

APPENDICES

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

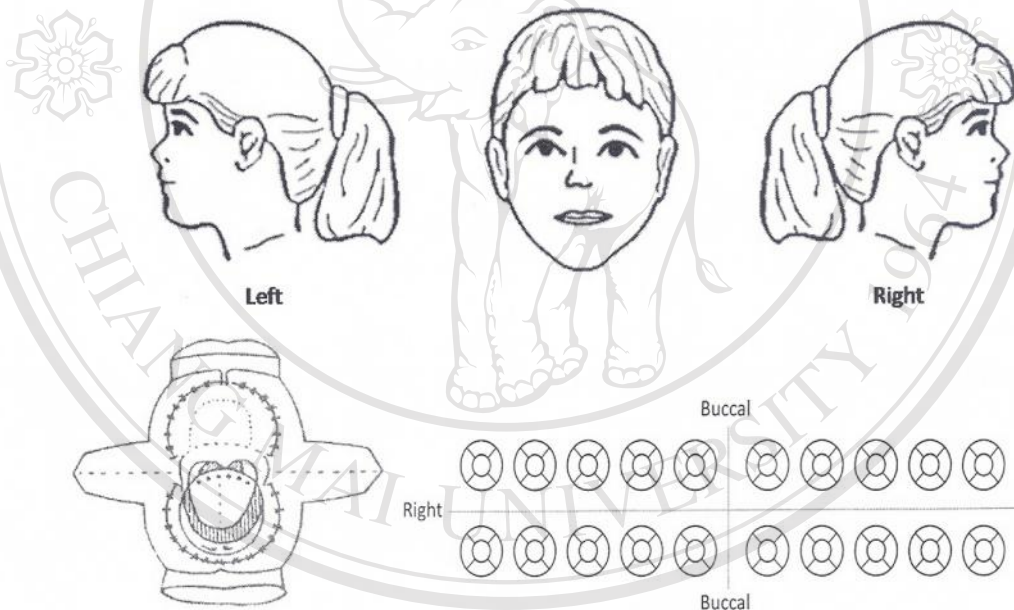
Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved

APPENDIX A

Dental Pain Assessment Form

- Date _____
1. Name _____ HN _____
 Date of Birth ____/____/____ Age ____ years ____ months
2. Medical condition healthy
 complicated _____
3. Chief complaint _____
4. History of pain _____



- ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 Copyright © by Chiang Mai University
 All rights reserved
- Does the child have pain today? yes no
 - How long did the child suffer from pain? _____
 - What stimulate pain?
 - Food impaction Chewing Nothing Other _____
 - Nocturnal pain yes no
 - Crying for pain yes no
 - Duration of pain continuous intermittent
 - When was the last pain? _____

➤ Treatment prior to this visit yes _____ no

➤ Other _____

5. Clinical appearance

➤ Dental caries yes, location _____ no

➤ Swelling yes, area _____ no

➤ Gumboil yes, size _____ area _____ no

➤ Mobility yes no

➤ Fistula yes no

➤ Pain on percussion yes no

6. Radiographic findings

➤ Root resorption

Tooth	Root	Level of resorption			
		No resorption	<1/3	1/3-2/3	>2/3
Upper # _____	Mesiobuccal				
	Distobuccal				
	Palatal				
Lower # _____	Mesial				
	Distal				

