for chondrocyte seeding. *Artificial organs* 2002;26:18-26.
170. van Dijken JW, Pallesen U. Long-term dentin retention of etch-and-rinse and self-etch adhesives and a resin-modified glass ionomer cement in non-carious cervical lesions. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 2008;24:915-922.
171. Van Landuyt KL, De Munck J, Ermis RB, Peumans M, Van Meerbeek B. Five-year clinical performance of a HEMA-free one-step self-etch adhesive in noncarious cervical lesions. *Clinical oral investigations* 2014;18:1045-1052.
172. Van Landuyt KL, De Munck J, Snauwaert J, Coutinho E, Poitevin A, Yoshida Y, Inoue S, Peumans M, Suzuki K, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Monomer-solvent phase separation in one-step self-etch adhesives. *Journal of dental research* 2005;84:183-188.
173. Van Landuyt KL, Peumans M, De Munck J, Cardoso MV, Ermis B, Van Meerbeek B. Three-year clinical performance of a HEMA-free one-step self-etch adhesive in non-carious cervical lesions. *European journal of oral sciences* 2011;119:511-516.
174. Van Landuyt KL, Snauwaert J, De Munck J, Coutinho E, Poitevin A, Yoshida Y, Suzuki K, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Origin of interfacial droplets with one-step adhesives. *Journal of dental research* 2007;86:739-744.
175. Van Landuyt KL, Snauwaert J, De Munck J, Peumans M, Yoshida Y, Poitevin A, Coutinho E, Suzuki K, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Systematic review of the

- chemical composition of contemporary dental adhesives. *Biomaterials* 2007;28:3757-3785.
176. Van Landuyt KL, Snauwaert J, Peumans M, De Munck J, Lambrechts P, Van Meerbeek B. The role of HEMA in one-step self-etch adhesives. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 2008;24:1412-1419.
177. Van Meerbeek B, De Munck J, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Vijay P, Van Landuyt K, Lambrechts P, Vanherle G. Buonocore memorial lecture. Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges. *Operative dentistry* 2003;28:215-235.
178. Van Meerbeek B, Perdigao J, Lambrechts P, Vanherle G. The clinical performance of adhesives. *Journal of dentistry* 1998;26:1-20.
179. Van Meerbeek B, Vargas M, Inoue S, Yoshida Y, Perdigao J, Lambrechts P, Vanherle G. Microscopy investigations. Techniques, results, limitations. *Am J Dent* 2000;13:3d-18d.
180. Van Meerbeek B, Yoshihara K, Yoshida Y, Mine A, De Munck J, Van Landuyt KL. State of the art of self-etch adhesives. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 2011;27:17-28.
181. Vandooren J, Geurts N, Martens E, Van den Steen PE, Opdenakker G. Zymography methods for visualizing hydrolytic enzymes. *Nature methods* 2013;10:211-220.
182. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation research* 2003;92:827-839.
183. Wang DY, Zhang L, Fan J, Li F, Ma KQ, Wang P, Chen JH. Matrix metalloproteinases in human sclerotic dentine of attrited molars. *Archives of oral biology* 2012;57:1307-1312.
184. Wang L, Bim OJ, Lopes AC, Francisconi-Dos-Rios LF, Maenoso RM, D'Alpino PH, Honorio HM, Atta MT. Water interaction and bond strength to dentin of dye-labelled adhesive as a function of the addition of rhodamine B. *Journal of applied oral science : revista FOB* 2016;24:317-324.
185. Yang H, Guo J, Deng D, Chen Z, Huang C. Effect of adjunctive application of epigallocatechin-3-gallate and ethanol-wet bonding on adhesive-dentin bonds. *Journal of dentistry* 2016;44:44-49.
186. Yang H, Guo J, Guo J, Chen H, Somar M, Yue J, Huang C. Nanoleakage evaluation

at adhesive-dentin interfaces by different observation methods. *Dental materials journal* 2015;34:654-662.

187. Yassen GH, Platt JA, Hara AT. Bovine teeth as substitute for human teeth in dental research: a review of literature. *Journal of oral science* 2011;53:273-282.

188. Yoshida Y, Nagakane K, Fukuda R, Nakayama Y, Okazaki M, Shintani H, Inoue S, Tagawa Y, Suzuki K, De Munck J, Van Meerbeek B. Comparative study on adhesive performance of functional monomers. *Journal of dental research* 2004;83:454-458.

189. Yoshida Y, Yoshihara K, Nagaoka N, Hayakawa S, Torii Y, Ogawa T, Osaka A, Meerbeek BV. Self-assembled Nano-layering at the Adhesive interface. *Journal of dental research* 2012;91:376-381.

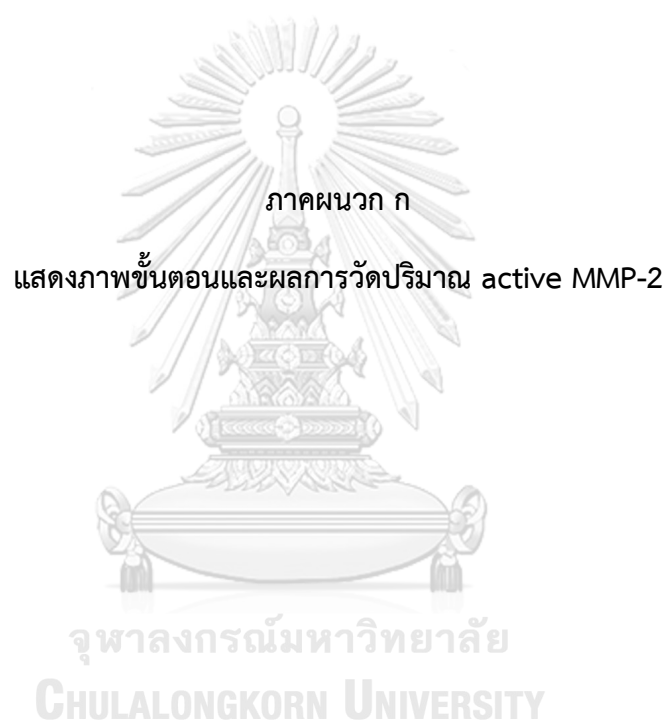
190. Zhang W, Yang W, Wu S, Zheng K, Liao W, Chen B, Yao K, Liang G, Li Y. Effects of acid etching and adhesive treatments on host-derived cysteine cathepsin activity in dentin. *The journal of adhesive dentistry* 2014;16:415-420.

191. Zhao W, Xie Q, Bedran-Russo AK, Pan S, Ling J, Wu CD. The preventive effect of grape seed extract on artificial enamel caries progression in a microbial biofilm-induced caries model. *Journal of dentistry* 2014;42:1010-1018.

192. Zheng P, Zaruba M, Attin T, Wiegand A. Effect of different matrix metalloproteinase inhibitors on microtensile bond strength of an etch-and-rinse and a self-etching adhesive to dentin. *Operative dentistry* 2015;40:80-86.

193. Zhou J, Chiba A, Scheffel DL, Hebling J, Agee K, Tagami J, Tan J, Abuelenain D, Nawareg MA, Hassan AH, Breschi L, Tay FR, Pashley DH. Cross-linked dry bonding: A new etch-and-rinse technique. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 2016;32:1124-1132.

194. Zucker S, Mancuso P, DiMassimo B, Lysik RM, Conner C, Wu CL. Comparison of techniques for measurement of gelatinases/type IV collagenases: enzyme-linked immunoassays versus substrate degradation assays. *Clinical & experimental metastasis* 1994;12:13-23.

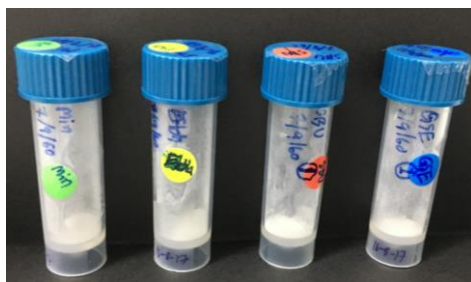


ภาคผนวก ก

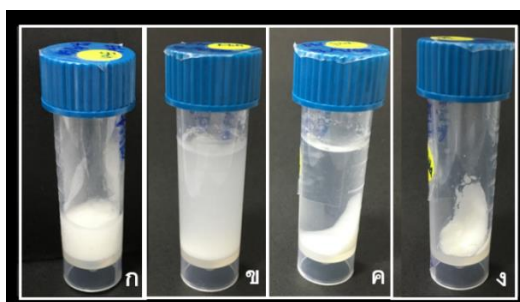
แสดงภาพขั้นตอนและผลการวัดปริมาณ active MMP-2

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

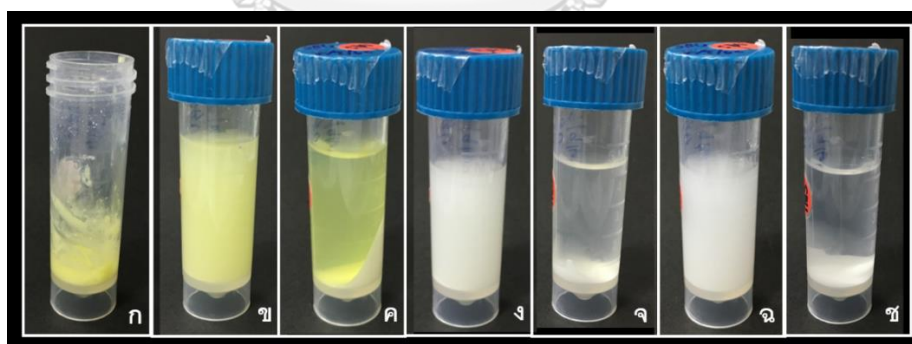


รูปที่ 17 แสดงผงเนื้อฟันที่เตรียมสำหรับวัดปริมาณ active MMP-2



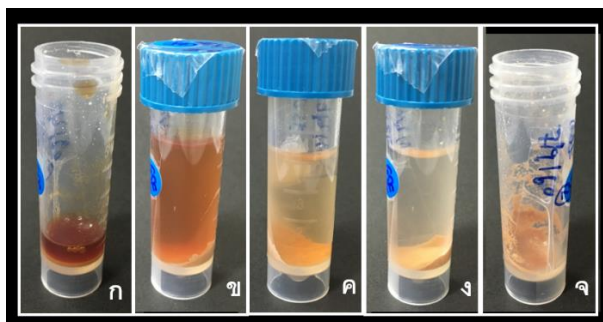
รูปที่ 18 แสดงวิธีปรับสภาพผงเนื้อฟันด้วยกรดฟอสฟอริก

เติมกรดฟอสฟอริกความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาณ 500 ไมโครลิตร นาน 10 นาที (ก) ล้างด้วยน้ำกลั่น 1,500 ไมโครลิตร (ข) ปั่นด้วยความเร็ว 18,000 รอบต่อนาที เพื่อให้ผงเนื้อฟันตกตะกอน (ค) ทำซ้ำ 3 ครั้ง แล้วดูดน้ำเหนือตะกอนทิ้ง (ง)

