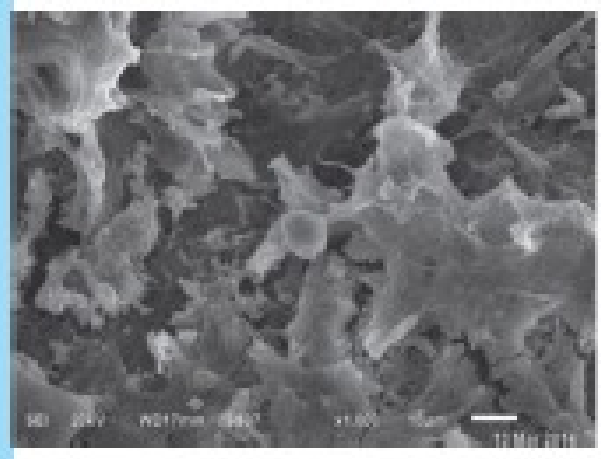
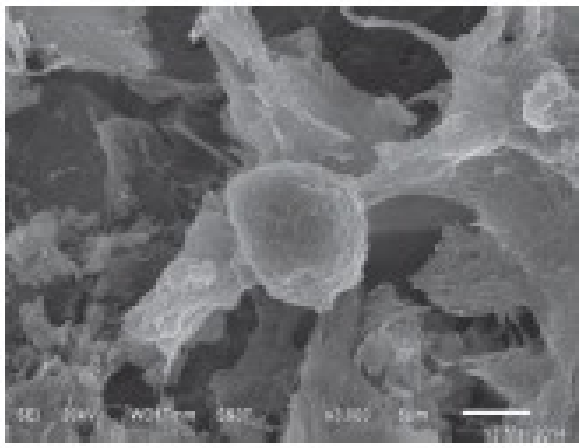
Volume 1 (1) Jan-Jun 2022

Thai Endodontic Journal (ENDOSARN)

The official journal of the Thai Endodontic Association

TEJ





Interesting articles

- มิติใหม่ในการใช้เทคนิคการถ่ายภาพขั้นสูงในงานเอ็นโดดอนติกส์
- ผลของน้ำยาอีดีทีเอสูตรต่างๆ ต่อความมีชีวิตของเซลล์ต้นกำเนิดเนื้อเยื่อในโพรงประสาทฟัน
- Clinical considerations for non-vital tooth walking bleaching

ISSN 1685-3709

Text and Journal

ผลของน้ำยาอีดีทีเอสูตรต่างๆ ต่อความมีชีวิตของเซลล์ต้นกำเนิดเนื้อเยื่อในโพรงประสาทฟัน

Effect of different EDTA formulae on dental pulp stem cells viability

ศุภชัย สุทธิมัณฑนกุล[1]

พัชร กุลโกวิท[2]

จีรภัทร จันทรัตน์[1]

หทัยทิพย์ ศรีธนอุดมชัย[3]

[1] สาขาวิทยาเอ็นโดดอนต์ ภาควิชาทันตกรรมหัตถการและวิทยาเอ็นโดดอนต์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล 6 ถ.โยธี ราชเทวี กทม.10400

[2] แผนกทันตกรรม ศูนย์การแพทย์และฟื้นฟูบึงยี่โถ ถ.รังสิต-นครนายก ต.บึงยี่โถ อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี 12130

[3] ภาควิชาชีววิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล 6 ถ.โยธี ราชเทวี กทม. 10400

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาผลของน้ำยาอีดีทีเอชนิดต่างๆ ต่อความมีชีวิตของเซลล์ต้นกำเนิดเนื้อเยื่อในบนพื้นผิวเนื้อฟัน

วิธีการศึกษา: ใช้รากฟันกรามน้อยล่างซี่ที่ 1 ของมนุษย์ที่ถูกถอนมาจำนวน 59 ซี่ ตัดแบ่งครึ่งรากฟันตามยาวแนวแก้ม-ลิ้นให้ผ่านคลองรากฟัน แต่ละครึ่งซีกของรากฟันนำมาตัดให้ได้ชิ้นเนื้อฟันที่ครอบคลุมผนังคลองรากฟันมีขนาด 3.5x3.5x1 มิลลิเมตร ได้จำนวนทั้งหมด 118 ชิ้น แบ่งเป็นกลุ่มทดลอง 7 กลุ่มๆ ละ 16 ชิ้น นำไปแช่ในน้ำยาแต่ละชนิดเป็นเวลา 1 นาทีดังนี้ เอ็นโดคลีน สเมียร์เคลียร์ อัลตราเด็นท์ อีดีทีเอ ร้อยละ 17 โซเดียมไฮโปคลอไรต์ร้อยละ 5.25 น้ำเกลือร้อยละ 0.9% และอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มเป็นกลุ่มควบคุมบวก ส่วนกลุ่มควบคุมลบ 6 ชิ้นจะแช่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่ไม่ใส่เซลล์ หลังแช่ในน้ำยา ล้างด้วยน้ำเกลือ 1 นาที นำชิ้นเนื้อฟันจากกลุ่มทดลองกลุ่มละ 3 ชิ้นไปตรวจพื้นผิวเนื้อฟันด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด ชิ้นเนื้อฟันที่เหลือของกลุ่มทดลองใส่เซลล์ต้นกำเนิดเนื้อเยื่อในลงไปเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน และอีก 10 ชิ้นนำไปตรวจหาปริมาณของเซลล์ที่มีชีวิตด้วยวิธีเอ็มทีที รูปร่างและการยึดเกาะของเซลล์ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดจากชิ้นตัวอย่างของกลุ่มทดลองกลุ่มละ 3 ชิ้น

ผลการศึกษา: พบว่าเซลล์มีชีวิตของกลุ่มอีดีทีเอร้อยละ 17 อัลตราเด็นท์ น้ำเกลือและกลุ่มควบคุมบวกมีค่าสูงกว่ากลุ่มเอ็นโดคลีน สเมียร์เคลียร์ โซเดียมไฮโปคลอไรต์ร้อยละ 5.25 อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) แต่ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มอีดีทีเอร้อยละ 17 อัลตราเด็นท์ น้ำเกลือและกลุ่มควบคุมบวก และระหว่างกลุ่มเอ็นโดคลีน สเมียร์เคลียร์ และโซเดียมโฮโปคลอไรต์ร้อยละ 5.25 ($p>0.05$) ลักษณะผิวเนื้อฟัน กลุ่มเอ็นโดคลีนส่วนใหญ่จะเห็นท่อเนื้อฟันขนาดใหญ่และมีสเมียร์พลักปิดท่อเนื้อฟันน้อยมาก กลุ่มสเมียร์-เคลียร์เห็นท่อเนื้อฟันขนาดใหญ่และมีสเมียร์พลักปิดอยู่ปานกลาง กลุ่มอัลตราเด็นท์ท่อเนื้อฟันมีขนาดเล็กและมีสเมียร์พลักปิดจำนวนไม่มาก กลุ่มอีดีทีเอมีท่อเนื้อฟันขนาดปานกลาง มีสเมียร์พลักไม่มาก กลุ่มโซเดียมไฮโปคลอไรต์และกลุ่มน้ำเกลือมีชั้นสเมียร์ปกคลุมปิดทั่วเนื้อฟัน ลักษณะและจำนวนเซลล์ กลุ่มเอ็นโดคลีนพบเซลล์รูปร่างกลมเป็นส่วนใหญ่ เซลล์รูปกระสวยพบจำนวนน้อย กลุ่มสเมียร์เคลียร์พบแต่เซลล์รูปร่างกลมผิวขรุขระ กลุ่มอัลตราเด็นท์พบเซลล์รูปร่างแบนเป็นส่วนใหญ่ เซลล์รูปร่างกลมและกระสวยมีเป็นส่วนน้อย กลุ่มอีดีทีเอ พบเซลล์รูปร่างแบนและกลมจำนวนใกล้เคียงกัน กลุ่มโซเดียมไฮโปคลอไรต์พบเซลล์รูปร่างไม่แน่นอนและเศษชิ้นส่วนของเซลล์ กลุ่มควบคุมบวกพบเซลล์รูปร่างแบนเป็นส่วนใหญ่ เซลล์รูปร่างกลมและกระสวยพบเป็นจำนวนน้อย

สรุปผล: สารละลายอีดีทีเอร้อยละ 17 อัลตราเด็นท์ สารละลายน้ำเกลือร้อยละ 0.9 และกลุ่มควบคุมบวกที่เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ มีค่าร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตที่ไม่แตกต่างกัน และมีค่าสูงกว่ากลุ่มเอ็นโดคลีน สเมียร์เคลียร์ และสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ร้อยละ 5.25

คำสำคัญ: รูปร่างเซลล์, ความมีชีวิตของเซลล์, เซลล์ต้นกำเนิดเนื้อเยื่อในโพรงประสาทฟัน, อีดีทีเอ, สารลดแรงตึงผิว

การอ้างถึง: ศุภชัย สุทธิมัณฑนกุล, พัชร กุลโกวิท, จีรภัทร จันทรัตน์, หทัยทิพย์ ศรีธนอุดมชัย. ผลของน้ำยาอีดีทีเอสูตรต่างๆ ต่อความมีชีวิตของเซลล์ต้นกำเนิดเนื้อเยื่อในโพรงประสาทฟัน. วารสารเอ็นโดดอนติกส์ไทย 2565; 1: 1-16.

Abstract

Objective: To study the effects of different EDTAs on cell viability of dental pulp stem cells (DPSCs) on root dentine.

Materials and method: Fifty-nine human extracted first mandibular premolar roots were sectioned bucco-lingually. Each half of root was cut vertically into a piece of dentine sample size 3.5X3.5X1 mm, which included root canal wall on one side. A total of 118 samples were randomly divided into 7 experimental groups of 16 each for submerging in one of the solutions for 1 minute: Endo Clean, Smearclear, Ultradent, 17% EDTA, 5.25% sodium hypochlorite, 0.9% Saline solution and DMEM culture medium as the Positive control. The negative control of 6 samples were in DMEM without cells. Three dentine samples from each experimental group were selected and examined the dentine surface with SEM. The remaining dentine samples were seeded with DPSCs and cultured. After 7 days, another 3 samples from each group were examined for cell morphology with SEM. The cell viability was determined by MTT assay from the remaining 10 samples.

Results: Percentage of cell viability in the groups of 17% EDTA, Ultradent, saline solution, and positive control were significantly higher than the Endoclean, Smearclear and 5.25% sodium hypochlorite groups ($p<0.05$). There was no significant difference between the groups of 17% EDTA, Ultradent, 0.9% saline solution and positive control and the Endoclean, Smearclear and 5.25% sodium hypochlorite groups ($p>0.05$). For dentine surfaces with SEM, the Endoclean group appeared to be mostly clear and large dentinal tubules, whereas the Smearclear group exhibited large dentinal tubules and some smear plugs. The Ultradent group presented tiny opened dentinal tubules with some smear plugs, while the EDTA group had medium opened dentinal tubules and some smear plugs. Heavy smear layer covering was observed in the sodium hypochlorite and the saline groups. For the 7 days of DPSCs culturing, the Endoclean group appeared round-shaped cells and a small number of spindle cells, whereas the Smearclear group exhibited only round cells. The Ultradent group presented mostly flat cells and small number of round and spindle cells, while the EDTA group had flat and round cells. The irregular shape cells and cell fragments were found only in the Sodium hypochlorite group. For the positive control group, the majority of cells were flat, the round- and spindle-shaped cells were rarely found.

Conclusion: In the condition of this study, cell viability of 17% EDTA Ultradent, 0.9% saline solution and positive control group was significantly higher than Endoclear, SmearClear and 5.25% sodium hypochlorite groups.

Keywords: Cell shapes, Cell viability, Dental Pulp Stem cells, EDTA, Surfactants

Correspondence: ศุภชัย สุทธิมัณฑนกุล
สาขาวิทยาเอ็นโดดอนต์ ภาควิชาทันตกรรมหัตถการและวิทยาเอ็นโดดอนต์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล 6 ถ.โยธี ราชเทวี กทม. 10400
โทรศัพท์: 02-200-7825 โทรสาร: 02-200-7824
Email address: supachai.sut@mahidol.ac.th

Received: 21 February 2022 Revised: 3 May 2022 Accepted: 26 May 2022

บทนำ

การรักษาคลองรากฟันแบบรีเจนเนอเรทีฟ (regenerative endodontics) เป็นหนึ่งในวิธีการรักษาฟันที่เนื้อเยื่อในตายและปลายรากยังไม่ปิด โดยอาศัยหลักการทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (tissue engineering) ซึ่งองค์ประกอบหลักได้แก่ เซลล์ต้นกำเนิด (stem cells) โครงค้ำยัน (scaffolds) และสารปัจจัยในการเจริญเติบโต (growth factors) [1, 2] ทำให้สร้างเนื้อเยื่อแข็งมาปิดบริเวณปลายรากฟัน รวมทั้งเพิ่มความหนาและความยาวของรากฟันได้ ลดโอกาสการแตกของรากฟันในอนาคต [3, 4] อัตราการคงอยู่ของฟันสูงขึ้นเมื่อเทียบกับวิธีการเหนี่ยวนำด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์และแคลเซียมซิลิเกตซีเมนต์ [5]

เซลล์ต้นกำเนิดในการรักษารากฟันแบบรีเจนเนอเรทีฟได้มาจากตุ่มปลายรากฟัน (stem cells from apical papilla; SCAP) และจากเนื้อเยื่อใน (dental pulp stem cells; DPSC) ซึ่งสามารถแบ่งตัว (self renewal) คงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ชนิดต่าง ๆ ของร่างกายโดยอาศัยสารปัจจัยการเจริญเติบโตช่วยกระตุ้น [2, 6-9] และยึดเกาะกับผนังคลองรากฟันได้ การยึดเกาะของเซลล์ขึ้นกับปริมาณอนินทรีย์สารที่เหลือบนผิวเนื้อฟัน การเผยของท่อเนื้อฟัน พื้นผิวของเนื้อฟันที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และการสร้างหลอดเลือด (angiogenesis) เข้ามาหล่อเลี้ยงให้เซลล์ต้นกำเนิดมีชีวิตอยู่ได้ [10, 11] การเตรียมคลองรากฟันจะไม่ทำความสะอาดด้วยวิธีการขูดขยายคลองรากฟัน เพราะผนังคลองรากฟันจะบางลงและยังอาจกำจัดเซลล์ต้นกำเนิดที่ยังเหลือค้างอยู่ในโพรงเนื้อเยื่อในออกไปด้วย การกำจัดเนื้อเยื่อในที่ตายและตกค้างอยู่ ใช้วิธีล้างด้วยน้ำยาล้างคลองรากฟันเพียงอย่างเดียว น้ำยาที่นิยมใช้ล้างคลองรากฟันได้แก่ โซเดียมโฮโปคลอไรต์ (sodium hypochlorite) อีดีทีเอหรือกรดเอทิลีนไดเอมีนเตตราอะซิตริก (EDTA; ethylene diamine tetraacetetic acid) และกรดซิตริก (citric acid) [2, 12]

ผลการศึกษาน้ำยาล้างคลองรากฟันต่อการเจริญและยึดเกาะของเซลล์ต้นกำเนิด พบว่าน้ำยาโซเดียมโฮโปคลอไรต์ซึ่งมีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียและละลายเนื้อเยื่อได้ดี มีความเป็นพิษต่อเซลล์ต้นกำเนิดค่อนข้างมาก และลดการยึดเกาะของเซลล์ที่ผนังคลองรากฟัน นอกจากนี้ยังไม่สามารถกำจัดชั้นสเมียร์ได้อีกด้วย [2, 12, 13] สารกลุ่มคีเลต (chelating agent) ซึ่งนำมาใช้กำจัดชั้นสเมียร์ โดยทั่วไปนิยมใช้ อีดีทีเอ เตตราไซคลิน (tetracycline) และ กรดซิตริก (citric acid) เพราะมีฤทธิ์ในการกำจัดชั้นสเมียร์ได้ดีและสามารถสลายแร่ธาตุ (demineralization) ที่ผิวนอกของเนื้อฟันได้ ทำให้มีการเผยของท่อเนื้อฟันและเส้นใยคอลลาเจนซึ่งใช้เป็นโครงค้ำยันสำหรับเซลล์ต้นกำเนิด [14, 15] ในทางปริทันตวิทยามีการนำเตตราไซคลินและกรดซิตริกมาใช้เป็นสารปรับสภาพผิวเคลือบรากฟัน เพื่อให้เอ็นยึดปริทันต์ (periodontal ligament) เข้ายึดเกาะ โดยช่วยกำจัดแบคทีเรีย เอ็นโดทอกซิน (endotoxin) และชั้นสเมียร์ได้ จึงสามารถยับยั้งเอ็นไซม์คอลลาจิเนส (collagenase) และการทำงานของเซลล์สลายกระดูก (osteoclast) ทำให้มีการสร้างคอลลาเจนและกระดูกได้ (16) จึงมีแนวคิดนำน้ำยาสองชนิดนี้มาใช้ปรับสภาพผิวเนื้อฟันในการรักษาคลองรากฟันแบบรีเจนเนอเรทีฟ

อีดีทีเอเป็นสารในกลุ่มกรดโพลีอะมิโนคาร์บอกซิลิก (polyamino carboxylic acid) เป็นสารในกลุ่ม คีเลต มีคุณสมบัติในการทำปฏิกิริยากับโลหะที่มีประจุบวกสองหรือบวกสาม (dicationic or tricationic) ได้ เช่น แคลเซียม (Ca^{2+}) เหล็ก (Fe^{3+}) สังกะสี (Zn^{2+}) ด้วยคุณสมบัตินี้จึงมีการนำมาประยุกต์ใช้ในงานรักษาคลองรากฟัน โดยใช้กำจัดส่วนประกอบอนินทรีย์ในชั้นสเมียร์ ช่วยเสริมฤทธิ์ในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราในคลองรากฟันร่วมกับการใช้โซเดียมโฮโปคลอไรต์ สามารถสลายแร่ธาตุของเนื้อฟันได้ประมาณ 20-50 ไมโครเมตร [12, 16] กลไกการออกฤทธิ์ของอีดีทีเอจะทำปฏิกิริยากับประจุของแคลเซียมในเนื้อฟัน กลายเป็นสารประกอบของแคลเซียมอีดีทีเอและโปรตรอน การเพิ่มโปรตรอนเข้ามา ทำให้ค่าความเป็นกรดด่างลดลง การสลายแร่ธาตุของเนื้อฟันลดลง ประสิทธิผลของอีดีทีเอจึงลดลงตามระยะเวลา (18, 19)

การสลายแร่ธาตุของเนื้อฟัน ช่วยให้สารปัจจัยในการเจริญเติบโตของเซลล์ในชั้นเนื้อฟันถูกปลดปล่อยออกมา ได้แก่ บีเอฟจีเอฟ (bFGF; basic Fibroblast Growth Factors), วีอีจีเอฟ (VEGF; Vascular Endothelial Growth Factor), พีแอลจีเอฟ-เอบี (PlGF-AB; Placenta Growth Factor),

พีดีจีเอฟ-เอบี (PDGF-AB; Platelet-Derived Growth Factor) และอีจีเอฟ (EGF; Epidermal Growth Factor) [17] ซึ่งกระตุ้นเซลล์ต้นกำเนิดให้เปลี่ยนไปเป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติคล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟัน (odontoblast-like properties cell) [2, 7, 9] อีดีทีเอนอกจากจะจับกับแคลเซียมแล้ว ยังสามารถจับกับแมกนีเซียมซึ่งเป็นปัจจัยร่วม (cofactor) ของเอ็นไซม์เมทริกซ์เมทาลโลโปรติเนส (Metrix metalloprotenase; MMP) ที่ย่อยสลายคอลลาเจนในเนื้อฟัน ทำให้เนื้อฟันยังคงสภาพของคอลลาเจนและโครงสร้างนอกเซลล์ (extracellular matrix) ที่สมบูรณ์ มีปัจจัยการเจริญเติบโตมากและมีโครงค้ำยันที่ดี [18, 19]

การศึกษาผลของน้ำยาล้างคลองรากฟันชนิดต่าง ๆ ต่อการยึดเกาะบนเนื้อฟันของเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อใน พบว่าการล้างคลองรากฟันด้วยอีดีทีเอร้อยละ 17 มีเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในยึดเกาะบนเนื้อฟันมากที่สุด และความเป็นพิษต่อเซลล์ต้นกำเนิดน้อยที่สุด [13, 15, 20] นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่พบว่าการใช้อีดีทีเอจะทำให้เซลล์ต้นกำเนิดเนื้อเยื่อในที่เกาะอยู่บนเนื้อฟัน เปลี่ยนไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อฟันและเซลล์สร้างกระดูก (odontoblasts and osteoblasts) ได้ดีขึ้น [21] แนวทางการรักษารากฟันแบบรีเจนเนอเรทีฟ จึงแนะนำให้ใช้สารละลายอีดีทีเอร้อยละ 17 เป็นน้ำยาล้างสุดท้ายก่อนการกระตุ้นเลือดให้เข้ามาในคลองรากฟัน [22]

ในปัจจุบันมีการผลิตน้ำยาอีดีทีเอสำเร็จรูปออกจำหน่ายหลายสูตรและมีความเข้มข้นไม่เท่ากัน โดยวัตถุประสงค์หลักเพื่อใช้ล้างคลองรากฟัน กำจัดชั้นสเมียร์จากผนังคลองรากฟัน และเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการล้างและอุดคลองรากฟัน จึงอาจมีการเพิ่มสารลดแรงตึงผิว (surfactant) ชนิดต่าง ๆ เข้าไป ได้แก่ โซเดียมลอริลอีเทอร์ซัลเฟต (1.25% Sodium lauryl ether sulfate; Tergentol) ซีเทฟลอน (0.1% Cetavlon) และซีทริไมด์ (Cetrimide) และยังอาจมีสารอื่น ๆ ที่ไม่เปิดเผยเพื่อลดแรงตึงผิว ช่วยทำให้อีดีทีเอจับกับแคลเซียมของเนื้อฟันได้มากขึ้น [23, 24] แต่บางการศึกษาให้ความเห็นที่ขัดแย้งว่าอีดีทีเอที่ผสมสารลดแรงตึงผิวจะให้ผลในการจับแคลเซียมที่ด้อยกว่าสารอีดีทีเอเพียงอย่างเดียว [25-27] ในกระบวนการรักษาคลองรากฟันแบบรีเจนเนอเรทีฟ มีการแนะนำให้ใช้น้ำยาอีดีทีเอล้างคลองรากฟันเพื่อช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตและการยึดเกาะกับผนังคลองรากฟันของเซลล์ต้นกำเนิด แต่เนื่องจากน้ำยาอีดีทีเอที่ใช้ในการล้างคลองรากฟันและจำหน่ายอยู่ทั่วไป มีส่วนประกอบอื่นที่แตกต่างกันตามที่กล่าวแล้ว การนำมาใช้ในงานรักษาคลองรากฟันแบบรีเจนเนอเรทีฟ จึงอาจมีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตและยึดเกาะของเซลล์ได้ วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้จึงต้องการศึกษาผลของน้ำยาอีดีทีเอ 4 ชนิด ได้แก่ เอ็นโดคลีน สเมียร์เคลียร์ อัลตราเด็นท์ และอีดีทีเอเข้มข้นร้อยละ 17 ที่มีผลต่อความมีชีวิต รูปร่างและการยึดเกาะกับเนื้อฟันของเซลล์ต้นกำเนิดเนื้อเยื่อใน โดยเทียบกับโซเดียมไฮโปคลอไรต์เข้มข้นร้อยละ 5.25 และน้ำเกลือร้อยละ 0.9

วิธีการศึกษา

งานวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคนฯ จากคณะกรรมการประจำคณะทันตแพทยศาสตร์และคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เลขที่ MU-DT/PY-IRB2014/DT004

1. การเตรียมตัวอย่างชิ้นเนื้อฟัน ใช้ฟันกรามน้อยมนุษย์ที่ถูกถอนเพื่อการจัดฟัน โดยไม่สามารถระบุเพศ อายุ และเชื้อชาติ จำนวน 59 ซี่ ที่มีขนาดและความยาวใกล้เคียงกัน แช่ฟันในสารละลายน้ำเกลือเข้มข้นร้อยละ 0.9 (0.9% normal saline solution) ฟันต้องไม่เคยผ่านการแช่ในสารละลายที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อใด ๆ และไม่เคยผ่านการรักษาคลองรากฟันมาก่อน กำจัดเนื้อเยื่ออ่อนและคราบที่ติดบริเวณผิวรากฟันด้วยใบมีดและล้างด้วยสารละลายน้ำเกลือ ฝังรากฟันในแท่งอะคริลิกลึก 3 มิลลิเมตร ใช้เครื่องตัดฟัน (Microcutting instrument Acutom-50, Struers, Compenhagen, Denmark) ตัดฟันในแนวขวาง (cross section) ที่รอยต่อของเคลือบฟันกับเคลือบรากฟัน (cemento-enamel junction) จากนั้นตัดรากฟันตามแนวแกนฟันที่ด้านแก้ม (A1) และด้านลิ้น (A2) ออกในแนวใกล้กลาง-ไกลกลาง (mesio-distal direction) เหลือแต่ส่วนตรงกลางฟันยาว 3.5 มิลลิเมตรและให้ครอบคลุมส่วนของคลองรากฟันทั้งหมด (รูปที่ 1ก) ผ่าครึ่งรากฟันที่เหลือตามแนวแก้ม-ลิ้น (bucco-lingual direction) ให้ผ่านกึ่งกลางคลองรากฟันแยกเป็น 2 ชิ้น (B1) แต่ละชิ้นจะถูกตัด

ห่างจากด้านที่เป็นผนังคลองรากฟันไปอีก 1 มิลลิเมตร (B2, B3) (รูปที่ 1ข) สุดท้ายตัดฟันตามแนวขวางของฟันที่ตำแหน่งห่างจากขอบรอยตัดตรงรอยต่อของเคลือบฟันกับเคลือบรากฟัน 3.5 มิลลิเมตร ฟันแต่ละซี่จะได้ชิ้นเนื้อฟันขนาด 3.5x3.5x1 มิลลิเมตร จำนวน 2 ชิ้น รวมชิ้นตัวอย่างเนื้อฟันทั้งหมด 118 ชิ้น หงายชิ้นเนื้อฟันให้ส่วนที่เป็นคลองรากฟันอยู่ด้านบน ตัดลบมุมขวาล่างเพื่อให้สามารถระบุด้านที่เป็นผนังคลองรากฟัน นำชิ้นเนื้อฟันไปอบไอน้ำฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ด้วยเครื่องนึ่งอัดไอน้ำ (autoclave)

2. การแช่ชิ้นเนื้อฟันในน้ำยาอีดีทีเอแต่ละชนิด

ชิ้นเนื้อฟันจำนวน 118 ชิ้น แบ่งออกเป็น 7 กลุ่ม ๆ ละ 16 ชิ้น และกลุ่มควบคุมลบจำนวน 6 ชิ้น กลุ่มที่ 1-7 จะนำไปแช่ในน้ำยาอีดีทีเอเป็นเวลา 1 นาที ตามกลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 เอ็นโดคลีน (Endo Clean; M Dent, Bangkok, Thailand)

กลุ่มที่ 2 สเมียร์เคลียร์ (Smear Clear; SybronEndo, United States)

กลุ่มที่ 3 อัลตราเด็นท์ (Ultradent; Ultradent, United States)

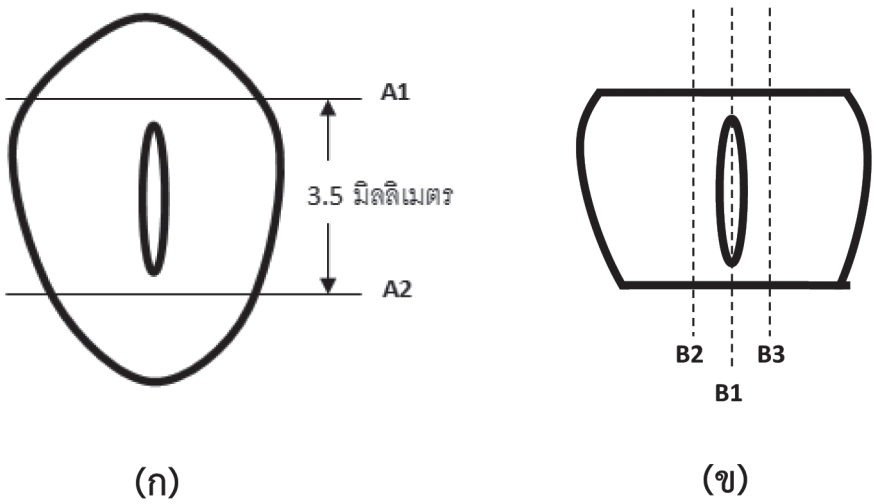
กลุ่มที่ 4 สารละลายอีดีทีเอเข้มข้นร้อยละ 17 (หน่วยปฏิบัติการวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล)

กลุ่มที่ 5 สารละลายโซเดียมโฮโปคลอไรต์เข้มข้นร้อยละ 5.25 (M Dent, Bangkok, Thailand)

กลุ่มที่ 6 สารละลายน้ำเกลือเข้มข้นร้อยละ 0.9 (M Dent, Bangkok, Thailand)

กลุ่มที่ 7 กลุ่มควบคุมบวก อาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็ม (DMEM; High glucose Dulbecco's modified Eagle's medium, Invitrogen Caribad, CA)

หลังจากนั้นนำชิ้นตัวอย่างทุกกลุ่มล้างด้วยสารละลายน้ำเกลือร้อยละ 0.9 เป็นเวลา 1 นาที ชิ้นตัวอย่างจำนวน 3 ชิ้นของกลุ่มที่ 1 ถึง 7 นำมาประเมินดูลักษณะผิวเนื้อฟันของผนังคลองรากฟันด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (SEM; JSM-6610LV) (JEOL Ltd., Tokyo, Japan)



รูปที่ 1 (ก) ภาพหน้าตัดขวางของฟันที่รอยต่อเคลือบฟันและเคลือบรากฟัน และตำแหน่งการตัดฟันแนวแกนฟันด้านแก้ม (A1) และด้านลิ้น (A2) ห่างกัน 3.5 มิลลิเมตร (ข) ภาพหน้าตัดขวางฟันหลังจากตัดด้านแก้มและด้านลิ้นออก ตัดแบ่งครึ่งให้ผ่านกลางคลองรากฟัน (B1) ออกเป็น 2 ชิ้น แต่ละชิ้นตัดตามแนวแกนฟัน (B2, B3) ให้ด้านหนึ่งเป็นผนังคลองรากฟันและมีความหนา 1 มิลลิเมตร จากนั้นตัดตามขวางให้ห่างจากด้านรอยตัดของเคลือบฟันและเคลือบรากฟัน 3.5 มม. ได้ชิ้นเนื้อฟันที่มีขนาด 3.5x.3.5x1 มิลลิเมตร

3. การศึกษาการยึดเกาะบนเนื้อฟัน การเจริญเติบโตและรูปร่างของเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อใน

3.1 การเตรียมเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อใน

เซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากเนื้อเยื่อใน มีการพิสูจน์ว่าเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเนื้อเยื่อใน โดยใช้ stem cell markers ชนิดซีดี 34 (CD34) และซีดี 45 (CD45) เป็น negative markers และใช้เซลล์ซีดี 73 ซีดี 90 ซีดี 105 (CD73, CD90, CD105) เป็น positive markers โดยมีการทดสอบคุณสมบัติการไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก (osteogenic) และเซลล์ไขมัน (adipogenic)

เลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้มาจากเนื้อเยื่อใน ในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็ม ที่ผสมกับเอฟบีเอสร้อยละ 10 (10% FBS, Fetal Bovine Serum; Invitrogen Caribad, CA) และ 100 U/มิลลิลิตร เพนิซิลลิน/สเตรปโตมัยซิน (penicillin/streptomycin; Invitrogen Caribad, CA) ภายในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ทุก 2 วัน

นำเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในที่เพาะเลี้ยงในพาสเซจ (passage) ที่ 8-10 จำนวน 3.0 x 10^4 เซลล์ ใส่บนตัวอย่างชิ้นเนื้อฟันกลุ่มที่ 1 ถึง 7 ในเพลท 96 หลุม (96-well tissue culture plate) กลุ่มควบคุมลบ จะไม่ใส่เซลล์บนตัวอย่างชิ้นเนื้อฟัน ใส่อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ลงในแต่ละหลุม เก็บกลุ่มทดลองทั้งหมดในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 7 วัน โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2 วัน หลังจากนั้นนำเซลล์ต้นกำเนิดที่เพาะเลี้ยงบนตัวอย่างชิ้นเนื้อฟันในแต่ละกลุ่มทดลองไปศึกษาความมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธีวิเคราะห์เอ็มทีที (Tetrazolium salt-based colorimetric, MTT assay) ศึกษาการยึดเกาะและรูปร่างของเซลล์ต้นกำเนิดบนเนื้อฟันด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดกำลังขยาย 1,000 และ 3,000 เท่า จำนวนชิ้นตัวอย่างในแต่ละกลุ่มแสดงในตารางที่ 1

3.2 การวิเคราะห์เอ็มทีที (MTT assay)

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดบนชิ้นตัวอย่างในแต่ละกลุ่มครบ 7 วัน นำเซลล์มาล้างด้วย สารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ซาไลน์เข้มข้นร้อยละ 0.9 ที่ไม่มีอิออนของแคลเซียมและแมกนีซียม (DPBS) หลังจากนั้นเติมสารละลายเอ็มทีที [MTT; 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide] ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 100 ไมโครลิตรบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และเติมสารไดเมธิลซัลฟอกไซด์ (Dimethylsulfoxide; DMSO) 100 ไมโครลิตร เพื่อละลาย

ตารางที่ 1 จำนวนชิ้นตัวอย่างที่แช่ในน้ำยาอีดีทีเอชนิดต่าง ๆ และการศึกษาความมีชีวิต การยึดเกาะและรูปร่างของเซลล์ในแต่ละกลุ่มทดลอง ที่ระยะเวลาก่อนการศึกษาและที่ 7 วัน

Experimental Groups	Number of specimens		
	MTT assay	SEM	
	7 d	0 d	7 d
1. Endo Clean / 0.9% NSS	10	3	3
2. Smear Clear / 0.9% NSS	10	3	3
3. Ultradent / 0.9% NSS	10	3	3
4. 17% pure EDTA / 0.9% NSS	10	3	3
5. 5.25% NaOCl / 0.9% NSS	10	3	3
6. 0.9% NSS	10	3	3
7. Positive control : DMEM	10	3	3
Negative control : DMEM without cell	6		

ตะกอนสีม่วงของผลึกฟอมาซาน (fomazan crystal) ที่เกิดจากเซลล์ที่มีชีวิต บ่มต่อที่อุณภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำสารละลายที่ได้จากกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมลบไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectro-photometer) ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้สารไดเมธิลซัลฟอกไซด์เป็นสารละลายแบลงค์ blank solution) และใช้กลุ่มที่ 7 ที่แช่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มเป็นตัวควบคุมบวก คำนวณร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตตามสูตร

$$\text{ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต} = \frac{\text{ค่า OD ของกลุ่มทดลอง} - \text{ค่า OD ของกลุ่มควบคุมลบ}}{\text{ค่า OD ของกลุ่มควบคุม} - \text{ค่า OD ของกลุ่มควบคุมลบ}} \times 100$$

3.3 การศึกษาผิวเนื้อฟัน ลักษณะ รูปร่างและการยึดเกาะของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศอิเล็กตรอนชนิดส่องกราด

นำชิ้นเนื้อฟันที่เตรียมไว้ก่อนนำไปแช่ในน้ำยาอีดีทีเอ กลุ่มละ 3 ชิ้น ไปตรวจดูพื้นผิวเนื้อฟันด้วยกล้องจุลทรรศอิเล็กตรอนชนิดส่องกราดสูญญากาศต่ำ (SEM; JSM-6610LV) หลังจากแช่ในน้ำยาอีดีทีเอครบ 7 วัน นำชิ้นตัวอย่างจากกลุ่ม 1 ถึง 7 อีกกลุ่มละ 3 ชิ้นไปตรวจดูพื้นผิวเนื้อฟัน รูปร่างและการยึดเกาะบนเนื้อฟันของเซลล์ต้นกำเนิดด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดอีก (ตารางที่ 1) ที่กำลังขยาย 1,000 และ 3,000 เท่า เพื่อประเมินดูลักษณะรูปร่างและการยึดเกาะของเซลล์บนผิวเนื้อฟัน

การวิเคราะห์ทางสถิติ

1. การประเมินร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ (percentage 0f cell viability) ในแต่ละกลุ่มทดลองหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน ทดสอบการกระจายตัวของข้อมูลด้วยสถิติโคลโมโกรอฟ-สเมียร์นอฟ (Kolmogorov-Smirnov test) พบว่าข้อมูลกลุ่มเอ็นโดคลีน สเมียร์เคลียร์และโซเดียมไฮโปคลอไรต์มีการกระจายตัวแบบไม่สม่ำเสมอ จึงทดสอบผลการศึกษาด้วยสถิติสถิติครัสคอ*ล-วอลลิส* (Kruskal-Wallis test) และทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วยสถิติ*แมน-วิทนีย์ยู* (Mann-Whitney U test) โดยใช้ระดับนัยสำคัญที่ 0.05

2. การประเมินลักษณะพื้นผิวของเนื้อฟัน ลักษณะรูปร่างและการยึดเกาะของเซลล์ ใช้สถิติเชิงพรรณา

ผลการศึกษา

ค่าร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตของกลุ่มต่าง ๆ เรียงลำดับจากมากไปน้อยดังนี้ กลุ่มอีดีทีเอร้อยละ 138.58 กลุ่มน้ำเกลือร้อยละ 119.53 กลุ่มอัลตราเด็นท์ร้อยละ 106.20 กลุ่มควบคุมบวกร้อยละ 100.00 กลุ่มเอ็นโด-คลีนร้อยละ 1.51 ส่วนกลุ่มสเมียร์เคลียร์ กลุ่มโซเดียมไฮโปคลอไรต์และกลุ่มควบคุมลบไม่พบเซลล์ที่มีชีวิตเลย

