วัสดุและวิธีการวิจัย

ข้อตกลงเบื้องต้น

ประชากรและตัวอย่าง

กลุ่มประชากรได้เลือกตัวอย่างจากผู้ป่วยที่เข้ามารับบริการทางทันตกรรม ณ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยไม่กำหนดช่วงอายุ เพศชายหรือหญิง โดยใช้ฟันที่จำเป็นต้องได้รับการรักษารากฟัน จำนวน 18 ซี่ โดยแบ่งกลุ่มตัวอย่างเป็น 2 กลุ่มดังนี้

1. ฟันที่วินิจฉัยเป็นฟัน**ปกติและไม่มีรอยโรครอบรากฟัน** (normal pulp without periradicular lesion) จำนวน 6 ซี่
2. ฟันที่วินิจฉัยเป็น**ฟันตาย และมีรอยโรครอบรากฟัน** (pulp necrosis with periradicular lesion) จำนวน 12 ซี่

กลุ่มที่ 1 ฟันที่วินิจฉัยเป็นฟันปกติ และไม่มีรอยโรครอบรากฟัน เป็นกลุ่มฟันที่มีชีวิตอยู่ (vital) โดยเมื่อตรวจด้วยเครื่องทดสอบความมีชีวิตของฟันแล้วได้ผลเป็นบวก (EPT positive) ไม่มีอาการของโรคในทางเอ็นโดดอนติกส์ ไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ ในภาพรังสีไม่พบเงาโปร่งรังสีหรือเงาทึบรังสีบริเวณรอบรากฟัน และเป็นฟันที่ต้องได้รับการรักษารากฟันแบบจงใจ (intentional root canal treatment) ด้วยสาเหตุทางทันตกรรมบูรณะ หรือทันตกรรมประดิษฐ์

กลุ่มที่ 2 ฟันที่วินิจฉัยเป็นฟันตาย และมีรอยโรครอบรากฟัน เป็นกลุ่มฟันที่ไม่มีชีวิต (non-vital) โดยเมื่อตรวจด้วยเครื่องทดสอบความมีชีวิตของฟันแล้วได้ผลเป็นลบ (EPT negative) ภาพรังสีพบเงาโปร่งรังสีบริเวณรอบรากฟันขนาดใหญ่กว่า 10 ตารางมิลลิเมตร และเป็นฟันที่ไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ

เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครเข้าร่วมโครงการ (Inclusion criteria) อาสาสมัครยินยอมเข้าร่วมโครงการ และลงนามในใบยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย โดยอาสาสมัครต้องมีฟันรากเดียวที่ปลายรากฟันเจริญเต็มที่แล้ว จำเป็นต้องได้รับการรักษารากฟัน และฟันอยู่ในสภาพที่สามารถทำการรักษารากฟันจนเสร็จสิ้น รวมทั้งบูรณะได้หลังจากทำการรักษารากฟันเสร็จสิ้นแล้ว อาสาสมัครที่อายุต่ำกว่า 20 ปีต้องได้รับอนุญาต และลงนามในใบยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยจากผู้ปกครองก่อน และอาสาสมัครต้องลงนามในใบยินยอมพร้อมใจ รวมทั้งมีการลงนามใบยินยอมให้ทำหัตถการก่อนการทำวิจัยทุกครั้ง

เกณฑ์การไม่รับอาสาสมัครเข้าโครงการ (Exclusion criteria) อาสาสมัคร หรือผู้ปกครองของอาสาสมัครไม่ประสงค์จะเข้าร่วมโครงการ หรือฟันตัวอย่างเป็นฟันรากเปิด ฟันที่ไม่จำเป็นต้องรับการรักษารากฟัน หรือสภาพของฟันไม่สามารถทำการรักษารากฟันให้เสร็จสิ้น รวมทั้งที่จะบูรณะได้หลังจากรักษารากฟันเสร็จสิ้นแล้ว

เกณฑ์การบอกเลิกจากการศึกษา (Discontinuation criteria) กรณีอาสาสมัคร หรือผู้ปกครองของอาสาสมัครไม่ประสงค์จะเข้าร่วมโครงการ หรือต้องการออกจากโครงการในระหว่างการวิจัยสามารถแจ้งความประสงค์ได้ทันที

การตอบแทนในการเข้าร่วมโครงการวิจัย

1. เงินสนับสนุนค่าเดินทางจำนวน 200 บาท
2. ชุดทำความสะอาดฟันพร้อมคำแนะนำในการทำความสะอาดฟันให้กับผู้ป่วย
3. ทำการขูดหินน้ำลายและขัดฟันให้ผู้ป่วย
4. ผู้ป่วยที่ไม่สามารถใช้สิทธิ์ในการเบิกสวัสดิการค่ารักษาพยาบาลได้ และประสงค์ที่จะเข้าร่วมในการวิจัยจะได้รับการยกเว้นค่ารักษาที่เกี่ยวข้องกับการรักษารากฟันซี่นั้น ๆ แต่จะไม่ครอบคลุมถึง ค่าใช้จ่ายในการบูรณะฟันที่นอกเหนือจากการรักษารากฟัน
5. สำหรับผู้ป่วยที่ใช้สิทธิ์ในการเบิกสวัสดิการค่ารักษาพยาบาลได้ จะขอให้ผู้ป่วยใช้สิทธิ์นั้นๆ โดยทางคณะจะคิดค่ารักษาทางทันตกรรม ในอัตราค่ารักษา ระดับที่ 2 ตามประกาศฯ ของคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย การควบคุมการวิจัย การเก็บรวบรวมข้อมูล และการวิเคราะห์ข้อมูล

ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างสิ่งรั่วข้นในคลองรากฟัน

1. ทำการตรวจเบื้องต้นก่อนการรักษารากฟัน และถ่ายภาพรังสีก่อนการรักษารากฟัน
2. ในตัวอย่างที่เป็นฟันที่วินิจฉัยว่าเป็นฟันปกติ ฉีดยาชาเฉพาะที่ก่อนเริ่มทำการรักษารากฟัน
3. แยกฟันที่ศึกษาออกจากสิ่งแวดล้อมด้วยวิธีการใส่แผ่นยางกันน้ำลาย
4. ทำความสะอาดแผ่นยางกันน้ำลาย และฟันตัวอย่างให้ปลอดเชื้อด้วยคลอเฮกซิดีน กลูโคเนท ความเข้มข้นร้อยละ 2 (2% Chlorhexidine gluconate)
5. กรอเปิดทางเข้าสู่คลองรากฟันด้วยหัวกรอปลอดเชื้อ
6. กำจัดเนื้อเยื่อในฟันที่คงเหลืออยู่ และล้างคลองรากฟันด้วยน้ำยาล้างคลองรากฟันโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้นร้อยละ 5 (5% Sodium hypochlorite)
7. วัดหาความยาวรากฟันโดยใช้เครื่องวัดความยาวรากฟันร่วมกับภาพถ่ายรังสี กำหนดให้ระยะทำงาน (working length) สั้นกว่าความยาวคลองรากฟัน (root canal length) 0.5-1.0 มิลลิเมตร

8. ขยายคลองรากฟันร่วมกับการล้างคลองรากฟัน ด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้นร้อยละ 5 และขยายคลองรากฟันให้ได้ขนาดของตะไบเบอร์สุดท้ายที่ขยายบริเวณระยะทำงานไม่น้อยกว่าเบอร์ 40
9. ใส่ยาในคลองรากฟันโดยใช้สำลีชุบแคมโฟเรตเตท พาราโมโนคลอโรฟีนอล (Camphorated paramonochlorophenol) ใส่ไว้ในคลองรากฟันโดยไม่ให้สัมผัสกับเนื้อเยื่อบริเวณปลายรากฟันโดยตรง
10. ปิดทางเข้าคลองรากฟันด้วยวัสดุอุดฟันแบบชั่วคราวชนิดซิงค์ออกไซด์ (Zinc oxide) เช่น Fermin® หรือ Cavit® ให้มีความหนาไม่น้อยกว่า 3.5 มม.
11. ทำการนัดครั้งต่อไปภายใน 2-3 วัน

ในกรณีที่ตัวอย่างเป็นฟันที่วินิจฉัยเป็นฟันปกติ และไม่มีรอยโรครอบรากฟัน

12. ในการนัดครั้งที่สอง หลังจากทำขั้นตอนที่ 3-5 แล้วให้นำเอาก้อนสำลีชุบยาแคมโฟเรตเตท พาราโมโนคลอโรฟีนอลที่ใส่ในคลองรากฟันออกมา ทำการเก็บตัวอย่างสิ่งรั่วขันในคลองรากฟันโดยใช้เครื่องมือ micropipette ดูด Eluting buffer (เป็นส่วนผสมของ NaCl 0.15 โมลาร์ และ $CaCl_2$ 1 มิลลิโมลาร์ ใน 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl buffer ที่ pH 7.5) ที่บรรจุใน eppendorf ที่บรรจุ Eluting buffer อยู่ 50 ไมโครลิตร ออกมาจำนวน 10 ไมโครลิตร แล้วใส่ไว้ในคลองรากฟันเป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้นจึงดูดน้ำยากลับในปริมาณเท่าเดิม แล้วเก็บตัวอย่างสิ่งรั่วขันที่ได้ไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส
13. หลังจากที่เก็บตัวอย่างสิ่งรั่วขันในคลองรากฟันแล้ว จึงเก็บตัวอย่างเพื่อทำการเพาะเชื้อโดยการใส่กระดาษซับปลอดเชื้อรูปกรวยแหลม (sterile paper point) ไว้ในคลองรากฟันเป็นเวลา 30 วินาที แล้วนำตัวอย่างที่ได้ไปทำการเพาะเชื้อด้วย Thioglycollate medium เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
14. ตัวอย่างที่เป็นฟันที่วินิจฉัยเป็นฟันปกติ และไม่มีรอยโรครอบรากฟันจะทำการเก็บตัวอย่างเพียงครั้งเดียว เมื่อเก็บตัวอย่างเรียบร้อยแล้วจะทำการอุดคลองรากฟันด้วยวิธี และวัสดุที่เหมาะสมต่อไป

ในกรณีที่ตัวอย่างเป็น ฟันที่วินิจฉัยเป็นฟันตาย และมีรอยโรครอบรากฟัน

15. ในการนัดครั้งที่สอง หลังจากทำขั้นตอนที่ 3-5 แล้วให้นำเอาก้อนสำลีชุบยาแคมโฟเรตเตท พาราโมโนคลอโรฟีนอลที่ใส่ในคลองรากฟันออกมา ทำการเก็บตัวอย่างสิ่งรั่วขันในคลองรากฟัน

ครั้งที่ 1 โดยใช้ micropipette ดูด Eluting buffer ที่บรรจุใน eppendorf ที่บรรจุ Eluting buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ออกมาจำนวน 10 ไมโครลิตร แล้วใส่ไว้ในคลองรากฟันเป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้นจึงดูดน้ำยากลับในปริมาณเท่าเดิม แล้วเก็บตัวอย่างสิ่งรั่วข้นที่ได้ไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