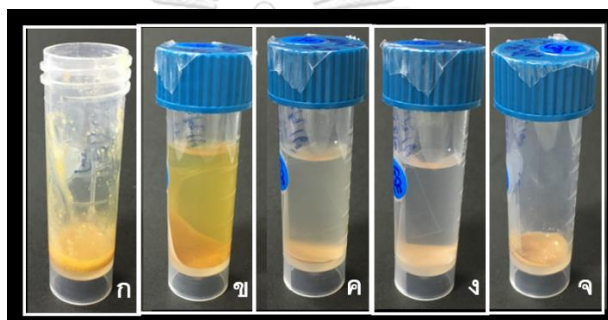


รูปที่ 19 แสดงวิธีปรับสภาพเนื้อฟันด้วยสารยึดติดหลังกัดด้วยกรดฟอสฟอริก

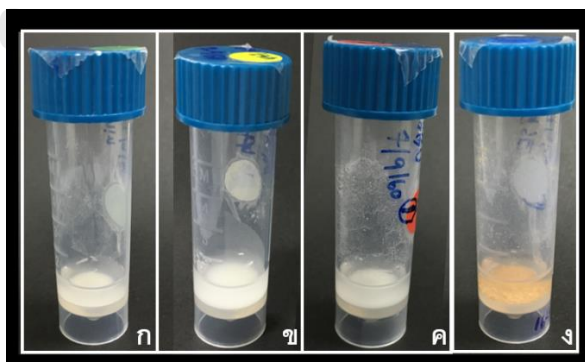
เติมสารยึดติด 400 ไมโครลิตร นาน 1 นาที (ก) กำจัดสารยึดติดออกด้วยอะซิโตน ปริมาณ 1,500 ไมโครลิตร (ข, ง, ฉ) ปั่นด้วยความเร็ว 18,000 รอบต่อนาที เพื่อให้ผงเนื้อฟันตกตะกอน (ค, จ, ช) ทำซ้ำ 3 ครั้ง แล้วดูดน้ำเหนือตะกอนทิ้ง



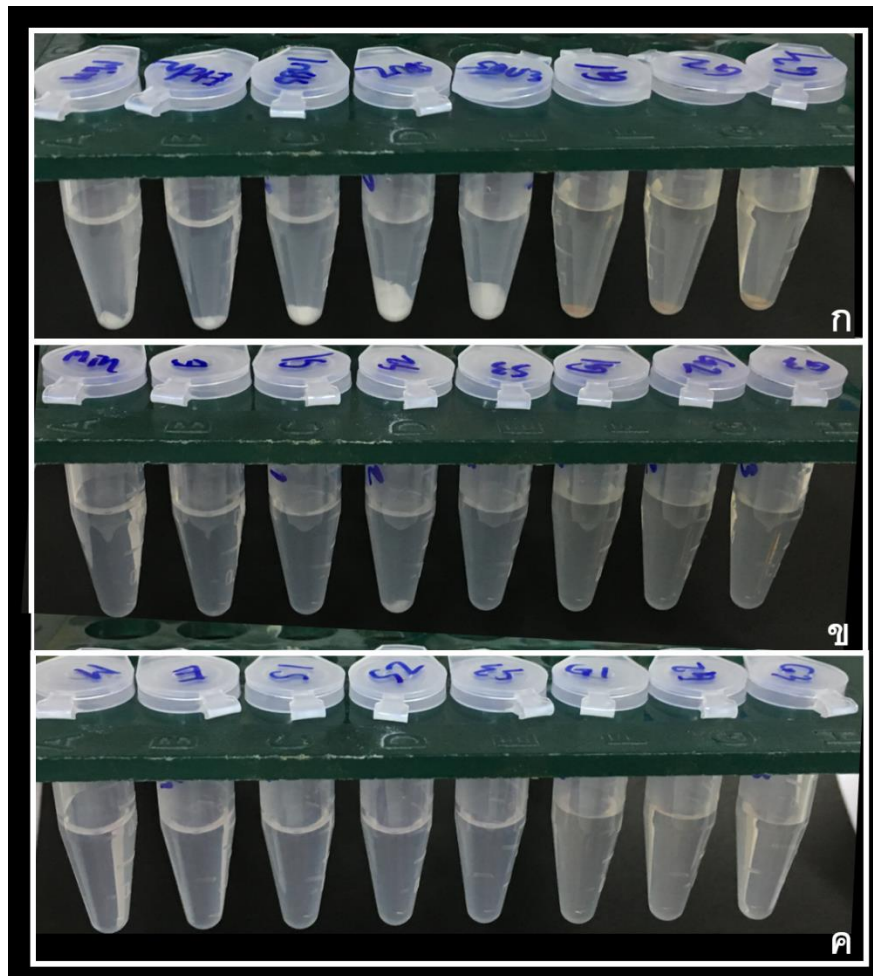
รูปที่ 20 แสดงวิธีปรับสภาพผงเนื้อฟันด้วยสารสกัดจากเมล็ดองุ่น
เติมสารสกัดจากเมล็ดองุ่นที่เตรียมไว้ ปริมาณ 500 ไมโครลิตร นาน 1 นาที (ก) ล้างด้วยน้ำกลั่น
ปริมาณ 1,500 ไมโครลิตร แล้วปั่นเพื่อให้ผงเนื้อฟันตกตะกอน (ข,ค ,ง) ทำซ้ำ 3 ครั้ง แล้วดูดูน้ำเหนือ
ตะกอนทิ้ง (จ)



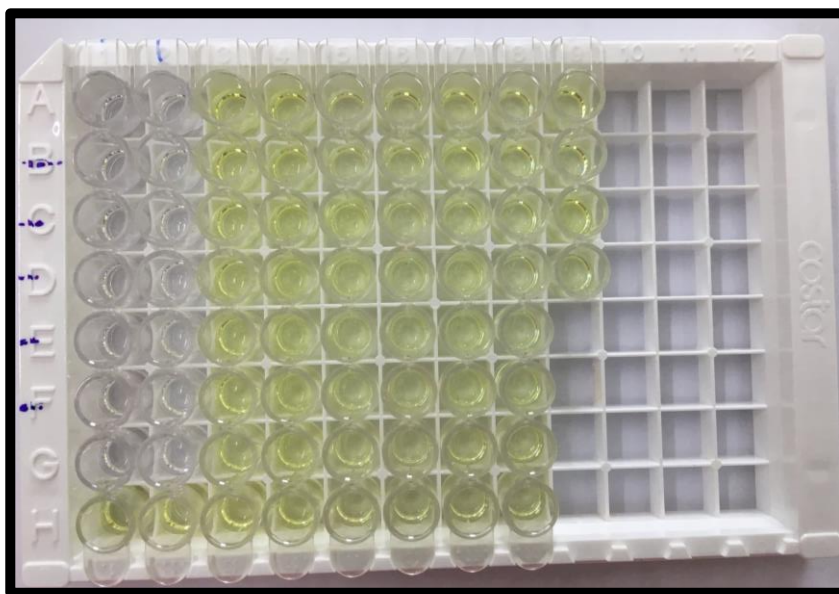
รูปที่ 21 แสดงวิธีปรับสภาพเนื้อฟันด้วยสารสกัดหลังปรับสภาพด้วยสารสกัดจากเมล็ดองุ่น
เติมสารสกัด 400 ไมโครลิตร นาน 1 นาที (ก) กำจัดสารสกัดออกด้วยอะซิโตน ปริมาณ 1,500
ไมโครลิตร (ข, ค, ง) ปั่นด้วยความเร็ว 18,000 รอบต่อนาที เพื่อให้ผงเนื้อฟันตกตะกอน ทำซ้ำ 3 ครั้ง
แล้วดูดูน้ำเหนือตะกอนทิ้ง (จ)