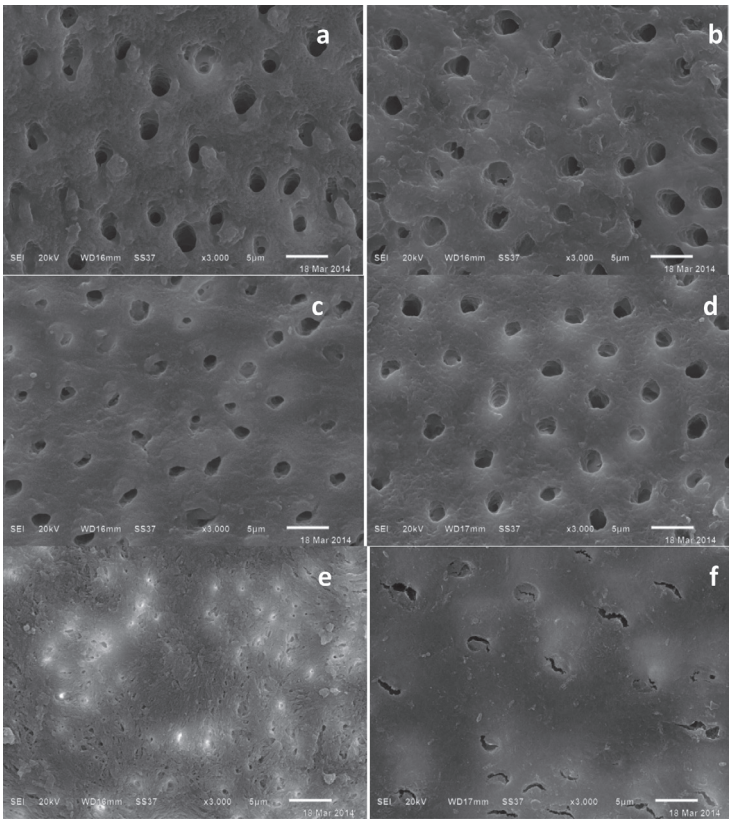
เมื่อทดสอบด้วยสถิติครัสคอ*ล-วอลลิส* พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลอง ($p<0.001$) จึงทดสอบด้วยสถิติ*แมน-วิทนีย์ยู* พบว่ากลุ่มอีดีทีเอเข้มข้นร้อยละ 17 กลุ่มน้ำเกลือ กลุ่มอัลตราเด็นท์และกลุ่มควบคุมบวกมีค่าร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) และทั้ง 4 กลุ่มนี้มีค่าร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตสูงกว่ากลุ่มเอ็นโดคลีน กลุ่มสเมียร์เคลียร์และโซเดียมโฮโปคลอไรต์อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ส่วนในกลุ่มเอ็นโดคลีน กลุ่มสเมียร์เคลียร์ และโซเดียมโฮโปคลอไรต์ มีค่าร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) (ตารางที่ 2)

ภาพผิวเนื้อฟันจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดที่กำลังขยาย 3,000 เท่าหลังจากแช่น้ำยาโดยการสุ่มจาก 3 ตำแหน่งของทุกกลุ่มทดลองพบว่ากลุ่มเอ็นโดคลีนส่วนใหญ่มีท่อเนื้อฟันขนาดใหญ่และพบสเมียร์พลัก (smear plug) ปิดท่อเนื้อฟันน้อยมาก (รูปที่ 2a) กลุ่มสเมียร์เคลียร์มีลักษณะท่อเนื้อฟันที่ใหญ่ใกล้เคียงกับกลุ่มเอ็นโดคลีนพบสเมียร์พลักปิดท่อเนื้อฟันปานกลาง (รูปที่ 2b) กลุ่มอัลตราเด็นท์มีท่อเนื้อฟันขนาดเล็กกว่า 2 กลุ่มแรกพบสเมียร์พลักปิดท่อเนื้อฟันจำนวนไม่มากเท่ากลุ่มเอ็นโดคลีน (รูปที่ 2c) กลุ่มอีดีทีเอร้อยละ 17 มีท่อเนื้อฟันขนาดปานกลาง มีสเมียร์พลักเหลืออยู่ไม่มาก (รูปที่ 2d) กลุ่มโซเดียมไฮโปคลอไรต์พบชั้นสเมียร์ปกคลุมที่เนื้อฟันอยู่มากที่สุด (รูปที่ 2e) และกลุ่มน้ำเกลือเห็นทุกท่อเนื้อฟันมีสเมียร์พลักปิดอยู่หมด (รูปที่ 2f)

ตารางที่ 2 ค่าร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตและเปรียบเทียบความต่างระหว่างกลุ่มทดลอง

Groups	Cells viability (%)
Endo Clean / 0.9% NSS	1.51[a]
Smear Clear / 0.9% NSS	0.00[a]
Ultradent / 0.9% NSS	106.20[b]
17% EDTA / 0.9% NSS	138.58[b]
5.25% NaOCl / 0.9% NSS	0.00[a]
0.9% NSS	119.53[b]
Positive control : DMEM	100.00[b]
Negative control : DMEM without cell	0.00[a]

ตัวอักษรยกระดับที่เหมือนกันแสดงว่าข้อมูลไม่แตกต่างอย่างมีนัยทางสถิติ ($p>0.05$)
ตัวอักษรยกระดับที่ต่างกันแสดงว่าข้อมูลมีความแตกต่างอย่างมีนัยทางสถิติ ($p<0.05$)



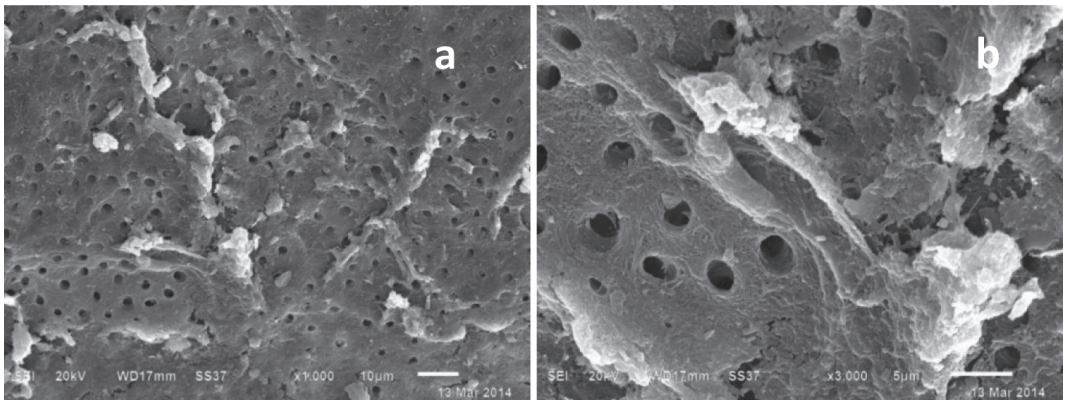
รูปที่ 2 ภาพตัวแทนจากกล้องจุลทรรศอิเล็กตรอนชนิดส่องกราดแสดงลักษณะของท่อเนื้อฟันที่มีชั้นสเมียร์ปกคลุมอยู่หลังจากแช่ใน (a) กลุ่มเอ็นโดคลีน ส่วนใหญ่มีท่อเนื้อฟันขนาดใหญ่และพบสเมียร์พลักปิดท่อเนื้อฟันน้อยมาก (b) กลุ่มสเมียร์เคลียร์ มีลักษณะท่อเนื้อฟันที่ใหญ่ใกล้เคียงกับกลุ่มเอ็นโดคลีน พบสเมียร์พลักปิดท่อเนื้อฟันปานกลาง (c) กลุ่มอัลตราเด็นท์ มีท่อเนื้อฟันขนาดเล็กกว่า 2 กลุ่มแรก พบสเมียร์พลักปิดท่อเนื้อฟันจำนวนไม่มากเท่ากลุ่มเอ็นโดคลีน (d) กลุ่มอีดีทีเอร้อยละ 17 มีท่อเนื้อฟันขนาดปานกลาง มีสเมียร์พลักเหลืออยู่ไม่มาก (e) กลุ่มโซเดียมไฮโปคลอไรต์ พบชั้นสเมียร์ปกคลุมที่เนื้อฟันอยู่มากที่สุด (f) กลุ่มน้ำเกลือ ทุกท่อเนื้อฟันมีสเมียร์พลักปิดอยู่

ลักษณะและจำนวนเซลล์จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดหลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน

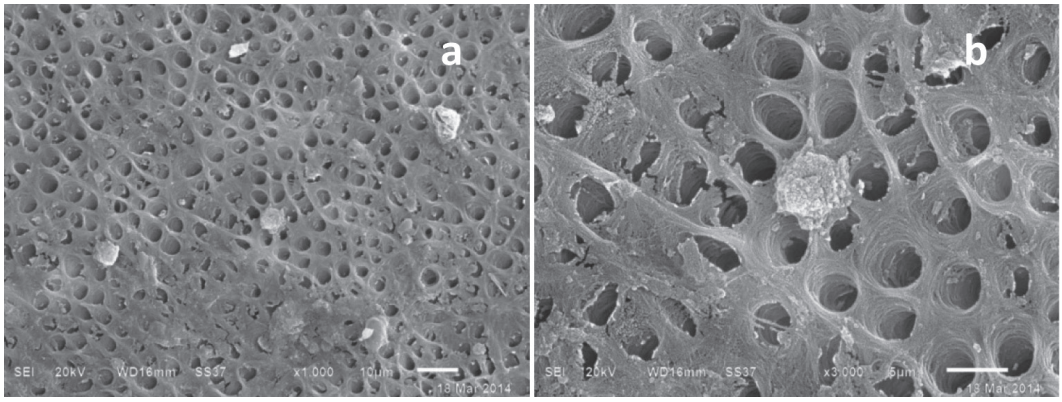
กลุ่มที่ 1 กลุ่มเอ็นโดคลีน กำลังขยาย 1,000 เท่า (รูปที่ 3a) พบเซลล์ที่มีรูปร่างกลม (rounded shape) จำนวนมาก ส่วนเซลล์รูปกระสวย (spindle shape) พบจำนวนน้อย รวมประมาณ 8 เซลล์บนผนังเนื้อฟัน กระจายตัวเป็นชั้นเดียว กำลังขยาย 3,000 เท่า (รูปที่ 3b) พบเซลล์รูปกระสวย มีการยื่นของไซโตพลาซึมตามแนวยาวไปเกาะกับเซลล์ข้างเคียงและมีการยื่นลงไปเกาะในท่อเนื้อฟันด้วย

กลุ่มที่ 2 สเมียร์เคลียร์ กำลังขยาย 1,000 เท่า (รูปที่ 4a) พบเซลล์รูปร่างกลมกระจายอยู่บนเนื้อฟัน กำลังขยาย 3,000 เท่า (รูปที่ 4b) พบว่าเซลล์รูปร่างกลมมีผิวขรุขระ มีการยื่นไซโตพลาซึมบางส่วนไปในท่อเนื้อฟัน

