การศึกษาผลของระดับความเข้มข้นกลูโคสสูงในอาหารเลี้ยงเซลล์ต่อความมีชีวิตและการแสดงออกของยีนอินทิกรินในเซลล์สร้างกระดูกบนพื้นผิวไททาเนียมในหลอดทดลอง

Study of the Effects of High Glucose Concentration in Culture Media on Osteoblast Viability and Integrin Gene Expression on Titanium Surfaces: An In Vitro Study

วสุพล จึงกิจธนวัฒน์[1], ประเวศ เสรีเชษฐพงษ์[2], วรีย์รัตน์ เจิ่งประภากร[3]

[1]ภาควิชาทันตกรรมประดิษฐ์ คณะทันตแพทยศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 6570026432@student.chula.ac.th

[2]คณะทันตแพทยศาสตร์, มหาวิทยาลัยสยาม, pravejs@hotmail.com

[3]ภาควิชาทันตกรรมประดิษฐ์ คณะทันตแพทยศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, wchengprapakorn@gmail.com

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเซลล์ต่อความมีชีวิตและการแสดงออกของยีนอินทิกรินบนพื้นผิวไททาเนียมในสภาวะหลอดทดลอง โดยจำลองสภาวะน้ำตาลปกติและสภาวะน้ำตาลสูงที่พบในผู้ป่วยเบาหวาน เซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิจากกระดูกเบ้าฟันมนุษย์ถูกเพาะเลี้ยงในอาหาร Dulbecco's Modified Eagle Medium ที่มี fetal bovine serum ร้อยละ 10, ยาปฏิชีวนะ ร้อยละ 1 และ L-glutamine ร้อยละ 1 หลังจากนั้นเซลล์ในช่วงการเพาะเลี้ยงย่อยครั้งที่ 3 จะถูกนำมาใช้ในการทำการทดลอง เซลล์จะถูกเลี้ยงบนแผ่นไททาเนียมที่เตรียมไว้ โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่มตามความเข้มข้นของระดับน้ำตาลกลูโคส ได้แก่ กลุ่มน้ำตาลกลูโคสต่ำ 5.5 mmol/L และกลุ่มน้ำตาลกลูโคสสูง 25 mmol/L ภายใต้สภาวะควบคุมอุณหภูมิ 37 °C และบรรยากาศ 5% CO_2 การประเมินความมีชีวิตของเซลล์ดำเนินการด้วยวิธี MTT assay ที่ระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง และประเมินการแสดงของยีนอินทิกรินด้วยวิธี qRT-PCR ที่ 24 ชั่วโมงโดยใช้เซลล์สร้างกระดูกจากผู้บริจาคจำนวน 3 คน และทำการทดลองซ้ำคนละ 3 ครั้ง ผลการศึกษาพบว่าความมีชีวิตของเซลล์สร้างกระดูกในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยน้ำตาลกลูโคสสูงไม่แตกต่างจากกลุ่มน้ำตาลกลูโคสต่ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ทั้งที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง และการแสดงของยีนอินทิกริน α_5 และ β_1 ที่ 24 ชั่วโมงของกลุ่มที่เลี้ยงด้วยน้ำตาลกลูโคสสูงไม่แตกต่างจากกลุ่มน้ำตาลกลูโคสต่ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ผลลัพธ์ดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าภาวะน้ำตาลสูงเพียงอย่างเดียวในระยะเวลาสั้นอาจยังไม่เพียงพอที่จะก่อให้เกิดผลกระทบต่อการอยู่รอดหรือการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูกในหลอดทดลองรวมถึงการแสดงออกของตัวรับอินทิกริน α_5 และ β_1 ที่เป็นตัวรับที่มีผลต่อยึดเกาะของเซลล์สร้างกระดูกบนไททาเนียม

ในระยะเริ่มต้น ทั้งนี้ผลกระทบของโรคเบาหวานต่อกระบวนการยึดติดของกระดูกกับรากฟันเทียมอาจเกี่ยวข้องกับปัจจัยทางพยาธิสรีรวิทยาอื่นร่วมด้วย เช่น การสะสมของ advanced glycation end products ภาวะเครียดออกซิเดชัน หรือการอักเสบเรื้อรัง ซึ่งควรได้รับการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคต องค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษานี้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการออกแบบการวิจัยต่อยอดและการวางแผนการรักษาทางทันตกรรมรากฟันเทียมในผู้ป่วยที่มีภาวะทางระบบ เช่น ผู้ป่วยเบาหวาน

คำหลัก: รากฟันเทียม, เบาหวาน, อินทิกริน, การยึดเกาะของเซลล์สร้างกระดูกกับรากฟันเทียม

Abstract

This study aimed to investigate the effects of glucose concentration in culture media on osteoblast viability and integrin expression on titanium surfaces under in vitro conditions. Normoglycemic and hyperglycemic environments observed in diabetic patients were simulated. Primary human alveolar osteoblasts obtained from alveolar bone were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% antibiotic agents, and 1% L-glutamine. Cells at passage 3 were used for the experiments. The osteoblasts were then seeded onto prepared titanium discs and divided into two groups according to glucose concentration: a low-glucose group (5.5 mmol/L) and a high-glucose group (25 mmol/L). Cells were maintained under controlled conditions at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2. Osteoblasts were isolated from three independent donors, and experiments for each donor were performed in triplicate.

Cell viability was evaluated using the MTT assay at 24 and 48 hours. The expression of integrin genes (α_5 and β_1) was assessed at 24 hours using reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR). The results demonstrated that osteoblast viability and proliferation in the high-glucose group were not significantly different from those in the low-glucose group ($P>0.05$) at both time points. Similarly, the expression levels of integrin α_5 and β_1 at 24 hours showed no significant differences between the two groups ($P>0.05$). These findings suggest that short-term exposure to elevated glucose alone may not be sufficient to impair osteoblast survival or proliferation or alter early integrin-mediated cell adhesion on titanium surfaces in vitro. The impact of diabetes on bone–implant integration may instead involve additional pathophysiological factors, such as

the accumulation of advanced glycation end products, oxidative stress, and chronic inflammation, which warrant further investigation. The knowledge gained from this study may serve as baseline information for designing future research and for treatment planning in implant dentistry for patients with systemic conditions such as diabetes.

Keywords: dental implant, diabetes, integrin, osseointegration

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันหลายประเทศทั่วโลกรวมถึงประเทศไทยได้ก้าวเข้าสู่สังคมผู้สูงอายุ ส่งผลให้ปัญหาการสูญเสียฟันพบได้เพิ่มขึ้นตามสัดส่วนประชากรสูงอายุที่มากขึ้น (Anantanasuwong, 2021) ภาวะการสูญเสียฟันไม่เพียงส่งผลต่อความสามารถในการบดเคี้ยวอาหารเท่านั้น แต่ยังสัมพันธ์กับภาวะโภชนาการที่บกพร่อง การลดลงของมวลกล้ามเนื้อ ตลอดจนคุณภาพชีวิตและการเข้าสังคมของผู้ป่วย (Della Terra Mouco Garrido et al., 2025) ดังนั้นงานทันตกรรมประดิษฐ์จึงมีบทบาทสำคัญในการฟื้นฟูสมรรถภาพช่องปากของผู้สูงอายุ เพื่อให้สามารถกลับมามีการใช้งานที่เหมาะสมและดำรงชีวิตได้อย่างมีคุณภาพ การทดแทนฟันที่สูญเสียสามารถทำได้หลายวิธี ทั้งฟันปลอมชนิดถอดได้และฟันปลอมชนิดติดแน่น โดยในปัจจุบันการรักษาด้วยรากฟันเทียมได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวางว่าเป็นทางเลือกที่มีประสิทธิภาพ เนื่องจากสามารถฟื้นฟูการทำหน้าที่ การกระจายแรงบดเคี้ยว การช่วยคงสภาพกระดูกขากรรไกร และความพึงพอใจของผู้ป่วยได้ใกล้เคียงฟันธรรมชาติ (Chakraborty et al., 2024) ความสำเร็จของการรักษาด้วยรากฟันเทียมขึ้นอยู่กับกระบวนการยึดติดระหว่างกระดูกกับผิวไททาเนียมบนรากฟันเทียมซึ่งเป็นกระบวนการทางชีววิทยาที่ซับซ้อน กระบวนการดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับคุณภาพของกระดูก รวมถึงสภาวะทางระบบของผู้ป่วย (Henry, 2002) แม้ว่าในปัจจุบันจะมีการพัฒนาเทคโนโลยีพื้นผิวรากฟันเทียมเพื่อส่งเสริมการยึดติดกับกระดูกให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น เช่น การปรับความหยาบหรือการเคลือบผิวด้วยสารชีวภาพต่าง ๆ แล้วก็ตาม (Łosiewicz et al., 2025) ปัจจัยทางระบบของผู้ป่วยยังคงเป็นตัวแปรสำคัญที่อาจรบกวนกระบวนการหายของกระดูก โดยเฉพาะกลุ่มโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง (Non-communicable diseases; NCDs) ซึ่งพบได้บ่อยในผู้สูงอายุหนึ่งในโรคที่มีความชุกสูงและส่งผลต่อกระบวนการซ่อมแซมเนื้อเยื่อของร่างกายคือโรคเบาหวาน (Jameson, 2010; Magliano et al., 2021) โดยจากรายงานของ International Diabetes Federation Diabetes Atlas ฉบับที่ 11 พบว่ามีผู้ป่วยเบาหวานทั่วโลกประมาณ 589 ล้านคน ในกลุ่มอายุ 20-79 ปี คิดเป็นร้อยละ 11.1 และคาดว่าจะเพิ่มขึ้นเป็น 853 ล้านคน ภายในปี พ.ศ. 2593 โดยพบว่าประมาณ 1 ใน 4 ของผู้ป่วยเบาหวานทั้งหมดมีอายุมากกว่า 65 ปี ซึ่งสะท้อนถึงภาระของโรคเบาหวานในกลุ่มผู้สูงอายุ (Duncan et al., 2025) ในผู้ป่วยเบาหวานภาวะระดับน้ำตาลในเลือดสูงเป็นเวลานานสามารถก่อให้เกิดความผิดปกติในระดับเซลล์และโมเลกุล ซึ่งอาจรบกวนการส่ง

สัญญาณและการทำงานของเซลล์สร้างกระดูกได้ (Chrcanovic et al., 2014) โดยตัวรับบนผิวเซลล์ที่มีผลต่อการยึดเกาะของเซลล์สร้างกระดูกบนไททาเนียม ได้แก่ อินทีกริน α_5 และ β_1 (Gronowicz & McCarthy, 1996) อย่างไรก็ตาม ผลของระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่สูงต่อความมีชีวิตของเซลล์และการแสดงออกของยีนอินทิกริน α_5 และ β_1 ยังไม่เป็นที่ชัดเจน นอกจากนี้ยังขาดการศึกษาที่ประเมินผลของกลูโคสต่อความมีชีวิตของเซลล์และการแสดงออกของยีนอินทิกรินบนพื้นผิวไททาเนียมโดยตรง ช่องว่างขององค์ความรู้นี้นำไปสู่คำถามวิจัยว่า ระดับความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่แตกต่างกัน ซึ่งใช้จำลองสภาวะน้ำตาลต่ำและสภาวะน้ำตาลสูง มีผลต่อความมีชีวิตและการแสดงออกของอินทิกริน α_5 และ β_1 ของเซลล์สร้างกระดูกบนพื้นผิวไททาเนียมในหลอดทดลองหรือไม่ การศึกษาผลของระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสต่อความมีชีวิตและการแสดงออกของโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการยึดเกาะของเซลล์สร้างกระดูกบนพื้นผิวไททาเนียมในหลอดทดลอง มีความสำคัญต่อการทำความเข้าใจกลไกพื้นฐานของการตอบสนองของเซลล์ภายใต้ภาวะน้ำตาลสูง ซึ่งเป็นสภาวะที่พบได้ในผู้ป่วยเบาหวาน โดยเฉพาะในระยะเริ่มต้นของกระบวนการยึดติดของกระดูกกับรากฟันเทียม องค์ความรู้นี้ช่วยเติมเต็มช่องว่างของงานวิจัยที่ยังขาดข้อมูลเกี่ยวกับผลของกลูโคสต่อการแสดงออกของอินทิกรินบนพื้นผิวไททาเนียมโดยตรง

วัตถุประสงค์

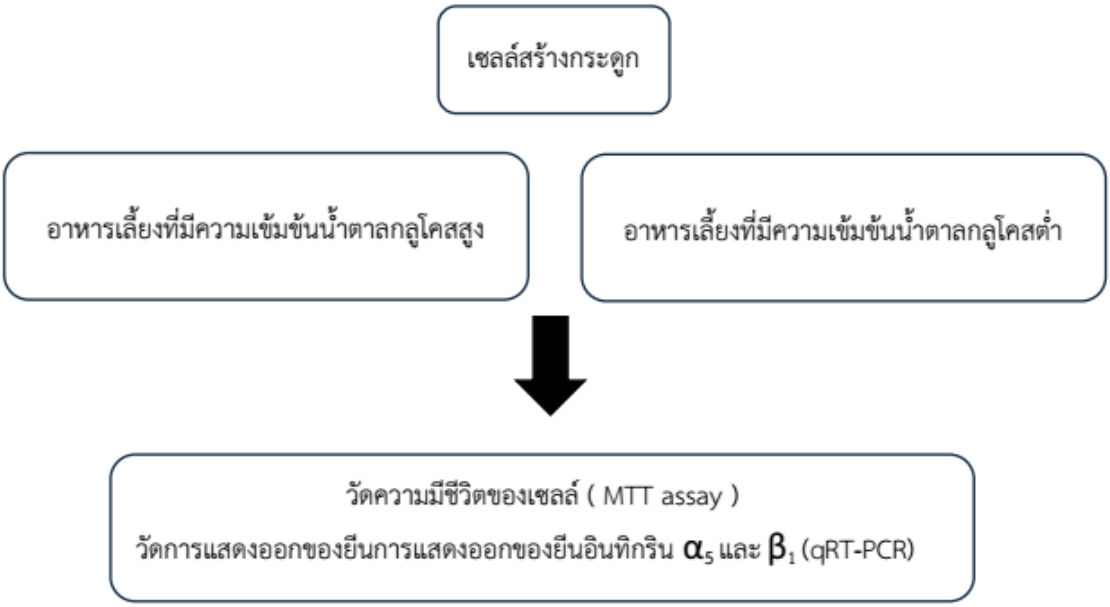
1. เพื่อเปรียบเทียบผลของระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสสูงและต่ำในอาหารเลี้ยงเซลล์ต่อความมีชีวิตของเซลล์สร้างกระดูกบนไททาเนียมในหลอดทดลอง
2. เพื่อเปรียบเทียบผลของระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสสูงและต่ำในอาหารเลี้ยงเซลล์ต่อการแสดงออกของยีนอินทิกริน α_5 และ β_1 ของเซลล์สร้างกระดูกบนไททาเนียมในหลอดทดลอง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ข้อมูลเชิงพื้นฐานเกี่ยวกับผลของระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสต่อความมีชีวิตและการโมเลกุลยึดเกาะของเซลล์สร้างกระดูกซึ่งช่วยอธิบายการตอบสนองของเซลล์กระดูกภายใต้ภาวะน้ำตาลสูง
2. เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการวางแผนการรักษาทางทันตกรรมรากฟันเทียมในผู้ป่วยกลุ่มเสี่ยง
3. เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาต่อยอดเกี่ยวกับการปรับสภาวะแวดล้อมทางชีวภาพการใช้สารที่ช่วยส่งเสริมการสร้างกระดูก หรือการพัฒนาและออกแบบพื้นผิววัสดุรากฟันเทียม เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการยึดติดของรากฟันเทียมในผู้ป่วยที่มีโรคทางระบบ

กรอบแนวคิด

โรคเบาหวานเป็นโรคทางระบบที่เกิดจากการขาดอินซูลินหรือการทำงานของอินซูลินที่ผิดปกติ ส่งผลให้เกิดภาวะระดับน้ำตาลในเลือดสูงเรื้อรัง (Jameson, 2010) ซึ่งภาวะดังกล่าวสามารถรบกวนกระบวนการทางชีวภาพหลายด้านที่เกี่ยวข้องกับการหายของกระดูกและการยึดติดระหว่างกระดูกกับรากฟันเทียม (osseointegration) ได้แก่ การหายของแผลที่ล่าช้า ความผิดปกติของหลอดเลือดขนาดเล็ก การเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระ และการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันที่บกพร่อง (Chrcanovic et al., 2014) กลไกเหล่านี้ล้วนมีบทบาทสำคัญต่อการทำงานของเซลล์สร้างกระดูกและกระบวนการสร้างกระดูกใหม่ อย่างไรก็ตาม ยังมีข้อสงสัยว่าภาวะระดับน้ำตาลสูงจะมีผลเป็นพิษต่อเซลล์กระดูกบนพื้นผิวรากฟันเทียมหรือไม่ รวมทั้งมีผลต่อการแสดงออกของยีนอินทิกริน α_5 และ β_1 หรือไม่ การศึกษานี้จึงมุ่งจำลองสภาวะระดับน้ำตาลที่แตกต่างกันในหลอดทดลอง เพื่อประเมินผลของระดับน้ำตาลกลูโคสต่อความมีชีวิตและการแสดงออกของยีนอินทิกริน α_5 และ β_1 ของเซลล์สร้างกระดูก ซึ่งเป็นกระบวนการสำคัญที่เกี่ยวข้องกับความสำเร็จของการยึดติดระหว่างกระดูกกับรากฟันเทียม



วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บกระดูกตัวอย่าง

ตัวอย่างกระดูกเบ้าฟันถูกเก็บจากคลินิกภาควิชาศัลยศาสตร์ช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยการศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยที่ได้รับการรับรองจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์จากสำนักงานคณะกรรมการพิจารณาการวิจัยในมนุษย์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (เลขที่โครงการ 2024-023) ผู้บริจาคจะได้รับการชี้แจงรายละเอียดเกี่ยวกับการทดลองอย่าง

