

การประเมินพิษของสารยึติดัดเนื้อฟันโดยวิธีอาการโอเวอร์เลย์

สุวรรณา ก่อสุวรรณวงศ์

นักวิจัย งานบริการวิชาการและวิจัย
คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ราชพร สัจจันทร์

เจ้าหน้าที่ช่วยวิจัย งานบริการวิชาการและวิจัย
คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ละอองทอง วัชรภักย์

ศาสตราจารย์ ภาควิชาทันตกรรมหัตถการ
คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ติดต่อเกี่ยวกับบทความ:

สุวรรณา ก่อสุวรรณวงศ์

งานบริการวิชาการและวิจัย

คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ถ.โยธี เขตราชเทวี กทม. 10400

โทร: 02-6607755 ต่อ 7756-7757

โทรสาร: 02-3548510

อีเมล: dtsat@mahidol.ac.th

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบความเป็นพิษของสารยึติดัดเนื้อฟันระบบเซิลฟ-เอชซึ่ง ไพรเมอร์ ชนิดชั้นตอนเดียว ได้แก่ จีบอนด์ และเคลียร์ฟิลด์ ไตรเอส-บอนด์ และชนิดสองชั้นตอน ได้แก่ เคลียร์ฟิลด์ เอสอีบอนด์เอ็กซ์ โดยวิธีอาการโอเวอร์เลย์-นำเซลล์แอลเกาสองแก้วจำนวน 3×10^5 เซลล์/มล. เลี้ยงในภาชนะเลี้ยงขนาด 90 มม. ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ ดีเอ็มอีเอ็ม ที่มีฟีทาลคาร์บซีรีมร้อยละ 10 ภายใต้สภาวะ 37 องศาเซลเซียส และคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 24 ชม. เพื่อให้เซลล์โตเต็มภาชนะเลี้ยงในลักษณะเซลล์ชั้นเดียว จึงเทอาหารวันร้อยละ 3 ลงในภาชนะเลี้ยงพร้อมทั้งย้อมสีนิวทริลเรดร้อยละ 0.01 หยดสารทดสอบ 2 ไมโครลิตร ลงบนกระดาษเซลลูโลสในเตรทขนาด 5 มม. และวางบนอาหารวันที่แข็งตัวแล้ว ในแต่ละการทดลอง วัสดุทดสอบแต่ละตัวอย่างถูกทดสอบครั้งละ 3 ตัวอย่าง พร้อมกับกลุ่มควบคุม และทำซ้ำจำนวน 4 ครั้ง จึงทำการประเมินพิษที่เกิดขึ้นตามเกณฑ์ไอเอสโอ 7405 ภายหลังจากสัมผัสของสารที่ถูกปลดปล่อยจากวัสดุทดสอบไปสู่เซลล์ในตู้เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชม. ผลการศึกษาพบว่า การแพร่กระจายของสารทดสอบไปสู่เซลล์ของเคลียร์ฟิลด์ ไตรเอสบอนด์ และจีบอนด์ อยู่ในระดับเดียวกัน ส่วนเคลียร์ฟิลด์ เอสอีบอนด์เอ็กซ์ มีการแพร่กระจายของสารมากกว่า 2 ชนิดแรก สำหรับการที่เซลล์ถูกทำลายด้วยสารยึติดัดเนื้อฟันทั้ง 3 ชนิด ไม่แตกต่างกัน ($p > .05$) โดยสรุปพบว่าความเป็นพิษทางสารยึติดัดเนื้อฟันที่ทดสอบในการทดลองนี้ไม่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม เทคนิคนี้ยังคงเป็นการประเมินพิษของสารเบื้องต้น ดังนั้น การประเมินพิษของวัสดุบูรณะฟัน ที่มีการสัมผัสกับเนื้อฟันในทางคลินิก โดยการใช้แบบจำลองเนื้อฟัน จึงเป็นการศึกษาที่ควรจะทำต่อไป

บทนำ

การประเมินสมบัติทางชีวภาพมีความสำคัญ คือเมื่อนำวัสดุไปใช้กับผู้ป่วยในคลินิกต้องไม่ก่อให้เกิดผลข้างเคียงที่เป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อในโพรงประสาทฟันและเนื้อเยื่อภายในช่องปาก วิธีการประเมินสมบัติทางชีวภาพของวัสดุทางทันตกรรมแบ่งออกเป็น 3 ระดับ คือ การทดสอบในระดับแรก (Initial test) เป็นการประเมินสมบัติทางชีวภาพในห้องปฏิบัติการ (*In vitro*) ได้แก่ การทดสอบการแตกของเม็ดเลือดแดง (Haemolysis test) การทดสอบการเกิดมะเร็ง (Carcinogenesis test) และการทดสอบพิษโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ (Cell culture test) การทดสอบในระดับทุติยภูมิ (Secondary test) เป็นการประเมินสมบัติทางชีวภาพในระดับที่สอง เป็นการทดลองในสัตว์ทดลองขนาดเล็ก