16. หลังจากที่เก็บตัวอย่างสิ่งรั่วข้นในคลองรากฟันแล้ว จึงเก็บตัวอย่างเพื่อทำการเพาะเชื้อ ครั้งที่ 1 โดยการใส่กระดาษซับปลอดเชื้อรูปกรวยแหลม ไว้ในคลองรากฟันเป็นเวลา 30 วินาที แล้วนำตัวอย่างที่ได้ไปทำการเพาะเชื้อด้วย Thioglycollate medium เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
17. ล้างคลองรากฟันด้วยน้ำยาโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้นร้อยละ 5 ใส่ยาในคลองรากฟันโดยใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์ผสมกับน้ำกลั่นในอัตราส่วนที่เหมาะสม ใช้ lentulo spiral นำยาเข้าสู่คลองรากฟัน
18. ปิดทางเข้าคลองรากฟันด้วยวัสดุอุดฟันแบบชั่วคราวชนิดซิงค์ออกไซด์ ให้มีความหนาไม่น้อยกว่า 3.5 มม.
19. ทำการนัดครั้งต่อไปในอีก 2 สัปดาห์
20. ในการนัดครั้งต่อไป หลังจากทำขั้นตอนที่ 3-5 แล้วใช้ไฟล์กำจัดแคลเซียมไฮดรอกไซด์ออกจากคลองรากฟันอย่างระมัดระวัง ร่วมกับการใช้น้ำยาโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้นร้อยละ 5 และล้างคลองรากฟันด้วย Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) ความเข้มข้นร้อยละ 17 เมื่อกำจัดแคลเซียมไฮดรอกไซด์จนแล้วจึงล้างคลองรากฟันอีกครั้งเพื่อล้าง EDTA ที่อยู่ในคลองรากฟันด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้นร้อยละ 5 เปลี่ยนยาที่ใส่ในคลองรากฟันเป็นแคมโฟเรตเตท พาราโมโนคลอโรฟีนอล
21. ปิดทางเข้าคลองรากฟันด้วยวัสดุอุดชั่วคราววัสดุอุดฟันแบบชั่วคราวชนิดซิงค์ออกไซด์ ให้มีความหนาไม่น้อยกว่า 3.5 มม.
22. ทำการนัดครั้งต่อไปภายใน 2-3 วัน
23. ในการนัดครั้งต่อไป หลังจากทำขั้นตอนที่ 3-5 แล้วให้นำเอาก้อนสำลีชุบยาแคมโฟเรตเตท พาราโมโนคลอโรฟีนอลที่ใส่ในคลองรากฟันออกมา ทำการเก็บตัวอย่างสิ่งรั่วข้นในคลองรากฟันครั้งที่ 2 โดยใช้ micropipette ใส่ Eluting buffer ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ไว้ในคลองรากฟันเป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้นจึงดูดน้ำยากลับ แล้วเก็บตัวอย่างสิ่งรั่วข้นที่ได้ไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส
24. หลังจากที่เก็บตัวอย่างสิ่งรั่วข้นในคลองรากฟันแล้ว จึงเก็บตัวอย่างเพื่อทำการเพาะเชื้อครั้งที่ 2 โดยการใส่กระดาษซับปลอดเชื้อรูปกรวยแหลม ไว้ในคลองรากฟันเป็นเวลา 30 วินาที แล้วนำ

ตัวอย่างที่ได้ไปทำการเพาะเชื้อด้วย Thioglycollate medium เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

25. ล้างคลองรากฟันด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้นร้อยละ 5 แล้วใส่ยาในคลองรากฟันโดยใช้สำลีชุบแคมโฟเรตเตท พาราโมโนคลอโรฟีนอลใส่ไว้ในคลองรากฟันโดยไม่ให้สัมผัสกับเนื้อเยื่อบริเวณปลายรากฟันโดยตรง
26. ปิดทางเข้าคลองรากฟันด้วยวัสดุอุดชั่วคราววัสดุอุดฟันแบบชั่วคราวชนิดซิงค์ออกไซด์ ให้มีความหนาไม่น้อยกว่า 3.5 มม.
27. ทำการนัดครั้งต่อไปภายใน 2-3 วัน
28. ในการนัดครั้งต่อไปหลังจากทำขั้นตอนที่ 3-5 แล้วให้นำเอาก้อนสำลีชุบยาแคมโฟเรตเตท พาราโมโนคลอโรฟีนอลที่ใส่ในคลองรากฟันออกมา ทำการเก็บตัวอย่างสิ่งรั่วขันในคลองรากฟันครั้งที่ 3 โดยใช้ micropipette ใส่ Eluting buffer ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ไว้ในคลองรากฟันเป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้นจึงดูดน้ำยากลับ แล้วเก็บตัวอย่างสิ่งรั่วขันที่ได้ไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส
29. หลังจากที่เก็บตัวอย่างสิ่งรั่วขันในคลองรากฟันแล้ว จึงเก็บตัวอย่างเพื่อทำการเพาะเชื้อครั้งที่ 3 โดยการใส่กระดาษซับปลอดเชื้อรูปกรวยแหลม ไว้ในคลองรากฟันเป็นเวลา 30 วินาที แล้วนำตัวอย่างที่ได้ไปทำการเพาะเชื้อด้วย Thioglycollate medium เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
30. ถ้าผลการเพาะเชื้อในการเก็บตัวอย่างครั้งที่แล้วเป็น**บวก** ให้พิจารณาในการใส่แคลเซียมไฮดรอกไซด์ เป็นยาที่ใส่ในคลองรากฟันอีกครั้ง โดยเริ่มทำในขั้นตอนที่ 15 อีกครั้ง และทำการเก็บตัวอย่างเป็นครั้งที่ 4 หรือ 5 จนกว่าจะได้ผลการเพาะเชื้อที่เป็นลบ ในกรณีที่ผลการเพาะเชื้อเป็น**ลบ** ให้พิจารณาอาการของผู้ป่วยร่วมด้วยเพื่ออุดคลองรากฟันแล้วปิดทางเข้าคลองรากฟันด้วยวัสดุชั่วคราวที่เหมาะสมแล้วติดตามดูอาการเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จึงพิจารณาอุดทางเปิดเข้าสู่คลองรากฟันด้วยวัสดุบูรณะถาวร แล้วแนะนำผู้ป่วยเข้าคิวเพื่อรับการบูรณะฟันที่เหมาะสมต่อไป

ขั้นตอนการวิเคราะห์ตัวอย่าง

1. ขั้นตอนการวัดปริมาณโปรตีนรวมในตัวอย่างสิ่งรั่วข้นในคลองรากฟัน

วัดปริมาณโปรตีนรวมในตัวอย่างสิ่งรั่วข้นในคลองรากฟัน ที่เก็บระหว่างการรักษาคลองรากฟัน ตามหลักการของ Bradford (Bradford, 1976) โดยใช้ชุดสำเร็จรูป Protein Assay Dye reagent Concentrate (catalog number 500-0006, Bio-Rad Laboratories, California, USA) และ ใช้ bovine serum albumin (catalog number 500-0007, Bio-Rad Laboratories, California, USA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน

1. ทำการคืนสภาพโปรตีนมาตรฐาน (bovine serum albumin) โดยเติมน้ำปราศจากไอออน (deionized water) จำนวน 20 มิลลิลิตรลงไปในโปรตีนมาตรฐาน จนละลายเข้ากันได้สารละลายที่มีปริมาณโปรตีนมาตรฐานเท่ากับ 1.37 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
2. ทำการเจือจางเป็นลำดับเท่า (double-serial dilution) ด้วยน้ำปราศจากไอออนจำนวนหกครั้ง และทำศูนย์มาตรฐาน (blank) ดังนั้นจะได้โปรตีนมาตรฐานจำนวนแปดความเข้มข้นตั้งแต่ 1.37 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจนถึง 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
3. ผสม Dye reagent 1 ส่วน กับน้ำปราศจากไอออน 4 ส่วน
4. เตรียมตัวอย่างสิ่งรั่วข้นโดยการเจือจางลงสี่เท่าด้วย Eluting buffer
5. เติมตัวอย่างสิ่งรั่วข้นที่ทำการเจือจางแล้ว และโปรตีนมาตรฐานทั้งแปดความเข้มข้น ปริมาตร 10 ไมโครลิตรลงไปใน 96 well-plate ทำซ้ำสามครั้ง
6. ใส่ Dye reagent ที่ทำการเจือจางแล้วลงใน 96 well-plate ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที
7. วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร ภายในเวลา 1 ชั่วโมง
8. ทำกราฟมาตรฐาน (Standard curve) จากค่าดูดกลืนแสงของโปรตีนมาตรฐานที่ได้ และคำนวณสูตรในการหาปริมาณโปรตีนรวมของตัวอย่างสิ่งรั่วข้นจากค่าเฉลี่ยของค่าดูดกลืนแสงของแต่ละตัวอย่าง

