

การศึกษาเปรียบเทียบการตอบสนองของเซลล์เอ็นยิดปริทันต์ต่อวัสดุซ่อมรอยทะลุรากฟัน 3 ชนิด: การศึกษาในห้องปฏิบัติการ

ชนิษฐา พงษ์แก้ว¹ ณัฏฐ์ณิศา ว่องวัฒนาสานต์^{2*} ละอองทอง วัชรภักย์² ฤดี สุรฤกษ์³
สุวรรณา ก่อสุวรรณวงศ์⁴ ราชพร สีจันทร์⁴

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: ประเมินสมบัติทางชีวภาพของวัสดุซ่อมรอยทะลุรากฟันที่มีขายในประเทศไทย คือ ไวท์โปรรูทเอ็มทีเอ (ไวท์เอ็มทีเอ) ไอรูทบีพีฟัลส (ไอรูทบีพี) และ นิซิกะคาแนลซีลเลอร์บีจีมีลติ (นิซิกะ)

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ: วัสดุทั้ง 3 ชนิดได้รับการเจือจางเป็น 4 ความเข้มข้น คือ ร้อยละ 20, 2, 0.2 และ 0.02 จากนั้น นำไปสัมผัสกับเซลล์เอ็นยิดปริทันต์ของมนุษย์ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ประเมินผลในห้องปฏิบัติการโดยใช้วิธีเอ็มทีที เอสเซ (MTT assay; 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay, Sigma, St Louis, MO)

ผลการศึกษา: ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ทดสอบภายหลังสัมผัสวัสดุทดสอบมีค่า 67.44 ± 13.44 ถึง 107.72 ± 18.52 สำหรับไวท์เอ็มทีเอ 76.00 ± 12.70 ถึง 110.05 ± 16.72 สำหรับไอรูทบีพี และ 104.42 ± 11.65 ถึง 117.97 ± 13.74 สำหรับนิซิกะ ซึ่งนิซิกะมีความเป็นพิษน้อยกว่ากลุ่มควบคุมบวกในทุกระดับความเข้มข้น ($p < 0.05$) แต่เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ นิซิกะเป็นวัสดุชนิดเดียวที่มีพิษต่อเซลล์น้อยกว่าในทั้ง 4 ความเข้มข้น ($p < 0.05$) นอกจากนี้ ในทุกระดับความเข้มข้นของไวท์เอ็มทีเอมีความเป็นพิษมากกว่านิซิกะ ($p < 0.05$) ขณะที่ไอรูทบีพีในระดับความเข้มข้นร้อยละ 20 พบว่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์เหลือน้อยกว่านิซิกะ ($p < 0.05$)

สรุป: นิซิกะมีแนวโน้มทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์เอ็นยิดปริทันต์ต่ำที่สุด ซึ่งบ่งชี้ว่าอาจเป็นวัสดุที่มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับไวท์เอ็มทีเอ และไอรูทบีพี

คำสำคัญ: การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ มิเนอรัลไตรออกไซด์แอกกรีเกต รอยทะลุรากฟัน วัสดุซ่อมรอยทะลุรากฟัน เซลล์เอ็นยิดปริทันต์ แคลเซียมซิติเลตซีเมนต์ ไบโอแอคทีฟกลาส

วันที่รับ: 12 มีนาคม 2568

วันที่แก้ไข: 8 กรกฎาคม 2568

วันที่ตอบรับ: 22 กรกฎาคม 2568

¹หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาทันตแพทยศาสตร์ (กลุ่มวิชาวิทยาเอ็นโดดอนต์) วิทยาลัยทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ปทุมธานี 12000

²สาขาวิชาวิทยาเอ็นโดดอนต์ วิทยาลัยทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ปทุมธานี 12000

³คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม กรุงเทพมหานคร 10160

⁴สำนักงานการวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร 10400

(*ผู้ติดต่อบทความ)

Comparative Study of Human Periodontal Ligament Fibroblasts Response to Three Different Perforation Repair Materials: An *In Vitro* Study

Kanitha Pajonklaew¹ Ninnita Wongwatanasanti^{2*} La-onghong Vajrabhaya² Rudee Surarit³
Suwanna Korsuwannawong⁴ Ratchaporn Srichan⁴

Abstract

Objective: To evaluate the cytocompatibility of three perforation repair materials available in Thailand: ProRoot® MTA, iRoot® BP+, and Nishika Canal Sealer BG Multi (CS-BG).

Materials and Methods: The three materials were diluted into four concentrations: 20%, 2%, 0.2%, and 0.02%. The materials were then exposed to human periodontal ligament fibroblasts in a 96-well cell culture plate for 24 hours. The evaluation was conducted in vitro using the MTT assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay, Sigma, St. Louis, MO).

Results: The percentage of cell viability after exposure ranged from 67.44 ± 13.44 to 107.72 ± 18.52 for ProRoot® MTA, 76.00 ± 12.70 to 110.05 ± 16.72 for iRoot® BP+, and 104.42 ± 11.65 to 117.97 ± 13.74 for CS-BG. All materials exhibited lower toxicity than the positive control group at all concentration levels ($p < 0.05$). However, when compared to the negative control group, CS-BG was the only material that demonstrated significantly lower cytotoxicity at all four concentrations ($p < 0.05$). Additionally, at all tested concentrations, ProRoot® MTA showed significantly higher toxicity than CS-BG ($p < 0.05$). For iRoot® BP+, the 20% concentration resulted in lower cell viability compared to CS-BG ($p < 0.05$).

Conclusions: The CS-BG exhibited the lowest cytotoxicity among the tested materials, suggesting that it may be the most biocompatible compared to ProRoot® MTA and iRoot® BP+.

Keywords: Bioactive glass, Calcium silicate cement, Cytotoxicity test, Human periodontal ligament fibroblasts, Mineral trioxide aggregate, Repair materials, Root canal perforation.

Received Date: Mar 12, 2025

Revised Date: Jul 8, 2025

Accepted Date: Jul 22, 2025

¹Master of science program in dentistry (Endodontics), College of Dental Medicine, Rangsit University, Pathumthani 12000, Thailand.

²College of Dental Medicine, Rangsit University, Pathumthani 12000, Thailand.

³Faculty of Dentistry, Siam University, Bangkok 10160, Thailand.

⁴Research Office, Faculty of Dentistry, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand.

(*Corresponding author)

บทนำ (Introduction)

การเกิดรอยทะลุรากฟัน (root perforation) เป็นปัญหาที่สามารถเกิดขึ้นได้จากการทำหัตถการ ส่งผลให้เกิดช่องทางติดต่อระหว่างระบบคลองรากฟัน (root canal system) และพื้นผิวภายนอกกรากฟัน (external tooth surface) ซึ่งเป็นสาเหตุให้การรักษาคคลองรากฟันล้มเหลว และอาจทำให้เกิดการถอนฟันในอนาคต (1) โดยตำแหน่งที่เกิดรอยโรคมีกการพยากรณ์ที่แตกต่างกัน หากเกิดที่บริเวณง่ามรากฟัน (furcation perforation) การพยากรณ์ของโรคไม่ดี เนื่องจากเป็นตำแหน่งที่เกิดการปนเปื้อนของแบคทีเรียได้ง่าย ซึ่งจะนำไปสู่การทำลายเนื้อเยื่อปริทันต์ และสูญเสียกระดูกบริเวณนั้น (2) จึงควรรักษารอยทะลุบริเวณดังกล่าวโดยเร็วด้วยวัสดุที่มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการหายสมบัติของวัสดุที่ใช้ควรมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเนื้อเยื่อบริเวณที่เกิดรอยทะลุ (biocompatibility) มีความคงตัว (stability) ไม่ละลายง่าย แนบสนิท (sealing ability) และสามารถต้านทานการหลุด (dislodgement resistance) เพื่อให้วัสดุสามารถยึดติดกับผนังคลองรากฟันและคงอยู่ในตำแหน่งเดิมได้ (2)