ครบถ้วน และจะต้องลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมก่อนการเก็บตัวอย่างกระดูก ผู้ป่วยที่มีคุณสมบัติตรงตามเกณฑ์ต่อไปนี้จะได้รับการคัดเลือกให้เป็นผู้บริจาคเซลล์สำหรับการทดลองนี้

1. บุคคลที่มีสุขภาพทั่วไปแข็งแรงอายุอยู่ในช่วง 20-50 ปี
2. ไม่เป็นบุคคลที่มีภาวะทางการแพทย์หรือโรคทางระบบที่อาจส่งผลต่อสุขภาพกระดูก ได้แก่ การผิดปกติของกระบวนการเผาผลาญหรือการหายของแผล อยู่ในระหว่างหรือเคยได้รับรังสีรักษา มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง หรืออยู่ระหว่างการได้รับยากดภูมิคุ้มกัน
3. ไม่เป็นบุคคลที่การสูบบุหรี่ หรือการใช้สารเสพติด
4. ไม่เป็นบุคคลที่มีโรคติดเชื้อ เช่น เอชไอวี หรือไวรัสตับอักเสบ เพื่อลดความเสี่ยงของการปนเปื้อนระหว่างการทำการทดลองในห้องทดลอง

2. การเตรียมแผ่นไททาเนียม

ไททาเนียมเกรด 4 (Commercial Pure Titanium Grade 4) จะถูกผลิตเป็นแผ่นขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 มม. เพื่อให้ได้ความหยาบของพื้นผิวสม่ำเสมอทุกแผ่น แผ่นไททาเนียมจะถูกขัดผิวด้วยเครื่อง Nano 2000 grinder-polisher (Pace Technologies, Arizona, USA) ด้วยกระดาษทรายเบอร์ 180 หลังการขัดตัวอย่างจะถูกวัดความหยาบด้วยเครื่อง Surface Roughness Tester ชนิด Non-Contact (Alicona, England) เพื่อยืนยันความสม่ำเสมอของค่าความหยาบ โดยอ้างอิงจากการศึกษาก่อนหน้า (Osathanon et al., 2011) นำตัวอย่างไปทำความสะอาดด้วยคลื่นอัลตราโซนิกในน้ำปราศจากไอออน ล้างด้วยเอทานอล 70% และน้ำปราศจากไอออน ก่อนนำไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ตามอุณหภูมิและความดันมาตรฐานกระบวนการทำให้ปราศจากเชื้อได้รับการตรวจสอบโดยใช้ sterilization indicator tape เพื่อยืนยันประสิทธิภาพของการนึ่งฆ่าเชื้อในแต่ละรอบการทำงาน

3. การเลี้ยงเซลล์และใช้สารทดสอบ

ชิ้นกระดูกถูกนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่เติมสารอาหารและยาปฏิชีวนะที่จำเป็น จากนั้นบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C ในบรรยากาศที่มีความชื้นเหมาะสมและมี 5% CO_2 โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์วันเว้นวัน เมื่อเซลล์เจริญเติบโตเต็มพื้นที่จะทำการย่อยแยกเซลล์ด้วยสารtrypsin และนำไปเลี้ยงต่อโดยใช้เซลล์ในช่วงการเพาะเลี้ยงย่อยครั้งที่ 3

ในการศึกษานี้ เซลล์ถูกแบ่งเลี้ยงบนแผ่นไททาเนียมในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสแตกต่างกัน ได้แก่ กลุ่มน้ำตาลสูง (25 mmol/L) และกลุ่มน้ำตาลต่ำ (5.5 mmol/L) โดยค่าความเข้มข้นของน้ำตาลต่ำ (5.5 mmol/L) ถูกกำหนดให้สอดคล้องกับระดับน้ำตาลในเลือดขณะอดอาหารในภาวะปกติ (normal fasting plasma glucose level) ตามเกณฑ์ทางคลินิก (Duncan et al., 2025) และค่าความเข้มข้นของน้ำตาลสูง (25 mmol/L) อ้างอิงจากงานวิจัยที่ผ่านมา (Miranda et al., 2016) โดยกำหนดจำนวนเซลล์เพาะเลี้ยงเริ่มต้นที่ 50000 เซลล์ต่อหลุมสำหรับการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์และ 150000 เซลล์ต่อหลุมในวิเคราะห์การแสดงออกของยีนอินทิกริน โดยทำการทดลองซ้ำ

จำนวน 3 ซ้ำต่อเซลล์จากผู้บริจาค 1 ราย และใช้เซลล์สร้างกระดูกจากผู้บริจาคทั้งหมด 3 รายในการศึกษา (Fitri et al., 2018)

4. การทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ (Cell viability assay)

สำหรับการทดลองความมีชีวิตของเซลล์ หลังจากบ่มเพาะเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง จึงประเมินความมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay โดยผลึก formazan ที่เกิดจากการทำงานของเซลล์จะถูกละลายด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตรด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลต

5. การวิเคราะห์การแสดงออกของโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการยึดเกาะด้วยวิธี Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

