

ASSESSMENT OF NATURAL PRODUCTS ON FIBROBLAST CELL VIABILITY

Suchanart YUTHAVONG¹, Kewalin THAMMASITBOON¹, Rawee TEANPAISAN² and Nuntiya PAHUMUNTO³

1 Department of Conservative Dentistry, Faculty of Dentistry, Prince of Songkla University, Thailand

2 Medical Science Research and Innovation Institute, Prince of Songkla University, Thailand

3 Department of Oral Diagnostic Sciences, Faculty of Dentistry, Prince of Songkla University, Thailand

ARTICLE HISTORY

Received: 16 August 2024

Revised: 30 August 2024

Published: 13 September 2024

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the effects of various natural extracts including *Cissus quadrangularis* Linn., *Artocarpus lakoocha* Roxb., *Curcuma aeruginosa* Roxb., and *Cannabis sativa* L. on fibroblasts cells viability. The MTT assay was used to assess the vitality of mouse fibroblast cells after being tested with natural extract for 24 h at various concentrations. Results showed that the extracts from *Cissus quadrangularis* Linn., *Artocarpus lakoocha* Roxb., *Curcuma aeruginosa* Roxb., and *Cannabis sativa* L. revealed different effects on the viability of fibroblast cells at varying concentrations. However, the trend of fibroblast cell viability relative to the concentration levels of each extract showed a similar pattern. Higher concentrations of the extracts tended to be toxic to the fibroblast cells, while lower concentrations of the extracts promoted the growth of fibroblast cells.

Keywords: *Cissus quadrangularis* Linn., *Artocarpus lakoocha* Roxb., *Curcuma aeruginosa* Roxb., *Cannabis sativa* L., cell viability

CITATION INFORMATION: Yuthavong, S., Thammasitboon, K., Teanpaisan, R., & Pahumunto, N. (2024). Assessment of Natural Products on Fibroblast Cell Viability. *Procedia of Multidisciplinary Research*, 2(9), 9

การคัดกรองสารสกัดจากธรรมชาติ ต่อความสามารถในการมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์

สุชานาถ ยุทธวงศ์¹, เกวลิน ธรรมสิทธิบุรณ์¹, รวี เกียรติไพศาล² และ นันทิยา พาหุมนโต³

1 สาขาวิชาทันตกรรมอนุรักษ์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2 สถาบันวิจัยและนวัตกรรมทางการแพทย์ สำนักวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

3 สาขาวิชาวินิจฉัยโรคช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากธรรมชาติแต่ละชนิด ได้แก่ เพชรสังฆาต แก่นไม้มะหาด ว่านมหาเมฆ และกัญชา ต่อความสามารถในการมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนู โดยใช้วิธีเอ็มทีทีในการประเมินความมีชีวิตของเซลล์ ภายหลังจากที่ทำการใส่สารสกัดธรรมชาติแต่ละชนิด ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดจากเพชรสังฆาต มะหาด ว่านมหาเมฆและกัญชา ส่งผลต่อความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์แตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน อย่างไรก็ตามแนวโน้มของการมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์มีทิศทางไปในทางเดียวกัน คือที่ระดับความเข้มข้นสูงจะมีความเป็นพิษต่อเซลล์ ในขณะที่สารสกัดความเข้มข้นต่ำจะส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์

คำสำคัญ: เพชรสังฆาต, แก่นไม้มะหาด, ว่านมหาเมฆ, กัญชา, การมีชีวิตของเซลล์

ข้อมูลการอ้างอิง: สุชานาถ ยุทธวงศ์, เกวลิน ธรรมสิทธิบุรณ์, รวี เกียรติไพศาล และ นันทิยา พาหุมนโต. (2567). การคัดกรองสารสกัดจากธรรมชาติ ต่อความสามารถในการมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์. *Procedia of Multidisciplinary Research*, 2(9), 9

บทนำ

การรักษาคลองรากฟันแท้ที่ยังมีการสร้างรากฟันไม่สมบูรณ์ (immature permanent teeth) มีความซับซ้อนในการรักษาเนื่องจากปลายรากฟันเปิดกว้าง รากฟันสั้น รวมถึงผนังรากฟันบางเนื่องจากยังไม่มี การสะสมของเนื้อฟันมากเพียงพอ ส่งผลให้เสี่ยงต่อการแตกหักของรากฟันเมื่อได้รับแรงบดเคี้ยว ดังนั้นเพื่อให้กระบวนการสร้างรากฟันสามารถดำเนินต่อไปได้ จึงมีความจำเป็นที่จะต้องคงสภาพการมีชีวิตของเนื้อเยื่อใน ซึ่งสามารถทำได้โดยการรักษาเนื้อเยื่อในแบบคงความมีชีวิต (Vital pulp therapy) อย่างไรก็ตามในฟันที่เนื้อเยื่อในได้รับความเสียหายจนเลือดไม่สามารถไหลเวียนเข้าไปหล่อเลี้ยงในเนื้อเยื่อในฟัน จนเกิดเป็นภาวะฟันตาย การรักษาจะแตกต่างออกไป โดยใช้วิธีการรักษาด้วยวิธีการเอเพคซิฟิเคชัน (Apexification) โดยการใส่แคลเซียมไฮดรอกไซด์ (Calcium hydroxide) หรือมินเนอรัลไตรออกไซด์แอกกริเกต (Mineral trioxide aggregate: MTA) เพื่อสร้างแนวกันปลายรากก่อนการอุดคลองรากฟัน ซึ่งการรักษาด้วยวิธีเอเพคซิฟิเคชัน ไม่ได้ก่อให้เกิดการหนาตัวของผนังคลองรากฟันเพิ่มขึ้น ทำให้รากฟันมีโอกาสแตกหักในระหว่างการรักษาหรือในอนาคต และไม่ได้ทำให้เกิดการพัฒนาของรากฟันให้ยาวขึ้น (Bose, 2009)

ในภายหลังได้มีการนำเสนอแนวทางใหม่ในการรักษาคลองรากฟันแท้ที่ยังมีการสร้างรากไม่สมบูรณ์ขึ้น คือ วิธีรีเจนเนอเรทีฟ เอ็นโดดอนติกส์ (Regenerative endodontics) ซึ่งเป็นการรักษาที่อาศัยการประยุกต์ใช้หลักการทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (tissue engineering) โดยมีการศึกษาอย่างยาวนานเพื่อให้ได้แนวทางการรักษาที่ดี ซึ่งประกอบไปด้วยการศึกษาเพื่อหาชนิดของน้ำยาล้างคลองรากฟัน (irrigation solutions) หรือชนิดของยาที่ใส่ในคลองรากฟัน (intracanal medications) ที่เหมาะสม เพื่อส่งเสริมให้มีการซ่อมแซมเนื้อเยื่อในด้วยกลไกตามธรรมชาติ (pulp tissue regeneration) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้มีอัตราความสำเร็จของการรักษามากยิ่งขึ้น

ในปัจจุบันทางด้านการแพทย์ และสาธารณสุขของไทย มีการใช้และพัฒนาสารสกัดจากสมุนไพรกันอย่างแพร่หลาย แต่ในทางทันตกรรมโดยเฉพาะสาขาวิทยาเอ็นโดดอนติกส์ ยังมีการนำสารสกัดจากสมุนไพรมาใช้จริงในทางคลินิกน้อยมาก ซึ่งได้มีการรายงานถึงประสิทธิภาพในการใช้สารสกัดจากสมุนไพรเหล่านี้ในการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อโรคในช่องปาก การสังเคราะห์คอลลาเจน การส่งเสริมการสร้างของกระดูก การหายของกระดูก รวมถึงประสิทธิภาพในการกระตุ้นการสร้างเนื้อฟัน เป็นต้น

ดังนั้นจึงอาจมีความเป็นไปได้ที่จะนำสารสกัดจากสมุนไพรเหล่านี้มาพัฒนาประยุกต์วัสดุทางทันตกรรมเพื่อใช้ในการรักษาโดยวิธีการสร้างเนื้อเยื่อที่มีลักษณะโครงสร้างเหมือนเดิมทดแทนเนื้อเยื่อที่ได้รับบาดเจ็บหรือสูญเสียไป (Tissue regeneration therapy) ไม่ว่าจะเป็นการรักษาเนื้อเยื่อในแบบคงความมีชีวิต (vital pulp therapy) การปิดปลายคลองรากฟัน (apexification) และรีเจนเนอเรทีฟ เอ็นโดดอนติกส์ (regenerative endodontics) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ด้วยเหตุนี้ ทางผู้วิจัยจึงต้องการที่จะศึกษาผลของสารสกัดจากสมุนไพรเหล่านี้ ต่อการกระตุ้นการเจริญเติบโต (cell proliferation) ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ซึ่งเป็นเซลล์ที่เป็นองค์ประกอบหลักของเนื้อเยื่อใน

การทบทวนวรรณกรรม

การรักษาเนื้อเยื่อในแบบคงความมีชีวิต (Vital pulp therapy: VPT)

การรักษาเนื้อเยื่อในแบบคงความมีชีวิต คือ การรักษาความมีชีวิตและการทำงานของเนื้อเยื่อใน ภายหลังได้รับภัยอันตรายจากการบาดเจ็บ ฟันผุ หรือการบูรณะ โดยการรักษาความมีชีวิตของฟัน ได้แก่ การปิดแผลเนื้อเยื่อในทางตรง (direct pulp capping) การปิดแผลเนื้อเยื่อในทางอ้อม (indirect pulp capping) การตัดเนื้อเยื่อในส่วนตัวฟันออกบางส่วน (partial pulpotomy) และการตัดเนื้อเยื่อในส่วนตัวฟันออกหมด (complete pulpotomy)

ในอดีตได้แนะนำให้รักษาเนื้อเยื่อในแบบคงความมีชีวิตในฟันแท้ที่ยังมีการสร้างรากฟันไม่สมบูรณ์ (immature permanent teeth) โดยมีจุดประสงค์เพื่อให้เกิดการสร้างรากฟันที่สมบูรณ์ แต่ในปัจจุบัน การรักษาเนื้อเยื่อในแบบคงความมีชีวิต ได้ถูกนำมาปรับใช้เป็นทางเลือกในการรักษาอื่นๆ มากขึ้น เช่น ใช้ในการรักษาฟันแท้ปลายรากปิดที่ได้รับ

การวินิจฉัยว่ามีอาการอักเสบของเนื้อเยื่อใน แทนการรักษาโดยการเอาเนื้อเยื่อในทั้งส่วนตัวฟันและส่วนรากฟันออกทั้งหมด (pulpectomy) หรือการรักษาคลองรากฟัน (root canal treatment) (AAE, 2020)

เดิมวัสดุที่ใช้ในการรักษาเนื้อเยื่อในแบบคงความมีชีวิต ได้แก่ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ (glass-ionomer cement) และวัสดุจำพวกเรซิน (resin-based materials) ซึ่งมีอัตราการประสบความสำเร็จระหว่างร้อยละ 43-92

ภายหลังได้มีการพัฒนาประสิทธิภาพของวัสดุทางทันตกรรมมากขึ้น จึงได้มีการนำเสนอให้ใช้แคลเซียมซิลิเกตซีเมนต์ (calcium silicate cements: CSC) ในการรักษาเนื้อเยื่อในแบบคงความมีชีวิต ทำให้อัตราการประสบความสำเร็จในการรักษาเพิ่มสูงขึ้นเป็นร้อยละ 85-100 ที่ระยะเวลา 1-2 ปี (AAE, 2021)

เอเพ็กซ์ซิเคชัน (Apexification)

เอเพ็กซ์ซิเคชัน เป็นกระบวนการเพื่อส่งเสริมการสร้างสิ่งกีดขวางบริเวณปลายรากฟันในฟันที่ไม่มีชีวิตและยังมีการสร้างรากฟันไม่สมบูรณ์ โดยการใช้วัสดุใส่เข้าไปในคลองรากฟัน เพื่อกระตุ้นปลายรากฟันให้ปิด (Rafter, 2005) มีวัตถุประสงค์เพื่อให้เกิดแนวกันปลายรากฟันในฟันที่ยังมีการสร้างรากฟันไม่สมบูรณ์ อย่างไรก็ตาม ได้มีการรายงานทางคลินิกที่พบว่าการทำเอเพ็กซ์ซิเคชันในฟันที่ไม่มีชีวิต ก่อให้เกิดการพัฒนาของปลายรากฟันเพิ่มขึ้นได้ (Iwaya, 2001; Banchs, 2004; Chueh, 2006)