รูปที่ 22 แสดงวิธีการดึงโปรตีน (Protein extraction) ด้วย Tris-HCl
เติม Tris-HCl ความเข้มข้น 50 mM ปริมาณ 500 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
นาน 96 ชั่วโมง แล้วปั่นด้วยความเร็ว 18,000 รอบ นาน 10 นาที เพื่อให้ผงเนื้อฟันตกตะกอน
ตัวอย่างในภาพแสดงกลุ่มที่ 1 (ก) 2 (ข) 3 (ค) และ 4 (ง)

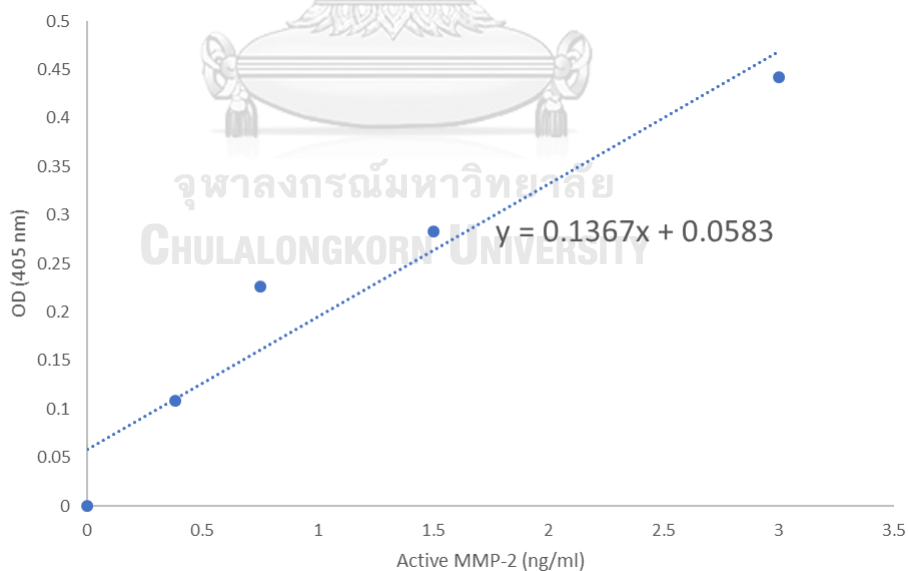


รูปที่ 23 แสดงของเหลวส่วนเหนือตะกอนที่นำไปวัดปริมาณ active MMP-2 ของเหลวเหนือตะกอนหลังการปั่นด้วยความเร็ว 18,000 รอบ นาน 10 นาที รอบที่ 1 (ก) 2 (ข) และ 3 (ค) ก่อนนำไปวัดปริมาณ active MMP-2



รูปที่ 24 แสดงชุดทดสอบ Biotrak™ MMP-2 activity assay

ชุดทดสอบหลังบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในที่มีดและมีความเข้มข้นสัมพัทธ์สมบูรณ์นาน 24 ชั่วโมง ที่นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร



รูปที่ 25 แสดง standard curve ปริมาณ active MMP-2 และค่าการดูดกลืนแสง

โดยเตรียมจาก standard human active MMP-2 ความเข้มข้น 3 1.5 0.75 และ 0.375 ng/ml

ตารางที่ 4 แสดงค่าการดูดกลืนแสง (OD) และปริมาณ active MMP-2

Group	OD	OD - OD _{blank}	Active MMP-2 (ng/ml)	Mean ± SD
Min	1.471	1.420	1.420	9.817 ± 0.187
	1.413	1.362	1.362	
	1.483	1.432	1.432	
	1.460	1.409	1.409	
	1.448	1.397	1.397	
	1.433	1.382	1.382	
PA	1.361	1.310	9.157	9.491 ± 0.285
	1.448	1.397	9.793	
	1.395	1.344	9.405	
	1.365	1.314	9.186	
	1.447	1.396	9.786	
	1.424	1.373	9.617	
SBU	1.282	1.231	8.579	7.520 ± 0.645
	1.101	1.050	7.255	
	1.063	1.012	6.977	
	1.157	1.106	7.664	
	1.083	1.032	7.123	
GSE+SBU	1.008	0.957	6.574	6.692 ± 0.159
	1.014	0.963	6.618	
	1.088	1.037	7.159	
	1.089	1.038	7.167	
	0.988	0.937	6.428	
	0.985	0.907	6.208	

Group	OD	OD - OD _{blank}	Active MMP-2 (ng/ml)	Mean ± SD
GPB	1.285	1.234	8.601	9.817 ± 0.187
	1.318	1.267	8.842	
	1.141	1.090	7.547	
	1.259	1.208	8.410	
	1.227	1.176	8.176	
	1.254	1.203	8.374	
	1.131	1.080	7.474	
GSE+GPB	0.920	0.869	5.931	6.763 ± 0.650
	1.115	1.064	7.357	
	1.058	1.007	6.940	
	0.973	0.922	6.318	
	0.987	0.936	6.421	
	1.150	1.099	7.613	



ตารางที่ 5 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณ active MMP-2 ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าสูงสุดและค่าต่ำสุด

Descriptive Statistics								
activeMMP2	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval of Mean	
							Lower Bound	Upper Bound
Min	6	9.54	10.05	9.8173	.18740	.07650	9.6207	10.0140
PA	6	9.16	9.79	9.4907	.28498	.11634	9.1916	9.4924
SBU	5	6.98	8.58	7.5196	.64515	.28852	6.7185	8.3207
GSE+SBU	6	6.21	7.17	6.6923	.39168	.15990	6.2813	7.1034
GPB	7	7.47	8.84	8.2034	.51661	.19526	7.7256	8.6812
GSE+GPB	6	5.93	7.61	6.7633	.65021	.26545	6.0810	7.4457



ตารางที่ 6 แสดงการกระจายข้อมูลปริมาณ active MMP-2

Tests of Normality							
group		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
activeMMP2	Min	.133	6	.200*	.981	6	.956
	PA	.191	6	.200*	.875	6	.247
	SBU	.259	5	.200*	.858	5	.222
	GSE+SBU	.242	6	.200*	.889	6	.312
	GPB	.201	7	.200*	.906	7	.372
	GSE+GPB	.201	6	.200*	.952	6	.760

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

จากตารางที่ 6 พบว่าข้อมูลมีการกระจายแบบปกติ (normal distribution) ทุกกลุ่มการทดลอง

ตารางที่ 7 แสดงความแปรปรวนของข้อมูลปริมาณ active MMP-2

Test of Homogeneity of Variances

activeMMP2

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.425	5	30	.058

จากตารางที่ 7 พบว่าข้อมูลมีความเป็นเอกพันธ์ของความแปรปรวน (Homogeneity of Variance)

ตารางที่ 8 แสดงความแตกต่างของปริมาณ active MMP-2



ANOVA

activeMMP2

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	53.668	5	10.734	47.855	.000
Within Groups	6.729	30	.224		
Total	60.396	35			

จากตารางที่ 8 พบว่ามีความแตกต่างของปริมาณ active MMP-2 อย่างน้อยหนึ่งกลุ่มการทดลอง

ตารางที่ 9 แสดงความแตกต่างของปริมาณ active MMP-2 ระหว่างกลุ่มการทดลอง

Multiple Comparisons

activeMMP2

Bonferroni

(i) group	(j) group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Min	PA	.32667	.27343	1.000	-.5453	1.1986
	SBU	2.29773*	.28678	.000	1.3833	3.2122
	GSE-SBU	3.12500*	.27343	.000	2.2531	3.9969
	GPB	1.61390*	.26349	.000	.7737	2.4541
	GSE-GPB	3.05400*	.27343	.000	2.1821	3.9259
PA	Min	-.32667	.27343	1.000	-1.1986	.5453
	SBU	1.97107*	.28678	.000	1.0566	2.8855
	GSE-SBU	2.79833*	.27343	.000	1.9264	3.6703
	GPB	1.28724*	.26349	.000	.4470	2.1274
	GSE-GPB	2.72733*	.27343	.000	1.8554	3.5993
SBU	Min	-2.29773*	.28678	.000	-3.2122	-1.3833
	PA	-1.97107*	.28678	.000	-2.8855	-1.0566
	GSE-SBU	.82727	.28678	.108	-.0872	1.7417
	GPB	-.68383	.27731	.294	-1.5681	.2005
	GSE-GPB	.75627	.28678	.197	-.1582	1.6707
GSE-SBU	Min	-3.12500*	.27343	.000	-3.9969	-2.2531
	PA	-2.79833*	.27343	.000	-3.6703	-1.9264
	SBU	-.82727	.28678	.108	-1.7417	.0872
	GPB	-1.51110*	.26349	.000	-2.3513	-.6709
	GSE-GPB	-.07100	.27343	1.000	-.9429	.8009
GPB	Min	-1.61390*	.26349	.000	-2.4541	-.7737
	PA	-1.28724*	.26349	.000	-2.1274	-.4470
	SBU	.68383	.27731	.294	-.2005	1.5681
	GSE-SBU	1.51110*	.26349	.000	.6709	2.3513
	GSE-GPB	1.44010*	.26349	.000	.5999	2.2803
GSE-GPB	Min	-3.05400*	.27343	.000	-3.9259	-2.1821
	PA	-2.72733*	.27343	.000	-3.5993	-1.8554
	SBU	-.75627	.28678	.197	-1.6707	.1582
	GSE-SBU	.07100	.27343	1.000	-.8009	.9429
	GPB	-1.44010*	.26349	.000	-2.2803	-.5999

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.



ผลการวิจัย *in situ* zymography (negative control)

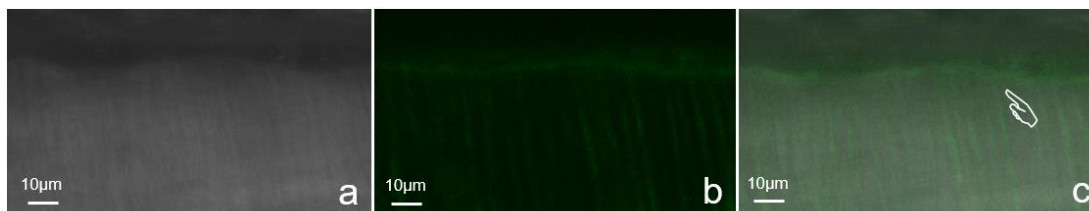
1. เตรียม resin-dentin slice จากการยึดติดเนื้อฟันด้วยสารยึดติด Single Bond Universal (3M ESPE, , St Paul, MN, USA)
2. ยึดติดชิ้นงานลงบนสไลด์ เช่นเดียวกับที่อธิบายในระเบียบวิธีวิจัย
3. บ่มชิ้นตัวอย่างกับสารละลายที่มีส่วนประกอบของ 1,10 phenanthroline ความเข้มข้น 1.25 mM ปริมาณ 1 μ l collagenase ความเข้มข้น 0.4 U/ml ปริมาณ 25 μ l quenched fluorescein-gelatin ปริมาณ 5 μ l anti-fading ปริมาณ 5 μ l และ reaction buffer ปริมาณ 14 μ l จากนั้นดำเนินการเช่นเดียวกับที่อธิบายในระเบียบวิธีวิจัย



