

ความเป็นพิษต่อเซลล์และคุณสมบัติการสร้างเนื้อเยื่อแข็งของกลาสไอโอโนเมอร์
ซีเมนต์ที่มีโมโนแคลเซียมซิลิเกตผสมในเซลล์เนื้อเยื่อในฟันมนุษย์



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาทันตกรรมคลินิก

พฤษภาคม 2557

ความเป็นพิษต่อเซลล์และคุณสมบัติการสร้างเนื้อเยื่อแข็งของกลาสไอโอโนเมอร์
ซีเมนต์ที่มีโมโนแคลเซียมซิลิเกตผสมในเซลล์เนื้อเยื่อในฟันมนุษย์



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาทันตกรรมคลินิก

พฤษภาคม 2557

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ความเป็นพิษต่อเซลล์และคุณสมบัติการสร้างเนื้อเยื่อแข็งของกลาสไอโอโนเมอร์
ซีเมนต์ที่มีโมโนแคลเซียมซิลิเกตผสมในเซลล์เนื้อเยื่อในฟันมนุษย์



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาทันตกรรมคลินิก

พฤษภาคม 2557

ปริญญา ชัยสิงห์เหนือ. (2557). *ความเป็นพิษต่อเซลล์และคุณสมบัติการสร้างเนื้อเยื่อแข็งของกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ที่มีโมโนแคลเซียมซิติลิกเกตผสมในเซลล์เนื้อเยื่อในฟันมนุษย์.*

ปริญญา นิพนธ์ วท.ม. (วิทยาเอ็นโดดอนต์). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม: อ. ทญ. ดร. จารุมา ศักดิ์ดี, ผศ. ดร. ปุณณมา ศิริพันธ์โนน, อ. ทพ. ดร. ญัฐพล ตั้งจิตตร.

โมโนแคลเซียมซิติลิกเกตเป็นสารประกอบซิติลิกเกตไบโอเซรามิกชนิดหนึ่ง ซึ่งมีสมบัติชีวเคมีสามารถสร้างผลึกอะพาไทต์เมื่อแช่ในสารละลายที่จำลองสภาวะของเหลวในร่างกาย และกระตุ้นเซลล์ให้เกิดกระบวนการแปรสภาพจากเซลล์ต้นกำเนิดไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก ในขณะที่กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ จะเป็นสารเพียงชนิดเดียวที่สามารถยึดติดกับโครงสร้างของฟันด้วยพันธะทางเคมี มีระยะเวลาการก่อตัวเร็ว โดยวัตถุประสงค์ของการศึกษานี้จะทำการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพและสมบัติการสร้างเนื้อเยื่อแข็งของกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ที่มีสารประกอบโมโนแคลเซียมซิติลิกเกต (GIC-CS) ต่อเซลล์เนื้อเยื่อในฟันมนุษย์ โดยทำการเปรียบเทียบกับ White ProRoot[®] MTA ซึ่งเป็นสารมาตรฐานที่นิยมนำมาใช้ทำการศึกษาร่วมกันในปัจจุบัน วิธีการดำเนินงานวิจัยโดยนำเซลล์เนื้อเยื่อในฟันมนุษย์มาทำการกระตุ้นด้วยสารสกัดทดสอบของ White ProRoot[®] MTA (Tooth-colored MTA, Densply Tulsa dental, Tulsa OK, USA) Ketac[™] Molar (Ketac[™] Molar Easymix, 3M ESPE AG, Germany) CaSiO₃ และ GIC-CS ชนิดละ 5 ความเข้มข้น ด้วยวิธี MTT((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) ทำการวัดค่าระดับความทึบแสงด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งจะนำมาใช้ในการทดสอบถัดไป ในการประเมินความมีชีวิตอยู่รอดของเซลล์จะนำความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดจากการทดสอบแรกมาทำการทดสอบวัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันมนุษย์ด้วยวิธี MTT เช่นเดียวกัน ที่ช่วงระยะเวลา 1 3 5 และ 7 วัน ทำการศึกษาลักษณะรูปร่างเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ในส่วนของการประเมินสมบัติการสร้างเนื้อเยื่อแข็งจะทำการทดสอบหาตัวบ่งชี้ของการแปรสภาพไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อฟันด้วยปฏิกิริยาถูกไซรีเวอร์สทรานคริปเตส (RT-PCR) เพื่อหา ยีน DSP Runx2 ALP และ OCN และวัดการสะสมของแร่ธาตุจากการย้อมติดสีอะลิซาริน เรด (Alizarin red) ผลการศึกษาพบว่าสารประกอบ GIC-CS ทุกความเข้มข้นไม่เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อในฟันมนุษย์ โดยไม่แตกต่างจาก White ProRoot[®] MTA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) และสามารถกระตุ้นให้เกิดกระบวนการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์มากกว่า White ProRoot[®] MTA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P≤0.001) ที่ช่วงระยะเวลาวันที่ 3 5 และ 7 มีการแสดงออกของยีนที่เป็นตัวบ่งชี้ของการแปรสภาพไปเป็นเซลล์

สร้างเนื้อฟันที่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ White ProRoot[®] MTA ทุกช่วงระยะเวลาของการศึกษา โดยยีน DSP และ ALP มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ในขณะที่ ยีน Runx2 และ OCN มีแนวโน้มลดลง รวมถึงเกิดการสะสมของแร่ธาตุซึ่งมีปริมาณน้อยกว่าที่พบใน White ProRoot[®] MTA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq 0.005$) สรุปผลการศึกษาได้ว่าสารประกอบ GIC-CS มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์เนื้อเยื่อในฟันมนุษย์และสามารถกระตุ้นการสร้างเนื้อเยื่อแข็ง ซึ่งอาจจะเป็นอีกหนึ่งทางเลือกสำหรับการจะพัฒนานำมาเป็นสารใช้ปิดแผลเนื้อเยื่อใน



CYTOTOXICITY AND OSTEOGENIC PROPERTIES OF GLASS IONOMER CEMENT
CONTAINING MONOCALCIUM SILICATE COMPOUND
IN HUMAN DENTAL PULP CELLS



Presented in Partial Fulfilment of the Requirements of the
Master of Science Degree in Clinical Dentistry
At Srinakharinwirot University

May 2014

Parinya Chaisinghanuae. (2014). *Cytotoxicity and Osteogenic Properties of Glass Ionomer Cement Containing Monocalcium Silicate Compound in Human Dental Pulp Cells*. Master thesis, M.S. (Endodontology). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Lect. Dr. Jaruma Sakdee, Asst. Prof. Punnama Siriphannon, Lect. Dr. Nathaphon Tungjit.

Monocalcium silicate (CaSiO_3) is a type of silicate bioceramics that have bioactive properties, can form apatite crystal layer in simulate body fluid (SBF), and stimulates cell proliferation and osteogenic differentiation. Meanwhile, Glass ionomer cement (GIC) is the only type of restorative material that has chemical bond to tooth structure and fast setting time. The purpose of this study was to investigate biocompatibility and osteogenic properties of Glass ionomer cement containing monocalcium silicate compound (GIC-CS) to Human Dental Pulp Cells (HDPC) comparing with White ProRoot[®] MTA. Methods : HDPC were exposed to extracted solution in 5 concentrations from the following materials: White ProRoot[®] MTA (Tooth-colored MTA, Densply Tulsa dental, Tulsa OK, USA) Ketac[™] Molar (Ketac[™] Molar Easymix, 3M ESPE AG, Germany) CaSiO_3 and GIC-CS to assess their cytotoxicity by MTT assay ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide). Optical density (OD) was measured by spectrophotometer at 570 nm. The optimum concentration was used in the next experiment at 1 3 5 and 7 day. The cell morphology was investigated by Scanning electron microscope (SEM). Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) was used to analyzed odontogenic markers such as Dentin sialoprotein (DSP) Runt related transcription factor2 (Runx2) Alkaline phosphatase (ALP) and Osteocalcin (OCN). Biomineralization assay was tested by Alizarin red staining. Result : GIC-CS extracts of all concentrations showed no significant difference in cytotoxicity when compared to White ProRoot[®] MTA ($P > 0.05$) and could increase cell proliferation significantly in comparison with White ProRoot[®] MTA ($P \leq 0.001$) at 3 5 and 7 day. It could also expressed several gene markers for odontogenic differentiation no significant when compared to White ProRoot[®] MTA ($P > 0.05$) at all times of test, by expressed gene DSP ALP more increase and gene Runx2 OCN more decrease along time of test, and could induce biomineralization less than White ProRoot[®] MTA in significantly ($P \leq 0.005$).

Conclusion: GIC-CS showed biocompatibility and osteogenic properties to HDPC. It demonstrated great potential to be developed as pulp capping agent in the future.



ปริญญาานิพนธ์

เรื่อง

ความเป็นพิษต่อเซลล์และคุณสมบัติการสร้างเนื้อเยื่อแข็งของกลาสไฮโอไคโนเมอร์
ซีเมนต์ที่มีโมโนแคลเซียมซิลิเกตผสมในเซลล์เนื้อเยื่อในฟันมนุษย์

ของ

ปริญญา ชัยสิงห์เหนือ

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาทันตกรรมคลินิก (วิทยาเข็นโดดอนต์)

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. สมชาย สันติวัฒนกุล)

วันที่.....เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2557

คณะกรรมการควบคุมปริญญาานิพนธ์

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

.....ประธาน

.....ประธาน

(อาจารย์ ทญ. ดร. จารุมา ศักดิ์ดี)

(อาจารย์ ทญ. ดร. วัลลภัทน์ แสนทวีสุข)

.....กรรมการ

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปุณณมา ศิริพันธ์โนน)

(อาจารย์ ทญ. ดร. สมสินี พิมพ์ขาวขำ)

.....กรรมการ

.....กรรมการ

(อาจารย์ ทพ. ดร. ญัฐพล ตั้งจิต)

(อาจารย์ ทญ. ดร. จารุมา ศักดิ์ดี)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปุณณมา ศิริพันธ์โนน)

.....กรรมการ

(อาจารย์ ทพ. ดร. ญัฐพล ตั้งจิต)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญาบัตรฉบับนี้ สามารถเสร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความช่วยเหลือจากคณาจารย์และบุคลากรหลายท่าน ผู้วิจัยขอกราบขอบคุณอาจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร. จารุมา ศักดิ์ดี ประธานควบคุมปริญญาบัตร สำหรับคำแนะนำและชี้แนะแนวทางในการทำปริญญาบัตร

ขอกราบขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ปุณณมา ศิริพันธ์โนน ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความอนุเคราะห์สารโมโนแคลเซียม ซิลิเกตใช้ในงานวิจัย ตลอดจนข้อแนะนำในการเขียนปริญญาบัตร

ขอกราบขอบคุณอาจารย์ ทันตแพทย์ ดร. ณัฐพล ตั้งจิตร ภาควิชาทันตกรรมจัดฟัน คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความอนุเคราะห์เซลล์เนื้อเยื่อในฟันมนุษย์และเนื้อเยื่อเพื่อสถานที่ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณนางสาว ราชพร สีจันทร์ และนางสาว สุภาพร มาลา ศูนย์วิเคราะห์และวิจัยเนื้อเยื่อเซลล์และอณูชีววิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความช่วยเหลือ ตลอดจนคำแนะนำด้านเทคนิคต่างๆ ในการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อ

ท้ายที่สุด ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่คอยเป็นกำลังใจและสนับสนุนจนทำให้สามารถสำเร็จการศึกษาในครั้งนี้

ปริญญา ชัยสิงห์เหนือ

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง.....	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	5
ความสำคัญของการวิจัย.....	5
ขอบเขตของการวิจัย.....	6
คำถามของการวิจัย.....	6
สมมุติฐานการวิจัย.....	6
กรอบแนวคิดในการวิจัย.....	7
นิยามศัพท์เฉพาะ.....	7
2 การทบทวนวรรณกรรม.....	8
มินเนรัลไทรออกไซด์แอกริเกต.....	8
โมโนแคลเซียมซิลิเกต.....	12
กลาสไฟลด์อัลซีโนเอตหรือกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์.....	13
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	16
การเตรียมเซลล์ที่ใช้ในการทดสอบ.....	16
การเตรียมสารที่ใช้ในการทดสอบ.....	18
การทดสอบวัดความเป็นพิษต่อเซลล์.....	22
การทดสอบวัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์.....	23
ปฏิกิริยาถูกโซรีเวอร์สทรานสคริปเตสโพลิเมอเรส.....	24
การประเมินการสะสมของแร่ธาตุ.....	25
การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด.....	26
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	28

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 ผลการวิจัยและการวิเคราะห์ข้อมูล.....	29
การทดสอบวัดความเป็นพิษต่อเซลล์.....	29
การทดสอบวัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์.....	35
ปฏิกิริยาถูกใช้รีเวอร์สทรานสคริปเตสโพลีเมอเรส.....	39
การประเมินการสะสมของแร่ธาตุ.....	44
การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด.....	47
5 สรุปและอภิปรายผลการวิจัย.....	54
บรรณานุกรม.....	65
ภาคผนวก	78
ภาคผนวก ก.....	79
ภาคผนวก ข.....	81
ภาคผนวก ค.....	83
ภาคผนวก ง.....	85
ภาคผนวก จ.....	98
ภาคผนวก ฉ.....	109
ภาคผนวก ช.....	146
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	150

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 ลำดับยีนของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาแอมพลิฟิเคชันซีดีเอ็นเอของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันมนุษย์.....	25
2 ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์จากการทดสอบวัดความเป็นพิษต่อเซลล์.....	29
3 ค่าระดับความทึบแสงจากการทดสอบวัดความเป็นพิษต่อเซลล์.....	30
4 ค่าระดับความทึบแสงจากการทดสอบวัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์.....	36
5 การแสดงออกของยีน DSP จากการกระตุ้นของสารสกัดที่ใช้ทดสอบ.....	39
6 การแสดงออกของยีน Runx2 จากการกระตุ้นของสารสกัดที่ใช้ทดสอบ.....	40
7 การแสดงออกของยีน ALP จากการกระตุ้นของสารสกัดที่ใช้ทดสอบ.....	42
8 การแสดงออกของยีน OCN จากการกระตุ้นของสารสกัดที่ใช้ทดสอบ.....	43
9 ค่าระดับความทึบแสงจากการทดสอบวัดการสะสมของแร่ธาตุ.....	46

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 ขวดพลาสติกเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 ตารางเซนติเมตร.....	17
2 ตู้บัพที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในความชื้นสัมพัทธ์บรรยากาศ ของคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 และ อากาศ ร้อยละ 100.....	17
3 สารตั้งต้นที่ใช้ในการทดสอบในรูปแบบผง.....	18
4 ผลิตภัณฑ์ทางการค้าที่ใช้ในการทดสอบ.....	18
5 เครื่องชั่งสารทดสอบมาตรฐาน	19
6 การทำให้สารปลอดเชื้อภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต เป็นระยะเวลาหนึ่งคืน	19
7 สารสกัดภายหลังทำการแช่สารทดสอบในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM free serum เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง.....	21
8 แผนภูมิสรุปการทดสอบในงานวิจัย.....	21
9 กล้องจุลทรรศน์ดูความเปลี่ยนแปลงเฟส.....	23
10 การนำชิ้นตัวอย่างไปผ่านกระบวนการทำให้แห้ง.....	27
11 การนำชิ้นตัวอย่างไปผ่านขั้นตอนการเคลือบทอง.....	27
12 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด.....	28
13 การเปรียบเทียบค่าระดับความทึบแสงจากการทดสอบวัดความเป็นพิษต่อเซลล์.....	31
14 ลักษณะรูปร่างและการกระจายตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดูความเปลี่ยนแปลงเฟส (40x) เมื่อกระตุ้นด้วยสารสกัดแต่ละชนิด ที่ระดับความเข้มข้นสูงสุดของการทดสอบ.....	32
15 ลักษณะรูปร่างและการกระจายตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดูความเปลี่ยนแปลงเฟส (40x) เมื่อกระตุ้นด้วยสารสกัดแต่ละชนิด ที่ระดับความเข้มข้นเจือจางอัตราส่วน 1:1.....	33
16 ลักษณะรูปร่างและการกระจายตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดูความเปลี่ยนแปลงเฟส (40x) เมื่อกระตุ้นด้วยสารสกัดในกลุ่มของ GIC-CS ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน.....	34
17 สารสกัดเมื่อทำการเจือจางในอัตราส่วน 1:1 จากความเข้มข้นสูงสุด ของการทดสอบ.....	35

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
18 การเปรียบเทียบค่าระดับความทึบแสงจากการทดสอบวัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์.....	37
19 ลักษณะรูปร่างและการกระจายตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดูความเปลี่ยนแปลงต่างเฟส (40x) เมื่อกระตุ้นด้วยสารสกัดทดสอบเจือจาง ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ที่ระยะเวลา 1 3 5 และ 7 วัน.....	38
20 การแสดงออกของยีน DSP จากการกระตุ้นของสารสกัดที่ใช้ทดสอบ.....	40
21 การแสดงออกของยีน Runx2 จากการกระตุ้นของสารสกัดที่ใช้ทดสอบ.....	41
22 การแสดงออกของยีน ALP จากการกระตุ้นของสารสกัดที่ใช้ทดสอบ.....	42
23 การแสดงออกของยีน OCN จากการกระตุ้นของสารสกัดที่ใช้ทดสอบ.....	44
24 ลักษณะการย้อมติดสีอะลิซาริน เรด เนื่องมาจากการสร้างแคลเซียมจากการ กระตุ้นด้วยสารสกัดชนิดต่างๆในช่วงระยะเวลา 28 วันภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดูความเปลี่ยนแปลงต่างเฟส (200x).....	45
25 ค่าระดับความทึบแสงจากการทดสอบวัดการสะสมของแร่ธาตุ.....	46
26 ลักษณะการกระจายตัวของเซลล์ภายหลังกระตุ้นด้วยสารสกัดที่ใช้ทดสอบ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (30x).....	48
27 ลักษณะการกระจายตัวของเซลล์ภายหลังกระตุ้นด้วยสารสกัดกลุ่ม White ProRoot [®] MTA ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (1000x).....	49
28 ลักษณะการกระจายตัวของเซลล์ภายหลังกระตุ้นด้วยสารสกัดกลุ่ม GIC-CS ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (1000x).....	50
29 ลักษณะการกระจายตัวของเซลล์ภายหลังกระตุ้นด้วยสารสกัดกลุ่ม CaSiO ₃ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (1000x).....	51
30 ลักษณะการกระจายตัวของเซลล์ภายหลังกระตุ้นด้วยสารสกัดกลุ่ม Ketac [™] Molar ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (1000x).....	52
31 ลักษณะการกระจายตัวของเซลล์ภายหลังกระตุ้นด้วยสารสกัดกลุ่ม กลุ่มควบคุม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (1000x).....	53

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

ในสภาวะที่มีภัยอันตรายต่อเนื้อเยื่อในฟัน (Pulp tissue) จากสาเหตุต่างๆ ไม่ว่าจะเป็น รอยผุ ฟันแตก ฟันกระแทก เป็นต้น ย่อมก่อให้เกิดสภาวะการอักเสบเนื้อเยื่อในฟัน ซึ่งมีการรักษาหลายรูปแบบขึ้นกับสภาวะของเนื้อเยื่อในฟันในขณะนั้น เช่น ในฟันแท้ปลายรากไม่สมบูรณ์ (Immature permanent tooth) นิยมทำการรักษาด้วยกระบวนการรักษาเนื้อเยื่อในฟันที่มีชีวิต (Vital pulp therapy) ซึ่งมีการรักษาหลายรูปแบบ ได้แก่ การปิดแผลเนื้อเยื่อในโดยไม่สัมผัสกับเนื้อเยื่อ (Indirect pulp capping) การปิดแผลเนื้อเยื่อในโดยสัมผัสกับเนื้อเยื่อ (Direct pulp capping) การตัดเนื้อเยื่อในส่วนตัวฟัน (Pulpotomy) การกระตุ้นปลายรากฟัน (Apexogenesis) ซึ่งล้วนแต่มีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะให้เกิดการหายกลับมาเป็นปกติของเนื้อเยื่อในฟันและมีการพัฒนาต่อของรากฟัน

สำหรับการปิดแผลเนื้อเยื่อในโดยสัมผัสกับเนื้อเยื่อ เป็นวิธีหนึ่งในการรักษาด้านวิทยาเอ็นโดดอนต์ เพื่อคงความมีชีวิตของเนื้อเยื่อในฟัน ซึ่งประกอบด้วย ขั้นตอนการกำจัดสิ่งระคายเคือง ควบคุมสภาวะการติดเชื้อ และใช้วัสดุที่เหมาะสมกับเนื้อเยื่อในฟัน โดยมีจุดมุ่งหมายที่สำคัญ คือ การเหนี่ยวนำให้มีความสามารถในการสร้างเนื้อฟัน (Dentinogenic potential) ของเซลล์เนื้อเยื่อในฟัน (Pulp cells)¹⁻³ โดยกระบวนการหายของเนื้อเยื่อในฟันจะประกอบด้วย การกระตุ้นเซลล์สร้างเนื้อฟัน (Odontoblast cells) และการสร้างสะพานเนื้อฟัน (Dentinal bridge formation) ในบริเวณจุดที่เกิดการเผยผิงเนื้อเยื่อในฟัน (Exposed pulp)¹ และรวมทั้งเซลล์มีเซนไคมัลที่ยังไม่เกิดการแปรสภาพ (Undifferentiated mesenchymal cells) สามารถที่จะทดแทนส่วนของเซลล์สร้างเนื้อฟันที่ตายไปได้⁴

กระบวนการหายของการรักษาในแต่ละรูปแบบ จะมีลักษณะปรากฏในลักษณะของการสร้างเนื้อฟันตติยภูมิ (Tertiary dentin) หากมีสิ่งกระตุ้นในระดับอ่อน มีการดำเนินของโรคอย่างช้าๆ การตอบสนองเกิดในลักษณะการสร้างเนื้อฟันตติยภูมิชนิดรีแอคชั่นนารี (Reactionary dentin) จากเซลล์สร้างเนื้อฟันปฐมภูมิ (Primary odontoblast cells)⁴ สำหรับการกระตุ้นในระดับที่รุนแรงมากขึ้น มีการดำเนินของโรคอย่างรวดเร็ว จะเกิดการสร้างเนื้อฟันตติยภูมิชนิดรีแพเรทีฟ (Reparative dentin) จากเซลล์สร้างเนื้อฟันทดแทน (Replacement odontoblast cells) โดยกระบวนการแปรสภาพ (Differentiation) มาจากเซลล์มีเซนไคมัลที่ยังไม่เกิดการแปรสภาพ ซึ่งจะเคลื่อนมาจากชั้นก่อนชั้นเซลล์สร้างเนื้อฟัน (Preodontoblast layer) หรือชั้นแกนกลางเนื้อเยื่อในฟัน (Pulp proper) เพื่อทดแทนเซลล์สร้างเนื้อฟันปฐมภูมิที่ถูกทำลาย^{5,6}

การปิดแผลเนื้อเยื่อในโดยสัมผัสกับเนื้อเยื่อ จะพบว่าเกิดปฏิกิริยาระหว่างส่วนของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันและสารที่ใช้ในการปิดแผลเนื้อเยื่อใน ซึ่งจะมีผลต่อกระบวนการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน (Proliferation) และกระบวนการแปรสภาพของเซลล์เนื้อเยื่อในฟัน⁷ ดังนั้นสารในอุดมคติที่ใช้ในการปิดแผลเนื้อเยื่อใน ควรมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Biocompatibility) กับเนื้อเยื่อได้อย่างดี⁸

เมื่อเกิดการเผยผิงเนื้อเยื่อในฟันจากการกระตุ้นทั้งทางกายภาพและพยาธิสภาพ จนเป็นสาเหตุที่ทำให้เซลล์สร้างเนื้อฟันปฐมภูมิถูกทำลายและตายในที่สุด ส่งผลให้เซลล์มีเซนไคมัลที่ยังไม่เกิดการแปรสภาพ ซึ่งมีสมบัติเป็นเซลล์ตั้งต้น (Progenitor cells) หรือเซลล์ต้นกำเนิดที่สร้างภายหลังเกิด (Postnatal stem cells) ที่พบในเนื้อเยื่อในฟัน ถูกกระตุ้นเข้าสู่บริเวณที่ได้รับภัยอันตราย และเกิดกระบวนการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและแปรสภาพไปเป็นเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟัน (Odontoblast like cells) หรือเซลล์สร้างเนื้อฟันทดแทน เพื่อทำหน้าที่สร้างเมทริกซ์เนื้อฟันรีแพเรทีฟ (Reparative dentin matrixs)^{10,11} และเหนี่ยวนำการสะสมแร่ธาตุในเนื้อฟัน (Dentin remineralization)

โดยทั่วไปเซลล์สร้างเนื้อฟันจะทำหน้าที่สังเคราะห์และหลั่งโปรตีนหลายชนิดสู่เมทริกซ์ภายนอกเซลล์ของเนื้อฟัน (Extracellular dentin matrixs) โปรตีนที่พบบ่อยจะอยู่ในกลุ่มเดนทินไฮอะโลโปรตีน (Dentin sialoprotein, DSP) และอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (Alkaline phosphatase, ALP) ซึ่งเป็นส่วนของโปรตีนที่ไม่มีคอลลาเจน มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการสะสมแร่ธาตุในเนื้อฟันซ่อมแซม¹² นอกจากนี้ยังพบออสติโอแคลซิน (Osteocalcin , OCN) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ (Specific marker) มีบทบาทสำคัญต่อการสร้างเนื้อเยื่อแข็ง เช่น กระดูก ซึ่งสามารถถูกสังเคราะห์ได้เฉพาะในเซลล์สร้างเนื้อฟัน เซลล์สร้างกระดูก (Osteoblast cells) เซลล์สร้างเคลือบรากฟัน (Cementoblast cells)¹³ ดังนั้นทั้ง DSP ALP OCN พิจารณาว่าเป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญสำหรับลักษณะที่แสดงออกของเซลล์สร้างเนื้อฟัน (Odontoblast phenotype)

มีการศึกษาของ Paranjpe และคณะในปีค.ศ. 2007¹⁴ ที่แสดงให้เห็นถึงเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในฟัน (Dental Pulp Stem Cells, DPSC) สามารถที่จะหลั่งสารที่มีฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเส้นเลือด (Angiogenic factor) เช่น วาสคิวลาร์เอ็นโดเทเลียลโกรทแฟคเตอร์ (Vascular endothelial growth factor, VEGF) และไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ทู (Fibroblast growth factor-2, FGF-2) ซึ่งสารที่มีฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเส้นเลือดเหล่านี้จะมีบทบาทสำคัญในกระบวนการพัฒนาของเนื้อเยื่อ การเคลื่อนของเซลล์ กระบวนการอักเสบและกระบวนการหายของแผล¹⁵ โดย VEGF จะมีความสำคัญต่อการทำงานของเซลล์ ถ้ามีระดับ VEGF สูงจะเกิดการหายของเนื้อเยื่อได้เร็ว แต่ในทางตรงกันข้ามถ้ามีการขาดหรือลดระดับของ VEGF จะทำให้เกิดการหายของเนื้อเยื่อได้ช้าลง¹⁴

ซึ่งสามารถกล่าวได้ว่าการเพิ่มระดับยีนบางตัวที่เป็นส่วนของโปรตีนที่ไม่มีคอลลาเจน รวมถึงการเพิ่มการผลิตสารที่มีฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเส้นเลือด มีความสัมพันธ์กับการหายของเนื้อเยื่อในฟัน และการสร้างสะพานเนื้อฟัน ภายหลังจากปิดแผลเนื้อเยื่อในโดยสัมพันธ์กับเนื้อเยื่อ¹⁶

ในส่วนของรันรีเลทเทดทรานสคริปชันแฟคเตอร์ทู (Runt-related transcription factor2, Runx2) ซึ่งเป็นทรานสคริปชันแฟคเตอร์ที่มีบทบาทสำคัญสำหรับการพัฒนาของฟัน รวมถึงกระบวนการแปรสภาพของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันเป็นเซลล์สร้างเนื้อฟัน^{17,18} โดยการศึกษาของ Zanini และคณะในปีค.ศ. 2012¹⁹ พบว่ามีการแสดงออกของยีนมากในช่วงของการเป็นเซลล์ก่อนสร้างเนื้อฟันและเซลล์สร้างเนื้อฟันที่ไม่สมบูรณ์ แต่จะพบปริมาณที่ลดลงระหว่างช่วงของการสิ้นสุดกระบวนการแปรสภาพ

ในปัจจุบันแคลเซียมไฮดรอกไซด์ (Calcium hydroxide, Ca(OH)₂) ยังเป็นสารที่นิยมนำมาใช้ในการปิดแผลเนื้อเยื่อใน²⁰ และใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบความเข้ากันได้ทางชีวภาพของสารที่จะนำมาใช้ในการปิดแผลเนื้อเยื่อใน โดยกลไกที่แคลเซียมไฮดรอกไซด์กระตุ้นการสร้างเนื้อฟันซ่อมแซม ยังไม่เป็นที่แน่ชัด คาดว่าเป็นผลจากค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่สูงของแคลเซียมไฮดรอกไซด์ มีความสามารถในการฆ่าเชื้อ รวมถึงเพิ่มการสะสมแคลเซียมในเนื้อเยื่อของเซลล์เนื้อเยื่อในฟัน โดยจะเกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างเนื้อเยื่อแข็ง เช่น ALP และแคลเซียมไอออน (Calcium ion, Ca²⁺) ที่ปลดปล่อยจากแคลเซียมไฮดรอกไซด์¹⁶

อย่างไรก็ดี ถึงแม้ว่าจะมีการใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์มาเป็นระยะเวลายาวนาน แต่พบว่าแคลเซียมไฮดรอกไซด์มีข้อด้อยหลายประการที่ส่งผลทำให้เกิดความล้มเหลว เช่น ทำให้เกิดลักษณะของรูพรุนในสะพานเนื้อฟัน (Tunnel defect) มีการยึดติดที่ไม่ดีของแคลเซียมไฮดรอกไซด์ต่อเนื้อฟัน และไม่สามารถทำให้เกิดการผนึกปิดที่แนบสนิทต่อการป้องกันการรั่วซึมในระยะเวลายาวได้²¹ นอกจากนี้ยังพบว่าแคลเซียมไฮดรอกไซด์จะทำลายชั้นภายใต้เนื้อเยื่อในฟัน ทำให้เกิดลักษณะของชั้นเนื้อตายจากการจับเป็นก้อน (Coagulation necrosis) เนื่องจากสภาวะความเป็นด่างสูง^{1,22} ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในลักษณะของการทำลาย เช่น ภาวะการอักเสบเรื้อรัง และการเกิดเนื้อเยื่อแข็งในเนื้อเยื่อที่มีภาวะเสื่อมสลาย (Dystrophic calcification)²³ รวมถึงมีการแทรกซึมของเส้นเลือดทำให้เกิดการรั่วซึมได้สูงขึ้น

ในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา สารที่มีองค์ประกอบของแคลเซียมซิลิเกต (Calcium silicate-based) เป็นที่ได้รับความสนใจในงานทางด้านทันตกรรมและทางทันตกรรม เนื่องจากมีสมบัติที่สามารถก่อตัวได้ในสภาวะที่มีเลือดหรือของเหลวทางชีวภาพ (Biological fluids) มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ รวมถึงมีสมบัติชีวกำมันต์ (Bioactive) เกิดการสร้างชั้นผลึกอะพาไทต์ (Apatite layer) ที่ส่งเสริมการสร้างเนื้อเยื่อใหม่และเพิ่มความสมบูรณ์ (Integration) ของเนื้อเยื่อกระดูก²⁴ ดังนั้นจึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้การปิดแผลเนื้อเยื่อในโดยสัมผัสกับเนื้อเยื่อ ซึ่งสภาวะแวดล้อมในบริเวณที่เกิดภัยอันตรายมักจะมีการออกของเลือด ที่ขัดขวางการยึดติดของสารที่ใช้ในการปิดแผลเนื้อเยื่อใน โดยมินอรัลไตรออกไซด์แอกกรีเกตหรือเอ็มทีเอ (Mineral Trioxide Aggregate, MTA) เป็นสารตัวแรกที่ได้ถูกนำมาใช้^{25,26} แต่พบว่ามีระยะเวลาการก่อตัวที่นาน ทำให้มีโอกาสถูกชะล้างจากความชื้นในเนื้อเยื่อ ซึ่งจะนำไปสู่ความล้มเหลวของการหายของเนื้อเยื่อในฟัน ใช้เวลาในการรักษาหลายครั้ง รวมถึงมีราคาแพง^{27,28}

โมโนแคลเซียมซิลิเกต (Monocalcium silicate / Wallastonite, CaSiO_3) เป็นอีกชนิดของสารในกลุ่มที่มีองค์ประกอบของแคลเซียมซิลิเกต พบว่ามีความสามารถในการสร้างผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ (Hydroxyapatite, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) ได้อย่างรวดเร็วภายหลังจากแช่ในสารละลายที่จำลองสภาวะของเหลวในร่างกาย (Simulated body fluid, SBF) ภายในระยะเวลา 2 ชั่วโมง²⁹ แต่พบว่ามีข้อด้อยที่สำคัญคือเป็นสารที่มีความเปราะ³⁰

กลาสโพลีอัลคีนเอต (Glass polyalkenoate) หรือกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ (Glass ionomer cement, GIC) มีสมบัติที่สามารถยึดติดกับเคลือบฟันและเนื้อฟันด้วยพันธะเคมี สามารถปลดปล่อยฟลูออไรด์ (Fluoride)^{31,32} โดย Ketac™ Molar ซึ่งเป็น GIC ดั้งเดิม (Conventional GIC) ที่มีความหนืดสูง (Highly viscous) พบว่าจะมีค่าความทนแรงอัด (Compressive strength) ที่สูงและค่าการละลายตัว (Solubility) ที่ต่ำเมื่อเทียบกับกลุ่ม Conventional GIC ชนิดอื่น^{33,34} นอกจากนี้ยังพบว่าจากความสามารถของ GIC ที่สามารถปลดปล่อยฟลูออไรด์ (Fluoride) ได้นั้น ทำให้สามารถที่จะสร้างผลึกฟลูออโรอะพาไทต์ (Fluoroapatite, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OHF}$) ได้³⁵

มีการศึกษาถึงผลของสารที่มีสมบัติชีวกำมันต์เมื่อเติมลงใน GIC พบว่าสามารถมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ³⁶ เกิดการสร้างผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์บนผิวเนื้อฟัน³⁷ รวมทั้งส่งเสริมการยึดติดและการเจริญเติบโตของเซลล์สร้างกระดูก³⁸ แต่อย่างไรก็ตามพบว่ายังไม่มีการศึกษาผลของการรวมสารดังกล่าวทั้ง 2 ชนิด ที่มีต่อเซลล์เนื้อเยื่อในฟัน

ดังนั้นมีความเป็นไปได้ที่จะสร้างสารประกอบจากโมโนแคลเซียมซิลิเกตและ Conventional GIC เพื่อที่จะพัฒนานำมาใช้เป็นสารในการปิดแผลเนื้อเยื่อในทดแทน MTA ซึ่งมีระยะเวลาการก่อตัวค่อนข้างนาน ราคาแพง โดยสารดังกล่าวที่พัฒนาขึ้นมาจะต้องมีความสามารถในการกระตุ้นการสร้างสะพานเนื้อฟันในบริเวณที่เกิดการผุพังเนื้อเยื่อในฟันได้ไม่ต่างจาก MTA รวมถึงมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเนื้อเยื่อในฟัน ซึ่งมีความจำเป็นที่จะต้องทำการทดสอบก่อนนำไปใช้งาน โดยจะต้องมีการทดสอบทั้งการเพาะเลี้ยงเซลล์ (Culture test) การทดสอบโดยฝังลงในเนื้อเยื่อสัตว์ทดลอง (Implantation test) การทดสอบในมนุษย์ (Usage test)³⁹

โดยจากผลการศึกษาที่นำสารประกอบโมโนแคลเซียมซิลิเกตมาผสมรวมกับ Conventional GIC ชนิด Ketac™ Molar เพื่อขึ้นรูปในลักษณะของซีเมนต์ ผลพบว่าสามารถสร้างผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์เมื่อแช่ในสารละลาย SBF เป็นระยะเวลา 7 วัน⁴⁰ มีระยะเวลาการก่อตัวเร็ว ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เป็นกรดอ่อน ค่าความทนแรงอัดที่มากกว่า White ProRoot® MTA ในช่วงระยะเวลา 7 วัน⁴¹ รวมถึงไม่เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์เอ็นยัดปริทันต์ (Periodontal ligament cells)⁴⁰ แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการศึกษาถึงความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อในฟัน

ความมุ่งหมายของการวิจัย

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ เพื่อเปรียบเทียบถึงสมบัติของสารประกอบที่เตรียมขึ้นจากโมโนแคลเซียมซิลิเกตและ GIC กับ White ProRoot® MTA ในด้านต่างๆ ได้แก่

1. ความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเนื้อเยื่อในฟันจากการทดสอบความเป็นพิษของสารต่อเซลล์และการมีชีวิตอยู่รอดของเซลล์
2. สมบัติในการสร้างเนื้อเยื่อแข็ง จากการวิเคราะห์ตัวบ่งชี้ของการสร้างเนื้อเยื่อแข็งได้แก่ โปรตีนที่ไม่มีคอลลาเจน และ Runx2 และวัดการสะสมของแร่ธาตุจากการย้อมติดสีอะลิซาริน เรด (Alizarin red, AR)

ความสำคัญของการวิจัย

เพื่อใช้เป็นแนวทางพัฒนาสารที่จะใช้ในการปิดแผลเนื้อเยื่อในโดยสัมผัสกับเนื้อเยื่อในกระบวนการรักษาเนื้อเยื่อในฟันที่มีชีวิต

ขอบเขตของการวิจัย

ในการศึกษาวิจัยนี้เป็นการศึกษาวิจัยพื้นฐาน (Basic research) ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อในฟันมนุษย์ (Human Dental Pulp Cells, HDPC) เพื่อการทดสอบวัดความเป็นพิษต่อเซลล์ วัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ และวัดการสะสมของแร่ธาตุในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์ เพื่อสกัดอาร์เอ็นเอ (RNA) นำไปทำการทดสอบตัวบ่งชี้ของการสร้างเนื้อเยื่อแข็งในห้องปฏิบัติการอณูชีววิทยา (Molecular biology laboratory)

คำถามของการวิจัย

ความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity) และสมบัติการสร้างเนื้อเยื่อแข็ง (Osteogenic properties) ของกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ที่มีสารประกอบโมโนแคลเซียมซิลิเกต (Glass ionomer cement containing monocalcium silicate compound, GIC-CS) ในเซลล์เนื้อเยื่อในฟันมนุษย์ แตกต่างจากการใช้ White ProRoot[®] MTA หรือไม่

สมมุติฐานการวิจัย

1. **สมมุติฐานว่าง (H_0):** ความเป็นพิษต่อเซลล์ของ GIC-CS ในเซลล์เนื้อเยื่อในฟันมนุษย์ มีผลลัพธ์ที่ไม่แตกต่างจากการใช้ White ProRoot[®] MTA

สมมุติฐานแย้ง (H_a): ความเป็นพิษต่อเซลล์ของ GIC-CS ในเซลล์เนื้อเยื่อในฟันมนุษย์ มีผลลัพธ์ที่แตกต่างจากการใช้ White ProRoot[®] MTA

2. **สมมุติฐานว่าง (H_0):** ความสามารถในการสร้างเนื้อเยื่อแข็งจากการกระตุ้นของ GIC-CS ในเซลล์เนื้อเยื่อในฟันมนุษย์ มีผลลัพธ์ที่ไม่แตกต่างจากการใช้ White ProRoot[®] MTA

สมมุติฐานแย้ง (H_a): ความสามารถในการสร้างเนื้อเยื่อแข็งจากการกระตุ้นของ GIC-CS ในเซลล์เนื้อเยื่อในฟันมนุษย์ มีผลลัพธ์ที่แตกต่างจากการใช้ White ProRoot[®] MTA

กรอบแนวคิดในการวิจัย

ในกระบวนการปิดแผลเนื้อเยื่อใน สารที่ใช้ในอุดมคติจะต้องมีสมบัติ คือ

1. ไม่เป็นพิษต่อเซลล์และมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพได้กับเซลล์เนื้อเยื่อในฟัน
 - โดยเซลล์มีชีวิตอยู่รอดและเกิดการเพิ่มจำนวน
2. สามารถกระตุ้นเซลล์เนื้อเยื่อในฟันให้เกิดกระบวนการแปรสภาพไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อฟัน
 - ทำหน้าที่สร้างเนื้อเยื่อแข็ง
 - จากการแสดงออกของยีนที่เป็นตัวบ่งชี้สำหรับการสร้างเนื้อเยื่อแข็ง และเกิดการสะสมของแร่ธาตุ

นิยามศัพท์เฉพาะ

- กระบวนการรักษาเนื้อเยื่อในฟันที่มีชีวิต: Vital pulp therapy
- การปิดแผลเนื้อเยื่อใน: Pulp capping
- การปิดแผลเนื้อเยื่อในโดยไม่สัมผัสกับเนื้อเยื่อ: Indirect pulp capping
- การปิดแผลเนื้อเยื่อในโดยสัมผัสกับเนื้อเยื่อ: Direct pulp capping
- เซลล์เนื้อเยื่อในฟันมนุษย์: Human Dental Pulp Cells, HDPC
- เซลล์สร้างเนื้อฟัน: Odontoblast cells
- การสร้างสะพานเนื้อฟัน: Dentinal bridge formation
- ความเข้ากันได้ทางชีวภาพ : Biocompatibility
- ความเป็นพิษต่อเซลล์: Cytotoxicity
- การทดสอบวัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์: Cell proliferation assay
- สมบัติการสร้างเนื้อเยื่อแข็ง: Osteogenic properties
- มินิอรัลไตรออกไซด์แอกกรีเกต, เอ็มทีเอ: Mineral Trioxide Aggregate, MTA
- โมโนแคลเซียมซิลิเกต: Monocalcium silicate, CaSiO_3
- กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์: Glass ionomer cement, GIC
- กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ที่มีสารประกอบโมโนแคลเซียมซิลิเกต: Glass ionomer cement containing monocalcium silicate compound, GIC-CS



บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรม

ในงานด้านวิทยาเข็นโอดอนต์ ปัจจุบันแนวทางการรักษาจะมุ่งเน้นคงความมีชีวิตของเนื้อเยื่อในฟัน โดยในกระบวนการปิดแผลเนื้อเยื่อใน สารที่ใช้ในอุดมคติจะต้องไม่เป็นพิษและมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์เนื้อเยื่อในฟัน โดยเฉพาะในฟันแท้ปลายรากไม่สมบูรณ์ต้องสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อแข็งปกป้องเนื้อเยื่อในฟัน เพื่อทดแทนเนื้อฟันส่วนที่ถูกทำลาย ตลอดจนสามารถป้องกันการรื้อซึม มีความแข็งแรงภายใต้แรงบดเคี้ยวได้อย่างเหมาะสม ทนต่อสภาวะขึ้น มีระยะเวลาการก่อตัวเร็ว ไม่ทำให้ฟันเปลี่ยนสี ใช้งานง่าย ราคาถูก ซึ่งจากข้อดีของสารที่ใช้ปิดแผลเนื้อเยื่อในชนิดต่างๆในอดีต รวมถึงแคลเซียมไฮดรอกไซด์ แนวทางการวิจัยในปัจจุบันจึงได้มีการศึกษาที่จะพัฒนานำ MTA มาใช้ในการปิดแผลเนื้อเยื่อใน

มินอรัลไตรออกไซด์แอกกรีเกต, เอ็มทีเอ (Mineral Trioxide Aggregate, MTA)

MTA (Densply, Tulsa dental, Tulsa OK, USA) ได้ถูกนำมาใช้ครั้งแรกในปีค.ศ.1993 สำหรับเป็นวัสดุอุดย่นปลายรากฟัน²⁵ หรือเป็นวัสดุผนึกปิดในบริเวณที่เกิดรอยทะลุลงมารากฟัน (Furcation perforation)²⁶ ซึ่งต่อมาในภายหลังได้ถูกพัฒนานำมาใช้สำหรับเป็นสารในการปิดแผลเนื้อเยื่อใน⁴² โดยจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า การรักษาในบริเวณที่เกิดการเผยผิงเนื้อเยื่อในฟันโดยการปิดแผลเนื้อเยื่อในด้วย MTA พบว่าทำให้เกิดผลดีหลายประการเมื่อเทียบกับการใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์ เช่น สามารถเกิดสะพานเนื้อฟันได้มากกว่า โดยสะพานเนื้อฟันที่สร้างขึ้นจะมีลักษณะที่หนาตัวและเกิดความต่อเนื่อง⁴³ และจะทำให้เกิดสภาวะอักเสบของเนื้อเยื่อในฟันน้อยกว่า⁴³⁻⁴⁵ มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเนื้อเยื่อ ซึ่งจะทำให้เซลล์สามารถคงความมีชีวิตและมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน เช่น มีการศึกษาพบว่า MTA สามารถส่งเสริมกระบวนการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนในเซลล์เนื้อเยื่อในฟัน (OD-21) เซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟันของหนู (MDPC-23) และเซลล์เนื้อเยื่อในฟันของหนู^{46,47} ซึ่งพบว่า MTA มีความสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเนื้อฟัน (Dentinogenesis)⁴⁸ Dominguez และคณะในปีค.ศ. 2003⁴⁹ พบว่ามีการตอบสนองที่ดีของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันต่อ MTA มากกว่าการใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์ หรือสารยึดติดเนื้อฟันจากการใช้กรดกัด (Acid-etching dentin bonding) โดยจะสังเกตพบเนื้อเยื่อแข็งที่สร้างขึ้นมาใหม่ในบริเวณที่สัมผัสกับ MTA ถึงแม้จะมีบางการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่า MTA เมื่อผสมเสร็จใหม่ๆ (Freshly mixed MTA) จะมีความเป็นพิษต่อเซลล์^{50,51} แต่อย่างไรก็ตามความเป็นพิษที่เกิดขึ้นก็ยังพบได้น้อยกว่าที่พบจากแคลเซียมไฮดรอกไซด์

โดยคุณภาพของเนื้อฟันตติยภูมิและสะพานเนื้อฟันที่สร้างขึ้นภายใต้ MTA จะมีลักษณะคล้ายเนื้อฟันปกติ⁴⁸

MTA จะมีส่วนประกอบที่คล้ายพอร์ตแลนด์ซีเมนต์ (Portland cement) ซึ่งมีส่วนประกอบหลักได้แก่ ไตรแคลเซียมซิลิเกต (Tricalcium silicate / Alite, $3\text{CaO}\cdot\text{SiO}_2$) ไดแคลเซียมซิลิเกต (Dicalcium silicate / Belite, $2\text{CaO}\cdot\text{SiO}_2$) ไตรแคลเซียมอะลูมิเนต (Tricalcium aluminate, $3\text{CaO}\cdot\text{Al}_2\text{O}_3$) เตตระแคลเซียมอะลูมิโนเฟอไรต์ (Tetracalcium aluminoferrite, $4\text{CaO}\cdot\text{Al}_2\text{O}_3\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$)⁵² แตกต่างกันตรงที่ MTA จะมีบิสมัทออกไซด์ (Bismuth oxide, Bi_2O_3) ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่ทำให้ MTA ปรากฏลักษณะทึบจากภาพรังสี (Radiopaque)⁵³ ถึงแม้ว่า MTA และพอร์ตแลนด์ซีเมนต์จะมีสมบัติทางด้านกายภาพ เคมี ชีวภาพ รวมถึงความเข้ากันได้ทางชีวภาพใกล้เคียงกัน⁵⁴ แต่พอร์ตแลนด์ซีเมนต์ไม่สามารถนำมาใช้ทดแทน MTA ได้ เนื่องจาก MTA จะมียิปซัม (Gypsum) ในปริมาณที่น้อยกว่าพอร์ตแลนด์ซีเมนต์ ซึ่งจะช่วยลดระยะเวลาการก่อตัวของซีเมนต์⁵⁵ มีปริมาณของโลหะหนักและอะลูมิเนียม (Aluminum, Al) ค่อนข้างน้อย รวมถึงมีขนาดอนุภาคที่เป็นลักษณะเดียวกันและขนาดเล็กกว่าพอร์ตแลนด์ซีเมนต์

MTA ที่ผลิตเริ่มแรกจะเป็นชนิด Gray MTA ซึ่งเป็นที่รู้จักในชื่อทางการค้าว่า ProRoot[®] MTA [Tulsa Dental Product, Tulsa OK, USA] โดยในปัจจุบันได้มีการพัฒนาผลิต MTA ขึ้นอีกรูปแบบ ในลักษณะที่เรียกว่า White ProRoot[®] MTA [Tooth-colored MTA, Densply Tulsa dental, Tulsa OK, USA]⁵⁶ โดยทั้ง Gray และ White MTA จะมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเนื้อเยื่อที่ใกล้เคียงกัน^{56,57} รวมถึงมีองค์ประกอบที่คล้ายกัน แต่แตกต่างกันที่จะไม่พบเตตระแคลเซียมอะลูมิโนเฟอไรต์ใน White MTA ซึ่งมีเหล็กเป็นส่วนที่ทำให้เกิดสีพบใน Gray MTA⁵⁸

MTA เป็นสารประกอบของอนุภาคที่ชอบน้ำ (Hydrophilic) ขนาดละเอียด จะก่อตัวในสภาวะที่มีความชื้นโดยเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลของน้ำ (Hydration reaction) ซึ่งในสภาวะที่ไม่ได้เกิดปฏิกิริยา MTA จะประกอบด้วย ไตรแคลเซียมซิลิเกต ไดแคลเซียมซิลิเกต และบิสมัทออกไซด์ โดยจะมีระดับของอะลูมิเนตน้อย การใช้งาน MTA จะนำส่วนผสมกับน้ำกลั่น (Distilled water) ภายหลังจากนั้น MTA จะค่อยๆก่อตัวเมื่อสัมผัสกับความชื้นจากสภาวะแวดล้อมในช่องปาก⁵⁹ โดยหลังจากการก่อตัว MTA จะพบได้ทั้งในลักษณะผลึกที่เป็นผลึก (Crystalline phase) และวัฏภาคอสัณฐาน (Amorphous phase)⁵⁸ จากนั้น MTA จะค่อยๆสลายตัวและเกิดการสร้างผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์เกาะตัวบนพื้นผิว MTA และเป็นโครงสร้างของผลึกที่อยู่ระหว่างพื้นผิวของ MTA และเนื้อเยื่อในฟัน⁶⁰ โดยโครงสร้างของผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์จะประกอบด้วย แคลเซียม (Calcium, Ca) ฟอสฟอรัส (Phosphorous, P) และออกซิเจน (Oxygen, O)⁶¹ ซึ่งเป็นโครงสร้างของสารประกอบ

แคลเซียมซิลิเกตไฮเดรต (Calcium silicate hydrate) แคลเซียมไฮดรอกไซด์ โมโนซัลเฟต (Monosulfate) และ เอททริงไท์ (Ettringite) เป็นผลึกที่มีลักษณะพูนในรูปแบบของเจล⁵⁹ ค่าความเป็นกรด-ด่าง pH หลังจากเริ่มผสมจะเท่ากับ 10.2 และเพิ่มเป็น 12.5 ในระยะภายหลัง 3 ชั่วโมง ซึ่งค่าความเป็นกรด-ด่างที่สูงขึ้น เนื่องจากแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่สร้างขึ้นมาจากสารประกอบไตรแคลเซียมซิลิเกต ไดแคลเซียมซิลิเกตทำปฏิกิริยากับน้ำ²² โดยที่ระดับของโมโนซัลเฟตและเอททริงไท์จะมีปริมาณต่ำ เนื่องจากมีปริมาณไตรแคลเซียมอะลูมิเนตน้อยเมื่อเทียบกับพอร์ตแลนด์ซีเมนต์ ซึ่งเมื่อไตรแคลเซียมอะลูมิเนตทำปฏิกิริยากับน้ำในสภาวะที่มียิปซัมจะส่งผลให้เกิดการสร้างเอททริงไท์⁵⁸ โดยผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ รวมถึงสารที่มีแคลเซียมเป็นองค์ประกอบจะมีความสามารถเหนียวและกระตุ้นการสร้างกระดูก^{62,63} ซึ่ง MTA มีสมบัติในการปลดปล่อยอิออนที่มีประจุบวก โดยที่แคลเซียมอิออนจะเป็นตัวหลักที่มีบทบาทสำคัญเมื่อสัมผัสกับของเหลวที่อยู่โดยรอบ⁶¹

อย่างไรก็ดี กลไกที่แท้จริงของการสร้างสะพานเนื้อฟันหลังจากเกิดการเผยผิงเนื้อเยื่อในฟันและการตอบสนองของเนื้อเยื่อในฟันต่อ MTA ยังไม่เป็นที่ทราบชัดเจน⁴² แต่ก็มีการศึกษาที่พบว่าผลของ MTA ต่อเซลล์เนื้อเยื่อในฟัน จะมีกลไกการสร้างเนื้อฟันโดยผ่านกระบวนการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน การเคลื่อนที่ กระบวนการแปรสภาพของเซลล์เนื้อเยื่อในฟัน ที่คล้ายคลึงผลที่เกิดจากแคลเซียมไฮดรอกไซด์⁴⁸ โดยสารประกอบไตรแคลเซียมซิลิเกตซึ่งพบใน MTA สามารถที่จะเหนียวทำให้เกิดการสร้างผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์⁵⁶ ซึ่งใน MTA จะสามารถปลดปล่อยอิออนได้หลายชนิดโดยมีแคลเซียมและซิลิคอน (Silicon, Si) เป็นตัวหลัก โดยพบว่าการสร้างผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์จะเกิดขึ้นเมื่อแคลเซียมอิออนที่ปลดปล่อยออกมาจาก MTA สัมผัสกับของเหลวในเนื้อเยื่อ อย่างไรก็ตามถึงแม้จะมีการศึกษาถึงผลของแคลเซียมอิออนแต่ยังไม่มีการศึกษาใดที่แสดงให้เห็นถึงแหล่งของแคลเซียมอิออนได้⁶¹

จากการศึกษาของ Fridland และ Rosado ในปีค.ศ. 2003⁶⁴ พบว่าแคลเซียมอิออนซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของ MTA โดยจะพบปริมาณมากในช่วงระยะเวลา 3 ชั่วโมงแรกหลังจากเริ่มผสม MTA มีการตั้งสมมุติฐานว่าแคลเซียมอิออนที่ปลดปล่อยออกมาจาก MTA จะเหนียวทำให้เกิดกระบวนการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันมนุษย์ โดยแคลเซียมออกไซด์ (Calcium oxide, CaO) ซึ่งพบใน MTA จะเปลี่ยนเป็นแคลเซียมไฮดรอกไซด์เมื่อสัมผัสกับของเหลวในเนื้อเยื่อ ต่อมาแคลเซียมไฮดรอกไซด์จะแตกตัวเป็นแคลเซียมอิออนและไฮดรอกซิลอิออน (Hydroxyl ion, OH⁻) ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการเพิ่มขึ้นของค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณแคลเซียมอิออน โดยแคลเซียมอิออนอาจจะเคลื่อนผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยกระบวนการดีโพลาไรเซชัน (Depolarization) หรือการกระตุ้นผ่านเมมเบรนบาวนด์แคลเซียมแซแนลเฉพาะ (Membrane-bound specific calcium

channels) โดยอิออนเหล่านี้ อาจจะมีบทบาทสำคัญต่อการสร้างเนื้อฟันซ่อมแซมมากกว่าบทบาทของไฮดรอกซิลอิออน⁶⁵

เช่นเดียวกับการศึกษาของ Rashid และคณะในปีค.ศ. 2003⁶⁶ ที่แสดงให้เห็นถึงบทบาทสำคัญของแคลเซียมอิออนต่อการควบคุมระดับของออสติโอพอนติน (Osteopontin, OPN) และโบนมอร์โฟเจเนติกโปรตีนทู (Bone morphogenetic protein-2, BMP-2) ระหว่างกระบวนการสร้างเนื้อเยื่อแข็ง ซึ่งโบนมอร์โฟเจเนติกโปรตีน (Bone morphogenetic protein, BMP) เป็นสารที่มีฤทธิ์กระตุ้นให้เซลล์มีการเจริญเติบโต (Growth factor) สำหรับการสร้างกระดูก จากการศึกษาของ Nakashima ในปีค.ศ. 1990⁶⁷ ที่ศึกษาถึงผลของ BMP ต่อการสร้างเนื้อฟันซ่อมแซมในฟันสุนัขที่มีการเผยผื่นเนื้อเยื่อในฟัน โดยจะมีบทบาทสำคัญสำหรับการแบ่งตัวของเซลล์มีเซนไคม์ที่ยังไม่เกิดการแปรสภาพ และอาจเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการแปรสภาพของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อฟัน รวมถึงการศึกษาของ Peng และคณะในปีค.ศ. 2011⁶⁸ ที่มีสมมุติฐานว่าซิลิคอนอิออน (Silicon ion) ที่ปลดปล่อยออกมาจากสารประกอบไตรแคลเซียมซิลิเกต สามารถที่จะกระตุ้นเซลล์เนื้อเยื่อในฟันมนุษย์ ให้เกิดกระบวนการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและกระบวนการแปรสภาพไปเป็นเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟัน จากการวัดปริมาณตัวบ่งชี้ เช่น ALP OCN คอลลาเจนชนิดที่หนึ่ง (Collagen type I, Col I) เดนตินไซลอปออสฟิโพรตีน (Dentin sialophosphoprotein, DSPP) เดนตินเมทริกซ์โปรตีนวัน (Dentin matrix protein-1, DMP-1) ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าแคลเซียมอิออน รวมถึงซิลิคอนอิออน มีความจำเป็นสำหรับกระบวนการแปรสภาพและการสะสมแร่ธาตุของเซลล์เนื้อเยื่อในฟัน

จากที่กล่าวมาข้างต้นเกี่ยวกับสมบัติของ MTA ที่สามารถสร้างผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์และเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างสะพานเนื้อฟัน แต่อย่างไรก็ตามยังพบว่า MTA มีข้อด้อยหลายประการ เช่น มีระยะเวลาการก่อตัวที่นาน ลักษณะการใช้งานยาก ทำให้ฟันเปลี่ยนสี มีราคาแพง^{27,28} ซึ่งจากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าหลายๆการศึกษาที่ผ่านมา ได้มีความพยายามจะปรับเปลี่ยนส่วนประกอบของ MTA ทั้งในส่วนประกอบที่เป็นผงและส่วนประกอบที่เป็นของเหลวเพื่อใช้ทดแทนน้ำกลั่น รวมถึงการพัฒนาหาสารชนิดอื่นที่มีสมบัติในการสร้างผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ได้เช่นเดียวกับ MTA⁶⁹⁻⁷² โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อแบคทีเรีย ลดระยะเวลาการก่อตัว ลดค่าใช้จ่าย ทำให้ง่ายต่อการใช้งาน

โมโนแคลเซียมซิลิเกต (Monocalcium silicate / Wallastonite, CaSiO_3)

เป็นสารประกอบในกลุ่มแคลเซียมซิลิเกต จัดอยู่ในประเภทไบนารีออกไซด์ (Binary oxides) ปรากฏลักษณะในรูปแบบของผง ซึ่งเป็นวัสดุทางชีวภาพที่มีสมบัติชีวเคมี มีประสิทธิภาพที่ดีในการสร้างผลึกอะพาไทต์เมื่อละลายในสารละลาย SBF รวมถึงอิออนที่ปลดปล่อยออกมาจากสารสามารถที่จะส่งเสริมให้เกิดกระบวนการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ เกิดกระบวนการแปรสภาพและมีการแสดงออกของยีนจากเซลล์ต้นกำเนิดไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก⁷³

โดยจากการศึกษาของ Siriphannon และคณะในปีค.ศ. 2002²⁹ พบการสร้างผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์บนพื้นผิวโมโนแคลเซียมซิลิเกตเมื่อนำมาแช่ในสารละลาย SBF โดยโมโนแคลเซียมซิลิเกตจะถูกเตรียมจากแคลเซียมไนเตรต (Calcium nitrate, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) และเตตราเอทิลออร์โธซิลิเกต (Tetraethyl orthosilicate, $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ / TEOS) โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH) เป็นสารที่ทำให้เกิดการตกตะกอนร่วมทางเคมี (Co-chemical precipitation) โดยศึกษาพฤติกรรมของโมโนแคลเซียมซิลิเกตที่แตกต่างกันออกไป 3 วัฏภาค (Phase) ได้แก่ วัฏภาคอสัณฐาน (Amorphous phase, Amorphous- CaSiO_3), วัฏภาคที่อุณหภูมิต่ำ (Low temperature phase, $\beta\text{-CaSiO}_3$) ซึ่งมีลักษณะพรุนและพื้นผิวขรุขระ ในขณะที่วัฏภาคที่อุณหภูมิสูง (High temperature phase, $\alpha\text{-CaSiO}_3$) จะมีลักษณะพื้นผิวเรียบ เมื่อนำโมโนแคลเซียมซิลิเกตไปแช่ในสารละลาย SBF ซึ่งมีความเข้มข้นของอิออนอินทรีย์คล้ายพลาสมาในเลือดมนุษย์ (Human blood plasma)²⁹ และมีค่าความเป็นกรด-ด่าง pH 7.25 ที่อุณหภูมิ 36.5 องศาเซลเซียส ($^{\circ}\text{C}$) เป็นระยะเวลาตั้งแต่ 2 ชั่วโมงถึง 30 วัน จะสังเกตพบการสร้างผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ แต่จะมีลักษณะสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันขึ้นกับวัฏภาคเริ่มต้นของสารที่ใช้ในการศึกษา โดยใน Amorphous- CaSiO_3 จะพบผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์เกิดขึ้นได้เร็ว ลักษณะเป็นชั้นที่มีลักษณะพรุน เรียงตัวหลวมๆ (Loose porous layer) ประกอบด้วยอนุภาคที่คล้ายลูกบอลขนาดเล็กเรียงตัวกัน ในขณะที่ $\beta\text{-CaSiO}_3$ และ $\alpha\text{-CaSiO}_3$ จะพบผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ลักษณะเป็นชั้นหนาแน่น ประกอบด้วยอนุภาคที่คล้ายลูกบอลขนาดใหญ่เรียงตัวกัน

โมโนแคลเซียมซิลิเกตเป็นสารที่มีสมบัติชีวเคมี มีความสามารถในการยึดกับกระดูกที่มีชีวิต โดยผ่านชั้นของผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่สร้างขึ้นเมื่อสัมผัสกับสารละลาย SBF โดยแคลเซียมและซิลิเกตซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในโมโนแคลเซียมซิลิเกต จะเกิดการละลายเมื่อเริ่มแช่ในสารละลาย SBF โดยจะก่อให้เกิดชั้นของซิลิกา (Silica-rich interlayer) บนพื้นผิวของโมโนแคลเซียมซิลิเกตตามด้วยการสร้างชั้นของแคลเซียมฟอสเฟตที่มีรูปร่างอสัณฐาน (Amorphous calcium

phosphate) และก่อตัวเป็นผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ โดยการก่อตัวของแคลเซียมไอออน ฟอสเฟตไอออน (Phosphate ion, PO_4^{3-}) และไฮดรอกซิลไอออนจากสารละลาย SBF

จากการศึกษาที่ผ่านมา โมโนแคลเซียมซิลิเกตเป็นสารประกอบที่ไม่สามารถขึ้นรูปในลักษณะของซีเมนต์เมื่อนำมาผสมกับน้ำกลั่น น้ำเกลือ หรือยาชา รวมถึงมีการศึกษาพบว่าโมโนแคลเซียมซิลิเกตเป็นสารที่มีความเปราะ³⁰ ซึ่งเป็นข้อด้อยที่สำคัญ โดยอาจทำให้เกิดการแตกหักขนาดเล็ก (Microcrack) ภายใต้อันตรึงแรงกดเคี้ยว หากนำมาใช้เป็นสารในการปิดแผลเนื้อเยื่อในโดยสัมผัสกับเนื้อเยื่อ ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการรั่วซึมขนาดเล็กที่นำไปสู่ความล้มเหลวของการรักษาได้ โดยพบว่ามีการศึกษาที่จะพัฒนานำสารประกอบบางชนิดมาผสมเพื่อปรับปรุงลดข้อด้อยดังกล่าว ดังเช่น การศึกษาของ Monvisade และคณะในปีค.ศ. 2007⁷⁴ ที่มีการเติมสารเมทิลเมทาคริเลต (Methyl metacrylate) ผสมกับโมโนแคลเซียมซิลิเกต ผลพบว่ามีค่าความทนแรงอัดในระดับเดียวกับกระดูกทึบ (Cortical bone)

กลาสโพลีอัลคิโนเอต (Glass polyalkenoate) หรือกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ (Glass ionomer cement, GIC)

กลาสโพลีอัลคิโนเอต หรือกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ ถูกนำมาใช้ทางทันตกรรมตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม ค.ศ. 1972 เนื่องจากมีสมบัติที่สามารถยึดติดกับเคลือบฟันและเนื้อฟันด้วยพันธะเคมี สามารถปลดปล่อยฟลูออไรด์^{31,32} เมื่อผสมซีเมนต์จะก่อตัวอย่างรวดเร็วด้วยปฏิกิริยากรด-ด่าง (Acid-base reaction) โดยไม่พบการหดตัวและการเพิ่มอุณหภูมิระหว่างการก่อตัว รวมถึงเป็นสารที่มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเนื้อเยื่อในฟัน⁷⁵ แต่อย่างไรก็ตามยังพบว่ามีข้อด้อย เนื่องจากเป็นสารที่มีความเปราะและสมบัติเชิงกลต่ำ⁷⁶ โดย KetacTM Molar ซึ่งเป็น Conventional GIC ที่มีความเหนียว ได้ถูกพัฒนาขึ้นมา โดยพบว่าจะมีค่าทนแรงอัดที่สูงและค่าการละลายตัวที่ต่ำเมื่อเทียบกับกลุ่ม Conventional GIC ชนิดอื่น^{33,34}

ต่อมาในช่วงปีค.ศ. 1980 ได้มีการพัฒนาซีเมนต์ในกลุ่มเรซินโมดิฟายด์กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ (Resin-modified glass ionomer cement, RMGIC) ซึ่งจะมีสมบัติเชิงกลที่ดีกว่ากลุ่ม Conventional GIC⁷⁷ โดยซีเมนต์ของกลุ่ม RMGIC จะใช้ระบบการบ่มตัว 2 ทาง (Dual cure)⁷⁸ ซึ่งจะมีกลไกการก่อตัวด้วยปฏิกิริยากรด-ด่าง ร่วมกับปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน (Polymerization reaction)⁷⁹ โดยจะก่อตัวได้เร็วกว่า Conventional GIC

โดยในทั้ง 2 กลุ่มของ GIC จะมีส่วนประกอบในส่วนผงเป็นแคลเซียมฟลูออโรอะลูมิเนียมซิลิเกต (Calcium fluoro alumino silicate) ส่วนของเหลวเป็นกรดพอลิอะคริลิก (Polyacrylic acid) โดยใน RMGIC จะมีการเติมสารไฮดรอกซีเอทิลเมทาคริเลต (Hydroxyethyl methacrylate, HEMA) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน⁸⁰ มีการศึกษาพบว่า HEMA ใน RMGIC มีความเป็นพิษมากเมื่อเทียบกับ Conventional GIC ซึ่งสามารถที่จะลดความเป็นพิษลงได้ด้วยการฉายแสง⁸¹⁻⁸⁴

จากรายงานการศึกษาของ Nourmohammadi และคณะในปีค.ศ. 2008⁷⁹ ที่แสดงให้เห็นว่า RMGIC เป็นสารที่มีสมบัติชีวเคมีที่ดี สามารถที่จะสร้างผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ได้ แต่จะไม่พบใน Conventional GIC โดยเมื่อผสมส่วนผงกับกรดพอลิอะคริลิกจะเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันจากการฉายแสงร่วมกับปฏิกิริยากรด-ด่าง ระหว่างขั้นตอนการก่อตัวของซีเมนต์ โดยจะมีการปลดปล่อยแคลเซียมไอออนเนื่องจากเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) จากโครงสร้างของแคลเซียมฟลูออโรอะลูมิเนียมซิลิเกตที่มีองค์ประกอบเป็นแก้วคล้ายโมโนแคลเซียมซิลิเกต⁸⁵ ซึ่งต่อมาแคลเซียมไอออนจะจับกับฟอสเฟตในเมทริกซ์ของซีเมนต์เกิดการสร้างสารประกอบแคลเซียมฟอสเฟต จากการทดลองเมื่อนำซีเมนต์ที่ก่อตัวแล้วของ RMGIC ไปเก็บไว้ในสารละลาย SBF เป็นระยะเวลา 28 วัน จะเกิดการสร้างผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์บนพื้นผิวของซีเมนต์⁷⁹ ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่าการสร้างผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์เนื่องจากมีหมู่ไฮดรอกซิล (Xylanol group, Si-OH) บนพื้นผิวนิวเคลียสของแคลเซียมฟลูออโรอะลูมิเนียมซิลิเกต และหมู่คาร์บอกซิล (Carboxyl group, COOH) ในกรดพอลิอะคริลิกของ RMGIC ตามลำดับ ร่วมกับการเพิ่มระดับแคลเซียมไอออนจากการแช่ RMGIC ในสารละลาย SBF ซึ่งจะมีผลมากกว่าผลของกรดพอลิอะคริลิกต่อการยับยั้งการสร้างผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ โดยแคลเซียมไอออนจากสารละลาย SBF จะจับกับประจุลบของ Si-OH และ COOH แล้วสร้างสารประกอบเชิงซ้อนขึ้น โดยในลำดับต่อมาสารประกอบเชิงซ้อนจะจับกับแคลเซียมไอออน เกิดการสร้างผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ขึ้น

นอกจากนี้ยังพบว่า จากความสามารถของ GIC ที่สามารถปลดปล่อยฟลูออไรด์ได้นั้น ทำให้สามารถที่จะสร้างผลึกฟลูออโรอะพาไทต์ โดยมีการศึกษาของ Lin และคณะในปีค.ศ. 2009³⁵ พบว่า จะมีการสร้างผลึกฟลูออโรอะพาไทต์เกิดขึ้นเมื่อมีการเติมแคลเซียมฟลูออไรด์ (Calcium fluoride, CaF₂) ลงในไตรแคลเซียมซิลิเกตในสภาวะที่สัมผัสกับสารละลาย SBF โดยปริมาณของฟลูออไรด์ไอออน (Fluoride ion, F⁻) ที่ปลดปล่อยออกมาจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณของฟลูออไรด์ตั้งต้น ซึ่งความสำคัญของผลึกฟลูออโรอะพาไทต์ที่สร้างขึ้น เป็นโครงสร้างของผลึกที่จะกระตุ้นการทำงานของเซลล์สร้างกระดูก และเกิดการสร้างกระดูกที่ดีกว่าผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ รวมถึงจะทำให้เซลล์สร้างกระดูกมีการตอบสนองที่ดีในการยึดติดของเซลล์⁸⁶ กระบวนการแปรสภาพ^{87,88} กระบวนการแบ่งตัว

เพิ่มจำนวน กระบวนการสะสมแร่ธาตุที่ดีกว่าเมื่อเทียบกับผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์⁸⁹ และอาจมีความสำคัญทางชีวภาพหลายประการเมื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการปิดแผลเนื้อเยื่อใน

จากสมบัติของโมโนแคลเซียมซิลิเกต ที่มีความสามารถในการสร้างผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ได้อย่างรวดเร็วภายหลังจากแช่ในสารละลาย SBF ในระยะเวลา 2 ชั่วโมง และสมบัติของ GIC ที่สามารถเกิดการก่อตัวได้อย่างรวดเร็วภายหลังจากผสมซีเมนต์ โดยไม่เกิดการหดตัวระหว่างการก่อตัว มีการยึดติดที่ดีกับเนื้อฟันด้วยพันธะเคมี มีสมบัติเชิงกลที่ดี สามารถปลดปล่อยฟลูออไรด์ที่มีผลต่อการสร้างผลึกฟลูออโรอะพาไทต์ รวมถึง RMGIC ที่สามารถสร้างผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ได้ แต่พบว่ามีความเป็นพิษมากเมื่อเทียบกับ Conventional GIC ถึงแม้ว่าจะสามารถลดความเป็นพิษลงได้เมื่อกระตุ้นด้วยการฉายแสงเนื่องจากยังคงมีส่วน HEMA ที่หลงเหลืออยู่ รวมถึงระหว่างปฏิกิริยาการก่อตัวอาจมีการปล่อยสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์หากนำมาใช้ในการปิดแผลเนื้อเยื่อในโดยสัมผัสกับเนื้อเยื่อ จึงมีความเป็นไปได้ที่จะสร้างสารประกอบจากโมโนแคลเซียมซิลิเกตและ Conventional GIC เพื่อที่จะพัฒนานำมาใช้เป็นสารในการปิดแผลเนื้อเยื่อในทดแทน MTA

ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ จะทำการศึกษาถึงสมบัติของสารประกอบที่เตรียมขึ้นจากโมโนแคลเซียมซิลิเกตและ Conventional GIC ชนิด KetacTM Molar เพื่อที่จะพัฒนานำมาใช้เป็นสารในการปิดแผลเนื้อเยื่อใน โดยทำการวิเคราะห์ความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเนื้อเยื่อในฟันจากการทดสอบความเป็นพิษของสารต่อเซลล์ และสมบัติการสร้างเนื้อเยื่อแข็งเปรียบเทียบกับ White ProRoot[®] MTA ซึ่งในการศึกษานี้จะทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่แยกย่อยจากอวัยวะสิ่งมีชีวิต (Primary cells) คือ เซลล์เนื้อเยื่อในฟันมนุษย์ เพื่อหวังผลให้รูปแบบของการศึกษามีความใกล้เคียงกับสภาวะทางคลินิกมากที่สุด

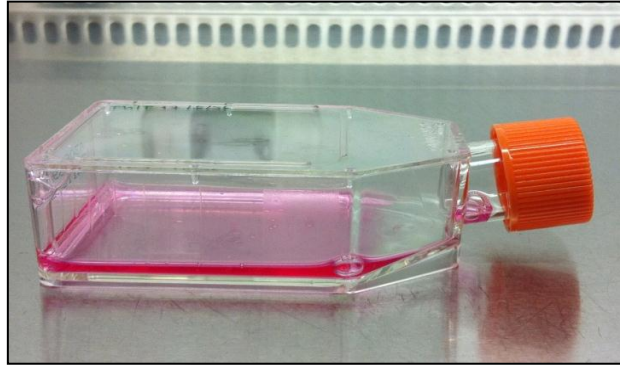


บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมเซลล์ที่ใช้ในการทดสอบ

HDPC เตรียมได้จากพันธุกรรมน้อยในสภาวะสมบูรณ์ ที่ถูกถอนเพื่อการจัดฟันในผู้ป่วยช่วงอายุ 18-22 ปี ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์โดย อ.ทพ.ดร. ณัฐพล ตั้งจิตร์ ภาควิชาทันตกรรมจัดฟัน คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ตามหนังสืออนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมในคนประจำคณะทันตแพทยศาสตร์และเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล (COE. No. MU-DT/PY-IRB 2013/017.0508) โดยทำการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็ม (Dulbeco's Modified Eagle medium, DMEM)[Gibco, Grand Island, NY] ร่วมกับสารกลูตามีน (Glutamine) 2 มิลลิโมลต่อลิตร (2mmol/L), เพนิซิลลิน (Penicillin) 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (100 Units/mL), สเตربتโตมัซิน (Streptomycin) 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (100 μ g/mL), แอมโฟเทอริซิน บี (Amphotericin B) 0.25 μ g/mL [Gibco, Grand Island, NY] และซีรัมของตัวอ่อนลูกวัว (Fetal bovine serum, FBS)[Gibco, Grand Island, NY] ร้อยละ 10 ในขวดพลาสติกเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 ตารางเซนติเมตร (cm²)(T75 plastic culture flask)[Corning ® CellBLIND® 75 cm² Rectangular Canted Neck Cell Culture Flask with Vent Cap] (ภาพประกอบ 1) ทำการบ่มไว้ในตู้อบ (Incubator)[Thermo forma311 USA] ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในความชื้นสัมพัทธ์บรรยากาศของคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 และอากาศร้อยละ 100 (ภาพประกอบ 2) โดย HDPC จากกลุ่มย่อย (Passage) ที่ 3 ถึงกลุ่มย่อยที่ 8 จะถูกนำมาใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้



