ผลของวิธีการล้างคลองรากฟันต่อปริมาณทรานส์ฟอร์มมิงโกรทแฟคเตอร์-เบต้า1 ที่ปลดปล่อยจากผนังคลองรากฟัน

THE EFFECT OF IRRIGATION PROTOCOLS TO TRANSFORMING GROWTH FACTOR-β1 RELEASED FROM ROOT CANAL DENTIN

ชิดหทัย ว่องวิทย์เดชา

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2563

ผลของวิธีการล้างคลองรากฟันต่อปริมาณทรานส์ฟอร์มมิงโกรทแฟคเตอร์-เบต้า1 ที่ปลดปล่อยจากผนังคลองรากฟัน

ชิดหทัย ว่องวิทย์เดชา

ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาทันตกรรมคลินิก
คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2563
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

THE EFFECT OF IRRIGATION PROTOCOLS TO TRANSFORMING GROWTH FACTOR-β1 RELEASED FROM ROOT CANAL DENTIN

CHITHATHAI WONGWITDECHA

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of MASTER OF SCIENCE

(Clinical Dentistry)

Faculty of Dentistry, Srinakharinwirot University

2020

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

ผลของวิธีการล้างคลองรากฟันต่อปริมาณทรานส์ฟอร์มมิงโกรทแฟคเตอร์-เบต้า1

ที่ปลดปล่อยจากผนังคลองรากฟัน

ของ

ชิดหทัย ว่องวิทย์เดชา

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาทันตกรรมคลินิก

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิงชินาลัย ปิยะชน)

..... ประธาน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุทัยวรรณ อารยะตระกูลลิขิต)

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร.จารุมา ศักดิ์ดี)

ชื่อเรื่อง	ผลของวิธีการล้างคลองรากฟันต่อปริมาณทรานส์ฟอร์มมิงโกรทแฟคเตอร์-เบต้า1 ที่ปลดปล่อยจากผนังคลองรากฟัน
ผู้วิจัย	ชิดหทัย ว่องวิทย์เดชา
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2563
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ชินาลัย ปิยะชน

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบปริมาณทรานส์ฟอร์มมิงโกรทแฟคเตอร์-เบต้า1 (TGF-β1) ที่ปลดปล่อยออกมาจากผนังคลองรากฟันเมื่อล้างคลองรากฟันด้วยวิธีการที่ต่างกัน ทำการศึกษาในฟันกรามน้อยล่างคลองรากฟันเดียวจำนวน 21 ซี่ ซึ่งได้จากคนไข้ในช่วงอายุ 18-25 ปี ทำการจำลองลักษณะปลายรากฟันเปิด แล้วจึงแบ่งกลุ่มทดลองเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัวอย่างและมี 1 ตัวอย่างเป็นกลุ่มควบคุม โดยกลุ่มที่ 1 ล้างด้วยสารละลายอีดีทีเอร้อยละ 17 (20 มิลลิลิตร 5 นาที) และล้างตามด้วยน้ำเกลือ (5 มิลลิลิตร 1 นาที) กลุ่มที่ 2 ล้างด้วยสารละลายอีดีทีเอร้อยละ 17 ร่วมกับการใช้เออริเซฟ (20 มิลลิลิตร 5 นาที) และล้างตามด้วยน้ำเกลือ กลุ่มที่ 3 ล้างสารละลายอีดีทีเอร้อยละ 17 ร่วมกับการใช้เอ็กซ์พีเอนโดฟินิชเชอร์ (20 มิลลิลิตร 5 นาที) และล้างตามด้วยน้ำเกลือ (5 มิลลิลิตร 1 นาที) กลุ่มที่ 4 ล้างด้วยสารละลายอีดีทีเอร้อยละ 17 (20 มิลลิลิตร 5 นาที) ทำการเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงในคลองรากฟัน 20 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาหาปริมาณ TGF-β1 ด้วยวิธีอีไลซา วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวและการทดสอบทูคีย์ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ผลการศึกษาพบว่ากลุ่มที่ 4 มีการปลดปล่อย TGF-β1 มากที่สุด (1,186.77±280.97 pg/ml) มากกว่ากลุ่มที่ 1 (580.02±327.26 pg/ml) และกลุ่มที่ 3 (458.59±191.11 pg/ml) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มที่ 2 (897.09±270.94) สรุปผลได้ว่าวิธีการล้างคลองรากฟันที่ต่างกันส่งผลต่อปริมาณ TGF-β1 ที่ปลดปล่อยออกมาจากผนังคลองรากฟัน อย่างไรก็ตามการใช้อุปกรณ์เสริมระบบอัลตราโซนิกส์แบบไร้แรงร่วมด้วยขณะล้างด้วยสารละลายอีดีทีเอก่อนล้างตามด้วยน้ำเกลือจะช่วยส่งเสริมให้เกิดการปลดปล่อยของ TGF-β1 ได้ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการล้างด้วยสารละลายอีดีทีเอเพียงชนิดเดียว

คำสำคัญ : รีเจเนอเรทีฟ เอ็นโดดอนติกส์, โกรทแฟคเตอร์, ทรานส์ฟอร์มมิงโกรทแฟคเตอร์-เบต้า1, ระบบอัลตราโซนิกแบบไร้แรง, เอ็กซ์พีเอ็นโดฟินิชเชอร์, TGF-β1

Title	THE EFFECT OF IRRIGATION PROTOCOLS TO TRANSFORMING GROWTH FACTOR-β1 RELEASED FROM ROOT CANAL DENTIN
Author	CHITHATHAI WONGWITDECHA
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2020
Thesis Advisor	Assistant Professor CHINALAI PIYACHON

The objective of this study is to evaluate the effects of irrigation protocols to transforming growth factor-beta1 (TGF-β1) released from root canal dentin. The roots of 21 single canal mandibular premolars from 18- to 25-year-old patients were prepared to stimulate immature roots. The roots were divided into four irrigation protocol groups with five samples in each group and one negative control, as follows: (1) 17% EDTA (20ml, 5 mins) followed by NSS (5ml, 1min); (2) 17% EDTA with PUI activation (20ml, 5 mins) followed by NSS (5ml, 1min); (3) 17% EDTA with XP-endo Finisher (20ml, 5 mins) followed by NSS (5ml, 1min); and (4) 17% EDTA (20ml, 5 mins). The canals were dry, filled with culture medium and kept at 37 degrees Celsius for 24 hours. The supernatants were collected to measure TGF-β1 by ELISA. The data was statistically analyzed using One-Way ANOVA with Tukey Post hoc test at $P < 0.05$. The results showed that group four (1,186.77±280.97 pg/ml) had the highest mean TGF-β1 released which was statistically higher than group one (580.02±327.26 pg/ml) and group three (458.59±191.11 pg/ml) ($P < 0.05$) but not statistically higher than group two (897.09±270.94) ($P > 0.05$). In conclusion, irrigation protocols affected the releasing of TGF-β1 from root canal dentin. However, the irrigation of EDTA with PUI activation followed by NSS resulted in growth factor released which was not statistically different from only irrigation with EDTA.

Keyword : Regenerative endodontic, Growth factor, Transforming growth factor-beta1, Passive ultrasonic irrigation, XP-endo Finisher, TGF-β1

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับความอนุเคราะห์และความกรุณาเป็นอย่างสูงทั้งจากอาจารย์และบุคลากรในคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒมากมายหลายท่าน ต้องขอขอบคุณทุกท่านโดยเฉพาะอย่างยิ่งอาจารย์ทันตแพทย์หญิงพีรพร ทวีวัฒนไพศาล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ทันตแพทย์หญิง ชินาลัย ปิยะชน ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ ที่ได้ให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะหลายอย่างที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย อีกทั้งดูแลเอาใจใส่ทำให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์และสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณอาจารย์เจ้าหน้าที่และนิสิตบัณฑิตศึกษาของคลินิกทันตกรรมจัดฟัน ภาควิชาทันตกรรมสำหรับเด็กและทันตกรรมป้องกัน คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ทุกท่านที่ช่วยกรุณาเชิญชวนคนไข้ที่เข้าเกณฑ์การคัดเลือกให้เข้าร่วมโครงการวิจัย และเก็บฟันไว้ให้ใช้ในการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณอาจารย์ภาควิชาทันตกรรมอนุรักษ์และทันตกรรมประดิษฐ์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒทุกท่านที่ได้มอบความรู้ อบรมสั่งสอนและให้ความช่วยเหลือ รวมทั้งเจ้าหน้าที่คลินิกบัณฑิตศึกษาและเจ้าหน้าที่ภาควิชาทันตกรรมอนุรักษ์และทันตกรรมประดิษฐ์ ที่ให้ความช่วยเหลือในการจัดเตรียมสถานที่และอุปกรณ์ในการทำวิจัย รวมถึงอำนวยความสะดวกเรื่องเอกสารรวมถึงสถานที่หรือโปรแกรมออนไลน์ที่ใช้ในการสอบทุกครั้ง ถึงแม้จะมีการปิดการเรียนการสอนเนื่องจากสถานการณ์การระบาดของโควิด-19

ที่ขาดไม่ได้ต้องขอขอบพระคุณประธานและกรรมการในการสอบเค้าโครงและสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ทุกท่านที่ได้สละเวลามาให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะที่มีประโยชน์ช่วยเติมเต็มให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทพญ. อุทัยวรรณ อารยะตระกูลลิขิต ผู้ทรงคุณวุฒิที่สละเวลามาเป็นประธานในการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ฉบับนี้

รวมถึงขอขอบคุณนางกนกพร สุขยานันท์ และ นายศริพงศ์ ตั้งประเสริฐ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สำหรับความช่วยเหลือในการจัดหาอุปกรณ์เครื่องมือต่างๆที่ใช้ในการวิจัย อีกทั้งยังให้คำแนะนำในการใช้เครื่องมือและขั้นตอนในการทำวิจัย

ที่สำคัญที่สุดขอขอบคุณโรงพยาบาลทันตกรรม คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการศึกษาและทำวิจัย รวมทั้งให้ทุนสำหรับการทำปริญญานิพนธ์ฉบับนี้

ท้ายที่สุดขอขอบคุณครอบครัวที่คอยสนับสนุนทั้งปัจจัยทางการเงินและให้กำลังใจ สนับสนุนช่วยเหลือมาโดยตลอด อีกทั้งเพื่อนทุกคนที่คอยให้กำลังใจและช่วยเหลือในทุกๆด้าน ทำให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุลวงไปด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณทุกท่านเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

ชิดหทัย ว่องวิทย์เดชา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ซ

สารบัญตาราง ..... ญ

สารบัญรูปภาพ ..... ฏ

บทที่ 1 บทนำ 1

ภูมิหลัง 1

คำถามการวิจัย 3

ความสำคัญของการวิจัย 3

จุดมุ่งหมายของการวิจัย 3

ขอบเขตของการวิจัย 3

ตัวแปรที่ศึกษา 3

นิยามศัพท์เฉพาะ 4

กรอบแนวคิดวิจัย 4

สมมติฐานการวิจัย 5

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 6

ความสำคัญของรีเจเนอเรทีฟ เอ็นโดดอนติกส์ 6

องค์ประกอบของการทำรีเจเนอเรทีฟ เอ็นโดดอนติกส์ 7

1. เซลล์ต้นกำเนิด (Stem cell) 7

2. โครงข่าย (Scaffold) 7

3. โกรทแฟคเตอร์ (Growth factor) 8
หลักการในการทำรีเจเนอเรทีฟ เอ็นโดดอนติกส์ 14
น้ำยาล้างคลองรากฟัน (Irrigants) 14
อุปกรณ์เสริมที่ช่วยในการล้างคลองรากฟัน 18
ขั้นตอนแนวปฏิบัติสำหรับการทำรีเจเนอเรทีฟ เอ็นโดดอนติกส์ 22
วิธีการศึกษาเกี่ยวกับการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์จากเนื้อฟัน 24
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย 27
วัสดุและอุปกรณ์ 27
การกำหนดขนาดกลุ่มตัวอย่าง 28
การเลือกฟัน 28
ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างฟัน 29
ขั้นตอนการล้างคลองรากฟัน 30
ขั้นตอนการตรวจวัดปริมาณทรานส์ฟอร์มมิงโกรทแฟคเตอร์-เบต้า1 32
การรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล 33
บทที่ 4 ผลการดำเนินงานวิจัย 34
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ 36
สรุปผลการวิจัย 36
อภิปรายผล 36
ข้อเสนอแนะ 42
บรรณานุกรม 43
ภาคผนวก 52
ประวัติผู้เขียน 58

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 แหล่งที่มา การทำงานและความสำคัญของโกรทแฟคเตอร์ 9

ตาราง 2 ค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าสูงสุดและค่าต่ำสุดของปริมาณ TGF-β1 ที่ปลดปล่อยออกมาในแต่ละกลุ่ม (pg/ml) 34

ตาราง 3 ข้อมูลค่าการดูดกลืนสี (O.D.) 53

ตาราง 4 ข้อมูลปริมาณ TGF-β1 (pg/ml) 53

ตาราง 5 ข้อมูลสถิติเชิงบรรยาย (Descriptive statistics) ของค่าความเข้มข้นของ TGF-β1 (pg/ml) 54

ตาราง 6 การทดสอบการแจกแจงปกติ (Tests of Normality) 54

ตาราง 7 การทดสอบความเป็นเอกพันธ์ของความแปรปรวน (Test of Homogeneity of Variances) 55

ตาราง 8 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) 55

ตาราง 9 การเปรียบเทียบพหุคูณ (Post Hoc tests) 56

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพประกอบ 1 ปริมาณ TGF-β1 ที่ปลดปล่อยออกมาในสารละลายอีดีทีเอหรือกรดซิตริกความเข้มข้นและ pH ต่างๆ เมื่อแช่เนื้อฟันเป็นระยะเวลา 5, 10 และ 20 นาที 13

ภาพประกอบ 2 โครงสร้างและกลไกการจับกับไอออนของอีดีทีเอ 15

ภาพประกอบ 3 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนชนิดส่องกราด (Scanning electron microscope: SEM) ที่แสดงท่อเนื้อฟันที่ล้างด้วยน้ำเกลือที่กำลังขยาย 50 เท่า (ซ้าย) และล้างด้วยสารละลายอีดีทีเอความเข้มข้นร้อยละ 17 ปริมาณ 10 มิลลิลิตรตามด้วยสารละลายโซเดียม ไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 5.25 ปริมาณ10 มิลลิลิตรที่กำลังขยายกำลังขยาย 700 เท่า (ขวา) 16

ภาพประกอบ 4 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนชนิดส่องกราดแสดงการยึดเกาะของเซลล์ ต้นกำเนิดกับเนื้อฟันที่ไม่ได้ล้างด้วยสารละลายอีดีทีเอ (ซ้าย) และล้างด้วยสารละลายอีดีทีเอ (ขวา) ที่กำลังขยาย 2000 เท่า 17

ภาพประกอบ 5 การเกิดปรากฏการณ์อะคูสติกสตรีมมิง 19

ภาพประกอบ 6 หัวอัลตราโซนิกส์เออริเซฟ (Irrisafe™) ที่ใช้ในการล้างคลองรากฟันในระบบ อัลตราโซนิกส์แบบไร้แรง 20

ภาพประกอบ 7 การตั้งค่าความแรงของเครื่องอัลตราโซนิกส์ในแต่ละรุ่น 20

ภาพประกอบ 8 การทำงานของไฟล์นิกเกิลไทเทเนียมแบบหมุนด้วยเครื่องระบบ เอ็กซ์พีเอนโดฟินิชเชอร์ (XP endo® finisher) 21

ภาพประกอบ 9 หลักการของแซนวิชอีไลซา (Sandwich ELISA) 25

ภาพประกอบ 10 การคำนวณกลุ่มตัวอย่างโดยใช้โปรแกรม G* power 28

ภาพประกอบ 11 ลักษณะคลองรากฟันที่จัดเป็นเวอทูชีชนิดที่ 1 (Vertucci type I) โดยจะมี 1 คลองรากฟันตลอดความยาว[63] 29

ภาพประกอบ 12 การเตรียมตัวอย่างฟัน 30

ภาพประกอบ 13 การแบ่งกลุ่มการทดลองที่มีวิธีการล้างคลองรากฟันที่แตกต่างกัน 31

ภาพประกอบ 14 จำลองการล้างคลองรากฟันภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส (water bath) 32

ภาพประกอบ 15 ชุดทดสอบอีไลซา (Human TGF-β1 Quantikine ELISA kit, R&D Systems, Minneapolis, MN) และเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Asys UVM 340, Biochrom®, Cambridge, United Kingdom) 33

ภาพประกอบ 16 แผนภูมิเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณ TGF-β1 ที่ปลดปล่อยออกมาจาก ผนังคลองรากฟันจำแนกตามวิธีการล้างคลองรากฟัน 35

บทที่ 1
บทนำ

ภูมิหลัง

รีเจเนอเรทีฟ เอ็นโดดอนติกส์ (Regenerative Endodontics) เป็นวิธีรักษาฟันแท้ที่ยังสร้างรากฟันไม่สมบูรณ์และเกิดการตายของเนื้อเยื่อใน วิธีการนี้สามารถเพิ่มความยาวและความหนาของรากฟันได้มากกว่าการรักษาวิธีแคลเซียมไฮดรอกไซด์ เอเพคซิฟิเคชัน (Calcium hydroxide apexification) และเอ็มทีเอ เอเพคซิฟิเคชัน (MTA apexification) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ[1, 2] อีกทั้งมีอัตราคงอยู่และอัตราการหายของรอยโรครอบรากฟันที่มากกว่า[2] ลดโอกาสการแตกหักของรากฟันจากการใส่แคลเซียมไฮดรอกไซด์เป็นเวลานานจากการรักษาด้วยวิธีแคลเซียมไฮดรอกไซด์ เอเพคซิฟิเคชัน[3] และลดการแตกหักจากการมีผนังคลองรากฟันที่บางและรากฟันสั้น

ผลสำเร็จของรีเจเนอเรทีฟ เอ็นโดดอนติกส์เกิดจากคลองรากฟันที่ปราศจากเชื้อร่วมกับการมีเซลล์ต้นกำเนิด (Stem cell) โครงข่าย (Scaffold) และโกรทแฟคเตอร์ (Growth factor)[4] โดยการฆ่าเชื้อในคลองรากฟันนั้นต้องอาศัยการล้างคลองรากฟันและการใส่ยาเป็นหลัก โดยน้ำยาล้างคลองรากฟันและยาที่ใส่ต้องส่งเสริมหรือไม่ส่งผลเสียต่อเซลล์ต้นกำเนิด โครงข่ายและโกรทแฟคเตอร์ จึงได้มีการแนะนำให้ใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 1.5-3 (Sodium hypochlorite: NaOCl) และ สารละลายอีดีทีเอ (Ethylenediaminetetraacetic Acid: EDTA) ความเข้มข้นร้อยละ 17 ในการล้างคลองรากฟันก่อนทำการกระตุ้นลิ่มเลือดบริเวณปลายรากฟัน[5, 6] โดยจะทำให้เกิดการเข้ามาของเซลล์ต้นกำเนิดและโกรทแฟคเตอร์พร้อมกับลิ่มเลือดในคลองรากฟัน[7] ซึ่งลิ่มเลือดจะทำหน้าที่เป็นโครงข่ายให้เซลล์ยึดเกาะ อีกทั้งโกรทแฟคเตอร์ที่ถูกเก็บไว้ในเนื้อฟันจะสามารถปลดปล่อยออกมาได้โดยน้ำยาล้างคลองรากฟันประเภทสารคีเลต (Chelating agent) เช่น สารละลายอีดีทีเอ[8]

โกรทแฟคเตอร์เป็นอีกปัจจัยสำคัญที่กำหนดหน้าที่การทำงานของเซลล์รวมถึงเป็นตัวส่งสัญญาณให้เกิดการเพิ่มจำนวน (Proliferation) และการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ต้นกำเนิด (Differentiation) ไปเป็นเซลล์หรือเนื้อเยื่อต่างๆ[9] ซึ่งโกรทแฟคเตอร์นั้นมีหลากหลายตัวและทำหน้าที่แตกต่างกันไป อย่างไรก็ตามเมื่อเกิดการละลายของแร่ธาตุในเนื้อฟันจะพบปริมาณทรานส์ฟอร์มมิงโกรทแฟคเตอร์-เบต้า1 (Transforming growth factor-beta1: TGF-β1) ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากเนื้อฟันได้มากกว่าตัวอื่น[10]

TGF-β1 เป็นหนึ่งในโกรทแฟคเตอร์ที่ถูกเก็บไว้ในเนื้อฟันในกระบวนการสร้างฟันและถูกปลดปล่อยออกมาอีกครั้งโดยสารที่ทำให้เกิดการละลายของแร่ธาตุในเนื้อฟัน (Demineralization agent) เช่น สารละลายอีดีทีเอ ซึ่ง TGF-β1 จะส่งผลทำให้เกิดการสะสมแร่ธาตุและการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ต้นกำเนิดไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อฟัน[11] นอกจากนี้ยังมีผลเรียกเซลล์ (Chemotactic effect) ที่ได้มาจากเนื้อเยื่อกำเนิดฟัน (Dental papilla-derived cell)[12] อย่างไรก็ตามการใช้สารละลายอีดีทีเอสามารถส่งผลกระทบต่อลิ่มเลือดซึ่งถือเป็นอีกปัจจัยสำคัญที่จะทำให้เกิดความสำเร็จในการทำรีเจเนอเรทีฟ เอ็นโดดอนติกส์ จึงได้มีการแนะนำให้ใช้น้ำเกลือในการล้างครั้งสุดท้ายก่อนทำการกระตุ้นลิ่มเลือดจากปลายรากฟัน [13]

อย่างไรก็ตามชนิด ความเข้มข้นของน้ำยาหรือขั้นตอนการล้างคลองรากฟันก่อนกระตุ้นปลายรากฟันที่เปลี่ยนไปสามารถส่งผลต่อปริมาณโกรทแฟคเตอร์ที่ปลดปล่อยออกมาได้ จากการศึกษาของ Widbiller และคณะในปี 2017[14] พบว่าการล้างน้ำเกลือครั้งสุดท้ายหลังจากล้างด้วยสารละลายอีดีทีเอส่งผลให้ปริมาณ TGF-β1 ลดลง แต่การล้างร่วมกับการใช้ระบบอัลตราโซนิกส์แบบไร้แรง (Passive ultrasonic irrigation: PUI) ส่งผลให้ปริมาณ TGF-β1 เพิ่มขึ้น

ระบบอัลตราโซนิกส์แบบไร้แรงถูกนำมาใช้ในงานรักษารากฟันเพื่อส่งเสริมประสิทธิภาพการล้างคลองรากฟันโดยอาศัยการเกิดปรากฏการณ์อะคูสติกสตรีมมิง (Acoustic streaming) และเคาวิเตชัน (Cavitation) นอกจากนี้ยังมีไฟล์นิกเกิลไทเทเนียมแบบหมุนด้วยเครื่องระบบเอ็กซ์พีเอนโดฟินิชเชอร์ (XP endo® finisher) ซึ่งสามารถเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นรูปร่างคล้ายเกลียว (Sickle shape) ที่อุณหภูมิร่างกายและเมื่อเคลื่อนที่ขึ้นลง ไฟล์จะสะบัดเป็นวงกว้างทำให้สามารถสัมผัสผนังคลองรากฟันที่มีขนาดใหญ่เนื่องจากมีการเจริญของรากไม่สมบูรณ์ ไฟล์จะสัมผัสทำความสะอาดผนังคลองรากฟันโดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างคลองรากฟันเดิม ช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพการล้างคลองรากฟัน[15-18]

จึงจะเห็นได้ว่าโกรทแฟคเตอร์นั้นเป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญของการทำรีเจเนอเรทีฟ เอ็นโดดอนติกส์ โดยในการศึกษาในปัจจุบันที่มีอยู่อย่างจำกัดทำให้แนวปฏิบัติในการทำรีเจเนอเรทีฟ เอ็นโดดอนติกส์ทั้งของ American Association of Endodontists (AAE)[5] และ European Society of Endodontology (ESE)[6] นั้นยังมีข้อแตกต่างกันของน้ำยาและขั้นตอนการล้างคลองรากฟันก่อนทำการกระตุ้นปลายรากฟัน และยังไม่มีแนวทางปฏิบัติที่ชัดเจน ซึ่งวิธีการล้างที่แตกต่างกันนั้นสามารถส่งผลต่อปริมาณการปลดปล่อย TGF-β1 ได้ ซึ่งในปัจจุบันยังไม่พบการศึกษาที่ศึกษาการปลดปล่อยของ TGF-β1 เมื่อใช้ไฟล์นิกเกิลไทเทเนียมแบบหมุนด้วยเครื่องระบบเอ็กซ์พีเอนโดฟินิชเชอร์ร่วมในการล้างคลองรากฟัน ผู้ทำวิจัยจึงสนใจทำการเปรียบเทียบ

ปริมาณ TGF-β1 ที่ปลดปล่อยออกมาจากผนังคลองรากฟันเมื่อล้างคลองรากฟันด้วยวิธีการที่ต่างกัน โดยหากมีอุปกรณ์เสริมการล้างคลองรากฟันให้มีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้นก็อาจส่งเสริมการปลดปล่อยของ TGF-β1 ได้

คำถามการวิจัย

การล้างคลองรากฟันด้วยวิธีการที่ต่างกันมีผลต่อปริมาณ TGF-β1 ที่ปลดปล่อยออกมาจากผนังคลองรากฟันหรือไม่

ความสำคัญของการวิจัย

การวิจัยนี้ทำให้ได้รู้ปริมาณของ TGF-β1 ที่ปลดปล่อยออกมาจากผนังคลองรากฟันเมื่อล้างคลองรากฟันด้วยวิธีการที่ต่างกัน ซึ่งเป็นอีกหนึ่งปัจจัยสำคัญในความสำเร็จของการทำรีเจเนอเรทีฟ เอ็นโดดอนติกส์ โดยหากใช้อุปกรณ์ที่ช่วยเสริมในการล้างคลองรากฟันแล้วส่งเสริมให้เกิดการปลดปล่อยของ TGF-β1 มากขึ้นได้จะสามารถเลือกใช้อุปกรณ์และวิธีที่เกิดผลที่ดีที่สุดต่อการทำรีเจเนอเรทีฟ เอ็นโดดอนติกส์ได้

จุดมุ่งหมายของการวิจัย

เพื่อเปรียบเทียบปริมาณ TGF-β1 ที่ปลดปล่อยออกมาจากผนังคลองรากฟันเมื่อล้างคลองรากฟันด้วยวิธีการที่ต่างกัน

ขอบเขตของการวิจัย

เป็นการวิจัยเชิงทดลองโดยจำลองสถานการณ์การล้างคลองรากฟันด้วยวิธีการที่แตกต่างกัน

ตัวแปรที่ศึกษา

ตัวแปรต้น

วิธีการล้างคลองรากฟัน

ตัวแปรตาม

ปริมาณ TGF-β1 ที่ปลดปล่อยออกมาจากผนังคลองรากฟัน

ตัวแปรควบคุม

ปริมาณและเวลาในการล้างคลองรากฟัน, ขนาดของคลองรากฟันและปริมาตรของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่นำไปทดสอบ

นิยามศัพท์เฉพาะ

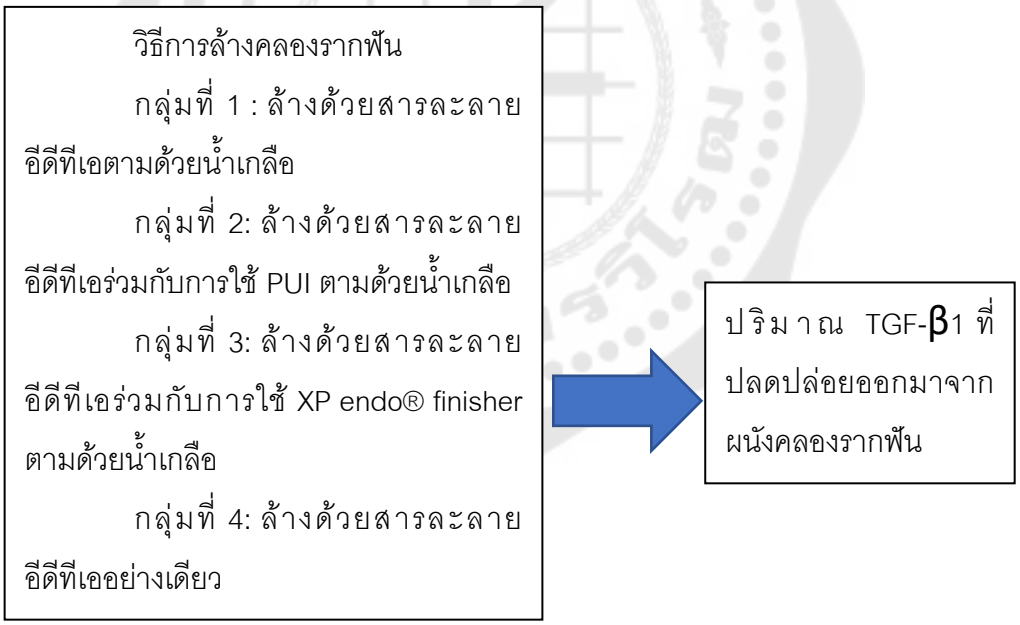
1. รีเจเนอเรทีฟ เอ็นโดดอนติกส์ (Regenerative Endodontics) คือกระบวนการซ่อมแซมตามธรรมชาติทางชีวภาพเพื่อให้เกิดการเจริญต่อของรากฟัน มีการผลิตส่วนของเนื้อฟันเพิ่มมากขึ้น และมีการทดแทนเซลล์เนื้อเยื่อใน

2. เอ็มทีเอ เอเพคซิฟิเคชัน (MTA apexification) คือวิธีการที่ทำให้เกิดแนวกั้นบริเวณปลายรากฟันที่เปิดกว้างโดยใช้มิเนอรัลไตรออกไซด์แอกกรีเกต (เอ็มทีเอ)

3. แคลเซียมไฮดรอกไซด์ เอเพคซิฟิเคชัน (Calcium hydroxide apexification) คือวิธีการที่ทำให้เกิดแนวกั้นบริเวณปลายรากฟันที่เปิดกว้างโดยใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์

4. โกรทแฟคเตอร์ (Growth factor) คือโปรตีนที่จับกับตัวรับ (Receptor) บนเซลล์มีความสำคัญต่อการอยู่รอดและการทำงานของเซลล์ ส่งเสริมให้เกิดการเพิ่มจำนวน (Proliferation) และการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ต้นกำเนิด (Differentiation) ไปเป็นเซลล์ต่างๆ

กรอบแนวคิดวิจัย



สมมติฐานการวิจัย

H0: วิธีล้างคลองรากฟันมีผลให้ปริมาณ TGF-β1 ที่ปลดปล่อยออกมาจากผนังคลองรากฟันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

H1: วิธีล้างคลองรากฟันมีผลให้ปริมาณ TGF-β1 ที่ปลดปล่อยออกมาจากผนังคลองรากฟันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอย่างน้อย 1 คู่

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ความสำคัญของรีเจเนอเรทีฟ เอ็นโดดอนติกส์

ฟันแท้ที่เกิดการตายของเนื้อเยื่อในโดยที่ยังสร้างรากไม่เสร็จสมบูรณ์นั้นมีความยุ่งยากในการจัดการเนื่องจากมีเนื้อฟันที่บางเสี่ยงต่อการแตกหัก มีโพรงเนื้อเยื่อในที่กว้างทำให้ยากต่อการกำจัดเชื้อและทำความสะอาดโดยวิธีปกติ นอกจากนี้ยังมีปลายรากฟันที่เปิดกว้างไม่มีแนวกั้นที่ปลายรากฟันทำให้วัสดุอุดคลองรากฟันมีโอกาสเกินออกนอกปลายรากฟันไปรบกวนเนื้อเยื่อปริทันต์รอบปลายรากฟันได้[19] ดังนั้นในการจัดการฟันปลายรากเปิดจึงมีการแนะนำให้ทำการกระตุ้นให้มีการปิดของปลายรากหรือสร้างแนวกั้นบริเวณปลายรากฟันก่อน โดยในปัจจุบันวิธีในการจัดการฟันตายที่ยังสร้างรากไม่สมบูรณ์มี 3 วิธี คือ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ เอเพคซิฟิเคชัน (Calcium hydroxide apexification) เอ็มทีเอ เอเพคซิฟิเคชัน (MTA apexification) และรีเจเนอเรทีฟ เอ็นโดดอนติกส์ (Regenerative Endodontics) โดยเป้าหมายของการจัดการด้วยวิธีรีเจเนอเรทีฟ เอ็นโดดอนติกส์นั้นทำเพื่อให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อใหม่แทนที่เนื้อเยื่อที่ถูกทำลายไป ทำให้เซลล์ในพัลพ์เดนทีนคอมเพล็กซ์ (Pulp-dentin complex) สามารถกลับมาทำหน้าที่ได้ใหม่และมีการเจริญต่อของรากฟัน ซึ่งจากการศึกษาของ Jeeruphan และคณะในปี 2012[2] ทำการศึกษาย้อนหลังพบว่าอัตราคงอยู่ของการักษาโดยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ เอเพคซิฟิเคชันเท่ากับร้อยละ 77.27 เอ็มทีเอ เอเพคซิฟิเคชันเท่ากับร้อยละ 94.74 และรีเจเนอเรทีฟ เอ็นโดดอนติกส์ร้อยละ 100 อีกทั้งรีเจเนอเรทีฟ เอ็นโดดอนติกส์สามารถเพิ่มความหนาและความยาวของรากฟันได้มากกว่าวิธีแคลเซียมไฮดรอกไซด์ เอเพคซิฟิเคชันและเอ็มทีเอ เอเพคซิฟิเคชันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ลดความเสี่ยงต่อการแตกหักของรากฟันอีกทั้งมีอัตราการหายของรอยโรคปลายรากและการคงอยู่ของฟันที่ดีกว่า อย่างไรก็ตามข้อจำกัดของการทำรีเจเนอเรทีฟ เอ็นโดดอนติกส์คือฟันที่ทำนั้นจะต้องไม่จำเป็นที่จะบูรณะต่อด้วยเดือยฟัน[5]

รีเจเนอเรทีฟ เอ็นโดดอนติกส์ คือกระบวนการทางชีวภาพที่ช่วยซ่อมแซมทดแทนโครงสร้างที่เสียหายถูกทำลายไป มีการผลิตส่วนของเนื้อฟันขึ้นมาใหม่ทำให้เกิดการเจริญต่อของรากฟันและมีการทดแทนของเซลล์เนื้อเยื่อใน[9] โดยอาศัยหลักการของวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue engineering) ซึ่งมีองค์ประกอบคือเซลล์ต้นกำเนิด (Stem cell), โครงข่าย (Scaffold) และโกรทแฟคเตอร์ (Growth factor) ในอดีตกระบวนการนี้มีชื่อเรียกว่า รีวาสคูลาไรเซชัน (Revascularization) และต่อมาถูกแนะนำให้เรียกแทนว่ารีเจเนอเรทีฟ เอ็นโดดอนติกส์ เนื่องจากคำว่ารีเจเนอเรทีฟ เอ็นโดดอนติกส์สามารถอธิบายถึงการเจริญต่อของรากฟันและการทดแทนของ

เซลล์ในพัลพ์เดนทีนคอมเพล็กซ์ที่เกิดขึ้นได้ดีกว่า[20] โดยจากการศึกษาของ Banchs และ Trope ในปี 2004[8] ได้ทำความสะอาดและฆ่าเชื้อในคลองรากฟัน แล้วจึงทำการกระตุ้นเลือดบริเวณปลายรากและปิดผนึกโพรงฟัน ทำการติดตามผลการรักษาเป็นเวลา 2 ปีในกรณีตัวอย่าง พบการหายของรอยโรคปลายรากฟัน มีการเพิ่มขึ้นของความหนาและความยาวรากฟัน ปลายรากฟันปิด และฟันมีการตอบสนองต่อการทดสอบความมีชีวิตของฟันด้วยความเย็น

องค์ประกอบของการทำรีเจเนอเรทีฟ เอ็นโดดอนติกส์

การทำรีเจเนอเรทีฟ เอ็นโดดอนติกส์จะต้องประกอบด้วย 3 องค์ประกอบตามหลักวิศวกรรมเนื้อเยื่อดังนี้

1. **เซลล์ต้นกำเนิด** (Stem cell)

เซลล์ต้นกำเนิดคือเซลล์ที่ยังเจริญเติบโตไม่เต็มที่ (Immature) มีความสามารถในการแบ่งตัวอย่างต่อเนื่อง (Self-replication) และสามารถเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์หรือเนื้อเยื่อชนิดต่างๆได้หลายชนิดที่มีลักษณะและหน้าที่จำเพาะ (Multilinage differentiation)[9, 21-23]

โดยฟันที่มีการเจริญของรากฟันไม่สมบูรณ์พบว่าบริเวณปลายรากฟันนั้นมีเซลล์ต้นกำเนิด (Stem cells from apical papilla: SCAP) ที่สามารถเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ต้องการได้หลากหลาย (Multipotent mesenchymal stem cell) [24, 25] และสามารถถูกกระตุ้นให้เข้ามาในคลองรากฟันได้พร้อมกับลิ่มเลือดในกระบวนการทำรีเจเนอเรทีฟ เอ็นโดดอนติกส์[7]

2. **โครงข่าย** (Scaffold)

โครงข่ายทำหน้าที่ให้เซลล์ยึดเกาะ ป้องกันอันตรายและช่วยให้เซลล์หรือเนื้อเยื่อใหม่เจริญได้ดีในบริเวณที่ต้องการ ซึ่งควรมีรูพรุนเพื่อให้เซลล์เจริญและเป็นที่อยู่ของโกรทแฟคเตอร์ สามารถเกิดการแลกเปลี่ยนสารอาหาร ออกซิเจนและของเสียได้ สามารถย่อยสลายได้เอง มีอัตราการย่อยสลายที่ใกล้เคียงกับอัตราการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ทดแทน มีความเข้ากันได้ดีกับเนื้อเยื่อ (Biocompatibility) และมีความแข็งแรงที่เพียงพอ[23]

โครงข่ายที่ถูกใช้กันอย่างแพร่หลายคือลิ่มเลือด โดย Ostby ได้เป็นผู้ริเริ่มการกระตุ้นลิ่มเลือดให้เข้ามาในคลองรากฟันในปี 1961 ผลจากการศึกษานี้พบว่ามีการเจริญของเนื้อเยื่อแกรนูเลชัน (Granulation tissue), เนื้อเยื่อเส้นใย (Fibrous tissue) และเนื้อเยื่อคล้ายเคลือบรากฟัน (Cementum-like tissue) เข้ามาในคลองรากฟัน[26] ซึ่งในลิ่มเลือดจะประกอบไปด้วยเส้นใยเมตริกซ์ (Fibrin matrix) ทำหน้าที่ดักจับเซลล์ต่างๆ เพื่อให้เกิดกระบวนการงอกใหม่ของ

เนื้อเยื่อ (Tissue regeneration) นอกจากนี้ยังเป็นวิธีที่ส่งผลให้เซลล์จากบริเวณรอบปลายรากฟัน ทั้งแมคโครเฟจ (Macrophages) และเซลล์ผลิตเส้นใย (Fibroblast) เข้ามาในบริเวณคลองรากฟัน ทำให้มีการเจริญของเนื้อเยื่อใหม่ในคลองรากฟัน อีกทั้งเป็นวิธีที่ทำได้สะดวกไม่ต้องใช้เครื่องมือเพิ่มเติมและให้ผลการรักษาทางรีเจเนอเรทีฟ เอ็นโดดอนติกส์ที่ดี [8, 27, 28] อย่างไรก็ตามลิ่มเลือดมีข้อจำกัดคือไม่สามารถควบคุมส่วนประกอบได้ รวมถึงมีความเข้มข้นของเซลล์ที่เข้ามาในคลองรากฟันไม่แน่นอน ทำให้ไม่สามารถคาดเดาผลของเนื้อเยื่อที่เกิดขึ้นใหม่ได้ นอกจากนี้บางการศึกษาพบว่าลิ่มเลือดไม่มีความแข็งแรงเพียงพอในการรองรับเอ็มทีเอ (Mineral trioxide aggregated: MTA)[29, 30] จึงทำให้มีการใช้โครงข่ายตัวอื่นเช่นเพลทเลทริชพลาสม่า (Platelet rich plasma: PRP) หรือเพลทเลทริชไฟบริน (Platelet rich fibrin: PRF) แทนมากขึ้น[31, 32]

3. โกรทแฟคเตอร์ (Growth factor)

โกรทแฟคเตอร์เป็นโปรตีนที่จับกับตัวรับ (Receptor) บนเซลล์มีความสำคัญต่อการอยู่รอดและการทำงานของเซลล์ ส่งเสริมให้เกิดการเพิ่มจำนวน (Proliferation) และการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ต้นกำเนิด (Differentiation) ไปเป็นเซลล์ต่างๆ เช่นเซลล์ที่คล้ายกับเซลล์สร้างเนื้อฟัน (Odontoblastic-like cell), เซลล์สร้างกระดูก (Osteoblast), เซลล์สร้างเส้นใย (Fibroblast)[9, 33] โดยระหว่างการพัฒนาของฟันโกรทแฟคเตอร์จะถูกปลดปล่อยจากเซลล์สร้างเนื้อฟัน (Odontoblast) และถูกเก็บไว้ในเนื้อฟัน (Dentine matrix) ในรูปที่ไม่สามารถใช้งานได้ (Inactive form) โดยสร้างพันธะกับแร่ธาตุในเนื้อฟัน[34] เนื่องจากโกรทแฟคเตอร์นั้นมีอายุสั้น การสร้างพันธะกับแร่ธาตุในเนื้อฟันเพื่อหลีกเลี่ยงไม่ให้โกรทแฟคเตอร์ถูกย่อยสลาย ทำให้สามารถมีอายุได้นานขึ้นโดยยังคงความสามารถในการส่งสัญญาณต่างๆได้อยู่ ซึ่งโกรทแฟคเตอร์จะถูกทำให้สามารถใช้งานได้ (Active) และปลดปล่อยออกมาได้ใหม่โดยสารที่ทำให้เกิดการละลายของแร่ธาตุในเนื้อฟัน (Demineralization agent) เช่น สารละลายอีดีทีเอ [10, 35, 36] , กรดซิตริก (citric acid)[37, 38], กรดฟอสฟอริก (phosphoric acid)[37]และกรดแลคติดจากโรคฟันผุ (Lactic acid)[39, 40] โดยมีโกรทแฟคเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเนื้อฟันหลายตัวซึ่งได้ยกตัวอย่างมาตามตารางที่ 1[9, 41, 42]

ตาราง 1 แหล่งที่มา การทำงานและความสำคัญของโกรทแฟคเตอร์

ชื่อ	แหล่งที่มา	หน้าที่	ความสำคัญ
Bone morphogenetic Proteins (BMP)	โบนเมทริกซ์ (Bone matrix)	ส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกและการสะสมแร่ธาตุของกระดูก	ใช้เพิ่มความสามารถของเซลล์ในการสร้างและหลั่งมิเนอรัลเมทริกซ์ (Mineral matrix)
Fibroblast growth factor (FGF)	หลากหลายเซลล์	ส่งเสริมการเพิ่มจำนวนของหลากหลายเซลล์	ใช้เพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิด
Platelet-derived growth factor (PDGF)	เกล็ดเลือด (Platelets), เซลล์บุผนังหลอดเลือด (Endothelial cells)	ส่งเสริมการเพิ่มจำนวนของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Connective tissue) เซลล์กล้ามเนื้อเรียบ (Smooth muscle cell) และเซลล์เกลีย (Glial cell)	ใช้เพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิด
Transforming growth factor-beta (TGF-β)	เดนทีนเมทริกซ์ (Dentin matrix)	ส่งเสริมการเพิ่มจำนวนและการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อฟัน ช่วยต้านการอักเสบและช่วยในการหายของแผล	ใช้ส่งเสริมการสะสมแร่ธาตุในเนื้อเยื่อในฟัน
Vascular endothelial growth factor (VEGF)	เซลล์เม็ดเลือดแดง (Erythrocytes)	กระตุ้นการสร้างหลอดเลือด	ส่งเสริมการเคลื่อนย้าย (Migration)และการเพิ่มจำนวนของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด (Endothelial cell)
Nerve growth factor (NGF)	โปรตีนที่ถูกปล่อยมาจากเนื้อเยื่อเป้าหมายของเซลล์ประสาท	มีความสำคัญในการคงความมีชีวิตของเซลล์ประสาทซิมพาเทติก (Sympathetic) และเซลล์ประสาทรับความรู้สึก (Sensory neurons)	ช่วยเพิ่มการเจริญและคงความมีชีวิตของเซลล์ประสาท

ที่มา: Murray, P. E., et al. (2007). Regenerative endodontics: A review of current status and a call for action. Journal of Endodontics 33(4): 377-390.

KM, H. (2011). Regenerative endodontic. Cohen's Pathways of the pulp. C. S. Hargreaves KM, Mosby Elsevier.

Widbiller, M., et al. (2019). Neurotrophic Proteins in Dentin and Their Effect on Trigeminal Sensory Neurons. Journal of Endodontics 45(6): 729-735.