เช่น หนู กระต่าย เป็นต้น ระดับสุดท้าย คือ การใช้งานจริงในคลินิก (Usage test) มีขั้นตอนที่เหมือนกับการนำไปใช้จริงในคลินิก โดยทดสอบในสัตว์ใหญ่ เช่น ลิง สุนัข หรือคน ซึ่งต้องได้รับการยินยอมจากผู้ป่วย และผ่านการพิจารณาของคณะกรรมการสิทธิมนุษยชนเกี่ยวกับการทดลองในมนุษย์ของสถาบันที่ผู้ทำวิจัยสังกัด สำหรับการประเมินสมบัติทางชีวภาพระดับแรก ซึ่งเป็นการประเมินในห้องปฏิบัติการ โดยเฉพาะการประเมินพิษด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ เป็นที่นิยมใช้อย่างกว้างขวาง ในระยะแรก Kawahara และคณะ¹ เป็นกลุ่มนักวิจัยที่เริ่มนำวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์มาประเมินสมบัติทางชีวภาพของวัสดุทันตกรรมในปี พ.ศ. 2511 ต่อมา Schmalz² ได้ปรับปรุงและพัฒนาการประเมินสมบัติทางชีวภาพของวัสดุทางทันตกรรมเพื่อให้ได้ข้อมูลที่น่าเชื่อถือ โดยศึกษาการดิฟฟิวชัน (Agar diffusion) เปรียบเทียบวิธีการปฏิบัติงาน 3 ลักษณะ ดังนี้ 1) ศึกษาในห้องปฏิบัติการ 2 แห่งที่ต่างกัน 2) ศึกษาในห้องปฏิบัติการ 1 แห่ง และผู้ปฏิบัติงาน 2 คนโดยต่างคนต่างปฏิบัติ 3) ศึกษาในห้องปฏิบัติการ 1 แห่งและผู้ปฏิบัติงาน 1 คน โดยศึกษาเป็นระยะเวลา 12 เดือน พบว่าวิธีการการดิฟฟิวชัน สามารถประเมินพิษของวัสดุทันตกรรมโดยจัดลำดับความเป็นพิษของวัสดุได้ ซึ่งมีกลุ่มควบคุมและกลุ่มวัสดุทดสอบ

โดยการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้านความเป็นพิษที่เกิดขึ้น อาการ์-โอเวอร์เลย์ (Agar overlay) หรือการดิฟฟิวชัน เป็นวิธีมาตรฐานวิธีหนึ่งที่นิยมนำมาใช้ในการประเมินสมบัติทางชีวภาพของวัสดุทันตกรรม พิษจากวัสดุทดสอบซึมผ่านอาหารวุ้น (Agar medium) ไปยังเซลล์ที่ย้อมสีนิวทรัลเรด (Neutral red) เป็นสีที่ใช้อ้อมเซลล์มีชีวิต เมื่อเซลล์ได้รับพิษจากวัสดุจะมีการปลดปล่อยสีแดงออกมาจากไลโซโซม (Lysosome) ของเซลล์ เกิดเป็นโซนใส (Clear zone or decolorization zone) ข้างใต้หรือโดยรอบตำแหน่งที่วางวัสดุทดสอบ วิธีการการโอเวอร์เลย์ เริ่มนำมาใช้โดย Wennberg และคณะ³ ซึ่งได้นำวิธีการประเมินพิษของสารผ่านอาหารวุ้นมาใช้ในการประเมินพิษของสาร ต่อมา Schmalz และคณะ⁴ ได้นำสารเรืองแสง (Fluoresceindiacetate staining) มาใช้ในการประเมินพิษของสาร แต่ไม่ได้รับความนิยม เพราะเป็นวิธีที่ยุ่งยาก ในการประเมินพิษของวัสดุทางทันตกรรมด้วยวิธีการการโอเวอร์เลย์ นั้นวิเคราะห์ผลการทดสอบตามไอเอสโอ/เอฟดีไอเอส 7405:2008 (อี) (ISO/FDIS 7405 : 2008 (E))⁵ โดยประเมินจากดัชนีการตอบสนองของเซลล์ (Cell response index) ต่อสารทดสอบ ซึ่งดัชนีโซนใส (Decolorization Index) กับดัชนีการทำลายเซลล์ (Lysis Index) จะให้ค่าดัชนีตัวเลขแยกจากกันโดยมีเกณฑ์ตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 เกณฑ์ไอเอสโอ/เอฟดีไอเอส 7405: 2008 (อี)
Table 1 ISO/FDIS 7405: 2008 (E)

Decolorization index	Description	Lysis index	Description of decolorized zone	Scale	Cell response	Interpretation
0	No detectable decolorization zone around under specimen	0	No observable cytotoxicity	0	0	Noncytotoxic
1	Decolorization zone limited to area under specimen	1	Less than 20% of the decolorized zone affected	1	1	Mildly cytotoxic
2	Decolorization zone extends less than 0.5 cm beyond specimen	2	20% to < 40% of the decolorized zone affected	2	2 to 3	Moderately cytotoxic
3	Decolorization zone extends 0.5 cm to 1.0 cm beyond specimen	3	40% to < 60% of the decolorized zone affected			
4	Decolorization zone extends greater than 1.0 cm beyond specimen but not involve entire dish	4	60% to < 80% of the decolorized zone affected	3	4 to 5	Severely cytotoxic
5	Decolorization zone involves entire dish	5	Greater than 80% of the decolorized zone affected			

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบและบริษัทผู้ผลิตสารยึดติดเนื้อฟัน 3 ชนิด ที่ใช้ในการวิจัย

Table 2 Components and manufacturers of three dentine bonding agents used in this experiment

Products	Components	Manufacturer	Lot.No.
G-Bond™	4-MET monomer Phosphoric acid Acetone Water UDMA Silica	GC Corporation, Tokyo, Japan	002302
Clearfil™ S ³ Bond™	MDP Bis-GMA HEMA Hydrophobic dimethacrylate Di-camphorquinone Ethyl alcohol Water Silanated colloidal Silica Hydrophilic monomer	Kuraray Medical INC., Okayama, Japan	00021A
Clearfil™ SE Bond X	Primer: MDP HEMA Di-camphorquinone Water Bonding: Bis-GMA MDP HEMA Di-camphorquinone Silanated colloidal Silica	Kuraray Medical INC., Okayama, Japan	Primer: Lot 00603A Bond: Lot 00852A

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ย±ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โซนสี ค่าดัชนีโซนสี ค่าดัชนีการตอบสนองของเซลล์ ค่าสเกล ค่าดัชนีเซลล์ถูกทำลาย ค่าดัชนีการตอบสนองของเซลล์และค่าสเกลที่ได้ต่อสารยึดติดเนื้อฟัน 3 ประเภท

Table 3 Mean±SD of Decolorization zone, Decolorization index, Cell response, Scale, Lysis index, Cell response and Scale of three bonding agents

Dentine bonding agents	Decolorization zone (mm.)	Decolorization index	Cell response	Scale	Lysis index	Cell response	Scale
PVC (positive control)	7.386 ± 0.754	3	3	2	2	2	2
Clearfil™ S ³ Bond	4.237 ± 0.986	2	2	2	1	1	1
G-Bond™	6.466 ± 1.131	3	3	2	1	1	1
Clearfil™ SE Bond X	10.955 ± 0.997	4	4	3	1	1	1

ในการประเมินสมบัติทางชีวภาพของวัสดุทันตกรรม โดยวิธีการโอเวอร์เลย์นี้ใช้เป็นวิธีตรวจสอบความเป็นพิษของวัสดุในเบื้องต้นซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย เร็ว งบประมาณค่าใช้จ่ายในการทดสอบไม่แพง และให้ข้อมูลเป็นที่น่าเชื่อถือได้ในระดับหนึ่ง ในการศึกษาการประเมินพิษของสารยึดติดเนื้อฟัน โดยวิธีการโอเวอร์เลย์นี้ เป็นการศึกษาเกี่ยวกับความเข้ากันได้ของวัสดุกับเนื้อเยื่อ ซึ่งยังมีการศึกษาน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาด้านอื่นๆ เช่น ด้านการยึดเกาะ การรื้อซึม เป็นต้น การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะประเมินความเป็นพิษของสารยึดติดเนื้อฟัน 3 ชนิด โดยวิธีการโอเวอร์เลย์

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมเซลล์

นำเซลล์แอลเก้าสองแก้ว เพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ (Culture flask) ขนาด 75 cm² ที่มีเซลล์เรียงตัวเป็นเซลล์ชั้นเดียว (Monolayer) มาถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมด ล้างด้วย 0.01 โมลาร์ ฟอสเฟสบัฟเฟอร์ซาลิน (Phosphate buffer saline) พีเอช 7.4 จำนวน 1 ครั้ง เติมทริปซินเวอร์ซิน (Trypsin versin) ร้อยละ 0.1 จำนวน 10 มล. ทิ้งไว้ 30 วินาที นำขวดเพาะเลี้ยงเข้าในตู้อบควบคุมอัตราการไหลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5.0 ภายใต้สภาวะ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จึงนำขวดออกมาเคาะเบาๆ 2-3 ครั้ง ให้เซลล์หลุดจากพื้นขวด เติมหาอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็ม (D-MEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium; Gibco BRL, Grand Island, N.Y., U.S.A) ที่มีฟีทัลคัลฟซีรัมร้อยละ 10.0 (Fetal calf serum, Gibco BRL, Grand Island, N.Y., U.S.A) ปรับจำนวนเซลล์ให้ได้ 3x10⁵ เซลล์/มล. นับเซลล์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ (Hemacytometer) และนำเซลล์จำนวน 3x10⁵ เซลล์/มล. ใส่ภาชนะเพาะเลี้ยงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มม. ภาชนะ 10 มล. จำนวน 11 ภาชนะ ดังนี้ สารยึดติดเนื้อฟันจำนวน 3 ชนิด ภาชนะ 3 ภาชนะ ภาชนะควบคุมบวกรวมจำนวน 1 ภาชนะ และภาชนะควบคุมลบจำนวน 1 ภาชนะ นำเลี้ยงในตู้อบเป็นเวลา 24 ชั่วโมงจนเซลล์กระจายลักษณะเซลล์ชั้นเดียวประมาณร้อยละ 90.0 ของภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ (Confluence type)