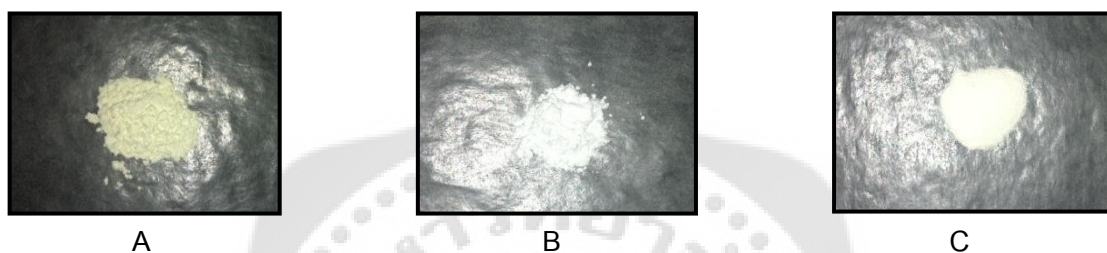
ภาพประกอบ 1 ขวดพลาสติกเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 ตารางเซนติเมตร



ภาพประกอบ 2 ตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในความชื้นสัมพัทธ์บรรยากาศ ของคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 และอากาศ ร้อยละ 100

การเตรียมสารที่ใช้ในการทดสอบ

สารตั้งต้นที่ใช้ในการทดสอบประกอบด้วย White ProRoot[®] MTA [Tooth-colored MTA, Densply Tulsa dental, Tulsa OK, USA] β -CaSiO₃ ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์โดยผศ.ดร. ปุณณมา ศิริพันธ์โนน ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ซึ่งเตรียมจากแคลเซียมไนเตรตและเตตราเอทิลออร์โทซิลิเกต โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นสารทำให้ตกตะกอนร่วมทางเคมี²⁹ และ Conventional GIC จะใช้ Ketac[™] Molar (Ketac[™] Molar Easymix, 3M ESPE AG, Germany) (ภาพประกอบ 3, 4)



ภาพประกอบ 3 สารตั้งต้นที่ใช้ในการทดสอบในรูปแบบผง ซึ่งได้แก่ (A) White ProRoot[®] MTA, (B) CaSiO₃ (C) Ketac[™] Molar

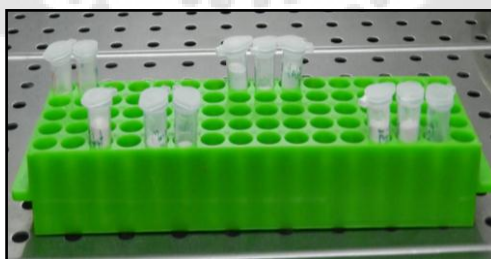


ภาพประกอบ 4 ผลิตภัณฑ์ทางการค้าที่ใช้ในการทดสอบ (A) White ProRoot[®] MTA, (B) Ketac[™] Molar

ทำการซั่งสารในเครื่องซั่งมาตรฐาน [Mettler AE 163] (ภาพประกอบ 5) ซึ่งจะผ่านขั้นตอนของการทำให้สารปลอดเชื้อภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (Ultraviolet light) เป็นระยะเวลาหนึ่งคืน (Over night) (ภาพประกอบ 6) ก่อนที่จะทำการเตรียมสารในสภาวะปลอดเชื้อภายในตู้ลามินาร์ (Laminar air flow cabinet)[Astec Microflow Advance Bio Safty Cabinet Model ABSI 200]



ภาพประกอบ 5 เครื่องซั่งสารทดสอบมาตรฐาน



ภาพประกอบ 6 การทำให้สารปลอดเชื้อภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต เป็นระยะเวลาหนึ่งคืน

โดยสารที่ใช้ในการทดสอบจะแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม คือ

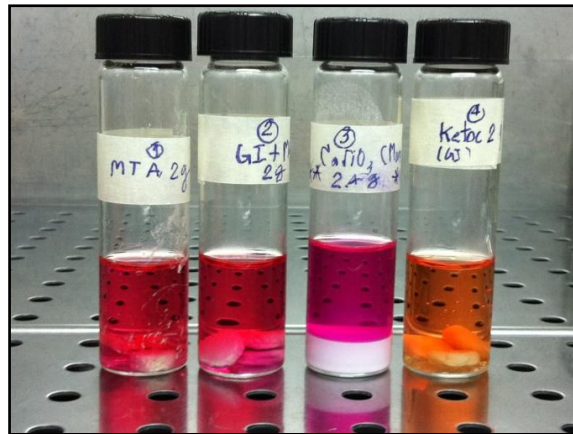
กลุ่มที่ 1 ใช้ White ProRoot[®] MTA ผสมกับน้ำกัลัน ในอัตราส่วน White ProRoot[®] MTA 3 ส่วน ต่อน้ำกัลัน 1 ส่วน โดยน้ำหนัก

กลุ่มที่ 2 ใช้ GIC ที่มีสารประกอบโมโนแคลเซียมซิลิเกต (Glass ionomer cement containing monocalcium silicate compound, GIC-CS) ซึ่งเตรียมส่วนผสมจาก CaSiO_3 ผสมกับ Ketac[™] Molar อัตราส่วน 1 ต่อ 1 โดยน้ำหนัก หลังจากนั้นนำส่วนผสมมาผสมกับส่วนของเหลว Ketac[™] Molar ที่เป็นกรดโพลีอะคริลิก ในอัตราส่วนผง 2.73 ส่วน ต่อของเหลว 1 ส่วน โดยน้ำหนัก ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่ได้ทดสอบแล้วพบว่าดีที่สุดในการเกิดผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์⁴⁰

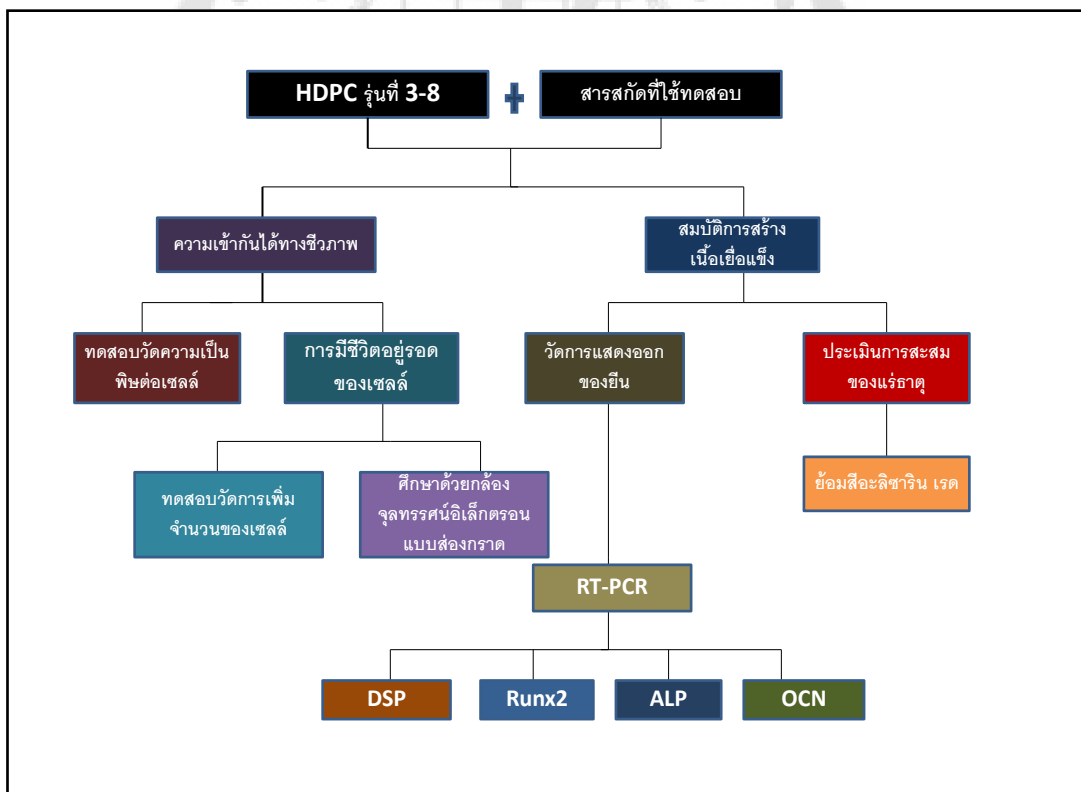
กลุ่มที่ 3 ใช้ CaSiO_3 ในรูปแบบผงที่ไม่ได้ผสมของเหลว

กลุ่มที่ 4 ใช้ Ketac[™] Molar ผสมในอัตราส่วนผง 3 ส่วน ต่อของเหลว 1 ส่วน โดยน้ำหนัก

โดยในกลุ่มที่ 1 2 4 เมื่อเตรียมเสร็จสารทดสอบจะอยู่ในรูปแบบของซีเมนต์ที่ขึ้นรูป มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 10 มิลลิเมตร สูงประมาณ 3 มิลลิเมตร ส่วนในกลุ่มที่ 3 จะอยู่ในรูปแบบของผง ซึ่งภายหลังจากเตรียมสารทดสอบในแต่ละกลุ่มจะถูกนำไปวางในขวดแก้ว (Vial tube) และนำไปป้อนไว้ในตู้อบเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นสารทดสอบจะถูกแช่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ดีเอ็มอีเอ็มที่ไม่มีซีรัมของตัวอ่อนลูกวัว (DMEM free serum) ในอัตราส่วน 0.2 กรัมต่อมิลลิลิตร (g/mL) ตามมาตรฐาน International Standard Organization [ISO 10993-12:2007(E)]⁹⁰ และนำไปป้อนไว้ในตู้อบเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อทำการสกัดแยกสารทดสอบ ภายหลังจากครบระยะเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพประกอบ 7) นำสารละลายจากสารทดสอบที่แช่ไปหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) ด้วยจำนวนรอบ 3000 รอบต่อนาที (Revolutions per minutes, rpm)[Sigma Laborzentrifugen 3k 15] เป็นระยะเวลา 5 นาที และนำสารละลายส่วนเหนือตะกอน (Supernatant) กรองผ่านชั้นกรอง (Filter) ขนาด 0.22 ไมโครเมตร (Micrometer, μm)[GVS Technology, USA] แล้วเก็บไว้ในขวดแก้ว ปิดผนึกด้วยพาราฟิน (Paraffin)[Pechiney Plastic Packaging, Chicago IL 60631, Menasha WI 54952] และห่อหุ้มด้วยกระดาษฟอยล์ (Foil)[เอ็มฟอยล์ อะลูมิเนียมฟอยล์, เอ็ม เอ็ม พี คอร์ปอเรชั่น] เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำสารสกัด (Extracts) ที่ได้มาใช้ในการทดสอบกับเซลล์เนื้อเยื่อในฟันมนุษย์ตามวิธีการทดสอบที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ ดังแผนภูมิ (ภาพประกอบ 8)



ภาพประกอบ 7 สารสกัดภายหลังทำการแช่สารทดสอบในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM free serum เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง



ภาพประกอบ 8 แผนภูมิวิธีการทดสอบที่ใช้ในงานวิจัย

การทดสอบวัดความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cell cytotoxicity assay)

โดยในลำดับแรกจะทำการทดสอบวัดความเป็นพิษต่อเซลล์ เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดของสารสกัดจากการทดสอบที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งจะถูกประเมินโดยใช้เมธิลทียาโซลเตตราโซเลียม, เอ็มทีที (Methyl-thiazoltetrazolium, MTT)[Sigma, St. Louis, MO, USA] โดย HDPC ความหนาแน่น 2×10^4 เซลล์ต่อหลุม (Well) จะถูกเลี้ยงในถาด 96 หลุม (96 Well plates)[Corning® 96 Well Multiwell Plates–Sigma-Aldrich] ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี FBS ร้อยละ 10 จำนวน 200 ไมโครลิตร เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการยึดเกาะของเซลล์บนถาด 96 หลุม หลังจากนั้นอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์จะถูกกำจัดออกและแทนที่ด้วยสารสกัดในแต่ละกลุ่มที่ใช้ทดสอบ ซึ่งมีความเข้มข้นแตกต่างกัน 5 ความเข้มข้น ได้แก่ ความเข้มข้นสูงสุด (Full concentration) ที่ 0.2 g/mL และทำการเจือจางในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 (1:1) 1 ต่อ 2 (1:2) 1 ต่อ 4 (1:4) 1 ต่อ 8 (1:8) ตามลำดับ ในปริมาณหลุมละ 100 ไมโครลิตร จำนวน 10 หลุม ต่อความเข้มข้น โดยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี FBS ร้อยละ 10 จะถูกใช้เป็นกลุ่มควบคุม เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการศึกษารูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ดูความเปลี่ยนแปลงเฟส (Phase contrast microscopy) [Nikon Eclipse TS 100] (ภาพประกอบ 9) และกำจัดสารที่อยู่ในแต่ละหลุมออกแล้วล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน (Phosphate buffer saline, PBS) เติม 50 ไมโครลิตร ของ MTT ลงไปในแต่ละหลุม ในระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (mg/mL) เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง จึงทำการกำจัด MTT แล้วล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน และเติม 100 ไมโครลิตร ของไดเมทิลซัลโฟไซด์หรือดีเอ็มเอสโอ (Dimethyl sulfoxide, DMSO)[Sigma, St. Louis, MO, USA] นำไปเข้าเครื่องสั่น (Shaker)[IKI®HS 260 basic] เป็นระยะเวลา 30 นาที แล้วทำการอ่านค่าระดับความทึบแสง (Optical density, OD) ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร (OD570) ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Absorption spectrophotometer)[Epoch Microplate Spectrophotometer, Biotek] เพื่อทำการประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดด้วยร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ เมื่อเทียบกับค่าระดับความทึบแสงกลุ่มควบคุมในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี FBS ร้อยละ 10 ซึ่งสารที่มีพิษต่อเซลล์จะมีค่าร้อยละความมีชีวิตน้อยกว่า 70^{91} โดยจะทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง (Triplicate experiment) ในเซลล์ 3 สายพันธุ์ (Line)



ภาพประกอบ 9 กล้องจุลทรรศน์ดูความเปลี่ยนแปลงเฟส

การทดสอบวัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Cell proliferation assay)

HDPC ความหนาแน่น 5×10^3 เซลล์ต่อหลุม จะถูกเลี้ยงในถาด 96 หลุม ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี FBS ร้อยละ 10 จำนวน 200 ไมโครลิตร เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์จะถูกกำจัดออกและแทนที่ด้วยสารสกัดแต่ละชนิด ในระดับความเข้มข้นเหมาะสมที่สุดที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ปริมาณหลุมละ 100 ไมโครลิตร จำนวน 10 หลุม ต่อชนิดสารสกัด โดยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี FBS ร้อยละ 10 จะถูกใช้เป็นกลุ่มควบคุม เพื่อใช้ในการทดสอบวัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ที่ช่วงระยะเวลา 1 3 5 และ 7 วัน ด้วยวิธี MTT เช่นเดียวกับการทดสอบวัดความเป็นพิษต่อเซลล์

ปฏิกิริยาลูกโซ่รีเวอร์สทรานสคริปเตสโพลีเมอเรส

(Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)

โดยจะทำการวิเคราะห์ตัวบ่งชี้สำหรับกระบวนการแปรสภาพของเซลล์สร้างเนื้อฟัน ได้แก่ DSP OCN ALP Runx2 ซึ่งจะเริ่มขบวนการรีเวอร์สทรานสคริปชัน (Reverse transcription) เพื่อสร้างซีดีเอ็นเอเทมเพลต (cDNA Template) หลังจากนั้นจะทำการวัดปริมาณการแสดงออก (Expression) ของยีนเหล่านี้ด้วย RT-PCR โดย HDPC ความหนาแน่น 1×10^5 จะถูกนำไปวางในถาด 12 หลุม (12 Well plate)[Corning® Cell BIND® 12 Well Clear Multiple Well Plates, Corning Life Sciences] และทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 4 7 และ 10 วัน ในอาหารเลี้ยงเซลล์ร่วมกับ สารสกัดแต่ละชนิดที่ใช้ทดสอบที่มีความเข้มข้นเหมาะสมที่สุดที่ไม่เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ โดย HDPC ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี FBS ร้อยละ 10 และ DMEM free serum ในหลุมที่ไม่มีส่วนของสารสกัดที่ใช้ทดสอบ จะถูกใช้เป็นกลุ่มควบคุมบวกและควบคุมลบตามลำดับ หลังจากนั้นทำการสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมด (Total RNA) โดยใช้ชุดสารเคมีสำหรับสกัดอาร์เอ็นเอ (High pure RNA isolation kit)[Roach Applied Science, Germany] ที่แต่ละช่วงระยะเวลา แล้วทำการวัดอาร์เอ็นเอบริสุทธิ์ (Purified RNA) โดยใช้เครื่องวัดการดูดกลืนแสง โดย 1 มิลลิกรัมของอาร์เอ็นเอจะถูกใช้เพื่อสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยารีเวอร์สซีดีเอ็นเอ (reverse cDNA) (ImPromp-II Reverse Transcription System RT Reagent Kit)[Promega, Madison, WI, USA) ตามคำแนะนำของผู้ผลิต หลังจากนั้นจะเริ่มขั้นตอนของปฏิกิริยาลูกโซ่เรียลไทม์ (Real-time Polymerase Chain Reaction, Real-time PCR) โดยใช้ LightCycler 480 SYBR Green I Master [Roach Applied Science, Germany] และมีลำดับรหัสพันธุกรรมไพรอเมออร์ของยีนที่ต้องการศึกษาและยีนควบคุม (House keeping gene) ซึ่งใช้ Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GADPH) (ตาราง 1) หลังจากนั้นจะเริ่มขบวนการดีเอ็นเอแอมพลิฟิเคชัน (DNA amplification) ซึ่งจะทำการตั้งค่าโปรแกรมก่อนอุ่น (Pre-incubation program) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 10 นาที จำนวน 1 รอบ โปรแกรมแอมพลิฟิเคชัน (Amplification program) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 15 วินาที 55 องศาเซลเซียส 15 วินาที 72 องศาเซลเซียส 25 วินาที จำนวน 45 รอบ โปรแกรมโค้งการละลาย (Melting curve program) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 5 วินาที 70 องศาเซลเซียส 1 นาที 97 องศาเซลเซียส ในช่วงระยะเวลาต่อเนื่อง จำนวน 1 รอบ โปรแกรมการเข้าสู่ความเย็น (Cooling program) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 30 วินาที จำนวน 1 รอบ เพื่อที่จะดูถึงประสิทธิภาพของการแอมพลิฟิเคชันและการวัดค่าเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ในแต่ละยีน ด้วยการดูปริมาณความสัมพันธ์ (Relative quantification) จากผลของ PCR โดยใช้ LightCycler® 480 Software version 1.5.0.39

[Roach Applied Science, Germany] ซึ่งจะเทียบกับการทำแอมพลิฟิเคชันของ GAPDH โดยจะเก็บค่าเฉลี่ยของข้อมูลจาก 3 หลุมในแต่ละชนิดสารสกัดที่ต้องการทดสอบ

ตาราง 1 ลำดับยีนของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาแอมพลิฟิเคชันซีดีเอ็นเอของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันมนุษย์

Gene Transcript	Primer Sequence	
Runx2	Forward	5'CCAACCCACGAATGCACTATC3'
	Reverse	3'TAGTGAGTGGTGGCGGACATAC5'
OCN	Forward	5'CCTGAAAGCCGATGTGGT3'
	Reverse	3'GGCAGCGAGGTAGTGAAGA5'
ALP	Forward	5'GACCCTTGACCCCCACAAT3'
	Reverse	3'GCTCGTACTGCATGTCCCCT5'
DSP	Forward	5'CTCCCAAATGGACACAATG3'
	Reverse	3'ATGCTTCTGACTGGCTGATG5'
GAPDH	Forward	5'CATGTTCCAATATGATTCCACC3'
	Reverse	3'GATGGGATTTCCATTGATGAC5'

การประเมินการสะสมของแร่ธาตุ (Mineralization assay)

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ HDPC ความหนาแน่น 1×10^5 ในจานพลาสติกเลี้ยงเซลล์ ขนาด 35 มิลลิเมตร (35 mm Plastic culture dish)[Corning ® Plastic Culture Dishes, Petri Style-Sigma-Aldrich] เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ภายหลังจากนั้นทำการกระตุ้นด้วยสารสกัดในแต่ละกลุ่มที่ใช้ทดสอบที่มีความเข้มข้นเหมาะสมที่สุดที่ไม่เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ ปริมาณ 2 มิลลิตร ต่อจานพลาสติกเลี้ยงเซลล์ โดย HDPC ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี FBS ร้อยละ 10 และ DMEM free serum ในจานพลาสติกเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีส่วนของสารสกัดที่ใช้ทดสอบ จะถูกใช้เป็นกลุ่มควบคุมบวกและควบคุมลบตามลำดับ และทำการเหนี่ยวนำด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำการสร้างเนื้อเยื่อแข็ง (Osteogenic media) ซึ่งผสม 50 $\mu\text{g/mL}$ กรดแอสคอร์บิก (L-Ascorbic acid)[Sigma-Aldrich] 10 mmol/mL เบต้ากลีเซอโรฟอสเฟต (β -glycerophosphate) [Sigma-Aldrich] และ 10^{-8}M เดกซาเมธาโซน (Dexamethasone)[Sigma-Aldrich] อย่างละ 10 ไมโครลิตร ทำการเปลี่ยนสารทุกกลุ่มในทุกช่วงระยะเวลา 2-3 วัน จนครบระยะเวลา 28 วัน โดยจะทำการล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ 1 ครั้ง และยัด (Fixed) ด้วยเมทานอลที่มีความเย็น

(Cold methanol) เป็นระยะเวลา 5 นาที และทำการล้างด้วยน้ำกลั่น ภายหลังจากนั้นทำการย้อมสีด้วยอะซิซาริน เรด [Sigma- Aldrich] ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง pH 4.2 ปริมาณ 2 มิลลิเมตร ต่อจานพลาสติกเลี้ยงเซลล์ เป็นระยะเวลา 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นจำนวน 3 ครั้ง และทำการถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ดูความเปลี่ยนแปลงเฟส หลังจากนั้นทำการล้างสีที่ย้อมและเป่าให้แห้ง แล้วนำไปละลายใน 100 mmol/L ซิลิลไพริดีเนียมคลอไรด์ (Cetylpyridinium chloride)[Sigma-Aldrich] เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง และนำเข้าสู่ภาค 96 หลุม ปริมาณหลุมละ 200 ไมโครลิตร เพื่อทำการวิเคราะห์ค่าระดับความทึบแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope)

HDPC ความหนาแน่น 1×10^4 จะถูกนำไปวางในภาชนะ 24 หลุม (24 Well plate)[Corning® Cell BIND® 12 Well Clear Multiple Well Plates, Corning Life Sciences] ที่มีแผ่นแก้ว (Glass cover slip)[Thermanox® Plastic Cover Slip] ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร สำหรับใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ซึ่งถูกเตรียมไว้ในสภาวะปลอดเชื้อ แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในความชื้นสัมพัทธ์บรรยากาศของคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 และอากาศ ร้อยละ 100 เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ภายหลังจากนั้นทำการกระตุ้นเซลล์ด้วยสารสกัดในแต่ละกลุ่มที่ใช้ทดสอบที่มีความเข้มข้นเหมาะสมที่สุดที่ไม่เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ ปริมาณ 100 ไมโครลิตร โดยจำนวนแผ่นแก้วจะถูกเตรียม 1 แผ่น ต่อ 1 ชนิดสารสกัดในแต่ละกลุ่มที่ใช้ทดสอบในช่วงระยะเวลา 1 3 5 และ 7 วัน หลังจากนั้นภายหลังจากแต่ละช่วงเวลา จะทำการล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ เป็นระยะเวลา 10 นาที ทั้งหมด 2 ครั้ง และทำการย้อมด้วยกลูตารัลดีไฮด์ ร้อยละ 2.5 (2.5% Glutaraldehyde)[Electron Microscopy Science] ตลอดระยะเวลา 1 คืน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ภายหลังจากนั้นทำการล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์เป็นระยะเวลา 10 นาที ทั้งหมด 2 ครั้ง และทำการย้อมด้วยออสเมียมเตตรอกไซด์ (Osmium tetroxide, OsO_4)[Electron Microscopy Science] เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง โดยทำการห่อหุ้มด้วยฟอยล์ ภายหลังจากนั้นทำการล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์เป็นระยะเวลา 10 นาที ทั้งหมด 2 ครั้ง และดึงน้ำ (Dehydration) ด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol, EtOH) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 30 50 60 70 85 95 100 ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 10 นาที โดยทำซ้ำ 2 ครั้ง ในแต่ละระดับความเข้มข้น ต่อจากนั้นนำชิ้นตัวอย่างไปผ่านกระบวนการทำให้แห้ง (Drying) ด้วยเครื่องทำให้แห้งภายใต้จุดวิกฤติ (Critical point dryer, CPD)[EMITEK K850] (ภาพประกอบ 10) ก่อนที่จะนำชิ้นตัวอย่างไปเคลือบทองด้วยเครื่องเคลือบระบบอัตโนมัติ (Auto fine coater)

[JEOL, JFC-1600](ภาพประกอบ 11) เพื่อทำการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (JEOL, JSM-6510 LV)(ภาพประกอบ 12) และทำการบันทึกข้อมูลทั้งจำนวนและรูปร่างของเซลล์เพื่อดูถึงความมีชีวิต



ภาพประกอบ 10 การนำชิ้นตัวอย่างไปผ่านกระบวนการทำให้แห้ง



ภาพประกอบ 11 การนำชิ้นตัวอย่างไปผ่านขั้นตอนการเคลือบทอง



ภาพประกอบ 12 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (Statistical analysis)

โดยความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละกลุ่มทดสอบ จะถูกนำมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วย ทูเวย์อะโนวา (Two-Way ANOVA) และทำการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มด้วยทูกี้เอชเอสดี (Tukey's HSD) สำหรับการทดสอบวัดความเป็นพิษต่อเซลล์ การทดสอบวัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ และการประเมินการสะสมของแร่ธาตุ วิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยครัสคัล วอลลิส (Kruskal wallis) และทำการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มด้วยแมนวิทนียู (Mann-whitney U) สำหรับวัดปริมาณการแสดงออกยีน ด้วย RT-PCR ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ α เท่ากับ 0.05 หรือระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้โปรแกรม SPSS Statistics 17.0 (IBM Software) สำหรับการศึกษาดังกล่าวด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดจะทำการวิเคราะห์ด้วยสถิติเชิงพรรณนา (Descriptive statistics)



บทที่ 4

ผลการวิจัยและการวิเคราะห์ข้อมูล

การทดสอบวัดความเป็นพิษต่อเซลล์

จากการทดสอบวัดความเป็นพิษต่อเซลล์ในเซลล์เนื้อเยื่อในฟันมนุษย์ เมื่อพิจารณาจากร้อยละความมีชีวิตของเซลล์เมื่อกระตุ้นด้วยสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นสูงสุดของการทดสอบ พบว่าในกลุ่มของสารสกัด CaSiO_3 จะมีความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งพิจารณาจากค่าร้อยละความมีชีวิตที่มีค่าน้อยกว่าร้อยละ 70⁹¹ (ตาราง 2)

ตาราง 2 ค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์จากการทดสอบวัดความเป็นพิษต่อเซลล์

สารสกัดทดสอบ	ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์				
	Full	1:1	1:2	1:4	1:8
White ProRoot [®] MTA	79.51	104.18	105.31	104.35	103.05
GIC-CS	81.19	100.26	103.93	105.07	103.51
CaSiO_3	30.58	96.84	102.17	103.97	102.10
Ketac [™] Molar	85.47	101.56	105.12	104.17	105.70

เมื่อนำค่าระดับความทึบแสงมาทำการเปรียบเทียบ พบว่าในทุกกลุ่มสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นสูงสุด จะมีค่าระดับความทึบแสงน้อยกว่าสารสกัดที่ทำการเจือจางทุกระดับความเข้มข้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.001$) แต่จะไม่พบความแตกต่างระหว่างระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำการเจือจาง ($P > 0.05$) (ตาราง 3)

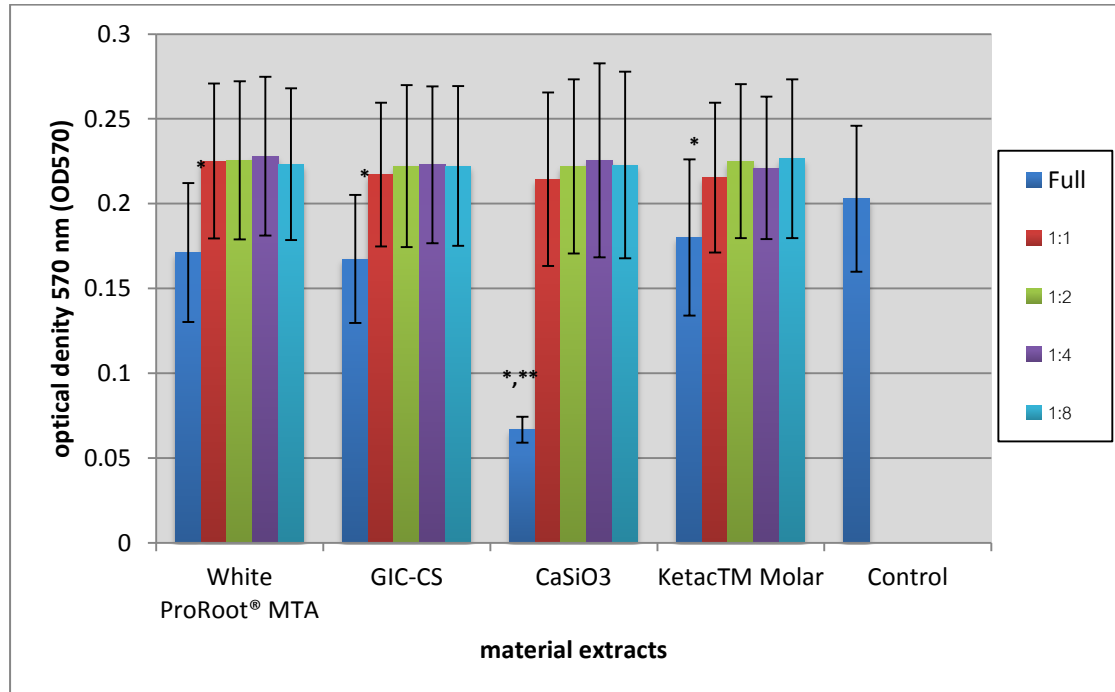
เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบระหว่างสารในแต่ระดับความเข้มข้นของสารสกัด พบว่าสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นสูงสุดในกลุ่ม CaSiO_3 จะมีค่าระดับความทึบแสงที่น้อยกว่าในกลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.001$) แต่เมื่อทำการเจือจางจะไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มของสารสกัดที่ใช้ทดสอบเมื่อพิจารณาที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน ($P > 0.05$) (ภาพประกอบ 13)

ตาราง 3 ค่าระดับความทึบแสงจากการทดสอบวัดความเป็นพิษต่อเซลล์

สารสกัดทดสอบ	ระดับความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ยระดับความทึบแสง
White ProRoot [®] MTA	ความเข้มข้นสูงสุด (0.2g/ml)	0.1711 ± 0.0410*
	เจือจาง1:1	0.2251 ± 0.0457
	เจือจาง1:2	0.2255 ± 0.0466
	เจือจาง1:4	0.2280 ± 0.0469
	เจือจาง1:8	0.2232 ± 0.0448
GIC-CS	ความเข้มข้นสูงสุด (0.2g/ml)	0.1674 ± 0.0377*
	เจือจาง1:1	0.2171 ± 0.0424
	เจือจาง1:2	0.2222 ± 0.0478
	เจือจาง1:4	0.2229 ± 0.0463
	เจือจาง1:8	0.2222 ± 0.0471
CaSiO ₃	ความเข้มข้นสูงสุด (0.2g/ml)	0.0667 ± 0.0077* **
	เจือจาง1:1	0.2144 ± 0.0511
	เจือจาง1:2	0.2220 ± 0.0514
	เจือจาง1:4	0.2256 ± 0.0572
	เจือจาง1:8	0.2228 ± 0.0551
Ketac [™] Molar	ความเข้มข้นสูงสุด (0.2g/ml)	0.1800 ± 0.0461*
	เจือจาง1:1	0.2153 ± 0.0441
	เจือจาง1:2	0.2251 ± 0.0454
	เจือจาง1:4	0.2210 ± 0.0420
	เจือจาง1:8	0.2265 ± 0.0468
กลุ่มควบคุม		0.2028 ± 0.0431

*: มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากระดับความเข้มข้นอื่นในสารสกัดที่ใช้ทดสอบชนิดเดียวกัน (P<0.001)

** : มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากสารสกัดที่ใช้ทดสอบชนิดอื่นที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน (P<0.001)

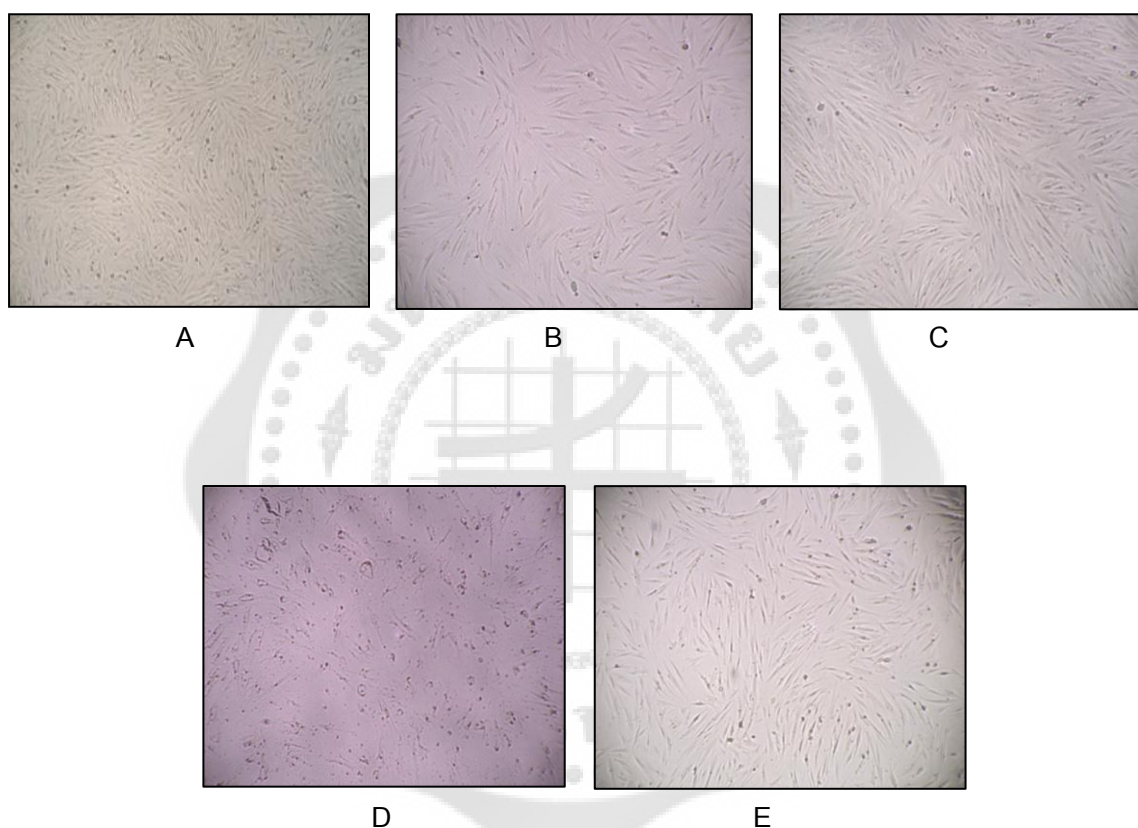


ภาพประกอบ 13 การเปรียบเทียบค่าระดับความทึบแสงจากการทดสอบวัดความเป็นพิษต่อเซลล์ (n=90 / สารทดสอบ)

*: มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากระดับความเข้มข้นอื่นในสารสกัดที่ใช้ทดสอบชนิดเดียวกัน ($P \leq 0.001$)