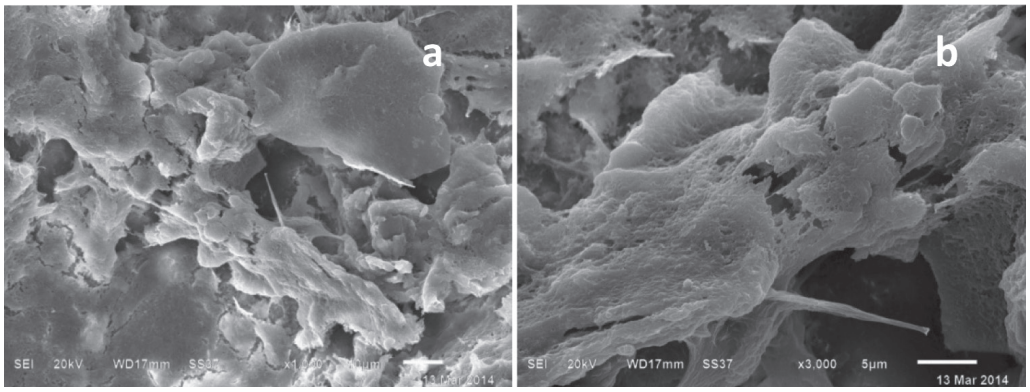
กลุ่มที่ 3 อัลตราเด็นท์ กำลังขยาย 1,000 เท่า (รูปที่ 5a) เซลล์ส่วนใหญ่ที่พบมีรูปร่างแบน (flattened shape) เซลล์ส่วนน้อยมีรูปร่างกลมและรูปกระสวยบนผนังเนื้อฟัน เซลล์มีความหนาแน่นมาก ซ้อนทับกันมากกว่า 1 ชั้น ไม่สามารถนับจำนวนเซลล์ได้ กำลังขยาย 3,000 เท่า (รูปที่ 5b) พบเซลล์รูปกระสวย ซ้อนทับอยู่กับเซลล์รูปร่างแบน ซึ่งมีการยื่นไซโตพลาซึมไปด้านข้างและออกไปตามแนวยาวของเซลล์ ไปยึดเกาะกับเซลล์ข้างเคียงอย่างหนาแน่น



รูปที่ 3 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดของกลุ่มเอ็นโดคลีน (a) กำลังขยาย 1,000 เท่า พบเซลล์รูปร่างกลมจำนวนมากและเซลล์รูปกระสวยจำนวนน้อยประมาณ 8 เซลล์ บนผนังเนื้อฟัน กระจายตัวเป็นชั้นเดียว (b) กำลังขยาย 3,000 เท่า เซลล์รูปกระสวย มีการยื่นของไซโตพลาซึมตามแนวยาวไปเกาะกับเซลล์ข้างเคียงและมีการยื่นลงไปเกาะในท่อเนื้อฟันด้วย



รูปที่ 4 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดของกลุ่มสเมียร์เคลียร์ (a) กำลังขยาย 1,000 เท่า พบเซลล์รูปร่างกลมกระจายอยู่บนเนื้อฟัน (b) กำลังขยาย 3,000 เท่า เซลล์รูปร่างกลมมีผิวขรุขระ มีการยื่นไซโต-พลาซึมบางส่วนไปในท่อเนื้อฟัน

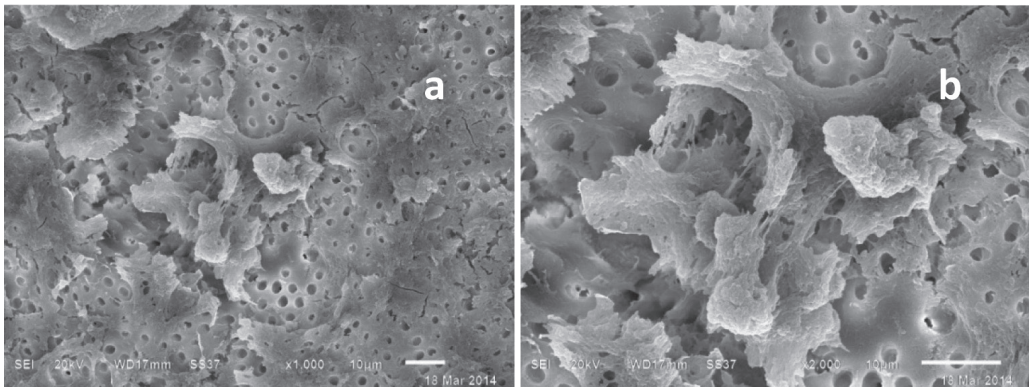


รูปที่ 5 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดของกลุ่มอัลตราเด็นท์ (a) กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่าเซลล์ส่วนใหญ่จะมีรูปร่างแบน (flattened shape) และเซลล์ส่วนน้อยมีรูปร่างกลมและรูปกระสวยบนผนังเนื้อฟัน เซลล์มีความหนาแน่นมาก ซ้อนทับกันมากกว่า 1 ชั้นไม่สามารถนับจำนวนเซลล์ได้ (b) กำลังขยาย 3,000 เท่า พบเซลล์รูปกระสวยซ้อนทับอยู่กับเซลล์รูปร่างแบน มีการยื่นไซโตพลาซึมไปด้านข้างและออกไปตามแนวยาวของเซลล์ไปยึดเกาะกับเซลล์ข้างเคียงอย่างหนาแน่น

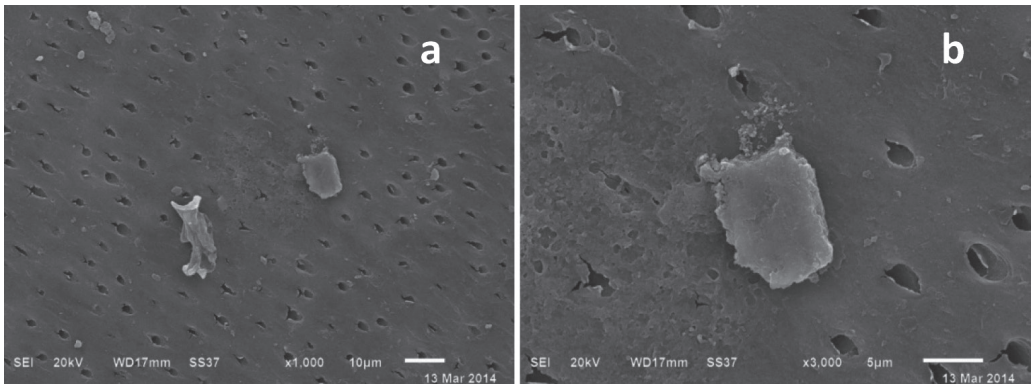
กลุ่มที่ 4 อีดีทีเอเข้มข้นร้อยละ 17 กำลังขยาย 1,000 เท่า (รูปที่ 6a) พบเซลล์รูปร่างแบนและรูปร่างกลมมีจำนวนใกล้เคียงกัน อยู่บนผนังเนื้อฟันซ้อนตัวกันมากกว่า 1 ชั้น ไม่สามารถนับจำนวนเซลล์ได้ กำลังขยาย 3,000 เท่า (รูปที่ 6b) พบลักษณะการเกาะกันของเซลล์รูปร่างแบนและรูปร่างกลม มีการยื่นไซโตพลาซึมมาเกาะกันอย่างหนาแน่น

กลุ่มที่ 5 โซเดียมโฮโปคลอไรต์เข้มข้นร้อยละ 5.25 กำลังขยาย 1,000 เท่า (รูปที่ 7a) พบเซลล์มีรูปร่างไม่แน่นอน (irregular shape) จำนวน 1 เซลล์ และพบเศษเยื่อหุ้มเซลล์กระจายบนผนังเนื้อฟัน กำลังขยาย 3,000 เท่า (รูปที่ 7b) พบว่าเซลล์ที่มีรูปร่างไม่แน่นอน มีลักษณะผิวเยื่อหุ้มเซลล์ขรุขระและมีการฉีกขาด มีการรั่วของสารในเซลล์ออกมาภายนอก ซึ่งแสดงว่าเป็นเซลล์ที่ไม่มีชีวิต

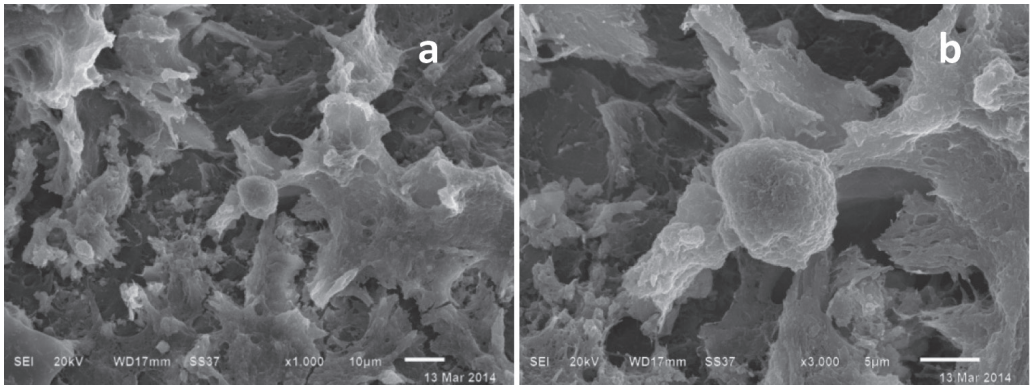
กลุ่มที่ 6 กลุ่มน้ำเกลือเข้มข้นร้อยละ 0.9 กำลังขยาย 1,000 เท่า (รูปที่ 8a) พบเซลล์รูปร่างแบนเป็นส่วนใหญ่ เซลล์รูปร่างกลมและรูปกระสวยพบได้เป็นจำนวนน้อย อยู่บนผนังเนื้อฟันซ้อนตัวกันมากกว่า 1 ชั้น มีความหนาแน่นปานกลาง ไม่สามารถนับจำนวนเซลล์ได้ กำลังขยาย 3,000 เท่า (รูปที่ 8b) พบเซลล์รูปร่างแบนยื่นส่วนของไซโตพลาซึมออกไปรอบ ๆ เซลล์และยื่นไปเกาะกับเซลล์รูปร่างกลมด้วย