วัสดุที่ทดสอบ

วัสดุที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นสารยึดติดเนื้อฟัน จำนวน 3 ชนิด ที่มีขายในประเทศไทย ตามตารางที่ 2

วิธีการทดสอบ

นำภาชนะที่มีเซลล์เรียงตัวเป็นเซลล์ชั้นเดียวมาถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมด จากนั้นนำอาหารวุ้น ร้อยละ 3.0 (Agar purified Sigma, Chemical Co., Ltd., St.Louis, MO, U.S.A.) ไปอุ่นที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นำอาหารวุ้นจำนวน 10 มล./ภาชนะเพาะเลี้ยง เทลงไปในชั้นของเซลล์ และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ให้อาหารวุ้นแข็งตัว จากนั้นย้อมสีเซลล์ด้วยนิวทรัลเรด (Neutral Red, MERCK, Darmstadt, Germany) ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 จำนวน 10 มิลลิเมตร เป็นเวลา 15 นาที ภายใต้สภาวะ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5.0 จึงดูดสารละลายสีออกให้หมด นำสารยึดติดเนื้อฟัน ได้แก่ จีบอนด์ (G-bond™, GC, Japan) เคลียร์ฟิลด์ ไตรเอสบอนด์ (Clearfil™ S³ Bond™, Kuraray, Japan) และเคลียร์ฟิลด์ เอสอีบอนด์เอ็กซ์ (Clearfil™ SE Bond X, Kuraray, Japan) นำสารทดสอบแต่ละชนิดจำนวน 2 ไมโครลิตร หยดบนกระดาษเซลลูโลสในเตรทขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร พร้อมฉายแสงตามคำแนะนำของบริษัทผู้จำหน่าย นำกระดาษเซลลูโลสในเตรทมาวางบนอาหารวุ้น แล้วจึงนำภาชนะดังกล่าวไปไว้ในตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5.0 เป็นเวลา 24 ชม.

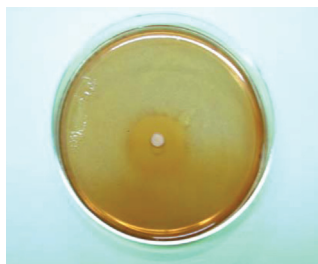
กลุ่มควบคุมลบ ไม่ใส่สารทดสอบ ส่วนกลุ่มควบคุมบวกรจะใช้วัสดุพีวีซี (PVC, Polyvinylchloride) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มม.

การแปลผล

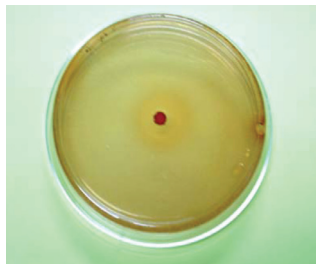
ประเมินดัชนีไซโทไลซิสและดัชนีเซลล์ถูกทำลาย ตามเกณฑ์มาตรฐานไอเอสโอ ดังตารางที่ 1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (Inverted microscope, Nikon TMS, Tokyo, Japan)

ผล

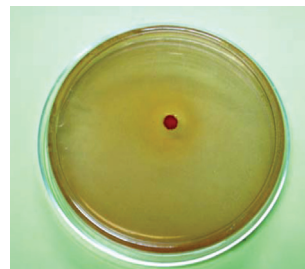
จากการประเมินความเป็นพิษของสารยึดติดเนื้อฟัน โดยวัดระยะจากขอบวัสดุจนถึงบริเวณขอบเขตของเซลล์ที่ย้อมไม่ติดสีนิวทรัลเรด พร้อมทั้งพิจารณาลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับขนาดกำลังขยาย 10 เท่า นำมาหาค่าเฉลี่ยของสารยึดติดเนื้อฟันแต่ละชนิด ดังตารางที่ 3 รูปที่ 1-4 และรูปที่ 5-6 แล้ววิเคราะห์ผลตามเกณฑ์มาตรฐานไอเอสโอ พบว่าค่าเฉลี่ยไซโทไลซิสของสารยึดติดเนื้อฟันมีค่าเฉลี่ย และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเรียงตามลำดับจากน้อยไปหามาก คือ เคลียร์ฟิลด์ ไตรเอสบอนด์ จีบอนด์ และเคลียร์ฟิลด์ เอสอีบอนด์เอ็กซ์ ซึ่งให้ค่า



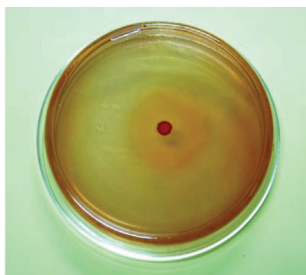
รูปที่ 1 กลุ่มควบคุมบวก พีวีซี
Fig. 1 Positive control : PVC



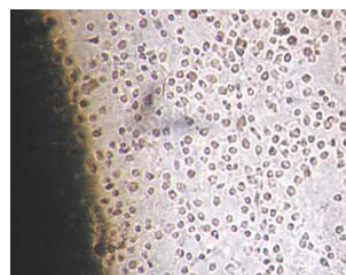
รูปที่ 2 โซนใสรอบจีบอนด์
Fig. 2 Decolorization zone around G-Bond™