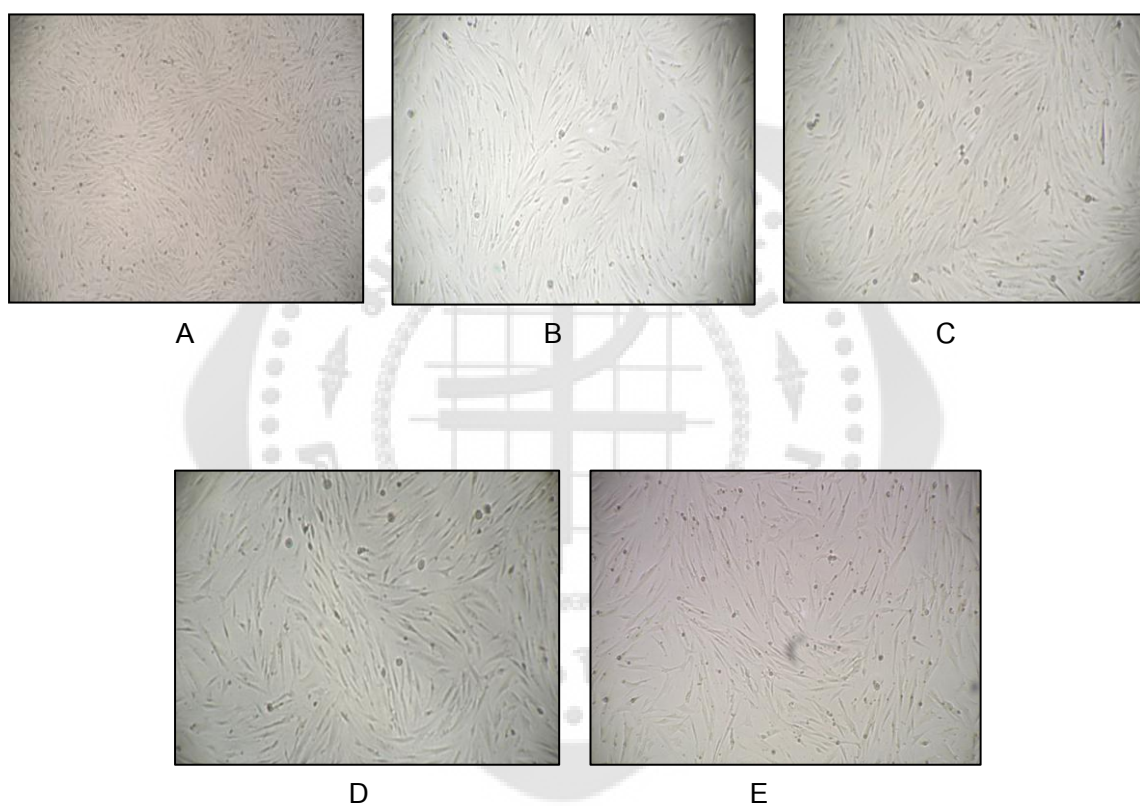
** : มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากสารสกัดที่ใช้ทดสอบชนิดอื่นที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน ($P \leq 0.001$)

โดยเมื่อพิจารณาถึงลักษณะรูปร่างและการกระจายตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ดูความเปลี่ยนแปลงเฟสที่กำลังขยาย 40 เท่า (40x) จะพบว่าในกลุ่มของสารสกัด CaSiO_3 เกิดการตายของเซลล์จำนวนมาก โดยเซลล์มีรูปร่างกลม หดตัว และอยู่รวมกันอย่างหลวมๆ (ภาพประกอบ 14 D) ขณะที่ในสารสกัดกลุ่มอื่นเซลล์จะมีชีวิตอยู่รอดมากกว่า โดยเซลล์มีลักษณะยึดตัว เรียวแหลม และอยู่รวมกันอย่างหนาแน่น (ภาพประกอบ 14 A, B, C, E)



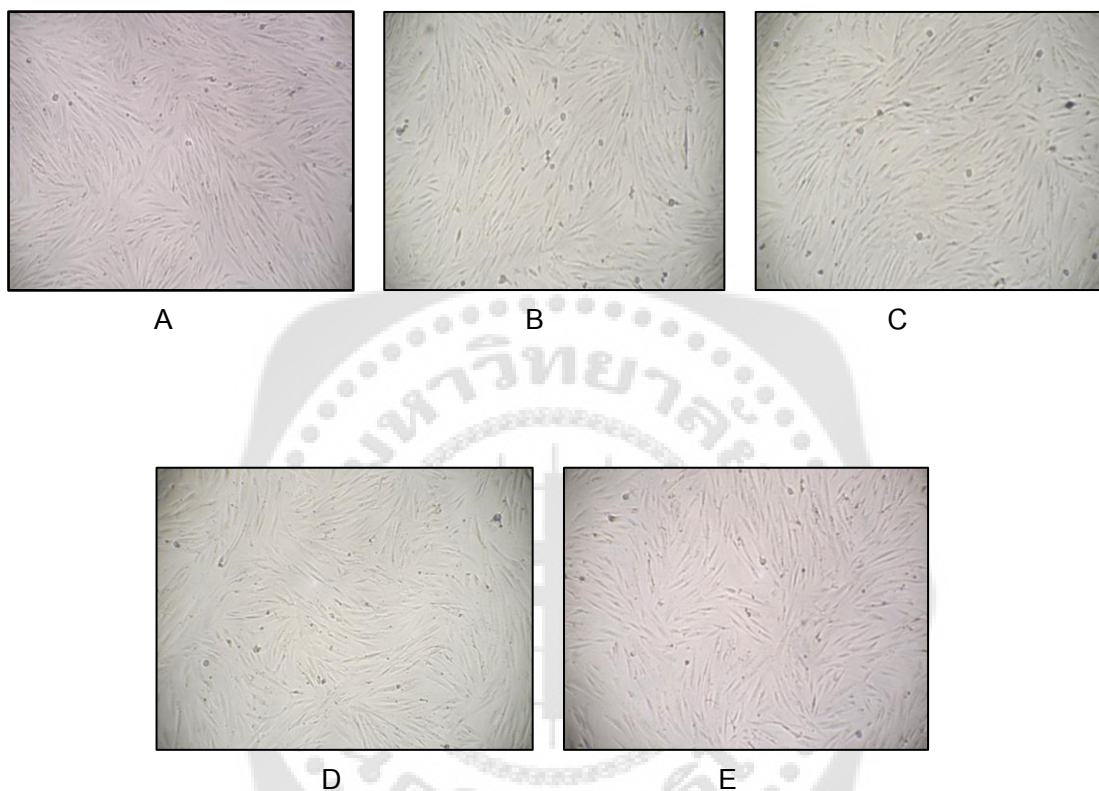
ภาพประกอบ 14 ลักษณะรูปร่างและการกระจายตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ดูความเปลี่ยนแปลงเฟส (40x) เมื่อกระตุ้นด้วยสารสกัดแต่ละชนิดที่ระดับความเข้มข้นสูงสุดของการทดสอบ. (A) กลุ่มควบคุม, (B) White ProRoot[®] MTA, (C) GIC-CS, (D) CaSiO_3 , (E) Ketac[™] Molar

แต่เมื่อทำการเจือจางสารสกัดความเข้มข้นสูงสุดด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี FBS ร้อยละ 10 ในอัตราส่วน 1:1 เป็นต้นไป พบว่าสารสกัดในกลุ่ม CaSiO_3 ไม่เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ (ตาราง 2) โดยค่าระดับความทึบแสงมีค่าไม่แตกต่างจากสารสกัดในกลุ่มอื่นที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) (ตาราง 3, ภาพประกอบ 13) โดยเมื่อดูลักษณะรูปร่างของเซลล์ จะพบเซลล์ที่มีลักษณะยึดตัว เรียวแหลม และรวมตัวกันหนาแน่น เช่นเดียวกับเซลล์ในกลุ่มอื่น (ภาพประกอบ 15)



ภาพประกอบ 15 ลักษณะรูปร่างและการกระจายตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ดูความเปลี่ยนแปลงเฟส (40x) เมื่อกระตุ้นด้วยสารสกัดแต่ละชนิดที่ระดับความเข้มข้นเจือจางอัตราส่วน 1:1 (A) กลุ่มควบคุม, (B) White ProRoot[®] MTA, (C) GIC-CS, (D) CaSiO_3 , (E) Ketac[™] Molar

เมื่อพิจารณาวิเคราะห์ในกลุ่มของสารสกัด GIC-CS พบว่าสารสกัดที่ทำการเจือจางในอัตราส่วน 1:1 เป็นต้นไป ค่าระดับความทึบแสงมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) (ตาราง 3, ภาพประกอบ 13) โดยมีลักษณะรูปร่างและการกระจายตัวที่คล้ายกัน (ภาพประกอบ 16)

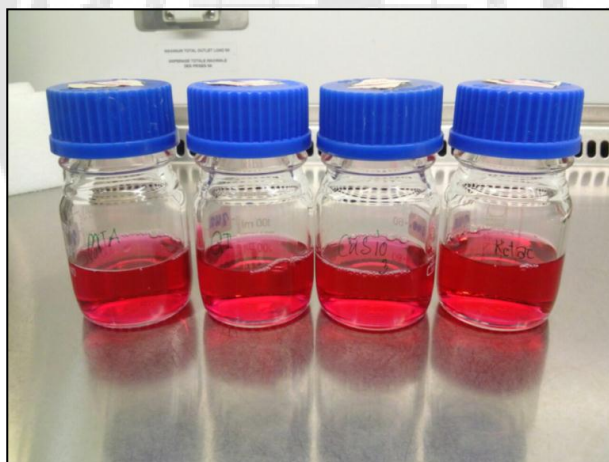


ภาพประกอบ 16 ลักษณะรูปร่างและการกระจายตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ดูความเปลี่ยนแปลงต่างเฟส (40x) เมื่อกระตุ้นด้วยสารสกัดในกลุ่ม GIC-CS ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน.
(A) GIC- CS Full concentration, (B) GIC-CS 1:1, (C) GIC-CS 1:2, (D) GIC-CS 1:4,
(E) GIC-CS 1:8

การทดสอบวัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์

จากผลการทดสอบวัดความเป็นพิษต่อเซลล์ พบว่าในทุกกลุ่มของสารสกัดเมื่อทำการเจือจางจากสารสกัดความเข้มข้นสูงสุดของการทดสอบจะไม่เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยในทุกระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำการเจือจาง เมื่อพิจารณาจากค่าระดับความทึบแสงมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) (ตาราง 3, ภาพประกอบ 13) ซึ่งจากผลของการทดสอบที่ได้เราจึงพิจารณาที่จะนำความเข้มข้นของสารสกัดเมื่อทำการเจือจางในอัตราส่วน 1:1 จากความเข้มข้นสูงสุดของการทดสอบ (ภาพประกอบ 17) มาทำการทดสอบวัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ รวมทั้งในการทดสอบถัดไปในงานวิจัยครั้งนี้

โดยผลการทดสอบวัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์เมื่อพิจารณาจากค่าระดับความทึบแสง พบว่าในทุกกลุ่มของสารสกัดที่ใช้ทดสอบเมื่อกระตุ้นต่อเซลล์เนื้อเยื่อในพื้นมนุษย์ สามารถทำให้เซลล์มีจำนวนที่เพิ่มขึ้นตามช่วงระยะเวลา 1 3 5 และ 7 วัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.001$) (ตาราง 4)



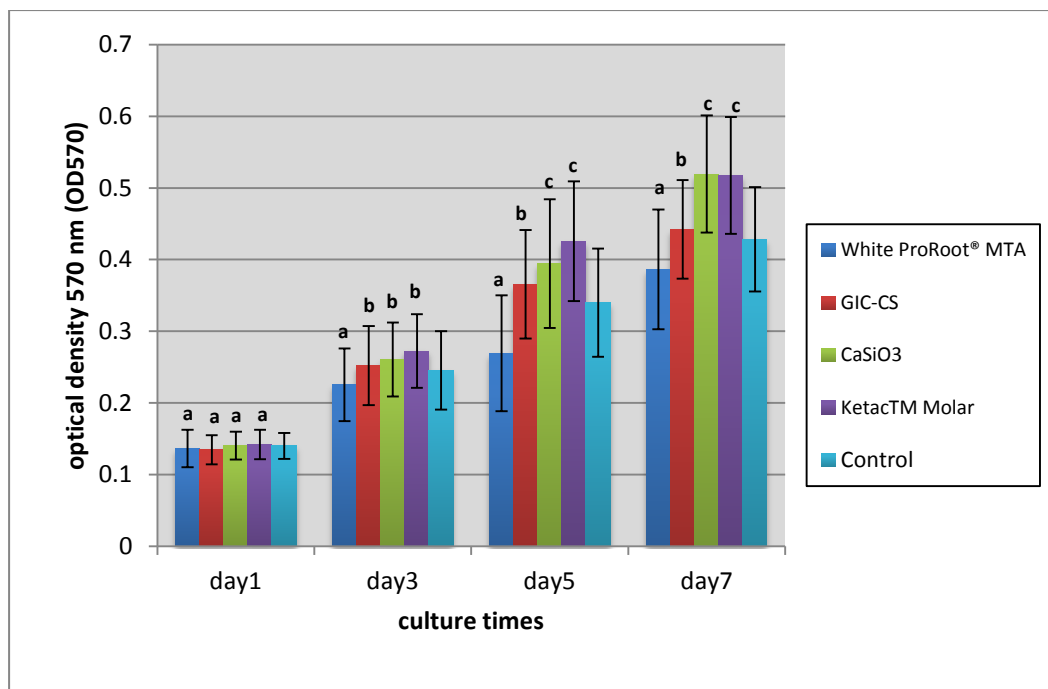
ภาพประกอบ 17 สารสกัดเมื่อทำการเจือจางในอัตราส่วน 1:1 จากความเข้มข้นสูงสุดของการทดสอบ

โดยผลการทดสอบพบว่าในช่วงระยะเวลาวันที่ 1 มีค่าระดับความทึบแสงที่ไม่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มสารทดสอบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ในช่วงระยะเวลาวันที่ 3 พบว่ากลุ่ม GIC-CS จะมีค่าระดับความทึบแสงมากกว่าในกลุ่ม White ProRoot[®] MTA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.010$) และน้อยกว่าในกลุ่ม CaSiO₃ Ketac[™] Molar อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ในช่วงระยะเวลาวันที่ 5 พบว่ากลุ่ม GIC-CS จะมีค่าระดับความทึบแสงมากกว่าในกลุ่ม White ProRoot[®] MTA และน้อยกว่าในกลุ่ม Ketac[™] Molar อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq 0.001$) รวมถึงน้อยกว่าในกลุ่ม CaSiO₃ อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ในขณะที่ช่วงระยะเวลาวันที่ 7 พบว่ากลุ่ม GIC-CS จะมีค่าระดับความทึบแสงมากกว่าในกลุ่ม White ProRoot[®] MTA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq 0.001$) และน้อยกว่าในกลุ่ม CaSiO₃ Ketac[™] Molar อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq 0.001$) (ตาราง 4, ภาพประกอบ 18)

ตาราง 4 ค่าระดับความทึบแสงจากผลการทดสอบวัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์

สารสกัดทดสอบ	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 7
White ProRoot [®] MTA	0.1366±0.0263 ^a	0.2254±0.0506 ^a	0.2695±0.0807 ^a	0.3864±0.0836 ^a
GIC-CS	0.1348±0.0202 ^a	0.2523±0.0552 ^b	0.3656±0.0756 ^b	0.4421±0.0686 ^b
CaSiO ₃	0.1405±0.0193 ^a	0.2607±0.0515 ^b	0.3945±0.0897 ^b	0.5192±0.0817 ^c
Ketac [™] Molar	0.1421±0.0206 ^a	0.2725±0.0512 ^b	0.4256±0.0834 ^c	0.5174±0.0816 ^c
Control	0.1401±0.0181	0.2455±0.0547	0.3401±0.0755	0.4284±0.0727

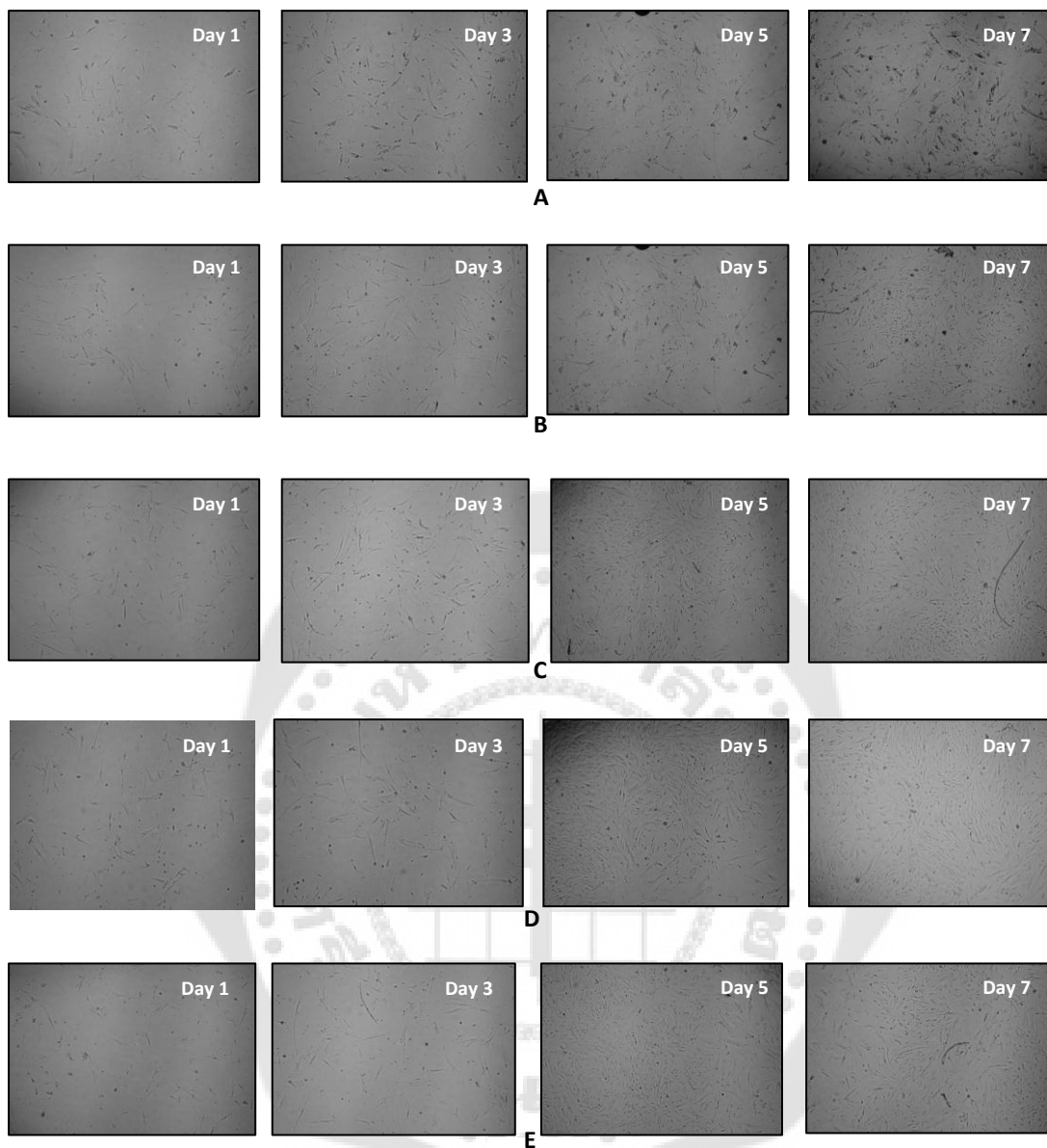
ดรรชนีบนที่แตกต่างกัน: มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มสารทดสอบในช่วงระยะเวลาเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.010$)



ภาพประกอบ 18 การเปรียบเทียบค่าระดับความทึบแสงจากการทดสอบวัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (n=90 / สารทดสอบ)

สัญลักษณ์ที่แตกต่างกัน: มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มสารทดสอบในช่วงระยะเวลาเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.010$)

เมื่อทำการศึกษาวิเคราะห์ลักษณะรูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ดูความเปลี่ยนแปลงเฟสพบว่าในทุกกลุ่มของสารสกัดที่ใช้ทดสอบจะมีรูปร่างของเซลล์ในลักษณะยึดตัว เรียวแหลม และการกระจายตัวในปริมาณที่มากขึ้นตามช่วงระยะเวลา 1 3 5 และ 7 วัน (ภาพประกอบ 19)



ภาพประกอบ 19 ลักษณะรูปร่างและการกระจายตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ดูความเปลี่ยนแปลงต่างเฟส (40x) เมื่อกระตุ้นด้วยสารสกัดทดสอบเจือจางในอัตราส่วน 1:1 ที่ระยะเวลา 1 3 5 และ 7 วัน (A) White ProRoot[®] MTA, (B) GIC-CS, (C) CaSiO₃, (D) Ketac[™] Molar, (E) กลุ่มควบคุม

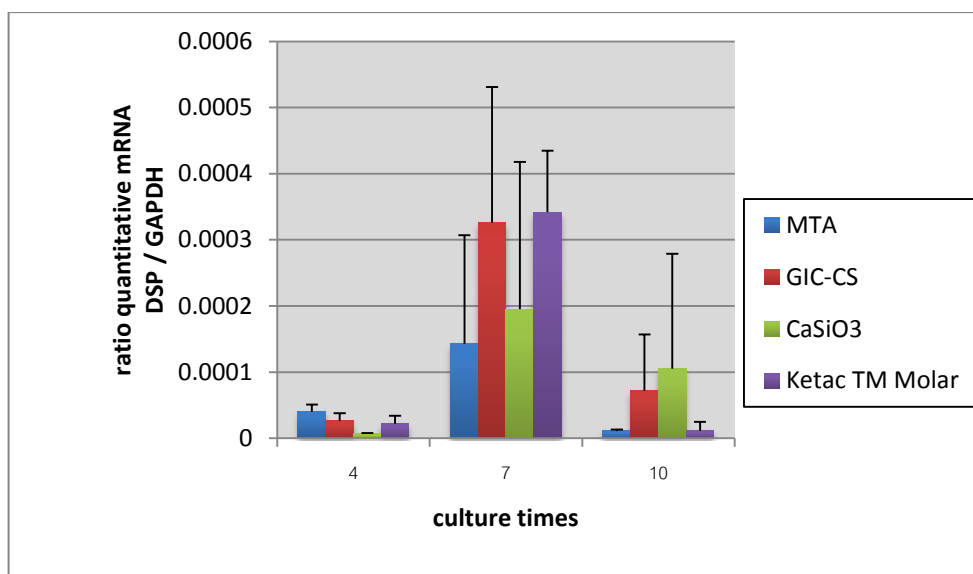
ปฏิกิริยาของไซรีเวอร์สทรานสคริปเตสโพลีเมอเรส

จากผลการทดสอบที่ได้พบว่าทุกกลุ่มของสารสกัดที่ใช้ทดสอบ มีการแสดงออกของยีนที่เป็นตัวบ่งชี้ของกระบวนการสร้างเนื้อเยื่อแข็ง ในส่วนของยีน DSP ผลพบว่าในทุกกลุ่มของสารสกัดที่ใช้ทดสอบมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นในช่วงระยะเวลาวันที่ 4 ถึงวันที่ 7 และมีแนวโน้มที่ลดลงในช่วงระยะเวลาวันที่ 7 ถึงวันที่ 10 เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มของสารสกัดที่ใช้ทดสอบในช่วงระยะเวลาเดียวกัน ผลพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ในทุกช่วงระยะเวลาของการทดสอบ โดยกลุ่ม GIC-CS จะพบยีน DSP ในปริมาณที่น้อยกว่ากลุ่ม White ProRoot[®] MTA ในวันที่ 4 และมากกว่าในวันที่ 7 และ 10 (ตาราง 5, ภาพประกอบ 20)

ตาราง 5 การแสดงออกของยีน DSP จากการกระตุ้นของสารสกัดที่ใช้ทดสอบ

สารสกัดทดสอบ	วันที่ 4	วันที่ 7	วันที่ 10
DMEM free serum	0.0000474±0.0000177	0.0023733±0.0014523	0.02422667±0.0179849
DMEM with 10% FBS	0.3838333±0.0271251	3.2486667±1.5573042	3.2233333±0.7167715
White ProRoot [®] MTA	0.0000401±0.0000108 ^a	0.0001429±0.0001639 ^a	0.0000111±0.0000021 ^a
GIC-CS	0.0000262±0.0000116 ^a	0.0003257±0.0002052 ^a	0.0000716±0.0000854 ^a
CaSiO ₃	0.0000066±0.0000012 ^a	0.0001952±0.0002225 ^a	0.0001050±0.0001741 ^a
Ketac [™] Molar	0.0000219±0.0000124 ^a	0.0003417±0.0000933 ^a	0.0000113±0.0000135 ^a

ดรชนีบนที่เหมือนกัน: ไม่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มของสารสกัดที่ใช้ทดสอบในช่วงระยะเวลาเดียวกัน ($P>0.05$)



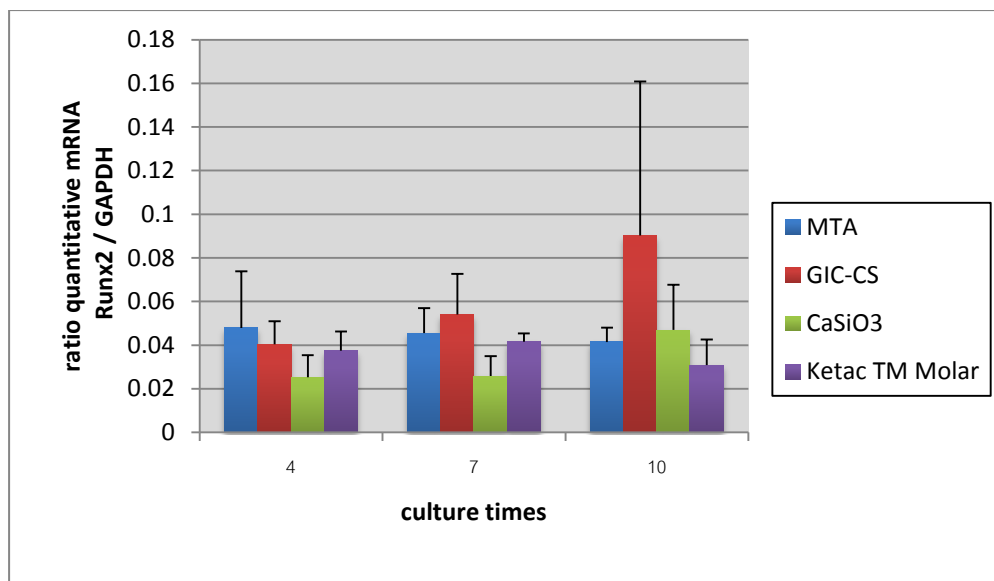
ภาพประกอบ 20 การแสดงออกของยีน DSP จากการกระตุ้นของสารสกัดที่ใช้ทดสอบ

ในส่วนของยีน Runx2 สามารถพบได้ในทุกกลุ่มของสารสกัดที่ใช้ทดสอบ ตลอดช่วงระยะเวลา 4 7 และ 10 วัน เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มของสารสกัดที่ใช้ทดสอบในช่วงระยะเวลาเดียวกัน พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ในทุกช่วงระยะเวลาของการทดสอบ โดยกลุ่ม GIC-CS จะพบยีน Runx2 ในปริมาณที่น้อยกว่ากลุ่ม White ProRoot[®] MTA ในวันที่ 4 และมากกว่าในวันที่ 7 และ 10 (ตาราง 6, ภาพประกอบ 21)

ตาราง 6 การแสดงออกของยีน Runx2 จากการกระตุ้นของสารสกัดที่ใช้ทดสอบ

สารสกัดทดสอบ	วันที่ 4	วันที่ 7	วันที่ 10
DMEM free serum	0.0812333±0.0095028	0.1056000±0.0380785	0.1451000±0.0266445
DMEM with 10% FBS	0.4299000±0.0182000	2.4670000±1.0294780	3.8770000±0.5444658
White ProRoot [®] MTA	0.0479000±0.0259409 ^a	0.0455333±0.0114127 ^a	0.0414667±0.0066018 ^a
GIC-CS	0.0403333±0.0106397 ^a	0.0539667±0.0186808 ^a	0.0903000±0.0705693 ^a
CaSiO ₃	0.0252667±0.0100947 ^a	0.0258333±0.0091090 ^a	0.0469333±0.0206781 ^a
Ketac [™] Molar	0.0374333±0.0087490 ^a	0.0415667±0.0037820 ^a	0.0308333±0.0116865 ^a

ดรรชนีบนที่เหมือนกัน: ไม่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มของสารสกัดที่ใช้ทดสอบในช่วงระยะเวลาเดียวกัน ($P > 0.05$)



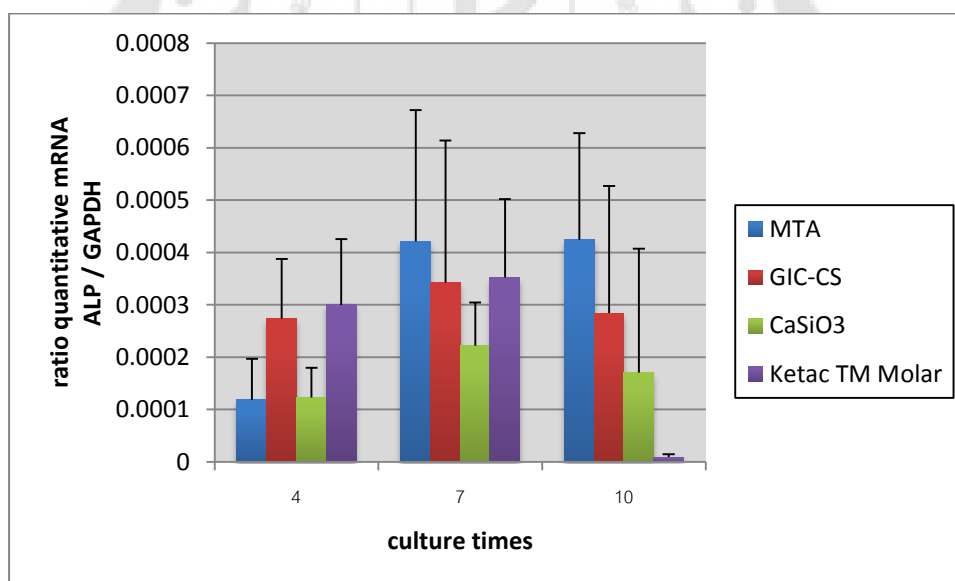
ภาพประกอบ 21 การแสดงออกของยีน Runx2 จากการกระตุ้นของสารสกัดที่ใช้ทดสอบ

ในส่วนของยีน ALP สามารถพบได้ในทุกกลุ่มของสารสกัดที่ใช้ทดสอบ โดยมีแนวโน้มในทิศทางที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นในช่วงระยะเวลาวันที่ 4 และ 7 และมีแนวโน้มลดลงในช่วงวันที่ 10 ยกเว้นในกลุ่ม White ProRoot[®] MTA ที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในวันที่ 10 เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มของสารสกัดที่ใช้ทดสอบในช่วงระยะเวลาเดียวกัน ผลพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ในทุกช่วงระยะเวลาของการทดสอบ โดยกลุ่ม GIC-CS จะพบยีน ALP ในปริมาณที่มากกว่ากลุ่ม White ProRoot[®] MTA ในวันที่ 4 และน้อยกว่าในวันที่ 7 และ 10 (ตาราง 7, ภาพประกอบ 22)

ตาราง 7 การแสดงออกของยีน ALP จากการกระตุ้นของสารสกัดที่ใช้ทดสอบ

สารสกัดทดสอบ	วันที่ 4	วันที่ 7	วันที่ 10
DMEM free serum	0.0031900±0.0013426	0.0150333±0.0064299	0.0613000±0.0285816
DMEM with 10% FBS	0.0037867±0.0030401	0.0093300±0.0092523	0.0172967±0.0294478
White ProRoot [®] MTA	0.0001186±0.0000780 ^a	0.0004210±0.0002511 ^a	0.0004240±0.0002037 ^a
GIC-CS	0.0002737±0.0001136 ^a	0.0003420±0.0002719 ^a	0.0002840±0.0002432 ^a
CaSiO ₃	0.0001228±0.0000568 ^a	0.0002217±0.0000826 ^a	0.0001706±0.0002365 ^a
Ketac [™] Molar	0.0002997±0.0001257 ^a	0.0003523±0.0001493 ^a	0.0000091±0.0000056 ^a

ตรวจนับที่เหมือนกัน: ไม่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มของสารสกัดที่ใช้ทดสอบในช่วงระยะเวลาเดียวกัน (P>0.05)



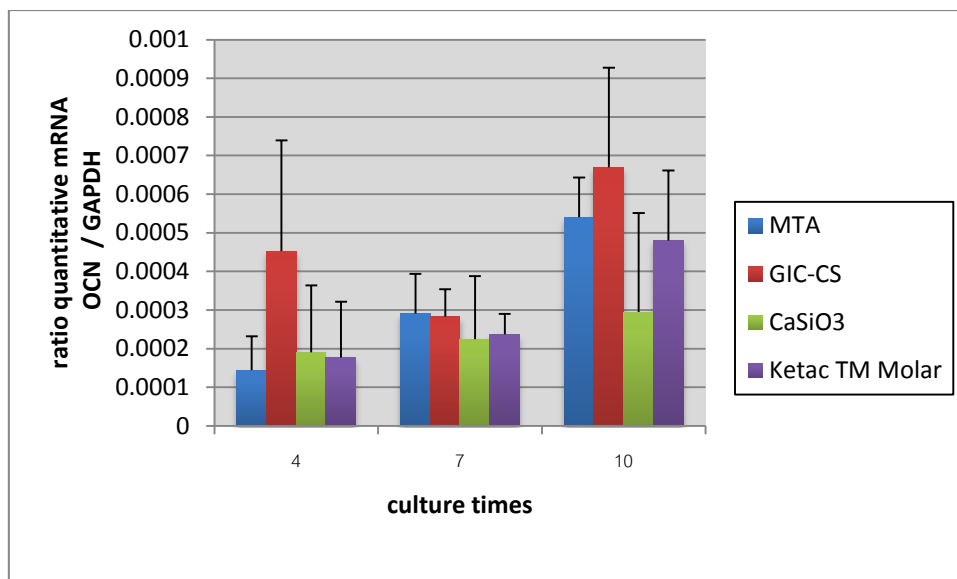
ภาพประกอบ 22 การแสดงออกของยีน ALP จากการกระตุ้นของสารสกัดที่ใช้ทดสอบ

ในส่วนของยีน OCN จะพบว่าในทุกกลุ่มของสารสกัดที่ใช้ทดสอบ มีแนวโน้มในทิศทางที่เพิ่มขึ้นตามช่วงระยะเวลา 4 7 และ 10 วัน เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มของสารสกัดที่ใช้ทดสอบในช่วงระยะเวลาเดียวกัน ผลพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ในทุกช่วงระยะเวลาของการทดสอบ โดยกลุ่ม GIC-CS จะพบยีน OCN ในปริมาณที่มากกว่ากลุ่ม White ProRoot[®] MTA ในวันที่ 4 และ 10 และพบปริมาณใกล้เคียงกันในวันที่ 7 (ตาราง 8, ภาพประกอบ 23)

ตาราง 8 การแสดงออกของยีน OCN จากการกระตุ้นของสารสกัดที่ใช้ทดสอบ

สารสกัดทดสอบ	วันที่ 4	วันที่ 7	วันที่ 10
DMEM free serum	0.0003913±0.0000851	0.0014623±0.0010574	0.3084567±0.5233906
DMEM with 10% FBS	0.0045475±0.0069073	0.0475000±0.0175236	0.0843483±0.0738067
White ProRoot [®] MTA	0.0001441±0.0000882 ^a	0.0002907±0.0001034 ^a	0.0005407±0.0001027 ^a
GIC-CS	0.0004527±0.0002864 ^a	0.0002827±0.0000710 ^a	0.0006700±0.0002574 ^a
CaSiO ₃	0.0001904±0.0001736 ^a	0.0002243±0.0001639 ^a	0.0002950±0.0002565 ^a
Ketac [™] Molar	0.0001772±0.0001445 ^a	0.0002370±0.0000528 ^a	0.0004800±0.0001814 ^a

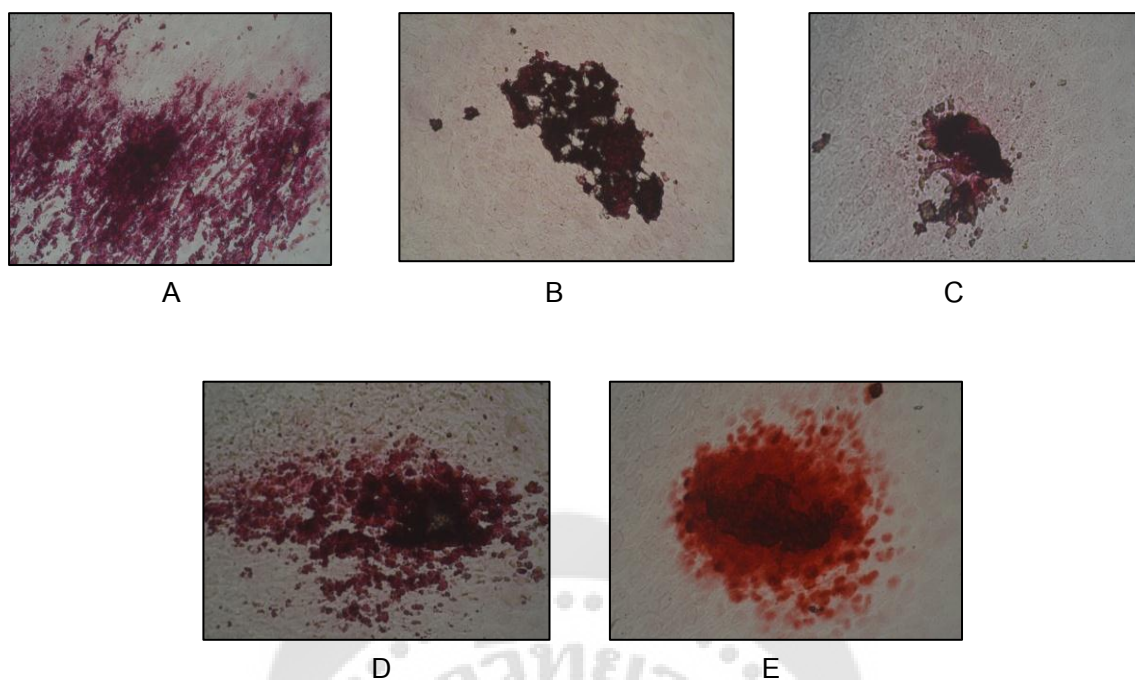
ดรรชนีบนที่เหมือนกัน: ไม่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มของสารสกัดที่ใช้ทดสอบในช่วงระยะเวลาเดียวกัน ($P>0.05$)



ภาพประกอบ 23 การแสดงออกของยีน OCN จากการกระตุ้นของสารสกัดที่ใช้ทดสอบ

การประเมินการสะสมของแร่ธาตุ

จากผลการทดสอบวัดการสะสมของแร่ธาตุ โดยทำการกระตุ้นเซลล์เนื้อเยื่อในฟันมนุษย์ด้วยสารสกัดในแต่ละกลุ่มเมื่อทำการเจือจางในอัตราส่วน 1:1 จากความเข้มข้นสูงสุดของการทดสอบเป็นระยะเวลา 28 วัน พบว่าในทุกกลุ่มของสารสกัดที่ใช้ทดสอบและกลุ่มควบคุมบวกในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี FBS ร้อยละ 10 จะมีการย้อมติดสีอะลิซาริน เรด เนื่องมาจากการสร้างแคลเซียม โดยจะพบการติดสีในบริเวณส่วนกลางของจานพลาสติกเลี้ยงเซลล์มากกว่าในบริเวณที่อยู่โดยรอบ (ภาพประกอบ 24) ในขณะที่กลุ่มควบคุมลบในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM free serum จะไม่พบการย้อมติดสีอะลิซาริน เรด จากการสะสมของแร่ธาตุ (ไม่แสดงข้อมูล)



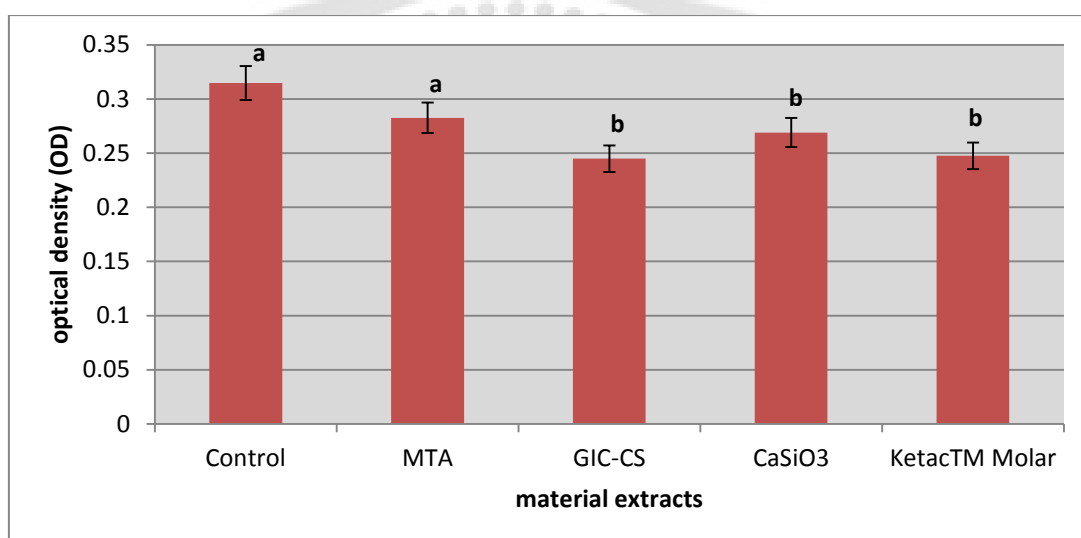
ภาพประกอบ 24 ลักษณะการยึดมติดิสอีซาริน เรด เนื่องมาจากการสร้างแคลเซียม จากการกระตุ้นด้วยสารสกัดชนิดต่างๆที่ช่วงระยะเวลา 28 วัน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ดูความเปลี่ยนแปลงเฟส (200x). (A) กลุ่มควบคุม, (B) White ProRoot[®] MTA, (C) GIC-CS, (D) CaSiO₃, (E) Ketac[™] Molar.