โกรทแฟคเตอร์ที่สามารถปลดปล่อยออกมาได้จากการใช้สารละลายอีดีทีเอได้แก่ ทรานส์ฟอร์มมิงโกรทแฟคเตอร์-เบต้า1 (Transforming growth factor-beta1: TGF-β1), ไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์-2 (Fibroblast growth factor-2: FGF-2), โบนมอร์โฟเจนิคโปรตีน-2 (Bone morphogenetic protein-2: BMP-2), เพลทเลทดีไลฟ์โกรทแฟคเตอร์ (Platelet-derived growth factor: PDGF), พลาเซ็นตาโกรทแฟคเตอร์ (Placenta growth factor), เอพิดเดอมอลโกรทแฟคเตอร์ (Epidermal growth factor: EGF) และ วาสคูลาร์เอนโดทีเลียลโกรทแฟคเตอร์ (Vascular endothelial growth factor: VEGF) [43-45] จากการศึกษาของ Galler และคณะในปี 2015[10] ใช้ชิ้นเนื้อฟัน (Dentin disk) แช่ในสารหลากชนิดที่มีความเข้มข้นต่างๆ พบว่าการใช้สารละลายอีดีทีเอที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 ทำให้มีปริมาณการปลดปล่อยของ TGF-β1 มากที่สุดแต่พบปริมาณการปลดปล่อยของ FGF-2 และ VEGF ที่น้อยมากจนเกือบไม่สามารถวัดได้ สอดคล้องกับ Zeng และคณะในปี 2016[36] ทำการจำลองลักษณะปลายรากฟันเปิดในฟันรากเดียวที่ถูกถอนและทาเคลือบผิวด้านนอกของรากฟันด้วยน้ำยาทาเล็บ ล้างคลองรากฟันด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 ร่วมกับ สารละลายอีดีทีเอความเข้มข้นร้อยละ 17, สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 ร่วมกับสารละลายอีดีทีเอความเข้มข้นร้อยละ 17, สารละลายอีดีทีเอความเข้มข้นร้อยละ 17 หรือน้ำบริสุทธิ์ (Deionized water) แล้วจึงนำฟันไปแช่ในสารตัวกลางที่ใช้เลี้ยงเซลล์ที่ 37ºC เป็นเวลา 4 ชั่วโมง, 1 วัน และ 3 วัน ทำการตรวจหาชนิดของโกรทแฟคเตอร์พบการแสดงออกของโกรทแฟคเตอร์ได้แก่ เอพิดเดอมอลโกรทแฟคเตอร์รีเซพเตอร์ (Epidermal growth factor receptor: EGFR), โคโลนีสติมูเลติงแฟคเตอร์ 1 (Colony stimulating factor 1: CSF1), CSF3, อินซูลินไลค์โกรทแฟคเตอร์บายดิงโปรตีน1 (Insulin-like growth factor binding proteins 1: IGFBP1), IGFBP3, PDGF-AB, TGF-α, TGF-β1, TGF-β2, VEGF-A และ VEGF-D โดยพบปริมาณของ

TGF-β1 ในสารตัวกลางของกลุ่มที่ล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 ร่วมกับสารละลายอีดีทีเอความเข้มข้นร้อยละ 17 และสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 ร่วมกับสารละลายอีดีทีเอความเข้มข้นร้อยละ 17 มากกว่ากลุ่มอื่นและมีปริมาณมากที่สุดในวันที่ 1 แต่พบปริมาณของเบสิคไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ (Basic fibroblast growth factor: bFGF) ที่น้อยมากหรือไม่พบเลย

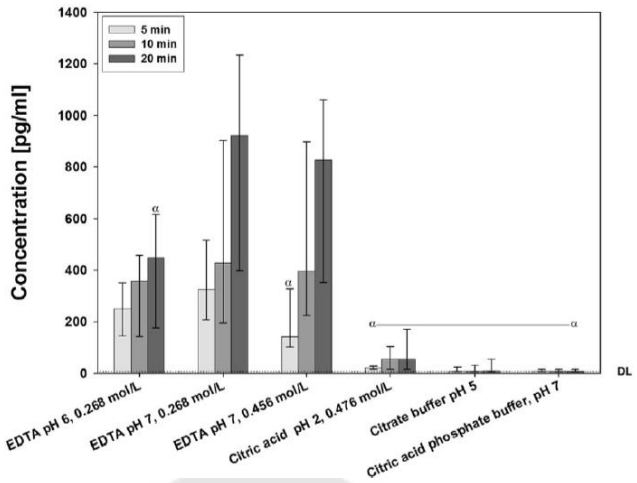
ทรานส์ฟอร์มมิงโกรทแฟคเตอร์-เบต้า (Transforming growth factor-beta: TGF-β)

มีทั้งหมด 5 ไอโซฟอร์ม (Isoforms) ได้แก่ TGF-β1 - TGF-β5 โดย TGF-β1 - TGF-β3 จะพบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ส่วน TGF-β4 และ TGF-β5 จะพบในสัตว์เลื้อยคลานและสัตว์ปีก โดยจากการศึกษาของ Cassidy และคณะในปี 1997[43] พบว่า TGF-β1 เป็นเพียงไอโซฟอร์มเดียวที่สามารถตรวจพบได้ในเนื้อฟันของมนุษย์

TGF-β1 มีความจำเพาะและเป็นโกรทแฟคเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานภายในเซลล์ที่หลากหลาย เช่น การเจริญของเซลล์ (Cell growth), การอักเสบ (Inflammation), การสร้างเมทริกซ์ (Matrix synthesis) การตายของเซลล์ (Apoptosis)[46] การสร้างเส้นเลือด (Angiogenic growth factor) โดยช่วยให้เกิดการเจริญของเส้นเลือด (Vessel maturation)[47]และมีความสำคัญอย่างยิ่งในการเกิดการสะสมแร่ธาตุและการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ต้นกำเนิดไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อฟัน[11] นอกจากนี้ยังมีผลเรียกเซลล์ (Chemotactic effect) ที่ได้มาจากเนื้อเยื่อกำเนิดฟัน (Dental papilla-derived cell)[12] ซึ่งมีความสำคัญต่อการทำรีเจเนอเรทีฟ เอ็นโดดอนติกส์ สามารถเรียกเซลล์ต้นกำเนิดบริเวณปลายรากฟันให้เข้ามาในคลองรากฟันได้ จากการศึกษาของ Li และคณะในปี 2011[11] ทำการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในของฟันหนูในภาวะที่มีหรือไม่มี TGF-β1 แล้ววัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ด้วยวิธีเอ็มทีที (MTT assay) วัดความสามารถในการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อฟันด้วยการวัดระดับอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (Alkaline Phosphatase activity: ALP activity) และวัดความสามารถในการสร้างเนื้อฟันด้วยการย้อมสีอะลิซารินเรด (Alizarin red) พบว่ากลุ่มที่มี TGF-β1 พบระดับอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและการสะสมแร่ธาตุที่มากกว่า แต่ไม่พบความแตกต่างของการเพิ่มจำนวนของเซลล์ อีกทั้งยังทำการทดลองโดยใช้มิลลิพอร์ทรานส์ฟิวเตอร์ (Millipore transfilter) เป็นโครงข่ายที่ชุบ TGF-β1 และวางเซลล์เนื้อเยื่อในไว้ด้านบน นำไปเพาะเลี้ยงในห้องทดลองและไปฝัง (Transplantation) ในหนู หลังจาก 7 วันกลุ่มที่ทดลองในห้องทดลองพบการแสดงออกของเดนทีนไซอะโลโปรตีน (Dentin sialoprotein: DSP), ออสตีโอโปรตีน (Osteopotin: OPN) และคอลลาเจนชนิดที่ 1 (Type I

collagen: Col I) ซึ่งแสดงถึงการการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อฟัน พบการสร้างเนื้อฟัน กระดูกและคอลลาเจน อีกทั้งพบการเรียงตัวของเซลล์คล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟันส่วนการทดลองในหนูพบลักษณะของเซลล์สร้างเนื้อฟันเรียงตัวบริเวณผิวของโครงข่ายหลังการทำการฝัง 7 วัน และพบการแสดงออกของ DSP หลังการทำการฝัง 3 เดือน

กรดซิตริก[37, 38] และกรดฟอสฟอริก[37] สามารถทำให้เกิดการปลดปล่อย TGF-β1 จากเนื้อฟันได้เช่นเดียวกับสารละลายอีดีทีเอ[10, 35, 36] ซึ่งจากการศึกษาของ Chae และคณะในปี 2018 [37] ทำการเตรียมตัวอย่างฟันโดยจำลองลักษณะปลายรากฟันเปิดในฟันรากเดียวที่ถูกถอนและทาเคลือบผิวด้านนอกของรากฟันด้วยน้ำยาทาเล็บเพื่อให้สอดคล้องกับการล้างคลองรากฟันในคลินิก ทำการล้างคลองรากฟันด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 ปริมาณ 20 มิลลิลิตร 5 นาทีและตามด้วยน้ำเกลือ, สารละลายอีดีทีเอความเข้มข้นร้อยละ 17, กรดซิตริกความเข้มข้นร้อยละ 10, กรดฟอสฟอริกความเข้มข้นร้อยละ 10 หรือร้อยละ 37 ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ซับแห้งด้วยกระดาษซับรูปกรวยแหลม (Paper point) แล้วนำไปใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจาก 24 ชั่วโมงจึงนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปตรวจหาปริมาณ TGF-β1 ด้วยวิธีอีไลซา (Enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA) พบการปลดปล่อยของ TGF-β1 ได้มากที่สุดในกลุ่มที่ล้างด้วยกรดซิตริกความเข้มข้นร้อยละ 10 มากกว่ากลุ่มที่ล้างด้วยสารละลายอีดีทีเอความเข้มข้นร้อยละ 17 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งกลุ่มที่ล้างด้วยกรดฟอสฟอริกความเข้มข้นร้อยละ 10 พบปริมาณ TGF-β1 ใกล้เคียงกับกลุ่มสารละลายอีดีทีเอความเข้มข้นร้อยละ 17 และกลุ่มที่ล้างด้วยกรดฟอสฟอริกความเข้มข้นร้อยละ 37 พบ TGF-β1 ปริมาณน้อยที่สุด ขัดแย้งกับการศึกษาของ Galler และคณะในปี 2015[10] ใช้ชิ้นส่วนเนื้อฟันที่ตัดออกมาจากฟันที่ถูกถอนของมนุษย์ทำการเปรียบเทียบความสามารถในการปลดปล่อย TGF-β1 เมื่อแช่ชิ้นเนื้อฟันในสารละลายอีดีทีเอหรือกรดซิตริก 100 μL ที่ความเข้มข้น, pH และเวลาที่ต่างกัน แล้วจึงตรวจวัดปริมาณ TGF-β1 ในสารละลายอีดีทีเอหรือกรดซิตริกโดยวิธีอีไลซา พบว่ากลุ่มสารละลายอีดีทีเอในทุกความเข้มข้นทุก pH และทุกช่วงเวลาส่งผลให้เกิดการปลดปล่อยของ TGF-β1 มากกว่ากลุ่มกรดซิตริกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามที่แสดงผลในภาพประกอบ 1



ภาพประกอบ 1 ปริมาณ TGF-β1 ที่ปลดปล่อยออกมาในสารละลายอีดีทีเอหรือกรดซิตริกความเข้มข้นและ pH ต่างๆ เมื่อแช่เนื้อฟันเป็นระยะเวลา 5, 10 และ 20 นาที

ที่มา: Galler, K. M., et al. (2015). Influence of root canal disinfectants on growth factor release from dentin. Journal of Endodontics 41(3): 363-368.

นอกจากนี้วิธีการการล้างคลองรากฟันที่ต่างกันก็ส่งผลต่อการปลดปล่อย TGF-β1 จากเนื้อฟัน โดยจากการศึกษาของ Widbiler และคณะในปี 2017[14] ทำการศึกษาโดยใช้ชิ้นเนื้อฟันแช่ในน้ำยาล้างคลองรากฟัน และการจำลองการล้างคลองรากฟันให้สอดคล้องกับในคลินิกแล้วนำน้ำยาล้างคลองรากฟันไปวัดปริมาณ TGF-β1 พบว่าการล้างคลองรากฟันด้วยน้ำเกลือหลังจากล้างด้วยสารละลายอีดีทีเอจะส่งผลให้ปริมาณ TGF-β1 น้อยกว่าการล้างด้วยสารละลายอีดีทีเอเพียงอย่างเดียว ซึ่งการใช้ระบบอัลตราโซนิกส์แบบไร้แรง (Passive ultrasonic irrigation: PUI) มาช่วยในการล้างจะส่งผลให้พบการปลดปล่อยของ TGF-β1 เพิ่มมากขึ้น เช่นเดียวกับการศึกษาของ Zeng และคณะในปี 2016[36] ที่ได้กล่าวมาแล้วพบว่ากลุ่มที่ล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 ร่วมกับสารละลายอีดีทีเอความเข้มข้นร้อยละ 17 และกลุ่มสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 ร่วมกับสารละลายอีดีทีเอความเข้มข้นร้อยละ 17 พบการปลดปล่อยของ TGF-β1 ได้มากกว่ากลุ่มที่ล้างด้วยสารละลายอีดีทีเอความเข้มข้นร้อยละ 17 ตัวเดียว

หลักการในการทำรีเจเนอเรทีฟ เอ็นโดดอนติกส์

หลักสำคัญในการทำรีเจเนอเรทีฟ เอ็นโดดอนติกส์คือการทำความสะอาดฆ่าเชื้อภายในคลองรากแล้วจึงกระตุ้นปลายรากฟันเพื่อให้ได้องค์ประกอบทั้ง 3 โดยในการทำความสะอาดคลองรากฟันจะเน้นการใช้น้ำยาล้างคลองรากฟันและใส่ยาเพื่อฆ่าเชื้อ อีกทั้งหลีกเลี่ยงการใช้เครื่องมือในการทำความสะอาดคลองรากฟันเพื่อรักษาปริมาณเนื้อฟันให้ได้มากที่สุด[8]

น้ำยาล้างคลองรากฟัน (Irrigants)

-สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (Sodium hypochlorite: NaOCl)

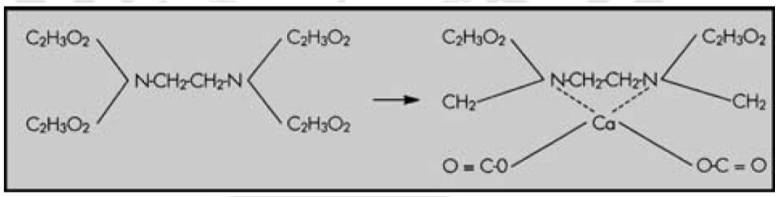
สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์เป็นน้ำยาล้างคลองรากฟันที่นิยมใช้ในการล้างคลองรากฟันมากที่สุด โดยเมื่อโซเดียมไฮโปคลอไรต์สัมผัสกับน้ำจะแตกตัวได้เป็นโซเดียมไอออน (Na+) และไฮโปคลอไรต์ไอออน (OCl-) โดยจะเกิดสมดุลโดยการเกิดโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และกรดไฮโปคลอรัส (HOCl) สามารถย่อยสลายโปรตีนได้ ทำหน้าที่ขัดขวางการเผาผลาญของเซลล์ (Metabolism) ยับยั้งการสร้างเอมไซม์ที่จำเป็นต่อแบคทีเรีย ทำให้มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อจุลชีพ สลายเนื้อเยื่อใน ย่อยสลายสารอินทรีย์และสลายโปรตีนซึ่งเป็นส่วนประกอบของแผ่นชีวภาพ (Biofilm) ในคลองรากฟันได้[48, 49]

โดยความเข้มข้นที่ถูกแนะนำให้ใช้ในงานรีเจเนอเรทีฟ เอ็นโดดอนติกส์คือร้อยละ 1.5 เนื่องจากความเข้มข้นสูงจะส่งผลเสียต่อความมีชีวิตและการเจริญของเซลล์ต้นกำเนิด อย่างไรก็ตามการล้างด้วยสารละลายอีดีทีเอความเข้มข้นร้อยละ 17 จะช่วยลดความเป็นพิษของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์[50, 51] ส่งผลดีต่อเซลล์ต้นกำเนิดให้มีความอยู่รอด เกิดการเกาะของเซลล์ (Cell attachment) และเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ที่สร้างกระดูกและเนื้อฟันได้ (Odontoblastic/ Osteoblastic differentiation)[52] อีกทั้งยังสามารถส่งเสริมให้เกิดการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์ออกมาจากเนื้อฟัน [10, 35, 36] โดยจากการศึกษาของ Trevino และคณะในปี 2011[51] ทำการศึกษาผลของน้ำยาล้างคลองรากฟันต่อความมีชีวิตของเซลล์ต้นกำเนิด โดยใช้เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อส่วนปลายราก จากการศึกษาพบว่าการใช้สารละลายอีดีทีเอเพียงอย่างเดียวมีจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดที่มีชีวิตมากที่สุด แต่เมื่อใช้สารละลายอีดีทีเอร่วมกับสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์จะพบจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดที่มีชีวิตลดน้อยลง ในขณะที่เมื่อมีการใช้คลอเฮกซิดีนในการล้างจะพบว่าไม่มีจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดที่มีชีวิตเหลืออยู่เลย สอดคล้องกับการศึกษาของ Martin และคณะในปี 2014[50] ทำการเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ต่อความมีชีวิตและของเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อส่วนปลายรากและการแสดงออกของเดนทีนไซอะโลโปรตีน ซึ่งแสดงถึงการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อฟัน โดยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ที่ความเข้มข้นมากยิ่งส่งผลกระทบต่อความมีชีวิตของเซลล์ต้นกำเนิดและ

การแสดงออกของเดนทีนไซอะโลโปรตีนลดลง แต่การล้างตามด้วยสารละลายอีดีทีเอความเข้มข้นร้อยละ 17 จะช่วยส่งเสริมให้ความมีชีวิตของเซลล์ต้นกำเนิดและการแสดงออกของเดนทีนไซอะโลโปรตีน ซึ่งแสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อฟันมากขึ้น ดังนั้นจึงได้แนะนำให้ล้างคลองรากฟันด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 ตามด้วยสารละลายอีดีทีเอความเข้มข้นร้อยละ 17 ในการทำรีเจเนอเรทีฟเอ็นโดดอนติกส์

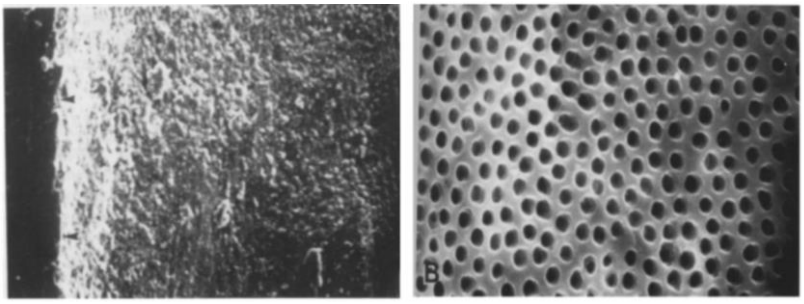
-สารละลายอีดีทีเอ (Ethylenediaminetetraacetic Acid, EDTA)

สารละลายอีดีทีเอเป็นสารในกลุ่มกรดอะมิโนโพลิคาร์บอกซิลิก (Aminopolycarboxylic acid) สูตรโครงสร้างคือ $[CH_2N(CH_2\ CO_2H)_2]_2$ ดังแสดงในภาพประกอบ 2[53] เป็นสารละลายใส ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น มีค่า pH ประมาณ 7 สารละลายอีดีทีเอถูกใช้ในการล้างคลองรากฟันเนื่องจากคุณสมบัติในการกำจัดสารอนินทรีย์และแร่ธาตุที่อยู่ในคลองรากฟัน โดยเฉพาะภายในชั้นสเมียร์ (Smear layer) ส่งผลให้ท่อเนื้อฟันกว้างขึ้นดังแสดงในภาพประกอบ 3[54] อย่างไรก็ตามสารละลายอีดีทีเอมีประสิทธิภาพในการทำงานที่จำกัดโดยสารละลายอีดีทีเอสามารถจับกับไอออนของโลหะที่มีประจุ 2+ หรือ 3+ เช่น Ca2+, Fe3+ ได้แต่เมื่อสารละลายอีดีทีเอจับกับแคลเซียมแล้วจะเกิดเป็นโมเลกุลที่มีความเสถียรและจะหยุดกระบวนการสลายแร่ธาตุ [48, 53]



ภาพประกอบ 2 โครงสร้างและกลไกการจับกับไอออนของอีดีทีเอ

ที่มา : Hülsmann, M., et al. (2003). Chelating agents in root canal treatment: mode of action and indications for their use. International Endodontic Journal 36(12): 810-830.

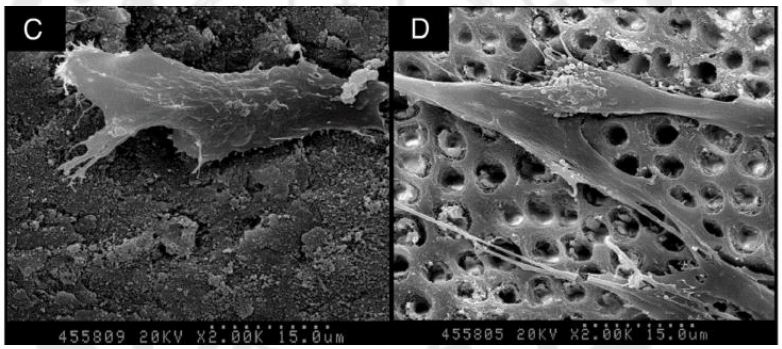


ภาพประกอบ 3 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนชนิดส่องกราด (Scanning electron microscope: SEM) ที่แสดงท่อเนื้อฟันที่ล้างด้วยน้ำเกลือที่กำลังขยาย 50 เท่า (ซ้าย) และล้างด้วยสารละลายอีดีทีเอความเข้มข้นร้อยละ 17 ปริมาณ 10 มิลลิลิตรตามด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 5.25 ปริมาณ10 มิลลิลิตรที่กำลังขยายกำลังขยาย 700 เท่า (ขวา)

ที่มา: Yamada, R. S., et al. (1983). A scanning electron microscopic comparison of a high volume final flush with several irrigating solutions: Part 3. Journal of Endodontics 9(4): 137-142.

ปัจจุบันสารละลายอีดีทีเอความเข้มข้นร้อยละ 17 ได้ถูกแนะนำให้ใช้ในงานรีเจเนอเรทีฟ เอ็นโดดอนติกส์[5, 6] เนื่องจากมีคุณสมบัติในการลดความเป็นพิษของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ต่อเซลล์ต้นกำเนิด ทำให้เกิดการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์จากเนื้อฟันและละลายสารอนินทรีย์ได้ดี ส่งผลเกิดการเผยผึ่งของท่อเนื้อฟันไม่ขัดขวางการปลดปล่อยของโกรทแฟคเตอร์ เซลล์ต้นกำเนิดสามารถยึดเกาะกับเนื้อฟันได้มากขึ้นและเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อฟันหรือสร้างกระดูกได้ โดยจากการศึกษาของ Pang และคณะในปี 2013[52] ทำการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดในโพรงประสาทฟัน (Dental pulp stem cell: DPSC) ที่ได้จากฟันกรามซี่ที่ 3 จากนั้นใส่ชิ้นเนื้อฟันที่ได้รับการล้างด้วยสารละลายอีดีทีเอและชิ้นเนื้อฟันปกติ หลังจากใส่ชิ้นเนื้อฟัน 3 วันนำมาวัดความหนาแน่นของเซลล์ต้นกำเนิดและส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนชนิดส่องกราด (Scanning electron microscope: SEM) พบว่าเนื้อฟันทั้ง 2 กลุ่มมีการยึดเกาะของเซลล์ต้นกำเนิด แต่เซลล์ต้นกำเนิดในกลุ่มที่ได้รับการล้างด้วยสารละลายอีดีทีเอจะมีความหนาแน่นและการยื่นของเซลล์เข้าไปในท่อเนื้อฟันมากกว่าดังแสดงในภาพประกอบ 4 และหลังจากใส่ชิ้นเนื้อฟัน 21 วันนำมาวัดโมเลกุลที่แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ต้นกำเนิดไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อฟันหรือเซลล์สร้างกระดูกด้วยวิธี*เรียลไท*มพีซีอาร์ (Real-time polymerase

chain reaction: real-time PCR) พบว่ากลุ่มที่ได้รับการล้างด้วยสารละลายอีดีทีเอและสัมผัสโดยตรงกับเซลล์มีการแสดงออกของเดนทีนไซอะโลโปรตีนและเดนทีนเมทริกซ์โปรตีน 1 (Dentin matrix protein 1) มากกว่ากลุ่มอื่น สอดคล้องกับการศึกษาของ Galler และคณะในปี 2016[55] เปรียบเทียบผลของการล้างชิ้นเนื้อฟันด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 5.25 สารละลายอีดีทีเอความเข้มข้นร้อยละ 10 และน้ำเปล่า ต่อการเคลื่อนที่ การยึดติด และการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อฟันของเซลล์ต้นกำเนิดในโพรงประสาทฟัน ผลการศึกษาพบว่าสารละลายอีดีทีเอทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของเซลล์มายังชิ้นเนื้อฟันได้มากกว่าสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์และน้ำเปล่า เมื่อล้างชิ้นเนื้อฟันด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์พบว่ามีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตน้อยกว่าการใช้สารละลายอีดีทีเอและน้ำเปล่า เมื่อส่องด้วยกล้องอิเล็คตรอนชนิดส่องกราดพบกลุ่มสารละลายอีดีทีเอมีการยึดติดของเซลล์กับเนื้อฟัน และเซลล์ต้นกำเนิดที่สัมผัสกับเนื้อฟันที่ล้างด้วยสารละลายอีดีทีเอมีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับโมเลกุลที่แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อฟันเช่นเดนทีนไซอะโลโปรตีนและอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส



ภาพประกอบ 4 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนชนิดส่องกราดแสดงการยึดเกาะของเซลล์ต้นกำเนิดกับเนื้อฟันที่ไม่ได้ล้างด้วยสารละลายอีดีทีเอ (ซ้าย) และล้างด้วยสารละลายอีดีทีเอ (ขวา) ที่กำลังขยาย 2000 เท่า

ที่มา: Pang, N.-S., et al. (2014). Effect of EDTA on attachment and differentiation of dental pulp stem cells. Journal of Endodontics 40(6): 811-817.

สารละลายอีดีทีเอยังส่งผลให้เกิดการปลดปล่อยของโกรทแฟคเตอร์ที่เคยถูกเก็บไว้ในเนื้อฟันออกมา ซึ่งโกรทแฟคเตอร์เหล่านี้จำเป็นสำหรับการเคลื่อนย้าย การยึดติด การเพิ่มจำนวนและเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดไปเป็นเซลล์หรือเนื้อเยื่อต่างๆ โดยจากการศึกษาของ Zeng และคณะในปี 2016[36] พบโกรทแฟคเตอร์ได้แก่ EGFR, CSF1, CSF3, IGFBP1, IGFBP3,

PDGF-AB, TGF-α, TGF-β1, TGF-β2, VEGF-A และ VEGF-D เมื่อล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 ร่วมกับสารละลายอีดีทีเอความเข้มข้นร้อยละ 17, สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 ร่วมกับสารละลายอีดีทีเอความเข้มข้นร้อยละ 17 หรือสารละลายอีดีทีเอความเข้มข้นร้อยละ 17 ในคลองรากฟัน อีกทั้งโกรทแฟคเตอร์ที่ปลดปล่อยออกมาเหล่านี้จะส่งเสริมให้เกิดการเคลื่อนย้ายของเซลล์ต้นกำเนิดในโพรงประสาทฟัน (Cell migration) นอกจากนี้จากการศึกษาของ Galler และคณะในปี 2015[10] พบว่าการล้างด้วยสารละลายอีดีทีเอความเข้มข้นร้อยละ 10 ส่งผลเกิดการปลดปล่อยของ TGF-β1 มากที่สุด สอดคล้องกับการศึกษาของ Goncalves และคณะในปี 2016[35] โดยใช้ชิ้นเนื้อฟัน (Tooth slice) ที่ตัดมาจากฟันกรามซี่ที่ 3 ที่ถูกถอนโดยฝั่งหนึ่งจะมีชั้นพรีเดนทีน (Predentin) และอีกฝั่งถูกกำจัดไป นำไปล้างด้วยสารละลายอีดีทีเอความเข้มข้นร้อยละ 10, สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 หรือน้ำเกลือ แล้วจึงนำฟันไปแช่ในสารตัวกลางที่ใช้เลี้ยงเซลล์ที่ 37ºC เป็นเวลา 3 วัน และนำสารตัวกลางมาตรวจหาปริมาณ TGF-β1 ด้วยวิธีอีไลซา ผลการทดลองพบว่ากลุ่มที่ล้างด้วยสารละลายอีดีทีเอความเข้มข้นร้อยละ 10 มีปริมาณ TGF-β1 มากที่สุดไม่ว่าจะมีชั้นพรีเดนทีนหรือไม่ก็ตาม

อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Taweewattanapaisan และคณะในปี 2019[13] พบว่าสารละลายอีดีทีเอนั้นส่งผลเสียต่อลิ่มเลือดซึ่งเป็นโครงข่ายในงานรีเจเนอเรทีฟเอ็นโดดอนติกส์ โดยทำการศึกษาในฟันกรามน้อยล่าง 35 ซี่ที่ล้างคลองรากฟันด้วยสารละลายอีดีทีเอความเข้มข้นร้อยละ 17 และ/หรือน้ำเกลือแล้วดูผลของน้ำยาล้างคลองรากฟันที่หลงเหลือต่อลักษณะของลิ่มเลือดด้วยกล้องอิเล็คตรอนชนิดส่องกราด พบว่าการใช้สารละลายอีดีทีเอความเข้มข้นร้อยละ 17 มีการเกิดเส้นใยในลิ่มเลือดที่น้อยกว่ากลุ่มที่ล้างด้วยสารละลายอีดีทีเอความเข้มข้นร้อยละ 17 ตามด้วยน้ำเกลือซึ่งพบลิ่มเลือดมีลักษณะของเส้นใยหนาแน่นกว่าและเซลล์เม็ดเลือดแดง (Erythrocyte) มีความปกติมากกว่า ดังนั้นการล้างคลองรากฟันครั้งสุดท้ายด้วยน้ำเกลือจึงสามารถลดผลกระทบของสารละลายอีดีทีเอต่อลิ่มเลือดได้

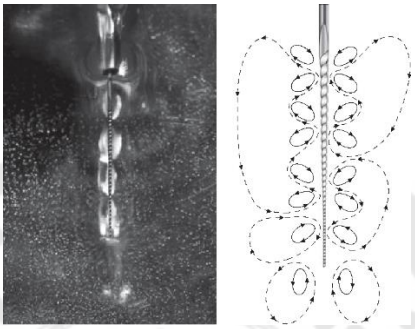
อุปกรณ์เสริมที่ช่วยในการล้างคลองรากฟัน

ในปัจจุบันมีอุปกรณ์เสริมที่สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการล้างคลองรากฟันทั้งสามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย ปริมาณแผ่นชีวภาพและปริมาณชั้นสเมียร์ได้

-ระบบอัลตราโซนิกส์แบบไร้แรง (passive ultrasonic irrigation: PUI)

เป็นเครื่องมือที่เปลี่ยนพลังงานไฟฟ้าเป็นคลื่นอัลตราโซนิกส์ ส่งผ่านพลังงานจากการสั่นไปยังไฟล์และน้ำยาล้างคลองรากฟันโดยที่ไม่มีการสัมผัสคลองรากฟัน ทำให้เกิด

ปรากฏการณ์อะคูสติกสตรีมมิง (Acoustic streaming) และเคาวิเตชัน (Cavitation) โดยปรากฏการณ์อะคูสติกสตรีมมิง คือการเคลื่อนที่ของของเหลวเป็นลักษณะวงกลมเป็นกระแสน้ำหมุนวนรอบไฟล์ จนก่อให้เกิดแรงเฉือน (Shear force) ไปตามผนังของคลองรากฟันช่วยในการกำจัดแบคทีเรียและเศษเนื้อฟัน ส่วนปรากฏการณ์เคาวิเตชันคือการเกิดฟองอากาศในของเหลว มีการบีบและขยายตัวทำให้ฟองอากาศแตกเกิดเป็นพลังงานถ่ายทอดไปยังผนังคลองรากฟันและกำจัดเศษต่างๆได้[15] ดังแสดงในภาพประกอบ 5



ภาพประกอบ 5 การเกิดปรากฏการณ์อะคูสติกสตรีมมิง

ที่มา: Van der Sluis L, et al. (2007). Passive ultrasonic irrigation of the root canal: a review of the literature. International endodontic journal 40(6): 415-26.

เครื่องมือที่ถูกคิดค้นมาเพื่อใช้ในการล้างด้วยระบบอัลตราโซนิกส์แบบไร้แรงเช่น เออริเซฟ (IrriSafe™, Satelec Acteon Group, Merignac, France) ดังแสดงในภาพประกอบ 6 โดยผู้ผลิตกล่าวว่าเครื่องมือผลิตจากสแตนเลสสตีลชนิดพิเศษเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการส่งผ่านคลื่นอัลตราโซนิกส์ โดยเครื่องมือมีลักษณะคล้ายไฟล์ มีความขนาน ปลายทู่ไม่มีความคม (Blunt-ended) เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดอันตรายต่อปลายรากฟัน ช่วยทำให้เกิดไมโครสตรีมมิงและไมโครเคาวิเตชัน เพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดเศษเนื้อฟัน เศษเนื้อเยื่อในและแบคทีเรีย มีสองขนาดที่เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.20 และ 0.25 มิลลิเมตร แต่ละขนาดจะมีความยาว 21 และ 25 มิลลิเมตร โดยต้องต่อเข้ากับเครื่องอัลตราโซนิกส์ของบริษัทผู้ผลิตเดียวกัน ความแรงที่ใช้จะขึ้นอยู่กับชนิดของเครื่องอัลตราโซนิกส์ดังแสดงในภาพประกอบ 7 ในการใช้งานต้องใส่เครื่องมือเออริเซฟลงไปในคลองรากฟันให้สั้นกว่าความยาวทำงาน 1 มิลลิเมตรทำการกระตุ้นเป็นเวลา 1-3 นาที[56]

ภาพประกอบ 6 หัวอัลตราโซนิกส์เออริเซฟ (Irrisafe™) ที่ใช้ในการล้างคลองรากฟันในระบบอัลตราโซนิกส์แบบไร้แรง

ที่มา : Acteon [Internet]. Irrisafe ultrasonic irrigation. Available from: https://www.endoexperience.com/documents/IrriSafe_D43801_R2_Eng.pdf.

Power settings

	P-Max XS P5 Newtron XS		P5 Newtron		P5 Booster		P-Max Newtron ProphyMax Newtron	
	Mini	Maxi	Mini	Maxi	Mini	Maxi	Mini	Maxi
Irri-Safe	6	7	6	7	4	7	4	7

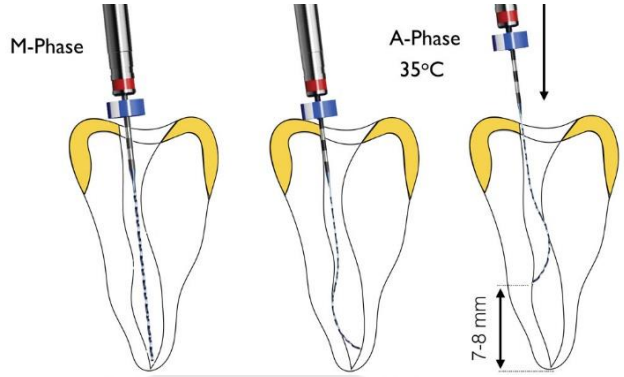
ภาพประกอบ 7 การตั้งค่าความแรงของเครื่องอัลตราโซนิกส์ในแต่ละรุ่น

ที่มา : Acteon [Internet]. Irrisafe ultrasonic irrigation. Available from: https://www.endoexperience.com/documents/IrriSafe_D43801_R2_Eng.pdf.

-ระบบไฟล์นิกเกิลไทเทเนียมแบบหมุนด้วยเครื่องระบบเอ็กซ์พีเอนโดฟินิชเชอร์ (XP endo® finisher)

เอ็กซ์พีเอนโดฟินิชเชอร์ (XP endo® finisher: XPF, FKG Dentaire, La Chaux-de-Fonds, Switzerland) ผลิตจากแม็กซ์ไวร์อัลลอยด์ (MaxWire alloy; Martensite-Austenite-electropolish-flex) ทำให้เครื่องมือมีความยืดหยุ่นสูง เมื่อเครื่องมือเข้าไปในคลองรากฟันที่อุณหภูมิร่างกายไฟล์จะเปลี่ยนแปลงรูปร่างกลายเป็นรูปร่างคล้ายเกลียว (Sickle shape) เมื่อเคลื่อนที่ขึ้นลง ไฟล์จะสะบัดเป็นวงกว้างทำให้สามารถสัมผัสผนังคลองรากฟันที่มีขนาดใหญ่เนื่องจากมีการเจริญของรากไม่สมบูรณ์ได้ หรือสามารถเข้าไปในบริเวณที่ยากต่อการสัมผัส ซึ่งไฟล์จะสัมผัสทำความสะอาดกับคลองรากฟันโดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างคลองรากฟันเดิม[18]

ดังแสดงในภาพประกอบ 8 โดยแนะนำให้ใช้ที่ความเร็วรอบ 800-1000 รอบต่อนาที และทอร์กที่ 1 นิวตันเซนติเมตร ใส่ไฟล์ลงไปถึงความยาวทำงานและขับขึ้นลง 7-8 มิลลิเมตรเป็นเวลา 1 นาที[57]



ภาพประกอบ 8 การทำงานของไฟล์นิกเกิลไทเทเนียมแบบหมุนด้วยเครื่องระบบเอ็กซ์พีเอนโดฟินิชเชอร์ (XP endo® finisher)

ที่ ม า : Cleaning the third dimension (2015) [Internet]. Available from: https://endopracticeus.com/ce-articles/4948/

ทั้งสองระบบสามารถลดปริมาณชั้นสเมียร์ได้โดยจากการศึกษาของ Xin และคณะในปี 2019[17] ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเอ็กซ์พีเอนโดฟินิชเชอร์ (XPF) และระบบอัลตราโซนิกส์แบบไร้แรง (PUI) ในการกำจัดชั้นสเมียร์ในคลองรากฟันกรามน้อยรากเดียว 60 ซี่ ทำการขยายคลองรากฟันและแบ่งกลุ่มล้างครั้งสุดท้าย (Final irrigation) ออกเป็น 6 กลุ่มได้แก่ กลุ่ม A ล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ร้อยละ 3 ปริมาณ 3 มิลลิลิตร 1 นาทีร่วมกับ XPF, กลุ่ม B สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 3 ปริมาณ 3 มิลลิลิตร 1 นาทีร่วมกับ XPF ตามด้วย สารละลายอีดีทีเอความเข้มข้นร้อยละ 17 ปริมาณ 4 มิลลิลิตร 1 นาทีร่วมกับ XPF, กลุ่ม C สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 3 ปริมาณ 3 มิลลิลิตร 1 นาทีร่วมกับ PUI, กลุ่ม D สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 3 ปริมาณ3 มิลลิลิตร 1 นาทีร่วมกับ PUI ตามด้วย สารละลายอีดีทีเอความเข้มข้นร้อยละ 17 ปริมาณ 4 มิลลิลิตร 1 นาทีร่วมกับ PUI, กลุ่ม E สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 3 ปริมาณ 3 มิลลิลิตร 1 นาทีด้วยเข็มล้างที่มีรูเปิดด้านข้าง (Side-vented needle), กลุ่ม F สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 3 ปริมาณ 3 มิลลิลิตร 1 นาทีตามด้วยสารละลายอีดีทีเอความเข้มข้นร้อยละ 17 ปริมาณ 4 มิลลิลิตร 1 นาทีด้วยเข็มล้างที่มีรูเปิดด้านข้างและตรวจสอบการกำจัดชั้นสเมียร์ด้วยกล้องกล้องอิเล็คตรอนชนิดส่องกราด พบว่าการใช้

XPF และ PUI สามารถช่วยกำจัดชั้นสเมียร์ได้มากกว่าการไม่ใช้อุปกรณ์เสริมแต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของทั้ง 2 อุปกรณ์ อีกทั้งจากการศึกษาของ Widbiler และคณะในปี 2017[14] พบว่าการใช้ระบบอัลตราโซนิกส์แบบไร้แรงมาช่วยในการล้างจะส่งผลให้พบการปลดปล่อยของ TGF-β1 เพิ่มมากขึ้น

ขั้นตอนแนวปฏิบัติสำหรับการทำรีเจเนอเรทีฟ เอ็นโดดอนติกส์

ปัจจุบันได้มีการแนะนำขั้นตอนแนวปฏิบัติสำหรับการทำรีเจเนอเรทีฟ เอ็นโดดอนติกส์โดย American Association of Endodontists (AAE) และ European Society of Endodontology (ESE) ซึ่งฟันที่จะทำรีเจเนอเรทีฟ เอ็นโดดอนติกส์นั้นต้องเป็นฟันตายที่รากยังเจริญไม่สมบูรณ์ มีการทำลายของตัวฟันเพียงเล็กน้อย ผู้ป่วยและผู้ปกครองจำเป็นต้องให้ความร่วมมือดี ผู้ป่วยไม่แพ้ยาที่ใช้และจัดอยู่ใน The American Society of Anesthesiologists (*ASA*) physical status *classification* class I หรือ II [5, 6]

-AAE clinical consideration[5] ฉบับแก้ไขวันที่ 1 เมษายน ค.ศ. 2018

การนัดหมายครั้งแรก: ทำการฉีดยาชาเพื่อระงับความเจ็บปวดและแยกฟันด้วยแผ่นยางกันน้ำลาย เปิดทางเข้าสู่คลองรากฟันและล้างคลองรากฟันด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 ปริมาณ 20 มิลลิลิตรเป็นเวลา 5 นาที โดยระวังไม่ให้น้ำยาล้างคลองรากฟันเกินออกไปนอกปลายรากฟัน แล้วตามด้วยน้ำเกลือหรือสารละลายอีดีทีเอความเข้มข้นร้อยละ 17 ปริมาณ 20 มิลลิลิตรเป็นเวลา 5 นาที โดยใช้เข็มที่มีรูเปิดด้านข้างและวางห่างจากปลายรากฟันประมาณ 1 มิลลิเมตรเพื่อลดความพิษของน้ำยาล้างคลองรากฟันต่อเซลล์ต้นกำเนิดบริเวณปลายรากฟัน ทำการซับคลองรากฟันให้แห้งและใส่ยาในคลองรากฟันด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์หรือยาปฏิชีวนะทรีมิกซ์ที่ความเข้มข้น 1-5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เนื่องจากความเข้มข้นสูงนั้นมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต้นกำเนิดแต่หากใช้ความเข้มข้นที่ต่ำเกินไปอาจไม่เพียงพอต่อการกำจัดเชื้อจุลชีพ แล้วจึงปิดผนึกด้วยวัสดุอุดชั่วคราวและทำการนัดหมายอีกรอบใน 1-4 สัปดาห์

การนัดหมายครั้งที่สอง: ทำการประเมินอาการ หากยังคงมีอาการหรืออาการแสดงของการติดเชื้อที่ยังคงเหลืออยู่ให้พิจารณาทำการฆ่าเชื้อคลองรากฟันเพิ่มเติม ถ้าไม่มีอาการแล้วให้ทำการฉีดยาชาเมพิวาเคน (Mepivacaine) ความเข้มข้นร้อยละ 3 ที่ไม่มีส่วนผสมของสารบีบหลอดเลือด (Vasoconstrictor) และแยกฟันด้วยแผ่นยางกันน้ำลาย กำจัดวัสดุอุดชั่วคราวและล้างคลองรากฟันด้วยสารละลายอีดีทีเอความเข้มข้นร้อยละ 17 ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ซับแห้งด้วยกระดาษซับรูปกรวยแหลมแล้วจึงกระตุ้นปลายรากฟันให้เกิดลิ่มเลือดโดยใช้เครื่องมือปลายแหลม เช่น ไฟล์ (Endo file) หรือ*เอ็นโดดอนติกเอ็กซ์พลอเรอร์* (Endo explorer) ใส่เข้าไปในคลองรากฟัน

ผ่านรูเปิดปลายรากฟันออกไป 2 มิลลิเมตรจนทำให้มีเลือดไหลเข้ามาในคลองรากฟันจนถึงระดับรอยต่อของเคลือบฟันและเคลือบรากฟัน (Cementoenamel junction: CEJ) ทำการหยุดเลือดให้ได้ระดับของวัสดุบูรณะประมาณ 3-4 มิลลิเมตร แล้วทำการวางเมทริกซ์ที่สามารถละลายได้ (Resorbable matrix) เช่น คอลลาพลัค (CollaPlug™), คอลลาโคท (Collacote™), คอลลาเทป (CollaTape™) ปิดทับด้วยเอ็มทีเอ (Mineral trioxide aggregate: MTA) และบูรณะฟันต่อไป อย่างไรก็ตามสามารถใช้เพลทเลทริชพลาสม่า (Platelet rich plasma: PRP) เพลทเลทริชไฟบริน (Platelet rich fibrin: PRF) หรือออโตโลกัสไฟบรินเมทริกซ์ (Autologous fibrin matrix: AFM) แทนการกระตุ้นในเกิดลิ่มเลือดได้

ทำการติดตามผลการรักษา 6-24 เดือน หลังการรักษาเพื่อประเมินอาการและอาการแสดงทางคลินิกและภาพรังสี เพื่อติดตามดูการหายของรอยโรคปลายรากฟันและการเจริญต่อของรากฟัน

-ESE statement for revitalization procedure[6] ในปี 2016

การนัดหมายครั้งแรก: หลังจากตรวจทางคลินิกและภาพรังสีให้ทำการแยกฟันด้วยแผ่นยางกันน้ำลาย เปิดทางเข้าสู่คลองรากฟัน กำจัดเนื้อเยื่อในที่ตายและหลีกเลี่ยงการใช้เครื่องมือในการทำความสะอาดผนังคลองรากฟัน (Mechanical instrumentation) ล้างคลองรากฟันด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 1.5-3 ปริมาณ 20 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที โดยใช้เข็มล้างที่มีรูเปิดด้านข้างวางเข็มเหนือเนื้อเยื่อที่มีชีวิต (Vital tissue) 2 มิลลิเมตร ซึ่งถ้าหากยังเลือดและสารคัดหลั่ง (Exudate) ในคลองรากฟันอยู่สามารถพิจารณาล้างต่อได้ แล้วจึงล้างด้วยน้ำเกลือปริมาณ 5 มิลลิลิตรเพื่อลดความเป็นพิษของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ต่อเนื้อเยื่อที่มีชีวิตบริเวณปลายรากฟัน ซับแห้งและล้างต่อด้วยสารละลายอีดีทีเอความเข้มข้นร้อยละ 17 ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ใส่ยาในคลองรากฟันด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์และปิดผนึกบริเวณโพรงฟันด้วยวัสดุชั่วคราว ทำการนัดหมายอีกรอบใน 1-4 สัปดาห์

การนัดหมายครั้งที่สอง: ทำการประเมินอาการ หากยังคงมีอาการหรืออาการแสดงของการติดเชื้อที่ยังคงเหลืออยู่ให้พิจารณาทำการฆ่าเชื้อคลองรากฟันเพิ่มเติม ถ้าไม่มีอาการแล้วให้ทำการฉีดยาชาที่ไม่มีส่วนผสมของสารบีบหลอดเลือด แยกฟันด้วยแผ่นยางกันน้ำลาย กำจัดวัสดุอุดชั่วคราวและล้างคลองรากฟันด้วยสารละลายอีดีทีเอความเข้มข้นร้อยละ 17 ปริมาณ 20 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที ต่อด้วยน้ำเกลือปริมาณ 5 มิลลิลิตร ซับแห้งคลองรากฟันแล้วจึงกระตุ้นปลายรากฟันให้เกิดลิ่มเลือดโดยใช้ไฟล์ที่ทำการดัดโค้งงอ (Pre-bent) มาแล้วไปรบกวนบริเวณปลายรากฟันให้มีเลือดไหลเข้ามาในคลองรากฟันจนถึงระดับต่ำกว่าระดับขอบเหงือก

(Gingival margin) 2 มิลลิเมตร และรอให้เกิดลิ่มเลือด 15 นาที แล้วทำการวางคอลลาเจนเมทริกซ์ (Collagen matrix), คอลลาพลัค (CollaPlug™) หรือฮีโมคอลลายีน (Hemocollagene) ปิดทับด้วยเอ็มทีเอประมาณ 2 มิลลิเมตรโดยให้อยู่ต่ำกว่าระดับรอยต่อของเคลือบฟันและเคลือบรากฟัน และต้องระวังการเปลี่ยนสีของฟัน แล้วทำการบูรณะฟันต่อไป

ทำการติดตามผลการรักษา 6, 12, 18, 24 เดือนและทุกปีเป็นระยะเวลา 5 ปี หลังการรักษาเพื่อประเมินอาการและอาการแสดงทางคลินิกและภาพรังสี เพื่อติดตามดูการหายของรอยโรคปลายรากฟันและการเจริญต่อของรากฟัน

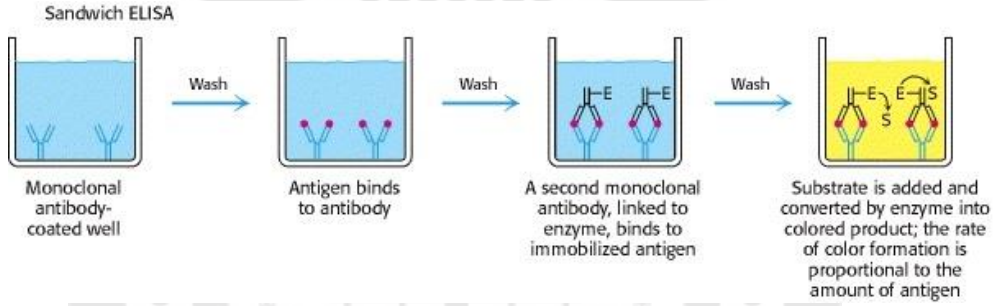
วิธีการศึกษาเกี่ยวกับการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์จากเนื้อฟัน

ในอดีตการศึกษาการปลดปล่อยของโกรทแฟคเตอร์จะใช้ตัวอย่างเนื้อฟันที่เป็นผงบดละเอียด[43-45, 58] แต่ต่อมาได้มีการใช้ตัวอย่างเนื้อฟันที่ถูกตัดออกมาจากส่วนรากฟันหรือตัวฟันให้ได้ขนาดที่กำหนด (Dentin disk)[10, 35, 38] แล้วนำมาแช่ในสารต่างๆที่ต้องการศึกษาเพื่อให้เกิดการปลดปล่อยของโกรทแฟคเตอร์ หลังจากนั้นจึงนำสารนั้นไปวัดปริมาณโกรทแฟคเตอร์ อย่างไรก็ตามทั้งสองวิธีนี้ไม่สอดคล้องกับลักษณะการล้างคลองรากฟันในทางคลินิก

จึงได้มีการเสนอวิธีการการเตรียมตัวอย่างฟันโดยจำลองลักษณะปลายรากฟันเปิดในฟันที่เจริญเต็มที่และถูกถอน ซึ่งฟันที่มีการเจริญของรากฟันเต็มที่แต่อยู่ในช่วงอายุน้อย (Young mature tooth) จะสามารถปลดปล่อย TGF-β1 ได้ไม่แตกต่างกับฟันที่มีการเจริญของรากไม่สมบูรณ์ (Immature tooth)[59] ทำการทาเคลือบผิวด้านนอกของรากฟันด้วยน้ำยาทาเล็บโดยให้เหลือเฉพาะบริเวณด้านในคลองรากฟันที่สัมผัสกับน้ำยา ทำการล้างคลองรากฟันและซับคลองรากฟันให้แห้ง แล้วจึงนำตัวอย่างฟันไปแช่ในสารตัวกลางที่ใช้เลี้ยงเซลล์ปล่อยให้เกิดการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์ตามเวลาที่กำหนด หลังจากครบตามเวลาจึงนำสารตัวกลางที่ใช้เลี้ยงเซลล์ไปวัดปริมาณโกรทแฟคเตอร์ โดยพบว่าปริมาณของ TGF-β1 ในสารตัวกลางของกลุ่มที่ล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ร่วมกับสารละลายอีดีทีเอความเข้มข้นร้อยละ 17 จะพบการปลดปล่อยของ TGF-β1 มากที่สุดในวันที่ 1[36] ดังนั้นจึงทำการตรวจวัดปริมาณ TGF-β1 ในสารตัวกลางเมื่อแช่ฟันไว้ครบ 24 ชั่วโมง ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่สอดคล้องกับการล้างคลองรากฟันในคลินิกและโกรทแฟคเตอร์สามารถปลดปล่อยออกมาได้จากเนื้อฟันในคลองรากฟันเท่านั้น [36, 37]

การวัดปริมาณโกรทแฟคเตอร์จะอาศัยหลักการของวิธีอีไลซา ซึ่งการตรวจจับโมเลกุล TGF-β1 จะใช้ชุดทดสอบอีไลซาที่มีความจำเพาะกับ TGF-β1 (Human TGF-β1 Quantikine ELISA kit, R&D Systems, Minneapolis, MN)[37] โดยอาศัยหลักการของแซนวิชอีไลซา

(Sandwich ELISA) ซึ่งหลุมที่ใส่ตัวอย่างจะถูกเคลือบด้วยแอนตี้บอดี้ตัวแรกที่มีความจำเพาะกับ TGF-β1 (Monoclonal antibody specific for TGF-β1) เมื่อใส่สารตัวอย่างเข้าไป TGF-β1 ในสารตัวอย่างจะไปจับกับแอนตี้บอดี้ที่ถูกเคลือบไว้หลังจากนั้นจะใส่แอนตี้บอดี้ตัวที่สองที่ปิดฉลากด้วยเอมไซม์และจำเพาะกับ TGF-β1 (Enzyme-linked polyclonal antibody specific for TGF-β1) หลังจากใส่สารเริ่มต้นปฏิกิริยาลงไป (Substrate) จะส่งผลให้เกิดปฏิกิริยากับเอมไซม์ที่ติดกับแอนตี้บอดี้ตัวที่สอง ส่งผลให้เกิดเป็นสีแสดงขึ้นดังแสดงในภาพประกอบ 9[60] สีที่เข้มจะแสดงถึงการมีโมเลกุล TGF-β1 ที่มาก ทำการวัดค่าการดูดกลืนสีด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ตามข้อปฏิบัติของบริษัทที่กำหนดไว้ แล้วนำมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานจะได้เป็นปริมาณโมเลกุลของ TGF-β1



ภาพประกอบ 9 หลักการของแซนวิชอีไลซา (Sandwich ELISA)

ที่มา: Alahi M, et al.(2017). Detection Methodologies for Pathogen and Toxins: A Review. Sensors (Switzerland);17

อย่างไรก็ตามแนวปฏิบัติสำหรับการทำรีเจเนอเรทีฟ เอ็นโดดอนติกส์โดย American Association of Endodontists (AAE) และ European Society of Endodontology (ESE) นั้นยังมีข้อแตกต่างกันในส่วนของน้ำยาและวิธีการล้างคลองรากฟันก่อนทำการกระตุ้นลิ่มเลือด เนื่องจากการศึกษาในปัจจุบันเกี่ยวกับน้ำยาและวิธีการการล้างคลองรากฟันต่อเซลล์ต้นกำเนิดโครงข่ายและโกรทแฟคเตอร์นั้นมีอยู่อย่างจำกัด การมีการศึกษาเพิ่มเติมจะช่วยทำให้ได้ข้อสรุปแนวทางที่ชัดเจน นำไปสู่ความสำเร็จในการทดแทนเซลล์ของเนื้อเยื่อในและสามารถสร้างรากฟันต่อได้

ผู้ทำวิจัยจึงสนใจศึกษาถึงวิธีการล้างคลองรากฟันที่แตกต่างกันต่อการปลดปล่อย TGF-β1 จากผนังคลองรากฟัน โดยจากการศึกษาของ Widbiller และคณะในปี 2017[14] พบว่าการล้างน้ำเกลือครั้งสุดท้ายหลังจากล้างด้วยสารละลายอีดีทีเอส่งผลให้ปริมาณ TGF-β1 ลดลง

แต่การล้างคลองรากฟันครั้งสุดท้ายด้วยน้ำเกลือจะสามารถลดผลกระทบของสารละลายอีดีทีเอต่อลิ่มเลือดได้[13] อย่างไรก็ตาม Widbiller และคณะ[14]ยังพบว่าหากมีการใช้ระบบอัลตราโซนิกส์แบบไร้แรงมาช่วยในการล้าง จะส่งผลให้ปริมาณ TGF-β1 เพิ่มขึ้นได้ ซึ่งนอกจากระบบอัลตราโซนิกส์แบบไร้แรงแล้วยังมีอุปกรณ์เสริมประสิทธิภาพการล้างตัวอื่นเช่นเอ็กซ์พีเอนโดฟินิชเชอร์ ที่ถูกใช้ในการรักษาคลองรากฟัน การศึกษานี้จึงสนใจที่จะเปรียบเทียบปริมาณ TGF-β1 ที่ถูกปลดปล่อยจากคลองรากฟัน เมื่อนำระบบอัลตราโซนิกส์แบบไร้แรงหรือไฟล์นิกเกิลไทเทเนียมแบบหมุนด้วยเครื่องระบบเอ็กซ์พีเอนโดฟินิชเชอร์มาช่วยเสริมประสิทธิภาพในการล้าง

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

1. สารเคมี ได้แก่

1.1 สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 1.5

1.2 สารละลายอีดีทีเอความเข้มข้นร้อยละ 17 (M-dent, Bangkok, Thailand)

1.3 น้ำเกลือ (Normal saline solution: NSS)

1.4 น้ำเกลือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer saline: PBS)

1.5 สารยึดติด (Clearfil™ SE bond, Kuraray Co, Ltd, Osaka, Japan)

1.6 วัสดุอุดฟันเรซินคอมโพสิท (Filtek™ Z350XT, 3M ESPE, Sumaré, SP, Brazil)

1.7 น้ำยาทาเล็บ (Revlon®, New York, NY)

1.8 อาหารเลี้ยงเซลล์ (Alpha minimum essential medium: α-MEM) ที่เติม Penicillin และ Streptomycin ปริมาณอย่างละ 100 U mL^{-1} (HyClone, Logan, UT)

2. อุปกรณ์

2.1 มีดผ่าตัดเบอร์ 15

2.2 ไฟล์ชนิดเค (K-file) เบอร์ 15, 20 และ 25 (Kerr, Orange, CA)

2.3 หัวกรอเกทส์กลิดเดน (Gates-Glidden drills) เบอร์ 1-4 (Kerr, Orange, CA)

2.4 หัวกรอกากเพชรร่วมกับน้ำ (High speed diamond bur)

2.5 กระบอกใส่น้ำยาล้างคลองรากฟัน

2.6 เข็มล้างคลองรากฟันที่มีรูเปิดด้านข้างเกจ 27 (Kerr, Orange, CA)

2.7 เครื่องอัลตราโซนิกส์ (P5 Newtron, Satelec Acteon Group, Merignac, France) และหัวอัลตราโซนิกส์เออริเซฟ (IrriSafe™ ,Satelec Acteon Group, Merignac, France)

2.8 ไฟล์นิกเกิลไทเทเนียมแบบหมุนด้วยเครื่องระบบเอ็กซ์พีเอนโดฟินิชเชอร์ (XP endo® finisherXP, FKG Dentaire, La Chaux- de-Fonds, Switzerland)

2.9 มอเตอร์เอกซ์สมาร์ทพลัส (X-Smart Plus motor, Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland)

2.10 กระดาษซับรูปกรวยแหลม (Paper point)

2.11 วัสดุพิมพ์ปากชนิดซิลิโคน (I-SiL premium putty, Spident, Korea)

2.12 ชุดทดสอบอีไลซา (Human TGF-β1 Quantikine ELISA kit, R&D Systems, Minneapolis, MN)

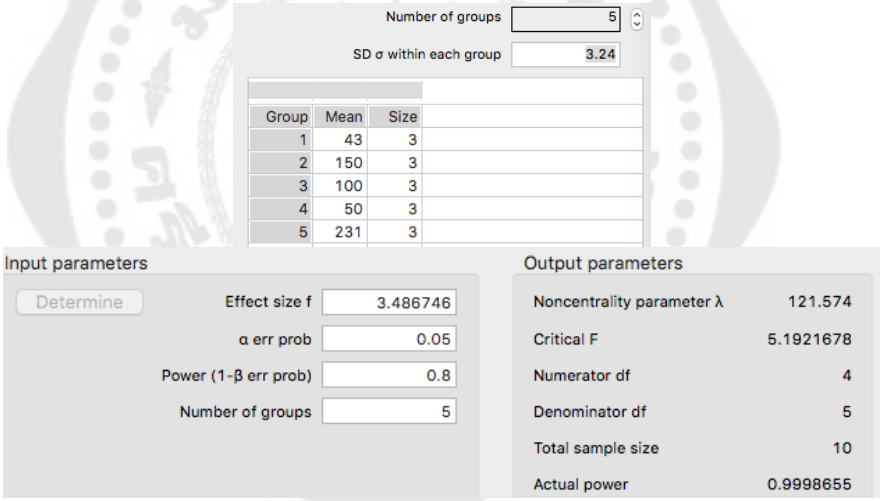
2.13 ปิเปตต์ทิป, หลอดไมโครทิว, ที่เก็บหลอดไมโครทิว

2.14 คาปิลารีทิป (Capillary Tip, Ultradent™, South Jordan, UT)

2.15 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Asys UVM 340, Biochrom®, Cambridge, United Kingdom)

การกำหนดขนาดกลุ่มตัวอย่าง

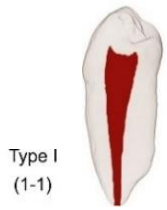
กำหนดกลุ่มตัวอย่างโดยการคำนวณขนาดของกลุ่มตัวอย่างด้วยโปรแกรม G* power โดยอ้างอิงผลการศึกษาของ Chae และคณะในปี 2018[37] และใช้ α = 0.05, Power = 0.8 ได้ขนาดของกลุ่มตัวอย่างทั้งหมดอย่างน้อย 10 ซี่ตามภาพประกอบ 10 ผู้วิจัยจึงกำหนดให้ใช้ตัวอย่างฟันทั้งหมด 21 ซี่ แบ่งเป็นกลุ่มทดลอง 4 กลุ่มกลุ่มละ 5 ซี่ และมีกลุ่มควบคุม 1 ซี่



ภาพประกอบ 10 การคำนวณกลุ่มตัวอย่างโดยใช้โปรแกรม G* power

การเลือกฟัน

ฟันกรามน้อยล่างของมนุษย์รากเดียวที่สมบูรณ์ซึ่งถูกถอนจากการจัดฟันโดยคนไข้อยู่ในช่วงอายุ 16-25 ปี ฟันไม่มีรอยผุ วัสดุอุดและรอยแตกร้าว มีเพียง 1 คลองรากฟันและจัดเป็นเวอทูซีชนิดที่ 1 (Vertucci type I) [61] (ภาพประกอบ 11) โดยตรวจสอบจากภาพรังสีทั้งในแนวใกล้กลาง-ไกลกลางและด้านแก้ม-ลิ้น เมื่อได้ฟันแล้วจะนำมาเตรียมตัวอย่างฟันและล้างคลองรากฟันทันที แต่ถ้าไม่สามารถทำได้ทันทีจะทำการเก็บฟันในน้ำเกลือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่อุณหภูมิ 4 องศา ไม่เกิน 2 วัน[62]



ภาพประกอบ 11 ลักษณะคลองรากฟันที่จัดเป็นเวอทูชีชนิดที่ 1 (Vertucci type I) โดยจะมี 1 คลองรากฟันตลอดความยาว[63]

ที่ ม า : Ahmed HMA, et al. (2017). A new system for classifying root and root canal morphology. International Endodontic Journal. 50(8): 761-70.

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างฟัน

ทำความสะอาดโดยล้างด้วยน้ำเกลือและกำจัดเนื้อเยื่อปริทันต์โดยใช้มีดผ่าตัดเบอร์ 15 ขูดออก จำลองลักษณะรากฟันที่มีการเจริญอยู่ในช่วงที่ 4 ตามการแบ่งของ Cvek ซึ่งรากฟันจะมีความยาวเกือบจะสมบูรณ์และมีลักษณะของปลายรากเปิด[64] โดยทำการตัดบริเวณตัวฟันออกด้วยหัวกรอกากเพชรร่วมกับน้ำโดยให้ตั้งฉากกับแนวแกนฟันที่ตำแหน่งรอยต่อของเคลือบฟันและเคลือบรากฟันและตัดบริเวณปลายรากฟันออกให้เหลือความยาว 10 มิลลิเมตร โดยใช้เวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ (Vernier caliper) วัดจากรอยตัดที่ตำแหน่งรอยต่อระหว่างเคลือบฟันและเคลือบรากฟันถึงบริเวณปลายฟัน จากนั้นขยายคลองรากฟันโดยตลอดความยาวจากส่วนตัวฟันไปปลายรากฟันด้วยไฟล์ชนิดเค เบอร์ 15, 20 และ 25 และตามด้วยหัวกรอเกทส์กลิดเดนตั้งแต่เบอร์ 1 จนถึงเบอร์ 4 เพื่อจำลองปลายรากฟันที่ยังเจริญไม่สมบูรณ์ให้มีปลายรากฟันเปิดและมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.1 มิลลิเมตรซึ่งเท่ากับขนาดหัวกรอเกทส์กลิดเดนเบอร์ 4 ล้างคลองรากฟันด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 ปริมาณ 20 มิลลิลิตร โดยใช้เข็มล้างคลองรากฟันที่มีรูเปิดด้านข้างเกจ 27 ล้างขยับขึ้นลงในตำแหน่งที่ห่างจากปลายราก 1 มิลลิเมตร แล้วทำการซับคลองรากฟันให้แห้งด้วยกระดาษซับรูปกรวยแหลม

หลังจากได้ตัวอย่างฟันที่ผ่านการขยายคลองรากฟันแล้ว นำตัวอย่างฟันมาปิดบริเวณปลายรากฟันด้วยวัสดุอุดฟันเรซินคอมโพสิทร่วมกับสารยึดติด แล้วทาเคลือบผิวด้านนอกบริเวณส่วนบนด้วยน้ำยาทาเล็บเพื่อลดการสัมผัสของผิวฟันด้านนอกกับน้ำยาล้างคลองรากฟันที่ล้นออกมาให้มีเพียงคลองรากฟันด้านในเท่านั้นที่สัมผัสน้ำยาล้างคลองรากฟัน โดยมีหนึ่งตัวอย่างที่ทาน้ำยาทาเล็บทั้งผิวด้านนอกและด้านในคลองรากฟันทั้งหมดเพื่อเป็นกลุ่มควบคุม (Negative control: NC)

นำตัวอย่างรากฟันที่ถูกเตรียมมาแล้วจำลองการล้างคลองรากฟันโดยนำรากฟันใส่ในวัสดุพิมพ์ปาก (I-SiL premium putty, Spident, Korea) ที่อยู่ในหลอดไมโครทิวเพื่อใช้เป็นฐานใส่ฟัน

ภาพประกอบ 12 การเตรียมตัวอย่างฟัน

ขั้นตอนการล้างคลองรากฟัน

แบ่งกลุ่มทดลองเป็น 4 กลุ่มโดยแต่ละกลุ่มมีตัวอย่างรากฟัน 5 ซี่ดังภาพประกอบ 13 และทุกกลุ่มจะถูกล้างคลองรากฟันภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาโดยใช้อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส (water bath) ดังภาพประกอบ 14

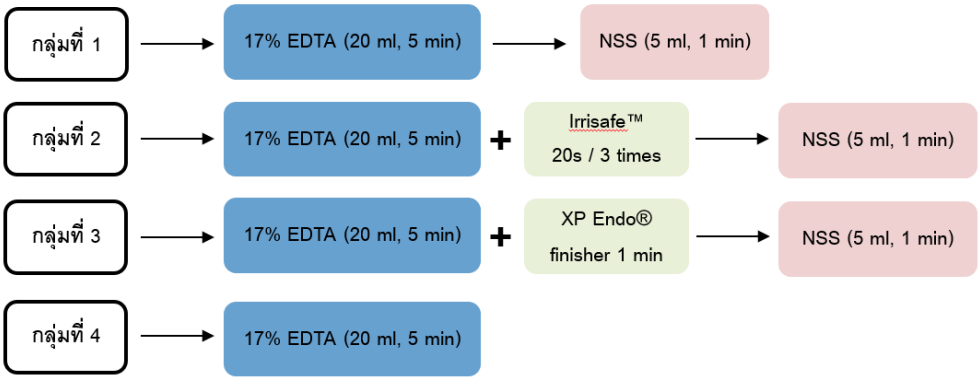
กลุ่มที่ 1 (EDATA/N) : ล้างด้วยสารละลายอีดีทีเอความเข้มข้นร้อยละ 17 ปริมาณ 20 มิลลิลิตรเป็นเวลา 5 นาที โดยจะแบ่งล้างเป็น 5 รอบรอบละ 4 มิลลิลิตรเป็นเวลา 1 นาที ตามด้วยการล้างน้ำเกลือปริมาณ 5 มิลลิลิตรเป็นเวลา 1 นาที โดยใช้เข็มล้างคลองรากฟันที่มีรูเปิดด้านข้างเกจ 27 ล้างขยับขึ้นลงในตำแหน่งที่ห่างจากปลายราก 1 มิลลิเมตร

กลุ่มที่ 2 (EDTA+PUI/N) : ล้างด้วยสารละลายอีดีทีเอความเข้มข้นร้อยละ 17 ปริมาณ 20 มิลลิลิตรเป็นเวลา 5 นาที โดยจะแบ่งล้างเป็น 5 รอบ รอบละ 4 มิลลิลิตรเป็นเวลา 1 นาที ซึ่งในรอบที่ 2, 3 และ 4 จะทำการล้างร่วมกับการใช้เออริเซฟ (IrriSafe™, Satelec Acteon Group, Merignac, France) โดยใส่อุปกรณ์เออริเซฟให้สั้นกว่าความยาวทำงาน 1 มิลลิเมตร ปรับระดับความแรงของเครื่องอัลตราโซนิก (P5 Newtron, Satelec Acteon Group, Merignac, France) ที่ระดับ 6[56] ทำการกระตุ้นภายในคลองรากฟันรอบละ 20 วินาที ตามด้วยการล้างน้ำเกลือปริมาณ 5 มิลลิลิตรเป็นเวลา 1 นาที โดยใช้เข็มล้างคลองรากฟันที่มีรูเปิดด้านข้างเกจ 27 ล้างขยับขึ้นลงในตำแหน่งที่ห่างจากปลายราก 1 มิลลิเมตร แต่รอบที่มีการใส่อุปกรณ์เออริเซฟเข็มล้างจะถูกใส่ไว้ในตำแหน่งรูเปิดคลองรากฟันด้านบนลึกลงไปในคลองรากฟัน 2 มิลลิเมตรโดยไม่มีการขยับของเข็มล้าง

กลุ่มที่ 3 (EDTA+XP/N) : ล้างด้วยสารละลายอีดีทีเอความเข้มข้นร้อยละ 17 ปริมาณ 20 มิลลิลิตรเป็นเวลา 5 นาที โดยจะแบ่งล้างเป็น 5 รอบ รอบละ 4 มิลลิลิตรเป็นเวลา 1 นาที ซึ่งในรอบที่ 3 จะทำการล้างร่วมกับการใช้เอ็กซ์พีเอนโดฟินิชเชอร์ (XP endo® finisher, FKG Dentaire, La Chaux- de-Fonds, Switzerland) โดยตั้งเครื่องหมุนให้มีความเร็วรอบ 800 รอบต่อนาทีและทอร์กขนาด 1 นิวตันเซนติเมตร ขยับขึ้นลงช้าๆ 7-8 มิลลิเมตรให้ถึงความยาวทำงานเป็นเวลา 1 นาที ตามด้วยการล้างน้ำเกลือปริมาณ 5 มิลลิลิตรเป็นเวลา 1 นาที โดยใช้เข็มล้างคลองรากฟันที่มีรูเปิดด้านข้างเกจ 27 ล้างขยับขึ้นลงในตำแหน่งที่ห่างจากปลายราก 1 มิลลิเมตร แต่รอบที่มีการใส่อุปกรณ์เอ็กซ์พีเอนโดฟินิชเชอร์ เข็มล้างจะถูกใส่ไว้ในตำแหน่งรูเปิดคลองรากฟันด้านบนลึกลงไปในคลองรากฟัน 2 มิลลิเมตรโดยไม่มีการขยับของเข็ม

กลุ่มที่ 4 (EDTA) : ล้างด้วยสารละลายอีดีทีเอความเข้มข้นร้อยละ 17 ปริมาณ 20 มิลลิลิตรเป็นเวลา 5 นาที โดยจะแบ่งล้างเป็น 5 รอบรอบละ 4 มิลลิลิตรเป็นเวลา 1 นาที โดยใช้เข็มล้างคลองรากฟันที่มีรูเปิดด้านข้างเกจ 27 ล้างขยับขึ้นลงในตำแหน่งที่ห่างจากปลายราก 1 มิลลิเมตร

ทำการซับคลองรากฟันด้วยกระดาษซับรูปกรวยแหลมหลังจากล้างคลองรากฟัน



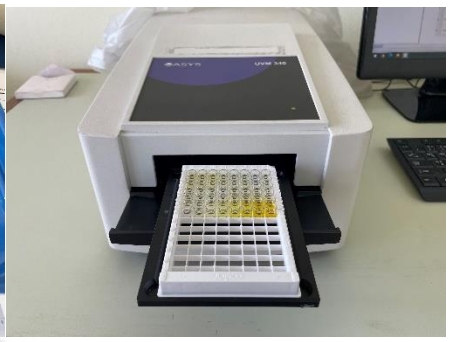
ภาพประกอบ 13 การแบ่งกลุ่มการทดลองที่มีวิธีการล้างคลองรากฟันที่แตกต่างกัน

ภาพประกอบ 14 จำลองการล้างคลองรากฟันภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส (water bath)

ขั้นตอนการตรวจวัดปริมาณทรานส์ฟอร์มมิงโกรทแฟคเตอร์-เบต้า1

เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ (Alpha minimum essential medium: α-MEM ที่เติม Penicillin และ Streptomycin ปริมาณอย่างละ 100 U/mL) 20 ไมโครลิตรลงในคลองรากฟันที่ผ่านการล้างมาแล้วและในคลองรากฟันกลุ่มควบคุม ซึ่งตัวอย่างฟันที่ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ 20 ไมโครลิตรลงในคลองรากฟันได้ไม่พอดีจะถูกคัดออก ปิดบริเวณรูเปิดคลองรากฟันด้วยพลาสติกห่อหุ้มใส ใส่ตัวอย่างฟันลงในกล่องที่มีความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 100 แล้วนำกล่องที่มีตัวอย่างฟันเข้าไปไว้ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อให้เกิดการปลดปล่อย TGF-β1 ออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ หลังจากครบ 24 ชั่วโมงทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ในคลองรากฟันขึ้นมา 11 ไมโครลิตร ซึ่งตัวอย่างฟันที่ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ได้ไม่ถึง 11 ไมโครลิตรจะถูกคัดออก แล้วจึงนำมาเจือจางกับอาหารเลี้ยงเซลล์ 110 ไมโครลิตรในไมโครทิว ได้เป็นสารละลายทั้งหมด 121 ไมโครลิตร ทำการแช่แข็งสารละลายทันทีและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เมื่อได้ตัวอย่างครบทุกกลุ่มจึงทำการละลายสารละลายที่เก็บไว้[10]และนำมาตรวจวัดปริมาณ TGF-β1 ที่ปลดปล่อยออกมาโดยใช้ชุดทดสอบอีไลซา (Human TGF-β1 Quantikine ELISA kit, R&D Systems, Minneapolis, MN) วัดค่าการดูดกลืนสีด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ 450 นาโนโมตร (Asys UVM 340, Biochrom®, Cambridge, United Kingdom) โดยจะแบ่งตรวจตัวอย่างเป็น 2 หลุมต่อ 1 ตัวอย่าง (Duplicate) ซึ่ง 1 หลุมจะใช้ปริมาณตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร เมื่อได้ค่าการดูดกลืนสีแล้วจึงนำมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานในชุดทดสอบนั้นเพื่อแปลผลเป็นค่าความเข้มข้นของ TGF-β1 (pg/mL)[37]และคูณด้วย 11 (dilution factor) เป็นค่า TGF-β1 ที่ถูกปลดปล่อยออกมาและนำไปใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล โดยกำหนดค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจได้ (detection limit) ที่ค่า

ความเข้มข้นน้อยที่สุดของ TGF-β1 ที่ชุดทดสอบอีไลซากำหนดมาในการทำกราฟมาตรฐานหารด้วย 2[10]



ภาพประกอบ 15 ชุดทดสอบอีไลซา (Human TGF-β1 Quantikine ELISA kit, R&D Systems, Minneapolis, MN) และเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Asys UVM 340, Biochrom®, Cambridge, United Kingdom)

การรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการเก็บข้อมูลค่าความเข้มข้นของ TGF-β1 ที่แปลผลได้และวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS วัดการกระจายตัวของข้อมูลโดยใช้ Shapiro-Wilk test และวัดความแปรปรวนของข้อมูลด้วย Levene's Test ทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติ One-way ANOVA และหาความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยใช้ Tukey post hoc Test ที่ค่า $P<0.05$

บทที่ 4
ผลการดำเนินงานวิจัย

ตัวอย่างฟันที่ถูกถอนจากคนไข้ที่ใช้ในการศึกษานี้ได้ผ่านขั้นตอนการชี้แจงวิธีการวิจัย และได้รับการยินยอมจากคนไข้ทุกรายให้สามารถนำฟันมาใช้ได้ อย่างไรก็ตามในคนไข้ที่อายุน้อยกว่า 18 ปีจะมีการชี้แจงและขอความยินยอมจากผู้ปกครองแทน โดยทางผู้วิจัยจะจัดทำเอกสารชี้แจงรายละเอียดการวิจัยและหากยินยอมจะให้คนไข้หรือผู้ปกครองลงชื่อกำกับในเอกสารยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย โดยจะไม่มีการเปิดเผยชื่อผู้เข้าร่วมวิจัย อีกทั้งเมื่อเก็บฟันมาแล้วจะไม่ทราบว่าฟันซี่นี้มาจากคนไข้คนใดจะรู้เพียงอายุของคนไข้ โดยโครงการวิจัยนี้ได้ผ่านการประเมินจริยธรรมจากคณะกรรมการจริยธรรมสำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ และได้รับหนังสือรับรองจริยธรรมการวิจัย หมายเลขรับรองข้อเสนอการวิจัย SWUEC/E-407/2563E

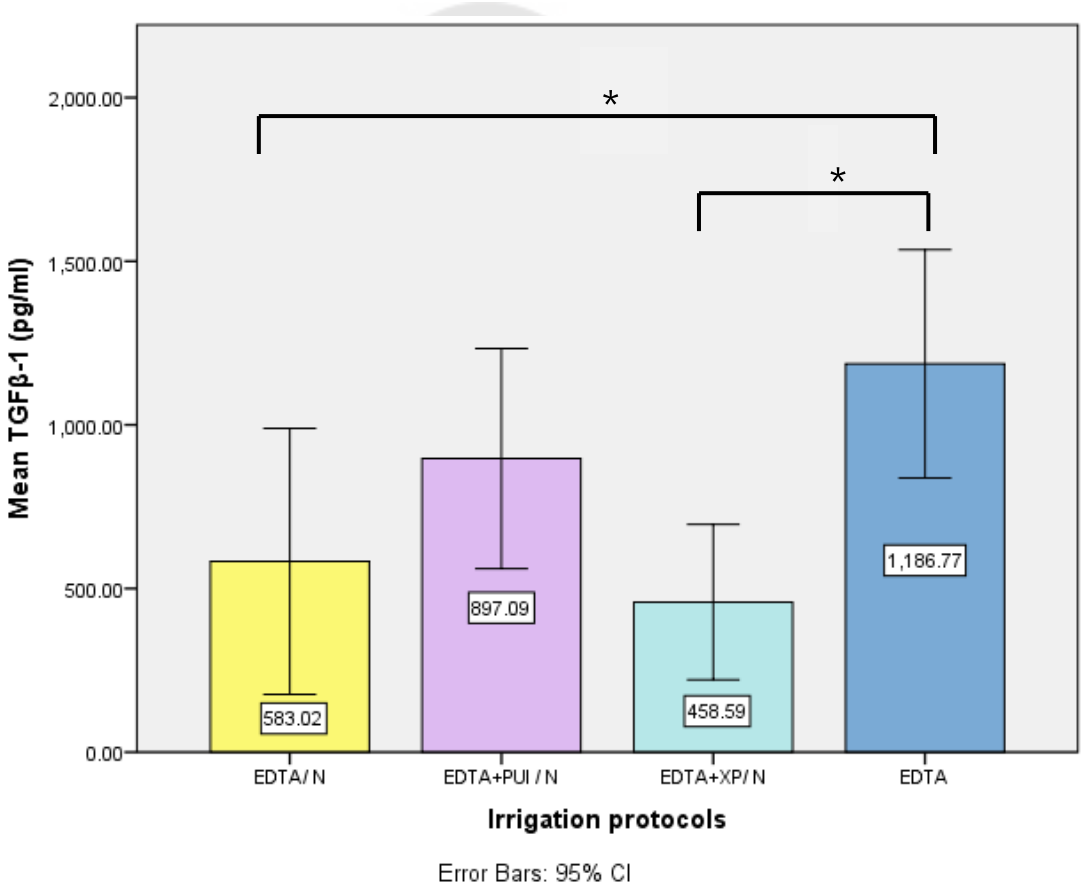
ผลการดำเนินงานวิจัยพบค่าเฉลี่ยปริมาณ TGF-β1 มากที่สุดในกลุ่มที่ 4 (EDTA) โดยมีค่าเท่ากับ 1186.77± 280.97 pg/ml ตามด้วยกลุ่มที่ 2 (EDTA+PUI/N) และกลุ่มที่ 1 (EDTA/N) ตามลำดับ และพบน้อยที่สุดในกลุ่มที่ 3 (EDTA+XP/N) โดยพบค่าเฉลี่ยปริมาณ TGF-β1 เท่ากับ 458.59±191.11pg/ml ดังแสดงในตาราง 2 ส่วนกลุ่มควบคุมไม่พบปริมาณ TGF-β1

ตาราง 2 ค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าสูงสุดและค่าต่ำสุดของปริมาณ TGF-β1 ที่ปลดปล่อยออกมาในแต่ละกลุ่ม (pg/ml)

กลุ่ม	ปริมาณ TGF-β1 (pg/ml)	Maximum	Minimum
	Mean ± SD		
EDTA/N	580.02 ± 327.26	328.68	1135.97
EDTA+PUI/N	897.09 ± 270.94	464.86	1177.11
EDTA+XP/N	458.59 ± 191.11	293.15	770.00
EDTA	1186.77 ± 280.97	789.80	1584.33

จากการวิเคราะห์ข้อมูลพบข้อมูลมีการกระจายตัวปกติและมีการเท่ากันของความแปรปรวน จึงทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) พบว่าค่าเฉลี่ยของกลุ่มการทดลองอย่างน้อย 1 กลุ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความ

เชื่อมั่นร้อยละ 95 จึงได้ปฏิเสธสมมติฐานหลักคือ วิธีล้างคลองรากฟันมีผลให้ปริมาณ TGF-β1 ที่ปลดปล่อยออกมาจากผนังคลองรากฟันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และทำการทดสอบรายคู่ต่อโดยใช้ Tukey Post Hoc Test พบว่ากลุ่มที่ 4 (EDTA) มีค่าเฉลี่ยของ TGF-β1 มากกว่ากลุ่มที่ 1 (EDTA+N) และกลุ่มที่ 3 (EDTA+XP/N) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามค่าเฉลี่ยปริมาณ TGF-β1 ในกลุ่มที่ 2 (EDTA+PUI/N) กับกลุ่มที่ 4 (EDTA) มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ค่าเฉลี่ยปริมาณ TGF-β1 ของกลุ่มที่ 1 กลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3 มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติดังแสดงในภาพประกอบ 16



ภาพประกอบ 16 แผนภูมิเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณ TGF-β1 ที่ปลดปล่อยออกมาจากผนังคลองรากฟันจำแนกตามวิธีการล้างคลองรากฟัน

เครื่องหมาย * แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

วิธีการล้างคลองรากฟันที่ต่างกันมีผลให้ปริมาณ TGF-β1 ที่ปลดปล่อยออกมาจากผนังคลองรากฟันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยการล้างคลองรากฟันด้วยสารละลายอีดีทีเอชนิดเดียวจะมีการปลดปล่อยของ TGF-β1 มากที่สุดและเมื่อล้างน้ำเกลือตามจะส่งผลให้ปริมาณ TGF-β1 ลดลง อย่างไรก็ตามหากมีการใช้อุปกรณ์เสริมระบบอัลตราโซนิกส์แบบไร้แรงร่วมด้วยขณะล้างด้วยสารละลายอีดีทีเอก่อนล้างตามด้วยน้ำเกลือจะช่วยส่งเสริมให้เกิดการปลดปล่อยของ TGF-β1 เพิ่มขึ้นจนมีปริมาณที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการล้างด้วยสารละลายอีดีทีเอเพียงชนิดเดียว

อภิปรายผล

รีเจเนอเรทีฟ เอ็นโดดอนติกส์ เป็นขบวนการรักษาการอักเสบของปลายรากฟันแท้ที่เจริญไม่สมบูรณ์ อีกทั้งยังเพิ่มความยาวและความหนาของรากฟันได้[2] ซึ่งต้องอาศัยเซลล์ต้นกำเนิดที่เข้ามาจากบริเวณปลายรากฟัน โครงข่ายจากการกระตุ้นลิ่มเลือด ร่วมกับการมีคลองรากฟันที่ปราศจากเชื้อมีสภาพแวดล้อมเหมาะสมทำให้เกิดการยึดติด เพิ่มจำนวนและการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์[4] อีกทั้งต้องมีโกรทแฟคเตอร์ที่ปลดปล่อยจากเนื้อฟันซึ่งเป็นตัวสำคัญอีกตัวหนึ่งที่ทำหน้าที่ส่งสัญญาณให้เซลล์เกิดกระบวนการเหล่านี้ จึงจะส่งผลให้เกิดผลสำเร็จของรีเจเนอเรทีฟ เอ็นโดดอนติกส์[9]

ในปัจจุบัน American Association of Endodontists (AAE) แนะนำให้ล้างคลองรากฟันด้วยสารละลายอีดีทีเอความเข้มข้นร้อยละ 17 ปริมาณ 20 มิลลิลิตรก่อนทำการกระตุ้นลิ่มเลือด[5] ส่วน European Society of Endodontology (ESE) แนะนำให้ล้างด้วยสารละลายอีดีทีเอความเข้มข้นร้อยละ 17 ปริมาณ 20 มิลลิลิตรต่อด้วยน้ำเกลือ 5 มิลลิตร[6] ซึ่งสารละลายอีดีทีเอจะทำให้เกิดการละลายของแร่ธาตุในเนื้อฟันส่งผลให้เกิดการปลดปล่อยของโกรทแฟคเตอร์[10, 36, 37] แต่จากการศึกษาของ Taweewattanapaisan และคณะในปี 2019[13] พบว่าสารละลายอีดีทีเอที่หลงเหลืออยู่นั้นส่งผลเสียต่อลิ่มเลือดซึ่งเป็นโครงข่ายในงานรีเจเนอเรทีฟ เอ็นโดดอนติกส์ โดยกลุ่มที่ล้างด้วยสารละลายอีดีทีเอความเข้มข้นร้อยละ 17 ตามด้วยน้ำเกลือจะพบลิ่มเลือดมีลักษณะของเส้นใยหนาแน่นกว่าและเซลล์เม็ดเลือดแดงมีความปกติมากกว่า อย่างไรก็ตามการล้างต่อด้วยน้ำเกลือจะส่งผลให้ปริมาณโกรทแฟคเตอร์ที่ปลดปล่อยออกมาลดลง[14] ซึ่งหากมีการใช้ระบบ

อัลตราโซนิกส์แบบไร้แรงช่วยเสริมในการล้างคลองรากฟันจะส่งผลให้ปริมาณโกรทแฟคเตอร์ TGF-β1 เพิ่มขึ้น[14] นอกจากนี้ยังมีอุปกรณ์เสริมประสิทธิภาพการล้างคลองรากฟันตัวอื่นเช่น เอ็กซ์พีเอนโดฟินิชเชอร์ซึ่งช่วยในการกำจัดยาที่ใส่ในคลองรากฟัน[65, 66] แผ่นชีวภาพ (Biofilm)[16] และชั้นสเมียร์[17, 67]ได้ ซึ่งจะช่วยส่งเสริมให้เกิดการเผยผึ่งของท่อเนื้อฟันและอาจส่งเสริมการปลดปล่อยของโกรทแฟคเตอร์ โดยจากการศึกษาของ Cameron และคณะในปี 2019[68]พบว่าแผ่นชีวภาพ (Biofilm) ที่หลงเหลืออยู่ในคลองรากฟันจะบดบังเนื้อฟันไม่ให้สัมผัสกับน้ำยาล้างคลองรากฟันและขัดขวางการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์ อีกทั้งยังปลดปล่อยเอนไซม์โปรติเอส (proteases) ไปทำลายโกรทแฟคเตอร์ อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีการศึกษาผลของเอ็กซ์พีเอนโดฟินิชเชอร์ต่อการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์

โกรทแฟคเตอร์ที่ปลดปล่อยจากเนื้อฟันนั้นมีหลายตัว ซึ่งการศึกษานี้ได้เลือกศึกษาปริมาณ TGF-β1 เนื่องจากเป็นโกรทแฟคเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานภายในเซลล์ที่หลากหลาย เช่น การเจริญของเซลล์ (Cell growth),การสร้างเมทริกซ์ (Matrix synthesis)[46] ช่วยให้เกิดการเจริญของเส้นเลือด (Vessel maturation)[47]และมีความสำคัญอย่างยิ่งในการเกิดการสะสมแร่ธาตุและการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ต้นกำเนิดไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อฟัน[11] นอกจากนี้ยังมีผลเรียกเซลล์ (Chemotactic effect) ที่ได้มาจากเนื้อเยื่อกำเนิดฟัน (Dental papilla-derived cell)[12] อีกทั้งยังมีการปลดปล่อยออกมาจากเนื้อฟันรอบท่อ (peritubular tubule)[59]ในปริมาณที่สามารถตรวจพบได้ [10, 36]

วิธีการศึกษาการปลดปล่อยของโกรทแฟคเตอร์ที่ผ่านมามีหลายวิธีทั้งใช้เนื้อฟันที่เป็นผงบดละเอียด[43-45, 58] หรือเนื้อฟันที่ถูกตัดออกมาจากส่วนรากฟันหรือตัวฟันให้ได้ขนาดที่กำหนด (Dentin disk)[10, 35, 38] แล้วนำมาแช่ในสารต่างๆที่ต้องการศึกษาเพื่อให้เกิดการปลดปล่อยของโกรทแฟคเตอร์ แล้วจึงนำสารนั้นไปวัดปริมาณโกรทแฟคเตอร์ อย่างไรก็ตามทั้งสองวิธีนี้ไม่สอดคล้องกับลักษณะการล้างคลองรากฟันในการทำรีเจเนอเรทีฟ เอ็นโดดอนติกส์ทางคลินิก

การศึกษานี้จึงเลือกใช้วิธีการจำลองคลองรากฟันที่เจริญไม่สมบูรณ์ (root canal model) ซึ่งการเตรียมตัวอย่างฟัน การจำลองการล้างคลองรากฟันและการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์จะถูกปรับเปลี่ยนมาจากการศึกษาของ Chae และคณะในปี 2018[37] ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถเลียนแบบสภาวะทางคลินิกในการทำรีเจเนอเรทีฟ เอ็นโดดอนติกส์ และปริมาณ TGF-β1 ที่วัดได้จะมาจากการปลดปล่อยออกมาจากผนังคลองรากฟันเท่านั้น[36, 37] การเตรียมตัวอย่างฟันในการศึกษานี้จะตัดบริเวณตัวฟันและปลายรากฟันออกให้มีความยาว 10 มิลลิเมตรเท่ากัน แล้วทำการเตรียมคลองรากฟันให้มีขนาดรูเปิดปลายรากฟันที่ 1.1 มิลลิเมตร เพื่อควบคุมให้ตัวอย่างฟันให้เป็น

มาตรฐาน จำลองลักษณะรากฟันที่มีการเจริญอยู่ในช่วงที่ 4 ตามการแบ่งของ Cvek[64] เนื่องจากขนาดของรูเปิดปลายรากฟันจะส่งผลต่อความสำเร็จในการทำรีเจเนอเรทีฟ เอ็นโดดอนติกส์[71] โดยไม่ควรมีรูเปิดปลายรากฟันกว้างน้อยกว่า 1 มิลลิเมตร[72] ซึ่งจะเลือกใช้ฟันกรามน้อยล่างแท้รากเดียว 1 คลองรากฟันที่เจริญเต็มที่ของมนุษย์ ไม่มีรอยผุและวัสดุอุด และถูกถอนมาจากคนไข้ที่อยู่ในช่วงอายุ 16-25 ปี เนื่องจากอายุเป็นปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อปริมาณท่อเนื้อฟันโดยอายุที่เพิ่มขึ้นจะส่งผลเกิดการสะสมแร่ธาตุที่เพิ่มขึ้นทำให้จำนวนท่อเนื้อฟันลดลง[69] ซึ่งจะส่งผลต่อปริมาณเมตริกซ์โปรตีน (matrix protein) ในเนื้อฟันรอบท่อ[70] โดยจากการศึกษาของ Ivica และคณะในปี 2020[59] พบว่าฟันที่มีการเจริญของรากสมบูรณ์แต่อยู่ในช่วงอายุ 17±1 ปี จะสามารถปลดปล่อย TGF-β1 ได้ไม่แตกต่างจากฟันที่มีการเจริญของรากไม่สมบูรณ์ (Immature tooth) และปริมาณของ TGF-β1 มีความสัมพันธ์กับเนื้อฟันรอบท่อ (peritubular dentin) โดยบริเวณเนื้อฟันที่ไม่มีท่อเนื้อฟัน (nontubular dentin) จะไม่พบ TGF-β1 อย่างไรก็ตามจากผลการศึกษานำร่อง (pilot study) ช่วงอายุที่กำหนดในการศึกษานี้ไม่มีผลต่อปริมาณ TGF-β1 ที่ปลดปล่อยออกมา

ฟันที่ถูกถอนและตรงตามเกณฑ์การคัดเลือกจะถูกนำมาเตรียมคลองรากฟันทันทีหลังจากถอน ซึ่งหากไม่สามารถนำมาใช้ได้ทันทีฟันจะถูกเก็บไว้ได้ในอุณหภูมิ 4 องศาไม่เกิน 2 วัน[62] เพื่อที่จะคงสภาพเนื้อฟันหลังถอนฟันให้มีองค์ประกอบเหมือนขณะอยู่ในช่องปาก เนื่องจากเนื้อฟันเป็นแหล่งสะสมของโกรทแฟคเตอร์ โดยระหว่างการพัฒนาของฟันโกรทแฟคเตอร์จะถูกสร้างและเก็บไว้ในเนื้อฟัน (Dentine matrix) โดยสร้างพันธะกับแร่ธาตุในเนื้อฟันในรูปที่ไม่สามารถใช้งานได้ (Inactive form)[34]เพื่อหลีกเลี่ยงไม่ให้โกรทแฟคเตอร์ถูกย่อยสลายและมีอายุได้นานขึ้น โดยยังคงความสามารถในการส่งสัญญาณต่างๆได้อยู่ และโกรทแฟคเตอร์จะถูกปลดปล่อยออกมาในรูปที่ใช้งานได้ใหม่โดยสารที่ทำให้เกิดการละลายของแร่ธาตุในเนื้อฟัน (Demineralization agent) เช่นสารละลายอีดีทีเอ [10, 35, 36] ,กรดซิตริก (citric acid)[37, 38], กรดฟอสฟอริก (phosphoric acid)[37]และกรดแลคติดจากโรคฟันผุ (Lactic acid)[39, 40]

วิธีการเก็บตัวอย่างที่นำมาตรวจหาปริมาณ TGF-β1 จะถูกปรับเปลี่ยนไปจากการศึกษาของ Chae โดยการศึกษานี้จะทำการใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาณ 20 ไมโครลิตรไว้ในคลองรากฟัน ซึ่งทุกตัวอย่างต้องใส่ได้พอดีเพื่อเป็นการควบคุมปริมาตรคลองรากฟันให้ใกล้เคียงกัน หลังจากทิ้งไว้ในความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 100 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเพื่อเลียนแบบสภาวะในช่องปากเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เนื่องจากการศึกษาของ Zeng และคณะในปี 2016[36] พบการปลดปล่อย TGF-β1 มากที่สุดที่ 1 วัน แล้วจึงดูดสารละลายออกมาจากคลองรากฟัน 11 ไมโครลิตรซึ่งเป็น

ตัวเลขที่ได้จากการศึกษานำร่อง นำมาเจือจางกับอาหารเลี้ยงเซลล์ให้ได้ปริมาณ 121 ไมโครลิตร ซึ่งพอดีกับปริมาณที่ใช้การทดสอบอีไลซาที่ต้องการ100 ไมโครลิตร วิธีการนี้จะช่วยลดอัตราส่วนการเจือจาง ทำให้สามารถหาอัตราส่วนการเจือจางได้ (dilution factor) และพบปริมาณ TGF-β1 ที่ถูกต้องมากกว่าวิธีการในการศึกษาของ Chae ที่นำตัวอย่างฟันที่ถูกเตรียมและล้างแล้วมาแช่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาณ 1 มิลลิลิตรแล้วรอให้เกิดการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์แล้วจึงนำตัวอย่างอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์แล้วไปทดสอบอีไลซาเพื่อหาปริมาณ TGF-β1[37] อย่างไรก็ตามปริมาณ TGF-β1 ที่วัดได้จากการศึกษานี้มาจากการปลดปล่อยจากผนังคลองรากฟันที่ถูกเตรียมมาแล้วเท่านั้น และไม่ได้ทำการวัดปริมาณ TGF-β1 ที่อาจติดอยู่บนผนังคลองรากฟัน ซึ่งปริมาณของ TGF-β1 นั้นมีความสัมพันธ์กับเนื้อฟันรอบท่อ (peritubular dentin)[59] การเตรียมคลองรากฟันเพื่อจำลองลักษณะรากฟันที่เจริญไม่สมบูรณ์ในการศึกษานี้จึงอาจไม่ได้ส่งผลต่อการปลดปล่อย TGF-β1 ในการศึกษานี้

การศึกษานี้ได้ใช้ชุดทดสอบอีไลซา (Human TGF-β1 Quantikine ELISA kit, R&D Systems, Minneapolis, MN) ซึ่งอาศัยหลักการของแซนวิชอีไลซา (Sandwich ELISA) โดยหลุมที่ใส่ตัวอย่างจะถูกเคลือบด้วยแอนติ้บอดี้ตัวแรกที่มีความจำเพาะกับ TGF-β1 (Monoclonal antibody specific for TGF-β1) เมื่อใส่สารตัวอย่างเข้าไป TGF-β1 ในสารตัวอย่างจะไปจับกับแอนติ้บอดี้ที่ถูกเคลือบไว้หลังจากนั้นจะใส่แอนติ้บอดี้ตัวที่สองที่ปิดฉลากด้วยเอมไซม์และจำเพาะกับ TGF-β1 (Enzyme-linked polyclonal antibody specific for TGF-β1) หลังจากใส่สารเริ่มต้นปฏิกิริยาลงไป (Substrate) จะส่งผลให้เกิดปฏิกิริยากับเอมไซม์ที่ติดกับแอนติ้บอดี้ตัวที่สองส่งผลให้เกิดเป็นสีแสดงขึ้น[60] ทำการวัดค่าการดูดกลืนสีด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ แล้วนำค่าการดูดกลืนสีมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานและคูณด้วยอัตราส่วนการเจือจางจะได้เป็นปริมาณโมเลกุลของ TGF-β1ที่ปลดปล่อยออกมา ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการแบ่งตรวจตัวอย่างเป็น 2 หลุมต่อ 1 ตัวอย่าง (Duplicate) ซึ่งเพียงพอต่อการตรวจสอบข้อผิดพลาดในชุดทดสอบหรือข้อผิดพลาดระหว่างทำการทดสอบ เนื่องจากชุดทดสอบที่ใช้มีการเคลือบหลุมทดสอบด้วยแอนติ้บอดี้ตัวแรกจากโรงงาน จึงเป็นการช่วยลดขั้นตอนที่อาจเกิดความผิดพลาดจากผู้วิจัยเอง อีกทั้งชุดทดสอบมีความจำเพาะและแม่นยำสูงในการตรวจจับหา TGF-β1 ข้อมูลที่ได้จึงมีคุณภาพและความน่าเชื่อถือที่เพียงพอ[73] โดยข้อมูลของผลการศึกษานี้พบค่าการดูดกลืนสีของทั้งสองหลุมในทุกตัวอย่างมีค่าที่ใกล้เคียงกันมาก

ผลการศึกษาพบว่าวิธีการล้างคลองรากฟันที่ต่างกันส่งผลต่อการปลดปล่อย TGF-β1 โดยกลุ่มที่ล้างคลองรากฟันด้วยสารละลายอีดีทีเอเพียงอย่างเดียวพบการปลดปล่อยของ TGF-β1

มากที่สุด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มที่ล้างด้วยสารละลายอีดีทีเอตามด้วยน้ำเกลือ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Widbiller และคณะในปี 2017[14] ที่พบว่าการล้างน้ำเกลือตามจะส่งผลให้ปริมาณ TGF-β1 ลดลง อาจเนื่องมาจากน้ำเกลือที่เป็นตัวชะล้างทั้งสารละลายอีดีทีเอที่หลงเหลืออยู่และ TGF-β1 ที่ถูกปลดปล่อยออกมาขณะล้างด้วยสารละลายอีดีทีเอ อีกทั้งน้ำเกลือไม่ได้เป็นสารคีเลตจึงไม่สามารถละลายสารอนินทรีย์และทำให้เกิดการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์ได้ อย่างไรก็ตามการล้างน้ำเกลือเพื่อชะล้างสารละลายอีดีทีเอที่หลงเหลืออยู่นั้นจะส่งผลดีทั้งต่อเซลล์ต้นกำเนิด[74, 75]และลิ่มเลือดที่เป็นโครงข่าย[13] ทั้งสามารถส่งเสริมความมีชีวิต[75]และการยึดเกาะของเซลล์[74] ช่วยให้ลิ่มเลือดมีลักษณะของเส้นใยที่หนาแน่นกว่าและเซลล์เม็ดเลือดแดง (Erythrocyte) มีความปกติมากกว่า[13] เนื่องจากสารละลายอีดีทีเอยังคงมีความเป็นกรดและเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่าน้ำเกลือ[76] อีกทั้งยังไปยับยั้งการสร้างเส้นใยในลิ่มเลือด[77]และเพิ่มเวลาในการแข็งตัวของลิ่มเลือด (clotting time)[78]

ระบบอัลตราโซนิกส์แบบไร้แรงเป็นอุปกรณ์ช่วยเสริมประสิทธิภาพการล้างคลองรากฟัน โดยระบบอัลตราโซนิกส์แบบไร้แรงจะเปลี่ยนพลังงานไฟฟ้าเป็นคลื่นอัลตราโซนิกส์ ส่งผ่านพลังงานจากการสั่นไปยังไฟล์และน้ำยาล้างคลองรากฟันโดยที่ไม่มีการสัมผัสคลองรากฟัน ทำให้เกิดปรากฏการณ์อะคูสติกสตรีมมิง (Acoustic streaming) และเคาวิเตชัน (Cavitation) การเคลื่อนที่ของของเหลวจะทำให้เกิดเป็นแรงเฉือนบนผนังคลองรากฟันช่วยในการทำความสะอาดคลองรากฟัน อีกทั้งคลื่นอะคูสติกยังช่วยส่งเสริมคุณสมบัติของสารละลายอีดีทีเอในการปลดปล่อย TGF-β1[75] โดยก่อให้เกิดการไหลเวียนของน้ำยาล้างคลองรากฟันส่งเสริมให้น้ำยาล้างคลองรากฟันไหลเวียนเข้าไปในท่อเนื้อฟันในส่วนที่ลึกได้[79-82] โดยจากการศึกษาของ Li และคณะในปี 2020[82] พบว่าการใช้อุปกรณ์ระบบอัลตราโซนิกส์แบบไร้แรงร่วมกับการล้างคลองรากฟันด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์และอีดีทีเอพบว่าสามารถกำจัดแบคทีเรียที่อยู่ลึกลงไปในท่อเนื้อฟันได้เฉลี่ย 152 ไมโครเมตร ซึ่งการไหลเวียนของน้ำยาล้างคลองรากฟันเข้าไปในท่อเนื้อฟันจะช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวที่สารละลายอีดีทีเอสัมผัสกับเนื้อฟันรอบท่อซึ่งเป็นแหล่งสะสมของ TGF-β1 และอาจเป็นผลที่ทำให้การศึกษานี้พบว่าการใช้อุปกรณ์เสริมด้วยระบบอัลตราโซนิกส์แบบไร้แรงร่วมด้วยขณะล้างด้วยสารละลายอีดีทีเอก่อนล้างตามด้วยน้ำเกลือจะช่วยส่งเสริมให้เกิดการปลดปล่อยของ TGF-β1 เพิ่มขึ้นทำให้พบปริมาณ TGF-β1 ได้ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการล้างด้วยสารละลายเอดีทีเอเพียงชนิดเดียว สอดคล้องกับการศึกษาของ Widbiller และคณะในปี 2017[14] Aksel และคณะในปี 2020[75]และ Hancerliogullar และคณะในปี 2021[83] นอกจากนี้การศึกษา ของ Aksel และคณะในปี 2020[75] ยังพบว่าการใช้ระบบอัลตราโซนิกส์แบบ

ไร้แรงเสริมในขณะล้างคลองรากฟันจะช่วยเพิ่มความมีชีวิตของเซลล์ มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์และเกิดการเคลื่อนย้ายของเซลล์เพิ่มขึ้น ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจาก TGF-β1 ที่คอยส่งสัญญาณให้กับเซลล์

เอ็กซ์พีเอนโดฟินิชเชอร์ที่ใช้ในงานเอ็นโดดอนติกส์เป็นอุปกรณ์เสริมอีกชนิดที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการล้างคลองรากฟัน [16, 17, 65-67] เครื่องมือเป็นไฟล์นิกเกิลไทเทเนียมทำจากอัลลอยชนิดแมกซ์ไวร์ (Max wire alloy) มีความยืดหยุ่นสูงและสามารถเปลี่ยนรูปร่างตามอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลง โดยที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เครื่องมือจะอยู่ในมาร์เทนไซต์เฟส (Martensite phase) คือมีลักษณะเป็นเส้นตรง แต่เมื่อเครื่องมือเข้าไปในคลองรากฟันที่อุณหภูมิร่างกาย (37 องศาเซลเซียส) เครื่องมือจะเปลี่ยนมาอยู่ในออสทิไนท์เฟส (Austenite phase) ซึ่งจะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นลักษณะคล้ายข้อนโดยอาศัยคุณสมบัติจดจำรูปร่าง (shape-memory effect) ของไฟล์นิกเกิลไทเทเนียม และเมื่อเคลื่อนที่ขึ้นลงในคลองรากฟัน ไฟล์จะสะบัดเป็นวงกว้างเข้าไปสัมผัสกับผนังคลองรากฟันในการทำความสะอาดคลองรากฟันโดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างคลองรากฟันเดิม[18]

อย่างไรก็ตามจากการศึกษานี้พบว่าการใช้เอ็กซ์พีเอนโดฟินิชเชอร์ร่วมด้วยขณะล้างด้วยสารละลายอีดีทีเอก่อนล้างตามด้วยน้ำเกลือพบปริมาณ TGF-β1 ที่ปลดปล่อยออกมาน้อยที่สุดและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มที่ล้างด้วยสารละลายอีดีทีเอเพียงชนิดเดียว อาจเนื่องมาจากกลไกการทำงานของเอ็กซ์พีเอนโดฟินิชเชอร์ที่อาศัยการสัมผัสของเครื่องมือกับผนังคลองรากฟันแต่ไม่ได้ส่งเสริมให้เกิดการไหลเวียนของน้ำยาล้างคลองรากฟันเข้าไปในท่อเนื้อฟันส่วนที่ลึกมากขึ้น โดยจากการศึกษาของ Azim และคณะในปี 2016[84] ที่ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการล้างคลองรากฟัน 4 วิธีต่อการกำจัดแบคทีเรียในท่อเนื้อฟัน พบว่าการล้างคลองรากฟันด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ร่วมกับเอ็กซ์พีเอนโดฟินิชเชอร์จะสามารถกำจัดแบคทีเรียได้ดีในบริเวณคลองรากฟันหลักและส่วนต้นของท่อเนื้อฟันลึกไม่เกิน 50 ไมโครเมตร แต่ในท่อเนื้อฟันส่วนลึกลงไปการใช้อุปกรณ์เลเซอร์ปล่อยพลังงานให้กับน้ำยาล้างคลองรากฟัน (Photon-induced photoacoustic streaming, PIPS) จะช่วยกำจัดเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่า เนื่องจากพลังจากเลเซอร์จะทำให้น้ำยาล้างคลองรากฟันเกิดเป็นคลื่นกระแทกที่มีพลัง (powerful shock wave) ส่งผลให้มีการเคลื่อนไหวของน้ำยาล้างคลองรากฟันจนสามารถเกิดปรากฏการณ์โฟโต้อะคูสติกสตรีมมิงและเควิเตชัน น้ำยาล้างคลองรากฟันสามารถแทรกซึมเข้าไปในท่อเนื้อฟันได้ลึกมากกว่า จึงแสดงให้เห็นว่าอุปกรณ์เอ็กซ์พีเอนโดฟินิชเชอร์ช่วยให้เกิดการไหลเวียนของน้ำยาล้างคลองรากฟันแทรกซึมเข้าไปในท่อเนื้อฟันได้แค่ส่วนต้นเท่านั้น

อีกทั้งในการศึกษานี้อุปกรณ์เอ็กซ์พีเอนโดฟินิชเซอร์จะถูกใช้ร่วมกับการล้างคลองรากฟันด้วยสารละลายอีดีทีเอโดยจะทำการขยับอุปกรณ์ขึ้นลง 7-8 มิลลิเมตรติดต่อกันเป็นเวลา 1 นาที ตามคำแนะนำของบริษัท แต่อุปกรณ์อัลตราโซนิกส์แบบไร้แรงจะถูกใช้กระตุ้นสารละลายอีดีทีเอ 3 รอบ รอบละ 20 วินาที ทำให้เกิดการไหลเวียนของน้ำยาล้างคลองรากฟันที่สดใหม่เข้าไปในทุกรอบของการใช้อุปกรณ์เสริม เนื่องจากสารละลายอีดีทีเอเป็นน้ำยาล้างคลองรากฟันที่มีประสิทธิภาพการใช้งานที่จำกัด เมื่อสารละลายอีดีทีเอจับกับแคลเซียมแล้วจะเกิดเป็นโมเลกุลที่มีความเสถียรและจะหยุดกระบวนการสลายแร่ธาตุ[48, 53] ดังนั้นการมีสารละลายอีดีทีเอที่สดใหม่จึงจะส่งเสริมกระบวนการสลายแร่ธาตุและนำมาซึ่งการปลดปล่อยของ TGF-β1 ที่มากกว่า สอดคล้องกับการศึกษาของ Bao และคณะในปี 2017[16] และการศึกษาของ Van der sluis.ในปี 2009[85] และปี 2010[86] พบว่าการล้างคลองรากฟันร่วมกับใช้อุปกรณ์เสริมเป็นระยะเวลาสั้นสั้นแต่ทำซ้ำหลายรอบจะส่งเสริมประสิทธิภาพในการล้างมากกว่าการใช้รอบเดียวเป็นระยะเวลายาว[87]

ดังนั้นจากผลการศึกษาที่พบว่าการใช้อุปกรณ์เสริมด้วยระบบอัลตราโซนิกส์แบบไร้แรงร่วมด้วยขณะล้างด้วยสารละลายอีดีทีเอก่อนล้างตามด้วยน้ำเกลือพบปริมาณ TGF-β1 ได้ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการล้างด้วยสารละลายเอดีทีเอเพียงชนิดเดียว อาจนำมาใช้เป็นข้อมูลประกอบเพื่อช่วยในการตัดสินใจเลือกวิธีการล้างคลองรากฟันเพื่อให้เกิดผลสำเร็จของการทำรีเจเนอเรทีฟ เอ็นโดดอนติกส์มากที่สุด

ข้อเสนอแนะ

เป้าหมายของการรักษาด้วยวิธีรีเจเนอเรทีฟ เอ็นโดดอนติกส์ คือเพื่อให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อใหม่แทนที่เนื้อเยื่อที่ถูกทำลายไป ทำให้เซลล์ในพัลพ์เดนทีนคอมเพล็กซ์ (Pulp-dentin complex) สามารถกลับมาทำหน้าที่ได้ใหม่และมีการเจริญต่อของรากฟัน ซึ่งจะต้องอาศัยปัจจัยหลักคือ เซลล์ต้นกำเนิด โกรทแฟคเตอร์ และโครงข่าย เพื่อส่งเสริมให้เซลล์ต้นกำเนิดเกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพ (differentiation) ไปเป็นเซลล์ที่จำเพาะในการทำหน้าที่เหล่านี้ ซึ่งการวัดผลการปลดปล่อยปริมาณโกรทแฟคเตอร์ TGF-β1 นั้นเป็นเพียงปัจจัยเบื้องต้นที่มีผลต่อความสำเร็จ ดังนั้นควรมีการศึกษาต่อเนื่องถึงผลของวิธีการล้างคลองรากฟันต่อการเคลื่อนย้ายของเซลล์ (migration) การเกิดการยึดเกาะของเซลล์ (attachment) การเพิ่มจำนวนของเซลล์ (proliferation) และการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ต้นกำเนิด (differentiation) ไปเป็นเซลล์ที่จำเพาะ ซึ่งเป็นสิ่งที่ต้องการให้เกิดอย่างแท้จริงในการทำรีเจเนอเรทีฟ เอ็นโดดอนติกส์

บรรณานุกรม

1. Bose R, Nummikoski P, Hargreaves K. A retrospective evaluation of radiographic outcomes in immature teeth with necrotic root canal systems treated with regenerative endodontic procedures. Journal of Endodontics. 2009;35(10):1343-9.

2. Jeeruphan T, Jantarat J, Yanpiset K, Suwannapan L, Khewsawai P, Hargreaves KM. Mahidol Study 1: Comparison of radiographic and survival outcomes of immature teeth treated with either regenerative endodontic or apexification methods: A retrospective study. Journal of Endodontics. 2012;38(10):1330-6.

3. Andreasen JO, Farik B, Munksgaard EC. Long-term calcium hydroxide as a root canal dressing may increase risk of root fracture. Dental Traumatology. 2002;18(3):134-7.

4. Diogenes A, Henry MA, Teixeira FB, Hargreaves KM. An update on clinical regenerative endodontics. Endodontic Topics. 2013;28(1):2-23.

5. AAE clinical considerations for a regenerative procedure. Revised 4/1/2018 [Internet]. 2018 [cited 17 May 2020]. Available from: https://www.aae.org/specialty/wp-content/uploads/sites/2/2018/06/ConsiderationsForRegEndo_AsOfApril2018.pdf.

6. Galler KM, Krastl G, Simon S, Van Gorp G, Meschi N, Vahedi B, et al. European Society of Endodontology position statement: Revitalization procedures. International Endodontic Journal. 2016;49(8):717-23.

7. Lovelace TW, Henry MA, Hargreaves KM, Diogenes A. Evaluation of the delivery of mesenchymal stem cells into the root canal space of necrotic immature teeth after clinical regenerative endodontic procedure. Journal of Endodontics. 2011;37(2):133-8.

8. Banchs F, Trope M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: New Ttreatment protocol? Journal of Endodontics. 2004;30(4):196-200.

9. Murray PE, Garcia-Godoy F, Hargreaves KM. Regenerative endodontics: A review of current status and a call for action. Journal of Endodontics. 2007;33(4):377-90.

10. Galler KM, Buchalla W, Hiller K-A, Federlin M, Eidt A, Schiefersteiner M, et al. Influence of root canal disinfectants on growth factor release from dentin. Journal of Endodontics. 2015;41(3):363-8.

11. Li Y, Lü X, Sun X, Bai S, Li S, Shi J. Odontoblast-like cell differentiation and dentin formation induced with TGF-β1. Archives of Oral Biology. 2011;56(11):1221-9.

12. Kwon S-M, Kim S-A, Yoon J-H, Ahn S-G. Transforming growth factor β1–Induced heat shock protein 27 activation promotes migration of mouse dental papilla–derived MDPC-23 cells. Journal of Endodontics. 2010;36(8):1332-5.

13. Taweewattanapaisan P, Jantarat J, Ounjai P, Janebodin K. The effects of EDTA on blood clot in regenerative endodontic procedures. Journal of Endodontics. 2019;45(3):281-6.

14. Widbiller M, Eidt A, Hiller K-A, Buchalla W, Schmalz G, Galler KM. Ultrasonic activation of irrigants increases growth factor release from human dentine. Clinical Oral Investigations. 2017;21(3):879-88.

15. Van der Sluis L, Versluis M, Wu M, Wesselink P. Passive ultrasonic irrigation of the root canal: a review of the literature. International endodontic journal. 2007;40(6):415-26.

16. Bao P, Shen Y, Lin J, Haapasalo M. In Vitro Efficacy of XP-endo Finisher with 2 Different Protocols on Biofilm Removal from Apical Root Canals. Journal of Endodontics. 2017;43(2):321-5.

17. Xin Y, Yang J, Song K. In vitro evaluation of the effectiveness of XP-endo Finisher file on smear layer removal after root canal instrumentation. West China journal of stomatology. 2019;37(1):48-52.

18. Gavini G, Santos Md, Caldeira CL, Machado MEdL, Freire LG, Iglecias EF, et al. Nickel–titanium instruments in endodontics: a concise review of the state of the art. Brazilian oral research. 2018;32.

19. Trope M. Treatment of the immature tooth with a non–vital pulp and apical periodontitis. Dental Clinics. 2010;54(2):313-24.

20. Hargreaves KM, Giesler T, Henry M, Wang Y. Regeneration potential of the young permanent tooth: what does the future hold? Pediatric dentistry. 2008;30(3):253-60.

21. Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry–part I: stem cell sources. Journal of prosthodontic research. 2012;56(3):151-65.

22. Huang GTJ. A paradigm shift in endodontic management of immature teeth:

Conservation of stem cells for regeneration. Journal of Dentistry. 2008;36(6):379-86.

23. Saber SE-DM. Tissue engineering in endodontics. Journal of Oral Science. 2009;51(4):495-507.

24. Huang GTJ, Sonoyama W, Liu Y, Liu H, Wang S, Shi S. The hidden treasure in apical papilla: The potential role in pulp/dentin regeneration and BioRoot engineering. Journal of Endodontics. 2008;34(6):645-51.

25. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: A pilot study. Journal of Endodontics. 2008;34(2):166-71.

26. Östby BN. The role of the blood clot in endodontic therapy an experimental histologic study. Acta Odontologica Scandinavica. 1961;19(3-4):323-53.

27. Ding RY, Cheung GS-p, Chen J, Yin XZ, Wang QQ, Zhang CF. Pulp revascularization of immature teeth with apical periodontitis: A clinical study. Journal of Endodontics. 2009;35(5):745-9.

28. Iwaya S-i, Ikawa M, Kubota M. Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. Dental Traumatology. 2001;17(4):185-7.

29. Wang X, Thibodeau B, Trope M, Lin LM, Huang GTJ. Histologic characterization of regenerated tissues in canal space after the revitalization/revascularization procedure of immature dog teeth with apical periodontitis. Journal of Endodontics. 2010;36(1):56-63.

30. Yamauchi N, Nagaoka H, Yamauchi S, Teixeira FB, Miguez P, Yamauchi M. Immunohistological characterization of newly formed tissues after regenerative procedure in immature dog teeth. Journal of Endodontics. 2011;37(12):1636-41.

31. Narang I, Mittal N, Mishra N. A comparative evaluation of the blood clot, platelet-rich plasma, and platelet-rich fibrin in regeneration of necrotic immature permanent teeth: a clinical study. Contemporary clinical dentistry. 2015;6(1):63.

32. Torabinejad M, Turman M. Revitalization of tooth with necrotic pulp and open apex by using platelet-rich plasma: A case report. Journal of Endodontics. 2011;37(2):265-8.

33. Murray PE, Smith AJ. Saving pulps—a biological basis. An overview. Primary Dental Care. 2002;9(1):21-6.

34. Smith AJ, Scheven BA, Takahashi Y, Ferracane JL, Shelton RM, Cooper PR. Dentine as a bioactive extracellular matrix. Archives of Oral Biology. 2012;57(2):109-21.

35. Goncalves LF, Fernandes AP, Cosme-Silva L, Colombo FA, Martins NS, Oliveira TM, et al. Effect of EDTA on TGF-β1 released from the dentin matrix and its influence on dental pulp stem cell migration. Brazilian oral research. 2016;30(1).

36. Zeng Q, Nguyen S, Zhang H, Chebrolu HP, Alzebdeh D, Badi MA, et al. Release of growth factors into root canal by irrigations in regenerative endodontics. Journal of Endodontics. 2016;42(12):1760-6.

37. Chae Y, Yang M, Kim J. Release of TGF-β1 into root canals with various final irrigants in regenerative endodontics: an in vitro analysis. International Endodontic Journal. 2018;51(12):1389-97.

38. Ivica A, Zehnder M, Mateos JM, Ghayor C, Weber FE. Biomimetic conditioning of human dentin using citric acid. Journal of Endodontics. 2019;45(1):45-50.

39. Dung SZ, Gregory RL, Li Y, Stookey GK. Effect of lactic acid and proteolytic enzymes on the release of organic matrix components from human root dentin. Caries Research. 1995;29(6):483-9.

40. Magloire H, Romeas A, Melin M, Couble M-L, Bleicher F, Farges J-C. Molecular regulation of odontoblast activity under dentin injury. Advances in Dental Research. 2001;15(1):46-50.

41. KM H. Regenerative endodontic. In: Hargreaves KM CS, editor. Cohen's Pathways of the pulp. 10 ed: Mosby Elsevier; 2011.

42. Widbiller M, Austah O, Lindner SR, Sun J, Diogenes A. Neurotrophic Proteins in Dentin and Their Effect on Trigeminal Sensory Neurons. Journal of endodontics. 2019;45(6):729-35.

43. Cassidy N, Fahey M, Prime S, Smith A. Comparative analysis of transforming growth factor-β isoforms 1–3 in human and rabbit dentine matrices. Archives of oral biology. 1997;42(3):219-23.

44. Finkelman RD, Mohan S, Jennings JC, Taylor AK, Jepsen S, Baylink DJ. Quantitation of growth factors IGF-I, SGF/IGF-II, and TGF-β in human dentin. Journal of

Bone and Mineral Research. 1990;5(7):717-23.

45. Roberts-Clark D, Smith A. Angiogenic growth factors in human dentine matrix. Archives of oral biology. 2000;45(11):1013-6.

46. Taipale J, Saharinen J, Keski-Oja J. Extracellular matrix-associated transforming growth factor-β: Role in cancer cell growth and invasion. In: Vande Woude GF, Klein G, editors. Advances in Cancer Research. 75: Academic Press; 1998. p. 87-134.

47. Gomez-Sosa J, Caviedes-Bucheli J, Diaz-Barrera L, Munoz H. Gene expression of growth factors with angiogenic potential in human dental pulp tissue from teeth with complete and incomplete root development. International endodontic journal. 2019;52(12):1716-22.

48. Basrani B, Haapasalo M. Update on endodontic irrigating solutions. Endodontic Topics. 2012;27(1):74-102.

49. Haapasalo M, Shen Y. Current therapeutic options for endodontic biofilms. Endodontic Topics. 2010;22(1):79-98.

50. Martin DE, De Almeida JFA, Henry MA, Khaing ZZ, Schmidt CE, Teixeira FB, et al. Concentration-dependent effect of sodium hypochlorite on stem cells of apical papilla survival and differentiation. Journal of Endodontics. 2014;40(1):51-5.

51. Trevino EG, Patwardhan AN, Henry MA, Perry G, Dybdal-Hargreaves N, Hargreaves KM, et al. Effect of irrigants on the survival of human stem cells of the apical papilla in a platelet-rich plasma scaffold in human root tips. Journal of Endodontics. 2011;37(8):1109-15.

52. Pang N-S, Lee SJ, Kim E, Shin DM, Cho SW, Park W, et al. Effect of EDTA on attachment and differentiation of dental pulp stem cells. Journal of Endodontics. 2014;40(6):811-7.

53. Hülsmann M, Heckendorff M, Lennon Á. Chelating agents in root canal treatment: mode of action and indications for their use. International Endodontic Journal. 2003;36(12):810-30.

54. Yamada RS, Armas A, Goldman M, Lin PS. A scanning electron microscopic comparison of a high volume final flush with several irrigating solutions: Part 3. Journal of

Endodontics. 1983;9(4):137-42.

55. Galler KM, Widbiller M, Buchalla W, Eidt A, Hiller K-A, Hoffer PC, et al. EDTA conditioning of dentine promotes adhesion, migration and differentiation of dental pulp stem cells. International Endodontic Journal. 2016;49(6):581-90.

56. Irrisafe ultrasonic irrigation [Internet]. [cited 02 August 2020]. Available from: https://www.endoexperience.com/documents/IrriSafe_D43801_R2_Eng.pdf.

57. Cleaning the third dimension [Internet]. 2015 [cited 02 August 2020]. Available from: https://endopracticeus.com/ce-articles/4948/.

58. Sadaghiani L, Gleeson HB, Youde S, Waddington RJ, Lynch CD, Sloan AJ. Growth factor liberation and DPSC response following dentine conditioning. Journal of Dental Research. 2016;95(11):1298-307.

59. Ivica A, Deari S, Patcas R, Weber FE, Zehnder M. Transforming Growth Factor Beta 1 Distribution and Content in the Root Dentin of Young Mature and Immature Human Premolars. Journal of Endodontics. 2020;46(5):641-7.

60. Alahi M, Mukhopadhyay SC. Detection Methodologies for Pathogen and Toxins: A Review. Sensors (Switzerland). 2017;17.

61. Vertucci FJ. Root canal anatomy of the human permanent teeth. Oral surgery, oral medicine, oral pathology. 1984;58(5):589-99.

62. Sirisha K, Tanikonda R, Shankar Y R, Kumar P. Validity of bond strength tests: A critical review-Part I. Journal of conservative dentistry. 2014;17:305-11.

63. Ahmed HMA, Versiani MA, De-Deus G, Dummer PMH. A new system for classifying root and root canal morphology. International Endodontic Journal. 2017;50(8):761-70.

64. Cvek M. Prognosis of luxated non‐vital maxillary incisors treated with calcium hydroxide and filled with gutta‐percha. A retrospective clinical study. Dental Traumatology. 1992;8(2):45-55.

65. Gawdat S, Sh E. Efficacy of XP-Endo finisher file compared to passive ultrasonic irrigation and conventional syringe irrigation on removal of triple antibiotic paste and calcium hydroxide. ENDO (Lond Engl). 2017;11(3):221-8.

66. Keskin C, Sariyilmaz E, Sariyilmaz Ö. Efficacy of XP-endo Finisher File in Removing Calcium Hydroxide from Simulated Internal Resorption Cavity. Journal of Endodontics. 2017;43(1):126-30.

67. Elnaghy AM, Mandorah A, Elsaka SE. Effectiveness of XP-endo Finisher, EndoActivator, and File agitation on debris and smear layer removal in curved root canals: a comparative study. Odontology. 2017;105(2):178-83.

68. Cameron R, Claudia E, Ping W, Erin S, Ruparel NB. Effect of a residual biofilm on release of transforming growth factor β1 from dentin. Journal of endodontics. 2019;45(9):1119-25.

69. Carrigan PJ, Morse DR, Furst ML, Sinai IH. A scanning electron microscopic evaluation of human dentinal tubules according to age and location. Journal of endodontics. 1984;10(8):359-63.

70. Carda C, Peydro A. Ultrastructural patterns of human dentinal tubules, odontoblasts processes and nerve fibres. Tissue and Cell. 2006;38(2):141-50.

71. Huang GT-J. Dental pulp and dentin tissue engineering and regeneration–advancement and challenge. Frontiers in bioscience (Elite edition). 2011;3:788.

72. Andreasen J, Paulsen H, Yu Z, Bayer T, Schwartz O. A long-term study of 370 autotransplanted premolars. Part II. Tooth survival and pulp healing subsequent to transplantation. The European Journal of Orthodontics. 1990;12(1):14-24.

73. Human TGF-beta 1 Quantikine ELISA Kit [Internet]. R&D Systems a biotechne brand. [cited29/08/2020]. Available from: https://resources.rndsystems.com/pdfs/datasheets/db100b.pdf?v=20210528&_ga=2.88031704.1346873133.1622235527-1630390427.1622235527.

74. Prompreecha S, Sastraruji T, Louwakul P, Srisuwan T. Dynamic Irrigation Promotes Apical Papilla Cell Attachment in an Ex Vivo Immature Root Canal Model. Journal of Endodontics. 2018;44(5):744-50.

75. Aksel H, Albanyan H, Bosaid F, Azim AA. Dentin Conditioning Protocol for Regenerative Endodontic Procedures. Journal of Endodontics. 2020;46(8):1099-104.

76. Malheiros C, Marques M, Gavini G. In vitro evaluation of the cytotoxic effects of

acid solutions used as canal irrigants. Journal of endodontics. 2005;31(10):746-8.

77. Hardy JJ, Carrell NA, Mcdonagh J. Calcium ion functions in fibrinogen conversion to fibrin. Annals of the New York Academy of Sciences. 1983;408(1):279-87.

78. Blombäck B, Blombäck M, Laurent TC, Pertoft H. Effect of EDTA on fibrinogen. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects. 1966;127(2):560-2.

79. Faria G, Viola K, Coaguila-Llerena H, Oliveira L, Leonardo R, Aranda-García A, et al. Penetration of sodium hypochlorite into root canal dentine: effect of surfactants, gel form and passive ultrasonic irrigation. International endodontic journal. 2019;52(3):385-92.

80. Salas H, Castrejon A, Fuentes D, Luque A, Luque E. Evaluation of the penetration of CHX 2% on dentinal tubules using Conventional Irrigation, Sonic Irrigation (EDDY) and Passive Ultrasonic Irrigation (PUI) techniques: An in vitro study. Journal of Clinical and Experimental Dentistry. 2021;13(1):e37.

81. Galler K, Grubmüller V, Schlichting R, Widbiller M, Eidt A, Schuller C, et al. Penetration depth of irrigants into root dentine after sonic, ultrasonic and photoacoustic activation. International endodontic journal. 2019;52(8):1210-7.

82. Li Q, Zhang Q, Zou X, Yue L. Evaluation of four final irrigation protocols for cleaning root canal walls. International Journal of Oral Science. 2020;12(1):1-6.

83. Hancerliogullari D, Erdemir A, Kisa U. The effect of different irrigation solutions and activation techniques on the expression of growth factors from dentine of extracted teeth. International Endodontic Journal. 2021.

84. Azim AA, Aksel H, Zhuang T, Mashtare T, Babu JP, Huang GT-J. Efficacy of 4 irrigation protocols in killing bacteria colonized in dentinal tubules examined by a novel confocal laser scanning microscope analysis. Journal of endodontics. 2016;42(6):928-34.

85. van der Sluis L, Wu M-K, Wesselink P. Comparison of 2 flushing methods used during passive ultrasonic irrigation of the root canal. Quintessence international. 2009;40(10).

86. van der Sluis LW, Vogels MP, Verhaagen B, Macedo R, Wesselink PR. Study on the influence of refreshment/activation cycles and irrigants on mechanical cleaning efficiency during ultrasonic activation of the irrigant. Journal of Endodontics. 2010;36(4):737-40.

87. Retsas A, Boutsioukis C. An update on ultrasonic irrigant activation. Endodontic Practice Today. 2019;13(2).

ภาคผนวก

ตาราง 3 ข้อมูลค่าการดูดกลืนสี (O.D.)

กลุ่ม	ค่าการดูดกลืนสี (O.D.)														
	ตัวอย่างที่ 1			ตัวอย่างที่ 2			ตัวอย่างที่ 3			ตัวอย่างที่ 4			ตัวอย่างที่ 5		
	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย
1	0.25	0.25	0.25	0.33	0.33	0.33	0.21	0.21	0.21	0.21	0.20	0.20	0.23	0.23	0.23
2	0.21	0.24	0.23	0.28	0.31	0.30	0.33	0.34	0.34	0.29	0.30	0.29	0.22	0.24	0.23
3	0.20	0.21	0.20	0.24	0.24	0.24	0.28	0.29	0.28	0.20	0.23	0.22	0.20	0.20	0.20
4	0.24	0.23	0.24	0.27	0.28	0.28	0.24	0.24	0.24	0.21	0.20	0.20	0.34	0.34	0.34
NC	0.12	0.13	0.13												

ตาราง 4 ข้อมูลปริมาณ TGF-β1 (pg/ml)

ุ่ม	ปริมาณ TGF-β1 (pg/ml)									
	ตัวอย่างที่ 1		ตัวอย่างที่ 2		ตัวอย่างที่ 3		ตัวอย่างที่ 4		ตัวอย่างที่ 5	
	TGF-β1	ชุด/อายุ	TGF-β1	ชุด/อายุ	TGF-β1	ชุด/อายุ	TGF-β1	ชุด/อายุ	TGF-β1	ชุด/อายุ
1	610.5	2/17	1135.97	2/18	375.1	4/23	328.68	4/22	464.86	4/22
2	1065.24	1/16	890.78	2/23	1177.11	2/23	887.48	2/24	464.86	4/16
3	333.85	4/17	502.59	4/20	770	4/16	393.36	4/17	293.15	4/21
4	1191.3	1/22	1584.33	1/16	1191.3	1/18	789.8	1/21	1177.11	2/24
NC	-	4/25								

ตาราง 5 ข้อมูลสถิติเชิงบรรยาย (Descriptive statistics) ของค่าความเข้มข้นของ TGF-β1 (pg/ml)

Descriptives

TGF-β1 (pg/ml)

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
EDTA/N	5	583.0220	327.25762	146.35406	176.6780	989.3660	328.68	1135.97
EDTA+PUI/N	5	897.0940	270.94306	121.16942	560.6738	1233.5142	464.86	1177.11
EDTA+XP/N	5	458.5900	191.11358	85.46859	221.2911	695.8889	293.15	770.00
EDTA	5	1186.7680	280.96863	125.65299	837.8994	1535.6366	789.80	1584.33
Total	20	781.3685	383.21658	85.68983	602.0176	960.7194	293.15	1584.33

ตาราง 6 การทดสอบการแจกแจงปกติ (Tests of Normality)

Tests of Normality

	Irrigation	Kolmogorov-Smirnov[a]			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
TGF-β1	EDTA/N	.267	5	.200*	.822	5	.121
	EDTA+PUI/N	.286	5	.200*	.908	5	.454
	EDTA+XP/N	.234	5	.200*	.876	5	.290
	EDTA	.294	5	.184	.895	5	.381

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

a. Lilliefors Significance Correction

ตาราง 7 การทดสอบความเป็นเอกพันธ์ของความแปรปรวน (Test of Homogeneity of Variances)

Test of Homogeneity of Variances

TGF-β1

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.228	3	16	.875

ตาราง 8 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA)

ANOVA

TGF-β1

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1606342.200	3	535447.400	7.236	.003
Within Groups	1183901.858	16	73993.866		
Total	2790244.059	19			

ตาราง 9 การเปรียบเทียบพหุคูณ (Post Hoc tests)

Multiple Comparisons

Dependent Variable: TGF-β1

	(I) Irr	(J) Irr	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	EDTA/N	EDTA+PUI/N	-314.07200	172.03937	.298	-806.2801	178.1361
		EDTA+XP/N	124.43200	172.03937	.886	-367.7761	616.6401
		EDTA	-603.74600*	172.03937	.014	-1095.9541	-111.5379
	EDTA+PUI/N	EDTA/N	314.07200	172.03937	.298	-178.1361	806.2801
		EDTA+XP/N	438.50400	172.03937	.090	-53.7041	930.7121
		EDTA	-289.67400	172.03937	.364	-781.8821	202.5341
	EDTA+XP/N	EDTA/N	-124.43200	172.03937	.886	-616.6401	367.7761
		EDTA+PUI/N	-438.50400	172.03937	.090	-930.7121	53.7041
		EDTA	-728.17800*	172.03937	.003	-1220.3861	-235.9699
	EDTA	EDTA/N	603.74600*	172.03937	.014	111.5379	1095.9541
		EDTA+PUI/N	289.67400	172.03937	.364	-202.5341	781.8821
		EDTA+XP/N	728.17800*	172.03937	.003	235.9699	1220.3861

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

กลุ่มที่ 1 (EDTA/N): แสดงถึงกลุ่มที่ล้างด้วยสารละลายอีดีทีเอความเข้มข้นร้อยละ 17 ปริมาณ 20 มิลลิลิตรเป็นเวลา 5 นาที โดยจะแบ่งล้างเป็น 5 รอบรอบละ 4 มิลลิลิตรเป็นเวลา 1 นาที ตามการล้างด้วยน้ำเกลือปริมาณ 5 มิลลิลิตรเป็นเวลา 1 นาที

กลุ่มที่ 2 (EDTA+PUI/N): แสดงถึงกลุ่มที่ล้างด้วยสารละลายอีดีทีเอความเข้มข้นร้อยละ 17 ปริมาณ 20 มิลลิลิตรเป็นเวลา 5 นาที โดยจะแบ่งล้างเป็น 5 รอบ รอบละ 4 มิลลิลิตรเป็นเวลา 1 นาที ซึ่งในรอบที่ 2, 3 และ 4 จะทำการล้างร่วมกับการใช้เออริเซฟ (IrriSafe™, Satelec Acteon Group, Merignac, France) โดยใส่อุปกรณ์เออริเซฟให้สั้นกว่าความยาวทำงาน

1 มิลลิเมตรทำการกระตุ้นภายในคลองรากฟันรอบละ 20 วินาที ตามด้วยการล้างน้ำเกลือปริมาณ 5 มิลลิลิตรเป็นเวลา 1 นาที

กลุ่มที่ 3 (EDTA+XP/N): แสดงถึงกลุ่มที่ล้างด้วยสารละลายอีดีทีเอความเข้มข้นร้อยละ 17 ปริมาณ 20 มิลลิลิตรเป็นเวลา 5 นาที โดยจะแบ่งล้างเป็น 5 รอบ รอบละ 4 มิลลิลิตรเป็นเวลา 1 นาที ซึ่งในรอบที่ 3 จะทำการล้างร่วมกับการใช้เอ็กซ์พีเอนโดฟินิชเชอร์ (XP endo® finisher, FKG Dentaire, La Chaux- de-Fonds, Switzerland) ขยับขึ้นลงช้าๆ 7-8 มิลลิเมตรเป็นเวลา 1 นาที ตามด้วยการล้างน้ำเกลือปริมาณ 5 มิลลิลิตรเป็นเวลา 1 นาที

กลุ่มที่ 4 (EDTA): แสดงถึงกลุ่มที่ล้างด้วยสารละลายอีดีทีเอความเข้มข้นร้อยละ 17 ปริมาณ 20 มิลลิลิตรเป็นเวลา 5 นาที โดยจะแบ่งล้างเป็น 5 รอบรอบละ 4 มิลลิลิตรเป็นเวลา 1 นาที

NC (Negative control) คือกลุ่มควบคุมตัวอย่างฟันจะถูกทาน้ำยาทาเล็บทั้งผิวด้านนอกและด้านในคลองรากฟันทั้งหมด

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ชิดหทัย ว่องวิทย์เดชา
วัน เดือน ปี เกิด	17 พฤษภาคม 2534
สถานที่เกิด	จังหวัดกรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2558 ทันตแพทยศาสตร์บัณฑิต มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ปีการศึกษา 2558
ที่อยู่ปัจจุบัน	108/43 อาคารสี่พระยาริเวอร์วิว ถนนโยธา แขวงตลาดน้อย เขตสัมพันธวงศ์ กรุงเทพ 10100