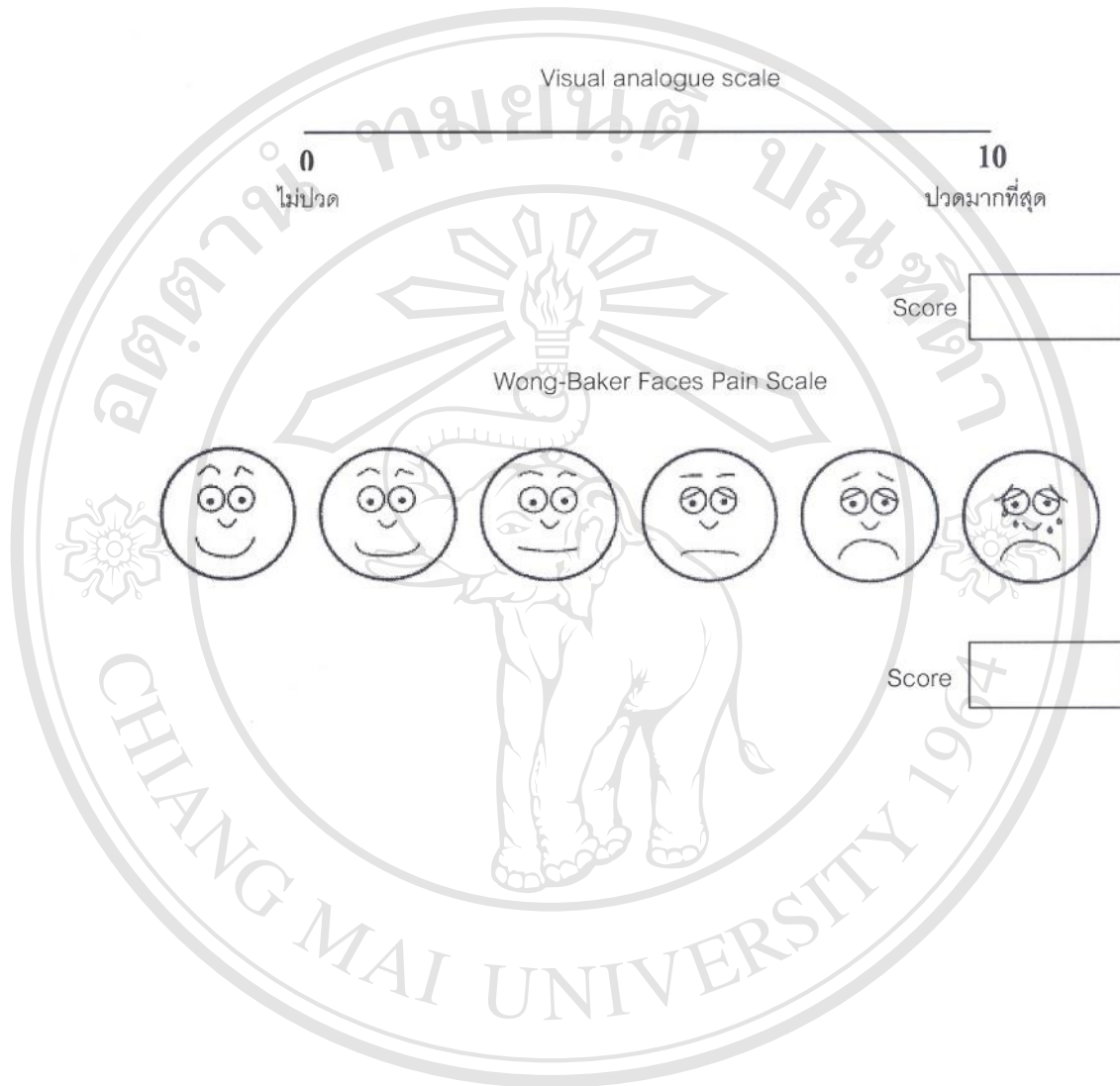
➤ Radiolucency no at furcation size _____ at apex size _____

➤ Other _____

7. Diagnosis _____

8. Treatment _____

The past severest pain



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

APPENDIX B



บันทึกข้อความ

ส่วนราชการ ภาควิชาทันตกรรมจัดฟันและทันตกรรมสำหรับเด็ก โทร.053-944460

ที่ ศธ6393(3).4.2/๑3๑

วันที่ 2๐ กันยายน 2553

เรื่อง ขอยื่นแบบรายละเอียดข้อมูลเสนอโครงการวิจัย

เรียน ประธานคณะกรรมการพิทักษ์สิทธิ์สวัสดิภาพและป้องกันภัยอันตรายของผู้ถูกวิจัย

ตามที่อาจารย์ทันตแพทย์หญิง อุบลวรรณ ธีระพิบูลย์ ได้ยื่นคำร้องขอคำรับรองจากคณะกรรมการพิทักษ์สิทธิ์ ในโครงการวิจัยเรื่อง “การตอบสนองของเส้นใยประสาทฟันต่อการอักเสบของโพรงประสาทฟันและอาการปวดฟันในฟันน้ำนมมนุษย์” และได้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการพิทักษ์สิทธิ์แล้วนั้น

บัดนี้ข้าพเจ้า ทพญ.อมรรัตน์ สุวรรณชัย ได้จัดทำโครงร่างงานวิจัยเรื่อง “การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ $Na_v1.8$ และ $Na_v1.9$ ในเนื้อเยื่อในของฟันน้ำนมมนุษย์ที่มีอาการปวด” โดยมี รศ.ทพญ.ดร.สิริพร ฉัตรทิพากร เป็นอาจารย์ที่ปรึกษา การศึกษานี้ใช้กลุ่มตัวอย่างเนื้อเยื่อในของฟันน้ำนมมนุษย์กลุ่มเดียวกันกับงานวิจัยของ อาจารย์ทันตแพทย์หญิง อุบลวรรณ ธีระพิบูลย์ โดยได้เพิ่มกลุ่มตัวอย่างเนื้อเยื่อในของฟันแท้มนุษย์ที่มีการอักเสบเพื่อใช้เป็น positive control ดังรายละเอียดตามโครงร่างงานวิจัยและแบบคำร้องขอคำรับรองจากคณะกรรมการพิทักษ์สิทธิ์ ที่แนบมาด้วยนี้

จึงเรียนมาเพื่อโปรดพิจารณาและดำเนินการในส่วนที่เกี่ยวข้องต่อไป จักเป็นพระคุณยิ่ง

(นางสาวอมรรัตน์ สุวรรณชัย)

นักศึกษาปริญญาโท

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright © by Chiang Mai University

(รศ.ทพญ.ดร.สิริพร ฉัตรทิพากร)

อาจารย์ที่ปรึกษา

All rights reserved

๒๐๑๖/๒

(ผศ.ทพญ.มารศรี ชัยวรวิทย์กุล)

หัวหน้าภาควิชาทันตกรรมจัดฟัน

และทันตกรรมสำหรับเด็ก



เอกสารเลขที่...29./2010....

เอกสารรับรองโครงการศึกษาวิจัยในมนุษย์

โดย

คณะกรรมการพิทักษ์สิทธิสวัสดิภาพและป้องกันอันตรายของผู้ถูกวิจัย

คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ขอรับรองว่า

โครงการวิจัย :

การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ $Na_v1.8$ และ $Na_v1.8$ ในเนื้อเยื่อ
ในของฟันน้ำนมมนุษย์ที่มีอาการปวด

หัวหน้าโครงการวิจัย :

ทันตแพทย์หญิง อมรรัตน์ สุวรรณชัย

สังกัด :

คณะทันตแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ได้รับการพิจารณาโครงการแล้ว เห็นว่าไม่ขัดต่อสิทธิสวัสดิภาพ และก่อให้เกิดอันตราย
แก่ผู้ถูกวิจัยแต่ประการใด

จึงเห็นสมควรให้ดำเนินการวิจัยในขอบข่ายของโครงการที่เสนอได้

ณ วันที่ ๒๙ กันยายน ๒๕๕๓

(ลงชื่อ).....

(ศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร. อะนัม เอี่ยมอรุณ)

ประธานคณะกรรมการพิทักษ์สิทธิสวัสดิภาพและป้องกันอันตรายของผู้ถูกวิจัย

(ลงชื่อ).....

(รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ทองนารด คำใจ)

คณบดี คณะทันตแพทยศาสตร์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



NO. ...29./2010.....

CERTIFICATE OF ETHICAL CLEARANCE

**Human Experimentation Committee
Faculty of dentistry
Chiang Mai University
Chiang Mai, Thailand**

Title of project or study : **Changes in the expression of Na_v1.8 and Na_v1.9 in painful human primary tooth pulp**

Principal Investigator : **Amornrat Suwanchai**

Participating Institution (S) : **Faculty of Dentistry
Chiang Mai University
Chiang Mai, Thailand**

Approved by the Faculty of Dentistry Human Experimentation Committee : September 29 , 2010

Signature of the Chairman of the Committee :

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

.....
(Anak Iamaroon ,D.D.S.,M.S.,Ph.D.)

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved

Countersigned :

.....
(Thongnard Kumchai , D.D.S.)
Dean ; Faculty of Dentistry

APPENDIX C

ใบยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย (Informed consent form)

1. ชื่อโครงการวิจัย เรื่อง การตอบสนองของเส้นใยประสาทต่อการอักเสบของโพรงประสาทฟันและอาการปวดฟัน

ท่านกำลังถูกทาบทามเพื่อเข้าร่วมในโครงการวิจัยเรื่องดังกล่าว
ตัดสินใจว่าจะเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ เราต้องการจะอธิบายให้
วิจัยนี้ อันตรายที่ท่านจะได้รับ และสิ่งที่เราคาดหวังจากท่าน เมื่อท่านตัดสินใจ
โครงการวิจัย

เมื่อท่านตกลงใจที่จะเข้าร่วมโครงการ เราขอให้ท่านลงลายมือชื่อ
บุคคลซึ่งเห็น

การตกลงใจเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ ขึ้นอยู่กับความสมัครใจของท่าน
อาจตัดสินใจที่จะไม่เข้าร่วมโครงการ หรือถอนตัวออกจากโครงการเวลา
สูญเสียประโยชน์ของท่านเกี่ยวกับการดูแล

2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อนำเนื้อเยื่อในฟัน ไปศึกษาวิจัยตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของ
การอักเสบ เยื่อในและมีอาการปวดเทียบกับฟันที่ไม่มีอาการอักเสบของเนื้อเยื่อ
อาการปวด

3. วิธีการ

เมื่อท่านตกลงใจเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ ภายหลังจากที่ท่านได้ลงลายมือชื่อ
ร่วมโครงการแล้ว ท่านจะถูกสอบถามถึงประวัติของอาการปวดฟันและท่านจะต้องทำการประเมิน
ระดับความเจ็บปวดของฟันซึ่งจะทำการรักษาทั้งระดับความเจ็บ
และระดับความเจ็บปวดในปัจจุบัน รวมทั้งทำการปร
ทัศน์กรรม จากนั้นท่านจะได้รับการถอนฟันหรือรักษา
การแพทย์คือ

- ฟันแท้เป็นการถอนเพื่อการ
- ฟันน้ำนมถอนเนื่องจากฟันไม่สามารถหลุดได้เอง หรือผุมากจน
บรูณะได้ หรือผู้ปกครองปฏิเสธการรักษา
- การรักษาประสาทฟันน้ำนมเป็นการรักษาเนื่องมาจากมีกา
ฟัน

การรักษาทำโดยทันตแพทย์เจ้าของไข้ ซึ่งจะเป็นผู้ดูแลภาวะแทรกซ้อนที่
การถอนฟันหรือรักษาประสาทฟัน

ทันตแพทย์จะทำการเก็บเนื้อเยื่อในของฟันที่ถูกถอนออก
รักษาประสาทฟันน้ำนมเพื่อนำไปทำการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนต่อไป
ความเกี่ยวเนื่องหรือมีผลกระทบต่อผู้เข้าร่วมโครงการ

4. ความเสี่ยงหรือความไม่สบายต่างๆที่อาจเกิดขึ้น

เหมือนกับการถอนฟันหรือการรักษาประสาทฟันน้ำ

ความเสี่ยงที่เกิดขึ้นจาก

- อาจมีแผลที่เนื้อเยื่อ เช่น กระทบแก้ม ลิ้น และริมฝีปากที่เกิดจากการกัด
เนื่องมาจากฤทธิ์ของยา
- อาจมีอันตรายเกิดขึ้นต่อหน่อฟันแท้
- การแพ้ยา
- การติดเชื้อภายหลังการถอน

ความเสี่ยงที่เกิดขึ้นจากการรักษาประ

- อาจมีแผลที่เนื้อเยื่อ เช่น กระทบแก้ม ลิ้น และริมฝีปากที่เกิดจากการกัด
เนื่องมาจากฤทธิ์ของยา
- ความล้มเหลวอันเนื่องมาจากการรักษาประ

5. ประโยชน์ที่จึ

ท่านจะได้รับแรงสึฟัน 1 คู่ และผลจากการศึกษานี้จะเป็นประโยชน์
เด็กที่มีอาการปวดฟันต่า

6. ค่าใช้จ่าย

ท่านต้องเสียค่าใช้จ่ายในการถอนฟันหรือรักษาประ

7. การได้รับบาดเจ็บที่เกี่ยวข้องกับ

หากท่านได้รับบาดเจ็บจากการเข้าร่วมโครงการ ท่านจะได้รับการดูแลรักษาโดยทันตแพทย์เจ้าของไข้ตามความเหมาะสม

8. การรักษาความลับ

ข้อมูลส่วนตัวของท่านจะไม่ได้รับการเปิดเผยโดยไม่ได้รับอนุญาตจากท่านก่อน

9. บุคคลที่ท่านสามารถติดต่อได้เมื่อมีปัญหาหรือคำถามเกี่ยวกับ

อาจารย์ ทันตแพทย์หญิง อুবลวรรณ ชีระพิบูลย์

สาขาทันตกรรมสำหรับเด็ก ภาควิชาทันตกรรมจัดฟันและทันตกรรมสำหรับเด็ก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

โทร (053) 944460-1

ทันตแพทย์หญิง อมรรัตน์ สุวรรณชัย

สาขาทันตกรรมสำหรับเด็ก ภาควิชาทันตกรรมจัดฟันและทันตกรรมสำหรับเด็ก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

โทร (053) 944461

หากท่านได้อ่านใบยินยอม หรือมีผู้อ่านและอธิบายใบยินยอมนี้ให้ และท่านเข้าใจ และสมัครใจที่จะเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ กรุณาลงลายมือชื่อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 Copyright © by Chiang Mai University
 All rights reserved

(.....)
 (.....)

วัน / เดือน / ปี

ชื่ออาสาสมัครหรือผู้ปกครอง
 (กรณีทำอาสาสมัครยังไม่บรรลุนิติภาวะ)

(.....)
 (.....)

วัน / เดือน / ปี

APPENDIX D

เอกสารคำแนะนำแก่ผู้ถูกวิจัยหรือผู้อนุญาต (Patient Information Sheet)

ชื่อโครงการวิจัย การตอบสนองของเส้นใยประสาทพินต่อการอักเสบของโพรงประสาทพิน และอาการปวดพินในพิน

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อนำเนื้อเยื่อในพินไปศึกษาวิจัยตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของปริมาณโปรตีนของเนื้อเยื่อในและมีอาการปวดเทียบกับพินที่ สบของเนื้อเยื่อในและไม่มีอาการ

ข้อมูลเกี่ยวกับการวิจัยโดยย่อ

การวิจัยนี้เป็นการนำเนื้อเยื่อจากพินที่จำเป็นต้องได้รับการรักษาเนื้อเยื่อในของพินน้ำมันไปทำการศึกษาก่อนการเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีน พินน้ำมันที่มี อาการของเนื้อเยื่อในและไม่สามารถบูรณะได้ หรือบูรณะได้แต่ผู้เนื้อเยื่อใน จำเป็นต้องถอนออก หรือพินน้ำมันที่มีการอักเสบของเนื้อเยื่อในและได้รับการรักษาเนื้อเยื่อในหรือพินน้ำมันที่ไม่สามารถหลุดได้เองตามธรรมชาติ หรือพินกราม ่อนเพื่อการจัดพิน โหลังจากการรักษา ทันตแพทย์เจ้าของไข้จะเป็นผู้ดูแลภาวะแท

ทันตแพทย์จะเป็นผู้ขอรับบริจาคพินดังกล่าวเพื่อจุดประสงค์ของห้องปฏิบัติการ ไม่มีความเกี่ยวเนื่องหรือมีผลกระทบต่อผู้เข้าร่วม วจใด

วิธีการโดยย่อในการทำวิจัย คือ หลังจากการถอนพิน ทันตแพทย์จะทำการแบ่งพินออกเป็นสองส่วนด้วยเครื่องกรอพินเพื่อทำการเก็บเนื้อเยื่อใน โดยเก็บไว้ในหลอดข 1.5 มิลลิลิตรและนำไปแช่ไว้ในไนโตรเจนเหลวโดยทันที หากพินชิ้นนั้นต้องการรักษาเนื้อเยื่อในพินน้ำมัน หลังจากทนนอกแล้วเนื้อเยื่อในจะถูกนำมาเก็บไว้ในหลอดข 1.5 มิลลิลิตรและแช่ไว้ในไนโตรเจนเหลวโดยทันทีเช่นกัน ทั้งนี้เพื่อลดการสลายตัวของโปรตีน จากนั้นจะทำการจัดเก็บ นที่เก็บได้ไว้ในตู้แช่ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสเพื่อรอการศึกษาหาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ โปรตีนของเนื้อเยื่อในและมีอาการปวดในห้องปฏิบัติการต่อไป เมื่อได้ข้อมูลแล้วจึงนำมาวัดค่าและสรุป

ขอแสดงความนับถือ

อ.ทพญ.อุบลวรรณ ชีระพิบูลย์ (ผู้วิจัย)

APPENDIX E

WESTERN BLOT PROTOCOL

Equipment Required for Western blotting

- Western blotting setup
 - Gel electrophoresis chambers
 - Membrane transferring chamber
 - Power supplies
- Polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes
- Water bath
- Orbital shaker
- Homogenizer
- Vibratome

Solutions for SDS-PAGE Western Blotting

- 1.5M Tris; 0.4% SDS; pH to 8.8 with HCl (500ml)
 - SDS 2.0 g
 - Tris 90.9 g
 - ddH₂O 300 mlAdjust pH to 8.8 and add more ddH₂O to 500 ml
- 0.5M Tris; 0.4% SDS; pH to 6.8 with HCl (500 ml)
 - SDS 2.0 g

– Tris 30.25 g

– ddH₂O 300 ml

Adjust pH to 8.8 and add more ddH₂O to 500 ml

- 2X Sample Buffer

– Glycerol 2.0 ml

– SDS 6.0 g

– Tris 1.4 g

Adjust to 100 ml with ddH₂O

- Loading buffer

– 100 µl of 10% 20-mercaptoethanol

– 900 µl of 2X sample buffer

– 5 µl of 8% bromophenol blue in ethanol

- 10X Running Buffer (1L)

– Tris 30.3 g

– Glycine 144.2 g

– SDS 10.0g

Adjust to 1,000 ml with ddH₂O

- 10X Transfer Buffer (1L)

– Tris 30.3 g

– Glycine 144.2 g

Add 100 ml of 10X Blotting Buffer to 200 ml of methanol and 700 ml

of ddH₂O to make 1L of 1X Blotting Buffer

- 10X TBST

- Tris 24.2 g
- NaCl 80 g

To make 1X TBST, add 100 ml of 10X TBST and 1 ml of Tween20 to 900 ml of ddH₂O

- Blocking solution

- 100 ml of 10X TBST
- 900 ml of ddH₂O
- 5% non-fat dry milk

Preparation of SDS-PAGE

- 10% Separating gels (2 gels)

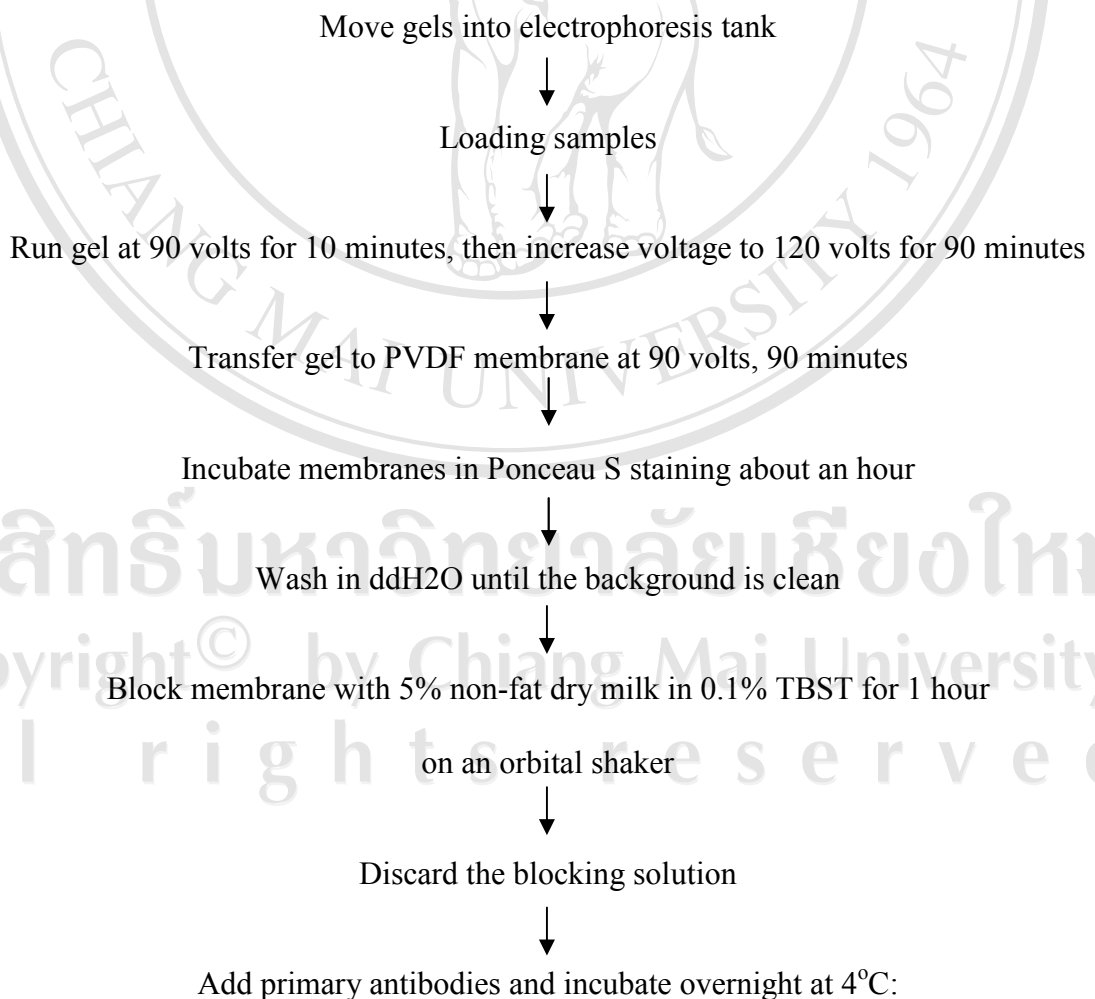
- ddH₂O 5 ml
- 30% Acrylamide 4 ml
- 1.5M Tris-HCl (pH8.8) 3 ml
- 10% Ammonium persulfate 60 μ l
- TEMED 15 μ l

- 4% Stacking gels (2 gels)

- ddH₂O 3.5 ml
- 30% Acrylamide 1 ml
- 0.5M Tris-HCl (pH6.8) 1.5 ml
- 10% Ammonium persulfate 50 μ l
- TEMED 5 μ l

- After the separating gel reagent is poured, a small amount of isobutanol should be added on top of the gel.
- Leave separating gel about 30 min
- After the gel is set, blot the isobutanol, wash with ddH₂O, and blot it.
- Add stacking solution on top of the separating gel, and place the well-forming comb very quickly, because stacking solution can set in 30 seconds after addition of 10% Ammonium persulfate and TEMED.
- Leave stacking gel about 15 min and pull off the well-forming comb gently

Immunoblotting



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

- 1:200 of rabbit polyclonal anti-sodium channel $\text{Na}_v1.8$ in 10% non-fat dry milk in 0.1% TBST
- 1:200 of rabbit polyclonal anti-sodium channel $\text{Na}_v1.9$ in 5% bovine serum albumin in 0.1% TBST
- 1:200 of rabbit polyclonal antibody to MMP-9 in 1% non-fat dry milk in 0.1% TBST
- 1:400 of rabbit polyclonal antibody to PGP9.5 in 10% non-fat dry milk in 0.1% TBST
- 1:1,000 of rabbit monoclonal antibody to β -actin in 0.1% non-fat dry milk in 0.1% TBST

↓
Wash the membranes with 0.1% TBST 6x5 minutes

↓
Add 1:5,000 of goat anti-rabbit antibody conjugate horseradish peroxidase in 0.1% TBST for 1 hour on an orbital shaker

↓
Wash the membranes with 0.1% TBST 6x5 minutes

ECL exposure to film

Mix reagent A and Reagent B 1:1

↓
Pipette the mixed reagent on to the membrane

↓
Incubate for 1 minute at room temperature

↓
Place the membrane within the plastic wrap and gently smooth out air bubbles

↓

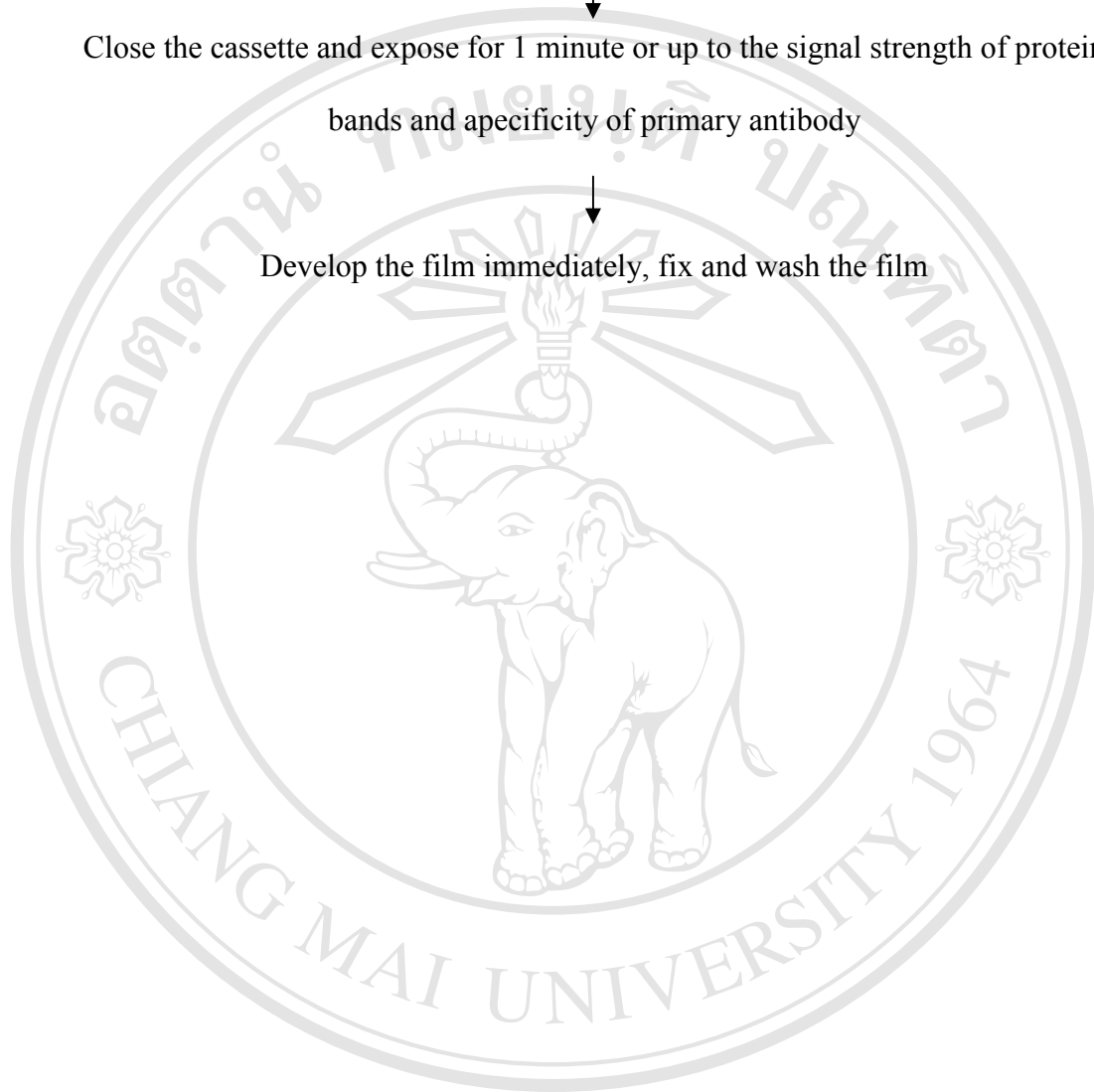
Place the wrap blots side up on an x-ray film cassette



Close the cassette and expose for 1 minute or up to the signal strength of protein bands and apecificity of primary antibody



Develop the film immediately, fix and wash the film



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved

CURRICULUM VITAE

Name Miss Amornrat Suwanchai

Date of Birth 9 May, 1982

Education

1989-1995 Primary school at Mahachai Christian Wittaya School

1995-1998 Grade 7-9 at Satee Wat Mahapruttaram School

1998-1999 Grade 10-11 at Triam Udom Suksa School

1999-2005 Doctor of Dental Surgery (D.D.S.), Faculty of
Dentistry, Chulalongkorn University

Working Experience

2005-2007 Dentist, Division of Public Health and Environment,
Kratumban Municipality

2007-2009 Dentist, Dental Department, Ekachai Hospital

Presentation at National Meeting

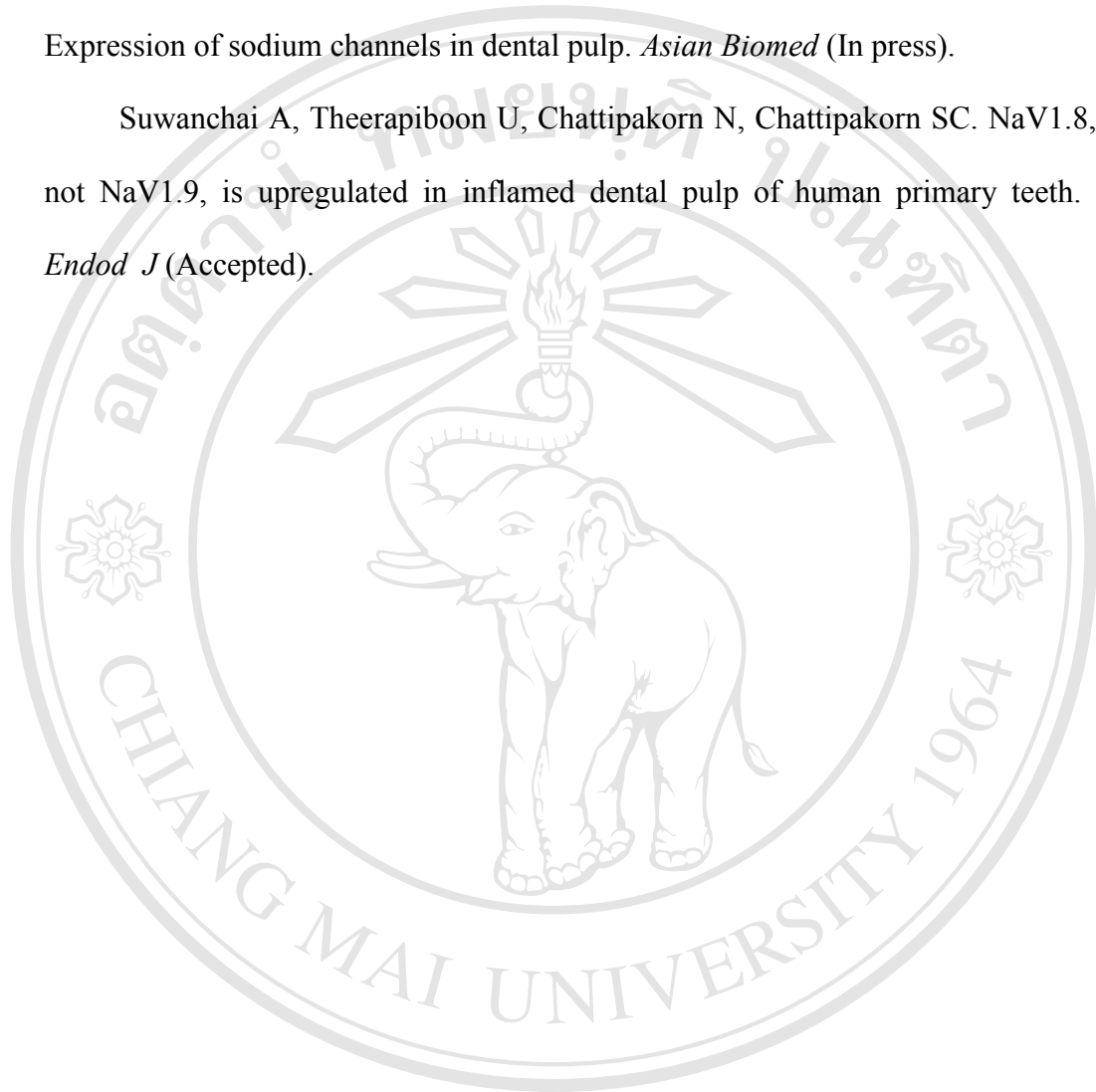
Suwanchai A, Theerapiboon U, Chattipakorn N, Chattipakorn SC (2011).

Quantification of $\text{Na}_V1.8$ in dental pulp of painful primary teeth in relation to pain sensation: A pilot study. The 21th National Graduate Research Conference, May 26, Bangkok, Thailand (Oral presentation).

Publication

Suwanchai A, Theerapiboon U, Chattipakorn N, Chattipakorn SC (2011).
Expression of sodium channels in dental pulp. *Asian Biomed* (In press).

Suwanchai A, Theerapiboon U, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. NaV1.8, but
not NaV1.9, is upregulated in inflamed dental pulp of human primary teeth. *Int
Endod J* (Accepted).



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved