เชียงใหม่สัตวแพทยสาร 2554; 9(1): 5-20

นิพนธ์ต้นฉบับ

ผลของ vedaprofen ที่มีต่อลักษณะทางกายภาพ การสร้างสารโปรตีโอกลัยแคน และการแสดงออกของยีน ในเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อสุนัขเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

กรกฎ งานวงศ์พาณิชย์[1,2,3] ปัณฑิตา เสียงดี[1] พีรพรรณ โปธาเจริญ[3] ศิริวรรณ์ องค์ไชย[1,3]

[1]ห้องปฏิบัติการวิจัยโรคกระดูกและข้อในสัตว์ ภาควิชาชีวศาสตร์ทางสัตวแพทย์และ สัตวแพทย์สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

[2]ศูนย์วิจัยวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

[3]ศูนย์วิจัยเพื่อความเป็นเลิศทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อแห่งประเทศไทย ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

บทคัดย่อ นำเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อสุนัขมาใช้ในการศึกษาผลของ vedaprofen ที่มีต่อลักษณะทางกายภาพของเซลล์ การสร้างสารโปรตีโอกลัยแคน 2 ชนิดคือ ไฮยาลูโรแนน (hyaluronan; HA) และกลัยโคซามิโนกลัยแคน (glycosamino glycan; GAG) และการแสดงออกของยีน *COL2* และ *AGG* โดยศึกษาความแตกต่างของระยะเวลาที่ได้รับสาร vedaprofen ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml ประกอบด้วย 4, 16 และ 32 ชั่วโมง จากผลการศึกษา ไม่พบความแตกต่างทางสถิติค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ ($P>0.05$) ที่ระยะเวลาการได้รับสารที่ 16 ชั่วโมง กลุ่มที่ได้รับสาร vedaprofen มีค่าร้อยละการแบ่งเซลล์สูงกว่ากลุ่มที่ได้รับเฉพาะตัวทำละลายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ไม่พบความแตกต่างทางสถิติของปริมาณการสร้างสารกลัยโคซามิโนกลัยแคนทั้ง 2 ชนิด ($P>0.05$) และไม่พบความแตกต่าง ($P>0.05$) ของการแสดงออกของทั้ง ยีน *COL2* และ *AGG* ระหว่างกลุ่มทดลองทั้ง 3 ทั้งที่เวลาในการเลี้ยงเดียวกันและที่เวลาในการเลี้ยงต่างกัน ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการใช้ vedaprofen ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml ไม่สามารถกระตุ้นให้เซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อเจริญได้ดีขึ้น ไม่สามารถกระตุ้นให้เซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อสร้างสารโปรตีโอกลัยแคนเพิ่มมากขึ้น และไม่สามารถทำให้มีการแสดงออกของยีน *COL2* และ *AGG* เพิ่มมากขึ้น **เชียงใหม่สัตวแพทยสาร** 2554; 9(1): 5-20

คำสำคัญ : vedaprofen เซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อ ลักษณะทางกายภาพ โปรตีโอกลัยแคน

ติดต่อขอสำเนาบทความได้ที่ : กรกฎ งานวงศ์พาณิชย์ ภาควิชาชีวศาสตร์ทางสัตวแพทย์และสัตวแพทย์สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50100 E-mail address: korakot.n@cmu.ac.th
ได้รับบทความวันที่ 2 พฤศจิกายน 2553

บทนำ

การบาดเจ็บและการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนผิวข้อจัดเป็นความผิดปกติที่พบบ่อยในสุนัข ซึ่งมีสาเหตุมาจากการได้รับอุบัติเหตุหรือโรคต่างๆ เช่น โรคข้อสะโพกเจริญผิดปกติ โรคข้อศอกเจริญผิดปกติ โรคข้อเสื่อม หรือโรคข้ออักเสบ ปัจจุบัน ยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (nonsteroidal antiinflammatory drugs; NSAIDs) ที่แนะนำให้ใช้ในภาวะที่เกิดความผิดปกติกับกระดูกอ่อนผิวข้อ (articular cartilage) ยังมีน้อย รวมทั้งไม่มีรายงานการศึกษาถึงผลของยาที่มีต่อเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อ (chondrocyte) ไม่ว่าจะเป็นอัตราการเจริญเติบโต อัตราการตาย การสร้างสารกลุ่มกลัยโคซามิโนกลัยแคน (glycosaminoglycan) ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเนื้อกระดูกอ่อน รวมทั้งการแสดงออกระดับยีน (gene expression) ที่ควบคุมการสร้างสารชีวเคมีที่สำคัญของเนื้อกระดูกอ่อนผิวข้อ ยา vedaprofen เป็นยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ชนิดใหม่ที่มีการนำมาใช้ในสุนัข มีรายงานมากมายที่แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการลดอาการปวดที่ดีของยากลุ่มนี้ แต่ยังไม่มีการศึกษาที่แสดงให้เห็นถึงผลของยานี้ต่อกระบวนการเมแทบอลิสม์ (metabolism) ของเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อ

จากการศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่า vedaprofen ให้ผลดีในการใช้เป็นยาต้านการอักเสบ[1] แต่ยังไม่มีรายงานการศึกษาถึงผลของ vedaprofen ที่มีต่อเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อ ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของ vedaprofen ต่อลักษณะทางกายภาพของเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อ และความสามารถในการสร้างสารในกลุ่มไกลโคซามิโนไกลแคน และการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างสารชีวเคมีที่เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในเนื้อกระดูกอ่อนผิวข้อ เพื่อให้ได้ข้อมูลที่สำคัญสำหรับการใช้ยา vedaprofen ในการรักษาโรคข้อเสื่อมและโรคเกี่ยวกับข้ออื่นๆ

วิธีการทดลอง

ตัวอย่างทางการศึกษา

การศึกษาครั้งนี้ใช้เซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อที่เก็บมาจากกระดูกอ่อนผิวข้อบริเวณส่วนหัวของกระดูกต้นขาหลัง (femoral head) ในสุนัขที่เข้ารับการผ่าตัดเพื่อเอาหัวกระดูกต้นขาหลังออก (femoral head excision) จำนวนทั้งสิ้น 5 ตัว สุนัขทั้งหมดมีอายุอยู่ระหว่าง 1-5 ปี ได้รับการวินิจฉัยแล้วว่าไม่เป็นโรคข้อเสื่อม นอกจากนั้นไม่เคยมีประวัติการได้รับบาดเจ็บของข้อสะโพก หรือมีการหักของกระดูกรยางค์ขาหลังมาก่อน

การแยกและเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อน

เก็บกระดูกอ่อนผิวข้อด้วยวิธีการผ่าตัดปลอดเชื้อ ใน อาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี gentamycin 0.1 mg/ml ตัดกระดูกอ่อนเป็นชิ้นเล็ก ขนาด 1x1 มม. จากนั้นทำการย้ายกระดูกอ่อนใส่ในจานเลี้ยงเซลล์ที่มี DMEM ผสมกับ 10% enzyme collagenase typeII (ความเข้มข้น 1 µg/µl) นำไปเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่ 37°C จนตรวจพบว่ามีการกระจายตัวของเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อออกมา

จากชิ้นกระดูก

การแบ่งกลุ่ม

เนื่องจากยังไม่เคยมีการศึกษาผลของ vedaprofen กับเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการมาก่อน ในการทดลองครั้งแรกจึงทำการหาความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการศึกษาต่อไป ทำการทดสอบสารโดยใช้ primary cell ที่แยกได้จากกระดูกอ่อนผิวข้อสุนัข โดยแบ่งเซลล์กระดูกอ่อนเป็น 9 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับ vedaprofen (MC) กลุ่มที่ได้รับ vedaprofen เข้มข้น 1 mg (tre-1000) กลุ่มที่ได้รับ vedaprofen เข้มข้น 500 µg (tre-500) กลุ่มที่ได้รับ vedaprofen เข้มข้น 100 µg (tre-100) กลุ่มที่ได้รับ vedaprofen เข้มข้น 50 µg (tre-50) กลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะตัวทำละลาย KOH ของ vedaprofen ที่ 1 mg (sc-1000) กลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะตัวทำละลาย KOH ของ vedaprofen ที่ 500 µg (sc-500) กลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะตัวทำละลาย KOH ของ vedaprofen ที่ 100 µg (sc-100) และกลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะตัวทำละลาย KOH ของ vedaprofen ที่ 50 µg (sc-50)

โดยในแต่ละกลุ่มการทดลองมีเซลล์เริ่มต้นประมาณ $2x10^6$ เซลล์ ทำการเพาะเลี้ยงเพื่อให้เซลล์เกาะและเจริญบนพลาสติกแบบ 24 หลุม จึงทำการทดสอบ เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง เก็บข้อมูล ลักษณะทางกายภาพของเซลล์เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพิจารณาเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับใช้ทดสอบ

เมื่อได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการศึกษาแล้วจึงเริ่มทำการทดลองโดยแบ่งกลุ่มทดลองเป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มควบคุม (media control) กลุ่มที่ได้รับตัวทำละลาย vedaprofen (solution control) และกลุ่มที่ได้รับสารละลาย vedaprofen (treatment)

การศึกษาลักษณะทางกายภาพของเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อ

ในการศึกษาลักษณะทางกายภาพของเซลล์ทำการศึกษาข้อมูลต่างๆ คือ ลักษณะรูปร่างของเซลล์ที่ยึดเกาะ อัตราการเจริญเติบโต อัตราการมีชีวิต และอัตราการตาย ตามวิธีการที่ผู้วิจัยได้เคยศึกษาก่อนหน้านี้แล้ว[2] อธิบายโดยย่อดังนี้

การนับเซลล์โดยใช้ haemocytometer

เป็นการนับเซลล์เพื่อให้ทราบจำนวนเซลล์ (cells/ml) และสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการหาร้อยละค่าความมีชีวิต (% viability) โดยนำเซลล์มา ผสมกับ trypan blue ใน PBS จากนั้นใช้ micropipette ดูดส่วนผสมที่ได้ออกมา เติมลงในช่องว่างระหว่าง cover slip และ haemocytometer ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์นับเซลล์ภายในช่อง ซึ่งจำนวนเซลล์ที่นับได้เป็นจำนวนเซลล์ที่มีอยู่ในปริมาตร 0.1 cm^3 (แต่ละช่องมีพื้นที่ 1x1 mm^2 และมีความลึก 0.1 mm.) นับทั้ง 4 ช่อง นำจำนวนที่นับได้คำนวณหาจำนวนเซลล์ทั้งหมด (total cell count) ปริมาตร 1 cm^3

โดยใช้สูตร $t = [(X \times d) \times 10^4]/n$

t = total cellcount (cells/ml.)

X = จำนวนเซลล์ทั้งหมดที่นับได้ใน 4 ช่อง (ทั้งเซลล์ที่มีชีวิต และไม่มีชีวิต)

d = จำนวนการผสมสีกับเซลล์ (ในที่นี้เท่ากับ 2 คือ สี 1 ส่วน : เซลล์ 1 ส่วน)

n = จำนวนซ้ำที่นับ (4 ช่อง)

การแสดงผลการเจริญของเซลล์ในรูปกราฟ (growth curve)

เพาะเลี้ยงเซลล์ในจานเพาะเลี้ยงแบบ 24 หลุม โดยใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้นที่ความเข้มข้นของเซลล์ 1000-5000 cell/cm^2 ในทุกหลุมของจานเพาะเลี้ยง ทำการ trypsini-sation เซลล์จากหลุมของจานเพาะเลี้ยงตามวิธีการดังที่ได้รายงานไปแล้ว[2] โดยทำการ trypsinisation วันละ 2 หลุม เพื่อหาค่าเฉลี่ย

ภายหลังจากการ trypsinisation ทำการนับจำนวนเซลล์ หาค่าเฉลี่ย และบันทึกจำนวนเซลล์ในแต่ละวันไว้ ทำทุกวันจนครบทุกหลุมของจานเพาะเลี้ยง จากนั้นนำจำนวนเซลล์ที่คำนวณได้มาสร้างเป็นกราฟแบบแผนการเจริญของเซลล์ โดยให้แกนตั้งเป็นจำนวนเซลล์ที่นับได้ ส่วนแกนนอนเป็นจำนวนวัน