ในอดีตนิยมใส่แคลเซียมไฮดรอกไซด์ในคลองรากฟัน และมักทำการเปลี่ยนแคลเซียมไฮดรอกไซด์ในคลองรากฟันทุกๆ 3 เดือน เนื่องจากมีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อโรค (disinfection) ในคลองรากฟัน มีการรายงานถึงคุณสมบัติของแคลเซียมไฮดรอกไซด์ในการเหนี่ยวนำการสร้างกระดูก (osteo-inductive properties) (Mitchell, 1958) ซึ่งอาจเป็นผลจากการมีความเป็นด่างสูง (high pH) จึงเอื้อให้เหนี่ยวนำการสร้างเนื้อเยื่อแข็ง (Javelet, 1985) โดยอาจใช้ระยะเวลาจนถึง 20 เดือน ในการสร้างแนวกันปลายรากฟัน นอกจากนี้ ปัจจัยเรื่องอายุ การมีอาการแสดงของคนไข้ (presence of symptoms) รวมถึงการมีเงาตำรอบปลายรากฟัน (presence of periradicular radiolucencies) ก็เป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อระยะเวลาที่ใช้ในการสร้างแนวกันปลายรากฟัน (Rafter, 2005)

ข้อจำกัดของการใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์ ได้แก่ ใช้ระยะเวลานานในการรักษา ต้องทำการรักษาหลายครั้ง รวมถึงเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดการแตกหักของตัวฟันจากการใช้เป็นระยะเวลานาน (Cvek, 1992; Andreasen, 2002) ด้วยข้อจำกัดที่กล่าวมานี้ จึงมีการนำเสนอให้ใช้เอ็มทีเอในการอุดปลายรากฟันโดยไม่จำเป็นต้องรอให้เกิดการสร้างแนวกันปลายรากฟัน ซึ่งการพยากรณ์ผลการรักษาดีกว่า และมีความต่อเนื่องของการสร้างเนื้อเยื่อแข็ง (consistent hard-tissue formation) ที่มากกว่าแคลเซียมไฮดรอกไซด์ (Shabahang, 1999) นอกจากนี้ หลังจากอุดปลายรากฟันด้วยเอ็มทีเอ จะสามารถที่จะบูรณะภายในคลองรากฟันด้วยวัสดุบูรณะแบบยึดติด (bonded restoration) ได้ทันที ซึ่งจะช่วยป้องกันการแตกหักของฟันที่ยังมีการสร้างรากฟันไม่สมบูรณ์ (Huang, 2009)

รีเจนเนอเรทีฟ เอ็นโดดอนติกส์ (Regenerative endodontics)

การรักษาวิธีรีเจนเนอเรทีฟ เอ็นโดดอนติกส์ เป็นกระบวนการทางชีวภาพที่มีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างส่วนของเนื้อฟัน รากฟัน และเซลล์ในพัลพ์เดนตินคอมเพล็กซ์ (pulp-dentin complex) เพื่อให้เกิดการซ่อมแซมทางชีวภาพ ทดแทนโครงสร้างของฟันที่ถูกทำลายไป มีวัตถุประสงค์เพื่อให้เกิดการคงหน้าที่ที่ปกติทางสรีรวิทยาของเนื้อเยื่อใน ทั้งการเจริญของรากฟัน การตอบสนองต่อการรับรู้ความรู้สึก และระบบภูมิคุ้มกันของเนื้อเยื่อใน (Austah, 2018) โดยอาศัยหลักการทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue engineering) เพื่อใช้ในการสร้างทดแทนอวัยวะและเนื้อเยื่อที่เป็นโรค (Hargreaves, 2008) ขั้นตอนในการรักษาประกอบไปด้วยการทำความสะอาดคลองรากฟันด้วยน้ำยาล้างคลองรากฟันร่วมกับการใช้เครื่องมือให้น้อยที่สุด จากนั้นจึงใส่ยาในคลองรากฟัน โดยยาที่นิยมใช้ประกอบไปด้วยยาปฏิชีวนะผสมกันสามชนิดคือเมโทนิดาโซล (metronidazole) ซิโพลฟลอกซาซิน (ciprofloxacin) และมิโนไซคลิน (minocycline) แต่เนื่องจากปัญหาเรื่องการแพ้ยาปฏิชีวนะและปัญหาการเปลี่ยนสีของตัวฟัน จึงมีบางการศึกษาแนะนำให้ใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์ หรือยาปฏิชีวนะชนิดที่ไม่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนสีของตัวฟันแทน

ภายหลังจากการใส่ยาในคลองรากฟันจนครบระยะเวลา 1-4 สัปดาห์ จะมีการใช้เครื่องมือ เช่น เคไฟล์ ใส่เลยออกนอกบริเวณปลายรากฟัน เพื่อให้มีเลือดเข้ามาในคลองรากฟัน เมื่อเลือดเริ่มแข็งตัวเป็นลิ่มเลือด จึงนำเอมที่เอหรือวัสดุในกลุ่มไบโอเซรามิกมาเป็นวัสดุปิดทับบนลิ่มเลือดและบูรณะบริเวณทางเข้าสู่โพรงประสาทฟัน ในบางกรณีที่ไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดลิ่มเลือดขึ้นมาได้ อาจพิจารณาใช้เพลทเลทริกพลาสมา (platelet-rich plasma: PRP) เพลทเลทริกไฟบริน (platelet-rich fibrin: PRF) หรือออโตโลจัสไฟบรินเมทริกซ์ (Autologous fibrin matrix: AFM) ทดแทน (Paryani, 2013)

วัสดุที่สมาคมเอ็นโดดอนทิสต์แห่งประเทศไทย (American Association of Endodontists: AAE) แนะนำให้ใช้เอมที่เอสีขาวเป็นวัสดุปิดทับบนลิ่มเลือด แต่อย่างไรก็ตามวัสดุจำพวกเอมที่เอ มีความเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนสีของตัวฟัน ดังนั้นในบริเวณที่ต้องการความสวยงาม จึงอาจพิจารณาเปลี่ยนไปใช้วัสดุในกลุ่มไบโอเซรามิก หรือวัสดุจำพวกไตรแคลเซียมซิลิเกตซีเมนต์ (tricalcium silicate cements) (Fagogeni, 2019)

สารสกัดจากต้นเพชรสังฆาต (*Cissus quadrangularis* Linn. Extract)

เพชรสังฆาตเป็นพืชที่เต็มไปด้วยสารจำพวกไฟโตสเตอรอล (phytosterol) สารประกอบอนาบอลิกสเตียรอยด์ (anabolic steroidal substances) กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) ไตรเทอร์พีนอยด์ (triterpenoids) วิตามินอี (vitamin-E) เบต้าแคโรทีน (β -carotene) และแคลเซียม (calcium)

จากการศึกษาของ Tasadduq et al. (2016) พบว่า สารสกัดจากเพชรสังฆาตที่สกัดในเอทานอล มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการสร้างของกระดูก การหายของกระดูก รวมถึงมีประสิทธิภาพในการป้องกันและรักษาโรคกระดูกพรุนได้ โดยหากให้สารสกัดเพชรสังฆาตในความเข้มข้นที่สูง (0.1 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์ MC3T3-E1 ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Potu et al. (2009) ที่พบว่า สารสกัดจากเพชรสังฆาตที่สกัดในปิโตรเลียมอีเธอร์สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดของระบบเลือด (mesenchymal stem cells) ในหนูทดลองได้

นอกเหนือจากคุณสมบัติข้างต้น สารสกัดจากเพชรสังฆาตที่สกัดโดยเอทิลอะซิเตต (ethyl acetate) ยังมีคุณสมบัติในการต้านการอักเสบ โดยการศึกษาของ Srisook et al. (2011) พบว่า สารสกัดจากลำต้นของเพชรสังฆาตที่สกัดโดยเอทิล อะซิเตต มีคุณสมบัติต้านการอักเสบในแมคโครฟาจ (macrophages) ผ่านการกระตุ้นการแสดงออกของเอนไซม์ฮีโมออกซิจีเนสวัน (heme oxygenase-1: HO-1)

สารสกัดจากแก่นไม้มะหาด (*Artocarpus lakoocha* Roxb. Extract)

แก่นไม้มะหาด มีสารออกฤทธิ์ที่สำคัญ 2 ชนิด คือ เรสเวราทรอล (resveratrol) ซึ่งมีคุณสมบัติต้านแบคทีเรียและเชื้อรา (Parkpoom, 2012) และออกซีเรสเวราทรอล (oxyresveratrol) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) (Laovachirasuwan, 2015)

จากการศึกษาของ Teanpaisan et al. (2014) พบว่า สารสกัดจากแก่นไม้มะหาดสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อโรคในช่องปาก คือ *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* และ *Tannerella forsythia* ได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Pandey et al. (2009) ที่พบฤทธิ์ของสารสกัดจากแก่นไม้มะหาด ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *S. Soneii*, *B. Subtelis*, *B. Pumellus* และ *E.coli* เป็นต้น

จากการศึกษาของ Gaglio et al. (2021) พบว่า หากใส่สารออกซีเรสเวราทรอล ลงในโพลีแลคติกโคไกลโคลิคแอซิดนาโนพาร์ติเคิล (poly lactic-co-glycolic acid: PLGA nanoparticles) จะมีฤทธิ์ในการต่อต้านการอักเสบและลดการตอบสนองของภูมิคุ้มกันใน dendritic cells ซึ่งอาจนำมาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ได้

สารสกัดจากว่านมหาเมฆ (*Curcuma aeruginosa* Roxb. Extract)

ว่านมหาเมฆ มีชื่อเรียกอื่นว่า ขมิ้นดำ ว่านขมิ้นดำ กระเจียวแดง มหาเมฆ อวแดง ขิงเนื้อดำ ขิงดำ ขิงสีน้ำเงิน เหวินจู้ เอ้อจู้ เป็นต้น

สารออกฤทธิ์ที่สำคัญที่เจอในเหง้าของว่านมหาเมฆ ได้แก่ โมโนเทอร์ปีน (monoterpenes) และเซสควิเทอร์พีนส์ (Sesquiterpenes) ซึ่งเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้ว่านมหาเมฆมีคุณสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรียทั้งชนิดแกรมบวก (gram-positive bacteria) และแกรมลบ (gram-negative bacteria) (Akarchariya, 2017)

จากการศึกษาของ Dewi et al. (2024) โดยทำการสกัดว่านมหาเมฆในตัวทำละลายเอทานอล พบว่า ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 50 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร สามารถกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มจำนวนของเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจสายพันธุ์ raw 264.7 ได้ รวมถึงมีคุณสมบัติในการต้านการอักเสบผ่านกระบวนการยับยั้งการสร้างไซโตไคน์อินเตอร์ลิวคิน-1 (IL-1) และทูเมอร์เนโครติคแฟกเตอร์แอลฟา (tumor necrotic factor- α : TNF- α)

จากการศึกษาของ Akarchariya et al. (2017) พบว่า น้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากเหง้าของว่านมหาเมฆ ประกอบไปด้วย สารออกฤทธิ์ที่สำคัญ ได้แก่ แคมเฟอร์ (camphor) และ เจอร์มาโครน (germacrone) ทำให้มีฤทธิ์ต่อต้านแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* รวมถึงฤทธิ์ต่อต้านเชื้อรา *Candida albicans* นอกจากนี้ การศึกษาของ Reanmongkol et al. (2006) พบว่า สารสกัดด้วยคลอโรฟอร์มจากเหง้าของว่านมหาเมฆ ที่ความเข้มข้น 100-400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีคุณสมบัติในการต้านการอักเสบ และระงับปวดในหนูทดลอง โดยมีกลไกการออกฤทธิ์ที่ต่างจากแอสไพริน

สารสกัดจากกัญชา (*Cannabis sativa* L. Extract)

กัญชา เป็นพืชล้มลุกชนิดหนึ่งในวงศ์ *Cannabidaceae* ใบมีลักษณะมนแฉกเล็กเข้าไปทางก้านหลายแฉก ดอกสีเขียว ช่อดอกเพศผู้และช่อดอกเพศเมียอยู่ต่างต้นกัน

มีการนำกัญชามาใช้ในทางการแพทย์เป็นระยะเวลานาน เนื่องจากมีความสามารถในการออกฤทธิ์ต่อจิตประสาท (psychoactive) ลดปวด (analgesic) กันชัก (anti-seizure) และต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) โดยสารส่วนใหญ่ที่พบในกัญชาคือกลุ่มสารแคนนาบินอยด์ (cannabinoids) โดยสารชนิดที่มีข้อมูลใช้ในทางการแพทย์มาก คือ เตตราไฮโดรแคนนาบินอล (tetrahydrocannabinol: THC) และแคนนาบิไดออล (cannabidiol: CBD) ซึ่งเป็นสารที่ละลายในไขมัน

การศึกษาของ Liu et al. (2023) ได้มีการนำเซลล์ต้นกำเนิดเนื้อเยื่อในมาเพาะเลี้ยงในแคนนาบิไดออล พบว่า เซลล์ที่เพาะเลี้ยงในแคนนาบิไดออล มีความสามารถในการซ่อมสร้างกระดูกมาทดแทน (bone-regenerative capacity) ที่สูงกว่า มีความสมบูรณ์ของกระดูกมากกว่า และมีการแสดงออกของเอนไซม์ที่เป็นตัวบ่งชี้การเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก (osteogenic markers) ได้มากกว่ากลุ่มควบคุม

นอกจากนี้ การศึกษาของ Qia et al. (2021) ที่ดูความสามารถในการสร้างกระดูกและฟันของเซลล์ต้นกำเนิดเนื้อเยื่อใน พบว่า เมื่อเติมสารแคนนาบิไดออลหนา 1 ไมโครเมตร ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ (differentiation media) พบว่า แคนนาบิไดออล สามารถส่งเสริมการแพร่กระจายของเซลล์ (cell migration) เพิ่มการสังเคราะห์คอลลาเจน (collagen synthesis) ส่งเสริมการสะสมของแร่ธาตุ (mineralized deposits) และเพิ่มการแสดงออกของยีนสร้างหลอดเลือด (angiogenic genes) รวมถึงยีนสร้างเนื้อเยื่อฟัน (odontogenic genes) ในเซลล์ต้นกำเนิดเนื้อเยื่อในอย่างมีนัยสำคัญ

สมมติฐานการวิจัย

สารสกัดจากเพชรสังฆาต แก่นไม้มะหาด ว่านมหาเมฆ และกัญชา ส่งผลต่อความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ได้ไม่แตกต่างกัน

การประเมินการมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ด้วยวิธีเอ็มทีที เพื่อหาค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดแต่ละชนิด ที่จะทำให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์มีชีวิตมากที่สุด (Optimization of dose of cell viability by MTT assay)

1) การเตรียมสารสกัดแต่ละชนิด

นำผงของพืชสมุนไพร ได้แก่ เพชรสังฆาต แก่นไม้มะหาด ว่านมหาเมฆบรีสุทธี มาละลายในสารละลายไตรเมทิลซัลโฟนิกไซด์ ร้อยละ 10 ที่เตรียมในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) ตามความเข้มข้นที่ต้องการใช้ในการทดสอบ ได้แก่ ร้อยละ 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625, 0.078125, 0.039, 0.0195, 0.00976, 0.00488 และ 0.00244 โดยมวลต่อปริมาตร

ในส่วนสารสกัดจากกัญชา เตรียมโดยนำน้ำมันแคนนาบิไดรอล ความเข้มข้น ร้อยละ 10 ที่สกัดในตัวทำละลายเอทานอล มาละลายในสารละลายเอทานอลความเข้มข้น ร้อยละ 10 ที่เตรียมในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ตามความเข้มข้นที่ต้องการใช้ในการทดสอบ ได้แก่ ร้อยละ 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625, 0.078125, 0.039, 0.0195, 0.00976, 0.00488 และ 0.00244 โดยมวลต่อปริมาตร

2) การเตรียมเซลล์ไฟโบรบลาสต์

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ การศึกษานี้ใช้เซลล์ไลน์ชนิด L929 โดยเซลล์จะถูกนำไปเพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาดพื้นที่ 75 ตารางมิลลิเมตร (T75 cell culture flask) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด FGM ทำการบ่มไว้ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศความชื้นสัมพัทธ์ ร้อยละ 95 คาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 จนเซลล์เริ่มเพิ่มจำนวน ภายหลังจากที่เซลล์เจริญเต็มภาชนะแล้ว ทำการขยายจำนวนเซลล์โดยการถ่ายลงจานเพาะเลี้ยงเซลล์ใหม่ (subculture) และนับเป็นเซลล์รุ่นที่ 1 สำหรับเซลล์ที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นเซลล์รุ่นที่ 2-5

3) การหาความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดของสารสกัดแต่ละชนิด โดยดูจากความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์มีชีวิตมากที่สุดด้วยวิธีเอ็มทีที (Optimization dose of cell viability by MTT assay)

เพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในไมโครไทเทอร์เพลท ขนาด 96 หลุม ชนิดกันแบน ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จนกระทั่งได้ความหนาแน่น 5000 เซลล์ต่อหลุม จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง

เมื่อครบกำหนดเวลา ทำการแทนที่อาหารเลี้ยงเซลล์ด้วยสารสกัดปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยนำสารสกัดแต่ละชนิดที่มีความเข้มข้นต่างๆ ใส่ลงไปในจานเพาะเซลล์ สำหรับสารสกัดเพชรสังฆาต แก่นไม้มะหาด ว่านมหาเมฆ จะมีกลุ่มควบคุมลบเป็น 10%DMSO และสารสกัดกัญชา จะมีกลุ่มควบคุมลบเป็น 10% Ethanol บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

หลังครบกำหนดเวลา ทำการล้างตะกอนของสารสกัดสมุนไพรออก โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน (Phosphate buffered saline; PBS) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วดูดตะกอนออก จากนั้นทำการทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์โดยใช้สารเอ็มทีที ปริมาตร 20 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ลงในแต่ละหลุมทดสอบ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

เมื่อครบกำหนดเวลา ดูดสารเอ็มทีทีที่ออก ทำการใส่ไดเมทิล ซัลโฟนิกไซด์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมทดสอบ นำสารที่ได้ในแต่ละหลุมไปหาการดูดกลืนแสง (Optical density) ที่ความเข้มแสง 570 นาโนเมตร โดยมีความยาวคลื่นอ้างอิง (reference wavelength) ที่ 630 นาโนเมตร โดยยังสารมีความทึบ ยิ่งแสดงถึงการมีเซลล์ที่มีชีวิต และมีการสันดาปของเซลล์ที่มาก

ผลการวิจัย

จากการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบร بلاสต์หลังจากใส่สารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวิธีเอ็มทีที พบว่า สารสกัดเพชรสังฆาต ความเข้มข้น ร้อยละ 0.15625, 0.078125 และ 0.03906 โดยมวลต่อปริมาตร มีความเป็นพิษต่อ เซลล์ไฟโบร بلاสต์ สามารถดูได้จากจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ คิดเป็นร้อยละ 83.59, 84.29 และ 87.85 ของกลุ่มควบคุม ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดเพชรสังฆาต ความเข้มข้น ร้อยละ 0.0195 และ 0.0975 โดยมวลต่อปริมาตร สามารถ ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบร بلاสต์ สามารถดูได้จากจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ คิดเป็นร้อยละ 104.61 และ 105.61 ของกลุ่มควบคุมตามลำดับ (ภาพที่ 1)

สารสกัดจากแก่นไม้มะหาด ความเข้มข้นร้อยละ 0.15625, 0.078125, 0.03906, 0.0195 และ 0.00975 โดยมวลต่อ ปริมาตร มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบร بلاสต์ สามารถดูได้จากจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ คิดเป็นร้อยละ 70.87, 72.82, 73.44, 76.14 และ 90.97 ของกลุ่มควบคุม ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดจากแก่นไม้มะหาด ความเข้มข้น ร้อยละ 0.004875 และ 0.00234375 โดยมวลต่อปริมาตร สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบร بلاสต์ สามารถดู ได้จากจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ คิดเป็นร้อยละ 115.94 และ 117.10 ของกลุ่มควบคุมตามลำดับ (ภาพที่ 2)

สารสกัดจากว่านมหาเมฆ ความเข้มข้น ร้อยละ 0.3125, 0.15625, 0.078125 และ 0.03906 โดยมวลต่อปริมาตร มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบร بلاสต์ สามารถดูได้จากจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ คิดเป็นร้อยละ 68.78, 69.44, 89.35 และ 94.22 ของกลุ่มควบคุม ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดจากว่านมหาเมฆ ความเข้มข้น ร้อยละ 0.0195 และ 0.00975 โดยมวลต่อปริมาตร สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบร بلاสต์ สามารถดูได้จากจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ คิดเป็นร้อยละ 100.62 และ 102.56 ของกลุ่มควบคุมตามลำดับ (ภาพที่ 3)

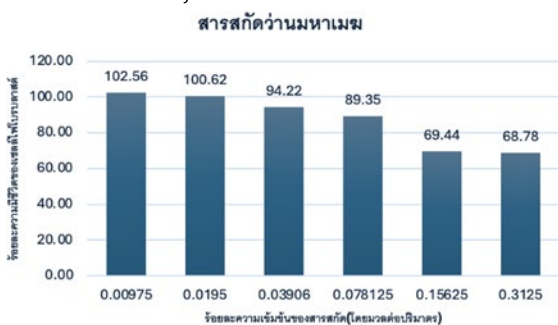
สารสกัดจากกัญชา ความเข้มข้น ร้อยละ 5, 2.5, 1.25, 0.625, และ 0.3125 โดยมวลต่อปริมาตร มีความเป็นพิษต่อ เซลล์ไฟโบร بلاสต์ สามารถดูได้จากจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ คิดเป็นร้อยละ 79.10, 84.45, 87.87, 89.21 และ 96.10 ของกลุ่มควบคุมตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดจากกัญชา ความเข้มข้น ร้อยละ 0.15625, 0.078125 และ 0.03906 โดยมวลต่อปริมาตร สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบร بلاสต์ สามารถดูได้จากจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ คิดเป็นร้อยละ 115.47, 117.41 และ 138.41 ของกลุ่มควบคุมตามลำดับ (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 1 แสดงร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบร بلاสต์ ในความเข้มข้นต่างๆ ของสารสกัดเพชรสังฆาต



ภาพที่ 2 แสดงร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบร بلاสต์ ในความเข้มข้นต่างๆ ของสารสกัดแก่นไม้มะหาด



ภาพที่ 3 แสดงร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบร بلاสต์ ในความเข้มข้นต่างๆ ของสารสกัดว่านมหาเมฆ



ภาพที่ 4 แสดงร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบร بلاสต์ ในความเข้มข้นต่างๆ ของสารสกัดกัญชา

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

การศึกษานี้พบว่า สารสกัดจากเพชรสังฆาต แก่นไม้มะหาด ว่านมหาเมฆ และกัญชา ที่ความเข้มข้น 0.0195 0.004875 0.00975 และ 0.15625 โดยมวลต่อปริมาณ ตามลำดับ ส่งผลต่อความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์แตกต่างกัน แต่แนวโน้มความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ เป็นไปในทิศทางเดียวกัน คือที่ระดับความเข้มข้นของสารสูงจะมีความเป็นพิษต่อเซลล์ ในขณะที่สารสกัดความเข้มข้นต่ำจะส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์

วัสดุทางทันตกรรมที่มีการสัมผัสกับเนื้อเยื่อโดยตรง ควรมีคุณสมบัติความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อโดยรอบ (biocompatibility) ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ (non-cytotoxicity) รวมถึงไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อยีนหรือการกลายพันธุ์ของสารพันธุกรรม (non-genotoxicity/mutagenicity) (Geurtsen, 1997) โดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์ เป็นเซลล์ที่พบได้มากที่สุด ในเนื้อเยื่อใน รวมถึงมีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์และทดแทนเนื้อเยื่อคอลลาเจน การสังเคราะห์ส่วนประกอบของสารเคลือบเซลล์ (Extracellular matrix ; ECM) มีส่วนช่วยในระบบคอมพลีเมนต์ (complement system proteins) ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในระบบภูมิคุ้มกัน การควบคุมอักเสบ และการซ่อมสร้างของเนื้อเยื่อใน

การส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์จากสารสกัดเพชรสังฆาต อาจเป็นผลจากคุณสมบัติในการลดการสร้างไนตริกออกไซด์ (NO) ลดการแสดงออกของอินดิโนซิเบลไนตริกออกไซด์ซินเทส (iNOS mRNA) ที่มีหน้าที่สร้างไนตริกออกไซด์ รวมถึงลดการแสดงออกของโปรตีนที่บ่งชี้ถึงการมีไลโปโพลีแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide) ซึ่งการลดลงของสารเหล่านี้ ส่งผลให้เซลล์มีกระบวนการอักเสบลดลง นอกจากนี้สารสกัดเพชรสังฆาตยังสามารถส่งเสริมการสร้างของฮีมออกซีจีเนส-1 (HO-1) ซึ่งเป็นโปรตีนป้องกัน (protective protein) ที่สำคัญ โดยมีความสามารถในการต่อต้านการอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระ และต้านการตายของเซลล์อย่างเป็นระบบ (anti-apoptotic) (Srisook, 2011)

การส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์จากสารสกัดแก่นไม้มะหาด อาจเป็นผลจากสารออกฤทธิ์ที่สำคัญ คือ ออกซิเรส-เวอร่าทรอล ซึ่งมีคุณสมบัติในการลดกระบวนการอักเสบที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไลโปโพลีแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide-induced inflammatory response) รวมถึงลดการหลั่งของไซโตไคน์ที่กระตุ้นให้เกิดการอักเสบ เช่น อินเตอร์ลิวคิน-6 (IL-6) อินเตอร์ลิวคิน-12 (IL-12) และ TNF- α เป็นต้น (Gaglio, 2021) จึงอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้เซลล์ในกลุ่มทดลองมีความมีชีวิตที่มากกว่าเซลล์ในกลุ่มควบคุม เช่นเดียวกันกับสารสกัดว่านมหาเมฆ ที่มีสารประกอบ 1,8 ซีนีโอล (1,8-cineol compound) ซึ่งเป็นสารจำพวกเทอร์พีนอยด์ออกไซด์ (terpenoid oxide) ที่พบในน้ำมันหอมระเหยของพืชสมุนไพรหลายชนิด โดยสารประกอบชนิดนี้มีคุณสมบัติลดปวด (antinociceptive) และต้านการอักเสบในหนูทดลอง นอกเหนือจากนี้ ว่านมหาเมฆยังสารออกฤทธิ์ คือ เจอร์มาโครน และเคอร์ซีรีโนน (curzerenone) ที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบในหนูทดลองเช่นกัน (Reanmongkol, 2006)

สารสกัดกัญชา มีสารสำคัญที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ คือ แคนนาบิไดอัล ซึ่งมีการศึกษาพบว่า แคนนาบิไดอัลสามารถออกฤทธิ์ในการยับยั้งยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการตายของเซลล์อย่างเป็นระบบ ได้แก่ ยีน BAX และ BAK1 รวมถึงส่งเสริมให้มีการเพิ่มขึ้นของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cell proliferation) ผ่าน PI3K/Akt/mTOR Pathway อย่างไรก็ตาม ควรจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับกลไกในการออกฤทธิ์ของแคนนาบิไดอัล (Cariccio, 2018)

จากการศึกษานี้สามารถสรุปได้ว่าสารสกัดจากเพชรสังฆาต แก่นไม้มะหาด ว่านมหาเมฆ และกัญชา ที่ความเข้มข้นของต่ำ สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ รวมทั้งกระตุ้นการสร้างเซลล์ไฟโบรบลาสต์ได้

การศึกษานี้เป็นการดูเฉพาะความเข้มข้นของสารสกัดจากเพชรสังฆาต แก่นไม้มะหาด ว่านมหาเมฆ และกัญชา ต่อความสามารถในการมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เพื่อคัดกรองเบื้องต้นเท่านั้น ดังนั้น เพื่อให้ทราบถึงฤทธิ์ของสารสกัดต่อเซลล์เนื้อเยื่อใน ควรต้องมีการทดสอบเพิ่มเติมในเซลล์ปฐมภูมิ (primary cells) อย่างเช่น เซลล์เนื้อเยื่อของมนุษย์ อีกทั้งการศึกษานี้ทราบเพียงฤทธิ์ของสารสกัดที่มีต่อความมีชีวิตของเซลล์เท่านั้น ยังไม่สามารถระบุได้ถึงกลไกในการออกฤทธิ์ของสารดังกล่าวได้ จึงควรต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปในอนาคต

นอกจากนี้ การศึกษานี้เป็นการคัดกรองเบื้องต้น เฉพาะความเข้มข้นของสารสกัดต่างๆ เท่านั้น ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับระยะเวลาการออกฤทธิ์ของสารสกัดแต่ละชนิด ซึ่งอาจส่งผลต่อความมีชีวิตของเซลล์ที่แตกต่างกัน เพื่อให้สามารถทราบระยะเวลาที่สารสกัดสามารถออกฤทธิ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด เพื่อนำองค์ความรู้ที่ได้ไปปรับใช้ในทางทันตกรรมต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Akarchariya, N., Sirilun, S., Julsrigival, J., & Chansakaowa, S. (2017). Chemical profiling and antimicrobial activity of essential oil from *Curcuma aeruginosa* Roxb., *Curcuma glans* K. Larsen & J. Mood and *Curcuma cf. xanthorrhiza* Roxb. collected in Thailand. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(10), 881-885.
- Andreasen, J. O., Farik, B., & Munksgaard, E. C. (2002). Long-term calcium hydroxide as a root canal dressing may increase risk of root fracture. *Dental traumatology*, 18(3), 134-137.
- Austah, O., Joon, R., Fath, W. M., Chrepa, V., Diogenes, A., Ezeldeen, M., ... & Ruparel, N. B. (2018). Comprehensive characterization of 2 immature teeth treated with regenerative endodontic procedures. *Journal of Endodontics*, 44(12), 1802-1811.
- Banchs, F., & Trope, M. (2004). Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol?. *Journal of endodontics*, 30(4), 196-200.
- Bose, R., Nummikoski, P., & Hargreaves, K. (2009). A retrospective evaluation of radiographic outcomes in immature teeth with necrotic root canal systems treated with regenerative endodontic procedures. *Journal of endodontics*, 35(10), 1343-1349.
- Chueh, L. H., & Huang, G. T. J. (2006). Immature teeth with periradicular periodontitis or abscess undergoing apexogenesis: a paradigm shift. *Journal of endodontics*, 32(12), 1205-1213.
- Cvek, M. (1992). Prognosis of luxated non-vital maxillary incisors treated with calcium hydroxide and filled with gutta-percha. A retrospective clinical study. *Dental Traumatology*, 8(2), 45-55.
- Dewi, I. P., Dachriyanus, Y. A., Ismail, N. H., Hefni, D., Susanti, M., Syafri, S., & Wahyuni, F. S. (2024). *Curcuma Aeruginosa* Roxb. Extract Inhibits the Production of Proinflammatory Cytokines on Raw 264.7 Macrophages. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 16(1), 41-44.
- American Association of Endodontists. (2020). *Glossary of Endodontic Terms*. 10th ed. Association of Endodontists.
- American Association of Endodontists. (2021). *AAE Position Statement on Vital Pulp Therapy*. 1-10.
- Fagogeni, I., Metlerska, J., Lipski, M., Falgowski, T., Maciej, G., & Nowicka, A. (2019). Materials used in regenerative endodontic procedures and their impact on tooth discoloration. *Journal of Oral Science*, 61(3), 379-385.
- Geurtsen, W., & Leyhausen, G. (1997). Biological aspects of root canal filling materials—histocompatibility, cytotoxicity, and mutagenicity. *Clinical Oral Investigations*, 1, 5-11.
- Gaglio, S. C., Donini, M., Denbaes, P. E., Dusi, S., & Perduca, M. (2021). Oxyresveratrol inhibits R848-induced pro-inflammatory mediators release by human dendritic cells even when embedded in PLGA nanoparticles. *Molecules*, 26(8), 2106.

