Thesis Title	Cell Proliferation and Differentiation of Isolated Human Dental Pulp and Apical Papilla Cells After Cultured in a Three-Antibiotic Mixture Containing Media
Author	Mr. Panupat Phumpatrakom
Degree	Master of Science (Dentistry)
Thesis Advisory Committee	Lect. Dr. Tanida Srisuwan Advisor Lect. Dr. Saengusa Khemaleelakul Co-advisor

Abstract

Introduction: A Three-antibiotic combination (3Mix) has been widely used in regenerative endodontics. Recent studies recommend that the safety concentration of 3Mix is in a range of 0.39 µg/mL-1 mg/mL for pulp tissue regeneration. However, the direct effect of 3Mix on human dental pulp cells and apical papilla cells has not been investigated. Therefore, the aim of this study was to determine the regenerative capacity of isolated human dental pulp cells and apical papilla cells (DPCs/APCs) after 7-day treatment with selected dose of 3Mix.

Methods: Primary isolated human DPCs/APCs from the 3rd passage were divided into control and experimental groups. In the control group, cells were cultured in regular complete media. In the experimental group, cells were cultured in complete media containing 0.39 µg/mL of 3Mix for seven days. After the treatment period, the media were changed and the cells were further tested for proliferation and

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

differentiation potential. For cell proliferation, the colorimetric quantification of 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-y1]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) was used at days 1, 3, 5 and 7. For differentiation analysis, a dentinogenic differentiation medium was added into treated cells and then cultured for 7, 14 and 21 days. Results were analyzed using cell morphology, quantitative Alizarin-red S staining, and real time RT-PCR.

Results: We found that the proliferative capacity of 0.39 µg/ml 3Mix-treated DPCs and APCs was significantly lower than that of untreated cells at all time points ($P<0.05$). Mineralized nodule formation was found in both 3Mix-treated and control groups, but it was significantly less in the 3Mix-treated groups, compared with the control groups at 7, 14 and 21 days ($P<0.01$). Quantitative RT-PCR showed no statistically significant difference (95% CI) in BSP, ALP, and DMP-1 gene expression in either 3Mix-treated DPCs or APCs compared to control groups.

Conclusions: Although low dose (0.39 µg/ml) of 3Mix does not have any effect on DPCs and APCs, it reduced those cellular proliferation and mineralization potential. In addition, it has no effect on dentinogenic gene expressions. These findings suggested that 3Mix, even at a very low concentration, there were negative effects on the proliferative capacity and mineralized matrix formation of DPCs and APCs *in vitro*.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การเพิ่มจำนวนและการเปลี่ยนสภาพของเซลล์เนื้อเยื่อในและเซลล์เนื้อเยื่อรอบปลายรากฟันมนุษย์ที่แยกเดี่ยวภายหลังการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มียาปฏิชีวนะผสมสามชนิด
ผู้เขียน	นายภาณุภัทร ภูมิภัทราคม
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ทันตแพทยศาสตร์)
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	อ.ทพญ.ดร. ธนิดา ศรีสุวรรณ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก อ.ทพญ.ดร. แสงอุษา เขมาลีลากุล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

บทนำ ยาปฏิชีวนะผสมสามชนิด (ทรีมิกซ์) เป็นยาที่ใช้อย่างแพร่หลายในงานวิทยาเอ็นโดดอนต์ จากการศึกษาในปัจจุบันแนะนำว่าการใช้ทรีมิกซ์ในความเข้มข้นที่ปลอดภัยสำหรับงานการเจริญทดแทนของเนื้อเยื่อนั้นจะอยู่ในช่วง 0.39 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ถึง 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตาม ผลกระทบโดยตรงของทรีมิกซ์ที่มีต่อเซลล์เนื้อเยื่อในและเซลล์เนื้อเยื่อรอบปลายรากฟันมนุษย์ยังไม่มีผู้ทำการศึกษาจวบจนปัจจุบัน ดังนั้นจุดประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อ ประเมินความสามารถในการเจริญทดแทนของเซลล์เนื้อในและเซลล์เนื้อเยื่อปุ่มปลายรากฟันมนุษย์ภายหลังจากการได้รับยาทรีมิกซ์เป็นระยะเวลา 7 วัน ณ ความเข้มข้นที่กำหนดไว้