การย้อมสีเซลล์ด้วยสี trypan blue เพื่อหาค่าร้อยละความมีชีวิต

อาศัยวิธีการ trypsinisation เซลล์ และการนับเซลล์โดยใช้ haemocytometer เพื่อนับเซลล์และคำนวณการหาค่าร้อยละความมีชีวิต (% viability) ของเซลล์ หลังจากที่ย้อมเซลล์ด้วยสี trypan blue เก็บข้อมูลเซลล์โดยการนับจำนวนเซลล์ แยกนับตามลักษณะของเซลล์ที่มองเห็น คือเมื่อย้อมด้วย trypan blue พบเซลล์มีชีวิต (เซลล์กลมไม่ติดสี) และเซลล์ไม่มีชีวิต (ติดสีน้ำเงิน) ทำการคำนวณค่าร้อยละความมีชีวิตดังนี้

ร้อยละความมีชีวิต = (จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมด X 100) / จำนวนเซลล์ทั้งหมดในพื้นภาพ

การย้อมสีเซลล์ด้วยสี Hoechest dyes No.33342 (HO)

ย้อมเซลล์ด้วยสี HO แล้วนำมาถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบ fluorescent เซลล์ที่ติดสีน้ำเงินสะท้อนแสง ทั้งเซลล์เป็นเซลล์ที่ยังมีชีวิต ส่วนเซลล์ที่มีการติดสีน้ำเงินสะท้อนแสงกลมเล็กสว่างจ้าเป็นเซลล์ที่เกิดการตายแบบ apoptosis ขึ้น สุ่มถ่ายภาพเก็บข้อมูลเพื่อนับเซลล์ที่มีลักษณะต่างๆ ทำการคำนวณค่าร้อยละความมีชีวิต โดยใช้สูตรต่อไปนี้

ร้อยละการเกิด apoptosis = (จำนวนเซลล์ที่เกิด apoptosis X 100) / จำนวนเซลล์ทั้งหมดในพื้นภาพ

การศึกษาปริมาณการสร้างสารโปรตีโอไกลแคน

ทำการวัดปริมาณสารในกลุ่มกลัยโคซามิโนกลัยแคนและไฮยาลูโรแนนที่สร้างจากเซลล์กระดูกอ่อนในแต่ละกลุ่มการทดลองด้วยเทคนิค ELISA[2,3,4] โดยส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ที่ศูนย์วิจัยที่มีความเป็นเลิศด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อแห่งประเทศไทย ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยชียงใหม่

การศึกษาการแสดงออกของยีน

นำเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อแต่ละกลุ่มมา

ศึกษาการแสดงออกของยีนที่ระดับอาร์เอ็นเอ จำนวน 2 ชนิดคือ type II collagen (*COL2*) และ aggrecan (*AGG*) โดยใช้ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) เป็นยีนควบคุม[2,10] โดยสกัดอาร์เอ็นเอ นำรหัส (mRNA) จากเซลล์กระดูกอ่อนจำนวน $1x10^6$ เซลล์ จากนั้นศึกษาเปรียบเทียบระดับของ mRNA ที่มีความจำเพาะต่อยีนทั้งหมดด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเสมือนจริง (real-time PCR) ระหว่างกลุ่มทดลอง[2,5,6]

การสกัดอาร์เอ็นเอ

ในการสกัดอาร์เอ็นเอเพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนใช้เซลล์กระดูกอ่อนจำนวน 1,000,000 เซลล์ต่อหนึ่งตัวอย่าง ในแต่ละกลุ่มทดลองทำซ้ำเป็นจำนวน 3 ซ้ำ วิธีการสกัดอาร์เอ็นเอที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นการสกัดด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป (RNeasy, Qiagen®, ประเทศไทย) จากนั้น mRNA ที่ได้จะถูกนำมาสร้างเป็น cDNA แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C ก่อนนำไปศึกษาด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเสมือนจริง

การสร้างสาย cDNA

หลังจากเสร็จสิ้นการสกัดอาร์เอ็นเอแล้วนำอาร์เอ็นเอที่ได้มาสร้างสาย cDNA โดยอาศัยเอ็นไซม์ M-MuLV® reverted reverse transcriptase มีขั้นตอน ดังนี้ นำอาร์เอ็นเอต้นแบบ ปริมาตร 8 µl ใส่ใน PCR tube ที่ประกอบด้วย oligo dT_{12}(500 µg/ml) ปริมาตร 1 µl, 10 mM dNTP ปริมาตร 1µl และ DEPC water ปริมาตร 2 µl จากนั้นนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 65°C นาน 5 นาที แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาที เติม 5X MuLV buffer ปริมาตร 4 µl, Ribolock® ปริมาตร 1 µl 100mM DTT ปริมาตร 2 µl และ เอ็นไซม์ M-MuLV® Revertid reverse transcriptase ปริมาตร 1 µl นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วยอุณหภูมิ 42°C นาน 90 นาที และ 70°C นาน 10 นาที นำ cDNA ที่ได้ไปเก็บที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

การศึกษาปริมาณอาร์เอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเสมือนจริง (Real-time PCR)

ในการศึกษานี้ใช้ไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *COL2* และยีน *AGG* โดยมียีน *GAPDH* ทำหน้าที่เป็นยีนควบคุมภายใน (house keeping gene) ดังแสดงในตารางที่ 1 ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเสมือนจริงมีปริมาตร 25 µl ใช้ชุดสารเคมีสำเร็จรูป syber green1 (Qua-ntiTect SYBR Green, Qiagen®, ประเทศไทย) ด้วยเครื่อง iCycler iQ (Bio-Rad) ภายใต้อุณหภูมิ 95°C นาน 5 นาที ตามด้วย 40 รอบของ อุณหภูมิ 95°C 10 วินาที และ 60°C 30 วินาที

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำผลที่ได้มาศึกษาความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองโดยใช้สถิติ ทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูลระหว่างกลุ่ม โดยใช้ Kruskal Wallis test และ Wilcoxan Rank-sum test ที่ระดับความเชื่อมั่น $p<0.05$ โดยอาศัยโปรแกรม STATA version 8.0

ตารางที่ 1 คู่ของไพร์เมอร์ ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนด้วย real-time PCR

Primer name	Sequence	Accession number
F-COL2	CTGGTGAACCTGGACGAGAG	NM_001006951
R-COL2	ACCACGATCACCCTTGACTC	
F-AGG	GGGACCTGTGTGAGATCGAC	CFU65989
R-AGG	GTAACAGTGGCCCTGGAACT	
F-GAPDH	CTGGGGCTCACTTGAAAGG	NM_001003142
R-GAPDH	CAAACATGGGGGCATCAG	

ผลการทดลอง

ผลการหาความเข้มข้นที่เหมาะสม

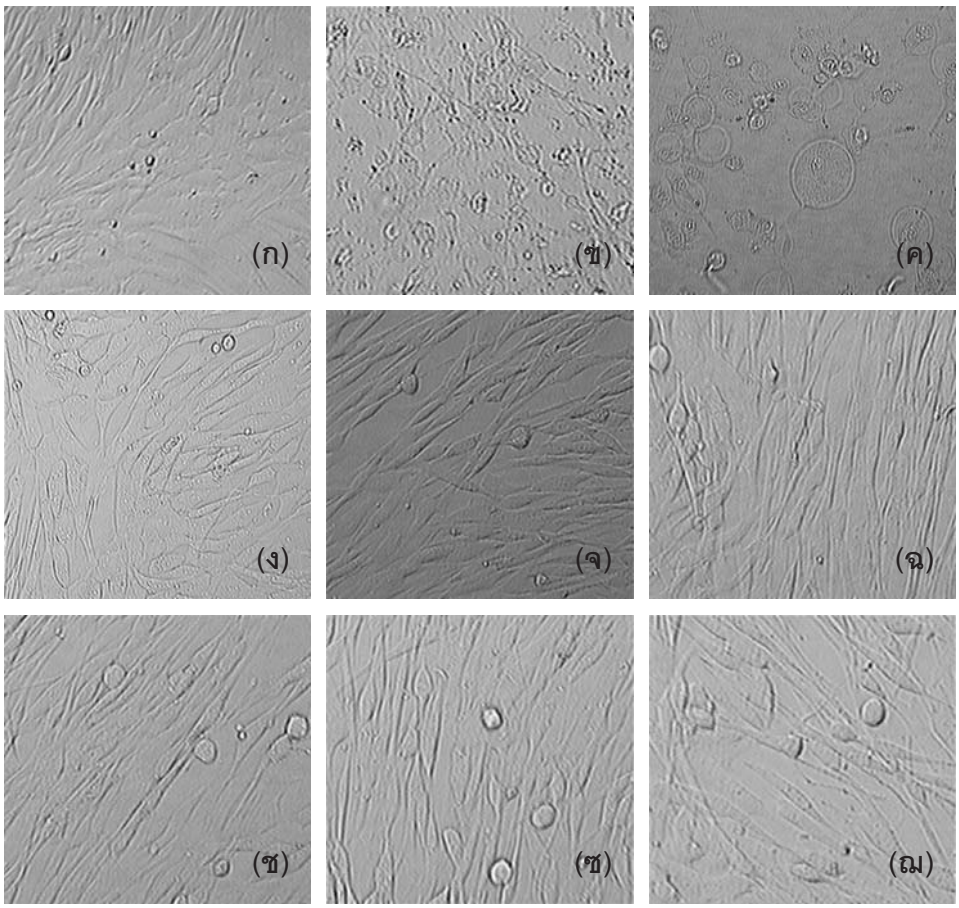
ผลการศึกษาเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ vedaprofen สำหรับใช้ในการศึกษาผลที่มีต่อเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ จากการทดสอบสารต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บนเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อที่เพาะเลี้ยง พบว่า ที่ความเข้มข้นของสาร vedaprofen 1 mg/ml และ 500 µg/ml ทำให้ลักษณะทางกายภาพของเซลล์กระดูกอ่อนเปลี่ยนไป คือ เกิดการโป่งพองของไซโตพลาสซึมของเซลล์อย่างเห็นได้ชัด จนทำให้เซลล์บางเซลล์แตก แต่เมื่อทดสอบด้วยความเข้มข้น 100 และ 50 µg/ml ไม่พบความผิดปกติดังกล่าว (รูปที่ 1)

เมื่อนำน้ำเลี้ยงเซลล์ไปทำการวิเคราะห์หาระดับสารในกลุ่มโปรตีโอกลัยแคน 2 ชนิดคือ HA และ GAG (รูปที่ 2) พบว่า การให้ vedaprofen ที่ความเข้มข้น 1 mg และ 500 µg/ml สามารถลดปริมาณการสร้าง HA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ในขณะที่การใช้ความเข้มข้น 100 µg/ml มีผลเพิ่มการสร้าง HA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ส่วนการใช้ความเข้มข้น 50 µg/ml ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการสร้างสาร HA ($P>0.05$) เมื่อพิจารณาผลของความเข้มข้นของตัวทำละลาย (KOH) ที่มีต่อปริมาณระดับของ HA พบว่า ตัวทำละลายสำหรับ vedaprofen ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 µg/ml มีผลลดปริมาณการผลิต HA แต่ที่ความเข้มข้น 500 µg/ml มีผลเพิ่มปริมาณ HA ของเซลล์กระดูกอ่อนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *($P<0.05$)*

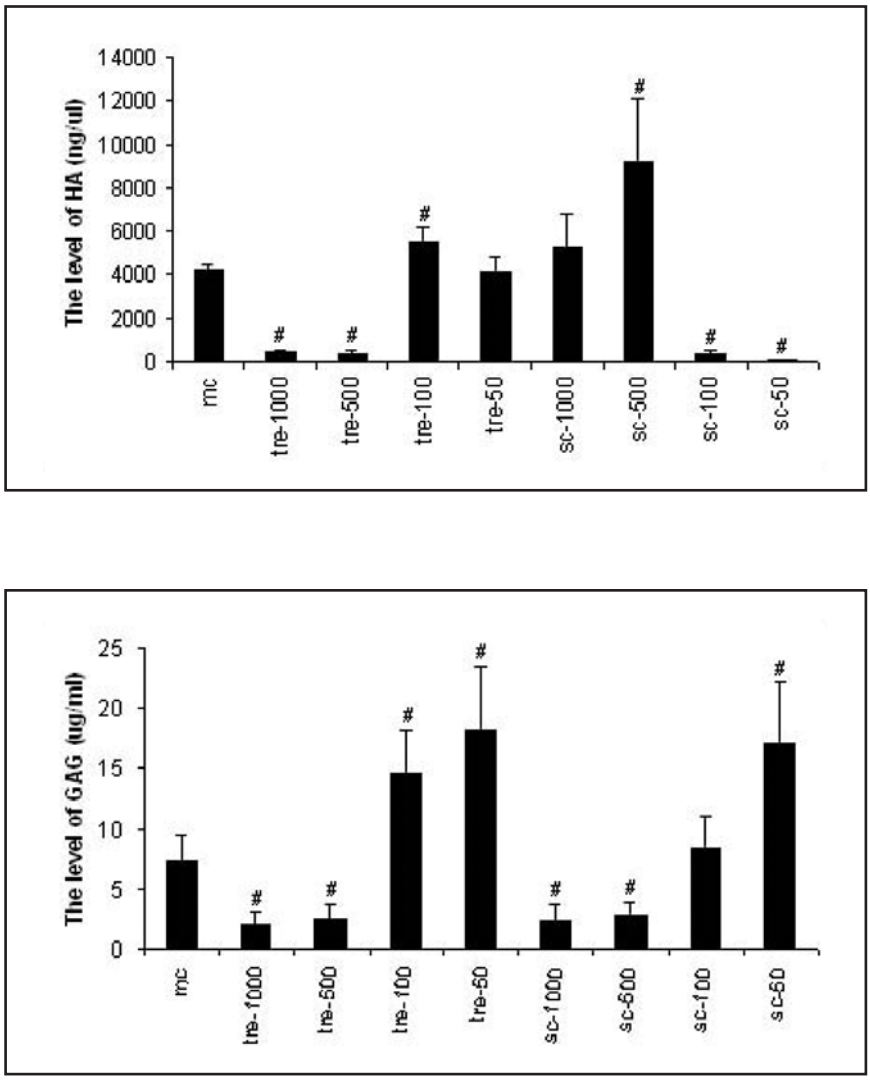
สำหรับผลความเข้มข้นของ vedaprofen ที่มีต่อการสร้างสาร GAG (รูปที่ 2) พบว่า vedaprofen ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml และ 500 µg/ml ลดปริมาณการสร้าง GAG อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ในขณะที่ความเข้มข้น 100 และ 50 µg/ml มีผลเพิ่มการสร้าง GAG อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อพิจารณาผลของความเข้มข้นของตัวทำละลายที่มีต่อปริมาณระดับของ GAG พบว่า ตัวทำละลายสำหรับความเข้มข้น vedaprofen 1 mg และ 500 µg/ml มีผลลดปริมาณการผลิต GAG ของเซลล์กระดูกอ่อนอย่างมีนัยสำคัญ

ทางสถิติ ($P<0.05$) แต่ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml มีผลเพิ่มการสร้าง GAG อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ในขณะที่ความเข้มข้น 100 µg/ml ไม่มีผลต่อการสร้างสาร GAG

จากผลที่ได้จึงเลือก vedaprofen ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml มาใช้ในการศึกษาผลของ vedaprofen ต่อลักษณะทางกายภาพของเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อ การสร้างสารโปรตีโอกลัย-แคน และ การแสดงออกของยีนโดยศึกษาความแตกต่างของระยะเวลาที่ได้รับสารประกอบด้วย 4, 16 และ 32 ชั่วโมง



รูปที่ 1 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ในกลุ่มต่างๆ ภายหลังจากการได้รับสาร 4 ชั่วโมง (ก=กลุ่มควบคุม (ไม่ได้รับสาร) ข=ได้รับสาร 1 mg/ml ค=ได้รับสาร 500 µg/ml ง=ได้รับสาร 100 µg/ml จ=ได้รับสารเข้มข้น 50 µg/ml ฉ=กลุ่มควบคุมตัวทำละลาย KOH ของสาร ที่ 1 mg/ml ช=กลุ่มควบคุมตัวทำละลาย KOH ของสาร ที่ 500 µg/ml ซ=กลุ่มควบคุมตัวทำละลาย KOH ของสาร ที่ 100 µg/ml และ ฌ=กลุ่มควบคุมตัวทำละลาย KOH ของสาร ที่ 50 µg/ml)



รูปที่ 2 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนของปริมาณ hyaluronan (HA) และกลัยโคซามิโนกลัยแคน (GAG) ที่สร้างจากเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อ (mc=media control, sc=solution control, tre=treatment, เลข 1000; 500; 100 และ 50 คือความเข้มข้นมีหน่วยเป็น µg/ml) เครื่องหมาย # แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (mc)

ผลของ vedaprofen ที่มีต่อลักษณะทางกายภาพของเซลล์กระดูกอ่อน

เมื่อทำการเปรียบเทียบข้อมูลระหว่าง กลุ่มที่ไม่ได้รับสาร (media control) และกลุ่มควบคุมที่ได้รับตัวทำละลาย KOH ของสารที่ความเข้มข้น 100 µg (solution control) และกลุ่มที่ได้รับสาร vedaprofen (treatment) พบว่าค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ (ตารางที่ 2) มีค่าใกล้เคียงกันในทุกระยะเวลาที่ได้รับสารและทุกกลุ่มทดลอง โดยไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) ในส่วนของค่าร้อยละการแบ่งเซลล์พบว่า ในกลุ่มที่ได้รับสาร vedaprofen มีแนวโน้มที่สูงขึ้นกว่า กลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับเฉพาะตัวทำละลาย โดยพบว่าที่ระยะเวลาการได้รับสารที่ 16 ชั่วโมง กลุ่มที่ได้รับสาร vedaprofen มีค่าร้อยละการแบ่งเซลล์สูงกว่ากลุ่มที่ได้รับเฉพาะตัวทำละลายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ผลของ vedaprofen ที่มีต่อการสร้างสารโปรตีโอกลัยแคน

ผลการศึกษาความสามารถในการสร้างสาร HA และ GAG ของเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อ (ตารางที่ 3) พบว่า การได้รับ vedaprofen ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml เพียง 4 ชั่วโมง สามารถกระตุ้นเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อให้สร้าง HA ได้มากที่สุด ในขณะที่การได้รับสารนาน 16 ชั่วโมงมีผลทำให้เซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อสร้าง GAG ได้มากที่สุด แต่เมื่อเซลล์กระดูกอ่อน

ตารางที่ 2 แสดงค่าร้อยละความมีชีวิต และค่าร้อยละการแบ่งเซลล์ ของกลุ่มทดลองที่ระยะเวลาการได้รับสารต่างๆ

เวลา (ชั่วโมง)	กลุ่ม	ค่าร้อยละความมีชีวิต	ร้อยละการแบ่งเซลล์
4	Media control	98.88 ± 1.30	12.84 ± 3.01
	Solution control	99.00 ± 1.50	12.69 ± 3.73
	Treatment	98.81 ± 1.81	13.15 ± 4.59
16	Media control	98.39 ± 1.66	12.86 ± 4.19 [a,b]
	Solution control	99.52 ± 0.63	12.70 ± 2.99[a]
	Treatment	99.00 ± 0.92	13.08 ± 4.89[b]
32	Media control	98.82 ± 1.78	13.64 ± 3.96
	Solution control	98.73 ± 1.49	11.45 ± 3.19
	Treatment	98.71 ± 1.66	13.76 ± 4.51

ที่ระยะเวลาเดียวกัน ตัวอักษรที่ต่างกัน (a,b) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% (media control = ไม่ได้รับสารใด, solution control = ได้รับสาร KOH, treatment control = ได้รับ vedaprofen ความเข้มข้น 100 µg/ml)

ตารางที่ 3 แสดงปริมาณของ hyaluronan และ glycosaminoglycan ที่สร้างจากเซลล์กระดูกอ่อนในแต่ละกลุ่มทดลองที่ระยะเวลาการได้รับสารต่างๆ

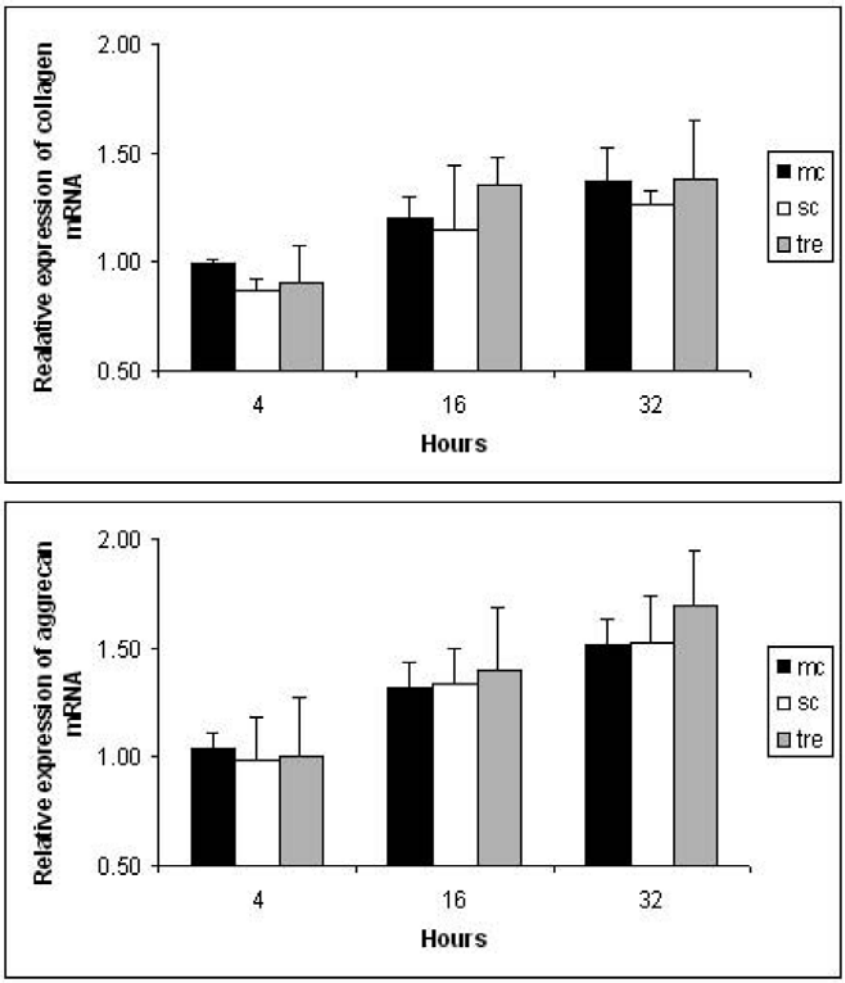
เวลา (ชั่วโมง)	กลุ่ม	hyaluronan	Glycosaminoglycan
4	Solution control	1695.20±18.95	6.08±1.07
	Media control	1816.08±109.07	5.02±1.93
	Treatment	3567.63±269.24	5.89±0.70
16	Solution control	7784.55±728.96	7.97±0.32
	Media control	8044.50±644.17	5.81±0.59
	Treatment	2361.38±1146.11	6.72±0.52
32	Solution control	7250.90±726.62	5.55±5.04
	Media control	6526.95±749.04	4.90±6.27
	Treatment	1972.38±751.18	4.20±3.32

Solution control = ได้รับสาร KOH, media control = ไม่ได้รับสารใด, treatment control = ได้รับ vedaprofen ความเข้มข้น 100 µg/ml

ได้รับสารนาน 32 ชั่งโมง มีผลทำให้ความสามารถในการสร้าง HA และ GAG ได้น้อยที่สุด แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติของปริมาณการสร้าง (P>0.05)

นำค่า Ct ที่คำนวณได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่เสมือนจริงของยีน *COL2* และ *AGG* มาคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การแสดงออก (relative expression) เปรียบเทียบกับระดับการแสดงออกของยีน *GAPDH* ที่เป็นยีนควบคุมภายใน การคำนวณกำหนดให้การแสดงออกของยีนในกลุ่มควบคุมที่เป็น media control ที่เวลา 4 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 1 แล้วคำนวณการแสดงออกของยีนในกลุ่มอื่น เปรียบเทียบกับการแสดงออกของยีนในกลุ่มควบคุมที่เป็น media control

ไม่พบความแตกต่าง (*P*>0.05) ของการแสดงออกของทั้ง ยีน *COL2* และ *AGG* ระหว่างกลุ่มทดลองทั้ง 3 ทั้งที่เวลาในการเลี้ยงเดียวกันและที่เวลาในการเลี้ยงต่างกัน (รูปที่ 3) แต่พบว่าเมื่อเวลาในการเลี้ยงเพิ่มมากขึ้น มีการแสดงออกของยีนที่ 2 ชนิดเพิ่มมากขึ้นตาม



รูปที่ 3 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนของสัมประสิทธิ์การเปลี่ยนแปลงระดับอาร์เอ็นเอนำรหัสของยีน collagen type II และ aggrecan ในชั่วโมงที่ 4, 16 และ 32 (mc=media control, sc=solution control, tre=treatment)

วิจารณ์ผลการทดลอง

vedaprofen (dL-2-(4 cyclohexyl-1-naphthenyl) propanoic acid) เป็นอนุพันธ์ของ propionic acid ตัวใหม่ที่มีการนำมาใช้ในสุนัขได้ไม่นาน แต่สำหรับในม้ามีการใช้เพื่อบรรเทาปวดและระงับการอักเสบมานานแล้ว มีฤทธิ์ลดไข้ ระงับการอักเสบ และบรรเทาปวด โดยสามารถยับยั้งเอนไซม์ไซโคลออกซีจีเนส 2 (cyclooxygenase 2) ได้ดีกว่า เอนไซม์ไซโคลออกซีจีเนส 1 ถึง 8.75 เท่า (ค่า IC_{50} ของยาต่อ COX-2 = 8×10^{-8} โมล่าร์; IC_{50} ของยาต่อ COX-1 = 7×10^{-7} โมล่าร์) ทำให้มีความปลอดภัยมากกว่า และอาการไม่พึงประสงค์ต่ำกว่า นอกจากนี้ vedaprofen ยังสามารถยับยั้งการสังเคราะห์ทรอมบอกเซน

เอ-2 ของเกล็ดเลือดในซีรั่ม และในสิ่งซึมเยิ้มข้นจากกระบวนการอักเสบ (exudative inflammation) แบบผันกลับได้ ทำให้การเคลื่อนตัวของเม็ดเลือดขาวไปยังบริเวณที่มีการอักเสบลดลง รวมทั้งยับยั้งการบวมบริเวณที่มีการอักเสบด้วย[7,8] เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของยา vedaprofen ในการบรรเทาความเจ็บปวด พบว่า ดีกว่า flunixin meglumine และ tolfenamic acid ใช้สำหรับบรรเทาการอักเสบ ลดปวด ลดไข้ ในม้า และสุนัขในกรณีต่างๆ เช่น บรรเทาปวดและลดการอักเสบของเนื้อเยื่ออ่อนหลังการผ่าตัด หรือมีความผิดปกติของกระดูกและกล้ามเนื้อ ยาถูกดูดซึมได้ดีหลังจากได้รับโดยการกินทั้งในสุนัขและม้า พบว่า ชีวปริมาณยาออกฤทธิ์ในสุนัขประมาณร้อยละ 80 ถึง 100 ยาจะจับกับโปรตีนในพลาสมาได้ดี ดังนั้น ปริมาตรการกระจายตัวของยาจะค่อนข้างต่ำ และเนื่องจากอาหารจะมีผลลดอัตราการดูดซึมยา จึงควรให้ยาในสัตว์ก่อนกินอาหารเล็กน้อย ยาจะถูกเปลี่ยนแปลงที่ตับโดยปฏิกิริยาไฮดรอกซีเลชั่น และกลูคูโรนิเดชั่น จากนั้นจะถูกขับออกมาทางปัสสาวะ ในม้าจะใช้เวลาประมาณ 3 วัน หลังจากได้รับยาในการเปลี่ยนแปลงและขับยาออกจากร่างกาย จึงควรงดใช้ยาอย่างน้อย 6 วันก่อนนำม้าลงแข่ง[9] พบว่า vedaprofen ไม่ถูกขับออกมาทางน้ำนม ดังนั้นจึงสามารถให้ในแม่สุนัข หรือแมวที่ให้นมลูกได้

จนถึงปัจจุบันยังไม่มีรายงานผลของ vedaprofen ในเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ในการศึกษานี้ได้รายงานผลของ vedaprofen ที่มีต่อลักษณะทางกายภาพของเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อ (การมีชีวิตและการแบ่งตัว) การสร้างสาร GAG และ HA รวมถึงการแสดงออกของยีน *COL2* และ *AGG* จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า vedaprofen ที่ความเข้มข้น 100 µg /1 ml ไม่มีผลต่อ การมีชีวิต การแบ่งตัว การสร้างสาร GAG และ HA รวมถึงการการแสดงออกของยีน *COL2* และ *AGG* ในกระดูกอ่อนผิวข้อสุนัขที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดสอบความเข้มข้นของสาร 4 ระดับคือ 1 mg/ml, 500 µg/ml, 100 µg/ml และ 50 µg/ml ซึ่งพบว่าการใช้สารที่ความเข้มข้นมากที่สุดที่ไม่มีผลต่อการเกาะของเซลล์กระดูกอ่อนคือ 100 µg ดังนั้นจึงเลือกใช้ความเข้มข้นดังกล่าว และพบว่าที่ ความเข้มข้นของ vedaprofen 1 µg /1 ml ไม่มีผลต่อเซลล์นั้นอาจเป็นไปได้ที่ความเข้มข้นที่ใช้น้อยเกินไป แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นพบว่า ทำให้อัตราการเกาะของเซลล์ลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของ KOH ที่ใช้ในการทำละลาย vedaprofen สูงเกินไป ปัญหาที่สำคัญในการศึกษาครั้งนี้คือ การทำละลาย vedaprofen เพื่อให้สามารถละลายได้ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์

การศึกษาของ Clements et al., (2006)[10] พบว่าในโรคข้อเสื่อม เซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อจะมีการแสดงออกของยีน *aggrecan, biglycan, collagen* (type 1, 2 และ 3), *chondroitin sulfate, proteoglycan, cathepsin B, cathepin D, lumican, matrix*

metalloproteinase 13, *tissue inhibitor of metalloproteinase 1* และ *tenascin* ส่วนยีนที่พบว่า มีการแสดงออกลดลงได้แก่ *tissue inhibitor of metalloproteinase 2* และ *-4* ในการศึกษานี้ได้เลือกศึกษาการแสดงออกของยีน *AGG* และ *COL2* พบว่า การใช้ vedaprofen ความเข้มข้น 100 µg /1 ml ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนทั้ง 2 ชนิด

การที่ vedaprofen ไม่มีผลต่อ การมีชีวิต การแบ่งตัว การสร้างสาร GAG และ HA รวมถึงการแสดงออกของยีน *COL2* และ *AGG* ในกระดูกอ่อนผิวข้อสุนัขที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการนั้นอาจเนื่องมาจากหลายสาเหตุ เช่น vedaprofen ไม่มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการทำงานของเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อ ความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการศึกษาไม่เหมาะสม อาจมากหรือน้อยไป ระยะเวลาที่ใช้ในการกระตุ้นไม่เพียงพอ นอกจากนั้นในการศึกษาครั้งนี้ยังไม่ได้ทำการเหนี่ยวนำให้เซลล์กระดูกอ่อนมีพฤติกรรมเช่นเดียวกับเซลล์กระดูกอ่อนที่อยู่ในภาวะโรคข้อเสื่อม ซึ่งโดยทั่วไปแล้วจะใช้สาร interleukin-1 (IL-1) เป็นสารที่ทำหน้าที่ในการกระตุ้นให้เซลล์กระดูกอ่อนที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการมีการสร้างสารต่างๆ ใกล้เคียงกับเซลล์กระดูกอ่อนที่เกิดกระบวนการเสื่อมโดยธรรมชาติ[11,12,13] โดยเฉพาะเอ็นไซม์ในกลุ่ม matrix metalloproteinase

ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมคือ การกระตุ้นให้เซลล์กระดูกอ่อนมีพฤติกรรมเหมือนกับเซลล์กระดูกอ่อนในภาวะข้อเสื่อมแล้วจึงทำการทดสอบผลของยา นอกจากนั้นการทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ รวมถึงระยะเวลาในการสัมผัสสาร ก็มีความจำเป็นที่ต้องมีการศึกษาเพิ่มมากขึ้น เพื่อให้แน่ใจว่ายา vedaprofen มีหรือไม่มีคุณสมบัติในการปกป้องเซลล์กระดูกอ่อน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณแหล่งทุนสนับสนุนงานวิจัย ได้แก่ ทุนสนับสนุนโครงการวิจัยจากเงินทุนบริจาคเพื่อการวิจัยโดยภาคเอกชน คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และทุนโครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ ศูนย์วิจัยวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการวิจัยโรคกระดูกและข้อ คณะสัตวแพทยศาสตร์ และหน่วยวิจัยที่มีความเป็นเลิศด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่สนับสนุนวัสดุอุปกรณ์ต่างๆ ตลอดจนบุคลากรในหน่วยงานจนทำให้งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลงได้

เอกสารอ้างอิง

1. ศิรินทร หยิบโชคอนันต์. Vedaprofen: new selective COX-2 inhibitor NSAIDs. วารสารสัตวแพทย์ผู้ประกอบการบำบัดโรคสัตว์ฯ. 2549; 18(2): 19-21.
2. Nganvongpanit K, Chaochird P, Siengdee P, Pothacharoen P, Klunklin K, Chomdej S, et al. In vitro suppression of the MMP-3 gene in normal and cytokine-treated human chondrosarcoma using small

interfering RNA. J Orthop Surg Res. 2009; 4(1): 45.

3. Nganvongpanit K, Pothacharoen P, Chaochird P, Klunklin K, Warrit K, Settakorn J, et al. Prospective evaluation of serum biomarker levels and cartilage repair by autologous chondrocyte transplantation and subchondral drilling in a canine model. Arthritis Res Ther. 2009; 11(3): R78.
4. Nganvongpanit K, Pothacharoen P, Suwankong N, Ong-Chai S, Kongtawelert P. The Effect of doxycycline on canine hip osteoarthritis: design of a 6-months clinical trial. J Vet Sci. 2009; 10(3): 239-47.
5. Nganvongpanit K, Muller H, Rings F, Gilles M, Jennen D, Holker M, et al. Targeted suppression of E-cadherin gene expression in bovine preimplantation embryo by RNA interference technology using double-stranded RNA. Mol Reprod Dev. 2006a; 73: 153-63.
6. Nganvongpanit K, Müller H, Rings F, Hölker M, Jennen D, Tholen E, et al. Selective degradation of maternal and embryonic transcripts in in vitro produced bovine oocytes and embryos using sequence specific double-stranded RNA. Reprod Domest Anim.2006; 131: 861-74.
7. Nell T, Bergman J, Hoeijmakers M, Van Laar P, Horspool LJ.. Comparison of vedaprofen and meloxicam in dogs with musculoskeletal pain and inflammation. J Small Anim Pract. 2002; 43(5): 208-212.
8. Hazewinkel HA, van den Brom WE, Theyse LF, Pollmeier M, Hanson PD. Comparison of the effects of firocoxib, carprofen and vedaprofen in a sodium urate crystal induced synovitis model of arthritis in dogs. Res Vet Sci. 2008; 84(1): 74-9.
9. Lees P, May SA, Hoeijmakers, Coert A, Rens PV. Apharmacodynamic and pharmacokinetic study with vedaprofen in an equine model of acute nonimmune inflammation. J Vet Pharmacol Ther. 1999; 22: 96-106.
10. Clements DN, Carter SD, Innes JF, Ollier WER, Day PJR. Analysis of normal and osteoarthritic canine cartilage mRNA expression by quantitative polymerase chain reaction. Arthritis Res Ther . 2006; 8: R158.

11. Chan PS, Caron JP, Orth MW. Effect of glucosamine and chondroitin sulphate on regulation of gene expression of proteolytic enzymes and their inhibitors in interleukin-1-challenged bovine articular cartilage explants. AJVR 2005; 66(11): 1870-76.

12. Neil KM, Orth MW, Coussens PM, Chan PS, Caron JP. Effects of glucosamine and chondroitin sulphate on mediators of osteoarthritis in cultured equine chondrocytes stimulated by use of recombinant equine interleukin-1β. AJVR 2005; 66(11): 1861-9.

13. Siengdee P,Nganvongpanit K, Porthacharoen P, Chomdej S, Mekchay S, Ong-Chai S. Effect of bromelain on cellular characteristics and expression of selected genes in canine in vitro chondrocyte culture. Vet. Med. 2010;55 (11): 551-60.