ซึ่งในภายหลังเมื่อทำการทดสอบวัดปริมาณการยึดมติดิสอีซาริน เรด โดยการละลายด้วยสารละลายซิติลไพริดีเนียมคลอไรด์ แล้ววัดค่าระดับความทึบแสงที่ความยาวคลื่นแสง 550 นาโนเมตร โดยผลพบว่ากลุ่มควบคุมบวกในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี FBS ร้อยละ 10 จะมีค่าระดับความทึบแสงที่มากกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.005$) ยกเว้นในกลุ่ม White ProRoot[®] MTA ที่มีค่ามากกว่าอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ในขณะที่กลุ่ม GIC-CS และกลุ่ม Ketac[™] Molar จะมีค่าระดับความทึบแสงที่ใกล้เคียงกันและมีค่าน้อยกว่าในกลุ่มของ White ProRoot[®] MTA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) และกลุ่มของ CaSiO₃ อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) (ตาราง 9, ภาพประกอบ 25)

ตาราง 9 ค่าระดับความทึบแสงจากการทดสอบวัดการสะสมของแร่ธาตุ

สารสกัด ทดสอบ	กลุ่มควบคุม	White ProRoot [®] MTA	GIC-CS	CaSiO ₃	Ketac [™] Molar
ค่าเฉลี่ย ระดับความ ทึบแสง	0.314750 ± 0.0563855 ^a	0.282625 ± 0.0447260 ^a	0.244833 ± 0.0363170 ^b	0.269000 ± 0.0398519 ^b	0.247500 ± 0.0368640 ^b

ดรรชนีบนที่แตกต่างกัน: มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



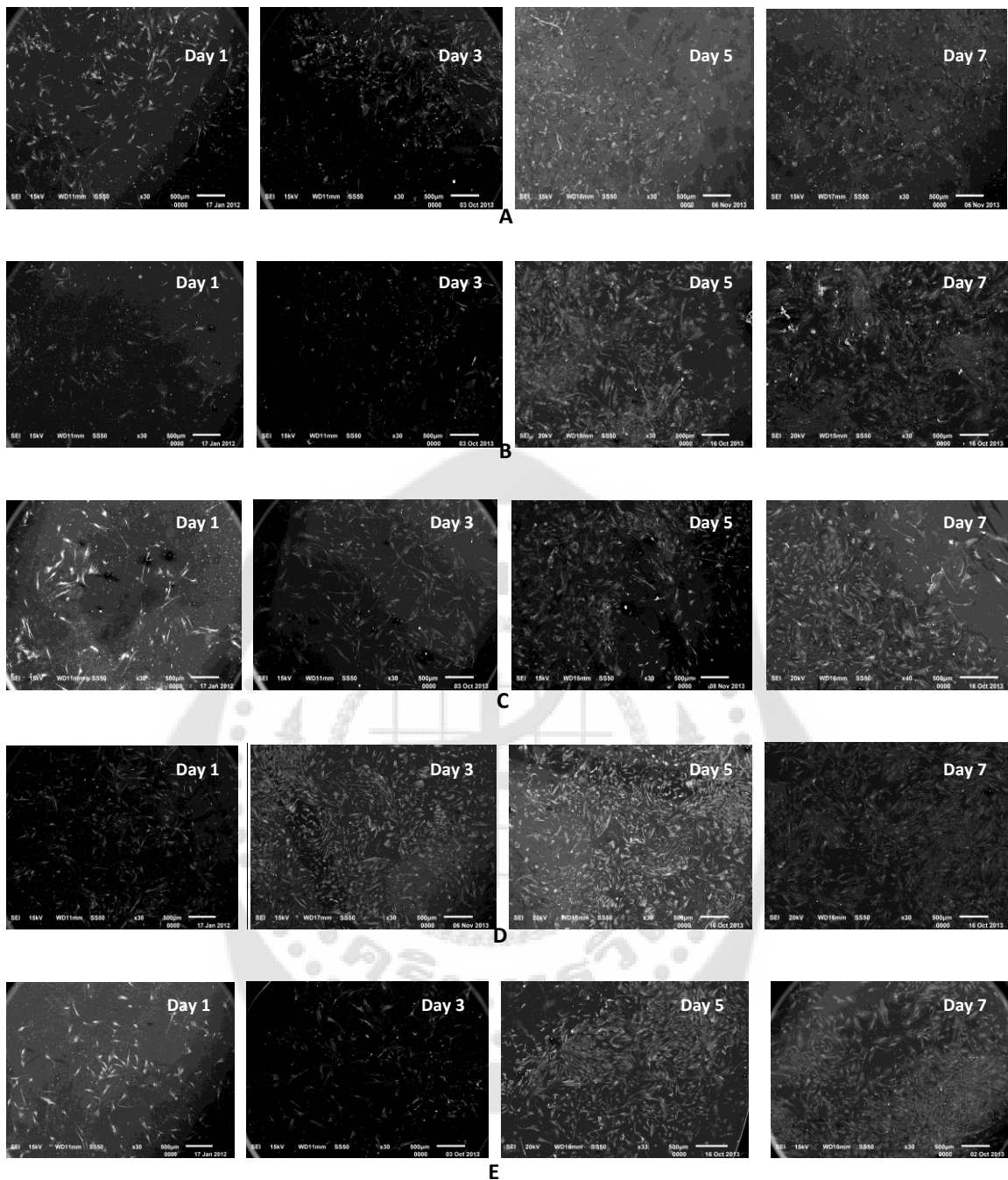
ภาพประกอบ 25 ค่าระดับความทึบแสงจากการทดสอบวัดการสะสมของแร่ธาตุ

(n=24 / สารทดสอบ)

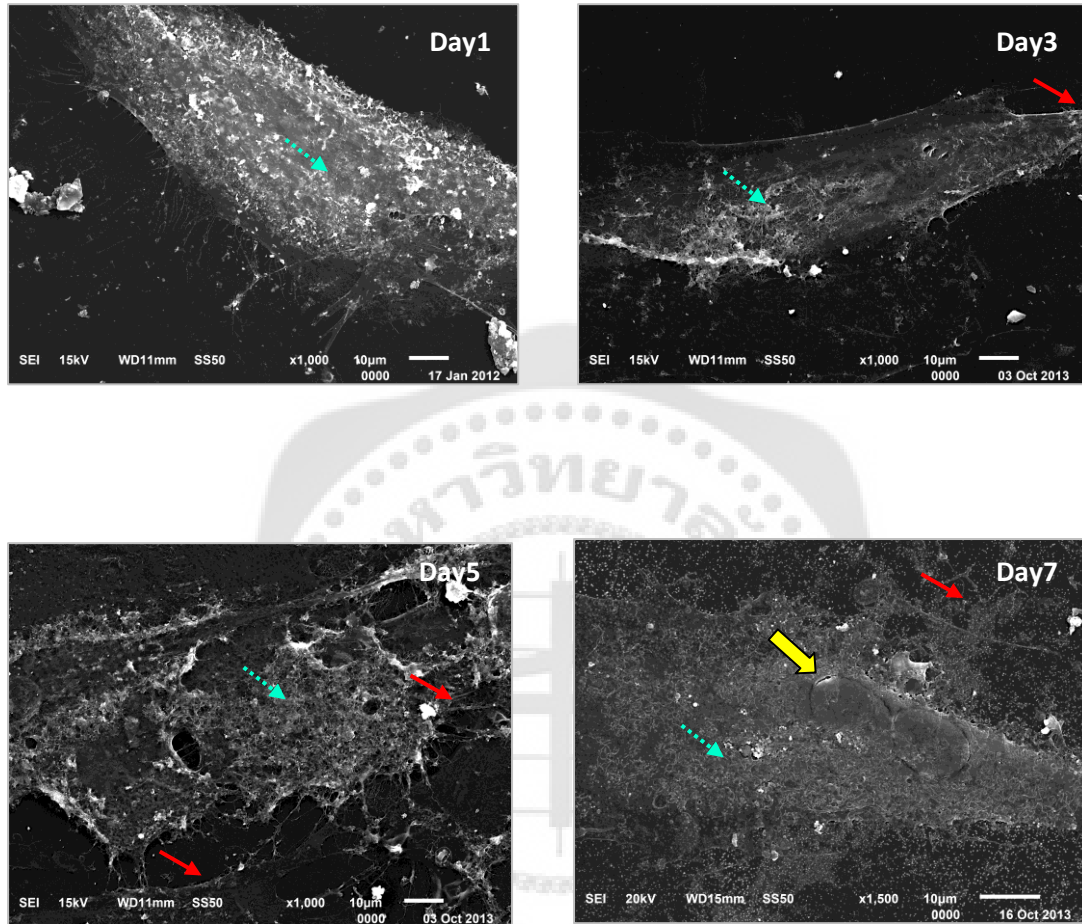
สัญลักษณ์ที่แตกต่างกัน: มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

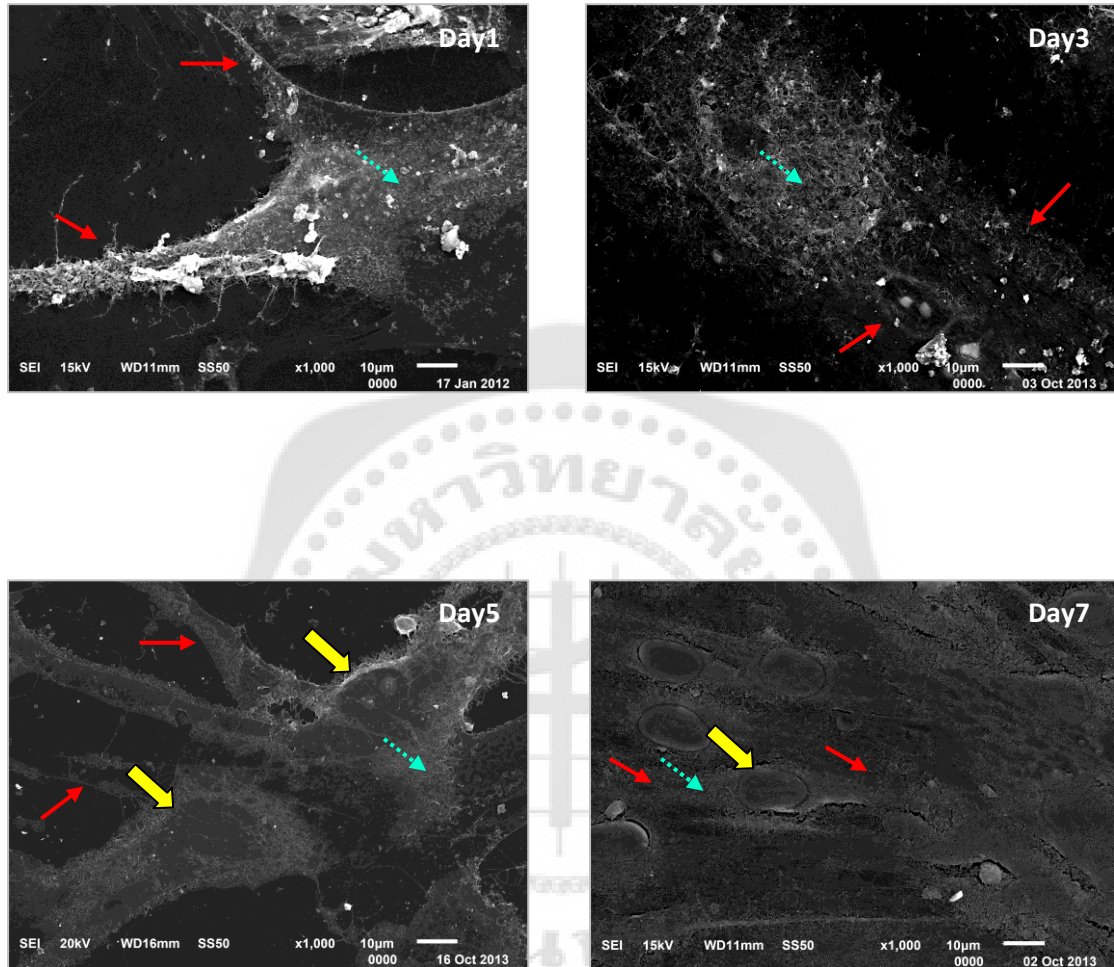
จากการเตรียมชิ้นตัวอย่างบนแผ่นแก้วสำหรับการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด วิเคราะห์ถึงลักษณะรูปร่างของเซลล์เพื่อยืนยันผลการศึกษาด้วยวิธี MTT ถึงความมีชีวิตอยู่รอดของเซลล์ ผลพบว่าที่กำลังขยาย 30 เท่า ในทุกกลุ่มของสารสกัดที่ใช้ทดสอบเมื่อทำการกระตุ้นเซลล์เนื้อเยื่อในฟันมนุษย์ มีผลให้เซลล์ยึดเกาะติดบนแผ่นแก้ว เกิดกระบวนการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้น ตามช่วงระยะเวลาวันที่ 1 3 5 และ 7 วัน จากส่วนกลางของแผ่นแก้วขยายออกสู่บริเวณที่อยู่โดยรอบ (ภาพประกอบ 26) ซึ่งในภายหลังเมื่อทำการศึกษาถึงลักษณะโครงสร้างของเซลล์ในแต่ละกลุ่มทดสอบที่กำลังขยาย 1000 เท่า ผลพบว่าเซลล์จะมีการพัฒนาเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากลักษณะรูปร่างรีแบน เรียวแหลม คล้ายเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Fibroblast cells) ในช่วงแรก ไปเป็นเซลล์ที่มีลักษณะรูปร่างกลม นิวเคลียส (Nucleus) ชัดเจน อยู่ชิดขอบเซลล์ (Eccentric position) มีโปรโตพลาสซึม (Protoplasm) ล้อมอยู่โดยรอบ ซึ่งจะมีชัยโตพลาสซึม (Cytoplasmic process) จำนวนมาก ยื่นออกจากส่วนของโปรโตพลาสซึมไปเชื่อมกับชัยโตพลาสซึมของเซลล์ข้างเคียง (ภาพประกอบ 27, 28, 29, 30, 31) ในลักษณะของเซลล์มีขั้ว คล้ายคลึงกับลักษณะที่ปรากฏในกระบวนการแปรสภาพไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อฟัน



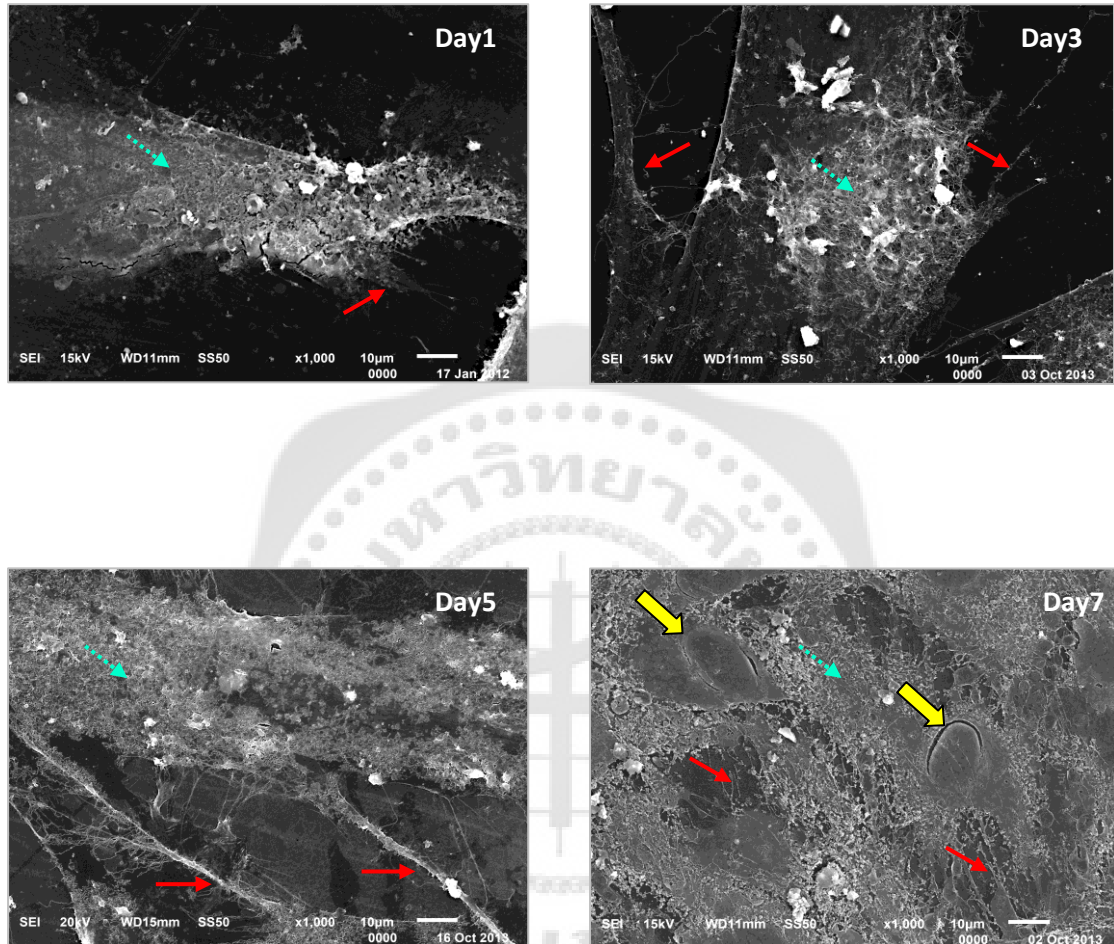
ภาพประกอบ 26 ลักษณะการกระจายตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (30x) ภายหลังจากกระตุ้นด้วยสารสกัดทดสอบเชื้อจากในอัตราส่วน 1:1 ที่ระยะเวลา 1 3 5 และ 7 วัน. (A) White ProRoot[®] MTA, (B) GIC-CS, (C) CaSiO₃, (D) Ketac[™] Molar, (E) กลุ่มควบคุม



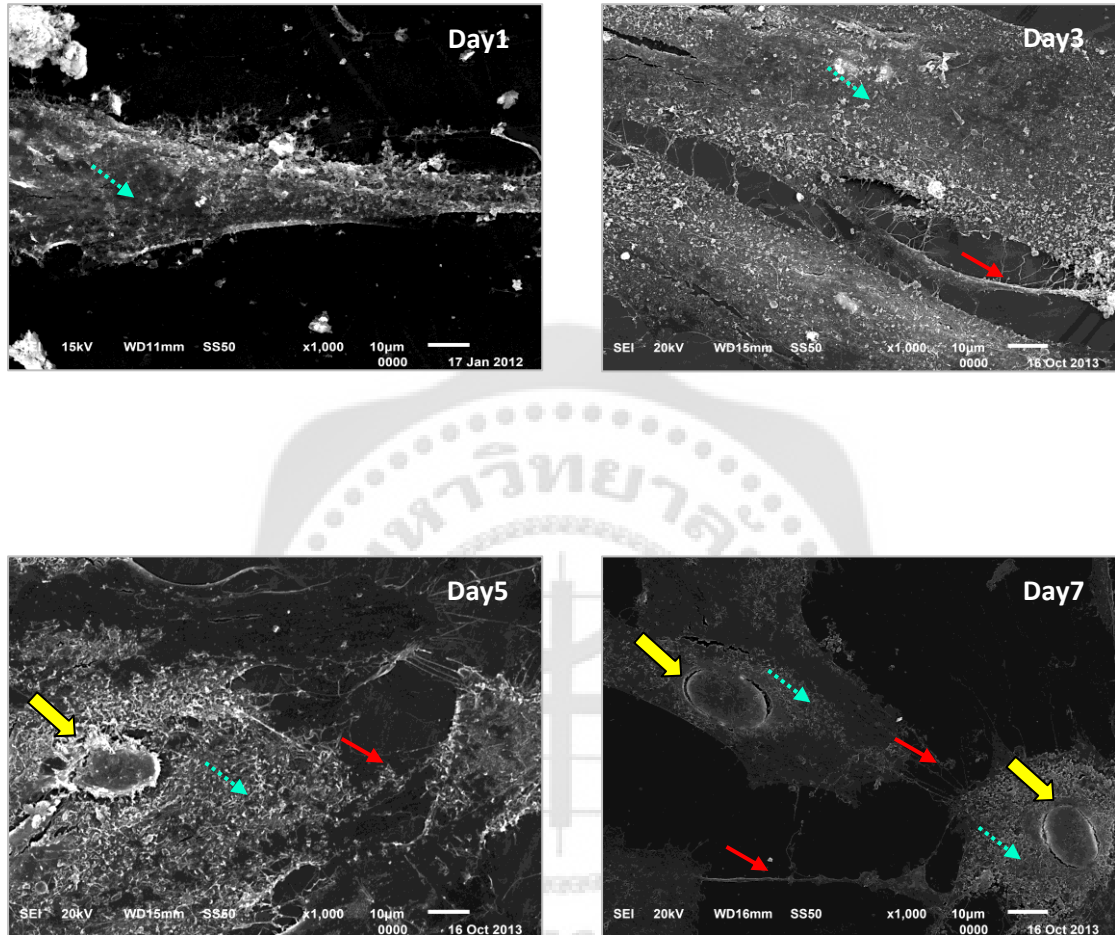
ภาพประกอบ 27 ลักษณะการกระจายตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (1000x) ภายหลังจากกระตุ้นด้วยสารสกัดกลุ่ม White ProRoot[®] MTA ที่ระยะเวลา 1 3 5 และ 7 วัน. ลูกศรใหญ่ แสดงนิวเคลียส, ลูกศรเล็ก แสดงซัยโตพลาสซึมโปรเซส, ลูกศรประ แสดงโปรโตพลาสซึม



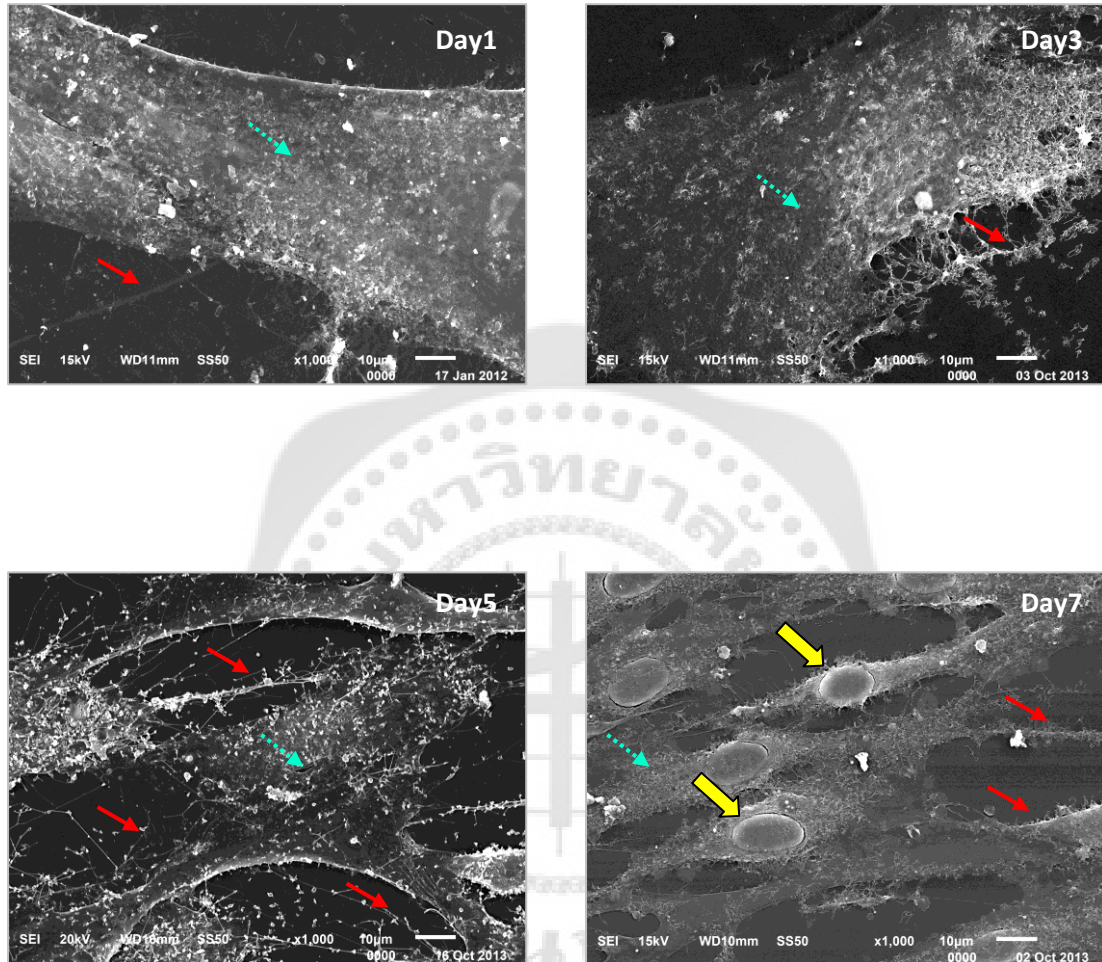
ภาพประกอบ 28 ลักษณะการกระจายตัวของเชลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (1000x) ภายหลังจากกระตุ้นด้วยสารสกัดกลุ่ม GIC-CS ที่ระยะเวลา 1 3 5 และ 7 วัน. ลูกศรใหญ่ แสดงนิวเคลียส, ลูกศรเล็ก แสดงซัยโตพลาสซึมไมโครเชลล์, ลูกศรประ แสดงโปรโตพลาสซึม



ภาพประกอบ 29 ลักษณะการกระจายตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (1000x) ภายหลังจากกระตุ้นด้วยสารสกัดกลุ่ม CaSiO_3 ที่ระยะเวลา 1 3 5 และ 7 วัน. ลูกศรใหญ่ แสดงนิวเคลียส, ลูกศรเล็ก แสดงซัยโตพลาสซึมโปรเซส, ลูกศรประ แสดงโปรโตพลาสซึม



ภาพประกอบ 30 ลักษณะการกระจายตัวของเชลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (1000x) ภายหลังจากกระตุ้นด้วยสารสกัดกลุ่ม Ketac™ Molar ที่ระยะเวลา 1, 3, 5 และ 7 วัน. ลูกศรใหญ่ แสดงนิวเคลียส, ลูกศรเล็ก แสดงซัยโตพลาสซึมไมโครเชลล์, ลูกศรประ แสดงโปรโตพลาสซึม



ภาพประกอบ 31 ลักษณะการกระจายตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (1000x) ภายหลังจากกระตุ้นด้วยสารสกัดกลุ่มควบคุม ที่ระยะเวลา 1 3 5 และ 7 วัน. ลูกศรใหญ่ แสดงนิวเคลียส, ลูกศรเล็ก แสดงซัยโตพลาสซึมโปรเซส, ลูกศรประ แสดงโปรโตพลาสซึม



บทที่ 5

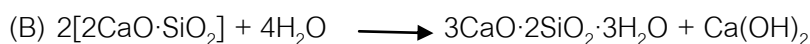
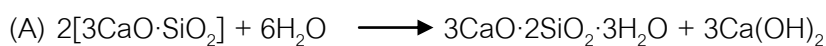
สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

วัตถุประสงค์ของการทำวิจัยในครั้งนี้ เพื่อศึกษาถึงสมบัติของกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ที่มีสารประกอบโมโนแคลเซียมซิลิเกตต่อเซลล์เนื้อเยื่อในฟันมนุษย์ เพื่อที่จะพัฒนานำมาเป็นสารที่ใช้ในการปิดแผลเนื้อเยื่อ โดยสารดังกล่าวจะต้องไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์และยังส่งผลให้เซลล์สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ รวมถึงสมบัติของสารที่จะกระตุ้นให้เซลล์เนื้อเยื่อในฟันมนุษย์เกิดกระบวนการแปรสภาพไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อฟัน ทำหน้าที่สร้างเนื้อเยื่อแข็งในลักษณะของสะพานเนื้อฟันเพื่อเป็นฉนวนปกป้องเนื้อเยื่อในฟันต่อสิ่งเร้าที่จะมากระตุ้นให้เกิดการระคายเคือง โดยในการศึกษานี้จะทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่แยกย่อยจากอวัยวะสิ่งมีชีวิตคือเนื้อเยื่อในฟันมนุษย์ เพื่อหวังผลให้รูปแบบของการศึกษามีความใกล้เคียงกับสภาวะทางคลินิกมากที่สุด สำหรับในส่วนของการทดสอบจะทำการศึกษาในรูปแบบของสารสกัด โดยทำการแช่สารทดสอบในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM free serum เพื่อหวังผลให้เกิดการปลดปล่อยอิออนที่เป็นองค์ประกอบของสารทดสอบสู่อาหารเลี้ยงเซลล์มากที่สุด⁹⁰ ซึ่งองค์ประกอบที่ปลดปล่อยออกมาจากสารทดสอบจะมีผลต่อเซลล์ นำมาซึ่งการศึกษาผลโดยตรงของสารทดสอบที่มีต่อเซลล์เนื้อเยื่อในฟันมนุษย์

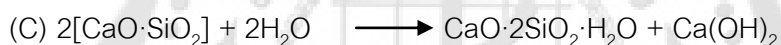
จากผลการทดสอบวัดความเป็นพิษต่อเซลล์ พบว่าสารสกัดในกลุ่ม GIC-CS ที่ความเข้มข้นสูงสุดของการทดสอบ คือ 0.2 g/mL ซึ่งได้เลือกใช้ตามมาตรฐาน International Standard Organization [ISO 10993-12:2007(E)]⁹⁰ โดยเมื่อกระตุ้นเซลล์เนื้อเยื่อในฟันมนุษย์พบว่าไม่เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ เช่นเดียวกับสารสกัดในกลุ่ม KetacTM Molar และกลุ่ม White ProRoot[®] MTA แต่มีผลตรงกันข้ามกับสารสกัดในกลุ่ม CaSiO₃ ที่ความเข้มข้น 0.2 g/mL ซึ่งพบว่าเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์มาก โดยค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์มีค่าน้อยกว่าร้อยละ 70⁹¹

โดยอาจเป็นผลเนื่องมาจากออสโมลาริตี (Osmolarity) ที่มีค่าสูง ซึ่งส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์ ดังการศึกษาของ Finan และ Guilak ในปีค.ศ. 2010⁹² ที่พบว่า การเพิ่มออสโมลาริตีภายนอกเซลล์ที่สูงขึ้นอาจส่งผลให้เซลล์เดี่ยวแตกตาย (Cell apoptosis) และยับยั้งการแสดงออกของยีนรวมถึงกิจกรรมเมตาบอลิก (Metabolic activity)

รวมถึงสารสกัดในกลุ่ม CaSiO_3 ที่ความเข้มข้น 0.2 g/mL อาจมีค่าความเป็นด่างสูง โดยสังเกตได้จากสารสกัดที่เตรียมได้จะมีสีชมพูเข้ม อาจเกิดเนื่องจากการปลดปล่อยแคลเซียมไฮดรอกไซด์และไฮดรอกซิลไอออนจากแคลเซียมไฮดรอกไซด์^{93,94} โดยมีการศึกษาพบว่าสารประกอบในกลุ่มแคลเซียมซิลิเกต ซึ่งได้แก่ ไตรแคลเซียมซิลิเกต ไดแคลเซียมซิลิเกต เมื่อมีปฏิกิริยากับโมเลกุลของน้ำจะเกิดเป็นแคลเซียมซิลิเกตไฮเดรตเจลและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ดังปฏิกิริยาข้างล่าง⁹⁵



อย่างไรก็ตามพบว่ายังไม่มีรายงานการศึกษาถึงระดับค่าความเป็นกรด-ด่าง ของสารประกอบโมโนแคลเซียมซิลิเกตภายหลังจากการแช่ในของเหลว โดยโมโนแคลเซียมซิลิเกตซึ่งเป็นสารประกอบในกลุ่มแคลเซียมซิลิเกต เตรียมจากแคลเซียมไฮดรอกไซด์และเตตราเอซิลออร์โทซิลิเกต โดยใช้ไฮดรอกไซด์เป็นสารที่ทำให้เกิดการตกตะกอนร่วมทางเคมี²⁹ โดยสารที่เป็นองค์ประกอบหลักทางเคมีของโมโนแคลเซียมซิลิเกตคือ แคลเซียมออกไซด์และซิลิคอนไดออกไซด์ (Silicon dioxide / Silica, SiO_2) อาจเกิดปฏิกิริยาดังสมการ



ซึ่งค่าความเป็นด่างสูงอาจเป็นสาเหตุให้เกิดการตายของเซลล์ สอดคล้องกับการศึกษาของ Beltes และคณะในปีค.ศ. 1995⁹⁶ ที่พบว่าความเป็นด่างสูงจะสลายเซลล์ข้างเคียงและทำลายโปรตีนของอาหารเลี้ยงเซลล์แล้วชักนำให้เซลล์เดี่ยวแตกตายหรือเกิดการตายของเซลล์ขึ้น

โดยผลที่ได้จะมีความแตกต่างจากการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่า สารสกัดในกลุ่ม CaSiO_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.2 g/mL จะกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ที่ได้จากกระดูกมนุษย์ (Human bone-derived cells, HBDC)⁹⁷ อาจเป็นผลเนื่องมาจากความแตกต่างในวัฏภาคเริ่มต้นของ CaSiO_3 ที่ใช้ในการศึกษา โดยในการศึกษานี้จะใช้ $\beta\text{-CaSiO}_3$ ซึ่งมีรูพรุนและพื้นผิวขรุขระ²⁹ แตกต่างจากการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ใช้ $\alpha\text{-CaSiO}_3$ ⁹⁷ ซึ่งมีเนื้อแน่นและพื้นผิวเรียบ²⁹ โดยอนุภาคของเซรามิก (Ceramic) ที่มีเนื้อแน่นและไม่มีจุดบกพร่องจะช่วยลดอัตราการละลายตัว (Dissolution) ของสารลดลง⁹⁸⁻¹⁰¹ ส่งผลให้ค่าความเป็นด่างลดลงจึงไม่เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์

สำหรับในกลุ่ม White ProRoot[®] MTA การแช่สารทดสอบในอาหารเลี้ยงเซลล์ จะทำภายหลังจากการผสมสารครบระยะเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งคาดว่าสารทดสอบจะเกิดการก่อตัวบางส่วนทำให้ความเป็นพิษต่อเซลล์ลดลง สอดคล้องกับการศึกษาของ Saidon และคณะในปีค.ศ. 2003⁵⁴ ซึ่งพบว่าภายหลังจากการก่อตัวของซีเมนต์จะเกิดยับยั้งการตายต่อเซลล์ลดลง รวมทั้งการศึกษาของ De Deus และคณะในปีค.ศ. 2005¹⁰²

สำหรับในกลุ่ม GIC-CS ค่าความเป็นกรดจากการผสมของเหลว Ketac™ Molar อาจถูกทำให้เป็นกลาง (Neutralized) ด้วยความเป็นด่างของ CaSiO_3 ที่เกิดขึ้นในขั้นตอนของการผสมสาร