2. การเพาะเชื้อของตัวอย่างสิ่งรั่วข้นในคลองรากฟัน

จากตัวอย่างสิ่งรั่วข้นในคลองรากฟันที่เก็บระหว่างการรักษาคลองรากฟัน จากการซับคลองรากฟันด้วยกระดาษซับปลอดเชื้อรูปกรวยแหลม นำตัวอย่างที่ได้ไปทำการเพาะเชื้อใน Thioglycollate medium เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

1. ผลการเพาะเชื้อเป็น**บวก**เมื่อ Thioglycollate medium มีลักษณะของการเจริญเติบโตของเชื้อภายใน 7 วัน

2. ผลการเพาะเชื้อเป็นลบเมื่อ Thioglycollate medium ไม่มีลักษณะของการเจริญเติบโตของเชื้อภายใน 7 วัน

3. การวิเคราะห์ปริมาณ MMP-2 และ MMP -8 ในตัวอย่างสิ่งรั่วซึมในคลองรากฟันโดยวิธี ELISA

นำตัวอย่างสิ่งรั่วซึมในคลองรากฟันที่เก็บระหว่างการรักษาคลองรากฟัน มาวิเคราะห์หาปริมาณ MMP-2 และ MMP-8 โดยการทำ ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) โดยใช้ชุดสำเร็จรูป Quantikine® Human MMP-2 (catalog number DMP2F0, R&D systems, Minneapolis, USA) และ Human Total MMP-8 (catalog number DMP800, R&D systems, Minneapolis, USA)

3.1 การวิเคราะห์ปริมาณ MMP-2 ในตัวอย่างสิ่งรั่วซึมในคลองรากฟัน

1. คืนสภาพ MMP-2 มาตรฐาน (MMP-2 standard) โดยเติมน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตรลงในโปรตีนมาตรฐาน จนละลายเข้ากันได้สารละลายที่มีปริมาณ MMP-2 มาตรฐานเท่ากับ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร
2. เจือจาง MMP-2 มาตรฐานเป็นลำดับเท่า (double-serial dilution) ด้วย Calibrator Diluent RD5-32 และทำศูนย์มาตรฐานด้วย Calibrator Diluents RD5-32 ดังนั้นจะได้ MMP-2 มาตรฐานจำนวนแปดความเข้มข้นตั้งแต่ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรจนถึง 0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร
3. เตรียมตัวอย่างสิ่งรั่วซึมโดยการเจือจางลงสิบเท่าด้วย Calibrator Diluent RD5-32
4. เติม Assay Diluent RD1-74 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงใน microplate ที่มากับชุดสำเร็จรูป
5. เติมตัวอย่างสิ่งรั่วซึมที่ทำการเจือจางแล้ว และ MMP-2 มาตรฐานทั้งแปดความเข้มข้นปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงใน microplate
6. วางบน horizontal orbital shaker ปรับไว้ที่ความเร็วประมาณ 500 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง
7. หลังจากนั้นดูดน้ำในหลุมทั้งหมดออก แล้วล้างด้วย Wash Buffer สี่ครั้งแล้วตาก microplate ไว้ให้แห้งสนิท
8. เติม MMP-2 conjugate ปริมาตร 200 ไมโครลิตรลงใน microplate
9. ทำซ้ำในข้อ 7
10. เติม Substrate Solution ปริมาตร 200 ไมโครลิตรลงใน microplate ทิ้งไว้บนพื้นนิ่งและปิดไม่ให้โดนแสงที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

11. เติม Stop Solution ปริมาณ 50 ไมโครลิตรลงใน microplate ผสมให้สีเข้ากัน
12. วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตรภายในเวลา 30 นาที โดยตั้งค่า corrective wavelength มีค่าเท่ากับ 540 นาโนเมตร
13. ทำกราฟมาตรฐานจากค่าดูดกลืนแสงของ MMP-2 มาตรฐานที่ได้ และคำนวณสูตรในการหาปริมาณ MMP-2 ของตัวอย่างสิ่งรั่วขันจากค่าเฉลี่ยของค่าดูดกลืนแสงของแต่ละตัวอย่าง

3.2 การวิเคราะห์ปริมาณ MMP-8 ในตัวอย่างสิ่งรั่วข้นในคลองรากฟัน

1. คืนสภาพ MMP-8 มาตรฐาน (MMP-8 standard) โดยเติมน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตรลงไปในโปรตีนมาตรฐาน จนละลายเข้ากันได้สารละลายที่มีปริมาณ MMP-8 มาตรฐานเท่ากับ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร
2. เจือจาง MMP-8 มาตรฐานเป็นลำดับเท่า (double-serial dilution) ด้วย Calibrator Diluent RD5-10 และทำศูนย์มาตรฐานด้วย Calibrator Diluents RD5-10 ดังนั้นจะได้ MMP-8 มาตรฐานจำนวนแปดความเข้มข้นตั้งแต่ 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรจนถึง 0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร
3. เตรียมตัวอย่างสิ่งรั่วข้นโดยการเจือจางลงยี่สิบเท่าด้วย Calibrator Diluent RD5-10
4. เติม Assay Diluent RD1-52 ปริมาตร 150 ไมโครลิตรลงใน microplate ที่มากับชุดสำเร็จรูป
5. เติมตัวอย่างสิ่งรั่วข้นที่ทำการเจือจางแล้ว และ MMP-8 มาตรฐานทั้งแปดความเข้มข้นจำนวน 50 ไมโครลิตรลงไปใน microplate
6. วาง microplate บน horizontal orbital shaker ปรับไว้ที่ความเร็วประมาณ 500 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง
7. ดูดน้ำในหลุมทั้งหมดออก ล้างด้วย Wash Buffer สี่ครั้ง เปิดฝาและวาง microplate ไว้ที่อุณหภูมิห้องจนแห้งสนิท
8. เติม MMP-8 conjugated ปริมาตร 200 ไมโครลิตรลงใน microplate
9. ทำซ้ำในข้อ 7
10. เติม Substrate Solution ปริมาตร 200 ไมโครลิตรลงใน microplate ทิ้งไว้บนพื้นนิ่ง และปิดไม่ให้โดนแสงที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที
11. เติม Stop Solution ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงใน microplate ผสมให้สีเข้ากัน
12. วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตรภายในเวลา 30 นาที โดยตั้งค่า corrective wavelength มีค่าเท่ากับ 540 นาโนเมตร

13. ทำกราฟมาตรฐานจากค่าดูดกลืนแสงของ MMP-8 มาตรฐานที่ได้ และคำนวณสูตรในการหาปริมาณ MMP-8 ของตัวอย่างสิ่งรั่วข้นจากค่าเฉลี่ยของค่าดูดกลืนแสงของแต่ละตัวอย่าง

4. การวิเคราะห์สัดส่วนของปริมาณ proMMP-2 กับ activeMMP-2 ในตัวอย่างสิ่งรั่วข้นในคลองรากฟัน โดยวิธี gelatin zymography

การวิเคราะห์สัดส่วนของปริมาณ proMMP-2 กับ active MMP-2ในตัวอย่างสิ่งรั่วข้นในคลองรากฟันที่เก็บระหว่างการรักษาคลองรากฟันโดยวิธี gelatin zymography

