

DEVELOPMENT AND OSTEOGENESIS OF SCAFFOLD PREPARED FROM THAI SILK
FIBROIN, GELATIN AND HYALURONIC ACID

Miss Tonporn Lamlerd



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเก่าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

for the Degree of Master of Science Program in Biomedical Engineering

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)

Faculty of Engineering
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

Chulalongkorn University

Academic Year 2014

Copyright of Chulalongkorn University

การพัฒนาและความสามารถในการสร้างกระดูกของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากไฟโบรอินไหม
ไทย เจลาติน และกรดไฮยาลูรอนิก

นางสาวต้นพร ล้ำเลิศ



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมชีวเวช

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2557

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การพัฒนาและความสามารถในการสร้างกระดูกของ
โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากไฟโบรอินไหมไทย เจลาติน
และกรดไฮยาลูรอนิก
โดย นางสาวต้นพร ล้ำเลิศ
สาขาวิชา วิศวกรรมชีวเวช
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายสัตวแพทย์กัมปนาท สุนทร
วิภาต

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร.บัณฑิต เอื้ออาภรณ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายสัตวแพทย์กัมปนาท สุนทรวิภาต)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ประวิทย์ กิตติดำรงสุข)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.ขวัญชนก พสุวัต)

ต้นพร ล้ำเลิศ : การพัฒนาและความสามารถในการสร้างกระดูกของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากไฟโบรอินใหม่ ไทย เจลาติน และกรดไฮยาลูรอนิก (DEVELOPMENT AND OSTEOGENESIS OF SCAFFOLD PREPARED FROM THAI SILK FIBROIN, GELATIN AND HYALURONIC ACID) อ.ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร.ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ดร. น.สพ.กัมปนาท สุนทร วิชาต, 139 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสามารถในการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกในสัตว์ทดลองของโครงเลี้ยง เซลล์สามมิติ 3 ชนิด ที่มีไฟโบรอินใหม่ไทยเป็นองค์ประกอบหลัก ได้แก่ โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เตรียมด้วยวิธี กำจัดเกลือออกและปรับปรุงพื้นผิวด้วยการคอนจูเกตกับเจลาติน (CGSF) โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เตรียมด้วย วิธีกำจัดเกลือออกและปรับปรุงพื้นผิวด้วยการคอนจูเกตกับเจลาตินและการสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (CGSF4) และ โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เตรียมด้วยวิธีกำจัดเกลือออกและปรับปรุงพื้นผิวด้วยการเคลือบกรดไฮยาลูรอนิก (HSF) โดยโครงสร้างพื้นฐานของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาติน (CGSF) และโครงเลี้ยงเซลล์ ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เคลือบด้วยกรดไฮยาลูรอนิก (HSF) มีพื้นผิวเรียบและมีรูพรุนเชื่อมต่อกัน ในขณะที่โครงสร้างพื้นฐาน ของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (CGSF4) นั้นมีพื้นผิวขรุขระ เนื่องจากการสะสมผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์บนโครงเลี้ยงเซลล์ จากการศึกษาความสามารถของโครงเลี้ยงเซลล์ในการ สร้างเนื้อเยื่อกระดูกในสัตว์ทดลอง โดยการฝังโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านและไม่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไข กระดูกของหนูแท่งที่กระดูกเรเดียสของหนูวิสต้าที่ถูกตัดออก (6 มิลลิเมตร) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งไม่มีการฝัง โครงเลี้ยงเซลล์ ด้วยการถ่ายภาพรังสี (X-ray) และการถ่ายภาพด้วยเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร (micro- CT) พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 12 สัปดาห์ มีการสร้างกระดูกใหม่บริเวณส่วนต้นของกระดูกเรเดียสในเกือบทุกกลุ่ม ยกเว้น ในกลุ่มที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ CGSF4 ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ (CGSF4 with cells) อนึ่ง โครงเลี้ยงเซลล์ CGSF4 สามารถชักนำให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ได้ดีที่สุด โดยพบค่าร้อยละของความหนาแน่นของเกลือแร่ในกระดูก (% BMD) ที่สูงที่สุดและมีค่าร้อยละของปริมาตรของกระดูกที่สร้างใหม่เทียบกับปริมาตรของเนื้อเยื่อที่สร้างใหม่ทั้งหมด (% Bone volume) ที่สูง นอกจากนี้ยังพบการสร้างกระดูกใหม่บริเวณตรงกลางของโครงเลี้ยงเซลล์ในกลุ่มที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ เท่านั้น ยกเว้นในกลุ่มที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ HSF ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ (HSF with cells) โดยสังเกตเห็นว่าการ เพาะเลี้ยงเซลล์ลงบนโครงเลี้ยงเซลล์ CGSF และโครงเลี้ยงเซลล์ CGSF4 สามารถส่งเสริมการสร้างกระดูกและเพิ่มความ หนาแน่นของเกลือแร่ในกระดูกใหม่ที่สร้างขึ้นได้ใกล้เคียงกับกระดูกปกติ จากการวิเคราะห์ทางจุลพยาธิในเชิงกึ่งปริมาณ พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ CGSF และโครงเลี้ยงเซลล์ HSF มีศักยภาพในการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกใหม่มากที่สุด ซึ่งพิจารณาได้ จากการเติมเต็มของเซลล์ Osteoblast การเกิดเนื้อเยื่อฟง്മืด การสร้างหลอดเลือดใหม่ และการเกิดสารแข็งคล้ายกระดูก โดยไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่ผ่านและไม่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกก่อนการฝัง ผล การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์ CGSF4 และโครงเลี้ยงเซลล์ CGSF มีศักยภาพสูงในการใช้เป็นกระดูกเทียม เพื่องานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก

สาขาวิชา วิศวกรรมชีวเวช

ปีการศึกษา 2557

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5470205621 : MAJOR BIOMEDICAL ENGINEERING

KEYWORDS: THAI SILK FIBROIN / GELATIN / HYDROXYAPATITE / SCAFFOLD / BONE REGENERATION

TONPORN LAMLERD: DEVELOPMENT AND OSTEOGENESIS OF SCAFFOLD PREPARED FROM THAI SILK FIBROIN, GELATIN AND HYALURONIC ACID. ADVISOR: ASSOC. PROF. SIRIPORN DAMRONGSAKKUL, Ph.D., CO-ADVISOR: ASST. PROF. DR.KUMPANART SOONTORNVIPART, D.V.M., 139 pp.

This research aims to study *in vivo* osteogenic potential of three groups of three-dimensional Thai silk fibroin-based scaffolds, including Thai silk fibroin scaffolds prepared via salt-leaching and modified by gelatin conjugation (CGSF), Thai silk fibroin scaffold/conjugated gelatin/deposited hydroxyapatite (CGSF4), and Thai silk fibroin scaffold/coated hyaluronic acid. The morphology of Thai silk fibroin scaffold conjugated with gelatin (CGSF) and Thai silk fibroin scaffold coated with hyaluronic acid (HSF) showed smooth surface and interconnected porous network. In contrast, the morphology of Thai silk fibroin scaffold conjugated with gelatin and deposited with hydroxyapatite (CGSF4) showed rough surface because of the deposited hydroxyapatite crystal on the scaffold. The osteogenic potential of scaffolds (with or without mesenchymal stem cell (MSC) seeding) in wistar rat models was evaluated by implanting the scaffold in the bone defect (6 mm) in the radius bone of rat, comparing to a control group (sham, no implanted scaffold). After 12 weeks, bone regeneration was analysed by X-ray and micro-CT. The images indicated that new bone was found from the proximal end of the bones in all groups with implanted scaffolds except CGSF4 scaffold with cell seeding (CGSF4 with cells). In addition, the highest % bone mineral density (% BMD) and high % bone volume, analysed from micro-CT results, was notified in the case of CGSF4 scaffold. Moreover, in all groups implanted with scaffolds, new bone in the middle of scaffolds was found, but not in the control group and HSF scaffold with cell seeding (HSF with cells). The results showed that pre-seeding of MSC on CGSF and CGSF4 scaffolds could support new bone formation in the middle of scaffolds and increase % BMD upto the value detected from normal bone. The result of histopathological semi-quantitative analysis showed that CGSF and HSF scaffolds effectively enhanced new bone formation as evaluated by osteoblast infiltration, fibrosis, neovascularization and callus formation. In addition, pre-cell seeding could not induce any remarked staining results in all groups. The *in vivo* study suggested that CGSF4 and CGSF scaffolds had a high potential to be employed as bone scaffold for bone tissue engineering.

Field of Study: Biomedical Engineering Student's Signature

Academic Year: 2014 Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยได้รับความช่วยเหลือจากหลายๆท่าน ซึ่งผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล อาจารย์ที่ปรึกษา และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายสัตวแพทย์กัมปนาท สุนทรวิภาต อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม เป็นอย่างสูงสำหรับการให้คำปรึกษาเกี่ยวกับงานวิจัย วางแผนการวิจัย การตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ และ แนวทางในการดำเนินงานวิจัย

ขอขอบพระคุณกรรมการ ซึ่งได้แก่ ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก ประธานกรรมการ, รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ประวิทย์ กิตติดำรงสุข และรองศาสตราจารย์ ดร.ขวัญชนก พสุวัต กรรมการ ที่ท่านได้สละเวลาอันมีค่ามาสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์สว่าง เกษแดงสกุลวุฒิ ภาควิชา พยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับความอนุเคราะห์ในการ วิเคราะห์ผลการทดลองทางจุลพยาธิวิทยา

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ไศรดา กนกพานนท์ และ ดร.จุฑามาศ รัตนวราภรณ์ สำหรับคำแนะนำและการให้ความช่วยเหลือในทุกด้านของการทดลอง

ขอขอบคุณ ศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ จังหวัดศรีสะเกษ ที่อนุเคราะห์รังไหมสำหรับใช้ในงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณ ศูนย์สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับการอนุเคราะห์สถานที่และอุปกรณ์ทำการทดลองในสัตว์ รวมถึงความช่วยเหลือในการทดลอง จากเจ้าหน้าที่ทุกท่าน

ขอขอบคุณ สัตวแพทย์หญิงศรารัตน์ คงวูธ สำหรับความช่วยเหลือในการผ่าตัด รักษา และติดตามผลการทดลองในสัตว์ด้วยวิธีการเอกซเรย์

ขอบคุณพี่ เพื่อน และน้อง ห้องปฏิบัติการวิศวกรรมวัสดุการแพทย์ที่ได้ให้กำลังใจ คำแนะนำ และให้ความช่วยเหลือจนงานวิจัยนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และสมาชิกในครอบครัวทุกท่าน ที่เป็นกำลังใจและให้การสนับสนุนผู้วิจัยในทุกด้านตลอดมาจนกระทั่งงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไป ได้ด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญรูป	1
สารบัญตาราง.....	4
บทที่ 1.....	7
บทนำ.....	7
1.1 ที่มาของงานวิจัย	7
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	10
1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....	10
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	11
บทที่ 2.....	12
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	12
2.1 วิศวกรรมเนื้อเยื่อ.....	12
2.2 โครงเลี้ยงเซลล์ (scaffold).....	14
2.3 กระดูก (bone)	16
2.4 เซลล์ต้นกำเนิดเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Mesenchymal stem cells).....	25
2.5 ชีววัสดุ.....	28
2.5.1 ไฟโบรอินไหมไทย (Thai silk fibroin).....	28
2.5.2 เจลาติน (gelatin)	33

2.5.3 กรดไฮยาลูรอนิก (Hyaluronic acid)	36
2.5.4 ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (Hydroxyapatite, HAp)	39
2.6 การเชื่อมขวาง	41
2.6.1 การเชื่อมขวางทางเคมี	41
2.6.1.1 การเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ (Glutaraldehyde, GA)	42
2.6.1.2 การเชื่อมขวางด้วย 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC)	44
2.6.2 การเชื่อมขวางด้วยความร้อน (dehydrothermal treatment, DHT)	44
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	45
2.7.1 ผลการตอบสนองของเซลล์ในระดับห้องปฏิบัติการต่อชีววัสดุชนิดต่างๆ	45
2.7.2 ผลการตอบสนองและการสร้างกระดูกในสัตว์ทดลองต่อชีววัสดุชนิดต่างๆ	53
บทที่ 3	66
วัสดุและวิธีการดำเนินวิจัย	66
3.1 วัสดุและสารเคมี	66
3.2 อุปกรณ์	67
3.3 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย	68
3.3.1 การเตรียมสารละลายไฟโบรอินไหมไทย	70
3.3.2 การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย	70
3.3.3 การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจุกต์ด้วยเจลาติน (CGSF)	70
3.3.4 การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจุกต์ด้วยเจลาตินและ สะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (CGSF4)	71
3.3.5 การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยา- ลูรอนิก (HSF)	71

3.3.6 การศึกษาโครงสร้างพื้นฐานและขนาดรูพรุนเฉลี่ยของโครงเลี้ยงเซลล์.....	72
3.3.7 การทดสอบความสามารถในการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกของโครงเลี้ยงเซลล์ในสัตว์ทดลอง	72
3.3.7.1 การเตรียมเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกของหนู (Rat bone marrow-derived mesenchymal stem cell, MSC).....	72
3.3.7.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์ลงบนโครงเลี้ยงเซลล์.....	73
3.3.7.3 การทดสอบการยึดเกาะของเซลล์ ด้วยวิธี DNA assay	73
3.3.8 การผ่าตัดฝังโครงเลี้ยงเซลล์ในหนูทดลอง	74
3.3.9 การทดสอบความสามารถในการเจริญเป็นเนื้อเยื่อกระดูกในสัตว์ทดลองด้วยการถ่ายภาพรังสี (X-ray).....	76
3.3.10 การทดสอบความสามารถในการเจริญเป็นเนื้อเยื่อกระดูกในสัตว์ทดลองด้วยเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร (micro-CT).....	76
3.3.11 การทดสอบความสามารถในการเจริญเป็นเนื้อเยื่อกระดูกในสัตว์ทดลองด้วยการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา	77
บทที่ 4.....	79
ผลการทดลอง และการวิเคราะห์ผลการทดลอง	79
4.1 โครงสร้างพื้นฐานของโครงเลี้ยงเซลล์	79
4.2 การทดสอบปริมาณเซลล์ที่ยึดเกาะบนโครงเลี้ยงเซลล์ก่อนทำการฝังในสัตว์ ทดลอง.....	83
4.3 ผลการทดสอบความสามารถในการเจริญเป็นเนื้อเยื่อกระดูกในสัตว์ทดลองด้วยการถ่ายภาพรังสี (X-ray)	84
4.4 ผลการทดสอบความสามารถในการเจริญเป็นเนื้อเยื่อกระดูกในสัตว์ทดลองด้วยเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร (micro-CT)	89
4.4.1 ความยาวของช่องว่างของกระดูก.....	91

4.4.2 ค่าร้อยละของความหนาแน่นของเกลือแร่ในกระดูก (% Bone mineral density, % BMD) และร้อยละของปริมาตรของกระดูกที่สร้างใหม่เทียบกับปริมาตรของเนื้อเยื่อที่สร้างใหม่ทั้งหมด (% Bone volume)	92
4.4.3 การเกิดเนื้อเยื่อกระดูกบริเวณกึ่งกลางโครงเลี้ยงเซลล์.....	97
4.5 ผลการทดสอบความสามารถในการเจริญเป็นเนื้อเยื่อกระดูกในสัตว์ทดลองด้วยการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา.....	101
บทที่ 5.....	111
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	111
5.1 สรุปผลการทดลอง.....	111
5.2 ข้อเสนอแนะ	116
รายการอ้างอิง.....	117
ภาคผนวก ก.....	131
ภาคผนวก ข.....	132
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	139



สารบัญรูป

รูปที่ 2.1	หลักการเบื้องต้นของวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกประกอบไปด้วย โครงเลี้ยงเซลล์ 3 มิติ เซลล์ และสารกระตุ้นการเจริญของเซลล์ จากนั้นจึงเพาะเลี้ยงเซลล์ในระดับห้องปฏิบัติการ และนำไปปลูกถ่ายในสิ่งมีชีวิตเพื่อซ่อมแซมกระดูก.....	14
รูปที่ 2.2	ลักษณะทางมหกายวิภาคของกระดูก.....	20
รูปที่ 2.3	ลักษณะทั่วไปของกระดูกพรุนและกระดูกที่บวม.....	20
รูปที่ 2.4	ความสามารถของเซลล์ MSC ในการเจริญเปลี่ยนสภาพเป็นเซลล์สายพันธุ์ต่างๆ ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน	26
รูปที่ 2.5	โครงสร้างของเส้นใยไหม.....	29
รูปที่ 2.6	โครงสร้างของเส้นใยไฟโบรอิน.....	31
รูปที่ 2.7	ตัวอย่างส่วนหนึ่งของสูตรโครงสร้างเจลาติน (Alanine-Glycine-Proline-Arginine-Glycine-Glutamic acid-Hydroxyproline-Glycine-Proline).....	33
รูปที่ 2.8	กระบวนการผลิตเจลาตินชนิด เอ และ บี.....	35
รูปที่ 2.9	หน่วยย่อยของกรดไฮยาลูรอนิค.....	37
รูปที่ 2.10	โครงสร้างผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทต์.....	40
รูปที่ 2.11	การเชื่อมขวางของโปรตีนด้วยกลูตาไรลดีไฮด์	43
รูปที่ 2.12	การเชื่อมขวางของพอลิแซคคาไรด์ (polysaccharide) ด้วยกลูตาไรลดีไฮด์.....	43
รูปที่ 2.13	การเชื่อมขวางของพอลิแซคคาไรด์ (polysaccharide) ด้วย EDC	44
รูปที่ 3.1	แผนการดำเนินงานวิจัยโดยรวม	69
รูปที่ 3.2	ระนาบการตัดกระดูกเรเดียสและกระดูกอัลนา เพื่อทำขึ้นเนื้อจากพาราฟินบล็อก (paraffin-embedded specimen) สำหรับการศึกษาด้านจุลพยาธิวิทยา.....	78
รูปที่ 4.1	ลักษณะโครงสร้างพื้นฐานของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย (SF) โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจุกต์ด้วยเจลาติน (CGSF) โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจุกต์ด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (CGSF4) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอิน	

- ไหมไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิก (HSF) (A) สเกลบาร์เท่ากับ 500 ไมโครเมตร (B) สเกลบาร์เท่ากับ 100 ไมโครเมตร 81
- รูปที่ 4.2** ลักษณะอนุภาคของผลึกเกลือ (NaCl) ขนาด 600-710 ไมโครเมตร ที่ใช้เป็นสารที่ทำให้เกิดรูพรุนในโครงเลี้ยงเซลล์ (A) สเกลบาร์เท่ากับ 500 ไมโครเมตร (B) สเกลบาร์เท่ากับ 100 ไมโครเมตร 82
- รูปที่ 4.3** ภาพสามมิติที่ได้จากการถ่ายภาพด้วยเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร (micro-CT) ภายหลังจากผ่าตัดฝังโครงเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจุกต์ด้วยเจลาติน (CGSF) โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจุกต์ด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (CGSF4) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิก (HSF) โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจุกต์ด้วยเจลาตินที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (CGSF with cells) โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจุกต์ด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (CGSF4) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิกที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (HSF with cells) เทียบกับกลุ่มควบคุม (sham) 90
- รูปที่ 4.4** ความยาวของช่องว่างของกระดูกเรเดียสของหนูทดลองภายหลังจากการผ่าตัดฝังโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 6 กลุ่ม เป็นเวลา 12 สัปดาห์ เทียบกับกลุ่มควบคุม (sham) วัดจากภาพสามมิติที่ผ่านการถ่ายภาพด้วยเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร 92
- รูปที่ 4.5** ตำแหน่งระนาบตัดขวางของภาพสามมิติจากเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตรและภาพตัดขวางที่ได้ของกระดูกที่สร้างใหม่ทางส่วนต้นของกระดูกเรเดียส (ในวงกลมสีแดง) และกระดูกเรเดียสปกติในส่วนที่ไม่ได้ตัดช่องว่างของกระดูก (ในวงกลมสีน้ำเงิน) ที่ใช้วิเคราะห์ค่าร้อยละของความหนาแน่นของเกลือแร่ในกระดูก (% Bone mineral density, % BMD) 94
- รูปที่ 4.6** ค่าเปอร์เซ็นต์ความหนาแน่นของเกลือแร่ในกระดูกที่สร้างใหม่เทียบกับกระดูกปกติ (% BMD) และร้อยละของปริมาตรของกระดูกที่สร้างใหม่เทียบกับปริมาตรของเนื้อเยื่อที่สร้างใหม่ทั้งหมด (% Bone volume) ทางส่วนต้นของกระดูกเรเดียสในหนูทดลอง ภายหลังจากการผ่าตัดฝังโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 6 กลุ่ม เป็นเวลา 12 สัปดาห์ เทียบกับกลุ่มควบคุม (sham) 97

- รูปที่ 4.7** ภาพตัวอย่างเนื้อเยื่อกระดูกที่ย้อมด้วยสี H&E ภายหลังจากการฝังโครงเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 12 สัปดาห์ แสดงการเกิดสารแข็งคล้ายกระดูก (Callus formation) โครงเลี้ยงเซลล์ที่เหลือนอยู่และปฏิกิริยาของเนื้อเยื่อต่อโครงเลี้ยงเซลล์ (tissue reaction) 107
- รูปที่ 4.8** ภาพตัวอย่างเนื้อเยื่อกระดูกภายหลังจากการฝังโครงเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 12 สัปดาห์ แสดงโครงเลี้ยงเซลล์ที่เหลือนอยู่และปฏิกิริยาของเนื้อเยื่อต่อโครงเลี้ยงเซลล์ (tissue reaction) โดยย้อมด้วยสี H&E (a และ b) และสี Masson's Trichrome (c และ d)..... 108
- รูปที่ ก.1** กราฟมาตรฐานของการวัดจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกของหนูโดยวิธี DNA (ช่วงความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้นที่ 355 นาโนเมตร และช่วงความยาวคลื่นของการแผ่รังสีที่ 460 นาโนเมตร)..... 131



สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1 สมบัติด้านความทนแรงดึงและค่ามอดูลัสของกระดูกชนิดต่างๆ	24
ตารางที่ 2.2 กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในเส้นใยไฟโบรอิน (residues/1000residues)	32
ตารางที่ 2.3 ตัวอย่างการเพิ่มหมู่ฟังก์ชันของกรดไฮยาลูรอนิกโดยใช้สารที่ทำปฏิกิริยาต่างๆ.....	39
ตารางที่ 2.4 รายงานผลการตอบสนองของเซลล์ในระดับห้องปฏิบัติการ (in vitro) ต่อชีววัสดุชนิดต่างๆ	46
ตารางที่ 2.5 รายงานผลการตอบสนองและการสร้างกระดูกในสัตว์ทดลอง (in vivo) ของชีววัสดุชนิดต่างๆ.....	54
ตารางที่ 4.1 ขนาดรูพรุนเฉลี่ยและอัตราส่วนระหว่างสารอินทรีย์ต่อสารอนินทรีย์ของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทย (SF) โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจุกต์ด้วยเจลาติน (CGSF) โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจุกต์ด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (CGSF4) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิก (HSF)	82
ตารางที่ 4.2 จำนวนเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกที่ยึดเกาะและร้อยละการยึดเกาะของเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจุกต์ด้วยเจลาติน (CGSF) โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจุกต์ด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (CGSF4) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิก (HSF) ภายหลังจากเพาะเลี้ยงแบบสั่นเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเซลล์ธรรมดาที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO ₂ (จำนวนเซลล์เริ่มต้นที่เพาะเลี้ยง 1×10 ⁶ เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์ หรือ 41,666 เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิเมตร)	84
ตารางที่ 4.3 ภาพถ่ายรังสีภายหลังการผ่าตัดฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจุกต์ด้วยเจลาติน (CGSF) โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจุกต์ด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (CGSF4) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิก (HSF) ในกระดูกเรเดียสของหนูทดลอง ที่เวลาต่างๆ เทียบกับกลุ่มควบคุม (sham) ซึ่งไม่มีการฝังโครงเลี้ยงเซลล์ในช่องว่างกระดูก.....	87

ตารางที่ 4.4 ภาพถ่ายรังสีภายหลังการผ่าตัดฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (CGSF with cells) โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (CGSF4 with cells) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิกที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (HSF with cells) ในกระดูกเรเดียสของหนูทดลอง ที่เวลาต่างๆ เทียบกับกลุ่มควบคุม (sham) ซึ่งไม่มีการฝังโครงเลี้ยงเซลล์ในช่องว่างกระดูก	88
ตารางที่ 4.5 ผลการวิเคราะห์การสร้างกระดูกใหม่บริเวณกึ่งกลางโครงเลี้ยงเซลล์ภายหลังการผ่าตัดฝังโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 6 กลุ่ม เทียบกับกลุ่มควบคุม (sham) เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ในวงกลมสีเหลืองคือกระดูกที่สร้างใหม่บริเวณกึ่งกลางโครงเลี้ยงเซลล์ และกระดูกที่อยู่ข้างเคียงคือ กระดูกอัลนา	100
ตารางที่ 4.6 ผลการวิเคราะห์ทางจุลพยาธิวิทยาของช่องกระดูกที่มีการฝังโครงเลี้ยงเซลล์ภายหลังการผ่าตัดฝังโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 6 กลุ่ม เทียบกับกลุ่มควบคุม (sham) เป็นเวลา 12 สัปดาห์.....	106
ตารางที่ 5.1 สรุปผลความสามารถในการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกในสัตว์ทดลองของโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 6 ชนิด เทียบกับกลุ่มควบคุม (sham).....	115
ตารางที่ ข.1 ภาพถ่ายรังสี (X-ray) ภายหลังการผ่าตัดในหมู่มควบคุม (sham) ซึ่งไม่มีการฝังโครงเลี้ยงเซลล์ในช่องว่างกระดูก	132
ตารางที่ ข.2 ภาพถ่ายรังสี (X-ray) ภายหลังการผ่าตัดฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ที่คอนจูเกตด้วยเจลาติน (CGSF) ในช่องว่างกระดูก	133
ตารางที่ ข.3 ภาพถ่ายรังสี (X-ray) ภายหลังการผ่าตัดฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (CGSF4) ในช่องว่างกระดูก	134
ตารางที่ ข.4 ภาพถ่ายรังสี (X-ray) ภายหลังการผ่าตัดฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิก (HSF) ในช่องว่างกระดูก	135
ตารางที่ ข.5 ภาพถ่ายรังสี (X-ray) ภายหลังการผ่าตัดฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ที่คอนจูเกตด้วยเจลาติน ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (CGSF with cells) ในช่องว่างกระดูก	136

- ตารางที่ ข.6 ภาพถ่ายรังสี (X-ray) ภายหลังจากผ่าตัดฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่
 คอนจุกต์ด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจาก
 ไชกระดูก (CGSF4 with cells) ในช่องว่างกระดูก 137
- ตารางที่ ข.7 ภาพถ่ายรังสี (X-ray) ภายหลังจากผ่าตัดฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่
 เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิกที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (HSF
 with cells) ในช่องว่างกระดูก 138



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาของงานวิจัย

ตั้งแต่อดีตถึงปัจจุบัน กระดูกหัก (bone fraction) เป็นภาวะที่พบได้บ่อยทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ ส่วนมากมักเกิดจากการบาดเจ็บในผู้สูงอายุที่มีภาวะกระดูกเสื่อมและเปราะ ทำให้เกิดการหักได้มากกว่าคนวัยหนุ่มสาว พบได้บ่อยบริเวณกระดูกต้นขาและสะโพก รักษาด้วยการใส่เฝือกหรือตามกระดูกส่วนที่หัก หากกระดูกหักเป็นชิ้นเล็ก ๆ จำนวนมาก หรือมีแผลเปิดจะเสี่ยงต่อการติดเชื้อรุนแรง อาจต้องรักษาโดยการตัดอวัยวะหรือกระดูกส่วนนั้นไป ทำให้เกิดช่องว่างระหว่างกระดูกซึ่งต้องทำการรักษาโดยการใส่กระดูกทดแทน การรักษาที่ดีที่สุดคือ การปลูกถ่ายกระดูกผู้ป่วยเองเนื่องจากไม่ก่อให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อต้านและไม่นำพาเชื้อโรคแต่จะต้องทำการผ่าตัดหลายครั้ง ทำให้เกิดความเจ็บปวดและเสี่ยงต่อการติดเชื้อเพิ่ม รองลงมาคือ การรักษาโดยการปลูกถ่ายกระดูกจากผู้อื่น ซึ่งหลีกเลี่ยงการผ่าตัดซ้ำซ้อนของผู้ป่วยได้แต่เสี่ยงต่อการติดเชื้อและมีการแพร่ของเชื้อโรคจากผู้บริจาคกระดูก อีกทั้งยังอาจก่อให้เกิดปฏิกิริยาตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ (immune response) [Langer and Vacanti, 1993, Goldberg, V.M. 1987, Doron, I. และ Amy, L. 2002] ดังนั้นจึงมีการศึกษาพัฒนาวัสดุเลียนแบบชีวภาพ (biomimetic materials) มาใช้เป็นกระดูกทดแทนเพื่อให้สามารถซ่อมแซมเนื้อเยื่อกระดูกได้ โดยใช้ความรู้ทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อซึ่งประกอบด้วย 3 องค์ประกอบคือ โครงเลี้ยงเซลล์ (scaffold) เซลล์ (cell) และสารโปรตีนกระตุ้นการเจริญเติบโต (growth factor) [Drosse, I. และคณะ 2008]

โครงเลี้ยงเซลล์เป็นโครงสร้างสามมิติที่สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มายึดเกาะได้ดี และกระตุ้นการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อกระดูกใหม่ในร่างกาย โครงเลี้ยงเซลล์มักจะถูกพัฒนามาจากวัสดุที่ได้จากธรรมชาติเพื่อให้โครงเลี้ยงเซลล์มีความสามารถในการเข้ากันได้กับเซลล์ของมนุษย์เป็นอย่างดีและไม่เป็นพิษต่อเซลล์ อาทิ คอลลาเจน แอลจีเนต เจลาติน กรดไฮยาลูรอนิก ไฟโบรอินใหม่ ไคโตซาน เป็นต้น หรือพัฒนาจากวัสดุสังเคราะห์เพื่อสะดวกต่อการใช้งานในปริมาณมากและสามารถควบคุมสมบัติต่าง ๆ ได้ตามต้องการ อาทิ ไฮดรอกซีอะพาไทต์ เบตา-ไตรแคลเซียมฟอสเฟต กรดพอลิไกลโคลิก กรดพอลิแลคติก เป็นต้น [Peter, X. M. และคณะ 2004, Karageorgiou, V. และ Kaplan, D. 2005, Hutmacher, D. W. 2000]

ไฟโบรอินไหมไทย เป็นโปรตีนที่ได้จากรังไหมของหนอนไหมเลี้ยงสายพันธุ์ *Bombyx mori* แต่รังไหมไทยจะมีสีเหลือง และมีกาวไหม หรือ เซรีซิน มากกว่าไหมชนิดอื่นๆ ไฟโบรอินเป็นโปรตีนที่ไม่ละลาย มีประมาณร้อยละ 75-80 ของน้ำหนักไหมดิบ ไฟโบรอินถูกนำมาใช้เป็นชีววัสดุในการทำโครงเลี้ยงเซลล์สำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อได้หลากหลายรูปแบบ ทั้งในรูปแบบแผ่นเจล เส้นใยนาโน และโครงสร้างพรุนคล้ายฟองน้ำ เนื่องจากมีสมบัติเชิงกลที่ดี มีความแข็งแรง และมีสมบัติทางชีวภาพที่เข้ากันกับเซลล์ในร่างกายได้เป็นอย่างดี มีอัตราการย่อยสลายที่ช้า [Srihanam, P. และคณะ 2009, Inoue, S. และคณะ 2000] ส่วนเจลาตินเป็นโปรตีนที่สกัดได้จากคอลลาเจนที่เป็นองค์ประกอบหลักของเนื้อเยื่อ ผิวหนัง กระดูกของมนุษย์และสัตว์ โดยทั่วไปเจลาตินจะถูกใช้งานทางด้านเภสัชกรรมและการแพทย์ เนื่องจากเจลาตินมีสมบัติในการย่อยสลายทางชีวภาพ และมีสมบัติการเข้ากันได้ดีกับร่างกาย เจลาตินจึงได้รับการยอมรับว่าเป็นสารที่ปลอดภัยเมื่อนำมาใช้เป็นส่วนประกอบของยาและอวัยวะเทียม [Tabata, Y. และ Ikada, Y. 1998]