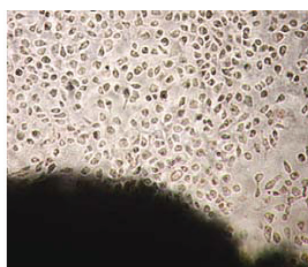
รูปที่ 3 โซนใสรอบเคลียร์ฟิลด์ ไตรเอสบอนด์
Fig. 3 Decolorization zone around Clearfil™ S3 Bond



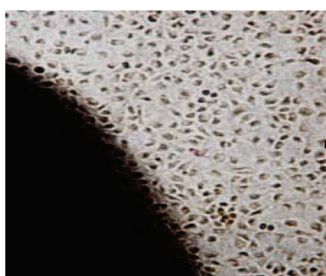
รูปที่ 4 โซนใสรอบเคลียร์ฟิลด์ เอสอีบอนด์เอ็กซ์
Fig. 4 Decolorization zone around Clearfil™ SE Bond X



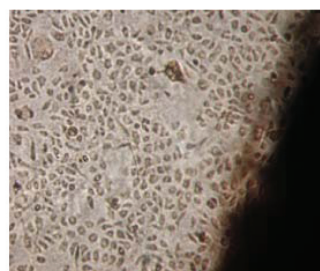
รูปที่ 5 กลุ่มควบคุมบวก ทดสอบด้วยวัสดุโพลีไวนิล (พีวีซี) เซลล์มีลักษณะกลมเป็นจำนวนมาก (กำลังขยาย 10x)
Fig. 5 Cells appearance in positive control : PVC under inverted Microscope a lot of round cells in the clear zone (Mag.10x)



จีบอนด์
G-bond™



เคลียร์ฟิลด์ ไตรเอสบอนด์
Clearfil™ S3 Bond™



เคลียร์ฟิลด์ เอสอีบอนด์เอ็กซ์
Clearfil™ SE Bond X

รูปที่ 6 ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ เมื่อทดสอบด้วยสารย้อมติดเนื้อฟัน: จีบอนด์ เคลียร์ฟิลด์ ไตรเอสบอนด์ และเคลียร์ฟิลด์ เอสอีบอนด์เอ็กซ์

Fig. 6 Cells appearance under inverted microscope : G-bond™, Clearfil™ S3 Bond™ and Clearfil™ SE Bond X (Mag.10x)

ดัชนีโซนไฮ (ค่าดัชนีการตอบสนองของเซลล์เป็น 2 และ 3 ได้ตรงกับสเกล 2 หมายถึง สารเคลียร์ฟิลด์ ไตรเอสบอนด์ และจีบอนด์ มีอัตราการแพร่กระจายพิษของสารที่ซึมผ่านอาหารฟันในระดับปานกลาง ส่วน 4 ได้ตรงกับสเกล 3 หมายถึง สารเคลียร์ฟิลด์ เอสอีบอนด์เอ็กซ์ มีการอัตราการแพร่กระจายพิษของสารที่ซึมผ่านอาหารฟันในระดับมาก ส่วนดัชนีเซลล์ถูกทำลายของสารยึดติดเนื้อฟันทั้ง 3 ประเภทให้ค่าเหมือนกัน คือ 1 ได้ตรงกับสเกล 1 หมายถึงสารยึดติดเนื้อฟันทั้ง 3 ประเภทมีความเป็นพิษระดับเล็กน้อย ตามมาตรฐานไอเอสโอ/เอฟดีไอเอส 7405:2008 (อี) (ISO/FDIS 7405: 2008 (E))⁵ กลุ่มควบคุมบวก ให้ค่าดัชนีโซนไฮเป็น 3 ได้ตรงกับสเกล 2 นั่นคือ มีอัตราการแพร่กระจายพิษของสารที่ซึมผ่านอาหารฟันในระดับปานกลาง ส่วนดัชนีเซลล์ถูกทำลายเป็น 2 ได้ตรงกับสเกล 2 นั่นคือ กลุ่มควบคุมบวกมีความเป็นพิษในระดับปานกลาง ซึ่งจะเห็นได้ว่าจากเกณฑ์มาตรฐานที่กล่าวมา การแปลผลค่าการตอบสนองของเซลล์จะแปลผลแยกจากกันเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนของดัชนีโซนไฮและส่วนของดัชนีการทำลายของเซลล์

บทวิจารณ์

การศึกษานี้เป็นการประเมินพิษของสารยึดติดเนื้อฟัน 3 ชนิด โดยวิธีการโอเวอร์เลย์ Meerbeck และคณะ⁸ ได้ทำการศึกษาระบบสารยึดติดเนื้อฟันประกอบด้วย 3 ส่วน ได้แก่ แอซิดไพรเมอร์ และเรซินโมโนเมอร์ การวิจัยนี้ใช้สารยึดติดเนื้อฟัน 3 ชนิด ได้แก่ จีบอนด์ และเคลียร์ฟิลด์ ไตรเอสบอนด์ เป็นชนิดขั้นตอนเดียว (one - step) ในระบบฮอล-อิน-วัน (all - in - one) และเคลียร์ฟิลด์ เอสอีบอนด์เอ็กซ์ เป็นชนิดสองขั้นตอน (two - step) ในระบบเซ็ลฟ-เอชชิง ไพร์เมอร์ (self - etching primer bonding system) ระบบฮอล-อิน-วัน เป็นการรวมขั้นตอนเอชชิง ไพร์มิง และบอนด์ดิ้ง (etching, priming and bonding) เข้าไว้ในขั้นตอนเดียวของการยึดติดของเรซิน ส่วนทู-สเต็ป-เซ็ลฟ-เอชชิง-ไพร์เมอร์ เป็นการรวมขั้นตอนเอชชิงและไพร์เมอร์ไว้ด้วยกัน แล้วจึงทาสารยึดติดเนื้อฟันชนิดเรซินแยกเป็นอีกขั้นตอน ก่อนการบูรณฟันด้วยวัสดุเรซินคอมโพสิต

จากการวิจัย พบว่าเคลียร์ฟิลด์ เอสอีบอนด์เอ็กซ์ มีโซนไฮกว้างมากที่สุด เนื่องจากมีน้ำเป็นตัวทำละลายทำให้เกิดการแพร่กระจายได้สูงกว่า จึงทำให้เกิดโซนไฮกว้างมากที่สุด ในขณะที่เคลียร์ฟิลด์ ไตรเอสบอนด์มีส่วนประกอบของ ไฮโดรโฟบิก ไดเมตาอะคริเลต สามารถยึดติดกับบอนด์เรซินทำให้เกิดชั้นของไฮบริด (Hybrid layer) โดยมีตัวทำละลายเป็นเอทิลแอลกอฮอล์

และน้ำ โดยแอลกอฮอล์จะตรึงเซลล์ทำให้เซลล์ไม่เสียหาย ไม่เกิดการแพร่กระจายของสารหรือมีอัตราการแพร่กระจายต่ำกว่าน้ำ จึงทำให้เกิดโซนไฮแคบที่สุด ซึ่งจากการศึกษา Torabinejad และคณะ⁶ พบว่าความเป็นพิษของวัสดุขึ้นอยู่กับการแพร่กระจายของสารทดสอบผ่านอาหารฟัน การศึกษาวิจัยนี้ สารยึดติดเนื้อฟันทั้ง 3 ชนิด ให้ค่าดัชนีโซนไฮของวัสดุทดสอบแตกต่างกันคือมีอัตราการแพร่กระจายของสารผ่านอาหารฟันแตกต่างกันตามที่กล่าวมาแล้ว แต่ให้ค่าดัชนีการทำลายของเซลล์เหมือนกันคือ ดัชนี 1 โดยศึกษาจากรูปร่างและลักษณะของเซลล์ถูกทำลายภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ พบว่ามีเซลล์บางส่วนไม่ติดสี คือเป็นเซลล์ไม่มีชีวิตและมีลักษณะกลมภายใต้สภาพเพาะเลี้ยงและให้ค่าดัชนีการตอบสนองของเซลล์ในระดับเดียวกัน คือวัสดุยึดติดเนื้อฟัน ได้แก่ เคลียร์ฟิลด์ ไตรเอสบอนด์ และจีบอนด์ มีอัตราการแพร่กระจายของสารผ่านอาหารฟันในระดับปานกลาง แต่มีความเป็นพิษในระดับเล็กน้อย ส่วนเคลียร์ฟิลด์ เอสอีบอนด์เอ็กซ์มีอัตราการแพร่กระจายของสารผ่านอาหารฟันในระดับมาก แต่มีความเป็นพิษในระดับเล็กน้อย ตามเกณฑ์การแปลผลของไอเอสโอ แต่เกณฑ์การแปลผลนี้จะไม่สามารถบอกเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์เหลือมากนักน้อยแค่ไหน แต่บอกได้แค่ระดับของความเป็นพิษของสาร

อีกประการหนึ่งที่มีความสำคัญต่อผลการทดสอบการโอเวอร์เลย์ในห้องปฏิบัติการ คือ อาหารฟันที่ทำการทดลองควรอุ่นไว้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 45 องศาเซลเซียส อุณหภูมิไม่ควรสูงกว่านี้ หรือต่ำกว่านี้ เพราะจะมีผลต่อเซลล์เพาะเลี้ยง นั่นคืออุณหภูมิต่ำกว่า 45 องศาเซลเซียส จะทำให้อาหารฟันแข็งตัวเร็วเกินไป เมื่อเทใส่จานเพาะเลี้ยงเซลล์ หรือหากตั้งอุณหภูมิสูงกว่า 45 องศาเซลเซียส จะมีผลต่อเซลล์เพาะเลี้ยงทำให้เซลล์ถูกทำลายก่อนนำมาทดสอบตัวอย่าง ทำให้ผลการทดสอบผิดพลาดตั้งแต่เริ่มแรก ก่อนใส่สารทดสอบ การใช้อุปกรณ์ดูดปล่อยสารชนิดปริมาณน้อย เมื่อนำมาใช้ดูดสารตัวอย่างที่ต้องการใช้ปริมาณน้อย ๆ ซึ่งในการวิจัยนี้จะใช้สารตัวอย่างทดสอบจำนวน 2 ไมโครลิตร ดังนั้นจึงควรเลือกใช้ช่วงปริมาตรแคบ ๆ ตั้งแต่ 0.1-2 ไมโครลิตร จึงจะทำให้ได้ปริมาตรที่ค่อนข้างเที่ยงตรงมากกว่าใช้อุปกรณ์ดูดปล่อยสารที่มีช่วงปริมาตรกว้าง ๆ และในระหว่างการย้ายชิ้นวัสดุผ่านอาหารฟัน ควรเก็บใส่ภาชนะที่บดแสง เนื่องจากชิ้นวัสดุมีความไวต่อแสงสว่างทำให้เกิดบริเวณโซนไฮซึ่งมีผลจากแสงที่มากกระทบ มิใช่จากความเป็นพิษของสารทดสอบ การทดสอบสารไม่ควรนานเกินกว่า 30 นาที ภายหลังก่อสร้างเซลล์ด้วยชิ้นวัสดุ เพราะจะทำให้เซลล์ที่ย้อมสีจางลงกว่าปกติ ทำให้เกิดการแปลผลผิดพลาดได้เช่นกัน

ส่วนเซลล์ที่ใช้ทดสอบในการวิจัยครั้งนี้ใช้แอลก้าสองแก้ว ซึ่ง Kettering และ Torabinejad⁹ ได้ศึกษาเซลล์นี้ พบว่าเป็นเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่อเนื่องที่เพาะเลี้ยงง่าย และมีงานวิจัยที่สนับสนุนว่ามีความไวต่อการตอบรับในด้านการทดสอบความเป็นพิษ ไม่แตกต่างจากเซลล์ปฐมภูมิ (primary cell) สำหรับการเปรียบเทียบระดับความเป็นพิษของสารชนิดต่าง ๆ นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับไอเอสโอ 7405¹⁰ ที่แนะนำให้ใช้เซลล์เพาะเลี้ยงต่อเนื่องเพื่องานวิจัยในลักษณะสครีนนิ่งเทส ทั้งนี้เพราะเซลล์ปฐมภูมิจะมีความแตกต่างในแต่ละบุคคล ถ้านำผลการทดสอบพิษในระหว่างห้องปฏิบัติการหลาย ๆ แห่งมาเปรียบเทียบกัน การใช้เซลล์มาตรฐานเดียวกันน่าจะให้คำตอบที่น่าเชื่อถือและมีเหตุผลที่ดีกว่า

อนึ่ง เนื่องจากวิธีการไอเวอร์เลย์นี้ เป็นวิธีประเมินสมบัติทางชีวภาพที่นำมาใช้ทดสอบสารตัวอย่างได้ทั้งที่เป็นของแข็ง ของเหลว โดยพิษของสารที่นำมาทดสอบต้องแพร่กระจายได้ และอีกประการหนึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย ค่าใช้จ่ายในการทำไม่แพงมาก จากผลการประเมินพิษของสารยึดติดเนื้อฟันทั้ง 3 ประเภท มีพิษระดับเล็กน้อย ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าไม่ได้ลอกเลียนแบบทางคลินิกเหมือนการทดสอบด้วยวิธีการทดสอบแบบจำลองเนื้อฟัน ซึ่งจะมีการจำลองการทดสอบให้เหมือนสภาพจริงทางคลินิก โดยใช้แบบจำลองเนื้อฟัน ให้สารทดสอบสัมผัสโดยตรงกับเนื้อฟัน อยู่ในแบบจำลองที่มีการตั้งอัตราการไหลของของเหลวในระดับ 2.0 มิลลิเมตรต่อชั่วโมง ซึ่งเหมือนกับอัตราการไหลของโลหิตในเนื้อเยื่อในได้เนื้อฟัน โดยสามารถประเมินความเป็นพิษของวัสดุทดสอบ โดยวิเคราะห์ร้อยละของจำนวนเซลล์ที่เหลือหลังมีการแพร่กระจายของสารพิษไปยังเซลล์ทดสอบ แต่เนื่องจากวิธีนี้มีขั้นตอนที่ยุ่งยาก ซับซ้อน ต้องอาศัยการฝึกฝนเทคนิค อีกทั้งมีงบประมาณค่าใช้จ่ายสูงมากและต้องมีอุปกรณ์ในระบบอย่างครบถ้วน ตลอดจนการเลี้ยงเซลล์ต้องเลี้ยงเป็นระบบเซลล์ 3 มิติ และใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 14 วัน ก่อนการทดสอบสารในสภาวะเพอร์ฟิวชัน (perfusion condition) แต่มีข้อดี คือสามารถลอกเลียนสภาวะของเนื้อฟันและเซลล์ของเนื้อเยื่อในได้เนื้อฟัน ตลอดจนการไหลของโลหิตในเนื้อเยื่อในได้ในระดับหนึ่ง นั่นคือ ประเมินพิษในเชิงปริมาณได้ นอกจากนี้การวิจัยในลักษณะสภาวะเพอร์ฟิวชันโดยให้มีของเหลวซึมผ่านแบบจำลองเพื่อให้เกิดการเจือจางพิษจากวัสดุทดสอบด้วย ซึ่งเป็นการลอกเลียนแบบการทำงานจริงทางคลินิกนั่นเอง