ในปัจจุบันวัสดุที่ได้รับความนิยมและใช้เป็นมาตรฐาน คือ มินเอรัลไตรออกไซด์แอ็กกรีเกต (Mineral trioxide aggregate; MTA, Dentsply Tulsa, OK, USA) ซึ่งเป็นวัสดุในกลุ่มแคลเซียมซิลิเกตซีเมนต์ (Calcium silicate cement) เช่น โปรรูทเอ็มทีเอ (ProRoot® MTA, Dentsply Tulsa, OK, USA) โดยมี 2 สี คือ สีเทา เกรย์โปรรูทเอ็มทีเอ (Grey ProRoot® MTA) และสีขาว ไวท์โปรรูทเอ็มทีเอ (White ProRoot® MTA) ซึ่งมีสมบัติที่เหมาะสมในการใช้งานหลายประการ เนื่องจากเมื่อก่อตัวจะเกิดปฏิกิริยาไฮเดรชัน (hydration) ของสารประกอบแอนไฮดรอสไมเนอรอลออกไซด์ (Anhydrous mineral oxide compound) ก่อให้เกิดแคลเซียมซิลิเกตไฮเดรต (Calcium silicate hydrate) และแคลเซียมไฮดรอกไซด์เฟส (Calcium hydroxide phases) ป้องกันการขยายตัว มีความแนบสนิทที่ดี (3) ป้องกันการรั่วซึม มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (4) ไม่กระตุ้นให้เกิดการอักเสบ นอกจากนี้ยังพบว่าการรักษาประสบความสำเร็จค่อนข้างสูง เอ็มทีเอจึงเป็นวัสดุที่เหมาะสม และเป็น

วัสดุมาตรฐานในการเปรียบเทียบกับวัสดุที่ผลิตขึ้นมาใหม่สำหรับการซ่อมรอยทะลุรากฟัน (5) แต่มีข้อด้อยคือ ระยะเวลาในการแข็งตัวของวัสดุค่อนข้างนาน (final setting time) ประมาณ 3 ชั่วโมง (6) ใช้งานค่อนข้างยาก และมีบิสมาทออกไซด์ (Bismuth oxide) เป็นส่วนประกอบทำให้เกิดการเปลี่ยนสีของฟัน (7) ปัจจุบันจึงมีการพัฒนาวัสดุในกลุ่มแคลเซียมซิลิเกตซีเมนต์เพื่อปรับปรุงข้อบกพร่องดังกล่าว แต่ยังคงสมบัติที่ดีของเอ็มทีเอไว้นั้นคือ ไอรูทบีพีพลัส (iRoot® BP+; Innovative Bioceramix, Vancouver, Canada) มีองค์ประกอบหลักคือ ฟอสเฟตแคลเซียมโมโนเบสิกและแคลเซียมซิลิเกต ซึ่งเมื่อสัมผัสกับความชื้นจะเกิดปฏิกิริยาทางเคมีและปล่อยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ช่วยส่งเสริมความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (8) อีกทั้งยังมีค่า pH มากกว่า 12 เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อแบคทีเรีย (9) นอกจากนี้ลักษณะเด่นของวัสดุที่ปรับปรุงจากเอ็มทีเอจะมีลักษณะเป็นวัสดุผสมสำเร็จรูปเนื้อพุดดี (putty consistency) สีขาวที่พร้อมใช้งานได้ทันที (10) โดยไม่เกิดการหดตัวไม่ละลายน้ำ ปราศจากอะลูมิเนียม และมีระยะเวลาในการแข็งตัวของวัสดุเพียง 2 ชั่วโมง ซึ่งเร็วกว่าค่าเฉลี่ยของเอ็มทีเอถึง 2 เท่า (9)

ในปี ค.ศ. 2017 ได้มีการพัฒนาไบโอเซรามิกชนิดใหม่ คือ ไบโอแอคทีฟกลาส (Bioactive glass) ซึ่งพบในวัสดุชนิดซีเมนต์แคลซิลเลอรั่บีจีมัลติ (Nishika canal sealer BG® multi; Nippon Shika Yakuhin, Yamaguchi, Japan) มีความแตกต่างจากวัสดุที่กล่าวมาข้างต้น คือ ใช้ระยะเวลาในการแข็งตัวของวัสดุเพียง 1 ชั่วโมง เมื่อเกิดปฏิกิริยาระหว่างไบโอแอคทีฟกลาสกับของเหลวในชั้นเนื้อฟัน จะเกิดการแลกเปลี่ยนไอออนของแคลเซียม (Ca^{2+}) ฟอสเฟต (PO_4^{3-}) โซเดียม (Na^+) และเกิดเป็นผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทต์ (Hydroxyapatite tag-like structure) เข้าไปในท่อเนื้อฟัน (Dentinal tubule) ทำให้มีการยึดติดกับผนังคลองรากฟันได้ดี (11) รวมทั้งได้ส่วนประกอบของสารที่เป็นเกลือของกรดไขมันแมกนีเซียม (Fatty acid magnesium salts) และแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งช่วยส่งเสริมความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (12) เนื่องจากวัสดุซ่อมรอยทะลุรากฟันต้องสัมผัสกับเนื้อเยื่อรอบรากฟันได้แก่เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน

(Connective tissues) หลอดเลือด (Blood vessel) เส้นประสาท (Nerve) กระดูก (Bone) และเอ็นยึดปริทันต์ (Periodontal ligament) โดยตรง หากไม่มีสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพ จะส่งผลให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อบริเวณข้างเคียง กระตุ้นให้เกิดการตอบสนองต่อกระบวนการอักเสบ ทำให้แผลหายช้า และมีผลต่ออัตราความสำเร็จของการซ่อมรอยทะลุรากฟัน (13) ดังนั้น ความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับวัสดุซ่อมรอยทะลุรากฟันจึงเป็นปัจจัยสำคัญที่ควรพิจารณา

จากการศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพของวัสดุชนิดนี้โดย Washio และคณะ (12) ในลักษณะของซีลเลอร์อุดคลองรากฟัน (root canal sealer) ที่ไม่มีส่วนผงผสม พบว่าวัสดุชนิดนี้มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพดีกว่าซีลเลอร์ออกไซด์ยูจีนอลซีลเลอร์ (Zinc oxide eugenol-based sealer) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Murata และคณะ (14) ที่พัฒนาวัสดุชนิดนี้เพื่อใช้เป็นวัสดุอุดย้อนปลายราก (retrograde filling materials) ด้วยการผสมส่วนผงในปริมาณต่างๆ กับส่วนของเหลวร่วมกับการเติมสารซิลิกอนไดออกไซด์ (SiO_2) แคลเซียม-เมตาฟอสเฟต ($\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$) และแคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3) เข้าไปพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของผงจะมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพสูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับไวท์เอ็มทีเอ และซูเปอร์อีบีเอ (SuperEBA; Bosworth, Chicago, IL, USA) แต่ในทางตรงกันข้ามกับการศึกษาของ Aka และคณะ (15) ที่ทำการทดลองในห้องปฏิบัติการกับเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ พบว่าวัสดุชนิดนี้มีความเป็นพิษต่อเซลล์ทดสอบมากกว่าเอ็มทีเอรีแพร์เฮลท์ (MTA Repair HP, Angelus, Londrina, Brazil) แต่น้อยกว่าเอ็มทีเอโฟลว์ไวท์ (MTA Flow White, Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, USA) นอกจากนี้ อัตราส่วนของส่วนผงกับของเหลวที่เข้มข้นขึ้นของชนิดนี้ทำให้ความเป็นพิษต่อเซลล์ทดสอบลดลง จากความหลากหลายของการศึกษาด้านสมบัติทางชีวภาพของวัสดุซ่อมรอยทะลุรากฟัน ร่วมกับการที่วัสดุชนิดนี้

เริ่มเข้ามามีบทบาทในประเทศไทย จึงเกิดการศึกษาในครั้งนี้ ซึ่งวัตถุประสงค์ของการศึกษาเพื่อประเมินความเป็นพิษของวัสดุซ่อมรอยทะลุรากฟันชนิดที่มีวางจำหน่ายในท้องตลาดประเทศไทย โดยเปรียบเทียบกับวัสดุซ่อมรอยทะลุรากฟันดั้งเดิมที่นิยมใช้ 2 ชนิด คือ ไวท์เอ็มทีเอ และโอโรทีบีพีในการทดสอบต่อเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ของมนุษย์ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ (Materials and Methods)

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์

เซลล์ที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้เป็นเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ (Human periodontal ligament fibroblasts: HPDLF, Sciencell Research Laboratories, USA, Cat. No. 2630, Lot number 5145, CA number 0001551) อาหารเลี้ยงเซลล์ คือ ดีเอ็มอีเอ็ม (DMEM; Dulbecco's Modified Eagle medium, Gibco® BRL, Grand Island Biological Co, Grand Island, NY) ที่มีซีรัมของลูกวัวร้อยละ 10 (FBS; 10% Fetal bovine serum) สารแอล กลูตามีน (L-glutamine) 4 mM/I ฟังจิโซน (fungizone) 2 µg/ml เพนนิซิลลิน (Penicillin) 200 µg/ml และสเตรปโตมัยซิน (Streptomycin) 200 µg/ml โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้บอดูอุณหภูมิ 37 °C ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 100 ซึ่งเป็นตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกวันวันวัน เมื่อเซลล์เจริญเติบโตจนครอบคลุมพื้นที่ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ (Flask) ประมาณร้อยละ 90 ก็ทำการย้ายไปเพาะเลี้ยงต่อในภาชนะอันใหม่ โดยใช้ทรินซิน ร้อยละ 0.2 (w/v) และเพาะเลี้ยงเซลล์จนได้ปริมาณที่เพียงพอในการศึกษาโดยเซลล์ที่ใช้เป็นรุ่นที่ 5 และ 6

2. วัสดุที่ใช้ทดสอบ

วัสดุซ่อมรอยทะลุรากฟันที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้ รวมทั้งส่วนประกอบต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงส่วนประกอบของวัสดุซ่อมรอยทะลุรากฟันทั้ง 3 ชนิด

Table 1. The composition of three different root perforation repair materials.

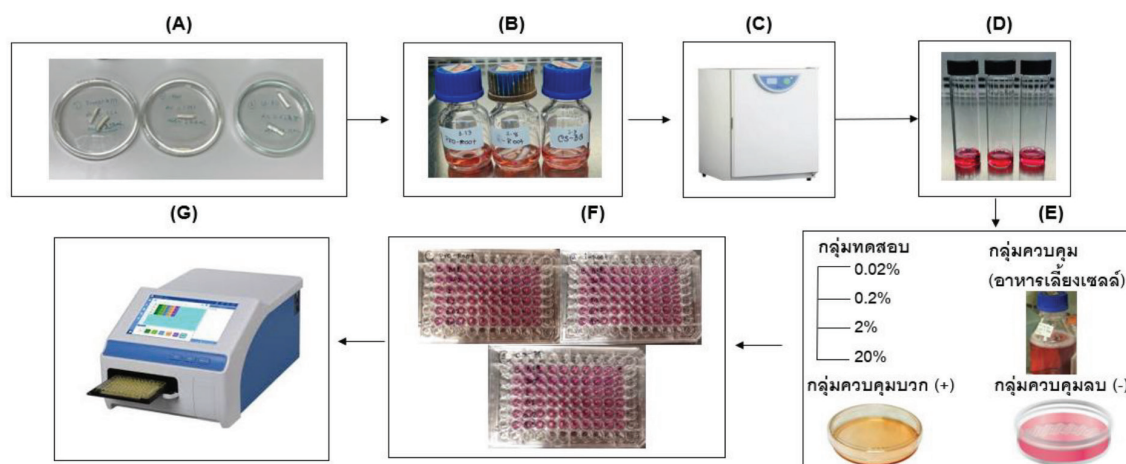
วัสดุ	ส่วนประกอบของส่วนผง	ส่วนประกอบของส่วนของเหลว
ไวท์เอ็มทีเอ	ไตรแคลเซียมซิลิเกต (Tricalcium silicate) ไดแคลเซียมซิลิเกต (Dicalcium silicate) บิสมัทออกไซด์ (Bismuth oxide) ไตรแคลเซียมอลูมิเนต (Tricalcium aluminate) และแคลเซียมซัลเฟตไดไฮเดรต (Calcium sulfate dihydrate)	น้ำกลั่น (Distilled water)
โอโรทีพี	แคลเซียมซิลิเกต (Calcium silicate) เซอร์โคเนียมออกไซด์ (Zirconium oxide) แทนทาลัมออกไซด์ (Tantalum oxide) และแคลเซียมฟอสเฟตโมโนเบสิก (Calcium phosphate monobasic)	
นิซิกะ	แคลเซียมซิลิเกตกลาส ชนิดของไบโอ แอกทีฟกลาส (Calcium silicate glass) และแคลเซียมไฮดรอกไซด์ (Calcium hydroxide)	เพสต์เอ (Paste a): กรดไขมัน (Fatty acid) บิสมัทซับคาร์บอเนต (Bismuth subcarbonate) และซิลิคอนไดออกไซด์ (Silicon dioxide) เพสต์บี (Paste b): แมกนีเซียมออกไซด์ (Magnesium oxide) น้ำกลั่น แคลเซียมซิลิเกตกลาส และซิลิคอนไดออกไซด์

เตรียมสารทดสอบแต่ละชนิดที่มีส่วนประกอบตามที่ผู้ผลิตแจ้งดังแสดงในตารางที่ 1 ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อในอัตราส่วนตามคำแนะนำของผู้ผลิต นำวัสดุซ่อมรอยทะลุรากฟันที่ผสมแล้วแยกใส่ในท่อไทกอน (Tygon tube) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 3.17 mm ความยาว 20 mm จำนวน 2 ท่อ/วัสดุ จากนั้นนำท่อไทกอนที่มีสารทดสอบบรรจุอยู่มาแช่ในขวดแก้ว ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมไว้ จำนวน 3.13 ml การเตรียมสารเพื่อแช่ในอาหารเลี้ยงเชื้อปฏิบัติตามมาตรฐานไอเอสโอ/ไออีซี (ISO/IEC) 10993-12: 2021 (16) วิธีการเตรียมสารทดสอบสำหรับประเมินความเป็นพิษของวัสดุ โดยแยกเป็น 2 ท่อ/วัสดุ/ขวด นำภาชนะทั้ง 3 ใบที่มีสารทดสอบบรรจุอยู่ในท่อไทกอนไปใส่ตู้เพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาดูดอาหารเลี้ยงเชื้อส่วนใสด้านบนออกมา และแยกปั่น

ด้วยเครื่องเหวี่ยงสาร 3,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 5 นาที เพื่อให้สารตกตะกอน แล้วจึงดูดสารสกัด (extract) ซึ่งเป็นของเหลวใสเหนือตะกอนด้วยปิเปต (pipette) มาผ่านแผ่นกรองขนาด 0.2 μm และเก็บแยกสารทดสอบทั้ง 3 ชนิดไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อใช้ในการประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ทดสอบต่อไป ในการประเมินความเป็นพิษจะเตรียมสารสกัดทั้ง 3 ชนิดที่ 4 ระดับความเข้มข้น คือ ร้อยละ 20, 2, 0.2 และ 0.02 ตามลำดับ และกลุ่มควบคุมตามมาตรฐานไอเอสโอ/ไออีซี 10993-5: 2009 (17) คือ กลุ่มควบคุม (Untreated blank control) เป็นกลุ่มที่ไม่มีสารทดสอบใส่เฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อ กลุ่มควบคุมบวก (Positive control) แนะนำให้ใช้โพลียูรีเทน (Polyurethane, Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center, Kanagawa, Japan) โดยใช้ขนาด 3 cm² แช่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ml

และเก็บในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนการทดสอบ ส่วนกลุ่มควบคุมลบใช้เทอร์มานอกซ์ (Thermanox® Coverslips, NUNCTM, Naperville, IL, USA) ขนาด 6 cm² แช่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 2 ml

และเก็บในตู้เพาะเลี้ยงก่อนการทดสอบกับเซลล์เช่นเดียวกับกลุ่มควบคุมบวกขั้นตอนการเตรียมสารทดสอบ ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 แผนผังการเตรียมตัวอย่างและวิธีการทดสอบ

(A) เตรียมวัสดุทดสอบทั้ง 3 ชนิดในท่อไทกอน (B) แช่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (C) อบในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ 72 ชั่วโมง (D) ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ส่วนใสด้านบน และกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร (E) เตรียมสารสกัดของสาร 3 ชนิดเจือจาง 4 ความเข้มข้น กลุ่มควบคุม กลุ่มควบคุมบวก และกลุ่มควบคุมลบ (F) ประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ในถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม (G) อ่านค่าความดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

Fig. 1 Schematic diagram of sample preparation and testing procedures:

- (A) Preparation of the three test materials in Tygon® tubes.,
- (B) Immersion in cell culture medium., (C) Incubation in an incubator for 72 hours.,
- (D) Collection of the supernatant followed by filtration through 0.2 µm filter.,
- (E) Preparation of extract dilutions at four concentrations for each material, along with the untreated blank control group (cell culture medium only), the positive control group, and the negative control group.,
- (F) Evaluation of cytotoxicity using 96-well cell culture plates.,
- (G) Measurement of optical density using a spectrophotometer.

3. การทดสอบความมีชีวิตของเซลล์

เมื่อได้จำนวนเซลล์มากเพียงพอสำหรับการทดสอบความเป็นพิษของสาร นำเซลล์มาทริบิโนเซชัน (trypsinization) และเพาะเลี้ยงในภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (96-well culture plate) โดยใส่เซลล์จำนวน 1×10^4 เซลล์/หลุม จำนวน 100 μ l/หลุม และนำไปเข้าสู่เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากภาชนะเพาะเลี้ยง และเติมสารทดสอบทั้ง 3 ชนิด 4 ความเข้มข้น/สาร โดยใส่หลุมละ 100 μ l จำนวน 8 หลุม/ความเข้มข้น สำหรับกลุ่มควบคุมบวก และ กลุ่มควบคุมลบ ใส่ปริมาตรสารละลายและจำนวนหลุมทดสอบเช่นเดียวกัน ส่วนกลุ่มควบคุม ใส่ปริมาตรเช่นเดียวกับกลุ่มอื่น ๆ ที่กล่าวข้างต้นจำนวน 12 หลุม พร้อมนำไปเข้าสู่เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ออกมาเพื่อประเมินความมีชีวิตของเซลล์ภายหลังสัมผัสกับสารทดสอบ 4 ความเข้มข้น/สาร กลุ่มควบคุม กลุ่มควบคุมบวก และกลุ่มควบคุมลบ ตามลำดับ ด้วยวิธี MTT assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay, Sigma, St. Louis, MO) ในขั้นตอนการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์จะทำซ้ำ 3 ครั้ง

ค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ =

4. การประเมินความมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay

ภายหลังนำสารทดสอบออกจากภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์แล้ว นำสารละลายเอ็มทีทีปริมาตร 100 μ l (ความเข้มข้น 5 mg/ml) ใส่แทนที่แล้วนำไปเข้าสู่เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ครบกำหนดดูดสารละลายเอ็มทีทีออก แล้วเติมไอโซโพรานอล (Isopropanol) ปริมาตร 100 μ l ในทุกหลุม พร้อมทั้งนำภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ไปเขย่าบนเครื่องเขย่า เพื่อให้ตะกอนสีม่วงของฟอร์มazan (Formazan) ออกมาในสารละลาย เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำสารละลายฟอร์มazanไปวัดค่าดูดกลืนแสง (OD; Optical density) ที่ความยาวคลื่น 570 nm ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer; BIO-TEK Instruments Inc, Winooski, VT, USA) ค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ในแต่ละกลุ่มของการทดลองคำนวณได้จากสูตร:

$$\frac{\text{ค่าดูดกลืนแสงเฉลี่ยในกลุ่มทดลอง}}{\text{ค่าดูดกลืนแสงเฉลี่ยในกลุ่มควบคุม}} \times 100$$

5. การทดสอบทางสถิติ

ค่าดูดกลืนแสงเฉลี่ยในกลุ่มควบคุม กำหนดให้ความมีชีวิตของเซลล์มีค่าร้อยละ 100 และนำค่าเฉลี่ยของค่าดูดกลืนแสงของกลุ่มวัสดุซ่อมรอยทะลุรากฟัน ทั้ง 3 ชนิด กลุ่มควบคุมบวก และกลุ่มควบคุมลบ ภายหลังสัมผัสสารมาเปรียบเทียบกันพร้อมทั้งวิเคราะห์สถิติโดยตรวจสอบข้อมูลการแจกแจง (Normality test) ด้วยการทดสอบ Kolmogorov-Smirnov เพื่อตรวจสอบลักษณะการแจกแจงของข้อมูลจากนั้นวิเคราะห์ค่าของสถิติโดยใช้วิธี Kruskal-Wallis เพื่อเปรียบเทียบร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ในแต่ละกลุ่ม โดยกำหนดระดับ

นัยสำคัญทางสถิติเท่ากับ 0.05 ($p = 0.05$) จากนั้นทำการเปรียบเทียบรายคู่ (Pairwise comparison) โดยใช้การทดสอบของ Mann-Whitney U

ผลการทดลอง (Results)

การตอบสนองของเซลล์เอ็นอีดีปริทันต์ต่อวัสดุซ่อมรอยทะลุรากฟัน 3 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 20, 2, 0.2 และ 0.02 พบว่าในกลุ่มที่สัมผัสกับไวท์เอ็มทีเอ เซลล์มีค่าความมีชีวิตเฉลี่ยร้อยละ 67.44 ± 13.44 , 94.50 ± 16.88 , 97.64 ± 17.33 และ 107.72 ± 18.52 ตามลำดับ สำหรับกลุ่มโอรูทบีพี ค่าความมีชีวิตเฉลี่ย

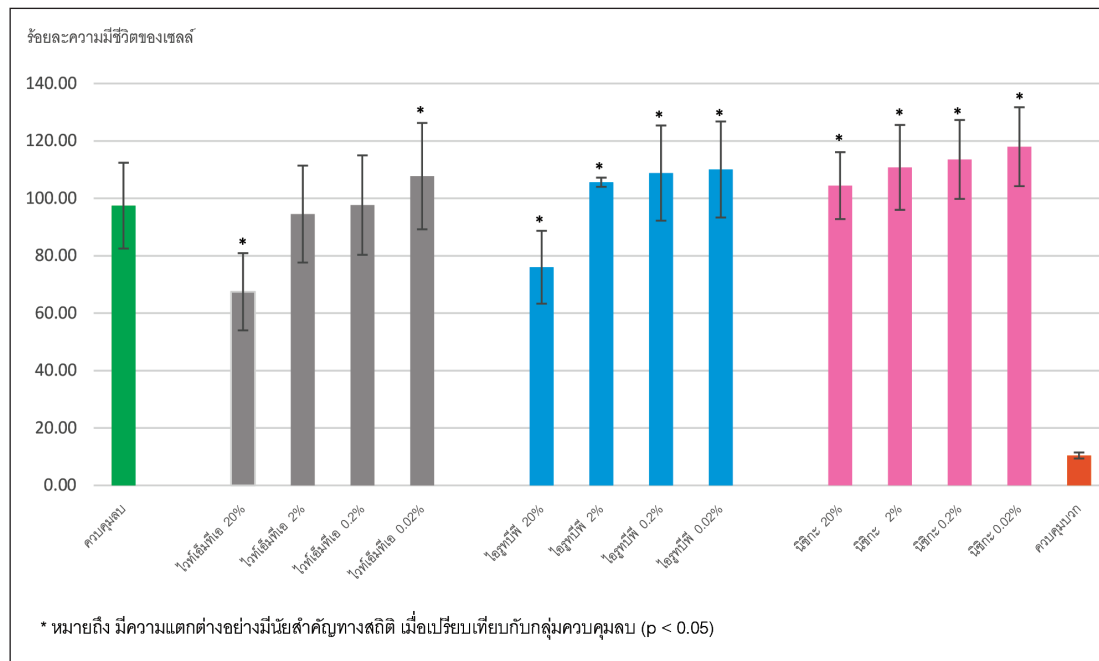
ของเซลล์อยู่ที่ร้อยละ 76.00 ± 12.70 , 105.60 ± 1.60 , 108.80 ± 16.58 และ 110.05 ± 16.73 ตามลำดับ ขณะที่กลุ่มนิซิกะแสดงค่าความมีชีวิตเฉลี่ยของเซลล์สูงที่สุดในทุกระดับความเข้มข้น ซึ่งพบค่าที่ 104.42 ± 11.65 , 110.77 ± 14.79 , 113.53 ± 13.74 และ 117.97 ± 13.74 ตามลำดับ โดยวัสดุทั้งสามชนิดแสดงความเป็นพิษน้อยกว่ากลุ่มควบคุมบวก ($10.41 \pm 1.05\%$) ในทุกระดับความเข้มข้น ($p < 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 2 หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ลักษณะของเซลล์ในกลุ่มควบคุม และกลุ่มควบคุมลบ พบว่ามีความคล้ายคลึงกับลักษณะเซลล์ก่อนการทดสอบ อย่างไรก็ตามในกลุ่มควบคุมบวก พบว่าเซลล์ส่วนใหญ่ มีการเปลี่ยนแปลงของรูปร่าง มีลักษณะรูปร่างกลม และมีจำนวนเซลล์ในแต่ละหลุมลดลง เมื่อพิจารณาวัสดุซ่อมรอยทะเลทั้งสามชนิด พบว่าเซลล์ในกลุ่มนิซิกะทุกระดับความเข้มข้นมีลักษณะไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม และกลุ่มควบคุมลบ ส่วนลักษณะของเซลล์กลุ่มไวท์เอ็มทีเอ และไฮรูทบีพีที่ความเข้มข้นร้อยละ 2-0.02 มีลักษณะคล้ายคลึงกันกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 ทั้งกลุ่มไวท์เอ็มทีเอ และไฮรูทบีพี พบการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ อีกทั้งยังมีจำนวนเซลล์ที่ลดลง ดังแสดงในตารางที่ 2

เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ (ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ 97.45 ± 14.94) ไวท์เอ็มทีเอที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.02 มีพิษต่อเซลล์น้อยกว่า ($p < 0.05$) ในขณะที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 มีความเป็นพิษมากกว่ากลุ่มควบคุมลบ ($p < 0.05$) สำหรับไฮรูทบีพีที่ความเข้มข้นร้อยละ 2-0.02 มีพิษต่อเซลล์น้อยกว่ากลุ่มควบคุมลบ ($p < 0.05$) ในขณะที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 ส่งผลต่อความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่ากลุ่มควบคุมลบ ($p < 0.05$) ส่วนกลุ่มสุดท้ายนิซิกะทั้ง 4 ความเข้มข้น ส่งผลต่อความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่ากลุ่มควบคุมลบ ($p < 0.05$)

เมื่อวิเคราะห์วัสดุซ่อมรอยทะเลแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นต่างกัน ผลของการศึกษาพบว่า วัสดุซ่อมรอยทะเลชนิดแรกไวท์เอ็มทีเอที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.02 มีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยที่สุด ($p < 0.05$) ในขณะที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 ส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอีก 3 ระดับความเข้มข้นที่ทำการทดสอบ ($p < 0.05$) สำหรับวัสดุซ่อมรอยทะเลไฮรูทบีพี และนิซิกะที่ความเข้มข้นร้อยละ 2-0.02 ส่งผลต่อความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่าที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 ($p < 0.05$)

เมื่อนำวัสดุซ่อมรอยทะเลทุกพันธุ์ทั้ง 3 ชนิดมาเปรียบเทียบรายคู่ พบว่า ไวท์เอ็มทีเอ กับ ไฮรูทบีพีที่ความเข้มข้นร้อยละ 20-0.2 แต่ละระดับความเข้มข้นไวท์เอ็มทีเอส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่าไฮรูทบีพี ($p < 0.05$) แต่ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.02 มีความเป็นพิษไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) ในการเปรียบเทียบไฮรูทบีพีกับนิซิกะที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 พบว่านิซิกะไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ และเซลล์มีชีวิตร้อยละ 104.42 ในขณะที่ไฮรูทบีพีเซลล์มีชีวิตเหลือเพียงร้อยละ 76 ($p < 0.05$) ส่วนความเข้มข้นอื่น ๆ ที่เหลือไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบความมีชีวิตของไวท์เอ็มทีเอกับนิซิกะในทุกระดับความเข้มข้นของไวท์เอ็มทีเอ มีร้อยละความมีชีวิตของเซลล์เหลือน้อยกว่านิซิกะ ($p < 0.05$)

ในการศึกษาครั้งนี้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.02 ของนิซิกะ มีร้อยละความมีชีวิตของเซลล์มากที่สุดที่ร้อยละ 117.97 ± 13.74 ในขณะที่ไวท์เอ็มทีเอที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 มีร้อยละความมีชีวิตของเซลล์เหลือเพียงร้อยละ 67.44 ± 13.44 ภายหลังสัมผัสกับสารทดสอบ

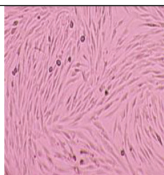
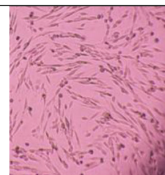
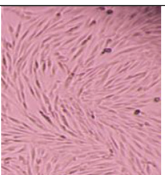
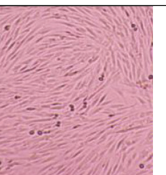
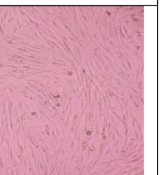
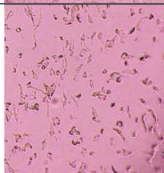
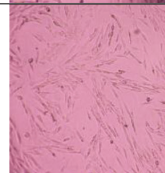
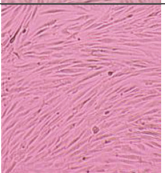
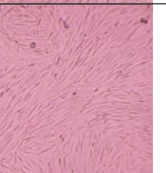
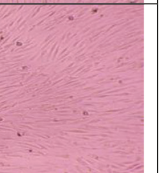
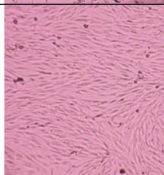
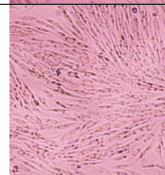
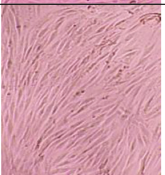
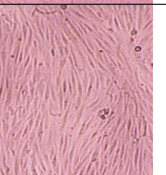
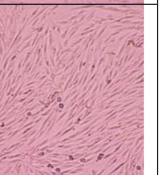


รูปที่ 2 แสดงค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตของเซลล์และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ภายหลังการสัมผัสกับวัสดุซ่อมรอยทะลุรากฟัน ไวท์เอ็มทีเอ ไอรูทบีพี และนิซิกะที่ 4 ระดับความเข้มข้น รวมทั้งกลุ่มควบคุมบวก และกลุ่มควบคุมลบ

Fig. 2 The mean percentage and standard deviation of cell viability after exposure to the root perforation repair materials: ProRoot® MTA, iRoot® BP+, and CS-BG at four concentration levels, along with the positive and negative control groups.

ตารางที่ 2 แสดงลักษณะของเซลล์เอ็นอีดีปริทันต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ กำลังขยาย 40 เท่าของกลุ่มควบคุม กลุ่มควบคุมบวก กลุ่มควบคุมลบ และกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบ 3 ชนิด ภายหลัง 24 ชั่วโมง ของการประเมินความมีชีวิตของเซลล์

Table 2. The morphology of HPDLF observed under an inverted microscope at 40x magnification. The images show the untreated blank control group, the positive control, the negative control, and the three test material groups after 24 hours of cell viability assessment.

กลุ่มควบคุม		สารทดสอบ	ความเข้มข้น 20%	ความเข้มข้น 2%	ความเข้มข้น 0.2%	ความเข้มข้น 0.02%
อาหารเลี้ยงเซลล์		ไวท์เอ็มทีเอ				
บวก		ไอโรทูบิพี				
ลบ		นิซิกะ				

บทวิจารณ์ (Discussion)

สมบัติทางชีวภาพของวัสดุซ่อมรอยทะเลาะรากฟันเป็นปัจจัยสำคัญที่จะส่งผลต่อความสำเร็จในการรักษา การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบความเป็นพิษต่อเซลล์ของวัสดุซ่อมรอยทะเลาะรากฟันสามชนิด ได้แก่ ไวท์เอ็มทีเอ ไอโรทูบิพี และนิซิกะ โดยใช้เซลล์เอ็นอีดีปริทันต์ของมนุษย์ เป็นการศึกษาในห้องปฏิบัติการ (*in vitro* study) ผลการทดลองพบว่าวัสดุนิซิกะแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับวัสดุอีกสองชนิด และมีแนวโน้มในการส่งเสริมความมีชีวิตของเซลล์เอ็นอีดีปริทันต์ได้ดีกว่าโดยเฉพาะที่ความเข้มข้นต่ำ ผลลัพธ์เหล่านี้มีความสำคัญในทางคลินิก เนื่องจากวัสดุที่มีความเป็นพิษต่ำจะช่วยลดโอกาสการเกิดปฏิกิริยาการอักเสบที่เนื้อเยื่อรอบรากฟัน และอาจช่วยเพิ่มอัตราความสำเร็จของการรักษาดลองรากฟันในระยะยาว

การศึกษาของ Aka และคณะ (15) สอดคล้องกับการศึกษาของ Murata และคณะ (14) ที่พบว่าอัตราส่วนของผงต่อของเหลวที่ใช้ในการผสมเป็นวัสดุซ่อมรอยทะเลาะรากฟันมีผลต่อเซลล์ทดสอบ โดยพบว่านิซิกะเมื่อเพิ่มปริมาณผงในส่วนผสม เพื่อลดความเหลว และเพิ่มความหนืด และความแข็งของวัสดุ เมื่อนำไปประเมินความเข้ากันได้กับเซลล์ (cytocompatibility) จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตจะสูงขึ้นมากกว่าการผสมในลักษณะเหลว นอกจากนี้ ส่วนผงของสารทดสอบที่ใช้ในการศึกษาของ Murata และคณะ (14) คือ เอ็นเอสวาย 224 (NSY-224, Newly developed BG powder) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของแคลเซียมซิลิเกตกลาสและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ มีส่วนประกอบส่วนผงเช่นเดียวกับนิซิกะที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ผลของการศึกษาพบว่าจำนวนเซลล์ที่เหลืออยู่หลังจากสัมผัสวัสดุนิซิกะจะ

มากกว่าไวท์เอ็มทีเอในทุกระดับความเข้มข้น ($p < 0.05$) โดยวัสดุชนิดนี้ในการศึกษาครั้งนี้ถูกผสมให้มีลักษณะเป็นก้อนได้ เพื่อจำลองการใช้งานจริงในคลินิก ตามคำแนะนำของผู้ผลิต

การเตรียมวัสดุซ่อมรอยทะเลาะรากฟันทั้ง 3 ชนิด ภายหลังการผสมวัสดุตามคำแนะนำของแต่ละบริษัท ผู้ผลิตแล้ว วัสดุทดสอบแต่ละชนิดถูกใส่ลงในท่อไทกอน จากนั้นนำไปแช่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ทันที โดยน้ำหนักของวัสดุทดสอบและปริมาตรของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้สำหรับแช่จะถูกปฏิบัติตาม ISO/IEC 10993-12: 2021 (16) ดังนั้นสารที่ปลดปล่อยออกมา (leachable substance) จากวัสดุทดสอบเริ่มตั้งแต่ทันทีที่ผสมวัสดุเสร็จจนกระทั่งวัสดุแข็งตัวเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเซลล์ จากนั้นนำไปประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งเป็นการจำลองสภาวะการใช้งานในคลินิกในกรณีของวัสดุซ่อมรอยทะเลาะรากฟัน พบว่าวัสดุมีผลต่อเซลล์เอ็นโดทีลียัลตั้งแต่ช่วงที่นำวัสดุไปปิดบริเวณรอยทะเลาะรากฟันจนวัสดุแข็งตัว เปรียบเสมือนการปล่อยสารพิษจากวัสดุไปยังเนื้อเยื่อปริทันต์โดยรอบ ซึ่งจะสอดคล้องกับการศึกษาของ Murata และคณะ (14) ที่แนะนำให้ประเมินความเข้ากันได้กับเซลล์ของวัสดุทดสอบตั้งแต่หลังการผสมเสร็จทันที โดยวัสดุจะถูกนำไปใส่ถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ และสารพิษที่ปลดปล่อยออกมาจากวัสดุทดสอบจะถูกส่งผ่านรูของทรานสเวลล์ (Transwell) ขนาด $8 \mu\text{m}$ ไปยังเซลล์ทดสอบ แต่การประเมินความเข้ากันได้ของเซลล์ทดสอบในการศึกษานี้จะทำตามมาตรฐานของ ISO/IEC 10993-5: 2009 (17) โดยการนำสารละลายในส่วนบน (eluent) ไปปั่นเพื่อได้สารสกัด (extract) ซึ่งเป็นสารที่ปลดปล่อยออกมาจากวัสดุทดสอบสู่เนื้อเยื่อโดยรอบบริเวณรอยทะเลาะรากฟันในทางคลินิก แล้วจึงนำไปประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ตามข้อกำหนด ISO/IEC 10993-5: 2009 (17) ซึ่งเป็นหลักเกณฑ์สำหรับการเตรียมสารทดสอบ และสารที่ใช้เป็นวัสดุอ้างอิง (reference materials) ในการประเมินสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพ ดังนั้น สารสกัดที่เตรียมได้จากวัสดุซ่อมรอยทะเลาะรากฟันทั้ง 3 ชนิด จะได้รับการเจือจางเป็น 4 ระดับความเข้มข้นตามหลักเกณฑ์ของไอเอสโอตามที่กล่าวมาข้างต้น แล้วจึงนำไปประเมินความเป็นพิษกับเซลล์ทดสอบ

ส่วนเซลล์ทดสอบในการศึกษานี้ได้เลือกใช้เซลล์เอ็นโดทีลียัลปริทันต์ของมนุษย์ เนื่องจากเป็นเซลล์ที่วัสดุจะสัมผัสโดยตรงเมื่อเกิดรอยทะเลาะในทางคลินิก แม้ว่าการใช้เซลล์สายพันธุ์ (Cell line) ในทางปฏิบัติจะมีข้อได้เปรียบในด้านความสะดวกในการเตรียมและเพาะเลี้ยงที่ง่ายกว่าเซลล์แบบปฐมภูมิ (Primary cell) แต่การเลือกใช้เซลล์ทดสอบที่มีความเฉพาะเจาะจงกับบริเวณที่วัสดุสัมผัสจริงในร่างกาย ย่อมได้ผลลัพธ์ที่ใกล้เคียงกับสภาวะทางคลินิกมากขึ้นในการประเมินสมบัติทางชีวภาพในห้องปฏิบัติการ (Initial test) อย่างไรก็ตาม มีการศึกษาเปรียบเทียบผลของสารทดสอบต่อเซลล์สายพันธุ์และเซลล์แบบปฐมภูมิ พบว่า ให้ผลไม่ต่างกันภายใต้เงื่อนไขการวิจัยที่เหมาะสม (18-19)

นอกจากนี้ Jiang และคณะ (20) พบว่าไวท์เอ็มทีเอ และโอโรทูบิพีเมื่อทดสอบกับเซลล์สร้างเส้นใย (L929, Murine fibroblast cell line) ของหนู และเซลล์สร้างกระดูกของมนุษย์ (MG63, human osteoblast-like cells) โดยการเตรียมสารสกัดใน 3 ระดับความเข้มข้น คือ ร้อยละ 100, 50 และ 25 พบว่า สารทั้ง 2 ชนิดมีความเป็นพิษต่อเซลล์ทดสอบไม่ต่างกัน โดยร้อยละ 95 ของเซลล์ยังคงมีชีวิตอยู่หลังจากสัมผัสกับวัสดุทดสอบ อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าในทุกความเข้มข้นของกลุ่มโอโรทูบิพี จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตหลังสัมผัสวัสดุทดสอบมากกว่าไวท์เอ็มทีเอ ($p < 0.05$) ยกเว้นที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.02 ซึ่งความมีชีวิตของเซลล์ในทั้ง 2 กลุ่มไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$)

จากผลของหลายการศึกษา (15,20-21) เป็นไปในทิศทางเดียวกันว่า วัสดุซ่อมรอยทะเลาะรากฟันที่มีระยะเวลาการแข็งตัวสมบูรณ์สั้น จะมีความเป็นพิษต่อเซลล์ทดสอบน้อยกว่าวัสดุที่มีระยะเวลาในการแข็งตัวสมบูรณ์นาน ทั้งนี้การศึกษาของ Jiang และคณะ (20) ยังพบว่าโอโรทูบิพีที่อยู่ในตู้บอดี้ต้องใช้เวลาถึง 7 วันในการแข็งตัวอย่างสมบูรณ์ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Modareszadeh และคณะ (22) ที่พบว่าวัสดุชนิดนี้จะค่อยๆ แข็งตัวและใช้เวลาอย่างน้อย 5 วัน ซึ่งตรงข้ามกับข้อมูลที่บริษัทผู้ผลิตระบุว่าใช้เวลาเพียง 2 ชั่วโมง โดยอาจสันนิษฐานได้ว่า สมบัติที่ไวต่อความชื้นขององค์ประกอบในวัสดุ เช่น แคลเซียมซิลิเกต อาจมีผลกระทบต่อการศึกษาการแข็งตัวของวัสดุ ในขณะเดียวกัน

สำหรับวัสดุทดสอบอีก 2 ชนิดมีความสอดคล้องกับข้อมูลที่บริษัทผู้ผลิตกล่าวอ้าง โดยนิซิกะใช้เวลาในการแข็งตัวสมบูรณ์ประมาณ 3 ชั่วโมง หากไม่มีส่วนผงผสม (12,23-24) แต่หากเพิ่มปริมาณผงในส่วนผสมเพื่อเพิ่มความหนืด จะทำให้วัสดุแข็งตัวสมบูรณ์เร็วขึ้นเหลือเพียง 1 ชั่วโมง (14-15) ส่วนไวท์เอ็มทีเอใช้เวลาในการแข็งตัวสมบูรณ์ประมาณ 3 ชั่วโมง (7,25-26)

นอกจากนี้ หลายการศึกษา (11,14,27-29) แสดงให้เห็นว่า วัสดุไบโอเซรามิกซ์ (bioceramics) และไบโอแอคทีฟกลาส ได้ถูกนำมาใช้ในทางทันตกรรมและศัลยกรรมกระดูก เนื่องจากสมบัติที่สามารถกระตุ้นการสร้างเนื้อเยื่อแข็งและช่วยลดการอักเสบได้ดี (30) วัสดุทั้งสองชนิดนี้มีองค์ประกอบและกระบวนการทำงานที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะในแง่ของการตกผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ ซึ่งเป็นแร่ธาตุหลักของกระดูกและฟัน รวมถึงความเข้ากันได้ทางชีวภาพ วัสดุไบโอเซรามิกซ์เป็นวัสดุที่มีแคลเซียมซิลิเกตเป็นองค์ประกอบ เมื่อสัมผัสกับของเหลวจะเกิดการตกผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทต์ซึ่งปกคลุมบนพื้นผิวของวัสดุ และสามารถแทรกซึมเข้าไปในท่อเนื้อฟัน (Dentinal tubule) ช่วยลดการปลดปล่อยสารพิษ เนื่องจากวัสดุจะสร้างชั้นผลึกที่เสถียร นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มการยึดเกาะของเซลล์สร้างกระดูกฟัน (Cementoblast) และเซลล์สร้างกระดูก (Osteoblast) ในขณะที่ไบโอแอคทีฟกลาสที่พบในนิซิกะประกอบด้วยซิลิกา (SiO_2), แคลเซียมออกไซด์ (CaO), ฟอสเฟต (P_2O_5) และโซเดียมออกไซด์ (Na_2O) โดยมีส่วนประกอบหลักเป็นแคลเซียมซิลิเกตกลาส แมกนีเซียมออกไซด์ และแคลเซียมไฮดรอกไซด์ สามารถกระตุ้นการตกผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทต์ได้ (31) จากการศึกษาของ Hoppe และ คณะ (32) พบว่ามีการละลายและปล่อยไอออนของซิลิกา แคลเซียม และฟอสเฟตเข้าสู่ของเหลวโดยรอบได้อย่างรวดเร็ว ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นปฏิกิริยาของเซลล์ ช่วยเพิ่มความเข้ากันได้ทางชีวภาพและสร้างสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ นอกจากนี้ยังสามารถรักษาสภาพความเป็นด่างในระดับที่เสถียรอีกด้วย ด้วยเหตุผลดังกล่าวนี้ จึงสันนิษฐานว่า

น่าจะส่งผลให้วัสดุนิซิกะมีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่าวัสดุในกลุ่มไบโอเซรามิกซ์อีก 2 ชนิดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

เนื่องจากวัสดุซ่อมรอยทะลุรากฟันต้องสัมผัสกับเนื้อเยื่อรอบรากฟันอย่างใกล้ชิดและถาวร จึงต้องมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ อีกทั้งควรกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ในเนื้อเยื่อรอบรากฟัน รวมทั้งส่งเสริมให้มีการเคลื่อนที่ของเซลล์ไปยังบริเวณนั้น เพื่อช่วยสร้างเนื้อเยื่อใหม่ และซ่อมแซมบริเวณที่ได้รับบาดเจ็บหายจากการติดเชื้อหรือการอักเสบ ดังนั้นในอนาคตการประเมินการเพิ่มจำนวนเซลล์ (Proliferation test) และการเคลื่อนที่ของเซลล์ (Migration test) ไปยังบริเวณที่เกิดการทะลุของรากฟันเมื่อเซลล์สัมผัสกับวัสดุซ่อมรอยทะลุ จึงเป็นการศึกษาที่น่าสนใจและควรทำต่อไป

บทสรุป (Conclusion)

การศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพของเซลล์เอ็นไยด์ปริทันต์ภายหลังสัมผัสวัสดุซ่อมรอยทะลุรากฟัน 3 ชนิดพบว่าที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 20 ทั้งไวท์เอ็มทีเอ และโอรูทบีพีพีพลัส ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์มีจำนวนลดลงและเหลือน้อยกว่ากลุ่มควบคุมลบ ($p < 0.05$) แต่เมื่อสารสกัดมีความเข้มข้นที่เจือจางลง ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์มีจำนวนเพิ่มขึ้น สำหรับนิซิกะ ไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ในทุกช่วงระดับความเข้มข้นและตลอดระยะเวลาในการทดสอบ ดังนั้นนิซิกะจึงเป็นวัสดุทางเลือกที่น่าสนใจในการใช้ซ่อมรอยทะลุรากฟัน

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

คณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณสถาบันวิจัยมหาวิทยาลัยรังสิต เอื้อเฟื้อทุนวิจัยในการทำการศึกษา และทำให้โครงการนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง (References)

1. Fuss Z, Trope M. Root perforations: classification and treatment choices based on prognostic factors. *Endod Dent Traumatol*. 1996;12(6):255-64.
2. Alhadainy HA. Root perforations. A review of literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1994;78(3):368-74.
3. Lee SJ, Monsef M, Torabinejad M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *J Endod*. 1993;19(11):541-4.
4. Torabinejad M, Parirokh M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--part II: leakage and biocompatibility investigations. *J Endod*. 2010;36(2):190-202.
5. Main C, Mirzayan N, Shabahang S, Torabinejad M. Repair of root perforations using mineral trioxide aggregate: a long-term study. *J Endod*. 2004;30(2):80-3.
6. Torabinejad M, Chivian N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 1999;25(3):197-205.
7. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part I: chemical, physical, and antibacterial properties. *J Endod*. 2010;36(1):16-27.
8. Öncel Torun Z, Torun D, Demirkaya K, Yavuz ST, Elçi MP, Sarper M, Avcu F. Effects of iRoot BP and white mineral trioxide aggregate on cell viability and the expression of genes associated with mineralization. *Int Endod J*. 2015;48(10):986-93.
9. Mahgoub N, Alqadasi B, Aldhorae K, Assiry A, Altawili ZM, Tao H. Comparison between iRoot BP Plus (EndoSequence Root Repair Material) and Mineral Trioxide Aggregate as Pulp-capping Agents: A Systematic Review. *J Int Soc Prev Community Dent*. 2019;9(6):542-52.
10. Tomer A, Kumari D, Rastogi D, Cecilia LL, Singh D, Tyagi A. Bioceramics in Endodontics- A Review. *Int J Appl Dent Sci*. 2020;6:588-94.
11. Profeta AC, Prucher GM. Bioactive-glass in Endodontic Therapy and Associated Microsurgery. *Open Dent J*. 2017;11:164-70.
12. Washio A, Morotomi T, Yoshii S, Kitamura C. Bioactive Glass-Based Endodontic Sealer as a Promising Root Canal Filling Material without Semisolid Core Materials. *Materials (Basel)*. 2019;12(23):3967. doi: 10.3390/ma12233967.
13. Ricucci D, Siqueira JF, Jr. Fate of the tissue in lateral canals and apical ramifications in response to pathologic conditions and treatment procedures. *J Endod*. 2010;36(1):1-15.
14. Murata K, Washio A, Morotomi T, Rojasawasthien T, Kokabu S, Kitamura C. Physicochemical Properties, Cytocompatibility, and Biocompatibility of a Bioactive Glass Based Retrograde Filling Material. *Nanomaterials (Basel)*. 2021;11(7):1828. doi: 10.3390/nano11071828.
15. Aka A, Matsuura T, Yoshimura A. An Evaluation of the Cytocompatibility of Endodontic Bioceramics in Human Periodontal-Ligament-Derived Cells. *J Funct Biomater*. 2024;15(8):231. doi: 10.3390/jfb15080231.
16. ISO. ISO 10993-12:2021 Biological evaluation of medical devices – Part 12: Sample preparation and reference materials. Geneva: International Organization for Standardization; 2021.

17. ISO. ISO 10993-5 Biological Evaluation of Medical Devices – Part 5: Tests for In vitro Cytotoxicity. Geneva: International Organization for Standardization; 2009.
18. Kettering JD, Torabinejad M. Cytotoxicity of root canal sealers: a study using HeLa cells and fibroblasts. *Int Endod J*. 1984;17(2):60-6.
19. Spångberg L. Biological effects of root canal filling materials. 5. Toxic effect *in vitro* of root canal filling materials on HeLa cells and human skin fibroblasts. *Odontol Revy*. 1969;20(4):427-36.
20. Jiang Y, Zheng Q, Zhou X, Gao Y, Huang D. A comparative study on root canal repair materials: a cytocompatibility assessment in L929 and MG63 cells. *ScientificWorldJournal*. 2014;2014:463826. doi: 10.1155/2014/463826.
21. Ma X, Xu H, Chen X, Zou Q, Wang J, Da Y, et al. Modern methods and materials used to treat root perforation: effectiveness comparison. *J Mater Sci Mater Med*. 2024;35(1):1. doi: 10.1007/s10856-023-06770-y.
22. Modareszadeh MR, Di Fiore PM, Tipton DA, Salamat N. Cytotoxicity and Alkaline Phosphatase Activity Evaluation of EndoSequence Root Repair Material. *J Endod*. 2012;38(8):1101-5.
23. Jo SB, Kim H, Lee H, Kim Y-J, Patel K, Knowles J, et al. Physical Properties and Biofunctionalities of Bioactive Root Canal Sealers In Vitro. *Nanomaterials (Basel)*. 2020;10(9):1750. doi: 10.3390/nano10091750.
24. Al-Sabawi NA, Al-Jubori SH. Physical-chemical properties and acellular bioactivity of newly prepared nano-tricalcium silicate-58s bioactive glass-based endodontic sealer. *J Oral Biosci*. 2023;65(4):305-15.
25. Islam I, Kheng Chng H, Jin Yap AU. Comparison of the Physical and Mechanical Properties of MTA and Portland Cement. *J Endod*. 2006;32(3):193-7.
26. Ber BS, Hatton JF, Stewart GP. Chemical Modification of ProRoot MTA to Improve Handling Characteristics and Decrease Setting Time. *J Endod*. 2007;33(10):1231-4.
27. De-Deus G, Canabarro A, Alves GG, Marins JR, Linhares AB, Granjeiro JM. Cytocompatibility of the ready-to-use bioceramic putty repair cement iRoot BP Plus with primary human osteoblasts. *Int Endod J*. 2012;45(6):508-13.
28. Tay FR, Pashley DH, Rueggeberg FA, Loushine RJ, Weller RN. Calcium phosphate phase transformation produced by the interaction of the portland cement component of white mineral trioxide aggregate with a phosphate-containing fluid. *J Endod*. 2007;33(11):1347-51.
29. Thomson TS, Berry JE, Somerman MJ, Kirkwood KL. Cementoblasts maintain expression of osteocalcin in the presence of mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 2003;29(6):407-12.
30. Skallevoid HE, Rokaya D, Khurshid Z, Zafar MS. Bioactive Glass Applications in Dentistry. *Int J Mol Sci*. 2019;20(23):5960. doi: 10.3390/ijms20235960.
31. Hench LL. The story of Bioglass. *J Mater Sci Mater Med*. 2006;17(11):967-78.
32. Hoppe A, Güldal NS, Boccaccini AR. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials*. 2011;32(11):2757-74.

ติดต่อบทความ:

อ.ญ.นรินทร์นิตา ว่องวัฒนาสานติ
สาขาวิชาวิทยาเอ็นโดดอนต์ วิทยาลัยทันตแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยรังสิต อ.เมือง จ.ปทุมธานี 12000
โทรศัพท์ : 062 642 9591
อีเมล : ninnita.w@rsu.ac.th

Corresponding author:

Dr. Ninnita Wongwatanasanti
College of Dental Medicine, Rangsit University,
Pathumthani 12000, Thailand
Tel: (662) 642 9591
E-mail: ninnita.w@rsu.ac.th