วิธีการทดลอง ใช้เซลล์เนื้อเยื่อในและเซลล์เนื้อเยื่อปุ่มปลายรากฟันมนุษย์ที่แยกเดี่ยวและเพาะเลี้ยงแบบปฐมภูมิ ณ พาสเสจที่สาม แบ่งกลุ่มออกเป็นกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง สำหรับกลุ่มควบคุมเซลล์ทั้งสองชนิดจะถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์แบบปกติ ส่วนกลุ่มทดลอง เซลล์จะถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมทรีมิกซ์ให้มีความเข้มข้น 0.39 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 7 วัน หลังจากครบกำหนดเซลล์ทั้งสองชนิดจะถูกเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์แบบปกติและนำไปศึกษาต่อในเรื่องการเพิ่มจำนวนและการเปลี่ยนสภาพของเซลล์ ในส่วนของการศึกษาเรื่องการเพิ่มจำนวนเซลล์จะใช้การวิเคราะห์โดยวิธีเอ็มทีทีของกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ 1, 3, 5 และ 7 วัน สำหรับการศึกษาเรื่องการเปลี่ยนสภาพเซลล์จะทำการเลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิดทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองต่อในอาหารเปลี่ยนสภาพเซลล์เป็นเวลา 7, 14 และ 21 วัน จากนั้นทำการวิเคราะห์ผลการศึกษาส่วนนี้โดยใช้การวิเคราะห์รูปร่างเซลล์ การวัดเชิงปริมาณจากการย้อมอลิเซอรินเรดเอสและการแสดงออกระดับยีนส์ด้วยรีลทาม อาร์ที-พีซีอาร์ เชิงปริมาณ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผลการศึกษา หลังจากเซลล์ทั้งสองชนิดได้รับทรีมิกซ์เป็นเวลา 7 วัน พบว่าเซลล์ทั้งสองชนิดในกลุ่มทดลองที่มีทรีมิกซ์ 0.39 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีความสามารถในการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในอัตราการเพิ่มที่น้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกจุดเวลาที่ทดสอบ (P<0.05) การผลิตปุ่มย่อยแร่ธาตุพอกพูนพบได้ในทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองของเซลล์ทั้งสองชนิดแต่ในกลุ่มทดลองจะพบได้น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.01) ในวันที่ 7, 14 และ 21 วัน จากการศึกษาในระดับยีนส์ด้วยการทำรีลทาม อาร์ที-พีซีอาร์เชิงปริมาณต่อการแสดงออกของยีนส์บีเอสพี เอแอลพี และดีเอ็มพีหนึ่ง พบว่าการแสดงออกของยีนส์ทั้งสามชนิดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (95% CI) ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองของเซลล์ทั้งสองชนิด

สรุปผลการศึกษา แม้ว่ายาทรีมิกซ์ที่ความเข้มข้นต่ำ (0.39 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จะไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์แต่ยาทรีมิกซ์มีผลให้ความสามารถในการเพิ่มจำนวนของเซลล์และการเปลี่ยนสภาพเซลล์เพื่อพอกพูนแร่ธาตุลดลง นอกจากนี้ยาทรีมิกซ์ไม่ส่งผลกระทบต่อการแสดงออกระดับยีนส์ในการสร้างเนื้อฟัน การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าแม้ว่ายาทรีมิกซ์ที่ความเข้มข้นต่ำมากยังคงส่งผลกระทบในแง่ลบต่อความสามารถในการเพิ่มจำนวนและการพอกพูนแร่ธาตุของเซลล์เนื้อเยื่อในและเซลล์เนื้อเยื่อปุ่มปลายรากฟันในสภาพแวดล้อมเทียม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved