หัวข้อวิทยานิพนธ์	ความสามารถในการยึดติดของเซลล์เนื้อเยื่อรอบปลายราก ฟันมนุษย์ส่วนผิวเนื้อฟันส่วนรากที่รักษาด้วยทรีมิกซ์หรือ แคลเซียมไฮดรอกไซด์
ผู้เขียน	นางสาว ปัทมา กิติกุศล
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ทันตแพทยศาสตร์)
คณะกรรมการที่ปรึกษา	ผศ.ทพญ.ดร. ธนิดา ศรีสุวรรณ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก รศ.ทพญ.ดร. ศิริพร ฉัตรทิพากร อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อ.ทพญ.ดร. แสงอุษา เขมาลีลากุล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

บทนำ ในกระบวนการเจริญทดแทนของเนื้อเยื่อนั้นได้มีการนำยาหลายชนิดมากำจัดเชื้อในคลองรากฟันรวมทั้งยาปฏิชีวนะผสมสามชนิด (ทรีมิกซ์) และแคลเซียมไฮดรอกไซด์ โดยมีการศึกษาที่รายงานถึงความเป็นพิษต่อเซลล์ของทรีมิกซ์ จึงได้มีการแนะนำให้ใช้ทรีมิกซ์ที่ความเข้มข้นต่ำเพื่อลดผลกระทบต่อเซลล์ ในทางตรงกันข้ามก็ได้มีการศึกษาที่พบว่าแคลเซียมไฮดรอกไซด์มีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ อีกทั้งยังกระตุ้นความมีชีวิตของเซลล์อีกด้วย จุดประสงค์หลักของกระบวนการเจริญทดแทนของเนื้อเยื่อนั้นคือมีการสร้างเนื้อเยื่อทดแทนและมีการสร้างรากฟันต่อไป ซึ่งมีการสันนิษฐานว่าเซลล์ในเนื้อเยื่อปุ่มปลายรากฟันอาจจะมีหน้าที่สำคัญในกระบวนการดังกล่าว ดังนั้นสิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึงคือการทำให้เซลล์เนื้อเยื่อปุ่มปลายรากฟันสามารถอยู่รอดและยึดติดบนผิวเนื้อฟันได้ อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาถึงผลกระทบของขั้นตอนต่างๆในกระบวนการเจริญทดแทนของเนื้อเยื่อโดยเฉพาะอย่างยิ่งในขั้นตอนการใส่ยาในคลองรากฟันที่มีต่อการยึดติดของเซลล์เนื้อเยื่อปุ่มปลายรากบนผิวเนื้อฟันส่วนราก การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความสามารถในการยึดติดของเซลล์เนื้อเยื่อปุ่มปลายรากฟันมนุษย์และรูปร่างของเซลล์ บนผิวเนื้อฟันส่วนรากที่ได้รับการรักษาด้วยยาทรีมิกซ์หรือแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวัดการแสดงออกของไฟโบรเนกทินบนเซลล์ด้วยกล้องอิมมูโนฟลูออเรสเซนส์ วัดความมีชีวิตของเซลล์ด้วยสารอลามาร์บลู และศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์ที่เกาะบนผิวฟันด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการทดลอง ตัดแผ่นเนื้อฟันส่วนรากให้เป็นแผ่นพอดีกับขนาดของถาดหลุมเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุมแบ่งแผ่นเนื้อฟันออกเป็น 6 กลุ่มตามชนิดของยาได้แก่ 1. สารละลายพีบีเอส (กลุ่มควบคุม) 2. ทรีมิกซ์ความเข้มข้น 0.39 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 3. ทรีมิกซ์ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 4. ทรีมิกซ์ชนิดสารป้าย 5. แคลเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 6. แคลเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แช่แผ่นฟันไว้ในยาเป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบตามกำหนดเวลาแล้วจึงล้างแผ่นฟันด้วยน้ำยาอีดีทีเอความเข้มข้นร้อยละ 17 จากนั้นจึงหว่านเซลล์เนื้อเยื่อปุ่มปลายรากฟันมนุษย์ลงบนแผ่นฟัน ทดสอบความสามารถในการยึดติดของเซลล์บนแผ่นฟันด้วยการนำแผ่นฟันไปตรึงแล้วย้อมด้วยแอนติบอดีของไฟโบรเนกทินและนำไปส่องภายใต้กล้องอิมมูโนฟลูออเรสเซนส์ ทำการนับและหาค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของไฟโบรเนกทินต่อพื้นที่ภาพ สำหรับการศึกษาความมีชีวิตของเซลล์ ทำการเติมสารอลามาร์บลู ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์แต่ละหลุมแล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่เวลา 0, 1, 2, 4, 6, 24, 48, และ 72 ชั่วโมง และทำการศึกษาศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์ที่เกาะบนผิวฟันด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด

ผลการศึกษา แผ่นฟันที่ได้รับการรักษาด้วยยาทรีมิกซ์ชนิดสารป้ายมีจำนวนเซลล์ที่มีแสดงออกของไฟโบรเนกทินต่ำที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แผ่นฟันที่ได้รับการรักษาด้วยยาทรีมิกซ์ที่ความเข้มข้น 0.39 และ100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่ส่งผลต่อการยึดติดของเซลล์เนื้อเยื่อปุ่มปลายรากฟันบนผิวฟัน ในขณะที่แผ่นฟันที่ได้รับการรักษาด้วยยาทรีมิกซ์ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีการอยู่รอดของเซลล์ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมทุกช่วงเวลาอย่างมีนัยสำคัญ แผ่นฟันที่ได้รับการรักษาด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ทั้งสองความเข้มข้นมีผลกระตุ้นการยึดติดของเซลล์เนื้อเยื่อปุ่มปลายรากฟันบนผิวฟันเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มยาทรีมิกซ์ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์เนื้อเยื่อปุ่มปลายรากฟันที่เกาะบนแผ่นฟันที่ได้รับการรักษาด้วยแคลเซียมนั้นมีการแสดงของส่วนยื่นไซโทพลาซึม

สรุปผลการศึกษา เนื้อฟันส่วนรากของมนุษย์ที่ได้รับการรักษาด้วยยาทรีมิกซ์ชนิดสารป้ายมีการยึดติดของเซลล์เนื้อเยื่อปุ่มปลายรากฟันที่ต่ำที่สุด ยาทรีมิกซ์ที่ความเข้มข้น 0.39 และ100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่ส่งผลกระทบต่อการยึดติดของเซลล์เนื้อเยื่อปุ่มปลายรากฟันมนุษย์บนผิวเนื้อฟัน แผ่นฟันที่ได้รับการรักษาด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์มีจำนวนเซลล์ที่ยึดติดสูงกว่ากลุ่มอื่น การรักษาผิวเนื้อฟันด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์มีแนวโน้มที่จะกระตุ้นการอยู่รอดและการยึดติดของเซลล์เนื้อเยื่อปุ่มปลายรากฟันมนุษย์บนผิวเนื้อฟัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title	Attachment Ability of Human Apical Papilla Cells to Root Dentin Surfaces Treated Either with 3Mix or Calcium Hydroxide
Author	Miss Pattama Kitikuson
Degree	Master of Science (Dentistry)
Advisory Committee	Asst. Prof. Dr. Tanida Srisuwan Advisor Assoc. Prof. Dr. Siriporn Chattipakorn Co-advisor Lect. Dr. Saengusa Khemaleelakul Co-advisor

ABSTRACT

Introduction: Various medicaments have been used in regenerative endodontics, including 3Mix and calcium hydroxide ($Ca(OH)_2$). Previous studies reported the cytotoxicity of 3Mix, so the low concentrations have been recommended. Besides, $Ca(OH)_2$ has become of interest since it had low toxicity and enhances stem cell viability. Generally, tissue regeneration and root continuation are the ultimate goals in regenerative endodontics. Cells in the apical papilla have been hypothesized to play roles in those processes. Therefore, preservation of cell vitality and, also, promotion of initial cell attachment seem to be crucial steps. However, the effects of current regenerative procedures, and, especially, medicaments, on the attachment of apical papilla cells (APCs) to root dentin surfaces have not yet been examined. The purpose of this study was to investigate the attachment ability and morphology of viable human APCs, when grown on human root dentin surfaces treated either with 3Mix or $Ca(OH)_2$ at different concentrations, using fibronectin immunofluoresence, alamarBlue® assay, and scanning electron microscopy (SEM).

Methods: Human root dentin slices were divided into six groups, based on the different medications used*: 1) control group (PBS, no medication), 2) 3Mix 0.39 µg/mL, 3) 3Mix 100 µg/mL, 4) 3Mix paste, 5) $Ca(OH)_2$ 1 mg/mL, and 6) $Ca(OH)_2$ 1,000 mg/mL.* All samples were separately treated with the designated medications for seven days, and final

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

rinsed with 17% EDTA. Then, primary human APCs were seeded on the treated dentin slices. To evaluate the attachment ability of APCs on treated dentin, the dentin slices were fixed and stained with fibronectin immunofluorescence. The numbers of fibronectin-positive cells per microscopic field were counted. Meanwhile, a vitality assay using alamarBlue® was monitored on the dentin slices at specific time intervals: 0, 1, 2, 4, 6, 24, 48, and 72 hours. Finally, the morphology of the cells on the treated surfaces was observed under scanning electron microscopy.

Results: The lowest number of fibronectin-positive cells was observed on root dentin surfaces treated with 3Mix paste ($p<0.05$). 3Mix at 0.39 and 100 µg/mL did not affect the amount of APC attachment, whereas the viability of APCs on the dentin surface was significantly lower in the 100 µg/mL 3Mix-treated group than in the negative control group at all given time points ($p<0.05$). Both concentrations of $Ca(OH)_2$ (1 mg/mL and 1,000 mg/mL) induced greater APC attachment than did the 100 µg/mL 3Mix-treated samples ($p<0.05$). Moreover, only cells grown on the surfaces treated with $Ca(OH)_2$ exhibited cytoplasmic processes.

Conclusions: Human root dentin treated with 3Mix paste had significantly lower APC attachment than other concentrations and other medicaments. 3Mix at 0.39 µg/mL and 100 µg/mL had no significant negative effect on APC attachment on dentin. Higher numbers of cells were observed attaching on dentin in calcium hydroxide-treated groups. Dentin pre-treated with $Ca(OH)_2$ tended to promote APC viability and attachment.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved