การศึกษาเปรียบเทียบผลของเรซินคอมโพสิตชนิดไหลแผ่และวัสดุเอ็มทีเอต่อเซลล์เพาะเลี้ยงจากเอ็นยึดปริทันต์ของมนุษย์

นางสาว วรพรรณ ตรัยไชยาพร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาเอ็นโดดอนต์ ภาควิชาทันตกรรมหัตถการ
คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

THE EFFECT OF FLOWABLE RESIN COMPOSITES ON CULTURED HUMAN PERIODONTAL LIGAMENT CELLS COMPARED WITH MTA

Miss Vorapun Trichaiyapon

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Endodontology
Department of Operative Dentistry
Faculty of Dentistry
Chulalongkorn University
Academic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

49220๔

Thesis Title	THE EFFECT OF FLOWABLE RESIN COMPOSITES ON CULTURED HUMAN PERIODONTAL LIGAMENT CELLS COMPARED WITH MTA
By	Miss Vorapun Trichaiyapon
Field of study	Endodontology
Thesis Advisor	Associate Professor Piyanee Panitvisai
Thesis Co-advisor	Assistant Professor Kitti Torrungruang, Ph.D

Accepted by the Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

.....Dean of the Faculty of Dentistry

(Assistant Professor Thitima Pusiri)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman

(Associate Professor Kwanta Jaru-ampornpan)

.....Thesis Advisor

(Associate Professor Piyanee Panitvisai)

.....Thesis Co-advisor

(Assistant Professor Kitti Torrungruang, Ph.D)

.....Member

(Associate Professor Chaiwat Maneenut, Ph.D)

.....Member

(Chootima Ratisoontorn, Ph.D)

วรพรรณ ตรัยไชยาพร : การศึกษาเปรียบเทียบผลของเรซินคอมโพสิตชนิดไหลแผ่และวัสดุเอ็มทีเอต่อเซลล์เพาะเลี้ยงจากเอ็นยึดปริทันต์ของมนุษย์ (THE EFFECT OF FLOWABLE RESIN COMPOSITES ON CULTURED HUMAN PERIODONTAL LIGAMENT CELLS COMPARED WITH MTA) อ. ที่ปรึกษา : รศ. ปิยาณี พาณิชย์วิสัย, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ. ดร.กิตติ ต.รุ่งเรือง, 83 หน้า.

ในการศึกษานี้ได้ทำการเปรียบเทียบความเป็นพิษของเรซินคอมโพสิตชนิดไหลแผ่สามผลิตภัณฑ์ (Tetric® Flow, Filtek™ Flow และ Aeliteflo™) กับวัสดุเอ็มทีเอต่อเซลล์เพาะเลี้ยงจากเอ็นยึดปริทันต์ของมนุษย์ในห้องปฏิบัติการ โดยศึกษาความมีชีวิตของเซลล์จาก MTT assay เมื่อนำสารละลายสกัดของวัสดุมาทดสอบกับเซลล์ และเมื่อมีการสัมผัสโดยตรงระหว่างวัสดุกับเซลล์ ศึกษาลักษณะรูปร่างและการยึดเกาะของเซลล์บนผิววัสดุ ผลการศึกษาพบว่าเมื่อนำสารละลายสกัดของวัสดุทั้ง 4 ชนิดหลังวัสดุผ่านการแช่ในอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 1, 2, 3 และ 4วัน มาทดสอบกับเซลล์ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของความเป็นพิษต่อเซลล์ระหว่างวัสดุทั้ง 4 ชนิด แต่ Filtek™ Flow มีความเป็นพิษมากกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และเมื่อมีการสัมผัสกับวัสดุโดยตรง พบว่าวัสดุทั้งสี่ชนิดมีความเป็นพิษต่อเซลล์สูงภายหลังผสมเสร็จใหม่ๆ โดย Tetric® Flow มีความเป็นพิษต่ำกว่าวัสดุเอ็มทีเออย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) แต่เมื่อวัสดุผ่านการแช่ในอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 1 วัน ระดับความเป็นพิษของวัสดุมีการลดลง โดยวัสดุเอ็มทีเอมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไม่แตกต่างจาก Tetric® Flow และ Filtek™ Flow ส่วนวัสดุ Aeliteflo™ มีความเป็นพิษที่ลดลงน้อยกว่าวัสดุตัวอื่น โดย Aeliteflo™ ยังคงมีความเป็นพิษอยู่มากกว่าวัสดุอื่นอย่างมีนัยสำคัญที่เวลา 2 วันหลังการแช่วัสดุ ผลการศึกษาความเป็นพิษดังกล่าวสอดคล้องกับการสังเกตลักษณะรูปร่าง และการยึดเกาะของเซลล์บนผิววัสดุ โดยพบว่าวัสดุ Tetric® Flow และ วัสดุเอ็มทีเอ เซลล์มีการยึดเกาะและการแผ่ตัวที่ดีใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่วัสดุ Filtek™ Flow เซลล์มีการแผ่ตัว แต่ไม่ยึดเกาะแนบสนิทไปกับผิววัสดุ ส่วนวัสดุ Aeliteflo™ พบว่าเซลล์มีการยกตัวเป็นลักษณะกลม ไม่แผ่ตัวไปกับวัสดุ โดยสรุปพบว่าวัสดุเรซินคอมโพสิตและวัสดุเอ็มทีเอมีความเป็นพิษหลังผสมเสร็จ แต่เมื่อผ่านการแช่ในสารละลายสำหรับเลี้ยงเซลล์แล้วมีความเป็นพิษต่อเซลล์ของวัสดุลดลง โดยในที่สุดความเป็นพิษของเรซินคอมโพสิตชนิดไหลแผ่ทั้งสามผลิตภัณฑ์ ไม่แตกต่างจากวัสดุเอ็มทีเอ แต่ Tetric® Flow มีการลดลงของความเป็นพิษที่เร็วกว่าวัสดุเอ็มทีเอ และให้การยึดเกาะต่อเซลล์ที่ไม่แตกต่างจากวัสดุเอ็มทีเอ

ภาควิชาทันตกรรมหัตถการ
สาขาวิชาวิทยาเอ็นโดดอนต์
ปีการศึกษา 2549

ลายมือชื่อนิสิต.....วรพรรณ ตรัยไชยาพร
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....ปิยาณี พาณิชย์วิสัย
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....กิตติ ต.รุ่งเรือง

4876124632 : MAJOR ENDODONTOLOGY
KEY WORD: HUMAN PERIODONTAL LIGAMENT CELL, FLOWABLE RESIN COMPOSITES, MTA: MINERAL TRIOXIDE AGGREGATE

VORAPUN TRICHAIYAPON: THE EFFECT OF FLOWABLE RESIN COMPOSITES ON CULTURED HUMAN PERIODONTAL LIGAMENT CELLS COMPARED WITH MTA. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. PIYANEE PANITVISAI, THESIS CO-ADVISOR : ASST. PROF. KITTI TORRUNGRUANG, Ph.D., 83 pp.

The objective of this study was to investigate effect of flowable resin composites (Tetric® Flow, Filtek™ Flow และ Aeliteflo™) compared with MTA on cultured human periodontal ligament cells. The effect of the elution from materials to human periodontal ligament cells after 1, 2, 3 and 4 days immersion of material in cultured medium and also the direct contact on these material surfaces were observed in this study. The study also focused on the morphological appearances of cells in contact with material surfaces using scanning electron microscope (SEM). The result showed that elution from materials was not cytotoxic at all periods. But in the beginning, Filtek™ Flow presented more cytotoxicity compared to control. However, after cells were in direct contact to materials, freshly mixed of all material had high cytotoxicity to human periodontal ligament cells. MTA showed to be significantly more cytotoxic than Tetric® Flow at this period ($p<0.05$). But cytotoxicity level of MTA decreased rapidly after 1 day of immersion and became not different from Tetric® Flow and Filtek™ Flow. Aeliteflo™, on the other hand, revealed significantly more toxicity compared to others until 2 days after immersion. For morphological assay, Tetric® Flow and MTA demonstrated good spreading and adhesion of cultured HPDL cells. Filtek™ Flow revealed good spreading of cells but not well attach to material. Aeliteflo™ was the most toxic showing cell in discoid shape and not attached well on the material surface. It was concluded that eventhough freshly mixed materials were toxic, after materials were immersed HPDL cells could normally grow and attach on flowable resin composites and MTA. But Tetric® Flow, in particular, had more positive effects on HPDL cells than other materials.

Department Operative Dentistry
Field of study Endodontology
Academic year 2006

Student's signature Vorapun Trichaiyapon
Advisor's signature Piyanee Panitvisai
Co-advisor's signature Kitti Torrungruang

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere gratitude and appreciation to Associated Professor Piyanee Panitvisai, Department of Operative Dentistry, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, my advisor, for her guidance, encouragement, supervision, suggestion and kindness throughout the course of my Master degree program. I am extremely indebted to my co-advisor, Assistant Professor Doctor Kitti Torrungruang, Department of Microbiology, for his grateful guidance, supervision, valuable technical advice and correction of this thesis. I wish to thank my thesis committee members; Associated Professor Kwanta Jaru-ampornpan, Associated Professor Doctor Chaiwat Maneenut and Dr. Chootima Ratisoontorn for their suggestions and kindness in being committee members.

Sincere appreciation is expressed to Assistant Professor Doctor Rangsini Mahanonda for providing the laboratory facilities and the opportunity to work in her lab which made this research possible. I particularly thank Mr. Noppadol Sa-Ard-lam and Ms. Pimprapa Rerkyen for their assistance in setting the experiments and preparing this manuscript. I also would like to thank Mr. Chaiwat Jiraritthamrong for technical assistance.

I would like to acknowledge research grant from the Graduate School, Chulalongkorn University for the partial financial support for this study. My sincere appreciation is also extended to the staffs of the Department of Operative Dentistry, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University for supporting and encouraging. Without them this project would be impossible.

Finally, I would like express my most sincere thank to my father, my mother, my siblings and my friends for their love, caring, understanding and encouragement.

TABLE OF CONTENTS

Page

Abstract (Thai) iv

Abstract (English) v

Acknowledgements vi

Table of contents vii

List of tables ix

List of figures x

List of abbreviations xii

Chapter

I. Introduction 1

1.1 Background of the present study 1

1.2 Research questions 3

1.3 Research objectives 3

1.4 Hypothesis 4

1.5 Experimental Design 4

1.6 Keywords 5

1.7 Research design 5

1.8 Limitation of research 5

1.9 Benefits 5

1.10 Ethical consideration 6

II. Literature review 7

Introduction 7

MTA 8

Zinc oxide-eugenol cements 10

Resin composites 12

Cytotoxicity testing 14

Periradicular wound healing 16

Chapter Page

III. Materials and methods 18
3.1 Materials 18
3.2 Medium 19
3.3 Preparation for cell culture 20
3.4 Preparation of flowable resin composites and MTA 20
3.5 Colorimetic (MTT) assay for cytotoxicity of extracted medium from materials (Elution) 21
3.6 Colorimetic (MTT) assay for cytotoxicity of materials (Direct contact) 22
3.7 Cell morphology and attachment by scanning electron microscope 24
3.8 Statistic Analysis 25
IV. Results 26
4.1 Colorimetic (MTT) assay for cytotoxicity of extracted medium from materials (Elution) 26
4.2 Colorimetic (MTT) assay for cytotoxicity of materials (Direct contact) 28
4.3 Cell morphology and attachment by scanning electron microscope 30
V. Discussion and conclusion 37
References 43
Appendices 52
Biography 70