รูปที่ 6 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดของกลุ่มอีดีทีเอเข้มข้นร้อยละ 17 (a) กำลังขยาย 1,000 เท่า พบเซลล์รูปร่างแบนและรูปร่างกลมจำนวนใกล้เคียงกัน อยู่บนผนังเนื้อฟัน ซ้อนกันมากกว่า 1 ชั้น ไม่สามารถนับจำนวนเซลล์ได้ (b) กำลังขยาย 3,000 เท่า มีการเกาะกันของเซลล์รูปร่างแบนและรูปร่างกลม มีการยื่นไซโตพลาซึมมาเกาะกันอย่างหนาแน่น

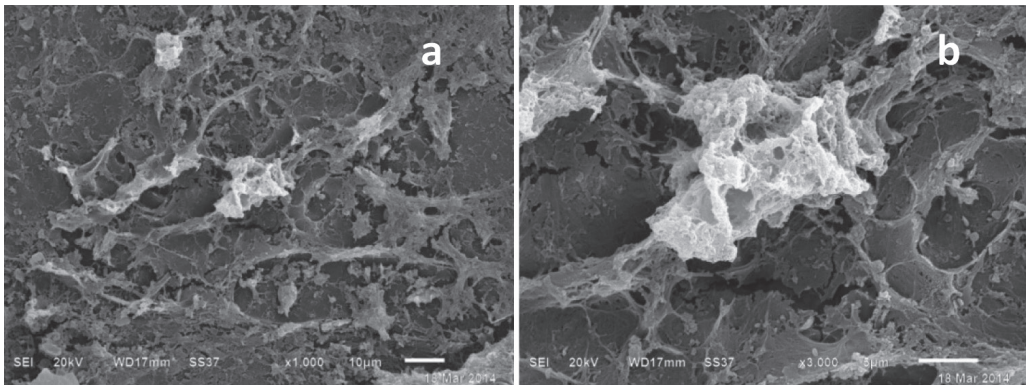


รูปที่ 7 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดของกลุ่มโซเดียมโฮโปคลอไรต์ (a) กำลังขยาย 1,000 เท่า พบเซลล์รูปร่างไม่แน่นอน (irregular shape) จำนวน 1 เซลล์และพบเศษเยื่อหุ้มเซลล์กระจายบนผนังเนื้อฟัน (b) กำลังขยาย 3,000 เท่า พบเซลล์รูปร่างไม่แน่นอน ลักษณะผิวเยื่อหุ้มเซลล์ขรุขระและมีการฉีกขาด มีการรั่วของสารในเซลล์ออกมาภายนอก แสดงว่าเป็นเซลล์ที่ไม่มีชีวิต



รูปที่ 8 กลุ่มน้ำเกลือ ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (a) กำลังขยาย 1,000 เท่า พบเซลล์รูปร่างแบนเป็นส่วนใหญ่ เซลล์รูปกลมและรูปกระสวยพบเป็นจำนวนน้อย อยู่บนผนังเนื้อฟันซ้อนตัวกันมากกว่า 1 ชั้น มีความหนาแน่นปานกลาง ไม่สามารถนับจำนวนเซลล์ได้ (b) กำลังขยาย 3,000 เท่า พบเซลล์รูปร่างแบนยื่นไซโตพลาซึมออกไปรอบ ๆ เซลล์และยื่นไปเกาะกับเซลล์รูปร่างกลมด้วย

กลุ่มที่ 7 กลุ่มควบคุมบวก กำลังขยาย 1,000 เท่า (รูปที่ 9a) พบเซลล์รูปกระสวยและรูปกลมกระจายทั่วผนังเนื้อฟัน ซ้อนตัวกันมากกว่า 1 ชั้น มีความหนาแน่นมากที่สุด ไม่สามารถนับจำนวนเซลล์ได้ และกำลังขยาย 3,000 เท่า (รูปที่ 9b) พบเซลล์รูปกระสวยและรูปกลมมีการยื่นไซโตพลาซึมออกมาเกาะกับเซลล์ข้างเคียงอย่างหนาแน่น



รูปที่ 9 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดของกลุ่มควบคุมบวก (a) กำลังขยาย 1,000 เท่า พบเซลล์รูปกระสวยและรูปกลมกระจายทั่วผนังเนื้อฟัน ซ้อนตัวกันมากกว่า 1 ชั้น มีความหนาแน่นมากที่สุด ไม่สามารถนับจำนวนเซลล์ได้ (b) กำลังขยาย 3,000 เท่า พบเซลล์รูปกระสวยและรูปกลมมีการยื่นไซโตพลาซึมออกมาเกาะกับเซลล์ข้างเคียงอย่างหนาแน่น

บทวิจารณ์

จากผลการศึกษาพบกลุ่มทดลองที่มีค่าร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตสูงกว่ากลุ่มควบคุมบวก 3 กลุ่ม ได้แก่กลุ่มอีดีทีเอเข้มข้นร้อยละ 17 กลุ่มน้ำเกลือและกลุ่มอัลตราเด็นท์ กลุ่มอีดีทีเอเข้มข้นร้อยละ 17 มีค่าร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตสูงที่สุด เนื่องจากเป็นน้ำยาอีดีทีเอบริสุทธิ์ที่ไม่มีการเติมสารอื่นเพิ่มเติม จึงไม่มีสารที่เป็นพิษต่อเซลล์ และตัวอีดีทีเอเองยังช่วยส่งเสริมการเจริญของเซลล์ต้นกำเนิดเนื้อเยื่อใน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Ring และคณะ [13] และ Sutimuntanakul และคณะ [20] กลุ่มน้ำเกลือมีค่าร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตสูงเป็นอันดับสอง แสดงให้เห็นว่าน้ำเกลือเป็นสารที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เช่นเดียวกัน เนื่องจากน้ำเกลือเป็นสารละลายที่เป็นไอโซทอนิก (*isotonic solution*) และมีแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) ใกล้เคียงกับเซลล์ จึงไม่ทำให้เซลล์ขยายหรือหดตัว ไม่มีอันตรายต่อเซลล์ [28] กลุ่มอัลตราเด็นท์ เป็นสารอีดีทีเอที่เติมสารลดแรงตึงผิวชนิดลอริลอีเทอร์ซัลเฟตลงไป สารลอริลอีเทอร์ซัลเฟตมีความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อจากเหงือกและเซลล์ไฟโบรบลาสเมื่อมีความเข้มข้นร้อยละ 0.006 และ 0.009 ขึ้นไป [29, 30] ความเข้มข้นที่เติมลงใน อัลตราเด็นท์อาจน้อยกว่าความเข้มข้นที่มีพิษต่อเซลล์ จึงไม่ปรากฏความเป็นพิษต่อเซลล์ต้นกำเนิดเนื้อเยื่อในและยังช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ได้

สำหรับกลุ่มเอ็นโดคลีน สเมียร์เคลียร์ และโซเดียมไฮโปคลอไรต์ มีค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์น้อยกว่ากลุ่มควบคุมบวก โดยในเอ็นโดคลีนมีสารเซทิลไตรเมทธิลแอมโมเนียมโบรไมด์ (cetyl trimethyl ammonium bromide) ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีประจุบวก (cationic surfactant) [31] ส่วนในสเมียร์-เคลียร์มีสารเซทริไมด์ (cetrimide) เป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีประจุลบ (anionic surfactant) มีฤทธิ์ต้านเชื้อราและช่วยยืดอายุการใช้งาน แม้ว่าเซทิลไตรเมทธิลแอมโมเนียมโบรไมด์และเซทริไมด์ยังไม่พบข้อมูลที่เพียงพอในการอธิบายถึงความเป็นพิษต่อเซลล์ และข้อมูลส่วนประกอบของแต่ละบริษัทไม่ได้ระบุความเข้มข้นของสารที่ใช้ไว้ แต่ผลการศึกษาก็พบว่าน้ำยาอีดีทีเอที่มีส่วนประกอบของสารเหล่านี้ มีผลทำให้ความมีชีวิตของเซลล์ต้นกำเนิดเนื้อเยื่อในลดลง

จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าน้ำยาอีดีทีเอเป็นสารที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ แต่น้ำยาอีดีทีเอที่มีขายในท้องตลาดที่มีส่วนผสมของสารลดแรงตึงผิวและสารอื่นด้วย จะมีความเป็นพิษต่อเซลล์ได้ ทั้งนี้ขึ้นกับปริมาณและชนิดของสารที่เพิ่มเติมเข้าไป โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการล้างคลองรากฟันในงานรักษาคลองรากฟันปรกติ ส่วนการรักษาคลองรากฟันรีเจนเนอเรทีฟที่ต้องใช้น้ำยาอีดีทีเอล้างคลองรากฟัน จึงควรใช้น้ำยาอีดีทีเอที่ไม่มีสารอื่นเจือปนอยู่ จะช่วยให้การรักษาได้ผลดีและประสบความสำเร็จได้มากกว่า

ค่าร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตในกลุ่มโซเดียมไฮโปคลอไรต์มีน้อยกว่ากลุ่มควบคุมบวก เนื่องจากโซเดียมไฮโปคลอไรต์สามารถละลายเนื้อเยื่อได้ดี ลดค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ของผิวเนื้อฟัน และยังมีคลอรีนส่วนเกินจากปฏิกิริยาการแตกตัวตกค้างที่ผิวเนื้อฟัน [32] ทำให้มีความเป็นพิษต่อเซลล์และไม่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Ring และคณะ [13] และ Sutimuntanakul และคณะ [20]

ภาพของเซลล์ต้นกำเนิดเนื้อเยื่อในจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดของกลุ่มอีดีทีเอเข้มข้นร้อยละ 17 น้ำเกลือ อัลตราเด็นท์และกลุ่มควบคุมบวก มีลักษณะแบนเป็นส่วนใหญ่ มีการยื่นของไซโต-พลาซึมและมีการแผ่ไฟโลโปเดีย (filopodia) ของเซลล์ออกไปรอบ ๆ เซลล์ และมีบางส่วนยื่นเข้าไปเกาะในท่อเนื้อฟัน แสดงถึงลักษณะของเซลล์ที่แข็งแรงและมีการเจริญเติบโตยึดเกาะบนชิ้นตัวอย่างได้ดี แสดงว่าน้ำยาอีดีทีเอร้อยละ 17 และอัลตราเด็นท์ ไม่ได้มีความเป็นพิษต่อเซลล์ [33] ในกลุ่มน้ำเกลือและกลุ่มควบคุมบวก แม้ว่าจะยังมีสเมียร์พลักอุดในท่อเนื้อฟันและมีชั้นสเมียร์ที่เกิดในขั้นตอนการตัดฟันบนชิ้นตัวอย่าง แต่มีการศึกษาที่พบว่าชั้นสเมียร์บนเนื้อฟันนั้นไม่ได้มีผลต่อการยึดเกาะของเซลล์เมื่อเทียบกับเนื้อฟันที่ไม่มีชั้นสเมียร์ [34] เซลล์ในทั้งสองกลุ่มนี้จึงมีการยึดเกาะที่ไม่ต่างจากกลุ่มของอีดีทีเอเข้มข้นร้อยละ 17 และอัลตราเด็นท์ แสดงให้เห็นว่าการกำจัดชั้นสเมียร์ไม่ได้เป็นปัจจัยที่จำเป็นต่อความมีชีวิต ส่วนกลุ่มเอ็นโดคลีนและ สเมียร์เคลียร์มีการแผ่ไฟโลโปเดียของเซลล์ออกไปไม่มาก เซลล์มีรูปร่างกลมและกระสวย แสดงถึงลักษณะของเซลล์ที่ไม่แข็งแรง การเจริญเติบโตไม่ดี ซึ่งเป็นผลจากน้ำยาทั้ง 2 ชนิดนี้ กลุ่มโซเดียมไฮโปคลอไรต์พบเซลล์ที่เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย แสดงถึงความเป็นพิษต่อเซลล์มากที่สุด

การกระจายตัวของข้อมูลจากการศึกษานี้พบว่าไม่ปกติ อาจเกิดในขั้นตอนการเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ในช่วง 4 ชั่วโมงแรกที่เซลล์กำลังเริ่มยึดเกาะกับชิ้นเนื้อฟันซึ่งต้องดูจากกล้องจุลทรรศน์ แต่แสงจากกล้องจุลทรรศน์ไม่สามารถส่องผ่านชิ้นเนื้อฟัน จึงเป็นอาจทำให้การตรวจการยึดเกาะของเซลล์ผิดพลาดได้ จากการศึกษานำร่อง (pilot study) ที่เลี้ยงเซลล์บนชิ้นเนื้อฟันโดยใช้เซลล์จำนวน 10,000 15,000 30,000 และ 50,000 เซลล์ที่เวลา 1, 2, 4 และ 24 ชั่วโมง พบว่าเมื่อเลี้ยงเซลล์จำนวน 30,000 เซลล์ที่เวลา 4 ชั่วโมงก่อนการเติมอาหาร มีการหลุดของเซลล์จากชิ้นฟันน้อยที่สุด ซึ่งเป็นการยึดเกาะของเซลล์บนเนื้อฟันดีที่สุดและมีปริมาณเซลล์ที่เหมาะสม สามารถตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ได้ดี จึงเลือกใช้เซลล์จำนวน 30,000 เซลล์ ที่เวลา 4 ชั่วโมงในการศึกษานี้

บทสรุป

ร้อยละของเซลล์มีชีวิตของกลุ่มน้ำยาอีดีทีเอร้อยละ 17 อัลตราเด็นท์ และน้ำเกลือร้อยละ 0.9 มีค่าสูงกว่ากลุ่มเอ็นโดคลีน สเมียร์เคลียร์และโซเดียมไฮโปคลอไรต์ร้อยละ 5.25 โดยกลุ่มเอ็นโดคลีน สเมียร์เคลียร์ และอีดีทีเอสามารถกำจัดชั้นสเมียร์ได้ดีกว่ากลุ่มอัลตราเด็นท์ โซเดียมไฮโปคลอไรต์ และน้ำเกลือ การกำจัดชั้นสเมียร์ไม่ใช่ปัจจัยจำเป็นที่ช่วยให้ความมีชีวิตชองเซลล์เพิ่มขึ้น

การยอมรับทางจริยธรรม

ได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน ประจำคณะทันตแพทยศาสตร์และคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เลขที่ MU-DT/PY-IRB 2012/071.0312

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ **คุณไพรัช ทองงาม คุณกรกนก พรหมเทพ** และ**คุณชินรัตน์ แจ้งแสงฟ้า** นักปฏิบัติการวิจัย กลุ่มงานวิจัยชีววิทยาระบบสืบพันธุ์และสเต็มเซลล์ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา ที่ช่วยเหลือแนะนำการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิด

ผลประโยชน์ขัดกัน

ไม่มี

เอกสารอ้างอิง

1. Murray PE, Garcia-Godoy F, Hargreaves KM. Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. J Endod. 2007; 33(4): 377-90.
2. Wigler R, Kaufman AY, Lin S, Steinbock N, Hazan-Molina H, Torneck CD. Revascularization: a treatment for permanent teeth with necrotic pulp and incomplete root development. J Endod. 2013; 39(3): 319-26.
1. 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.
2. Wigler R, Kaufman AY, Lin S, Steinbock N, Hazan-Molina H, Torneck CD. Revascularization: a treatment for permanent teeth with necrotic pulp and incomplete root development. Journal of endodontics. 2013;39(3):319-26.
3. Rafter M. Apexification: a review. Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology. 2005; 21(1):1-8.
4. Garcia-Godoy F, Murray PE. Recommendations for using regenerative endodontic procedures in permanent immature traumatized teeth. Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology. 2012;28(1):33-41.
5. 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.
6. 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.
7. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2000;97(25):13625-30.
8. Huang GT, 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.
9. 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.
10. Huang X, Zhang J, Huang C, Wang Y, Pei D. Effect of intracanal dentine wettability on human dental pulp cell attachment. International endodontic journal. 2012;45(4):346-53.
11. Zhang R, Cooper PR, Smith G, Nor JE, Smith AJ. Angiogenic activity of dentin matrix components. Journal of endodontics. 2011;37(1):26-30.
12. Bettina Basrani, Haapasalo M. Update on endodontic irrigating solutions. Endodontic Topics. 2012;27:74-102.
13. Ring KC, Murray PE, Namerow KN, Kuttler S, Garcia-Godoy F. The comparison of the effect of endodontic irrigation on cell adherence to root canal dentin. Journal of endodontics. 2008;34(12):1474-9.

14. Galler KM, D'Souza RN, Federlin M, Cavender AC, Hartgerink JD, Hecker S, et al. Dentin conditioning codetermines cell fate in regenerative endodontics. Journal of endodontics. 2011; 37(11):1536-41.
15. 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.
16. Rosenberg K, Olsson H, Morgelin M, Heinegard D. Cartilage oligomeric matrix protein shows high affinity zinc-dependent interaction with triple helical collagen. The Journal of biological chemistry. 1998;273(32):20397-403.
17. Roberts-Clark DJ, Smith AJ. Angiogenic growth factors in human dentine matrix. Archives of oral biology. 2000;45(11):1013-6.
18. Toledano M, Aguilera FS, Yamauti M, Ruiz-Requena ME, Osorio R. In vitro load-induced dentin collagen-stabilization against MMPs degradation. Journal of the mechanical behavior of biomedical materials. 2013;27:10-8.
19. Li R, Guo W, Yang B, Guo L, Sheng L, Chen G, et al. Human treated dentin matrix as a natural scaffold for complete human dentin tissue regeneration. Biomaterials. 2011;32(20):4525-38.
20. เลิศอักษรไพบูล วรงล. Effect of solution enchancing dental pulp stem cells on dentin attachment and cell survival. รายงานการวิจัยเพื่อประกาศนียบัตรชั้นสูง สาขาวิชาทันตแพทยศาสตร์ วิชาเอก วิทยาเอ็นโดดอนต์. 2012.
21. 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. 2013:1-7.
22. AAE. Clinical Considerations for a Regenerative Procedure. 2013.
23. Hulsmann M, Heckendorff M, Lennon A. Chelating agents in root canal treatment: mode of action and indications for their use. International endodontic journal. 2003; 36(12):810-30.
24. Song J, Liu L, Li P, Xiong G. Short-range interactions between surfactants, silica species and EDTA(4)-salt during self-assembly of siliceous mesoporous molecular sieve: a UV Raman study. Spectrochimica acta Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy. 2012;97: 616-24.
25. Bhatnagar R, M. DKN, Shivanna V. Decalcifying effect of three chilating agents. endodontology. 2006;18(2).
26. De-Deus G, Reis C, Fidel S, Fidel R, Paciornik S. Dentine demineralization when subjected to EDTA with or without various wetting agents: a co-site digital optical microscopy study. International endodontic journal. 2008;41(4): 279-87.
27. Lui JN, Kuah HG, Chen NN. Effect of EDTA with and without surfactants or ultrasonics on removal of smear layer. Journal of endodontics. 2007;33(4):472-5.
28. Awad S, Allison SP, Lobo DN. The history of 0.9% saline. Clinical nutrition. 2008;27(2): 179-88.
29. Barbosa SV, Barroso CM, Ruiz PA. Cytotoxicity of endodontic irrigants containing calcium hydroxide and sodium lauryl sulphate on fibroblasts derived from mouse L929 cell line. Brazilian dental journal. 2009;20(2):118-21.

30. Babich H, Babich JP. Sodium lauryl sulfate and triclosan: in vitro cytotoxicity studies with gingival cells. Toxicology letters. 1997;91(3):189-96.
31. http://en.wikipedia.org/wiki/Cetrimonium_bromide.
32. Spano JC, Barbin EL, Santos TC, Guimaraes LF, Pecora JD. Solvent action of sodium hypochlorite on bovine pulp and physico-chemical properties of resulting liquid. Brazilian dental journal. 2001;12(3):154-7.
33. Rajaraman R, Rounds DE, Yen SP, Rembaum A. A scanning electron microscope study of cell adhesion and spreading in vitro. Experimental cell research. 1974;88(2):327-39.
34. Al-Nazhan S. SEM observations of the attachment of human periodontal ligament fibroblasts to non-demineralized dentin surface in vitro. Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics. 2004;97(3): 393-7.