ส่วนในกลุ่ม Ketac™ Molar ความเป็นพิษอาจจะมีมากเฉพาะในช่วงแรกที่เกิดปฏิกิริยากกรด-ด่าง ภายหลังจากการผสมสาร ซึ่งในปฏิกิริยาการก่อตัวจะเป็นปฏิกิริยากกรด-ด่าง ระหว่างไอออนที่ปลดปล่อยออกมาจากองค์ประกอบที่เป็นแก้วและส่วนของกรด โดยในช่วงแรกหลังจากผสมเสร็จใหม่ๆ จะมีค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่เป็นกรด ซึ่งจะมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายหลังสารเริ่มจะก่อตัวสมบูรณ์ ภายหลังจากนั้นความเป็นพิษจะค่อยๆ ลดลง โดยความเป็นพิษมักจะเกิดจากองค์ประกอบที่เป็นโลหะที่ปลดปล่อยออกมาสู่อาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งมีการศึกษาพบว่าองค์ประกอบที่เป็นโลหะจากวัสดุที่ใช้ในงานด้านบูรณะอาจมีความเป็นพิษต่อเซลล์โดยความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidative stress)¹⁰³ แต่มีการศึกษาพบว่าปริมาณไอออนที่พบใน Conventional GIC เช่น ฟลูออไรด์ ไอออน อะลูมิเนียมไอออน (Al^{3+}) สตรอนเทียมไอออน (Sr^{2+}) ซิงค์ไอออน (Zn^{2+}) จะมีปริมาณเพียงเล็กน้อยที่จะส่งผลให้เกิดความเป็นพิษ เมื่อเทียบกับเรซินโมโนเมอร์ที่ไม่เกิดปฏิกิริยาในส่วนของ RMGIC ที่จะก่อให้เกิดความเป็นพิษสูงกว่า⁸¹

โดยการศึกษาของ de Souza Costa และคณะในปีค.ศ. 2003⁸¹ ที่พบว่าในกลุ่ม Conventional GIC (Ketac™ Molar) จะเกิดความเป็นพิษน้อยกว่าในกลุ่ม RMGIC (Fuji II LC, Vitremer, Vitrebond) เมื่อทำการทดสอบใน MDPC-23 รวมถึงสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่า Conventional GIC จะส่งผลทำให้เกิดการทำลายต่อเซลล์เนื้อเยื่อในฟันเพียงเล็กน้อย¹⁰⁴⁻¹⁰⁶

สำหรับในการศึกษานี้จะทำการทดสอบวัดความเป็นพิษต่อเซลล์ ด้วยวิธีทดสอบเอ็มทีที [MTT assay, (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)] โดย Tim Mosman¹⁰⁷ ซึ่งจะทำการบันทึกการเปลี่ยนแปลงของสี (Colormetric) โดยเซลล์ที่มีชีวิตจะมีการทำงานของเอนไซม์ซักซินิเดไฮโดรจีเนส (Succinyl dehydrogenase)¹⁰⁸ จากการมีกิจกรรมไมโทคอนเดรีย (Mitochondria activity) ซึ่งจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีจากสีเหลืองของ MTT ไปเป็นสีน้ำเงินเข้มของผลึกฟอร์มazan (Formazan crystal) โดยจะเห็นการเปลี่ยนแปลงเมื่อทำการละลายสารฟอร์มazan ด้วย DMSO ผ่านการใช้เครื่องสั่น ภายหลังจากนั้นทำการอ่านค่าระดับความทึบแสงด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง โดยปริมาณของฟอร์มazan ที่ปรากฏจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและมีการทำงานของเซลล์ ซึ่งข้อดีของ MTT คือ ไม่มีสารกัมมันตรังสี ทำได้ง่าย รวดเร็ว แม่นยำ ให้ข้อมูลจำนวนมากถึงแม้จะมีปริมาณเซลล์เพียงเล็กน้อย รวมถึงสามารถทำซ้ำได้^{107,108}

แต่อย่างไรก็ตามวิธี MTT ยังมีข้อด้อยที่สำคัญ เนื่องจากจะประเมินการทำงานของเซลล์จากการมีกิจกรรมเมตาบอลิก ที่จะไม่เกิดในเซลล์ตาย (Dead cells) แต่สามารถพบได้ในเซลล์เดี่ยวแตกตาย ซึ่งเป็นระยะทำยาก่อนที่จะเข้าสู่การตายของเซลล์¹⁰⁹ ดังนั้นวิธี MTT อาจประเมินความมีชีวิตของเซลล์ได้ต่ำกว่าความเป็นจริง แต่อาจเป็นวิธีที่เหมาะสมมากในการใช้ทดสอบวัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ซึ่งจะเกิดเฉพาะในเซลล์ที่มีกิจกรรมเมตาบอลิก

โดยจากผลของการทดสอบวัดความเป็นพิษต่อเซลล์ จะเห็นได้ว่าในทุกกลุ่มของสารสกัดทดสอบเมื่อทำการเจือจางสารด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี FBS ร้อยละ 10 ในอัตราส่วน 1:1 จากสารสกัดความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ทดสอบ พบว่าผลของสารสกัดทำให้ค่าความมีชีวิตของเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด รวมถึงสารสกัดในกลุ่ม CaSiO_3 ที่จะไม่เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งอาจเกิดจากออสโมลาริตีและค่าความเป็นกรด-ด่างที่ลดลง ดังนั้นในการทดสอบเพื่อจะดูถึงการมีชีวิตรอดของเซลล์ เกิดกระบวนการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน กระบวนการแปรสภาพ และเกิดการสะสมของแร่ธาตุ จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของสารสกัดที่เจือจางในอัตราส่วน 1:1 ในทุกกลุ่มของสารทดสอบ ซึ่งพบว่าไม่เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ และคาดว่าน่าจะมีปริมาณสารเพียงพอในการที่จะกระตุ้นเซลล์เนื้อเยื่อในฟันมนุษย์ ให้เกิดกระบวนการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน กระบวนการแปรสภาพ และเกิดการสะสมของแร่ธาตุสร้างเนื้อเยื่อแข็งในลักษณะของสะพานเนื้อฟันขึ้นตามวัตถุประสงค์ของการศึกษา

ซึ่งจากผลการทดสอบวัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ พบว่าสารสกัดในกลุ่ม GIC-CS ทำให้เกิดกระบวนการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ ที่ศึกษาในสารประกอบกลุ่มแคลเซียมซิลิเกต เช่น ไดแคลเซียมซิลิเกต¹¹⁰ ไตรแคลเซียมซิลิเกต⁶⁸ โดยจากผลการศึกษาที่ได้ อาจเนื่องมาจากบทบาทของแคลเซียมไอออนและซิลิคอนไอออน ที่จะกระตุ้นให้เซลล์เกิดกระบวนการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน ตามสมมุติฐานของ Valerio และคณะในปีค.ศ. 2004¹¹¹ และผลการศึกษายืนยันโดย Zanini และคณะในปีค.ศ. 2012¹⁹

โดยบทบาทของซิลิคอนไอออน ที่อาจจะกระตุ้นกระบวนการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ผ่านกลไกของกระบวนการเมตาบอลิซึม สังเคราะห์คอลลาเจน การสะสมแร่ธาตุของกระดูก การสร้างโครงตาข่ายเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Connective tissue cross-link)¹¹² ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Shie และคณะในปีค.ศ. 2012¹¹³ ที่พบว่าปริมาณซิลิคอนไอออนจากสารประกอบแคลเซียมซิลิเกตในปริมาณที่มากขึ้นจะทำให้เซลล์เกิดกระบวนการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน รวมถึงกระบวนการแปรสภาพเพิ่มขึ้น

สำหรับบทบาทของแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่อาจจะกระตุ้นกระบวนการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ มีการศึกษาของ Eklou-Kalonji และคณะในปีค.ศ. 1998¹¹⁴ ที่พบว่าการเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของแคลเซียมไฮดรอกไซด์จะเพิ่มการเคลื่อนที่ของเซลล์สร้างกระดูก กระบวนการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน และการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีนที่เป็นตัวบ่งชี้ของกระบวนการแปรสภาพ (Differentiation marker) บางตัว รวมถึงสอดคล้องกับการศึกษาของ Takita และคณะในปีค.ศ. 2006¹¹⁵ ที่พบว่าระดับของแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่มากขึ้นจะกระตุ้นให้เซลล์เกิดกระบวนการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้นโดยจะพบใน MTA มากกว่าใน Dycal[®]

ในส่วนของ Ketac[™] Molar ที่มีองค์ประกอบของส่วนผงเป็นแคลเซียมฟลูออโรไฮดรอกไซด์ในซิลิเกต ซึ่งมีทั้งแคลเซียมไฮดรอกไซด์และซิลิโคนไฮดรอกไซด์ ดังนั้นจึงอาจมีสมบัติชีวเคมีที่กระตุ้นเซลล์เนื้อเยื่อในฟันมนุษย์ให้เกิดกระบวนการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้เช่นเดียวกับกลุ่ม White ProRoot[®] MTA CaSiO₃ และ GIC-CS โดยค่าระดับความทึบแสงที่วัดได้ในกลุ่ม Ketac[™] Molar จะมีค่ามากกว่าในกลุ่ม White ProRoot[®] MTA เนื่องจากใน White ProRoot[®] MTA มีองค์ประกอบที่เป็นโลหะ เช่น อะลูมินา เหล็ก อยู่ในส่วนประกอบในปริมาณที่มากกว่าที่พบใน Ketac[™] Molar ซึ่งอาจมีผลต่อเซลล์ที่จะมีกิจกรรมเมตาบอลิซึม เกิดกระบวนการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน⁹⁴

จากผลการทดสอบที่ได้ในงานวิจัยนี้ ได้ทำการทดสอบวัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ด้วยวิธี MTT ซึ่งเป็นวิธีประเมินที่ดูจากกิจกรรมเมตาบอลิซึมของเซลล์ ซึ่งจะเกิดเฉพาะในเซลล์มีชีวิตที่มีการทำงานเท่านั้น โดยข้อมูลที่ได้จะเป็นเชิงปริมาณ (Quantitative)

ในขณะที่การศึกษาดังกล่าวด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด นับเป็นอีกหนึ่งวิธีที่ใช้ในการทดสอบดูความมีชีวิตของเซลล์ ซึ่งข้อมูลที่ได้จะเป็นเชิงพรรณนา ให้รายละเอียดในลักษณะรูปร่างโครงสร้างของเซลล์ จะเป็นการให้ข้อมูลเพิ่มเติมจากการทดสอบด้วยวิธี MTT ที่ให้ข้อมูลเชิงปริมาณ โดยผลที่ได้จากการทดสอบแสดงให้เห็นถึงลักษณะการมีชีวิตและโครงสร้างของเซลล์เนื้อเยื่อในฟัน รวมถึงความสัมพันธ์กับเซลล์ข้างเคียง ในการที่จะเกิดกระบวนการแปรสภาพไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อฟันได้

สำหรับในการทดสอบสารสกัดเพื่อกระตุ้นเซลล์เนื้อเยื่อในฟันมนุษย์ให้เกิดกระบวนการแปรสภาพไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อฟัน โดยทำการวิเคราะห์จากการแสดงออกของยีนซึ่งเป็นส่วนของโปรตีนที่ไม่มีคอลลาเจน ผลการทดสอบพบว่าในทุกกลุ่มของสารสกัดที่ใช้ทดสอบจะพบการแสดงออกของยีน

- ALP พบมากในช่วงระยะเวลาวันที่ 4 และ 7 ของการทดสอบ โดย ALP จะเป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญในช่วงแรกของการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างกระดูกในการสร้างเนื้อเยื่อแข็ง¹¹⁰ ซึ่งจะมีการแสดงออกที่ลดลงในช่วงท้ายของกระบวนการสะสมแร่ธาตุ สอดคล้องกับการศึกษาของ Zanini และคณะในปีค.ศ. 2012¹⁹

- OCN พบมากสุดในช่วงระยะเวลาวันที่ 10 โดย OCN จะเป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญในช่วงท้ายของกระบวนการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างกระดูกในการสร้างเนื้อเยื่อแข็ง¹¹⁶ โดย OCN จะพบในกระดูกและเนื้อฟัน ซึ่งสามารถถูกสร้างได้ในเพียงเซลล์สร้างกระดูก เซลล์สร้างเนื้อฟัน และเซลล์สร้างเคลือบรากฟันที่สมบูรณ์ (Mature osteoblast, Mature odontoblast, Mature cementoblast)¹¹⁷ โดยมีหลายการศึกษาที่พบว่าปริมาณความเข้มข้นของแคลเซียมไอออนภายนอกเซลล์จะมีผลต่อปริมาณ OCN ในเซลล์เนื้อเยื่อในฟันมนุษย์^{94,118,119}

- DSP พบมากในช่วงระยะเวลาวันที่ 4 และ 7 ของการทดสอบ และจะลดลงในช่วงระยะเวลาวันที่ 10 โดย DSP จะเป็นส่วนของโปรตีนที่ไม่มีคอลลาเจน พบได้เฉพาะในโครงสร้างของฟัน สามารถสร้างได้เฉพาะในส่วน of เซลล์สร้างเนื้อฟันและเซลล์สร้างเคลือบฟันที่ไม่สมบูรณ์ (Preamoeloblast) แต่จะไม่มีในส่วน of เซลล์สร้างเคลือบฟัน (Amoeloblast) รวมถึงเซลล์ชนิดอื่น¹²⁰ มีบทบาทที่สำคัญในช่วงแรกของการสร้างเนื้อฟันและเคลือบฟัน ทำให้เกิดการยึดเกาะของผลึกอะพาไทต์คาร์บอเนต (Carbonate apatite crystal) รอบๆเส้นใยคอลลาเจน (Collagen fibrils) เกิดการเปลี่ยนแปลงจากชั้นก่อนเนื้อฟันที่ไม่มีการสะสมของแร่ธาตุ (Unmineralized predentin) เป็นชั้นเนื้อฟัน¹²¹ ซึ่ง DSP เป็นไกลโคโปรตีนที่มีกรดไซอะลิก (Sialic acid rich glycoprotein)¹²⁰ จะแยกย่อยมาจากการสลายตัวของ DSPP ออกได้เป็นเดนตินฟอสโฟโปรตีน (Dentin phosphoprotein, DPP) และ DSP^{122,123} โดย DSP จะพบในช่วงเริ่มต้นของการสะสมแร่ธาตุในเนื้อฟัน (Dentin mineralization) ในขณะที่ DPP จะพบในช่วงที่สมบูรณ์ของการสะสมแร่ธาตุในเนื้อฟัน¹²¹ สอดคล้องกับการศึกษาของ Peng และคณะในปีค.ศ.2011⁶⁸ ที่พบว่าเมื่อมีการกระตุ้นเซลล์เนื้อเยื่อในฟันด้วยสารสกัดของสารประกอบในกลุ่มแคลเซียมซิติลิกเกต พบว่าจะมีการแสดงออกของยีนซึ่งเป็นส่วนของโปรตีนที่ไม่มีคอลลาเจน เช่น DSPP

• Runx2 เป็นทรานส์คริปชันแฟคเตอร์ ที่มีความจำเพาะเจาะจงของเซลล์สร้างกระดูก (Osteoblast-specific transcription factor) ที่จะเกิดกระบวนการแปรสภาพจากเซลล์เพอริโพเทนท์ มีเซนไคมัล (Pluripotent mesenchymal cells) ไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก¹⁷ รวมถึงเซลล์ที่มีต้นกำเนิดมาจากนิวรัลเครสต์ (Neural crest-derived cells)¹⁸ ที่จะเกิดกระบวนการแปรสภาพไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อฟัน โดย Runx2 จะพบว่ามีความปริมาณมากในช่วงท้ายของกระบวนการแปรสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก แต่จะพบในปริมาณลดลงในช่วงท้ายของกระบวนการแปรสภาพไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อฟัน ดังการศึกษาของ Zanini และคณะในปีค.ศ. 2012¹⁹ ซึ่งจะพบการแสดงออกของยีนมากในช่วงของการเป็นเซลล์ก่อนสร้างเนื้อฟัน และเซลล์สร้างเนื้อฟันที่ไม่สมบูรณ์ แต่จะพบปริมาณที่ลดลงระหว่างช่วงของการสิ้นสุดกระบวนการแปรสภาพ รวมถึงแสดงผลต่อการแสดงออกของยีน DSPP ตามปริมาณของ Runx2 ที่เพิ่มขึ้น¹⁹ แสดงให้เห็นว่าเซลล์เนื้อเยื่อในฟันจะมีส่วนของเซลล์มีเซนไคมัลเข้าสู่กระบวนการแปรสภาพไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อฟัน แต่ไม่ได้เข้าสู่กระบวนการแปรสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก ซึ่งสามารถที่จะช่วยในการระบุถึงสถานะของกระบวนการแปรสภาพในเซลล์เนื้อเยื่อในฟันมนุษย์ แต่มีความแตกต่างจากผลที่ได้จากการศึกษาที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอาจเนื่องมาจากแหล่งที่มาของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันที่ใช้ทดสอบ

จากผลการทดสอบนี้ พบว่าในทุกกลุ่มของสารสกัดที่ใช้ทดสอบ มีการปลดปล่อยซิลิโคนและแคลเซียมไอออน โดยจากการศึกษาของ An และคณะในปีค.ศ. 2012¹²⁴ ที่แสดงให้เห็นว่าแคลเซียมไอออนสามารถจะกระตุ้นเซลล์เนื้อเยื่อในฟันมนุษย์ให้มีการแสดงออกของยีนซึ่งเป็นส่วนของโปรตีนที่ไม่มีคอลลาเจนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างเนื้อฟัน โดยมีการศึกษา¹²⁵ ถึงบทบาทของแคลเซียมไอออนพบว่าสามารถเคลื่อนผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (Cell membrane) ระหว่างขบวนการติโพลาไรเซชันหรือการกระตุ้นของเมมเบรนบาวนด์แคลเซียมแซแนลเฉพาะ⁶⁵ โดยในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Mamalian cells) สามารถที่จะตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงระดับแคลเซียมภายนอกเซลล์เพียงเล็กน้อยผ่านแคลเซียมเซ็นซิงรีเซปเตอร์ (Calcium sensing receptor, CaR) ซึ่งสามารถพบได้ในเซลล์พาราไทรอยด์ (Parathyroid cells) บนต่อมพาราไทรอยด์ (Parathyroid gland) โดยจะทำหน้าที่รักษาสสมดุล (Homeostatic) แคลเซียมไอออนให้อยู่ในระดับปกติ¹²⁶ นอกจากนี้ในเซลล์พาราไทรอยด์แล้ว ในส่วนของเซลล์สร้างกระดูกก็ยังสามารถพบ CaR ได้เช่นกัน ซึ่งจะช่วยคงสภาพความสมบูรณ์ของกระดูก¹²⁶ โดยจะพบได้ในกลุ่มของเซลล์กระดูก (Osteoblastic cell lines) ซึ่งการกระตุ้น CaR (CaR activation) จากการเปลี่ยนแปลงระดับของแคลเซียมในเซลล์เหล่านี้จะส่งเสริมให้เกิดกระบวนการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน กระบวนการแปรสภาพ และกระบวนการสะสมแร่ธาตุ^{126,127}

โดยอาจจะทำหน้าที่เสมือนกับสารที่มีฤทธิ์กระตุ้นให้เซลล์มีการเจริญเติบโตในเซลล์หลายชนิดรอบไขกระดูก (Bone marrow)¹²⁶

ซึ่งสามารถทำการทดสอบยืนยันถึงความสามารถในการสร้างเนื้อฟัน เมื่อกระตุ้นเซลล์เนื้อเยื่อในฟันด้วยสารสกัดที่ต้องการทดสอบ โดยจะทำการย้อมสีอะลิซาริน เรด เพื่อประเมินการสะสมของแร่ธาตุจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ร่วมกับการเหนี่ยวนำโดยใช้ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ กรดแอสคอบิก 10 mmol/mL เบต้ากลีเซอรอเฟสเฟต และ 10^{-8} M เดกซาเมธาโซน ซึ่งคาดว่าจะปริมาณความเข้มข้นของสารที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำเซลล์เนื้อเยื่อในฟันให้เกิดกระบวนการแปรสภาพได้ดีที่สุด^{128,129} ซึ่งผลการทดสอบภายหลังจากการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ดูความเปลี่ยนแปลงต่างเฟส พบว่าเกิดการสะสมของแร่ธาตุในบริเวณส่วนกลางของจานพลาสติกเลี้ยงเซลล์เป็นปริมาณมากเมื่อเทียบกับบริเวณรอบๆ โดยสารสกัดในกลุ่ม GIC-CS สามารถที่จะกระตุ้นเซลล์ให้เกิดการสะสมของแร่ธาตุได้ อาจเนื่องจากมีแคลเซียมอยู่ในสารประกอบแคลเซียมซิลิเกต สอดคล้องกับการศึกษาของ An และคณะในปีค.ศ. 2012¹²⁴ ที่พบว่าปริมาณแคลเซียมไอออนจะมีบทบาทโดยตรงต่อการสร้างปุ่มเมทริกซ์ที่มีการสะสมของแร่ธาตุ (Mineralized matrix nodule formation)

ภายหลังจากนั้นทำการวัดปริมาณการสะสมของแร่ธาตุ โดยละลายการย้อมติดสีอะลิซาริน เรด ด้วยสารละลายซิลิโคฟลูออไรด์เนียมคลอไรด์ แล้ววัดค่าระดับความทึบแสงที่ความยาวคลื่นแสง 550 นาโนเมตร จากผลพบว่าในกลุ่มควบคุมบวกจะมีค่าระดับความทึบแสงที่มากกว่าในกลุ่มของสารสกัดที่ใช้ทดสอบ อาจเนื่องจากในกลุ่มควบคุมบวกนอกจากจะเหนี่ยวนำด้วยสารกระตุ้นการสร้างเนื้อเยื่อแข็งแล้ว ในอาหารเลี้ยงเซลล์จะมีส่วนของ FBS ในปริมาณที่สูงเมื่อเทียบกับกลุ่มทดสอบ ซึ่งอาจจะมีสารที่มีฤทธิ์กระตุ้นให้เซลล์มีการเจริญเติบโต ที่จำเป็นต่อเซลล์เนื้อเยื่อในฟันมนุษย์ให้มีเมตาบอลิซึม เกิดกระบวนการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน กระบวนการแปรสภาพ การสะสมเมทริกซ์ภายนอกเซลล์ และการสะสมของแร่ธาตุมากกว่าในกลุ่มของสารสกัดที่ใช้ทดสอบ ที่ส่วนใหญ่อาจเป็นผลเนื่องจากการปลดปล่อยแคลเซียมไอออน ซึ่งอาจจะไปกระตุ้นเซลล์เนื้อเยื่อในฟันมนุษย์ให้เกิดการหลั่งสารที่มีฤทธิ์กระตุ้นให้เซลล์มีการเจริญเติบโตด้วยเช่นกัน แต่อาจมีปริมาณที่น้อยกว่าเมื่อเทียบกับในกลุ่มควบคุมบวก สอดคล้องกับการศึกษาของ Couble และคณะในปีค.ศ. 2000¹³⁰ ซึ่งพบว่าในกลุ่มที่มีปริมาณความเข้มข้นของ FBS ร้อยละ 15 จะเกิดการสะสมของแร่ธาตุได้มากกว่าในกลุ่มที่มีปริมาณความเข้มข้นของ FBS ร้อยละ 10 ในเซลล์เนื้อเยื่อในฟันมนุษย์ ร่วมกับการเหนี่ยวนำด้วยเบต้ากลีเซอรอเฟสเฟต

ในการทดสอบครั้งนี้ ในกลุ่มสารสกัดที่ใช้ทดสอบและกลุ่มควบคุมบวกซึ่งไม่มีสารสกัดที่ใช้ทดสอบ จำเป็นต้องเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี FBS ร้อยละ 10 เนื่องจากเซลล์เหล่านี้อาจไม่สามารถเพาะเลี้ยงให้มีชีวิตอยู่รอดและเพิ่มจำนวนในระยะเวลานานได้ภายใต้อาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM free serum ดังผลที่เกิดในกลุ่มควบคุมลบในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM free serum ซึ่งเซลล์ไม่สามารถมีชีวิตอยู่รอดและเพิ่มจำนวนให้เกิดกระบวนการสร้างเนื้อเยื่อแข็งขึ้นได้ (ไม่ได้แสดงข้อมูล) โดยจากผลการทดสอบพบว่าในกลุ่ม CaSiO_3 จะมีปริมาณการยับยั้งเซลล์ชีวาริน เรด ในปริมาณที่ใกล้เคียงกลุ่ม White ProRoot[®] MTA อาจเนื่องมาจากเป็นสารประกอบในกลุ่มแคลเซียมซิลิเกตเหมือนกันทำให้มีการปลดปล่อยแคลเซียมออกไซด์ได้ในปริมาณที่มากกว่า ในขณะที่กลุ่ม GIC-CS และ Ketac[™] Molar จะมีการยับยั้งเซลล์ชีวาริน เรด ที่น้อยกว่า อาจเนื่องมาจากมีปริมาณแคลเซียมในองค์ประกอบในปริมาณที่น้อยกว่าซึ่งเป็นส่วนที่จำเป็นในการกระตุ้นการสร้างเนื้อเยื่อแข็ง

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์จะพัฒนาสารชนิดใหม่ด้วยการนำโมโนแคลเซียมซิลิเกตและกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์มาผสมรวมกัน โดยสมบัติข้อเด่นของโมโนแคลเซียมซิลิเกต คือ มีสมบัติชีวภัณฑ์ สามารถเกิดการก่อตัวจากการทำปฏิกิริยากับน้ำ สามารถสร้างผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ได้อย่างรวดเร็วเมื่อสัมผัสกับสารละลาย SBF แต่อย่างไรก็ตามพบว่ามีข้อด้อยที่สำคัญคือ มีความเปราะ และไม่สามารถที่จะผสมกับน้ำกลั่น น้ำเกลือ หรือยาชา ให้มีลักษณะเป็นซีเมนต์ ดังเช่นที่ปรากฏใน White ProRoot[®] MTA โดยจากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าโมโนแคลเซียมซิลิเกตสามารถที่จะขึ้นรูปในลักษณะของซีเมนต์เมื่อนำผสมกับ Ketac[™] Molar⁴⁰ รวมถึงสมบัติข้อเด่นของกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ที่มีปฏิกิริยาการก่อตัวได้เร็วและสามารถทำให้เกิดการยึดติดที่ดีและแนบสนิทกับเนื้อฟันด้วยพันธะทางเคมี สามารถที่จะเกิดการสร้างผลึกฟลูออโรอะพาไทต์กับเนื้อฟันจากการปลดปล่อยฟลูออไรด์ออกไซด์ โดยหวังผลให้สารประกอบดังกล่าวเมื่อนำมาใช้ในกระบวนการปิดแผลเนื้อเยื่อในจะยึดติดกับเนื้อฟันได้ดี มีการปิดผนึกที่แนบสนิทระหว่างตัวสารและส่วนของเนื้อฟัน ภายใต้การรับแรงบดเคี้ยวได้อย่างเหมาะสม สามารถป้องกันการรั่วซึมจากเชื้อโรคซึ่งเป็นปัจจัยที่จะก่อให้เกิดการหายของเนื้อเยื่อในฟัน ซึ่งเซลล์เนื้อเยื่อในฟันที่มีสมบัติเป็นเซลล์ตั้งต้นสามารถที่จะเกิดกระบวนการแปรสภาพไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งในลักษณะของเนื้อฟันซ่อมแซม^{131,132}

โดยในการทดสอบจะให้สารมีการสัมผัสโดยตรงกับเซลล์เนื้อเยื่อในฟันมนุษย์ในรูปแบบของสารสกัดเพื่อจำลองสภาวะของการทดสอบให้ใกล้เคียงกับสภาวะทางคลินิก ซึ่งภายหลังการผสมสารจะปล่อยให้สารก่อตัวเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนทำการแช่สารในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM free serum เพื่อหวังผลให้สารก่อตัวได้บางส่วน อาจจะช่วยลดองค์ประกอบที่ปลดปล่อยออกมาในช่วงแรก ภายหลังการผสมสาร ซึ่งมักจะมีความเป็นพิษจากค่าความเป็นกรด-ด่างที่สูง โดยจะมีค่าลดลงเมื่อสารเริ่มก่อตัวซึ่งจะช่วยลดความเป็นพิษต่อเซลล์ สอดคล้องกับการศึกษาของ Paranjpe และคณะในปีค.ศ. 2011¹³³ ที่พบว่า การทดสอบ MTT โดยให้สารสัมผัสโดยตรงกับเซลล์เนื้อเยื่อในฟันมนุษย์ เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการทดสอบสารที่จะนำมาใช้ในกระบวนการปิดแผลเนื้อเยื่อใน

โดยผลจากการศึกษาวิจัยครั้งนี้พบว่าสารประกอบ GIC-CS มีความเข้ากันได้กับเซลล์เนื้อเยื่อในฟันมนุษย์ โดยไม่เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์และสามารถกระตุ้นให้เซลล์เกิดกระบวนการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน รวมถึงสามารถที่จะเกิดกระบวนการแปรสภาพไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อฟัน ทำหน้าที่สร้างเนื้อเยื่อแข็งในลักษณะของสะพานเนื้อฟันเพื่อปกป้องเนื้อเยื่อในจากสิ่งเร้าที่มากกระตุ้น สอดคล้องกับการศึกษาของ Gronthos และคณะในปีค.ศ. 2000¹³¹ ซึ่งพบว่า DPSC มีสมบัติในการเกิดกระบวนการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน ฟื้นตัวได้เอง (Self renewal) สามารถเกิดกระบวนการแปรสภาพไปเป็นเซลล์ได้หลายชนิด (Multilineage differentiation) รวมถึงเซลล์สร้างเนื้อฟัน โดยภายใต้สภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมจะเกิดการตอบสนองต่อสัญญาณเฉพาะที่อยู่โดยรอบ เกิดการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดใหม่หรือเข้าสู่ขั้นตอนของกระบวนการแปรสภาพ¹³¹

ในปัจจุบัน White ProRoot[®] MTA เป็นสารมาตรฐานที่นิยมนำมาใช้ศึกษาประสิทธิภาพการสะสมแร่ธาตุในเซลล์เนื้อเยื่อในฟันเปรียบเทียบกับสารที่สนใจศึกษา โดยจากผลการศึกษาพบว่าในกลุ่ม White ProRoot[®] MTA มีปริมาณการยับยั้งดีเอสอีซาริน เรด ที่มากกว่าในกลุ่ม GIC-CS กลุ่ม CaSiO₃ รวมถึงกลุ่ม Ketac[™] Molar ซึ่งอาจเกิดเนื่องจากสารตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้มีแคลเซียมไอออนในสารตั้งต้นในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยในส่วนของ White ProRoot[®] MTA ซึ่งมีองค์ประกอบทั้งไดแคลเซียมซิลิเกต และไตรแคลเซียมซิลิเกต ดังนั้นเมื่อแช่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM free serum จะมีผลต่อการปลดปล่อยแคลเซียมไอออน ซึ่งแคลเซียมไอออนจากสารตั้งต้นเหล่านี้อาจมีผลต่อกระบวนการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน กระบวนการแปรสภาพไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อฟันที่จะให้เกิดกระบวนการสร้างเนื้อฟันซ่อมแซม¹³¹ อย่างไรก็ตามการที่ White ProRoot[®] MTA ซึ่งเป็นสารประกอบในกลุ่มแคลเซียมซิลิเกต ที่จะเกิดการละลายตัวสามารถปลดปล่อยไอออนออกมาได้เร็วในการสร้างผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์¹³⁴ ก็อาจจะเป็นข้อดีของการละลายตัวที่สูง อาจทำให้มีแนวโน้มเกิดการรั่วซึมที่สูงในช่วงแรกของการสร้างผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์เกิดการสร้างเนื้อฟัน

ซ่อมแซม ซึ่งความสามารถในการปิดแนบสนิทจะเป็นปัจจัยสำคัญเมื่อพิจารณาผลสำเร็จการหายจากกระบวนการปิดแผลเนื้อเยื่อใน ถึงแม้ว่าในกลุ่ม White ProRoot® MTA จะมีประสิทธิภาพในการสร้างเนื้อเยื่อแข็งที่มากกว่าในกลุ่ม GIC-CS แต่เมื่อพิจารณาสมบัติข้อดีของ GIC-CS ซึ่งมีองค์ประกอบของกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ที่สามารถยึดติดกับเนื้อฟันด้วยพันธะทางเคมี ดังนั้น GIC-CS อาจพิจารณาเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่เหมาะสมในการนำมาปิดแผลเนื้อเยื่อใน

สรุปผลการศึกษา

สารประกอบ GIC-CS ไม่เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อในฟันมนุษย์ โดยไม่แตกต่างจาก White ProRoot® MTA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) สามารถกระตุ้นให้เกิดกระบวนการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์มากกว่า White ProRoot® MTA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.001$) ที่ช่วงระยะเวลาวันที่ 3 5 และ 7 มีการแสดงออกของยีนที่เป็นตัวบ่งชี้ของการการแปรสภาพไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อฟันที่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ White ProRoot® MTA ทุกช่วงระยะเวลาของการศึกษา และมีความสามารถในการสร้างเนื้อเยื่อแข็งจากการทดสอบวัดการสะสมของแร่ธาตุที่น้อยกว่า White ProRoot® MTA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.005$) อย่างไรก็ตามในงานการศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาทางชีวภาพของสารที่มีต่อเซลล์เนื้อเยื่อในฟัน จำเป็นต้องมีการศึกษาเปรียบเทียบในด้านอื่นๆ ไม่ว่าจะเป็นทางกายภาพ (Physical) เคมี (Chemical) รวมถึงการศึกษาทางชีวภาพในส่วนอื่นๆ เพิ่มเติม เช่น บทบาทต่อสารที่มีฤทธิ์กระตุ้นให้เซลล์มีการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ รวมถึงการหลังไซโตไคน์ ที่มีผลต่อกระบวนการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและกระบวนการแปรสภาพของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อฟัน





บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

1. Shröder U. Effect of calcium hydroxide-containing pulp capping agents on pulp cell migration, proliferation, and differentiation. *J Dental Res* 1985; 64: 541-8.
2. Mjor IA, Dahl E, Cox CF. Healing of pulp exposure: an ultrasonic study. *J Oral Pathol Med* 1991; 20: 496-501.
3. Abedi HR, Ingle JI . Mineral trioxide aggregate: a review of new cement . *J Calif Dent Assoc* 1995; 23: 36-9.
4. Smith AJ, Cassidy N, Perry H, Begue-Kirn C, Ruch JV, Lesot H. Reactionary dentinogenesis. *Int J Dev Biol* 1995; 39: 273-80.
5. Fitzgerald M, Chiego DJ Jr, Heys DR. Autoradiograph analysis of odontoblast replacement following pulp exposure in primate teeth . *Arch Oral Biol* 1990; 35: 707-15.
6. Ferracane JL, Cooper PR, Smith AJ. Can interaction of materials with the dentin-pulp complex contribute to dentin regeneration?: review article. *Odontology* 2010; 98: 2-14.
7. Guven EP, Yalvac ME, Sahin F, Yazici MM, Rizvanov AA, Bayirli G. Effect of dental materials calcium hydroxide-containing cement, mineral trioxide aggregate, and enamel matrix derivative on proliferation and differentiation of human germ stem cells. *J Endod* 2011; 37: 650-6.
8. Minamikawa H, Yamada M, Deyama Y, Suzuki K, Kaga M, Yakawa Y, et al. Effect of N-acetylcysteine on rat dental pulp cells cultures on mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2011; 37: 637-41.
9. Tonomura A, Mizuno D, Hisada A, Kuno N, Ando Y, Sumita Y, et al. Differential effect scaffold shape on dentin regeneration. *Ann Biomed Eng* 2010; 38: 1664-71.
10. Tziafas D. Basic mechanism of cytodifferentiation and dentinogenesis during dental pulp repair. *Int J Dev Biol* 1995; 39: 281-90.

11. Mathieu S, El-Battari A, Dejou J, About A. Role of endothelial cells in the recruitment of human pulp cells. *Arch Oral Biol* 2005; 50: 109-13.
12. Butter WT. Dentin matrix proteins and dentinogenesis. *Connect Tissue Res* 1995; 33: 59-65.
13. Zhang W, Walboomers XF, van Osch GJ, van den Dolder J, Jansen JA. Hard tissue formation in a porous HA/TCP ceramic scaffold loaded with stroma cell derived from dental pulp and bone marrow. *Tissue Eng Part A* 2008; 14: 285-94.
14. Paranjpe A, Cacalno NA, Hume WR, Jewett A. N-acetylcysteine protect dental pulp stroma cells from HEMA-induced apoptosis by inducing differentiation of the cells. *Free Radic Bio Med* 2007; 43: 1394-408.
15. Mantellini MG, Botero T, Yaman P, Denisson JB, Hanks CT, Nör JE. Adhesive resin and the hydrophilic monomer HEMA induce VEGF expression on dental pulp cells and macrophages. *Dent Mater* 2006; 22: 434-40.
16. Rashid F, Shiba H, Mizuno N, Mouri Y, Fujita T, Shinohara H, et al. The effect of extracellular calcium ion gene expression of bone-related proteins in human pulp cell. *J Endod* 2003; 29: 104-7.
17. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *osf2/cbfa1*: a transcription activator of osteoblast differentiation. *Cell* 1997; 89: 747-54.
18. Ruch JV, Lesot H, Begue-Kirn C. Odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol* 1995; 39: 51-68.
19. Zanini M, Sautier JM, Berdal A, Simon S. Biodentine induces immortalized murine pulp cell differentiation into odontoblast-like cells and stimulates biomineralization. *J Endod* 2012; 38: 1220-6.
20. Camp JH, Barret EJ, Pulver F. Pediatric endodontics: endodontic treatment of primary and young permanent dentition. In : Cohen S, Burn RC eds. *Pathway of the pulp*, 8th edn. St Louis, MO: Mosby; 2002. pp.797-884.
21. Holland R, Filho JA, de Souza V, Nery MJ, Bernabe PF, Junior ED. Mineral trioxide aggregate repair of lateral root perforations. *J Endod* 2001; 27: 281-4.

22. Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod* 1995; 21: 349-53.
23. Seltzer S, Bender IB. *The dental pulp*. 3rd ed. Philadelphia: J.B. Lippincott Co, 1985.
24. Taddei P, Modena E, Tinti A, Siboni F, Prati C, Gandofil MG. Vibrational investigation of calcium-silicate cements for endodontics in simulated body fluids. *J Mol Struct* 2011; 993: 367-75.
25. Torabinejad M, Watson TF, Pitt-Ford TR. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when use as a root end filling material. *J Endod* 1993; 19: 591-5.
26. Lee SJ, Monsef M, Torabinejad M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral perforation. *J Endod* 1993; 19: 541-4.
27. Ber BS, Hatton JF, Stewart GP. Chemical modification of Proroot MTA to improve handling characteristics and decrease setting time. *J Endod* 2007; 33: 1231-4.
28. Zarrabi MH, Javidi M, Jafarian AH, Joushan B. Histological assessment of human pulp response to capping with mineral trioxide aggregate and a novel endodontic cement. *J Endod* 2010; 36: 1778-81.
29. Siriphannon P, Kameshima Y, Yasumori A, Okada K, Hayashi S. Formation of hydroxyapatite on CaSiO_3 powders in simulated body fluid. *J Eur Ceram Soc* 2002; 22: 511-20.
30. Wei J, Chen F, Shin JW, Hon H, Dai C, Su J, et al. Preparation and characterization of bioactive mesoporous wollastonite-prolycaprolactone composite scaffold. *Biomaterial* 2009; 30: 1080-8.
31. Nicholson JW. Chemistry of glass-ionomer cement: a review. *Biomaterials* 1998; 19: 485-94.
32. Mount GJ. Clinical performance of glass-ionomer. *Biomaterials* 1998; 19: 573-9.
33. Peez R, Frank S. The physical-mechanical performance of the new KetacTM Molar Easymix compared to commercially available glass ionomer restoratives. *J Dent* 2006; 34: 582-7.
34. Xie D, Brantly WA, Culbertson BM, Wang G. Mechannical properties and microstructures of glass-ionomer cements. *Dent Mater* 2000; 16: 129-38.

35. Lin Q, Li Y, Lan X, Lu C, Chen Y, Xu Z. The apatite formation ability of CaF_2 doping tricalcium silicates in simulated body fluid. *Biomed Mater* 2009; 4: 1-6.
36. Yli-Urpo H, Närhi T, Södering E. Antimicrobial effect of glass ionomer cement containing bioactive glass (S53P4) on oral microorganism in vitro. *Acta Odontol Scan* 2003; 61: 241-6.
37. Yli-Urpo H, Vallittu PK, Närhi TO, Farsback AP, Väkiparta M. Release of silica, calcium, phosphorus, and fluoride from glass ionomer cement containing bioactive glass. *J Biomater Appl* 2004; 19: 5-20.
38. Choi JY, Lee HH, Kim HW. Bioactive sol-gel glass added ionomer cement for the regeneration of tooth structure. *J Mater Sci Mater Med* 2008; 19: 3287-94.
39. Tuna D, Olmez A. Clinical long-term evaluation of MTA as a direct pulp capping material in primary teeth. *Int Endod J* 2008; 41: 273-8.
40. Sangsawatpong W. Bioactivity and biocompatibility of glass ionomer cement added with monocalcium silicate at various ratios. [Thesis M.S. Endodontic]. Bangkok: Srinakarinwirot University; 2013.
41. Pothiraksanont S. A comparative study of physical properties of GIC containing β -monocalcium silicate to mineral trioxide aggregate (MTA) [Thesis M.S. Endodontic]. Bangkok: Srinakarinwirot University; 2013.
42. Paranjpe A, Zhang H, Johnson JD. Effect of mineral trioxide aggregate on human dental pulp cells after pulp capping procedures. *J Endod* 2010; 36: 1042-7.
43. Faraco IM Jr, Holland R. Response of the pulp dog to capping with mineral trioxide aggregate or a calcium hydroxide cement. *Dent traumatol* 2001; 17: 163-6.
44. Abedi HR, Torabinejad M, Pitt-Ford TR. The use of mineral trioxide aggregate (MTA) as a direct pulp capping material [abstract]. *J Endod* 1996; 22: 199.
45. Nair PN, Duncan HF, Pitt-Ford TR, Lauder HU. Histological, ultrastructure and quantitative investigation on the response of human pulps to experimental capping with mineral trioxide aggregate : a randomized controlled trial. *Int Endod J* 2008; 41: 128-50.

46. Moghaddame-Jafari S, Mantellini MG, Botero TM, McDonald NJ, Nör JE. Effect of Proroot MTA on pulp cell apoptosis and proliferation in vitro. *J Endod* 2005; 31: 387-91.
47. Masuda-Murakami Y, Kobayashi M, Wang X, Yamada Y, Kamura Y, Hossain M, et al. Effect of mineral trioxide aggregate on the differentiation of rat dental pulp cells. *Acta Histochem* 2010; 112: 452-8.
48. Pitt-Ford TR, Torabinejad M, Abedi HR, Bakland LK, Kariyawasam SP. Using mineral trioxide aggregate as a pulp capping material. *J Am Dent Assoc* 1996; 127: 1491-4.
49. Domingues MS, Witherspoon DE, Gutmann JL, Opermann LA. Histological and scanning electron microscopy assessment of various vital pulp-therapy materials. *J Endod* 2003; 29: 324-33.
50. Ko H, Yang W, Park K, Kim M. Cytotoxicity of mineral trioxide aggregate (MTA) and bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) and response of rat pulp to MTA and BMP-2. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010; 109: e103-8.
51. Balto HA. Attachment and morphological behavior of human periodontal ligament fibroblast to mineral trioxide aggregate: a scanning electron microscopy study. *J Endod* 20004; 30: 25-9.
52. Islam I, Chng HK, Yap AU. X-ray diffraction analysis of mineral trioxide aggregate and Portland cement. *Int Endod J* 2006; 39: 220-5.
53. Asgary S, Parirokh M, Eghbal MJ, Brink F. A comparative study of white mineral trioxide aggregate and white portland cement using x-ray microanalysis. *Aust Endod J* 2004; 30: 89-92.
54. Saidon J, He J, Zhu Q, Safavi K, Spångberg LS. Cell and tissue reactions to mineral trioxide aggregate and Portland cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; 95: e483-9.
55. Lea FM. *Lea's chemistry of cement and concrete*. 4th ed. London:Edward Arnold; 1998.

56. Camilleri J, Montesin FE, Papaioannou S, McDonald F, Pittford TR. Biocompatibility of two commercial forms of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J* 2004; 37: 669-704.
57. Torabinejad M, Hong CU, Pittford TR, Kettering JD. Cytotoxicity of four root end filling materials. *J Endod* 1995; 21: 489-92.
58. Camilleri J, Montesin FE, Brady K, Sweeney R, Curtis RV, Pittford TR. The constitution of mineral trioxide aggregate. *Dent Mater* 2005a; 21: 297-303.
59. Camilleri J. Hydration mechanisms of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J* 2007; 40: 462-70.
60. Tziafas D, Pantelidou O, Alvanou A, Belibasaki G, Papadimitriou S. The dentinogenic effect of mineral trioxide aggregate (MTA) in short-term capping experiments. *Int Endod J* 2002; 35: 245-54.
61. Sarkar NK, Caicedo R, Ritwak P, Moiseyeva R, Kawashima I. Physicochemical basis of the biologic properties of mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2005; 31: 97-100.
62. Legeros RZ. Calcium phosphates in oral biology and medicine. *Monogr Oral Sci* 1991; 15: 1-201.
63. Yuan H, Li Y, de Bruijn JD, de Groot K, Zhang X. Tissue response of calcium phosphate cement: a study in dogs. *Biomaterials* 2000; 21: 1283-90.
64. Fridland M, Rosado R. Mineral trioxide aggregate (MTA) solubility and porosity with different water-to-powder ratios. *J Endod* 2003; 29: 814-7.
65. Hunter AR, Kirk EE, Robin DH, Kardos TB. A slow release calcium delivery system for the study of reparative dentin formation. *Endod Dental Traumatol* 1998; 14: 112-8.
66. Rashid F, Shiba H, Mizuno N, Mouri Y, Fujita T, Shinohara H, et al. The effect of extracellular calcium ion on gene expression of bone-related proteins in human pulp cells. *J Endod* 2003; 29: 104-7.
67. Nakashima M. The induction of reparative dentine in the amputated dental pulp of dog by bone morphogenetic protein. *Arch Oral Biol* 1990; 35: 493-7.

68. Peng W, Liu W, Zhai W, Jiang L, Li L, Chang J, et al. Effect of tricalcium silicate on the proliferation and odontogenic differentiation of human dental pulp cells. *J Endod* 2011; 37: 1240-6.
69. Nandini S, Ballal S, Kandaswamy D. Influence of glass-ionomer cement on the interface and setting reaction of mineral trioxide aggregate when used as a furcal repair material using roman spectroscopic analysis. *J Endod* 2007; 33: 167-72.
70. Bortoluzzi EA, Broon NJ, Bramante CM, Garcia RB, de Moraes IG, Bernadineli N. Sealing ability of MTA and radiopaque Portland cement with or without calcium chloride for root-end filling. *J Endod* 2006; 32: 897-900.
71. Holt DM, Watts JD, Beeson TJ, Kirkpatrick TC, Rutledge RE. The anti-microbial effect against enterococcus faecalis and the compressive strength of two types of mineral trioxide aggregate mixed with sterile water or 2% chrohexidine liquid. *J Endod* 2007; 33: 884-7.
72. Kogan P, He J, Glickman GN, Wantable I. The effect of various additives on setting properties of MTA. *J Endod* 2006; 32: 569-72.
73. Wu C, Chang J. A review of bioactive silicate ceramics. *Biomed Mater* 2013; 8: 1-12.
74. Monvisade P, Sririphannon P, Jermungnern R, Ruttanabodee S. Preparation of hydroxyapatite / poly(methyl metacrylate) and calcium silicate / poly(methyl metacrylate) interpenetrating hybrid composites. *J Mater Sci* 2007; 18: 1955-9.
75. Wilson AD, McLean JW. *Glass ionomer cement*. Chicago, IL, USA: Quintessence Publishing Co; 1988.
76. Hatton PV, Hurrell-Gillingham K, Brook IM. Biocompatibility of glass-ionomer bone cements. *J Dent* 2006; 34: 598-601.
77. Kanchanasita W, Anstice HM, Pearson GJ. Long-term flexural strengths of resin-modified glass-ionomer cements. *Biomaterials* 1998; 19: 1703-13.
78. Xie D, Brantly WA, Culbertson BM, Wang G. Mechanical properties and microstructures of glass ionomer cements. *Dent Mater* 2000; 16: 129-38.

79. Nourmohammadi J, Sadrnezhaad SK., Ghader AB. Bone-like apatite layer formation on the new resin-modified glass-ionomer cement. *J Mater Sci Mater Med* 2008; 19: 3507–14.
80. Aranha AM, Giro EM, Souza PP, Hebling J, de Souza Costa CA. Effect of curing regimen on the cytotoxicity of resin-modified glass ionomer cement lining cements applied to an odontoblast-cell line . *Dent Mater* 2006; 22: 864-9.
81. de Souza Costa CA, Hebling J, Garcia-Godoy F, Hanks CT. In vitro cytotoxicity of five glass-ionomer cements. *Biomaterials* 2003; 24: 3853–8.
82. Huang FM, Chang YC. Cytotoxicity of resin-based restorative materials on human pulp cell cultures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radio Endod* 2002; 94: 361–5.
83. Lan WH, Lan WC, Wang TM, Lee YL, Tseng WY, Lin CP. Cytotoxicity of conventional and modified glass ionomer cements. *Oper Dent* 2003; 28: 251–9.
84. Lonroth EC, Dahl JE. Cytotoxicity of liquids and powders of chemically different dental materials evaluated using dimethylthiazol diphenyltetrazolium and neutral red tests. *Acta Odontol Scand* 2003; 61: 52–6.
85. Nourmohammadi J, Salarian R, Solati-Hashjin M, Moztarzadeh F. Dissolution behavior and fluoride release from new glass composition used in glass ionomer cements. *Ceram Int* 2007; 33: 557-61.
86. Qu H, Wei M. The effect of fluoride contents in fluoridated hydroxyapatite on osteoblast behavior. *Acta Biomater* 2006; 2: 113-9.
87. Yoon BH, Kim HW, Lee SH, Bae CJ, Koh YH, Kong YM, et al. Stability and cellular response to fluoroapatite-collagen composites. *Biomaterials* 2005; 26: 2957-63.
88. Qu WJ, Zhong DB, Wu PF, Wang JF, Han B. Sodium fluoride modulates caprine osteoblast proliferation and differentiation. *J Bone Miner Metab* 2008; 26: 328-34.
89. Zhang WG, Wang LZ, Liu Z. The influence of fluoride on the development of osteoblast phenotype in rat calvarial osteoblast: an in vitro study. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue* 1998; 7: 88-93.

90. Thai Industrial Standard: TISI. Biological evaluation of medical device (Part 12: Test for in vitro cytotoxicity ISO 10993-12) 3rd edition. Rajathevee Bangkok; 2007: 7.
91. Thai Industrial Standard: TISI. Biological evaluation of medical device (Part 5: Test for in vitro cytotoxicity ISO 10993-5) 3rd edition. Rajathevee Bangkok; 2009: 28.
92. Finan JD, Guilak F. The effects of osmotic stress on the structure and function of the cell nucleus. *J Cell Biochem* 2010; 1093: 460-7.
93. Leonardo RT, Consolaro A, Carlos IZ, Leonardo MR. Evaluation of cell culture cytotoxicity of five root canal sealers. *J Endod* 2000; 26: 328-30.
94. Camargo SE, Camargo CH, Hiller KA, Rode SM, Schweikl H, Schmalz G. Cytotoxicity and genotoxicity of pulp capping materials in two cell lines. *Int Endod J* 2009; 42: 227-37.
95. Richardson IG. The calcium silicate hydrates. *Cem Concr Res*. 2008; 38: 137-58.
96. Beltes P, Koulaouzidore E, Kotoula V, Kortsaris AH. In vitro evaluation of the cytotoxicity of calcium hydroxide-based root canal sealers. *Endod Dent Traumatol* 1995 ; 11: 245-9.
97. Wu C, Ramaswamy Y, Kwik D, Zreiqat H. The effect of strontium incorporation into CaSiO₃ ceramic on their physical and biological properties. *Biomaterials* 2007; 28: 1371-8.
98. Li J, Liao H, Hermansson L. Sintering of partially stabilized zirconia and partially stabilized zirconia–hydroxyapatite composites by hot isostatic pressing and pressureless sintering. *Biomaterials* 1996; 17: 1787–90.
99. Kishi Y, Shimojima H, Ohsio S, Saitoh H, Uematsu K. Microstructure design of HIPed TiO₂ ceramics for improved corrosion resistance. *J Mater Sci Lett* 1997; 16: 1342.
100. Daculsi G, LeGeros RZ, Mitre D. Crystal dissolution of biological and ceramic apatites. *Calcif Tissue Int* 1989; 45: 95–103.
101. Porter AE, Botelho CM, Lopes MA, Santos JD, Best SM, Bonfield W. Ultrastructural comparison of dissolution and apatite precipitation on hydroxyapatite and silicon-substituted hydroxyapatite in vitro and in vivo. *J Biomed Mater Res* 2004; 69: 670–9.

102. De Deus G, Ximenes R, Gurgel-Filho ED, Plotkowski MC, Coutinho-Filho T. Cytotoxicity of MTA and Portland cement on human ECV 304 endothelial cells. *Endod J* 2005; 38: 604-9.
103. Soheili Majd E, Goldberg M, Stanislawski L. In vitro effects of ascorbate and Trolox on the biocompatibility of dental restorative materials. *Biomaterials* 2003; 24: 3-9.
104. Mjor IA, Nordahl I, Tronstad L. Glass ionomer cements and dental pulp. *Endod Dental Traumatol* 1991; 7: 59-64.
105. Schmalz G, Thonemann B, Riedel M, Elderton RJ. Biological and clinical investigations of a glass ionomer base material. *Dental Mater* 1994; 10: 304-13.
106. Kuhn AT LW, Painter HA. Release of organic species from glass ionmer cements. *J Mater Sci Lett* 1983; 2: 224.
107. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63.
108. Slater TF, Sawyer B, Strauli UD. Studies on succinate-tetrazolium reductase systems. III. points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biochem Biophys Acta* 1963; 77: 383-93.
109. Wei W, Qi YP, Nikonov SY, Niu LN, Messer RL, Mao J, et al. Effects of an experimental calcium aluminosilicate cement on the viability of murine odontoblast-like cells. *J Endod* 2012; 38: 936-42.
110. Chen CC, Shie MY, Ding SJ. Human dental pulp cell responses to new calcium silicate-based endodontic materials. *Int Endod J* 2011; 44: 836-42.
111. Valerio P, Pereira MM, Goes AM, Leite MF. The effect of ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production. *Biomaterials* 2004; 25: 2941-8.
112. Huang Y, Jin X, Zhang X, Sun H, Tu J, Tang T, et al. In vitro and in vivo evaluation of akermanite bioceramics for bone regeneration. *Biomaterials* 2009; 30: 5041-8.
113. Shie MY, Chang HC, Ding SJ. Effects of altering the Si/Ca molar ratio of a calcium silicate cement on in vitro cell attachment. *Int Endod J* 2012; 45: 337-45.

114. Eklou-Kalonji E, Denis I, Lieberherr M, Pointillart A. Effects of extracellular calcium on the proliferation and differentiation of porcine osteoblasts in vitro. *Cell Tissue Res* 1998; 292: 163-71.
115. Takita T, Hayashi M, Takeichi O, Ogiso B, Suzuki N, Otsuka K, et al. Effect of mineral trioxide aggregate on proliferation of cultured human dental pulp cells. *Int Endod J* 2006; 39: 415-22.
116. Ding SJ, Shie MY, Wang CY. Novel fast-setting calcium silicate bone cement with high bioactivity and enhanced osteogenesis in vitro. *J Mater Chem* 2009; 19: 1183-90.
117. Sun H, Wu C, Dai K, Chang J, Tang T. Proliferation and osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived stromal cells on akermanite-bioactive ceramics. *Biomaterials*. 2006; 27: 5651-7.
118. Mente J, Geletneky B, Ohle M, Koch MJ, Friedrich Ding PG, Wolff D, et al. Mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide direct pulp capping: an analysis of the clinical treatment outcome. *J Endod* 2010; 36: 806-13.
119. Pameijer CH, Stanley HR. The disastrous effects of the "total etch" technique in vital pulp capping in primates. *Am J Dent* 1998; 11 Spec No: S45-54.
120. Butler WT. Dentin matrix proteins. *Eur J Oral Sci* 1998; 106 Suppl 1: 204-10.
121. Suzuki S, Sreenath T, Haruyama N, Honeycutt C, Terse A, Cho A, et al. Dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein have distinct roles in dentin mineralization. *Matrix Biol* 2009; 28: 221-9.
122. Butler WT, Brunn JC, Qin C, McKee MD. Extracellular matrix proteins and the dynamics of dentin formation. *Connect Tissue Res* 2002; 43: 301-7.
123. Qin C, Baba O, Butler WT. Post-translational modifications of sibling proteins and their roles in osteogenesis and dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Medicine* 2004; 15: 126-36.
124. An S, Gao Y, Ling J, Wei X, Xiao Y. Calcium ions promote osteogenic differentiation and mineralization of human dental pulp cells: implications for pulp capping materials. *J Mater Sci Mater Med* 2012; 23: 789-95.

125. Tada H, Nemoto E, Kanaya S, Hamaji N, Sato H, Shimauchi H. Elevated extracellular calcium increases expression of bone morphogenetic protein-2 gene via a calcium channel and ERK pathway in human dental pulp cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 394: 1093-7.
126. Sharan K, Siddiqui JA, Swarnkar G, Chattopadhyay N. Role of calcium-sensing receptor in bone biology. *Indian J Med Res* 2008; 127: 274-86.
127. Ahlstrom M, Pekkinen M, Riehle U, Lamberg-Allardt C. Extracellular calcium regulates parathyroid hormone-related peptide expression in osteoblasts and osteoblast progenitor cells. *Bone* 2008; 42: 483-90.
128. Alliot-Licht B, Bluteau G, Magne D, Lopez-Cazaux S, Lieubeau B, Daculsi G, et al. Dexamethasone stimulates differentiation of odontoblast-like cells in human dental pulp cultures. *Cell Tissue Res* 2005; 321: 391-400.
129. Liu M, Sun Y, Liu Y, Yuan M, Zhang Z, Hu W. Modulation of the differentiation of dental pulp stem cells by different concentrations of beta-glycerophosphate. *Molecules* 2012; 17: 1219-32.
130. Couble ML, Farges JC, Bleicher F, Perrat-Mabillion B, Boudeulle M, Magloire H. Odontoblast differentiation of human dental pulp cells in explants cultures. *Calcif Tissue Int* 2000 ; 66: 129-38.
131. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 13625-30.
132. Huang GT, Shagramanova K, Chan SW. Formation of odontoblast-like cells from cultured human dental pulp cells on dentin in vitro. *J Endod* 2006; 32: 1066-73.
133. Paranjpe A, Smoot T, Zhang H, Johnson JD. Direct contact with mineral trioxide aggregate activates and differentiates human dental pulp cells. *J Endod* 2011; 37: 1691-5.
134. Wu C, Chang J. A review of bioactive silicate ceramics. *Biomed Mater* 2013; 8: 032001. doi: 10.1088/1748-6041/8/3/032001.





ภาคผนวก



ภาคผนวก ก







ภาคผนวก ง

ภาคผนวก ง
การวิเคราะห์ข้อมูลการทดสอบวัดความเป็นพิษต่อเซลล์

ในทุกระดับความเข้มข้นของสารทดสอบ

ตาราง 1 สถิติเชิงพรรณนา

Descriptive Statistics

optical density

solutions	Concentration	Mean	Std. Deviation	N
MTA	Full	.171078	.0409766	90
	1:1	.225067	.0457000	90
	1:2	.225456	.0466433	90
	1:4	.227978	.0468948	90
	1:8	.223211	.0447790	90
	Total	.214558	.0498739	450
GIC-CS	Full	.167411	.0377421	90
	1:1	.217111	.0423459	90
	1:2	.222189	.0477458	90
	1:4	.222900	.0462898	90
	1:8	.222211	.0471368	90
	Total	.210364	.0492079	450
CaSiO3	Full	.066722	.0076570	90
	1:1	.214389	.0511107	90
	1:2	.221922	.0513926	90
	1:4	.225600	.0572033	90
	1:8	.222767	.0550767	90
	Total	.190280	.0783694	450
Ketac	Full	.180022	.0461003	90
	1:1	.215311	.0441422	90
	1:2	.225067	.0453644	90
	1:4	.221044	.0419590	90
	1:8	.226511	.0467908	90
	Total	.213591	.0479148	450

Control	Full	.202822	.0430504	560
	Total	.202822	.0430504	560
Total	Full	.180708	.0568879	920
	1:1	.217969	.0459433	360
	1:2	.223658	.0476663	360
	1:4	.224381	.0482808	360
	1:8	.223675	.0484307	360
	Total	.206160	.0552953	2360



*ระดับความเข้มข้นสูงสุด

ตาราง 2 สถิติเชิงพรรณนา

Descriptives

optical density

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					MTA	90		
GIC-CS	90	.167411	.0377421	.0039784	.159506	.175316	.0940	.2320
CaSiO ₃	90	.066722	.0076570	.0008071	.065118	.068326	.0460	.0860
Ketac	90	.180022	.0461003	.0048594	.170367	.189678	.1100	.3050
Control	560	.202822	.0430504	.0018192	.199249	.206395	.1190	.3650
Total	920	.180708	.0568879	.0018755	.177027	.184389	.0460	.3650

ตาราง 3 การทดสอบความแปรปรวนเป็นเอกพันธ์

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
32.572	4	915	.000

ตาราง 4 การวิเคราะห์หลายกลุ่มอิสระด้วยสถิติอะโนวา

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.468	4	.367	222.815	.000
Within Groups	1.507	915	.002		
Total	2.974	919			

ตาราง 5 การเปรียบเทียบพหุคูณ

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

optical density

Tukey HSD

(I) solution	(J) solution	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
MTA	GIC-CS	.0036667	.0060490	.974	-.012867	.020200
	CaSiO3	.1043556*	.0060490	.000	.087822	.120889
	Ketac	-.0089444	.0060490	.577	-.025478	.007589
	Control	-.0317442*	.0046082	.000	-.044339	-.019149
GIC-CS	MTA	-.0036667	.0060490	.974	-.020200	.012867
	CaSiO3	.1006889*	.0060490	.000	.084156	.117222
	Ketac	-.0126111	.0060490	.227	-.029144	.003922
	Control	-.0354109*	.0046082	.000	-.048006	-.022816
CaSiO3	MTA	-.1043556*	.0060490	.000	-.120889	-.087822
	GIC-CS	-.1006889*	.0060490	.000	-.117222	-.084156
	Ketac	-.1133000*	.0060490	.000	-.129833	-.096767
	Control	-.1360997*	.0046082	.000	-.148695	-.123505
Ketac	MTA	.0089444	.0060490	.577	-.007589	.025478
	GIC-CS	.0126111	.0060490	.227	-.003922	.029144
	CaSiO3	.1133000*	.0060490	.000	.096767	.129833
	Control	-.0227997*	.0046082	.000	-.035395	-.010205
Control	MTA	.0317442*	.0046082	.000	.019149	.044339
	GIC-CS	.0354109*	.0046082	.000	.022816	.048006
	CaSiO3	.1360997*	.0046082	.000	.123505	.148695
	Ketac	.0227997*	.0046082	.000	.010205	.035395

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

*เงื่อนไข 1 ต่อ 1

ตาราง 6 สถิติเชิงพรรณนา

Descriptives

optical density

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					MTA	90		
GIC-CS	90	.217111	.0423459	.0044637	.208242	.225980	.1320	.3210
CaSiO3	90	.214389	.0511107	.0053875	.203684	.225094	.1440	.3120
Ketac	90	.215311	.0441422	.0046530	.206066	.224557	.1440	.3300
Total	360	.217969	.0459433	.0024214	.213207	.222731	.1320	.3300

ตาราง 7 การทดสอบความแปรปรวนเป็นเอกพันธ์

Test of Homogeneity of Variances

optical density

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.661	3	356	.048

ตาราง 8 การวิเคราะห์หลายกลุ่มอิสระด้วยสถิติอะโนวา

ANOVA

optical density

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.006	3	.002	1.009	.389
Within Groups	.751	356	.002		
Total	.758	359			

ตาราง 9 การเปรียบเทียบพหุคูณ

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

optical density

Tukey HSD

(I) solution	(J) solution	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
MTA	GIC-CS	.0079556	.0068486	.651	-.009722	.025633
	CaSiO3	.0106778	.0068486	.403	-.007000	.028355
	Ketac	.0097556	.0068486	.485	-.007922	.027433
GIC-CS	MTA	-.0079556	.0068486	.651	-.025633	.009722
	CaSiO3	.0027222	.0068486	.979	-.014955	.020400
	Ketac	.0018000	.0068486	.994	-.015878	.019478
CaSiO3	MTA	-.0106778	.0068486	.403	-.028355	.007000
	GIC-CS	-.0027222	.0068486	.979	-.020400	.014955
	Ketac	-.0009222	.0068486	.999	-.018600	.016755
Ketac	MTA	-.0097556	.0068486	.485	-.027433	.007922
	GIC-CS	-.0018000	.0068486	.994	-.019478	.015878
	CaSiO3	.0009222	.0068486	.999	-.016755	.018600



*เงื่อนไข 1 ต่อ 2

ตาราง 10 สถิติเชิงพรรณนา

Descriptives

optical density

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					MTA	90		
GIC-CS	90	.222189	.0477458	.0050328	.212189	.232189	.1280	.3190
CaSiO3	90	.221922	.0513926	.0054173	.211158	.232686	.1560	.3550
Ketac	90	.225067	.0453644	.0047818	.215565	.234568	.1350	.3340
Total	360	.223658	.0476663	.0025122	.218718	.228599	.1280	.3550

ตาราง 11 การทดสอบความแปรปรวนเป็นเอกพันธ์

Test of Homogeneity of Variances

optical density

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.642	3	356	.179

ตาราง 12 การวิเคราะห์หลายกลุ่มอิสระด้วยสถิติอะโนวา

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.001	3	.000	.136	.938
Within Groups	.815	356	.002		
Total	.816	359			

ตาราง 13 การเปรียบเทียบพหุคูณ

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

optical density

Tukey HSD

(I) solution	(J) solution	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
MTA	GIC-CS	.0032667	.0071315	.968	-.015141	.021674
	CaSiO3	.0035333	.0071315	.960	-.014874	.021941
	Ketac	.0003889	.0071315	1.000	-.018019	.018797
GIC-CS	MTA	-.0032667	.0071315	.968	-.021674	.015141
	CaSiO3	.0002667	.0071315	1.000	-.018141	.018674
	Ketac	-.0028778	.0071315	.978	-.021286	.015530
CaSiO3	MTA	-.0035333	.0071315	.960	-.021941	.014874
	GIC-CS	-.0002667	.0071315	1.000	-.018674	.018141
	Ketac	-.0031444	.0071315	.971	-.021552	.015263
Ketac	MTA	-.0003889	.0071315	1.000	-.018797	.018019
	GIC-CS	.0028778	.0071315	.978	-.015530	.021286
	CaSiO3	.0031444	.0071315	.971	-.015263	.021552

*เง็องจาง 1 ต่อ 4

ตาราง 14 สลิตีเซ็งพรรณนา

Descriptives

optical density

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					MTA	90		
GIC-CS	90	.222900	.0462898	.0048794	.213205	.232595	.1390	.3210
CaSiO3	90	.225600	.0572033	.0060298	.213619	.237581	.1430	.3540
Ketac	90	.221044	.0419590	.0044229	.212256	.229833	.1540	.3140
Total	360	.224381	.0482808	.0025446	.219376	.229385	.1390	.3540

ตาราง 15 การทดสอบความแปรปรวนเป็นเอกพันธ์

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
7.237	3	356	.000

ตาราง 16 การวิเคราะห์หลายกลุ่มอิสระด้วยสลิตีอะโนวา

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.002	3	.001	.355	.785
Within Groups	.834	356	.002		
Total	.837	359			

ตาราง 17 การเปรียบเทียบพหุคูณ
Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

optical density

Tukey HSD

(I) solution	(J) solution	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
MTA	GIC-CS	.0050778	.0072167	.896	-.013550	.023706
	CaSiO3	.0023778	.0072167	.988	-.016250	.021006
	Ketac	.0069333	.0072167	.772	-.011695	.025561
GIC-CS	MTA	-.0050778	.0072167	.896	-.023706	.013550
	CaSiO3	-.0027000	.0072167	.982	-.021328	.015928
	Ketac	.0018556	.0072167	.994	-.016772	.020483
CaSiO3	MTA	-.0023778	.0072167	.988	-.021006	.016250
	GIC-CS	.0027000	.0072167	.982	-.015928	.021328
	Ketac	.0045556	.0072167	.922	-.014072	.023183
Ketac	MTA	-.0069333	.0072167	.772	-.025561	.011695
	GIC-CS	-.0018556	.0072167	.994	-.020483	.016772
	CaSiO3	-.0045556	.0072167	.922	-.023183	.014072

*เงื่อนไข 1 ต่อ 8

ตาราง 18 สถิติเชิงพรรณนา

Descriptives

optical density

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					MTA	90		
GIC-CS	90	.222211	.0471368	.0049687	.212339	.232084	.1410	.3440
CaSiO ₃	90	.222767	.0550767	.0058056	.211231	.234302	.1520	.3860
Ketac	90	.226511	.0467908	.0049322	.216711	.236311	.1400	.3440
Total	360	.223675	.0484307	.0025525	.218655	.228695	.1400	.3860

ตาราง 19 การทดสอบความแปรปรวนเป็นเอกพันธ์

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.906	3	356	.009

ตาราง 20 การวิเคราะห์หลายกลุ่มอิสระด้วยสถิติอะโนวา

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.001	3	.000	.143	.934
Within Groups	.841	356	.002		
Total	.842	359			

ตาราง 21 การเปรียบเทียบพหุคูณ

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

optical density

Tukey HSD

(I) solution	(J) solution	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
MTA	GIC-CS	.0010000	.0072456	.999	-.017702	.019702
	CaSiO3	.0004444	.0072456	1.000	-.018258	.019147
	Ketac	-.0033000	.0072456	.969	-.022002	.015402
GIC-CS	MTA	-.0010000	.0072456	.999	-.019702	.017702
	CaSiO3	-.0005556	.0072456	1.000	-.019258	.018147
	Ketac	-.0043000	.0072456	.934	-.023002	.014402
CaSiO3	MTA	-.0004444	.0072456	1.000	-.019147	.018258
	GIC-CS	.0005556	.0072456	1.000	-.018147	.019258
	Ketac	-.0037444	.0072456	.955	-.022447	.014958
Ketac	MTA	.0033000	.0072456	.969	-.015402	.022002
	GIC-CS	.0043000	.0072456	.934	-.014402	.023002
	CaSiO3	.0037444	.0072456	.955	-.014958	.022447



ภาคผนวก จ

การวิเคราะห์ข้อมูลการทดสอบวัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์

• ในทุกช่วงระยะเวลาของสารทดสอบ

ตาราง 1 สถิติเชิงพรรณนา

Descriptive Statistics

optical density

day	solution	Mean	Std. Deviation	N
day1	MTA	.136611	.0262468	90
	GIC-CS	.134800	.0202347	90
	CaSiO3	.140522	.0193165	90
	Ketac	.142067	.0206206	90
	Control	.140111	.0181077	180
	Total	.139037	.0206963	540
day3	MTA	.225389	.0506317	90
	GIC-CS	.252300	.0551457	90
	CaSiO3	.260656	.0514601	90
	Ketac	.272478	.0512242	90
	Control	.245450	.0546873	180
	Total	.250287	.0547845	540
day5	MTA	.269467	.0806985	90
	GIC-CS	.365567	.0755952	90
	CaSiO3	.394467	.0897181	90
	Ketac	.425633	.0834093	90
	Control	.340061	.0704952	180
	Total	.355876	.0924894	540
day7	MTA	.386433	.0835390	90
	GIC-CS	.442133	.0685946	90
	CaSiO3	.519233	.0816990	90
	Ketac	.517444	.0816347	90
	Control	.428367	.0726740	180
	Total	.453663	.0909590	540

Total	MTA	.254475	.1107581	360
	GIC-CS	.298700	.1303509	360
	CaSiO ₃	.328719	.1569163	360
	Ketac	.339406	.1575723	360
	Control	.288497	.1221382	720
	Total	.299716	.1372675	2160



• ในระยะเวลาวันที่ 1

ตาราง 2 สถิติเชิงพรรณนา

Descriptives

optical density

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					MTA	90		
GIC-CS	90	.134800	.0202347	.0021329	.130562	.139038	.0960	.1850
CaSiO3	90	.140522	.0193165	.0020361	.136476	.144568	.0940	.1890
Ketac	90	.142067	.0206206	.0021736	.137748	.146386	.1050	.1980
Control	180	.140111	.0181077	.0013497	.137448	.142774	.1090	.1860
Total	540	.139037	.0206963	.0008906	.137288	.140787	.0630	.2190

ตาราง 3 การทดสอบความแปรปรวนเป็นเอกพันธ์

Test of Homogeneity of Variances

optical density

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.708	4	535	.147

ตาราง 4 การวิเคราะห์หลายกลุ่มอิสระด้วยสถิติอะโนวา

ANOVA

optical density

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.003	4	.001	1.986	.095
Within Groups	.227	535	.000		
Total	.231	539			

ตาราง 5 การเปรียบเทียบพหุคูณ

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

optical density

Tukey HSD

(I) solution	(J) solution	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
MTA	GIC-CS	.0018111	.0030740	.977	-.006603	.010225
	CaSiO3	-.0039111	.0030740	.708	-.012325	.004503
	Ketac	-.0054556	.0030740	.389	-.013869	.002958
	Control	-.0035000	.0026622	.682	-.010787	.003787
GIC-CS	MTA	-.0018111	.0030740	.977	-.010225	.006603
	CaSiO3	-.0057222	.0030740	.340	-.014136	.002692
	Ketac	-.0072667	.0030740	.127	-.015681	.001147
	Control	-.0053111	.0026622	.270	-.012598	.001975
CaSiO3	MTA	.0039111	.0030740	.708	-.004503	.012325
	GIC-CS	.0057222	.0030740	.340	-.002692	.014136
	Ketac	-.0015444	.0030740	.987	-.009958	.006869
	Control	.0004111	.0026622	1.000	-.006875	.007698
Ketac	MTA	.0054556	.0030740	.389	-.002958	.013869
	GIC-CS	.0072667	.0030740	.127	-.001147	.015681
	CaSiO3	.0015444	.0030740	.987	-.006869	.009958
	Control	.0019556	.0026622	.948	-.005331	.009242
Control	MTA	.0035000	.0026622	.682	-.003787	.010787
	GIC-CS	.0053111	.0026622	.270	-.001975	.012598
	CaSiO3	-.0004111	.0026622	1.000	-.007698	.006875
	Ketac	-.0019556	.0026622	.948	-.009242	.005331

• ในระยะเวลาวันที่ 3

ตาราง 6 สถิติเชิงพรรณนา

Descriptives

optical density

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					MTA	90		
GIC-CS	90	.252300	.0551457	.0058129	.240750	.263850	.1740	.4230
CaSiO ₃	90	.260656	.0514601	.0054244	.249877	.271434	.1860	.3630
Ketac	90	.272478	.0512242	.0053995	.261749	.283206	.1470	.3780
Control	180	.245450	.0546873	.0040761	.237407	.253493	.1390	.3910
Total	540	.250287	.0547845	.0023575	.245656	.254918	.1350	.4230

ตาราง 7 การทดสอบความแปรปรวนเป็นเอกพันธ์

Test of Homogeneity of Variances

optical density

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.670	4	535	.613

ตาราง 8 การวิเคราะห์หลายกลุ่มอิสระด้วยสถิติอะโนวา

ANOVA

optical density

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.114	4	.029	10.175	.000
Within Groups	1.503	535	.003		
Total	1.618	539			

ตาราง 9 การเปรียบเทียบพหุคูณ

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

optical density

Tukey HSD

(I) solution	(J) solution	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
MTA	GIC-CS	-.0269111*	.0079022	.006	-.048540	-.005282
	CaSiO3	-.0352667 [†]	.0079022	.000	-.056896	-.013638
	Ketac	-.0470889 [†]	.0079022	.000	-.068718	-.025460
	Control	-.0200611 [†]	.0068435	.029	-.038792	-.001330
GIC-CS	MTA	.0269111 [†]	.0079022	.006	.005282	.048540
	CaSiO3	-.0083556	.0079022	.828	-.029985	.013274
	Ketac	-.0201778	.0079022	.081	-.041807	.001451
	Control	.0068500	.0068435	.855	-.011881	.025581
CaSiO3	MTA	.0352667 [†]	.0079022	.000	.013638	.056896
	GIC-CS	.0083556	.0079022	.828	-.013274	.029985
	Ketac	-.0118222	.0079022	.565	-.033451	.009807
	Control	.0152056	.0068435	.173	-.003526	.033937
Ketac	MTA	.0470889 [†]	.0079022	.000	.025460	.068718
	GIC-CS	.0201778	.0079022	.081	-.001451	.041807
	CaSiO3	.0118222	.0079022	.565	-.009807	.033451
	Control	.0270278 [†]	.0068435	.001	.008296	.045759
Control	MTA	.0200611 [†]	.0068435	.029	.001330	.038792
	GIC-CS	-.0068500	.0068435	.855	-.025581	.011881
	CaSiO3	-.0152056	.0068435	.173	-.033937	.003526
	Ketac	-.0270278 [†]	.0068435	.001	-.045759	-.008296

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

• ในระยะเวลาวันที่ 5

ตาราง 10 สถิติเชิงพรรณนา

Descriptives

optical density

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					MTA	90		
GIC-CS	90	.365567	.0755952	.0079684	.349734	.381400	.2320	.5040
CaSiO3	90	.394467	.0897181	.0094571	.375676	.413258	.1830	.5610
Ketac	90	.425633	.0834093	.0087921	.408164	.443103	.2510	.5910
Control	180	.340061	.0704952	.0052544	.329693	.350430	.0820	.5360
Total	540	.355876	.0924894	.0039801	.348057	.363694	.0820	.5910

ตาราง 11 การทดสอบความแปรปรวนเป็นเอกพันธ์

Test of Homogeneity of Variances

optical density

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.603	4	535	.007

ตาราง 12 การวิเคราะห์หลายกลุ่มอิสระด้วยสถิติอะโนวา

ANOVA

optical density

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.297	4	.324	52.374	.000
Within Groups	3.313	535	.006		
Total	4.611	539			

ตาราง 13 การเปรียบเทียบพหุคูณ

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

optical density

Tukey HSD

(I) solution	(J) solution	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
MTA	GIC-CS	-.0961000*	.0117314	.000	-.128210	-.063990
	CaSiO3	-.1250000*	.0117314	.000	-.157110	-.092890
	Ketac	-.1561667*	.0117314	.000	-.188277	-.124057
	Control	-.0705944*	.0101597	.000	-.098402	-.042786
GIC-CS	MTA	.0961000*	.0117314	.000	.063990	.128210
	CaSiO3	-.0289000	.0117314	.101	-.061010	.003210
	Ketac	-.0600667*	.0117314	.000	-.092177	-.027957
	Control	.0255056	.0101597	.090	-.002302	.053314
CaSiO3	MTA	.1250000*	.0117314	.000	.092890	.157110
	GIC-CS	.0289000	.0117314	.101	-.003210	.061010
	Ketac	-.0311667	.0117314	.062	-.063277	.000943
	Control	.0544056*	.0101597	.000	.026598	.082214
Ketac	MTA	.1561667*	.0117314	.000	.124057	.188277
	GIC-CS	.0600667*	.0117314	.000	.027957	.092177
	CaSiO3	.0311667	.0117314	.062	-.000943	.063277
	Control	.0855722*	.0101597	.000	.057764	.113380
Control	MTA	.0705944*	.0101597	.000	.042786	.098402
	GIC-CS	-.0255056	.0101597	.090	-.053314	.002302
	CaSiO3	-.0544056*	.0101597	.000	-.082214	-.026598
	Ketac	-.0855722*	.0101597	.000	-.113380	-.057764

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

• ในระยะเวลาวันที่ 7

ตาราง 14 สถิติเชิงพรรณนา

Descriptives

optical density

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					MTA	90		
GIC-CS	90	.4421333	.06859459	.00723050	.4277665	.4565002	.28800	.58100
CaSiO3	90	.5192333	.08169896	.00861183	.5021218	.5363448	.36400	.73000
Ketac	90	.5174444	.08163472	.00860505	.5003464	.5345425	.21100	.71500
Control	180	.4283667	.07267398	.00541680	.4176777	.4390557	.22700	.58000
Total	540	.4536630	.09095903	.00391425	.4459739	.4613520	.20000	.73000

ตาราง 15 การทดสอบความแปรปรวนเป็นเอกพันธ์

Test of Homogeneity of Variances

optical density

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.511	4	535	.198

ตาราง 16 การวิเคราะห์หลายกลุ่มอิสระด้วยสถิติอะโนวา

ANOVA

optical density

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.287	4	.322	54.260	.000
Within Groups	3.172	535	.006		
Total	4.459	539			

ตาราง 17 การเปรียบเทียบพหุคูณ

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

optical density

Tukey HSD

(I) solution	(J) solution	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
MTA	GIC-CS	-.05570000 [*]	.01147923	.000	-.0871199	-.0242801
	CaSiO3	-.13280000 [*]	.01147923	.000	-.1642199	-.1013801
	Ketac	-.13101111 [*]	.01147923	.000	-.1624310	-.0995913
	Control	-.04193333 [*]	.00994131	.000	-.0691437	-.0147229
GIC-CS	MTA	.05570000 [*]	.01147923	.000	.0242801	.0871199
	CaSiO3	-.07710000 [*]	.01147923	.000	-.1085199	-.0456801
	Ketac	-.07531111 [*]	.01147923	.000	-.1067310	-.0438913
	Control	.01376667	.00994131	.638	-.0134437	.0409771
CaSiO3	MTA	.13280000 [*]	.01147923	.000	.1013801	.1642199
	GIC-CS	.07710000 [*]	.01147923	.000	.0456801	.1085199
	Ketac	.00178889	.01147923	1.000	-.0296310	.0332087
	Control	.09086667 [*]	.00994131	.000	.0636563	.1180771
Ketac	MTA	.13101111 [*]	.01147923	.000	.0995913	.1624310
	GIC-CS	.07531111 [*]	.01147923	.000	.0438913	.1067310
	CaSiO3	-.00178889	.01147923	1.000	-.0332087	.0296310
	Control	.08907778 [*]	.00994131	.000	.0618674	.1162882
Control	MTA	.04193333 [*]	.00994131	.000	.0147229	.0691437
	GIC-CS	-.01376667	.00994131	.638	-.0409771	.0134437
	CaSiO3	-.09086667 [*]	.00994131	.000	-.1180771	-.0636563
	Ketac	-.08907778 [*]	.00994131	.000	-.1162882	-.0618674

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.



ภาคผนวก จ

การวิเคราะห์ข้อมูลการทดสอบปฏิบัติการปลูกใช้รีเวิร์สทรานสคริปเตสโพลีเมอเรส

*DSP ในระยะเวลาวันที่ 4

ตาราง 1 สถิติเชิงพรรณนา

Descriptives

Tgt/Ref

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					10%FBS	3		
Free serum	3	.000047433	.0000177720	.0000102607	.000003285	.000091581	.0000271	.0000600
MTA	3	.000040067	.0000108247	.0000062496	.000013177	.000066957	.0000282	.0000494
GIC-CS	3	.000026233	.0000115760	.0000066834	-.000002523	.000054990	.0000195	.0000396
CaSiO3	3	.000006607	.0000011978	.0000006915	.000003631	.000009582	.0000057	.0000080
Ketac	3	.000021913	.0000123540	.0000071326	-.000008776	.000052602	.0000077	.0000304
Total	18	.063995931	.1474762236	.0347604793	-.009342270	.137334132	.0000057	.4063000

ตาราง 2 การวิเคราะห์หลายกลุ่มอิสระด้วยสถิติครัสคัล วอลลิส

Test Statistics^{a,b}

	Tgt/Ref
Chi-Square	7.462
df	3
Asymp. Sig.	.059

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: solution

ตาราง 3 การเปรียบเทียบ 2 กลุ่มอิสระด้วยสถิติแมนวิทนีย์ ยู

3.1 MTA : GIC-CS

Test Statistics ^b	
	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	1.000
Wilcoxon W	7.000
Z	-1.528
Asymp. Sig. (2-tailed)	.127
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.200 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

3.2 MTA : CaSiO3

Test Statistics ^b	
	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)	.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

3.3 MTA : Ketac

Test Statistics ^b	
	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	1.000
Wilcoxon W	7.000
Z	-1.528
Asymp. Sig. (2-tailed)	.127
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.200 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

3.4 GIC-CS : CaSiO₃Test Statistics^b

	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)	.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

3.5 GIC-CS : Ketac

Test Statistics^b

	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	4.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-.218
Asymp. Sig. (2-tailed)	.827
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

3.6 CaSiO₃ : KetacTest Statistics^b

	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	1.000
Wilcoxon W	7.000
Z	-1.528
Asymp. Sig. (2-tailed)	.127
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.200 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

*DSP ในระยะเวลาวันที่ 7

ตาราง 4 สถิติเชิงพรรณนา

Descriptives

Tgt/Ref

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
10%FBS	3	3.248666667	1.5573041878E0	.8991099920	-.619891395	7.117224728	1.8760000	4.9410000
Free serum	3	.002373333	.0014522511	.0008384576	-.001234258	.005980925	.0011100	.0039600
MTA	3	.000142900	.0001638885	.0000946211	-.000264222	.000550022	.0000420	.0003320
GIC-CS	3	.000325667	.0002052080	.0001184769	-.000184098	.000835432	.0001400	.0005460
CaSiO3	3	.000195167	.0002225065	.0001284642	-.000357570	.000747903	.0000607	.0004520
Ketac	3	.000341667	.0000933024	.0000538682	.000109891	.000573443	.0002530	.0004390
Total	18	.542007567	1.3552516713E0	.3194358823	-.131943234	1.215958367	.0000420	4.9410000

ตาราง 5 การวิเคราะห์หลายกลุ่มอิสระด้วยสถิติครัสคัล วอลลิส

Test Statistics ^{a,b}	
	Tgt/Ref
Chi-Square	7.462
df	3
Asymp. Sig.	.059

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: solution

ตาราง 6 การเปรียบเทียบ 2 กลุ่มอิสระด้วยสถิติแมนวิทนีย์ ยู

6.1 MTA : GIC-CS

Test Statistics ^b	
	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	8.000
Z	-1.091
Asymp. Sig. (2-tailed)	.275
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.400 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

6.2 MTA : CaSiO3

Test Statistics ^b	
	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	8.000
Z	-1.091
Asymp. Sig. (2-tailed)	.275
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.400 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

6.3 MTA : Ketac

Test Statistics ^b	
	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	1.000
Wilcoxon W	7.000
Z	-1.528
Asymp. Sig. (2-tailed)	.127
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.200 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

6.4 GIC-CS : CaSiO₃Test Statistics^b

	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	8.000
Z	-1.091
Asymp. Sig. (2-tailed)	.275
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.400 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

6.5 GIC-CS : Ketac

Test Statistics^b

	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	4.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-.218
Asymp. Sig. (2-tailed)	.827
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

6.6 CaSiO₃ : KetacTest Statistics^b

	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	3.000
Wilcoxon W	9.000
Z	-.655
Asymp. Sig. (2-tailed)	.513
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.700 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

*DSP ในระยะเวลาวันที่ 10

ตาราง 7 สถิติเชิงพรรณนา

Descriptives

Tgt/Ref

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
10%FBS	3	3.223333333	.7167714652	.4138281984	1.442774306	5.003892361	2.4360000	3.8380000
Free serum	3	.024226667	.0179848862	.0103835789	-.020450268	.068903601	.0095800	.0443000
MTA	3	.000011057	.0000022673	.0000013090	.000005424	.000016689	.0000085	.0000127
GIC-CS	2	.000071600	.0000854185	.0000604000	-.000695855	.000839055	.0000112	.0001320
CaSiO3	3	.000105002	.0001740737	.0001005015	-.000327421	.000537425	.0000032	.0003060
Ketac	3	.000011317	.0000134939	.0000077907	-.000022204	.000044837	.0000015	.0000267
Total	17	.573129725	1.2897539307E0	.3128112757	-.090000556	1.236260006	.0000015	3.8380000

ตาราง 8 การวิเคราะห์หลายกลุ่มอิสระด้วยสถิติครัสคัล วอลลิส

Test Statistics^{a,b}

	Tgt/Ref
Chi-Square	1.636
df	3
Asymp. Sig.	.651

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: solution

ตาราง 9 การเปรียบเทียบ 2 กลุ่มอิสระด้วยสถิติแมนวิทนีย์ ยู

9.1 MTA : GIC-CS

Test Statistics ^b	
	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	8.000
Z	-.577
Asymp. Sig. (2-tailed)	.564
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.800 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

9.2 MTA : CaSiO3

Test Statistics ^b	
	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	3.000
Wilcoxon W	9.000
Z	-.655
Asymp. Sig. (2-tailed)	.513
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.700 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

9.3 MTA : Ketac

Test Statistics ^b	
	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	3.000
Wilcoxon W	9.000
Z	-.655
Asymp. Sig. (2-tailed)	.513
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.700 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

9.4 GIC-CS : CaSiO₃Test Statistics^b

	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	8.000
Z	-.577
Asymp. Sig. (2-tailed)	.564
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.800 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

9.5 GIC-CS : Ketac

Test Statistics^b

	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	1.000
Wilcoxon W	7.000
Z	-1.155
Asymp. Sig. (2-tailed)	.248
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.400 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

9.6 CaSiO₃ : KetacTest Statistics^b

	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	3.000
Wilcoxon W	9.000
Z	-.655
Asymp. Sig. (2-tailed)	.513
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.700 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

*Runx2 ในระยะเวลาวันที่ 4

ตาราง 10 สถิติเชิงพรรณนา

Descriptives

Tgt/Ref

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
10%FBS	3	.429900000	.018200000	.0105077749	.384688694	.475111306	.4169000	.4507000
Free serum	3	.081233333	.0095028066	.0054864480	.057627053	.104839614	.0716000	.0906000
MTA	3	.047900000	.0259408944	.0149769823	-.016540754	.112340754	.0272000	.0770000
GIC-CS	3	.040333333	.0106397055	.0061428368	.013902840	.066763827	.0323000	.0524000
CaSiO3	3	.025266667	.0100947181	.0058281882	.000189997	.050343337	.0137000	.0323000
Ketac	3	.037433333	.0087489047	.0050511825	.015699849	.059166817	.0282000	.0456000
Total	18	.110344444	.1486660776	.0350409305	.036414543	.184274346	.0137000	.4507000

ตาราง 11 การวิเคราะห์หลายกลุ่มอิสระด้วยสถิติครัสคัล วอลลิส

Test Statistics ^{a,b}	
	Tgt/Ref
Chi-Square	2.869
df	3
Asymp. Sig.	.412

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: solution

ตาราง 12 การเปรียบเทียบ 2 กลุ่มอิสระด้วยสถิติแมนวิทนีย ยู

12.1 MTA : GIC-CS

Test Statistics ^b	
	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	4.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-.218
Asymp. Sig. (2-tailed)	.827
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

12.2 MTA : CaSiO₃

Test Statistics ^b	
	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	8.000
Z	-1.091
Asymp. Sig. (2-tailed)	.275
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.400 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

12.3 MTA : Ketac

Test Statistics ^b	
	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	4.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-.218
Asymp. Sig. (2-tailed)	.827
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

12.4 GIC-CS : CaSiO₃Test Statistics^b

	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	.500
Wilcoxon W	6.500
Z	-1.771
Asymp. Sig. (2-tailed)	.077
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

12.5 GIC-CS : Ketac

Test Statistics^b

	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	4.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-.218
Asymp. Sig. (2-tailed)	.827
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

12.6 CaSiO₃ : KetacTest Statistics^b

	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	8.000
Z	-1.091
Asymp. Sig. (2-tailed)	.275
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.400 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

*Runx2 ในระยะเวลาวันที่ 7

ตาราง 13 สถิติเชิงพรรณนา

Descriptives

Tgt/Ref

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					10%FBS	3		
Free serum	3	.105600000	.0380784716	.0219846158	.011007833	.200192167	.0644000	.1395000
MTA	3	.045533333	.0114128582	.0065892168	.017182222	.073884445	.0356000	.0580000
GIC-CS	3	.053966667	.0186808280	.0107853811	.007560917	.100372416	.0421000	.0755000
CaSiO3	3	.025833333	.0091089699	.0052590662	.003205398	.048461269	.0165000	.0347000
Ketac	3	.041566667	.0037819748	.0021835242	.032171720	.050961613	.0372000	.0438000
Total	18	.456583333	.9906960240	.2335092922	-.036078209	.949244876	.0165000	3.3720000

ตาราง 14 การวิเคราะห์หลายกลุ่มอิสระด้วยสถิติครัสคัล วอลลิส

	Tgt/Ref
Chi-Square	6.846
df	3
Asymp. Sig.	.077

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: solution

ตาราง 15 การเปรียบเทียบ 2 กลุ่มอิสระด้วยสถิติแมนวิทนีย ยู

15.1 MTA : GIC-CS

Test Statistics ^b	
	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	3.000
Wilcoxon W	9.000
Z	-.655
Asymp. Sig. (2-tailed)	.513
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.700 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

15.2 MTA : CaSiO₃

Test Statistics ^b	
	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)	.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

15.3 MTA : Ketac

Test Statistics ^b	
	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	4.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-.218
Asymp. Sig. (2-tailed)	.827
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

15.4 GIC-CS : CaSiO₃Test Statistics^b

	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)	.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

15.5 GIC-CS : Ketac

Test Statistics^b

	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	8.000
Z	-1.091
Asymp. Sig. (2-tailed)	.275
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.400 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

15.6 CaSiO₃ : KetacTest Statistics^b

	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)	.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

*Runx2 ในระยะเวลาวันที่ 10

ตาราง 16 สถิติเชิงพรรณนา

Descriptives

Tgt/Ref

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
10%FBS	3	3.87700000	.5444657932	.3143474723	2.524471990	5.229528010	3.2590000	4.2860000
Free serum	3	.145100000	.0266445116	.0153832160	.078911364	.211288636	.1280000	.1758000
MTA	3	.041466667	.0066017674	.0038115322	.025066967	.057866366	.0343000	.0473000
GIC-CS	2	.090300000	.0705692568	.0499000000	-.543739616	.724339616	.0404000	.1402000
CaSiO3	3	.046933333	.0206780882	.0119384998	-.004433885	.098300552	.0291000	.0696000
Ketac	3	.030833333	.0116864594	.0067471805	.001802559	.059864108	.0175000	.0393000
Total	17	.741447059	1.5091871513E0	.3660316490	-.034505374	1.517399491	.0175000	4.2860000

ตาราง 17 การวิเคราะห์หลายกลุ่มอิสระด้วยสถิติครัสคัล วอลลิส

Test Statistics^{a,b}

	Tgt/Ref
Chi-Square	3.227
df	3
Asymp. Sig.	.358

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: solution

ตาราง 18 การเปรียบเทียบ 2 กลุ่มอิสระด้วยสถิติแมนวิทนีย ยู

18.1 MTA : GIC-CS

Test Statistics ^b	
	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	8.000
Z	-.577
Asymp. Sig. (2-tailed)	.564
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.800 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

18.2 MTA : CaSiO₃

Test Statistics ^b	
	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	4.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-.218
Asymp. Sig. (2-tailed)	.827
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

18.3 MTA : Ketac

Test Statistics ^b	
	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	8.000
Z	-1.091
Asymp. Sig. (2-tailed)	.275
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.400 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

18.4 GIC-CS : CaSiO₃Test Statistics^b

	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	8.000
Z	-.577
Asymp. Sig. (2-tailed)	.564
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.800 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

18.5 GIC-CS : Ketac

Test Statistics^b

	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.732
Asymp. Sig. (2-tailed)	.083
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.200 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

18.6 CaSiO₃ : KetacTest Statistics^b

	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	8.000
Z	-1.091
Asymp. Sig. (2-tailed)	.275
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.400 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

*ALP ในระยะเวลาวันที่ 4

ตาราง 19 สถิติเชิงพรรณนา

Descriptives

Tgt/Ref

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					10%FBS	3		
Free serum	3	.003190000	.0013425722	.0007751344	-.000145134	.006525134	.0023900	.0047400
MTA	3	.000118500	.0000780243	.0000450473	-.000075323	.000312323	.0000648	.0002080
GIC-CS	3	.000273667	.0001136060	.0000655905	-.000008546	.000555880	.0001630	.0003900
CaSiO3	3	.000122800	.0000568095	.0000327990	-.000018323	.000263923	.0000654	.0001790
Ketac	3	.000299667	.0001257312	.0000725909	-.000012667	.000612000	.0002080	.0004430
Total	18	.001298550	.0019694674	.0004642079	-.000319157	.002277943	.0000648	.0072000

ตาราง 20 การวิเคราะห์หลายกลุ่มอิสระด้วยสถิติครัสคัล วอลลิส

Test Statistics ^{a,b}	
	Tgt/Ref
Chi-Square	6.265
df	3
Asymp. Sig.	.099

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: solution

ตาราง 21 การเปรียบเทียบ 2 กลุ่มอิสระด้วยสถิติแมนวิทนีย์ ยู

21.1 MTA : GIC-CS

Test Statistics ^b	
	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	1.000
Wilcoxon W	7.000
Z	-1.528
Asymp. Sig. (2-tailed)	.127
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.200 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

21.2 MTA : CaSiO₃

Test Statistics ^b	
	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	4.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-.218
Asymp. Sig. (2-tailed)	.827
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

21.3 MTA : Ketac

Test Statistics ^b	
	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	.500
Wilcoxon W	6.500
Z	-1.771
Asymp. Sig. (2-tailed)	.077
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

21.4 GIC-CS : CaSiO₃Test Statistics^b

	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	1.000
Wilcoxon W	7.000
Z	-1.528
Asymp. Sig. (2-tailed)	.127
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.200 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

21.5 GIC-CS : Ketac

Test Statistics^b

	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	4.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-.218
Asymp. Sig. (2-tailed)	.827
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

21.6 CaSiO₃ : KetacTest Statistics^b

	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)	.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

*ALP ในระยะเวลาวันที่ 7

ตาราง 22 สถิติเชิงพรรณนา

Descriptives

Tgt/Ref

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
10%FBS	3	.009330000	.0092523348	.0053418380	-.013654074	.032314074	.0002000	.0187000
Free serum	3	.015033333	.0064298782	.0037122919	-.000939370	.031006036	.0078000	.0201000
MTA	3	.000421000	.0002511195	.0001449839	-.000202815	.001044815	.0002560	.0007100
GIC-CS	3	.000342000	.0002718455	.0001569501	-.000333302	.001017302	.0001120	.0006420
CaSiO3	3	.000221667	.0000826458	.0000477156	.000016363	.000426970	.0001420	.0003070
Ketac	3	.000352333	.0001492794	.0000861865	-.000018497	.000723164	.0002530	.0005240
Total	18	.004283389	.0071312449	.0016808506	.000737104	.007829674	.0001120	.0201000

ตาราง 23 การวิเคราะห์หลายกลุ่มอิสระด้วยสถิติครัสคัล วอลลิส

Test Statistics ^{a,b}	
	Tgt/Ref
Chi-Square	1.667
df	3
Asymp. Sig.	.644

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: solution

ตาราง 24 การเปรียบเทียบ 2 กลุ่มอิสระด้วยสถิติแมนวิทนีย ยู

24.1 MTA : GIC-CS

Test Statistics ^b	
	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	3.000
Wilcoxon W	9.000
Z	-.655
Asymp. Sig. (2-tailed)	.513
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.700 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

24.2 MTA : CaSiO₃

Test Statistics ^b	
	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	8.000
Z	-1.091
Asymp. Sig. (2-tailed)	.275
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.400 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

24.3 MTA : Ketac

Test Statistics ^b	
	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	3.000
Wilcoxon W	9.000
Z	-.655
Asymp. Sig. (2-tailed)	.513
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.700 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

24.4 GIC-CS : CaSiO₃Test Statistics^b

	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	4.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-.218
Asymp. Sig. (2-tailed)	.827
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

24.5 GIC-CS : Ketac

Test Statistics^b

	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	4.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-.218
Asymp. Sig. (2-tailed)	.827
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

24.6 CaSiO₃ : KetacTest Statistics^b

	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	8.000
Z	-1.091
Asymp. Sig. (2-tailed)	.275
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.400 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

*ALP ในระยะเวลาวันที่ 10

ตาราง 25 สถิติเชิงพรรณนา

Descriptives

Tgt/Ref

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					10%FBS	3		
Free serum	3	.061300000	.0285816375	.0165016161	-.009700723	.132300723	.0299000	.0858000
MTA	3	.000424000	.0002036762	.0001175925	-.000081960	.000929960	.0002420	.0006440
GIC-CS	2	.000028400	.0000243245	.0000172000	-.000190147	.000246947	.0000112	.0000456
CaSiO3	3	.000267077	.0002365001	.0001365434	-.000320422	.000854575	.0000032	.0004600
Ketac	3	.000009123	.0000055994	.0000032328	-.000004786	.000023033	.0000039	.0000150
Total	17	.013996906	.0276237922	.0066997537	-.000205938	.028199749	.0000032	.0858000

ตาราง 26 การวิเคราะห์หลายกลุ่มอิสระด้วยสถิติครัสคัล วอลลิส

Test Statistics^{a,b}

	Tgt/Ref
Chi-Square	5.073
df	3
Asymp. Sig.	.167

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: solution

ตาราง 27 การเปรียบเทียบ 2 กลุ่มอิสระด้วยสถิติแมนวิทนีย์ ยู

27.1 MTA : GIC-CS

Test Statistics ^b	
	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	5.000
Z	-.577
Asymp. Sig. (2-tailed)	.564
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.800 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

27.2 MTA : CaSiO₃

Test Statistics ^b	
	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	1.000
Wilcoxon W	4.000
Z	-1.155
Asymp. Sig. (2-tailed)	.248
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.400 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

27.3 MTA : Ketac

Test Statistics ^b	
	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)	.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

27.4 GIC-CS : CaSiO₃Test Statistics^b

	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	1.000
Wilcoxon W	4.000
Z	-.775
Asymp. Sig. (2-tailed)	.439
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.667 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

27.5 GIC-CS : Ketac

Test Statistics^b

	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.732
Asymp. Sig. (2-tailed)	.083
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.200 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

27.6 CaSiO₃ : KetacTest Statistics^b

	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	3.000
Wilcoxon W	9.000
Z	.000
Asymp. Sig. (2-tailed)	1.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

*OCN ในระยะเวลาวันที่ 4
ตาราง 28 สถิติเชิงพรรณนา

Descriptives

Tgt/Ref

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					10%FBS	3		
Free serum	3	.000391333	.0000851136	.0000491404	.000179899	.000602767	.0003330	.0004890
MTA	3	.000144133	.0000882443	.0000509479	-.000075078	.000363344	.0000494	.0002240
GIC-CS	3	.000452667	.0002863710	.0001653364	-.000258718	.001164052	.0002310	.0007760
CaSiO3	3	.000190400	.0001736902	.0001002801	-.000241070	.000621870	.0000302	.0003750
Ketac	3	.000177167	.0001444925	.0000834228	-.000181773	.000536106	.0000215	.0003070
Total	18	.000983867	.0028868208	.0006804302	-.000451716	.002419449	.0000215	.0125000

ตาราง 29 การวิเคราะห์หลายกลุ่มอิสระด้วยสถิติครัสคัล วอลลิส

Test Statistics ^{a,b}	
	Tgt/Ref
Chi-Square	3.974
df	3
Asymp. Sig.	.264

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: solution

ตาราง 30 การเปรียบเทียบ 2 กลุ่มอิสระด้วยสถิติแมนวิทนีย ยู

30.1 MTA : GIC-CS

Test Statistics ^b	
	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)	.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

30.2 MTA : CaSiO₃

Test Statistics ^b	
	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	4.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-.218
Asymp. Sig. (2-tailed)	.827
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

30.3 MTA : Ketac

Test Statistics ^b	
	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	4.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-.218
Asymp. Sig. (2-tailed)	.827
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

30.4 GIC-CS : CaSiO₃Test Statistics^b

	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	8.000
Z	-1.091
Asymp. Sig. (2-tailed)	.275
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.400 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

30.5 GIC-CS : Ketac

Test Statistics^b

	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	1.000
Wilcoxon W	7.000
Z	-1.528
Asymp. Sig. (2-tailed)	.127
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.200 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

30.6 CaSiO₃ : KetacTest Statistics^b

	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	4.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-.218
Asymp. Sig. (2-tailed)	.827
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

*OCN ในระยะเวลาวันที่ 7

ตาราง 31 สถิติเชิงพรรณนา

Descriptives

Tgt/Ref

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
10%FBS	3	.047500000	.0175236982	.0101173119	-.003968720	.091031280	.0313000	.0661000
Free serum	3	.001462333	.0010574480	.0006105179	-.001164513	.004089180	.0007750	.0026800
MTA	3	.000290667	.0001033941	.0000596946	.000033822	.000547512	.0001730	.0003670
GIC-CS	3	.000282667	.0000709389	.0000409566	.000106445	.000458889	.0002010	.0003290
CaSiO3	3	.000224333	.0001638302	.0000945874	-.000182643	.000631310	.0001180	.0004130
Ketac	3	.000237000	.0000528488	.0000305123	.000105716	.000368284	.0001780	.0002800
Total	18	.008332833	.0190086900	.0044803912	-.001119966	.017785632	.0001180	.0661000

ตาราง 32 การวิเคราะห์หลายกลุ่มอิสระด้วยสถิติครัสคัล วอลลิส

Test Statistics^{a,b}

	Tgt/Ref
Chi-Square	1.359
df	3
Asymp. Sig.	.715

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: solution

ตาราง 33 การเปรียบเทียบ 2 กลุ่มอิสระด้วยสถิติแมนวิทนีย ยู

33.1 MTA : GIC-CS

Test Statistics ^b	
	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	3.000
Wilcoxon W	9.000
Z	-.655
Asymp. Sig. (2-tailed)	.513
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.700 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

33.2 MTA : CaSiO₃

Test Statistics ^b	
	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	3.000
Wilcoxon W	9.000
Z	-.655
Asymp. Sig. (2-tailed)	.513
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.700 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

33.3 MTA : Ketac

Test Statistics ^b	
	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	3.000
Wilcoxon W	9.000
Z	-.655
Asymp. Sig. (2-tailed)	.513
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.700 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

33.4 GIC-CS : CaSiO₃Test Statistics^b

	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	3.000
Wilcoxon W	9.000
Z	-.655
Asymp. Sig. (2-tailed)	.513
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.700 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

33.5 GIC-CS : Ketac

Test Statistics^b

	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	8.000
Z	-1.091
Asymp. Sig. (2-tailed)	.275
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.400 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

33.6 CaSiO₃ : KetacTest Statistics^b

	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	3.000
Wilcoxon W	9.000
Z	-.655
Asymp. Sig. (2-tailed)	.513
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.700 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

*OCN ในระยะเวลาวันที่ 10

ตาราง 34 สถิติเชิงพรรณนา

Descriptives

Tgt/Ref

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
10%FBS	3	.084348333	.0738066563	.0426122929	-.098997565	.267694232	.0003450	.1388000
Free serum	3	.308456667	.5233905832	.3021796941	-.991717619	1.608630952	.0024700	.9128000
MTA	3	.000540667	.0001026856	.0000592856	.000285581	.000795752	.0004750	.0006590
GIC-CS	3	.017546667	.0292318107	.0168769938	-.055069177	.090162510	.0004880	.0513000
CaSiO3	3	.000294967	.0002564631	.0001480690	-.000342123	.000932056	.0000519	.0005630
Ketac	3	.000480000	.0001814056	.0001047346	.000029363	.000930637	.0002920	.0006540
Total	18	.068611217	.2146749168	.0505993631	-.038144108	.175366541	.0000519	.9128000

ตาราง 35 การวิเคราะห์หลายกลุ่มอิสระด้วยสถิติครัสคัล วอลลิส

Test Statistics^{a,b}

	Tgt/Ref
Chi-Square	3.950
df	3
Asymp. Sig.	.267

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: solution

ตาราง 36 การเปรียบเทียบ 2 กลุ่มอิสระด้วยสถิติแมนวิทนีย ยู

36.1 MTA : GIC-CS

Test Statistics ^b	
	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	1.500
Wilcoxon W	7.500
Z	-1.328
Asymp. Sig. (2-tailed)	.184
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.200 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

36.2 MTA : CaSiO₃

Test Statistics ^b	
	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	8.000
Z	-1.091
Asymp. Sig. (2-tailed)	.275
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.400 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

36.3 MTA : Ketac

Test Statistics ^b	
	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	4.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-.218
Asymp. Sig. (2-tailed)	.827
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

36.4 GIC-CS : CaSiO₃Test Statistics^b

	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	1.000
Wilcoxon W	7.000
Z	-1.528
Asymp. Sig. (2-tailed)	.127
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.200 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

36.5 GIC-CS : Ketac

Test Statistics^b

	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	8.000
Z	-1.091
Asymp. Sig. (2-tailed)	.275
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.400 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution

36.6 CaSiO₃ : KetacTest Statistics^b

	Tgt/Ref
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	8.000
Z	-1.091
Asymp. Sig. (2-tailed)	.275
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.400 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: solution



ภาคผนวก ช

ภาคผนวก ข
การวิเคราะห์ข้อมูลการทดสอบวัดการสะสมของแร่ธาตุ

ตาราง 1 สถิติเชิงพรรณนา

Descriptives

optical density

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
MTA	24	.282625	.0447260	.0091297	.263739	.301511	.2180	.3380
GIC-CS	24	.244833	.0363170	.0074132	.229498	.260169	.1730	.2870
CaSiO ₃	24	.269000	.0398519	.0081347	.252172	.285828	.2060	.3200
Ketac	24	.247500	.0368640	.0075248	.231934	.263066	.2050	.3200
Control	24	.314750	.0563855	.0115096	.290940	.338560	.1820	.4150
Total	120	.271742	.0498865	.0045540	.262724	.280759	.1730	.4150

ตาราง 2 การทดสอบสำหรับการกระจายปกติ

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		optical density
N		120
Normal Parameters ^{a, b}	Mean	.271742
	Std. Deviation	.0498865
Most Extreme Differences	Absolute	.121
	Positive	.121
	Negative	-.085
Kolmogorov-Smirnov Z		1.324
Asymp. Sig. (2-tailed)		.060

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

ตาราง 3 การทดสอบความแปรปรวนเป็นเอกพันธ์

Test of Homogeneity of Variances

optical density

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.757	4	115	.555

ตาราง 4 การวิเคราะห์หลายกลุ่มอิสระด้วยสถิติอะโนวา

ANOVA

optical density

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.079	4	.020	10.441	.000
Within Groups	.217	115	.002		
Total	.296	119			

ตาราง 5 การเปรียบเทียบพหุคูณ

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

optical density

Tukey HSD

(I) solution	(J) solution	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
MTA	GIC-CS	.0377917 [†]	.0125471	.026	.003017	.072566
	CaSiO3	.0136250	.0125471	.813	-.021150	.048400
	Ketac	.0351250 [†]	.0125471	.046	.000350	.069900
	Control	-.0321250	.0125471	.085	-.066900	.002650
GIC-CS	MTA	-.0377917 [†]	.0125471	.026	-.072566	-.003017
	CaSiO3	-.0241667	.0125471	.310	-.058941	.010608
	Ketac	-.0026667	.0125471	1.000	-.037441	.032108
	Control	-.0699167 [†]	.0125471	.000	-.104691	-.035142
CaSiO3	MTA	-.0136250	.0125471	.813	-.048400	.021150
	GIC-CS	.0241667	.0125471	.310	-.010608	.058941
	Ketac	.0215000	.0125471	.430	-.013275	.056275

	Control	-.0457500	.0125471	.004	-.080525	-.010975
Ketac	MTA	-.0351250	.0125471	.046	-.069900	-.000350
	GIC-CS	.0026667	.0125471	1.000	-.032108	.037441
	CaSiO3	-.0215000	.0125471	.430	-.056275	.013275
	Control	-.0672500	.0125471	.000	-.102025	-.032475
Control	MTA	.0321250	.0125471	.085	-.002650	.066900
	GIC-CS	.0699167	.0125471	.000	.035142	.104691
	CaSiO3	.0457500	.0125471	.004	.010975	.080525
	Ketac	.0672500	.0125471	.000	.032475	.102025

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.





ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล นายปริญญา ชัยสิงห์เหนือ
 วัน เดือน ปีเกิด 28 กรกฎาคม 2522
 สถานที่เกิด อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น
 สถานที่อยู่ปัจจุบัน บ้านเลขที่ 35/115 หมู่บ้านปริญญาดา ถนนสามัคคี
 ตำบลท่าทราย อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี
 รหัสไปรษณีย์ 11000

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2540 มัธยมศึกษาตอนปลาย
 จาก โรงเรียนขอนแก่นวิทยายน จังหวัดขอนแก่น
 พ.ศ. 2547 ทันตแพทยศาสตรบัณฑิต (ทันตแพทยศาสตร์)
 จาก มหาวิทยาลัยมหิดล
 พ.ศ. 2557 วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (ทันตกรรมคลินิก)
 จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