ผลของฟลูโอซิโนโลน อะซีโทไนด์ต่อการสร้างคอลลาเจน และการเกิดตะกอนแคลเซียมในห้องปฏิบัติการในเซลล์โพรงฟันมนุษย์

นาย ภูมิศักดิ์ เลาวกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาเอ็นโดดอนต์ ภาควิชาทันตกรรมหัตถการ
คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-14-3275-5

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

THE EFFECTS OF FLUOCINOLONE ACETONIDE ON COLLAGEN SYNTHESIS AND *IN VITRO* CALCIFICATION IN HUMAN DENTAL PULP CELLS

Mr. Phumisak Louwakul

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 2005

ISBN 974-14-3275-5

431670

Thesis Title	The effects of fluocinolone acetonide on type I collagen synthesis and in vitro calcification in human dental pulp cells
By	Phumisak Louwakul
Field of study	Endodontology
Thesis Advisor	Assistant Professor Veera Lertchirakarn
Thesis Co-advisor	Associate Professor Prasit Pavasant

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

(Assistant Professor Veera Lertchirakarn)

..... Thesis Co-advisor

(Associate Professor Prasit Pavasant)

..... Member

(Assistant Professor Sirivimol Srisawasdi)

..... Member

(Chootima Ratisoonthorn)

ภูมิศักดิ์ เลาวกุล : ผลของฟลูโอซิโนโลน อะซีโทไนด์ต่อการสร้างคอลลาเจนและการเกิดตะกอนแคลเซียมในห้องปฏิบัติการในเซลล์โพรงฟันมนุษย์ (THE EFFECTS OF FLUOCINOLONE ACETONIDE IN COLLAGEN SYNTHESIS AND *IN VITRO* CALCIFICATION IN HUMAN DENTAL PULP CELLS) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ทพ.ดร. วีระ เสิศจิราการ, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ทพ.ดร. ประสิทธิ์ ภวสันต์, 71 หน้า. ISBN 974-14-3275-5.

การรักษาการเผยผึ่งของเนื้อเยื่อในโพรงฟัน มีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะคงสภาพความมีชีวิตและสุขภาพที่ดีของเนื้อเยื่อในโพรงฟันไว้ สารเคมีบางชนิด เช่น สารสเตียรอยด์ อาจสามารถช่วยการกระตุ้นการหายและการสร้างเนื้อเยื่อแข็งจากเนื้อเยื่อในโพรงฟันได้ การวิจัยนี้เป็นการศึกษาผลของฟลูโอซิโนโลน อะซีโทไนด์ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อในโพรงฟันมนุษย์ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของฟลูโอซิโนโลน อะซีโทไนด์ ในความเข้มข้นที่ต่างกัน (0.1 - 10 ไมโครโมล) ต่อการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ 1 และการเกิดตะกอนแคลเซียม ในเซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อในโพรงฟันมนุษย์ในห้องปฏิบัติการ การศึกษาปริมาณการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ 1 วัดด้วยวิธีเวสเทิร์น (Western blot analysis) ที่ระยะเวลา 5 วัน พบว่าฟลูโอซิโนโลน อะซีโทไนด์สามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ 1 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ประมาณ 2 เท่า โดยได้ทำการยืนยันผลการทดลองด้วยวิธี รีเวิร์ส ทรานสคริบชัน โพลิเมอเรสเชนรีเอคชัน (Reverse transcription polymerase chain reaction; RT-PCR) โดยศึกษาผลของฟลูโอซิโนโลน อะซีโทไนด์ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครโมล พบว่าสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ของคอลลาเจนชนิดที่ 1 ได้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ประมาณ 2.8 เท่า ส่วนผลการสร้างตะกอนแคลเซียมนั้น เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ระยะเวลานาน 28 วัน พบว่าไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุม โดยสรุปพบว่า ฟลูโอซิโนโลน อะซีโทไนด์ สามารถส่งเสริมการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ 1 และอาจจะสามารถนำมาพัฒนาเป็นวัสดุปิดโพรงฟันต่อไปในอนาคตได้

ภาควิชาทันตกรรมหัตถการ
สาขาวิชาวิทยาเอ็นโดดอนต์
ปีการศึกษา 2548

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4776118832 : MAJOR ENDODONTOLOGY

KEY WORD: DENTAL PULP / HEALING / COLLAGEN / CALCIFICATION / FLUOCINOLONE ACETONIDE

PHUMISAK LOUWAKUL : THE EFFECTS OF FLUOCINOLONE ACETONIDE IN COLLAGEN SYNTHESIS AND *IN VITRO* CALCIFICATION IN HUMAN DENTAL PULP CELLS. THESIS ADVISOR : ASSISTANT PROFESSOR VEERA LERTCHIRAKARN, THESIS COADVISOR : ASSOCIATE PROFESSOR PRASIT PAVASANT, 71 pp. ISBN 974-14-3275-5.

The purpose of treatment of pulpal exposure is to preserve vitality, healthy and promote healing of exposed pulp tissue. Fluocinolone acetonide (FA) is a potent topical glucocorticoid used in treatment of skin disorders and oral lesions. It may have a potential to promote tissue healing. The aim of this study was therefore to investigate the effects of FA (0.1 to 10 μM) on type I collagen synthesis and *in vitro* calcification in human dental pulp cells. The Western blot analysis was performed to examine the effect of FA on type I collagen synthesis at 5 days. The result showed that 1 and 10 μM of FA significantly stimulated the synthesis of collagen for about 2-fold ($p<0.05$). The result was confirmed by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) which indicated that 1 μM FA could significantly induce the expression of type I collagen mRNAs for about 2.8 times ($p<0.05$). Long term cultures were done to examine the *in vitro* calcification. After 28 days, the result showed no difference between FA-treated groups and the controls. These results demonstrated that FA enhanced type I collagen synthesis but not in calcification process. The results suggested that FA may be the potential substance as a pulp capping material.

Department of Operative Dentistry
Field of study Endodontology
Academic year 2005

Student's signature .....
Advisor's signature .....
Co-advisor's signature .....

Acknowledgements

I would like to express my sincere gratitude to Assistant Professor Doctor Veera Lertchirakarn, Department of Operative Dentistry, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, who is my research advisor for helpful guidance, spending many hours to correct this thesis, suggestion and kind support throughout the course of Master degree program.

I am particularly grateful to Associate Professor Doctor Prasit Pavasant, Department of Anatomy, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, who is my co-advisor for providing me the opportunity to work in his lab which made this research possible, for his grateful guidance, supervision, and correcting this thesis.

I would like to thank my thesis committee members: Associate Professor Kwanta Jaru-ampornpan, Assistant Professor Doctor Sirivimol Srisawasdi and Doctor Chootima Ratisoonthorn for their suggestions, helps and kindness in being committee members.

Tribute must be paid to all Instructors in 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 to express my appreciation to my family and a group of special friends for their endless love, caring, understanding, encouragement and support.

Table of Contents

Page

Abstract (Thai).....iv

Abstract (English).....v

Acknowledgements.....vi

Table of contents.....vii

Table index.....x

Figure index.....xii

List of abbreviations.....xiv

Chapter

I. Introduction.....1

1.1 Background and rationale.....1

1.2 Research question.....6

1.3 Research Objective.....6

1.4 Hypothesis.....6

1.5 Experimental design.....7

1.6 Key word.....7

1.7 Research design.....7

1.8 Limitation of research.....7

Page

1.9 Benefit.....8

1.10 Ethical consideration.....8

II. Literature review.....9

2.1 Vital pulp therapy and pulpal healing process.....9

2.2 Type I collagen and mineralization process.....13

2.3 Pulp capping material.....16

2.4 Topical corticosteroids.....19

2.5 Fluocinolone acetonide.....23

III. Material and methods.....26

Cell culture.....26

Fluocinolone acetonide preparation.....27

Colorimetric (MTT) assay for cell proliferation.....27

Type I collagen synthesis.....28

Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).....30

In vitro calcification.....31

IV. Result.....33

MTT assay.....33

Type I collagen synthesis.....34

In vitro calcification.....37

V. Discussion.....40

VI. Conclusion.....48

References.....49

Appendices.....64

Author's Biography.....71

Table Index

Page

Table 1: The effect of fluocinolone acetonide on human dental pulp cell proliferation examined by MTT assay at 24, 48 and 72 hours.....33

Table 2: The effect of fluocinolone acetonide on human dental pulp cell proliferation at 24, 48 and 72 hours measured by MTT assay.....65

Table 3: The effect of fluocinolone acetonide on relative amount of type I collagen synthesis by human dental pulp cells, examined by Western blot analysis.....66

Table 4: The data from Western blotting was analyzed by Shapiro-Wilk test in order to test of normality.....66

Table 5: The data from Western blotting was tested by Levene statistic to test of homogeneity of variances between groups.....67

Table 6: The data from Western blotting was analyzed by One-way ANOVA to compare means among different groups.....67

Table 7: The data from Western blotting was analyzed by Scheffe test to perform all pairwise comparisons between 2 different groups.....67

Table 8: The effect of fluocinolone acetonide on relative amount of type I collagen mRNA expression by human dental pulp cells, examined by RT-PCR.....68

Table 9: The data from RT-PCR was analyzed by Shapiro-Wilk test in order to test of normality.....69

Page

Table 10: The data from RT-PCR was analyzed by t test to perform pairwise comparison between 2 different groups.....69