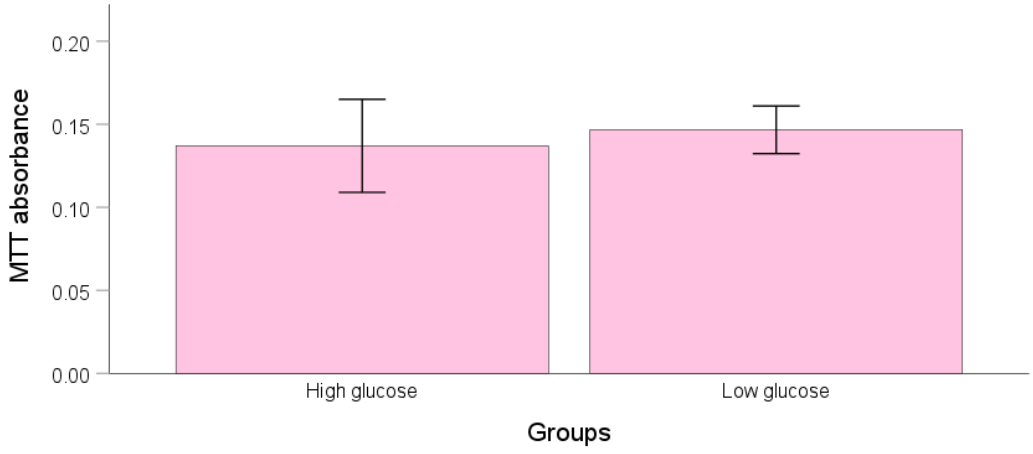
เซลล์จะถูกเก็บที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นสกัด RNA ด้วยน้ำยา TRIzol และนำมาเปลี่ยนเป็น complementary DNA (cDNA) โดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase ตามชุดตรวจของ Bio-Rad การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมจะดำเนินการด้วยเครื่อง MiniOpticon (Bio-Rad) โดยใช้ชุดน้ำยา SYBR Green Master Mix และทำการวิเคราะห์ melting curve เพื่อยืนยันความจำเพาะของการขยายสัญญาณ ยีน GAPDH ถูกใช้เป็น housekeeping gene สำหรับปรับค่ามาตรฐานการแสดงออกของยีน โดยลำดับไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองออกแบบด้วยเครื่องมือออกแบบไพรเมอร์จากฐานข้อมูล NCBI

6. การวิเคราะห์ผล

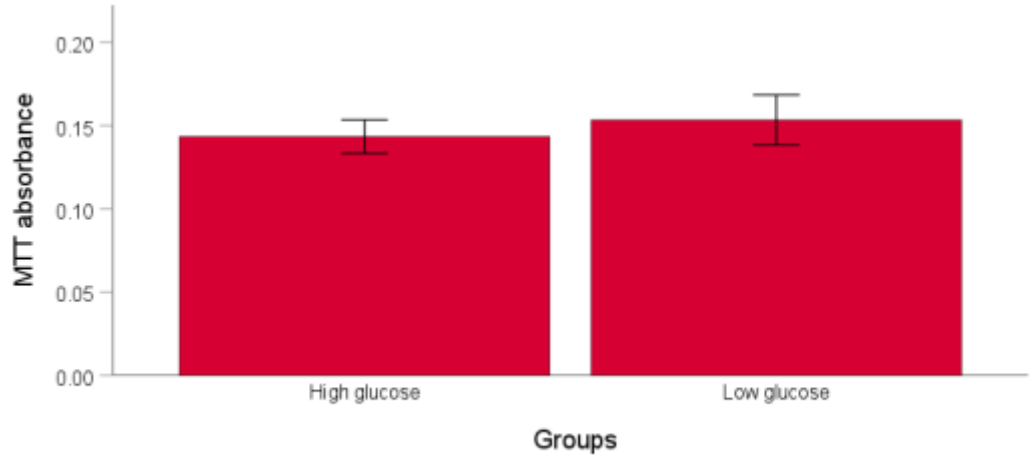
การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มดำเนินการโดยใช้การทดสอบทางสถิติแบบ non-parametric ด้วยวิธี Mann–Whitney U test และกำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ $P< 0.05$ โดยใช้โปรแกรม SPSS ver.29

ผลการวิจัย

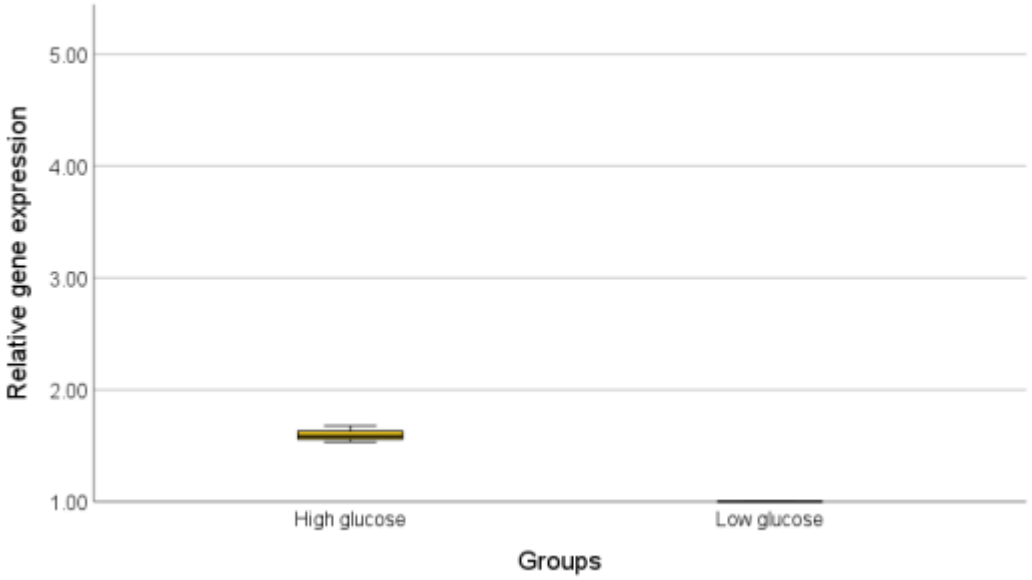
ผลการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์สร้างกระดูกพบว่า กลุ่มที่เลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสสูง (25 mmol/L) และกลุ่มที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสต่ำ (5.5 mmol/L) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง ($P>0.05$) ดังแสดงในภาพ 1 และ 2 อย่างไรก็ตาม พบแนวโน้มที่ค่า cell viability (absorbance) ในกลุ่มน้ำตาลกลูโคสสูงมีค่าลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มน้ำตาลกลูโคสต่ำ นอกจากนี้ผลการประเมินการแสดงออกของยีนอินทิกริน α_5 และ β_1 ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยวิธี RT-PCR พบว่า ระดับการแสดงออกของยีนทั้งสองในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยน้ำตาลกลูโคสสูงไม่แตกต่างจากกลุ่มน้ำตาลกลูโคสต่ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ดังแสดงในภาพ 3 และ 4 โดยพบแนวโน้มการแสดงออกของยีนที่สูงขึ้นในกลุ่มน้ำตาลกลูโคสสูง