1. เตรียมตัวอย่างสิ่งรั่วข้นในคลองรากฟันโดยให้มีปริมาณโปรตีนรวมในทุกตัวอย่างเท่ากับ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร โดยเจือจางลงด้วย Eluting buffer
2. ผสมตัวอย่างสิ่งรั่วข้นในคลองรากฟัน และ MMP-2 มาตรฐาน เข้ากับ Laemmli buffer (sample buffer) ด้วยสัดส่วน 1:1
3. ใส่ตัวอย่างสิ่งรั่วข้นในคลองรากฟัน และ MMP-2 มาตรฐาน ที่เตรียมเรียบร้อยแล้วลงไปใน polyacrylamide gel ที่มีความเข้มข้นของ acrylamide ร้อยละ 10 และมีส่วนผสมของ เจลาตินในปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
4. นำ polyacrylamide gel ไปแยกโปรตีนด้วยไฟฟ้า (electrophoresis) ที่กระแสไฟฟ้า 100 volts เป็นเวลา 90 นาที
5. ครบ 90 นาทีให้นำ polyacrylamide gel แช่ใน renaturing buffer (Triton X-100 ความเข้มข้นร้อยละ 2.5) สามรอบ รอบละ 30 นาที
6. นำ polyacrylamide gel ไปบ่มด้วยสารละลาย developing buffer (0.15 M NaCl, 10mM $CaCl_2$, 50 mM Tris-HCl pH7.5, 0.1% Brij- 35) เป็นเวลา 1 คืนที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
7. ย้อม polyacrylamide gel ด้วย Coomassie Brilliant Blue R 250 (Sigma®) ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ในสารละลายเมทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 40 และ กรดอะซีติกร้อยละ 10
8. ล้าง polyacrylamide gel ที่ย้อมสีแล้วด้วยสารละลายเมทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 5 และกรดอะซีติกร้อยละ 7.5 บริเวณที่มีเอนไซม์ MMP-2 จะปรากฏเป็นแถบใสบน gel สีน้ำเงิน
9. วิเคราะห์ผลที่ได้จากการทำ gelatin zymography ด้วยโปรแกรม Scion Image software (National Institutes of Health, Rockville, MD, USA) เพื่อคำนวณสัดส่วนระหว่าง ปริมาณ proMMP-2 และ active MMP-2

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การวิเคราะห์ปริมาณ MMP-2 และ MMP -8 ในตัวอย่างสิ่งรั่วข้นในคลองรากฟันโดยวิธี ELISA สามารถวิเคราะห์ได้โดยนำตัวเลขที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยกราฟเส้น และประเมินผลทางสถิติเพื่อหาความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างทั้งหมดด้วย Kruskal–Wallis one-way analysis of variance และหาความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างสองกลุ่มด้วย Mann-Whitney U-test ว่าผลของการเพาะเชื้อ และผลของการเก็บตัวอย่างในแต่ละครั้งทำให้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่อย่างไร

การวิเคราะห์สัดส่วนของ proMMP-2 กับ active MMP-2 ในตัวอย่างสิ่งรั่วข้นในคลองรากฟันโดยวิธี gelatin zymography สามารถวิเคราะห์ได้โดยการวัดความเข้มของแถบใสบน polyacrylamide gel ด้วยโปรแกรม Scion Image software (National Institutes of Health, Rockville, MD, USA) และหาความแตกต่างของสัดส่วนของ proMMP-2 กับ active MMP-2 ในการเก็บตัวอย่างแต่ละครั้งว่าแตกต่างกันหรือไม่ด้วยสถิติ Wilcoxon Signed Ranks Test

ผลที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถทราบการเปลี่ยนแปลงระดับของ MMP-2 และ MMP-8 ใน สิ่งรั่วข้นในคลองรากฟันว่าสัมพันธ์กับสภาวะของการวินิจฉัยโรคทางเอ็นโดดอนติกส์ และสัมพันธ์กับความคืบหน้าในการรักษาคลองรากฟัน