วัสดุอีกชนิดหนึ่งคือ ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (Hydroxyapatite) ซึ่งเป็นสารอนินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบของกระดูกและเป็นผลึกที่เกิดจากการก่อตัวของแคลเซียมและฟอสฟอรัส มีสมบัติเข้ากันได้ดีกับเซลล์ของสิ่งมีชีวิต สามารถเพิ่มการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกของ Osteoblast ส่งเสริมการเคลื่อนย้ายของเซลล์กระดูกที่มีการเปลี่ยนแปลงแล้วนั้นไปยังบริเวณที่เกิดบาดแผล (osteoconduction) และเพิ่มการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกได้ [Chang, B. S. และคณะ 2000] จึงนิยมใช้ไฮดรอกซีอะพาไทต์เป็นวัสดุในการซ่อมเสริมกระดูกในรูปแบบของโครงเลี้ยงเซลล์ และนำมาเคลือบพื้นผิวของอวัยวะเทียมที่เป็นโลหะ เช่น ข้อต่อเทียม เพื่อปรับปรุงสมบัติทางชีวภาพให้มีความเข้ากันได้ดีกับร่างกายมากยิ่งขึ้น [Yoshikawa, H. และคณะ 2009, Cox, S. C. และคณะ 2015]

จากผลงานวิจัยของคณะผู้วิจัยที่ทำการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยด้วยเทคนิคการชะเกล็ดออกแล้วศึกษาผลกระทบจากการเชื่อมขวางเจลาตินที่มีต่อสมบัติทางกายภาพและทางชีวภาพ พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่มีการปรับปรุงพื้นผิวด้วยการเชื่อมขวางกับเจลาตินมีโครงสร้างที่แข็งแรง โดยดูจากค่ามอดูลัสของการกดซึ่งมีค่าสูงขึ้นร้อยละ 93 และสามารถส่งเสริมการยึดเกาะ การเจริญเติบโตของเซลล์ mouse osteoblast-like cells (MC3T3-E1) บนโครงเลี้ยงเซลล์ได้ดี [Chamchongkaset, J. และคณะ 2008] ต่อมาได้มีการพัฒนาโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่เชื่อมขวางด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์บนพื้นผิว แล้วนำโครงเลี้ยงเซลล์ทั้งหมดไปศึกษาการตอบสนองของเนื้อเยื่อและการย่อยสลายทางชีวภาพ ผล

การทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพในห้องปฏิบัติการโดยเอนไซม์คอลลาจีเนส พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินและเจลาตินที่ผ่านการเชื่อมขวางเกิดการย่อยสลายช้าที่สุด การทดสอบการย่อยสลายในสิ่งมีชีวิต โดยการฝังใต้ผิวหนังของหนู wistar rat เป็นเวลา 12 สัปดาห์ และผลการตอบสนองของเนื้อเยื่อตามมาตรฐาน ISO10993-6 พบว่าหลังจากการฝังเป็นเวลา 2 และ 4 สัปดาห์ โครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 4 ชนิดถูกประเมินอยู่ในกลุ่มวัสดุประเภท “ไม่ระคายเคือง” ถึง “ระคายเคืองเล็กน้อย” เมื่อเปรียบเทียบกับ Gelfoam[®] ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์เชิงพาณิชย์ที่เป็นกลุ่มควบคุม จึงสรุปได้ว่า โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากไฟโบรอินใหม่ไทยเป็นองค์ประกอบหลัก มีศักยภาพในการนำไปใช้เป็นวัสดุทางการแพทย์ได้ [Tungtasana, H. และคณะ 2010] นอกจากนี้โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยด้วยเจลาตินที่มีการสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่พื้นผิวยังผ่านการทดสอบความปลอดภัยโดยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) 4 ประเภท ได้แก่ การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันต่อระบบร่างกายของสัตว์ทดลอง (Systemic injection test) การทดสอบการระคายเคืองต่อผิวหนังแบบเฉียบพลัน (Acute dermal irritation test) การทดสอบการแพ้ของผิวหนัง (Skin sensitization test) และการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง (Cytotoxicity test) โดยผลการทดสอบระบุว่า โครงเลี้ยงเซลล์นี้ไม่เป็นพิษต่อเซลล์และสัตว์ทดลอง ไม่มีการระคายเคืองแบบเฉียบพลัน ไม่ก่อให้เกิดผื่นแดงและการบวมที่ผิวหนังของสัตว์ทดลอง (ศิริพร และคณะ, 2554)

นอกจากไฟโบรอินใหม่ไทย เจลาติน และไฮดรอกซีอะพาไทต์แล้ว กรดไฮยาลูรอนิคซึ่งเป็นไกลโคซามิโนไกลแคน (glycosaminoglycan) ที่พบได้มากในเนื้อเยื่อและ extracellular matrix ของระบบกล้ามเนื้อและกระดูก สามารถสกัดได้จากเนื้อเยื่อของสัตว์ เช่น หงอนไก่ ลูกตา สายสะดือ หรือผลิตจากกระบวนการหมักของจุลินทรีย์ มีสมบัติที่สามารถเข้ากันได้กับเซลล์ของสิ่งมีชีวิต (biocompatibility) [Zanchetta, P. และคณะ 2003, Lei, Y. และคณะ 2011] โดยมีรายงานการศึกษาสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอิน/กรดไฮยาลูรอนิค ซึ่งเตรียมโดยการเติมกรดไฮยาลูรอนิคในสารละลายไฟโบรอินและใช้ EDC เป็นสารเชื่อมขวาง พบว่ามีสมบัติทางกายภาพที่ดี และการเพิ่มปริมาณของกรดไฮยาลูรอนิคมีผลต่อการบวมตัวของโครงเลี้ยงเซลล์ อีกทั้งพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินและกรดไฮยาลูรอนิคเชื้อต่อการมีชีวิตรอด (survival) มีการเคลื่อนที่ (migration) และเกาะยึด (adhesion) ของเซลล์ต้นกำเนิดของประสาท (Neural stem cells) ของหนู Sprague Dawley บนพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์ [Ren, Y.J. และคณะ 2009] นอกจากนี้ยังมีรายงานผลของกรดไฮยาลูรอนิคที่มีต่อการกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ (Osteoinduction) ในสัตว์ทดลอง พบว่าในสัตว์ทดลองที่ไม่มีการปลูกถ่ายกรดไฮยาลูรอนิคลงไป บริเวณช่องว่างของ