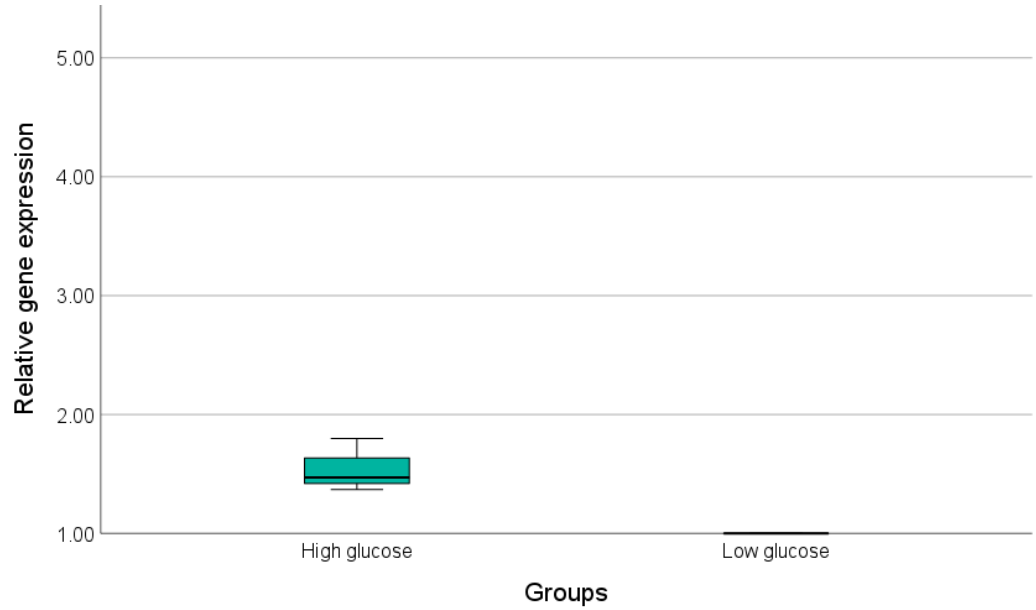
ภาพ 1 แผนภูมิแสดงค่าการดูดกลืนแสงจากการทดสอบ MTT assay ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งใช้เป็นตัวบ่งชี้ความมีชีวิตของเซลล์สร้างกระดูกในแต่ละกลุ่มทดลอง



ภาพ 2 แผนภูมิแสดงค่าการดูดกลืนแสงจากการทดสอบ MTT assay ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งใช้เป็นตัวบ่งชี้ความมีชีวิตของเซลล์สร้างกระดูกในแต่ละกลุ่มทดลอง



ภาพ 3 แผนภูมิแสดงระดับการแสดงออกของยีนอินทิกริน α_5 ในกลุ่มที่เลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสสูง (25 mmol/L) เปรียบเทียบกับกลุ่มที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสต่ำ (5.5 mmol/L)



ภาพ 4 แผนภูมิแสดงระดับการแสดงออกของยีนอินทิกริน β_1 ในกลุ่มที่เลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสสูง (25 mmol/L) เปรียบเทียบกับกลุ่มที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสต่ำ (5.5 mmol/L)

สรุปผลการวิจัย

ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเซลล์ไม่ส่งผลต่อความมีชีวิตและการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูกในหลอดทดลองที่ระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง และการแสดงออกของยีนอินทิกริน α_5 และ β_1 ที่ 24 ชั่วโมงของกลุ่มที่เลี้ยงด้วยน้ำตาลกลูโคสสูงไม่แตกต่างจากกลุ่มน้ำตาลกลูโคสต่ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) ผลดังกล่าวอาจสะท้อนว่า ภาวะน้ำตาลสูงเพียงอย่างเดียวในช่วงเวลาสั้น ๆ ยังไม่เพียงพอที่จะก่อให้เกิดความเป็นพิษและการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของอินทิกริน α_5 และ β_1 ทั้งนี้อาจต้องอาศัยระยะเวลาการสัมผัสที่ยาวนานขึ้นหรือปัจจัยร่วมอื่น ๆ จึงจะเกิดผลกระทบที่ชัดเจน ซึ่งเป็นประเด็นที่ควรได้รับการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคต

อภิปรายผล

โรคเบาหวานจัดเป็นโรคในกลุ่มโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง (Non-communicable diseases; NCDs) ที่มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องทั่วโลก โดยมีความเกี่ยวข้องกับทั้งปัจจัยทางพันธุกรรม พฤติกรรมการดำเนินชีวิต และความผิดปกติของกระบวนการเผาผลาญที่ส่งผลให้การทำงานของอินซูลินบกพร่อง ภาวะดังกล่าวนำไปสู่ระดับน้ำตาลในเลือดสูงเรื้อรัง (Jameson, 2010) ซึ่งส่งผลกระทบต่อหลายระบบของร่างกาย โดยเฉพาะกระบวนการซ่อมแซมเนื้อเยื่อ การทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน และการหายของแผลที่ล่าช้า (Chrcanovic et al., 2014) ปัจจัยเหล่านี้มีความสำคัญทางคลินิกในงานรากฟันเทียม เนื่องจากอาจรบกวนกระบวนการยึดติดระหว่างกระดูกกับผิวรากฟันเทียมซึ่งเป็นพื้นฐานของความสำเร็จในการรักษา

การศึกษานี้ได้จำลองสภาวะน้ำตาลสูงในหลอดทดลองโดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 25 mmol/L ซึ่งเป็นระดับที่สูงกว่าค่าปกติและสอดคล้องกับภาวะน้ำตาลในเลือดที่ควบคุมได้ไม่ดีในผู้ป่วยเบาหวาน ผลการทดลองพบว่าระดับน้ำตาลกลูโคสดังกล่าวไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์และไม่ส่งผลต่อความมีชีวิตของเซลล์สร้างกระดูกบนพื้นผิวไททาเนียมภายในระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ผลลัพธ์นี้ชี้ให้เห็นว่า ภาวะน้ำตาลสูงเพียงอย่างเดียวในระยะเวลาสั้นอาจยังไม่เพียงพอที่จะเหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติของเซลล์สร้างกระดูกในด้านการอยู่รอด ผลการศึกษาสอดคล้องกับแนวคิดที่ว่าปัญหาของการหายของกระดูกในผู้ป่วยเบาหวานมิได้เกิดจากการตายของเซลล์โดยตรง