บทสรุป

การประเมินสมบัติทางชีวภาพของวัสดุยึดติดเนื้อฟันทั้ง 3 ประเภท โดยวิธีการไอเวอร์เลย์ เป็นการศึกษาค้นคว้าร่วมกันได้ของวัสดุกับเนื้อเยื่อ ผลการทดสอบพบว่า การแพร่กระจายของสารทดสอบไปสู่เซลล์ของเคลียร์ฟิลด์ ไตรเอสบอนด์และจีบอนด์อยู่ในระดับเดียวกัน ส่วนเคลียร์ฟิลด์ เอสอีบอนด์เอ็กซ์ มีการแพร่กระจายของสารมากกว่า 2 ชนิดแรก สำหรับการที่เซลล์ถูกทำลายด้วยสารยึดติดเนื้อฟันทั้ง 3 ชนิด ไม่แตกต่างกันในการศึกษาครั้งนี้ เป็นการประเมินพิษของสารยึดติดเนื้อฟันในเบื้องต้น ดังนั้น จึงต้องศึกษาในเชิงปริมาณในลักษณะสภาวะเพอร์ฟิวชันในโอกาสต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Kawahara H, Yamagami A, Nakamura M Jr. Biological testing of dental materials by means of tissue culture. *Int Dent J* 1968;18:443-67.
2. Schmalz G. A reproducibility study on the agar diffusion test. *J. dent Res* 1982;61:577-80.
3. Wennberg A, Hasselgren G, Tronstad L. A method for toxicity screening of biomaterials using cells cultured on millipore filters. *J Biomed Mater Res* 1979;13:109-20.
4. Schmalz G, Netuschil L. A modification of the cell culture agar diffusion test using fluoresceindiacetate staining. *J Biomed Mater Res* 1985;19:653-61.
5. International Organization for Standardization 7405. Evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry *ISO/FDIS*, 2008(E).
6. Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD. Cytotoxicity of four root end filling materials. *J Endod* 1995;21:489-92.
7. Vajrabhaya LO, Pasasuk A, Hamirattisai C. Cytotoxicity evaluation of single component dentine bonding agents. *Oper Dent* 2003;28:440-4.
8. Van Meerbeek B, De Munck J, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Vijay P, et al. Buonocore memorial lecture. Adhesive to enamel and dentine: Current status and future challenges. *Oper Dent* 2003;28:215-35.
9. Kettering JD, Torabinejad M. Cytotoxicity of root canal sealers: a study using Hela cells and fibroblasts. *Int Endod J* 1984;17:60-6.
10. International Organization for Standardization 7405. Evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry *ISO*, 1997.

Original Article

Cytotoxicity Evaluation of Dentine Bonding Agents: Agar Overlay Technique

Suwanna Korsuwanawong

Researcher
Research Service Center
Faculty of Dentistry, Mahidol University

Ratchaporn Srichan

Researcher Assistant
Research Service Center
Faculty of Dentistry, Mahidol University

La-onghong Vajrabhaya

Professor
Department of Operative Dentistry
Faculty of Dentistry, Mahidol University

Correspondence to:

Suwanna Korsuwanawong
Research Service Center
Faculty of Dentistry, Mahidol University
Yothi Street, Rachatavee, Bangkok 10400
Tel: 02-660-7755 ext. 7756-7757
Fax: 02-3548510
E-mail: dtsat@mahidol.ac.th

Abstract

The purpose of this study was to compare the cytotoxicity of three dentine bonding agents, one-step (G-Bond™ and Clearfil™ S³ Bond) and two-step (Clearfil™ SE Bond X), by agar overlay test. The number of 3×10^5 cells/ml of L929 in 10%D-MEM was seeded in 90 mm petri dish and incubated in 37 °C 5% CO₂. After 24 hours, the monolayer cells reached confluency. Then, 3% of nutrient agar was poured on the monolayer cells in the petri dish and stained with 0.01% neutral red dye. Two microliter of each test material was dropped on the cellulose nitrate filter diameter 5 mm. and placed on the nutrient agar. For each test group, three samples along with one sample of the control group were tested. The same procedure was repeated 4 times. The cytotoxicity was graded according to the criteria of ISO 7405 after 24 hours of incubation period. It showed that the diffusions of Clearfil™ S³ Bond and G-Bond™ were in the same rate but Clearfil™ SE Bond X had a higher diffusion rate than the former two dentine bonding agents. Furthermore, there was no difference among three materials on the cellular lysis ($p > .05$). In conclusion, there is no difference among three bonding agents based on the cytotoxicity. However this technique is the primary screening for toxicity of biomaterials. Further cytotoxic investigation of material that contacts dentine in clinical practice by using Dentine Barrier Test is recommended.

Key words: agar overlay; cytotoxicity; dentine bonding agents