รูปที่ 26 แสดงบริเวณรอยต่อของเรซินและเนื้อฟันกลุ่ม negative control

1, 10-phenanthroline (a) ภาพขาวดำ แสดงตำแหน่งของการยึดติด (b) ภาพช่วงสีเขียว (c) ภาพผลสแกน ไม่ปรากฏสีเขียวของฟลูออเรสเซนต์บริเวณชั้นไฮบริด (ระหว่างหัวลูกศร) และท่อเนื้อฟัน ตัวอย่าง A คือ ชั้นสารยึดติด H คือ ชั้นไฮบริด และ D คือ เนื้อฟัน

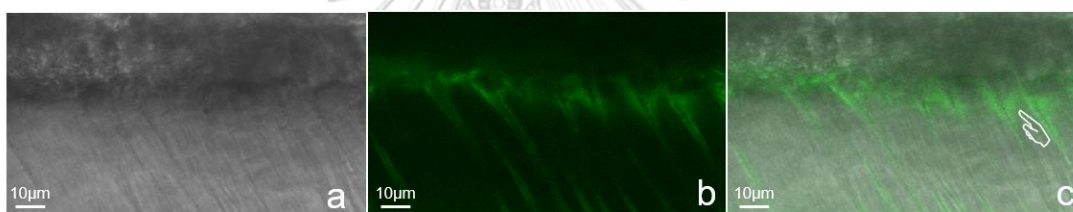
ผลการวิจัย *in situ* zymography กลุ่มที่ 1 (mineralized dentin)



รูปที่ 27 แสดงผล *in situ* zymography ของเนื้อฟันที่ไม่ปรับสภาพใด ๆ

(a) ภาพขาวดำ (b) ภาพช่วงสีเขียว (c) ภาพผสม ปราบกฏสีเขียวของฟลูออเรสเซนต์ใน
ท่อเนื้อฟัน (นิวซี)

ผลการวิจัย *in situ* zymography กลุ่มที่ 2 (phosphoric acid etch)

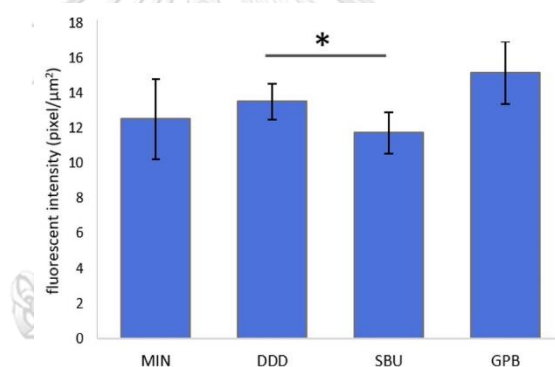


รูปที่ 28 แสดงผล *in situ* zymography ของเนื้อฟันที่ถูกกัดด้วยกรดฟอสฟอริก 15 วินาที

(a) ภาพขาวดำ (b) ภาพช่วงสีเขียว (c) ภาพผสม ปราบกฏสีเขียวของฟลูออเรสเซนต์ใน
ท่อเนื้อฟัน (นิวซี)

ตารางที่ 10 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มฟลูออเรสเซนซ์

Group	Fluorescence intensity (pixel/ μm^2)	SD
MIN	12.51	2.28
DDD	13.51	1.04
SBU	11.74	1.18
GSE+SBU	11.85	1.25
GPB	15.17	1.78
GSE+GPB	12.9	1.59



รูปที่ 29 กราฟแท่งแสดงความเข้มฟลูออเรสเซนซ์

ตัวย่อ MIN คือ เนื้อฟันที่ไม่ปรับสภาพผิวใด ๆ DDP คือ เนื้อฟันที่ถูกกัดกรดฟอสฟอริก 15 วินาที SBU คือ ชั้นไฮบริดที่ทำการยึดติดด้วยสารยึดติด Single Bond Universal GPB คือ ชั้นไฮบริดที่ทำการยึดติดด้วยสารยึดติด G-Premio Bond เส้นและเครื่องหมายดอกจันที่แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มการทดลอง ($p < 0.05$)

ตารางที่ 11 แสดงการกระจายข้อมูลความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์

group	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
MIN	.202	10	.200*	.931	10	.460
DDD	.189	9	.200*	.925	9	.434
SBU	.123	26	.200*	.976	26	.792
GSE+SBU	.087	39	.200*	.966	39	.280
GPB	.229	10	.147	.909	10	.274
GSE+GPB	.220	11	.142	.948	11	.613

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

จากตารางที่ 11 พบว่าข้อมูลมีการกระจายแบบปกติ (normal distribution) ทุกกลุ่มการทดลอง

ตารางที่ 12 แสดงความแตกต่างความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์ในชั้นไฮบริด

Fluorescence intensity					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	114.812	5	22.962	11.026	.000
Within Groups	206.171	99	2.083		
Total	320.983	104			

จากตารางที่ 12 พบว่ามีความแตกต่างความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์ อย่างน้อยหนึ่งกลุ่มการทดลอง

ตารางที่ 13 แสดงความแตกต่างความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์ ระหว่างกลุ่มการทดลอง