LIST OF TABLES

Table Page

1. Colorimetic (MTT) assay for cytotoxicity of extracted medium from materials (Elution) PDL 2 passage 6 53
2. Colorimetic (MTT) assay for cytotoxicity of extracted medium from materials (Elution) PDL 4 passage 3 54
3. Colorimetic (MTT) assay for cytotoxicity of extracted medium from materials (Elution) PDL 8 passage 3 55
4. Colorimetic (MTT) assay for cytotoxicity of extracted medium from materials (Elution) PDL 11 passage 3 56
5. Colorimetic (MTT) assay for cytotoxicity of materials (direct contact) PDL 2 passage 4 57
6. Colorimetic (MTT) assay for cytotoxicity of materials (direct contact) PDL 4 passage 3 58
7. Colorimetic (MTT) assay for cytotoxicity of materials (direct contact) PDL 7 passage 4 59
8. Colorimetic (MTT) assay for cytotoxicity of materials (direct contact) PDL 8 passage 3 60
9. Colorimetic (MTT) assay for cytotoxicity of materials (direct contact) PDL 11 passage 4 61
10. Statistical analysis using SPSS of colorimetric (MTT) assay for cytotoxicity of extracted medium from material (Elution) (ANOVA) 62
11. Statistical analysis using SPSS of colorimetric (MTT) assay for cytotoxicity of extracted medium from material (Elution) (T-test) 65
12. Statistical analysis using SPSS of colorimetric (MTT) assay for cytotoxicity of extracted medium from material (Direct contact) (ANOVA) 66
13. Statistical analysis using SPSS of colorimetric (MTT) assay for cytotoxicity of extracted medium from material (direct contact) (T-test) 69

LIST OF FIGURES

Figure Page

1. Diagram illustrated cultured well plate with material (for direct contact test) and extracted medium (for elution test) 23
2. Diagram illustrated extracted medium and material from cultured well used for cytotoxicity testing 24
3. Cytotoxicity of extracted medium from materials (Elution)..... 27
4. Cytotoxicity of materials (Direct contact)..... 29
5. SEM of HPDLs attached to cultured plate at 24-hour incubation. (original magnification x15)..... 32
6. SEM of HPDLs attached to cultured plate at 24-hour incubation. (original magnification x200)..... 32
7. SEM of HPDLs attached to cultured plate at 24-hour incubation. (original magnification x1000)..... 32
8. SEM of HPDLs attached to Tetric flow at 24-hour incubation. (original magnification x15) 33
9. SEM of HPDLs attached to Tetric flow at 24-hour incubation. (original magnification x200) 33
10. SEM of HPDLs attached to Tetric flow at 24-hour incubation. (original magnification x1000) 33
11. SEM of HPDLs attached to Filtek flow at 24-hour incubation. (original magnification x15) 34
12. SEM of HPDLs attached to Filtek flow at 24-hour incubation. (original magnification x200) 34
13. SEM of HPDLs attached to Filtek flow at 24-hour incubation. (original magnification x1000) 34
14. SEM of HPDLs attached to Aelite flo at 24-hour incubation. (original magnification x15) 35
15. SEM of HPDLs attached to Aelite flo at 24-hour incubation. (original magnification x200) 35

Figure Page

16. SEM of HPDLs attached to Aelite flo at 24-hour incubation. (original magnification x1000) 35
17. SEM of HPDLs attached to MTA at 24-hour incubation. (original magnification x15) 36
18. SEM of HPDLs attached to MTA at 24-hour incubation. (original magnification x200) 36
19. SEM of HPDLs attached to MTA at 24-hour incubation. (original magnification x1000) 36

LIST OF ABBREVIATIONS

AF	Aeliteflo™
Bis-GMA	Bisphenol glycidyl methacrylate
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
EBA	ethoxy benzoic acid
FCS	fetal calf serum
FF	Filtek™ Flow
HPDLs	human periodontal ligament cells
ISO	International Standard Organization
MTA	Mineral Trioxide Aggregate
MTT	(3-(4, 5,dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
PBS	phosphate buffer solution
PDL	periodontal ligament
SEM	scanning electron microscope
TEGDMA	triethylglycol dimethacrylate
TF	Tetric® Flow
UDMA	urethane dimethacrylate
ZOE	zinc oxide eugenol