อินทิกริน (Integrin) เป็นหนึ่งในโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการยึดเกาะของเซลล์ (adhesion molecules) ซึ่งมีลักษณะเด่นคือความสามารถในการจับกับลิแกนด์จำเพาะได้อย่างเลือกจำเพาะ อินทิกรินเป็นไกลโคโปรตีนที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยชนิดแอลฟา (α) 16 ชนิด และหน่วยย่อยชนิดเบตา (β) 8 ชนิด ซึ่งสามารถจับคู่กันเกิดได้ทั้งหมด 22 รูปแบบ (Khalili & Ahmad, 2015) การแสดงออกของอินทิกรินมีความจำเพาะสูง โดยขึ้นอยู่กับชนิดของพื้นผิว (Sinha & Tuan, 1996) ชนิดของเซลล์ (Saito et al., 1994) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า การขาดตัวรับอินทิกรินชนิด $\alpha_5\beta_1$ ส่งผลให้ความสามารถในการยึดเกาะของเซลล์สร้างกระดูกต่อพื้นผิวโลหะไททาเนียมลดลง (Gronowicz & McCarthy, 1996)

นอกจากนี้จากการที่ผ่านมาพบว่าผู้ป่วยเบาหวานมักต้องการระยะเวลาการยึดติดของกระดูกกับรากฟันเทียมและการหายของแผลนานกว่าบุคคลทั่วไป ซึ่งสะท้อนถึงประสิทธิภาพของกระบวนการยึดเกาะและการซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่ลดลง (Ghiraldini et al., 2016) ดังนั้นในเชิงกลไกจึงคาดว่าการแสดงออกของโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการยึดเกาะ เช่น อินทิกริน α_5 และ β_1 ควรมีแนวโน้มลดลงภายใต้สภาวะน้ำตาลสูง อย่างไรก็ตามผลการศึกษานี้กลับไม่พบการลดลงดังกล่าวและยังสังเกตแนวโน้มของการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นเล็กน้อย ผลลัพธ์ที่ไม่สอดคล้องกับสมมติฐานนี้อาจบ่งชี้ว่า ระดับน้ำตาลกลูโคสที่สูงเพียงอย่างเดียวในแบบจำลองระยะสั้นยังไม่ใช่ปัจจัยหลักที่ทำให้การยึดเกาะของเซลล์สร้างกระดูกบกพร่อง แต่ความผิดปกติที่พบในผู้ป่วยเบาหวานอาจเกิดจากผลสะสมของปัจจัยทางพยาธิสรีรวิทยาอื่นร่วมด้วย หรือจากการสัมผัสภาวะน้ำตาลสูงเป็นระยะเวลานาน ซึ่งไม่สามารถจำลองได้อย่างครบถ้วนในสภาวะการทดลองครั้งนี้ นอกจากนี้ความบกพร่องของการยึดเกาะอาจไม่ได้เกิดผ่านอินทิกรินชนิด $\alpha_5\beta_1$ แต่อาจเกี่ยวข้องกับอินทิกรินชนิดอื่น ๆ รวมไปถึงกระบวนการทางชีววิทยาด้านอื่นของเซลล์ เช่น กระบวนการเปลี่ยนสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก (osteogenic differentiation) และการสะสมแร่แคลเซียม (calcification) ซึ่งล้วนมีบทบาทสำคัญต่อการสร้างกระดูกใหม่และความสำเร็จของการยึดติดของรากฟันเทียมในผู้ป่วยเบาหวาน

สรุปได้ว่า จากผลการศึกษานี้ภาวะน้ำตาลกลูโคสสูงในระยะเวลาสั้นไม่ส่งผลต่อความมีชีวิตของเซลล์สร้างกระดูกและไม่ทำให้การแสดงออกของอินทิกริน α_5 และ β_1 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ จึงอาจสะท้อนว่าระดับน้ำตาลที่สูงเพียงอย่างเดียวภายใต้สภาวะการทดลองนี้ยังไม่เพียงพอที่จะเหนี่ยวนำให้เกิดความเป็นความบกพร่องของการยึดเกาะผ่านอินทิกริล α_5 และ β_1 รวมถึงก่อให้เกิดความเป็นพิษของเซลล์สร้างกระดูกบนพื้นผิวไททาเนียม

ข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้เป็นการทดลองในหลอดทดลองซึ่งมีข้อจำกัดในการจำลองสภาวะทางชีวภาพของร่างกายมนุษย์ ระยะเวลาการสัมผัสน้ำตาลกลูโคสที่สั้น และประเมินเพียงความมีชีวิตของเซลล์ร่วมกับการแสดงออกของยีนอินทิกริน α_5 และ β_1 ซึ่งเป็นเพียงตัวแทนของตัวรับการยึดเกาะบางชนิดเท่านั้น ดังนั้นการศึกษาในอนาคตควรพิจารณาประเมินอินทิกรินชนิดอื่นเพิ่มเติมเพื่อให้เข้าใจกลไกการยึดเกาะของเซลล์ได้อย่างครอบคลุมยิ่งขึ้น และการศึกษาดังกล่าวยังไม่ครอบคลุมถึงการทำงานเชิงหน้าที่ของเซลล์สร้างกระดูกอื่น ๆ เช่น กระบวนการเปลี่ยนสภาพเป็นเซลล์กระดูก (osteogenic differentiation) และการสะสมแร่แคลเซียม (calcification) ดังนั้น การศึกษาในอนาคตควรพิจารณาใช้แบบจำลองที่มีระยะเวลาการกระตุ้นยาวนานขึ้น ร่วมกับการเพิ่มปัจจัยทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับพยาธิสรีรวิทยาของโรคเบาหวานเพื่อให้เข้าใจผลของภาวะน้ำตาลสูงต่อกระบวนการยึดเกาะกระดูกกับรากฟันเทียมได้อย่างรอบด้านและใกล้เคียงสถานการณ์ทางคลินิกมากยิ่งขึ้น การศึกษานี้เป็นการศึกษานำร่องเพื่อสำรวจแนวโน้มของ

ผลระดับน้ำตาลกลูโคสต่อกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการยึดติดของกระดูกและรากฟันเทียม ทั้งนี้ในการศึกษายังมีข้อจำกัดเรื่องจำนวนกลุ่มตัวอย่าง ครั้งต่อไปควรเพิ่มขนาดตัวอย่างของการศึกษา (sample size) ให้ผลที่ได้มีความน่าเชื่อถือและสามารถเป็นตัวแทนของประชากรได้ดียิ่งขึ้นด้วย องค์ความรู้ที่ได้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการออกแบบการศึกษาที่มีความซับซ้อนมากขึ้นในอนาคต เช่น การศึกษาผลของการสัมผัสระดับน้ำตาลสูงในระยะยาว หรือการใช้แบบจำลองที่เลียนแบบสภาวะเบาหวานจริง เพื่อสนับสนุนการพัฒนาแนวทางการรักษาและเพิ่มประสิทธิภาพของการรักษาด้วยรากฟันเทียมในผู้ป่วยที่มีโรคทางระบบต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Anantanasuwong, D. (2021). Population Ageing in Thailand: Critical Issues in the Twenty-First Century. In P. Narot & N. Kiettikunwong (Eds.), *Education for the Elderly in the Asia Pacific* (pp. 31-56). Springer Nature Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-16-3326-3_3

Chakraborty, N., Almudarris, B. A., Gautam, P., Laddha, R., Giri, T. K., & Patel, V. D. (2024). Patient Satisfaction and Quality of Life Outcomes Following Dental Implant Placement. *J Pharm Bioallied Sci,* 16(Suppl 4), S3338-s3340. https://doi.org/10.4103/jpbs.jpbs_831_24

Chrcanovic, B. R., Albrektsson, T., & Wennerberg, A. (2014). Diabetes and oral implant failure: a systematic review. *J Dent Res,* 93(9), 859-867. https://doi.org/10.1177/0022034514538820

Della Terra Mouco Garrido, B., Pereira, P. S. S., Foloni, K., Pegoraro, H. D., Souza, I. R., Bastos, J. R. M., Foratori-Júnior, G. A., Yamauti, M., Ferreira, R. C., & Bastos, R. S. (2025). Tooth Loss, Nutrition, and Oral Health-Related Quality of Life in Older Adults: Evidence from a Structural Equation Model. *Int J Environ Res Public Health,* 22(12). https://doi.org/10.3390/ijerph22121793

Duncan, B. B., Magliano, D. J., & Boyko, E. J. (2025). IDF Diabetes Atlas 11th edition 2025: global prevalence and projections for 2050. *Nephrol Dial Transplant,* 41(1), 7-9. https://doi.org/10.1093/ndt/gfaf177

Fitri, A. R., Pavasant, P., Chamni, S., & Sumrejkanchanakij, P. (2018). Asiaticoside induces osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells through the Wnt pathway. *J Periodontol,* 89(5), 596-605. https://doi.org/10.1002/jper.17-0471

Ghiraldini, B., Conte, A., Casarin, R. C., Casati, M. Z., Pimentel, S. P., Cirano, F. R., & Ribeiro, F. V. (2016). Influence of Glycemic Control on Peri-Implant Bone Healing: 12-Month Outcomes of Local Release of Bone-Related Factors and Implant Stabilization in Type 2 Diabetics. *Clin Implant Dent Relat Res,* 18(4), 801-809. https://doi.org/10.1111/cid.12339

Gronowicz, G., & McCarthy, M. B. (1996). Response of human osteoblasts to implant materials: integrin-mediated adhesion. *J Orthop Res,* 14(6), 878-887. https://doi.org/10.1002/jor.1100140606

Henry, P. J. (2002). A review of guidelines for implant rehabilitation of the edentulous maxilla. *The Journal of Prosthetic Dentistry,* 87(3), 281-288. https://doi.org/https://doi.org/10.1067/mpr.2002.122775

Jameson, J. L. (2010). *Harrison's endocrinology* (2nd ed.). McGraw-Hill Medical.

Khalili, A. A., & Ahmad, M. R. (2015). A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications. *Int J Mol Sci,* 16(8), 18149-18184. https://doi.org/10.3390/ijms160818149

Łosiewicz, B., Osak, P., Nowiǹska, D., & Maszybrocka, J. (2025). Developments in Dental Implant Surface Modification. *Coatings,* 15(1), 109. https://www.mdpi.com/2079-6412/15/1/109

Magliano, D. J., Boyko, E. J., & committee, I. D. F. D. A. t. e. s. (2021). IDF Diabetes Atlas. In *Idf diabetes atlas.* International Diabetes Federation

© International Diabetes Federation, 2021.

Miranda, C., Giner, M., Montoya, M. J., Vázquez, M. A., Miranda, M. J., & Pérez-Cano, R. (2016). Influence of high glucose and advanced glycation end-products (ages) levels in human osteoblast-like cells gene expression. *BMC Musculoskeletal Disorders,* 17(1), 377. https://doi.org/10.1186/s12891-016-1228-z

Osathanon, T., Bespinyowong, K., Arksornnukit, M., Takahashi, H., & Pavasant, P. (2011). Human osteoblast-like cell spreading and proliferation on Ti-6Al-7Nb surfaces of varying roughness. *J Oral Sci,* 53(1), 23-30. https://doi.org/10.2334/josnusd.53.23

Saito, T., Albelda, S. M., & Brighton, C. T. (1994). Identification of integrin receptors on cultured human bone cells. *J Orthop Res,* 12(3), 384-394. https://doi.org/10.1002/jor.1100120311

Sinha, R. K., & Tuan, R. S. (1996). Regulation of human osteoblast integrin expression by orthopedic implant materials. *Bone,* 18(5), 451-457. https://doi.org/10.1016/8756-3282(96)00044-0