ชื่อวิทยานิพนธ์	ผลของระยะเวลาและขนาดของสารยับยั้งไซโคลออกซิจิเนส-2 แบบจำเพาะต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาการของเซลล์สร้างกระดูกบนผิวไทเทเนียม
ผู้เขียน	นางสาวบุษกร อัครวัชรางกูร
สาขาวิชา	ศัลยศาสตร์ช่องปากและแม็กซิลโลเฟเชียล
ปีการศึกษา	2549

บทคัดย่อ

มีการใช้ยาระงับปวดและต้านอักเสบที่ยับยั้งจำเพาะไซโคลออกซีจีเนส-2 เซเลคอกซิบ (Specific cyclooxygenase 2 inhibitor NSAID, celecoxib) อย่างแพร่หลายเพื่อหลีกเลี่ยงผลข้างเคียงที่เกิดจากการใช้ยาระงับปวดและต้านอักเสบชนิดดั้งเดิม (Conventional NSAIDs) ผลข้างเคียงของยาระงับปวดและต้านอักเสบที่ยับยั้งจำเพาะไซโคลออกซีจีเนส ต่อการซ่อมแซมและการสร้างของกระดูก ทำให้เกิดความห่วงใยถึงผลเสียที่อาจเกิดขึ้นต่อการเกาะติดของรากฟันเทียมและข้อเทียมในผู้ป่วยที่จำเป็นต้องได้รับยาดังกล่าวเป็นเวลานานเพื่อรักษาอาการปวดเรื้อรัง อาทิผู้ป่วยโรคข้อกระดูกเสื่อมและอักเสบ (osteoarthritis and rheumatoid arthritis) **วัตถุประสงค์** เพื่อศึกษาอิทธิพลของเซเลคอกซิบที่เนื่องมาจากปริมาณของยาที่ใช้เพื่อการรักษาและระยะเวลาที่ได้รับยาต่อการเจริญเติบโต (growth) และการพัฒนา (differentiation) ของเซลล์สร้างกระดูกบนผิวของวัสดุไทเทเนียมที่อยู่ในระยะการเจริญเติบโตที่ต่างๆกัน (different stages of cell growth) **วัสดุและวิธีการ** ทำการเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูกที่พัฒนามาจากกระดูกกะโหลกศีรษะของหนูเมาส์ (Mouse calvarial osteoblast cell line, MC3T3-E1) ในน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มีความจำเพาะต่อการเจริญเติบโตของเซลล์สร้างกระดูกบนแผ่นโลหะไทเทเนียมชนิดเรียบ ที่เตรียมด้วยวิธีการ acid prickle (Straumann, Switzerland) เป็นเวลา 21 วัน การทดลองแบ่งออกเป็น 5 กลุ่มตามชนิดและขนาดของยาในน้ำเลี้ยงเซลล์ กลุ่ม A ได้รับยา อินโดเมทาซิน (Indomethacin) 0.1 ไมโครโมลาร์ กลุ่ม B ได้รับยาเซเลคอกซิบ 1.5 ไมโครโมลาร์ กลุ่ม C ได้รับยาเซเลคอกซิบ 3 ไมโครโมลาร์ กลุ่ม D ได้รับยาเซเลคอกซิบ 9 ไมโครโมลาร์ กลุ่ม E ได้รับน้ำเลี้ยงที่ไม่ได้ผสมยาใดๆ ปริมาณของยาที่ให้คำนวณเทียบเคียงจากขนาดของยาที่ใช้ในการรักษาอาการปวดของข้อ โดยแบ่งการการทดลองออกเป็น 3 ระยะตามการเจริญเติบโตของเซลล์ คือ ช่วงเริ่มต้น (*static* phase,วันที่ 1 ของการเลี้ยงเซลล์) ช่วงเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว (*log* phase,วันที่ 5 ของการเลี้ยงเซลล์) และ ช่วงโตเต็มที่ (*plateau* phase,วันที่ 12 ของการเลี้ยงเซลล์) โดยในแต่ระยะเซลล์จะถูกเลี้ยงในน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัมที่มีส่วนผสมของยาตามกลุ่ม

การทดลองเป็นเวลา 1 - 5 วัน การทดสอบต่างๆจะทำในวันที่ 1 3 และ 5 หลังการให้ยา โดยในแต่ละการทดสอบมีจำนวนตัวอย่าง 3 ตัวอย่าง โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดที่มีการรวมแสงเลเซอร์ (Confocal laser scanning electron microscope, CLSM) และ กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope, SEM) ตรวจสอบความมีชีวิตและการยึดเกาะและลักษณะของเซลล์บนพื้นผิวไทเทเนียมตามลำดับ ทำการติดตามผลของยาต่อการเจริญเติบโตของเซลล์โดยทำการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ (cell viability test) โดยใช้ MTT assay และติดตามการพัฒนาการของเซลล์กระดูกโดยทำการวัดระดับของอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase, ALP) และ ออสติโอคัลซิน (osteocalcin) และศึกษาอิทธิพลของยาแก้อักเสบ (NSAIDs) ต่อการทำงานของเอนไซม์ไซโคลออกซีจีเนสโดยการตรวจวัดระดับของพรอสตาแกลนดิน (prostaglandin, PGE_2) **ผลการศึกษา** จากภาพถ่าย CLSM และ SEM แสดงให้เห็นว่าเซลล์สร้างกระดูกมีชีวิตและสามารถยึดเกาะและเจริญเติบโตบนพื้นผิวไทเทเนียมเป็นอย่างดี โดยแสดงลักษณะการแผ่และยื่นออกของไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ทำให้เซลล์มีลักษณะเป็นรูปร่างหลายเหลี่ยมที่มีแขนของเซลล์ยื่นออกไปสัมผัสกับเซลล์ข้างเคียง (polygonal shape with extending filopodia) จากการทำการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ พบว่าจำนวนของเซลล์ในกลุ่ม D (Celecoxib 9 μM) มีจำนวนลดลงอย่างมีนัยสำคัญในทุกช่วงการเจริญเติบโต ($p<0.05$) ไม่พบผลการยับยั้งการแสดงออกของ ALP และออสติโอคัลซินในทุกกลุ่มทดลอง ($p>0.05$) แต่พบว่าในวันที่ 5 ของการทดลองในระยะเริ่มต้นและระยะโตเต็มที่ระดับของ PGE_2 ในกลุ่ม A-D มีระดับต่ำกว่ากลุ่ม E ซึ่งเป็นควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$ และ $p<0.01$ ตามลำดับ) **สรุป** ยาเซเลคอกซิบในขนาดสูง (9 μM) ที่ใช้ในการรักษามีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์กระดูกอย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่มีผลต่อพัฒนาการของเซลล์กระดูก โดยผลการยับยั้งดังกล่าวมีความสัมพันธ์โดยตรงกับขนาดของยาและระยะเวลาที่ได้รับยา ผลการยับยั้งดังกล่าวยังขึ้นอยู่กับระยะการเจริญเติบโตของเซลล์สร้างกระดูก จึงเป็นไปได้ว่าการได้รับยาระงับปวดและต้านอักเสบที่ยับยั้งจำเพาะไซโคลออกซีจีเนส-2 เป็นเวลานานอาจก่อให้เกิดการลดลงของการเจริญเติบโตของเซลล์สร้างกระดูกบนผิวไททาเนียมชนิดเรียบ (acid prickle) ซึ่งอาจส่งผลขัดขวางการยึดเกาะของรากฟันเทียมและข้อกระดูกเทียม

Thesis Title	Time and Dose-Dependent Effects of Specific COX -2 Inhibitor on Growth and Differentiation of Osteoblasts on Titanium Surface
Author	Miss Butsakorn Akarawatcharangura
Major Program	Oral and Maxillofacial Surgery
Academic Year	2006

Abstract

Specific COX-2 inhibitor NSAIDs (Celecoxib) have been widely used to avoid adverse effects of conventional NSAIDs. Adverse effects of the specific COX-2 inhibitor on bone healing and osteogenesis raises concerns about those effects on osteointegration particularly in long term usage of celecoxib such as in osteoarthritis and rheumatoid arthritis cases. **Objective:** This study aimed to investigate dose and time dependent effects of celecoxib on growth and differentiation of osteoblasts, on a titanium surface in different stages of cell growth. **Materials and Methods:** A mouse calvarial osteoblast cell line (MC3T3-E1) was cultivated on smooth surface (acid prickle) titanium disks (Straumann, Switzerland) in a mineralized culture medium for 21 days. The study was divided into five groups according to the supplemented medications: Group A; indomethacin 0.1 μM, Group B; celecoxib 1.5 μM, Group C; celecoxib 3 μM, Group D; celecoxib 9 μM, and Group E; without supplementation. Doses of celecoxib and indomethacin were ranged by their therapeutic doses. The medications were supplemented in three stages of cell growth, *static* (24 hours after seeding), *log* (on culture-day 5) and *plateau* experimental phases (on culture-day 12). In each phase, cells were incubated in a serum free culture medium treated with the medications for 1-5 days. Attachment, growth and differentiation of osteoblasts were monitored on treatment-days 1, 3 and 5, on triplicate samples. A confocal laser scanning electron microscope (CLSM) and a scanning electron microscope (SEM) were used to examine cell viability, attachment and morphology of cells on titanium disks. A cell viability test (MTT assay) was performed to determine growth of cells. Expression of ALP and osteocalcin were measured to determine osteoblastic differentiation in early and late stages, respectively. Levels of PGE_2 were detected to determine inhibitory effects of NSAIDs on function of cyclooxygenase enzymes. **Results:** CLSM and SEM images showed cell viability

and well-attached of polygonal shaped cells on the titanium surface. A suppression of proliferation of cells in dose and time dependent manners was found in Group D; Celecoxib 9 μM in all experimental phases. On treatment-day 5 the numbers of cells in Group D were significantly less than the control Group E in experimental *log* and *plateau* phases, while it was less than Groups A-C in all experimental phases ($p<0.05$). Inhibitory effects of the supplemented medications on ALP activity and expression of osteocalcin was not found in all groups of all experimental phases ($p>0.05$). Levels of PGE_2 of Groups A-D were significantly less than Group E in the *static* and *plateau* phases ($p<0.01$), but not in *log* phases. **Conclusions:** A high therapeutic dose of Celecoxib (9 μM) was able to inhibit growth of osteoblasts on titanium surfaces, but it had no effect on osteoblastic differentiation. The inhibitory effects of celecoxib were dose and time dependent and influenced by different stages of cell growth. It may be postulated that a long term usage of celecoxib may inhibit growth of osteoblasts on the titanium surface, resulting in an impeding of osteointegration of implants.