- Hargreaves, K. M., Giesler, T., Henry, M., & Wang, Y. (2008). Regeneration potential of the young permanent tooth: what does the future hold?. *Pediatric dentistry*, 30(3), 253-260.
- Huang, G. J. (2009). Apexification: the beginning of its end. *International endodontic journal*, 42(10), 855-866.
- Iwaya, S. I., Ikawa, M., & Kubota, M. (2001). Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. *Dental traumatology*, 17(4), 185-187.
- Javelet, J., Torabinejad, M., & Bakland, L. K. (1985). Comparison of two pH levels for the induction of apical barriers in immature teeth of monkeys. *Journal of endodontics*, 11(9), 375-378.
- Lanza Cariccio, V., Scionti, D., Raffa, A., Iori, R., Pollastro, F., Diomedea, F., ... & Mazzon, E. (2018). Treatment of periodontal ligament stem cells with MOR and CBD promotes cell survival and neuronal differentiation via the PI3K/Akt/mTOR pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8), 2341.
- Laovachirasuwan, P., Phadungkit, M., Namsawang, T., Khamphuwang, J., & Chaemphudsa, C. (2015). Oxyresveratrol Content and Tyrosinase Inhibitory Activity of Artocarpus lakoocha Heartwood Extract. *Journal of Science and Technology Mahasarakham University*, 34(6), 547-550.
- Liu, F., Wu, Q., Liu, Q., Chen, B., Liu, X., Pathak, J. L., Watanabe, N., & Li, J. (2023). Dental pulp stem cells-derived cannabidiol-pretreated micro-spheroids showed robust osteogenic potential via upregulation of WNT6. *Communications Biology*, 7(972), 1-14
- Mitchell, D. F., & Shankwalker, G. B. (1958). Osteogenic potential of calcium hydroxide and other materials in soft tissue and bone wounds. *Journal of Dental Research*, 37(6), 1157-1163.
- Pandey, A., & Bhatnagar, S. P. (2009). Preliminary Phytochemical screening and antimicrobial studies on Artocarpus lakoocha Roxb. *Ancient science of life*, 28(4), 21-24.
- Parkpoom, T., Chantree, K. (2012). A study of efficiency the mixed extract of Pistia Stratics Helianthus embolic Linn. *Journal of Food Health and Bioenvironmental Science*, 5(1), 47-60
- Paryani, K., & Kim, S. G. (2013). Regenerative endodontic treatment of permanent teeth after completion of root development: a report of 2 cases. *Journal of Endodontics*, 39(7), 929-934.
- Potu, B. K., Bhat, K. M., Rao, M. S., Nampurath, G. K., Chamallamudi, M. R., Nayak, S. R., & Muttigi, M. S. (2009). Petroleum ether extract of Cissus quadrangularis (Linn.) enhances bone marrow mesenchymal stem cell proliferation and facilitates osteoblastogenesis. *Clinics*, 64(10), 993-998.
- Qi, X., Liu, C., Li, G., Luan, H., Li, S., Yang, D., & Zhou, Z. (2021). Investigation of in vitro odonto/osteogenic capacity of cannabidiol on human dental pulp cell. *Journal of dentistry*, 109, 103673.
- Rafter, M. (2005). Apexification: a review. *Dental Traumatology*, 21(1), 1-8.
- Reanmongkol, W., Subhadhirasakul, S., Khaisombat, N., Fuengnawakit, P., Jantasila, S., & Khamjun, A. (2006). Investigation the antinociceptive, antipyretic and anti-inflammatory activities of Curcuma aeruginosa Roxb. extracts in experimental animals. *Songklanakarin J Sci Technol*, 28(5), 999-1008.
- Shabahang, S., Torabinejad, M., Boyne, P. P., Abedi, H., & McMillan, P. (1999). A comparative study of root-end induction using osteogenic protein-1, calcium hydroxide, and mineral trioxide aggregate in dogs. *Journal of endodontics*, 25(1), 1-5.

- Srisook, K., Palachot, M., Mongkol, N., Srisook, E., & Saraputit, S. (2011). Anti-inflammatory effect of ethyl acetate extract from *Cissus quadrangularis* Linn may be involved with induction of heme oxygenase-1 and suppression of NF-KB activation. *Journal of ethnopharmacology*, 133(3), 1008-1014.
- Tasadduq, R., Gordon, J., Al-Ghanim, K. A., Lian, J. B., Van Wijnen, A. J., Stein, J. L., ... & Shakoori, A. R. (2017). Ethanol extract of *Cissus quadrangularis* enhances osteoblast differentiation and mineralization of murine pre-osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Journal of cellular physiology*, 232(3), 540-547.
- Teanpaisan, R., Senapong, S., & Puripattanavong, J. (2014). In vitro antimicrobial and antibiofilm activity of *Artocarpus lakoocha* (Moraceae) extract against some oral pathogens. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13(7), 1149-1155.

Data Availability Statement: The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Conflicts of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.



Copyright: © 2024 by the authors. This is a fully open-access article distributed under the terms of the Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0).