Multiple Comparisons

Dependent Variable: fluorescence intensity

Bonferroni

(I) group	(J) group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
MIN	DDD	-1.00214	.66306	1.000	-2.9967	.9924
	SBU	.76730	.53698	1.000	-.8480	2.3826
	GSE+SBU	.65989	.51152	1.000	-.8788	2.1986
	GPB	-2.66820 [*]	.64537	.001	-4.6095	-.7269
	GSE+GPB	-.47706	.63054	1.000	-2.3738	1.4196
DDD	MIN	1.00214	.66306	1.000	-.9924	2.9967
	SBU	1.76944 [*]	.55811	.030	.0906	3.4483
	GSE+SBU	1.66203 [*]	.53366	.036	.0567	3.2673
	GPB	-1.66606	.66306	.204	-3.6606	.3285
	GSE+GPB	.52508	.64863	1.000	-1.4260	2.4762
SBU	MIN	-.76730	.53698	1.000	-2.3826	.8480
	DDD	-1.76944 [*]	.55811	.030	-3.4483	-.0906
	GSE+SBU	-.10741	.36537	1.000	-1.2065	.9917
	GPB	-3.43550 [*]	.53698	.000	-5.0508	-1.8202
	GSE+GPB	-1.24436	.51906	.276	-2.8057	.3170
GSE+SBU	MIN	-.65989	.51152	1.000	-2.1986	.8788
	DDD	-1.66203 [*]	.53366	.036	-3.2673	-.0567
	SBU	.10741	.36537	1.000	-.9917	1.2065
	GPB	-3.32809 [*]	.51152	.000	-4.8668	-1.7894
	GSE+GPB	-1.13695	.49267	.346	-2.6189	.3450
GPB	MIN	2.66820 [*]	.64537	.001	.7269	4.6095
	DDD	1.66606	.66306	.204	-.3285	3.6606
	SBU	3.43550 [*]	.53698	.000	1.8202	5.0508
	GSE+SBU	3.32809 [*]	.51152	.000	1.7894	4.8668
	GSE+GPB	2.19114 [*]	.63054	.011	.2944	4.0878
GSE+GPB	MIN	.47706	.63054	1.000	-1.4196	2.3738
	DDD	-.52508	.64863	1.000	-2.4762	1.4260
	SBU	1.24436	.51906	.276	-.3170	2.8057
	GSE+SBU	1.13695	.49267	.346	-.3450	2.6189
	GPB	-2.19114 [*]	.63054	.011	-4.0878	-.2944

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ภาคผนวก ข

รายละเอียดชุดทดสอบ MMP-2 activity assay และ in situ zymography

(ข้อมูลจากบริษัทผู้ผลิต)



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

Biotrak™ MMP-2 Activity Assay (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)

เป็นชุดทดสอบสำหรับวัดปริมาณ active หรือ pro MMP-2 ในสารเหลวจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหรือสารเหลวจากร่างกาย เช่น ซีรัม พลาสมา ปัสสาวะ หรือน้ำไขข้อ เมื่อบ่มนาน 24 ชั่วโมง สามารถตรวจวัดปริมาณ active MMP-2 ได้ในช่วง 0.75 – 12 ng/ml และหากเพิ่มเวลาในการบ่ม สามารถตรวจวัดปริมาณ active MMP-2 ได้ในช่วง 0.19 – 3 ng/ml

เมื่อหยดสารเหลวตัวอย่างลงในหลุมทดสอบ MMP-2 จะจับกับ anti MMP-2 antibody ที่ถูกเคลือบไว้ในหลุมทดสอบ สารอื่นในสารเหลวตัวอย่างจะถูกกำจัดออกในขั้นตอนการล้าง ชุดทดสอบนี้สามารถวัดได้ทั้งเฉพาะปริมาณ active MMP-2 หรือปริมาณ MMP-2 ทั้งหมดในสารเหลวตัวอย่าง หากต้องการวัดปริมาณทั้งหมด ทำได้โดยใช้สาร p-aminophenylmercuric acetate (APMA) เพื่อกระตุ้น pro MMP-2 ให้กลายเป็น active MMP-2 จึงทำให้สามารถวัดปริมาณ MMP-2 ทั้งหมดในสารตัวอย่างได้ แต่หากต้องการวัดเฉพาะ active MMP-2 ที่มีในสารตัวอย่าง ไม่ต้องเติมสาร APMA

สารเคมีในชุดทดสอบ

10X Assay buffer ความเข้มข้น 500 mM ปริมาณ 10 ml 1 ขวด

assay buffer ที่พร้อมใช้งานต้องทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 50 mM ซึ่งประกอบด้วย Tris-HCl buffer pH = 7.6; 1.5 mM sodium chloride, 0.5 mM calcium chloride, 1 μ M zinc chloride, 0.01 (v/v) BRIJ 35 and 0.005% (w/v) gelatin

Standard คือ lyophilised human pro MMP-2 ปริมาณ 24 ng 1 ขวด

เตรียมโดยละลายใน assay buffer 1 ml จะได้ 24 ng/ml human pro MMP-2 แล้วจึงทำการเจือจางต่อด้วย assay buffer ให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ

Detection enzyme คือ urokinase ปริมาณ 100 μ l 1 ขวด

เนื่องเป็นความเข้มข้นที่พร้อมใช้งานแต่ถูกแช่แข็งไว้ ให้ทำการละลายก่อนใช้งาน

Substrate คือ lyophilised S-2444 peptide substrate

เตรียมโดยละลายใน assay buffer 5.1 ml จะให้ความเข้มข้นของ substrate 50 mM

Wash buffer ความเข้มข้น 40 M ปริมาณ 12.5 ml

เตรียมโดยเติม deionized water 487.5 ml จะได้ sodium phosphate buffer ความเข้มข้น 0.01 M

p-Aminophenylmercuric acetate (APMA) รูปแบบผงปริมาณ 352 mg 1

ขวด เตรียมโดยละลายใน deionized water ปริมาณ 1 ml จะได้ APMA ความเข้มข้น 1 M

จากนั้นเจือจางต่อด้วย deionized water ให้ได้ความเข้มข้น 0.5 mM

microplate จำนวน 96 หลุม ที่เคลือบด้วย anti MMP-2 antibody

ขั้นตอนการทดสอบ

1. เจือจาง standard ด้วย assay buffer ให้ได้ความเข้มข้น 3, 1.5, 0.75, 0.38 และ 0.19 ng/ml แล้วหยด standard ลงใน microplate ความเข้มข้นละ 2 หลุม หลุมละ 100 μ l
2. หยด assay buffer 100 μ l ลงใน microplate 2 หลุม เพื่อใช้เป็น blank
3. เตรียมสารเหลวตัวอย่างที่ต้องการวัดปริมาณ MMP-2 หยดน้ำเหนื่อตะกอนจากกลุ่มตัวอย่าง ลงใน microplate ตัวอย่างละ 2 หลุม หลุมละ 200 μ l
4. ปิดฝาแล้วบ่มในตู้มืดอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง
5. ล้างด้วย wash buffer และซับแห้ง ทำซ้ำ 4 รอบ

6. เติม APMA ปริมาณ 50 μl ลงในหลุม standard เพื่อกระตุ้น pro MMP-2 ให้กลายเป็น active MMP-2 แต่ในงานวิจัยนี้ไม่เติม APMA ในหลุมของกลุ่มตัวอย่าง เนื่องจากต้องการวัดเฉพาะปริมาณ active MMP-2 ที่มีในสารเหลวตัวอย่าง
7. เติม assay buffer ปริมาณ 50 μl ลงในหลุม standard สำหรับหลุมของกลุ่มตัวอย่าง ให้เติม assay buffer ปริมาณ 100 μl
8. เติม detection agent (เตรียมจากการผสม detection enzyme และ substrate ในอัตราส่วน 1:50) ปริมาณ 50 μl ลงในหลุมทดสอบ
9. เขย่าให้เข้ากัน นาน 20 วินาที แล้วบ่มในตู้มืดอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง
10. วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 405 nm
11. ทำ standard curve และคำนวณหาปริมาณ active MMP-2

Mounting medium with Dapi H-1200 (Vestashield, Vector Laboratories LTD, Cambridgeshire, UK)

เป็นสารละลายสำหรับใช้เตรียมเนื้อเยื่อหรือเซลล์ลงบนสไลด์ มีสมบัติป้องกันแสงยูวีและช่วยชะลอการจางหายของฟลูออเรสเซนต์ บรรจุในขวดพร้อมหลอดหยดที่ถูกออกแบบให้สามารถใช้หยดสารละลายได้ปริมาณ 25 μl โดยมีส่วนผสมของ 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) ความเข้มข้น 1.5 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่ง DAPI สามารถย้อมสี DNA และ stain RNA ปรากฏเป็นสีฟ้าในช่วงความยาวคลื่น excites 360 nm และ emits 460 nm

E12055 EnzCheck Gelatinase/Collagenase assay Kit (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)

สารเคมีในชุดทดสอบ

10X Reaction Buffer ความเข้มข้น 0.5 mM ซึ่งประกอบด้วย 1.5 M NaCl, 50 mM CaCl_2 , 2 mM sodium azide, pH 7.6 ปริมาณ 50 ml 1 ขวด

เตรียมโดยทำการเจือจางด้วย deionized water ให้ได้ความเข้มข้นพร้อมใช้งาน 0.05 M

DQ gelatin from pig skin, fluorescein conjugate คือ quenched fluorescein-gelatin ที่ถูกทำให้แห้ง น้ำหนัก 1 มิลลิกรัม

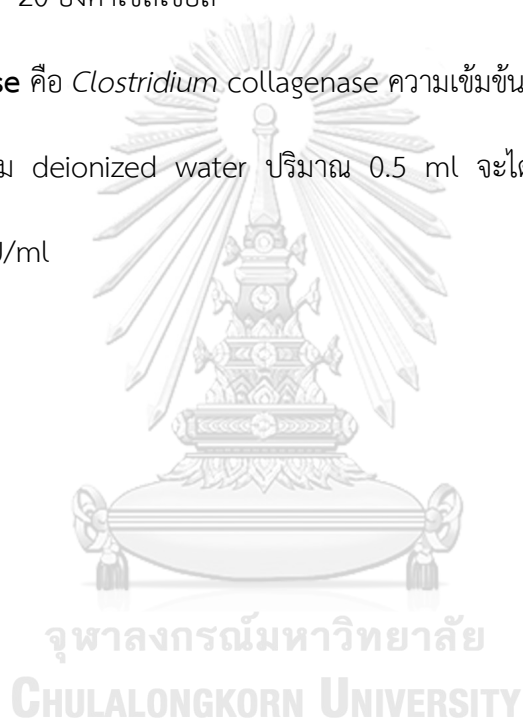
เตรียมโดยละลายใน deionized water ปริมาณ 1 มิลลิลิตรจะได้สารละลาย quenched fluorescein-gelatin ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการทดสอบ จากนั้นเติมโซเดียมเอไซด์ (sodium azide) ให้มีความเข้มข้นของโซเดียมเอไซด์ 2 มิลลิโมลาร์ ในสารละลาย quenched fluorescein-gelatin เพื่อใช้เป็นวัตถุกันเสีย จัดเก็บสารละลายที่ได้ไว้ในที่มืดอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1, 10-phenanthroline 9.9 mg (MW = 198.2) คือ MMP inhibitor ที่มาในชุดทดสอบ

เตรียมโดยละลายในเอทานอล 25 ไมโครลิตร จะได้สารละลาย 1, 10-phenanthroline ความเข้มข้น 2 โมลาร์ จากนั้น เจือจางด้วย reaction buffer ให้ได้ความเข้มข้นพร้อมใช้งานคือ 1, 10-phenanthroline ความเข้มข้น 10 mM จัดเก็บสารละลายที่เหลือจากการเตรียมเพื่อใช้ทดสอบไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

Collagenase คือ *Clostridium collagenase* ความเข้มข้น 500 U

เตรียมโดยเติม deionized water ปริมาณ 0.5 ml จะได้ *Clostridium collagenase* ความเข้มข้น 1,000 U/ml



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	กิตติศักดิ์ สະนนท์
วัน เดือน ปี เกิด	9 ธันวาคม 2531
สถานที่เกิด	จ. พังงา
วุฒิการศึกษา	ทันตแพทยศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับสอง) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ที่อยู่ปัจจุบัน	279/523 ถ. รัชดาภิเษก แขวงห้วยขวาง เขตห้วยขวาง กรุงเทพฯ
ผลงานตีพิมพ์	Porntaveetus T., Nowwarote N., Osathanon T., Theerapanon T., Pavasant P., Boonprakong L., Sanon K., Srisawasdi S., Suphapeetiporn K., Shotelersuk V. Compromised alveolar bone cells in a patient with dentinogenesis imperfecta caused by DSPP mutation. Clin Oral Investig 2019; 23: 303-13.