กระดูก จะมีการสร้างกระดูกใหม่โดยการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ Osteoblast ภายใน 1 อาทิตย์ ในขณะที่สัตว์ทดลองที่ได้รับการปลูกถ่ายกระดูกไฮยาลูรอนิก มีการสร้างกระดูกใหม่ภายใน 4 วัน [Sasaki, T. และ Watanabe, C. 1995]

ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกในสัตว์ทดลองของโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติ 3 ชนิด คือ โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาติน โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและมีการสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์บนพื้นผิว ซึ่งคัดเลือกมาจากรายงานของ Tungtasana, H. และคณะ 2010 และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เคลือบด้วยกรดไฮยาลูรอนิกซึ่งเตรียมขึ้นในงานวิจัยนี้ เพื่อประเมินศักยภาพการใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกเบื้องต้น

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 พัฒนาโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิกและศึกษาโครงสร้างพื้นฐานของโครงเลี้ยงเซลล์ดังกล่าว
- 1.2.2 ศึกษาความสามารถในการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกในสัตว์ทดลองของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาติน โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและมีการสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์บนพื้นผิว และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิก ทั้งกรณีที่มีและไม่มีกรเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกหนู

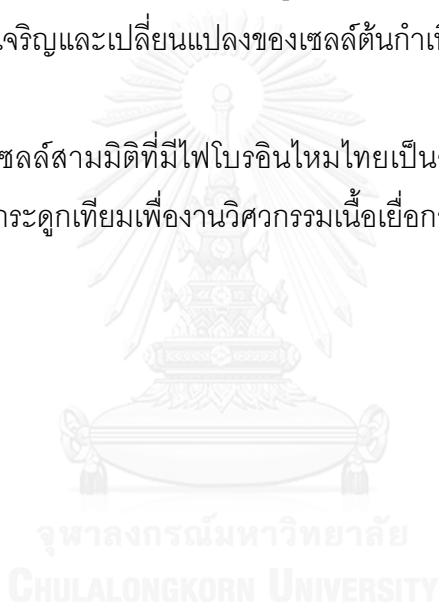
1.3 ขอบเขตงานวิจัย

- 1.3.1 เตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยด้วยวิธีการกำจัดเกลือออก (Salt-leaching)
- 1.3.2 เคลือบโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยด้วยสารละลายกรดไฮยาลูรอนิก
- 1.3.3 ผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาติน และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและมีการสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์บนพื้นผิวตามรายงานของ Tungtasana, H. และคณะ 2010
- 1.3.4 วิเคราะห์โครงสร้างพื้นฐานของโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 3 ชนิด

- 1.3.5 ทดสอบความสามารถในการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกในสัตว์ทดลอง (หนูวิสต้า) ของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจุกต์ด้วยเจลาติน โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจุกต์ด้วยเจลาตินและมีการสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์บนพื้นผิว และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เคลือบด้วยกรดไฮยาลูรอนิค โดยเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 3 ชนิดที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกของหนู

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่ถูกเคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิคที่สามารถเชื่อมต่อการเจริญและเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกไปเป็นเนื้อเยื่อกระดูกใหม่
- 1.4.2 โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่มีไฟโบรอินใหม่ไทยเป็นองค์ประกอบหลักที่มีศักยภาพในการใช้เป็นกระดูกเทียมเพื่องานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก



บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 วิศวกรรมเนื้อเยื่อ

วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue Engineering) เป็นศาสตร์สหสาขาแขนงหนึ่งที่อาศัยองค์ความรู้ทางด้านวิศวกรรมศาสตร์ วัสดุศาสตร์ ชีววิทยาของเซลล์ อณูชีววิทยา เคมี ฟิสิกส์ และ แพทย์ศาสตร์ เพื่อการทดแทน ซ่อมแซม ปรับปรุงการทำงาน และฟื้นฟูรักษาเนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่เกิดการเสียหาย ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่ไม่สามารถสร้างใหม่ทดแทนได้ในมนุษย์ เช่น กระดูก กระดูกอ่อน เส้นประสาท เป็นต้น [Langer, R. และ Vacanti, J.P. 1993, Cancedda, R. และคณะ 2003]

ปัญหาการบาดเจ็บและเกิดความเสียหายของกระดูกเกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุ เช่น โรคทางกระดูก การบาดเจ็บจากอุบัติเหตุหรือการผ่าตัด ความพิการแต่กำเนิด เป็นต้น โดยทั่วไปรักษาโดยการใส่เฝือกหรือการผ่าตัดใส่โลหะเพื่อตามกระดูกส่วนที่หัก แต่หากกระดูกหักเป็นชิ้นเล็ก ๆ จำนวนมาก หรือมีแผลเปิดจะเสี่ยงต่อการติดเชื้อรุนแรง อาจต้องรักษาโดยการตัดอวัยวะหรือกระดูกส่วนนั้นไป ทำให้เกิดช่องว่างระหว่างกระดูก ต้องทำการรักษาด้วยวิธีการปลูกถ่ายกระดูกทดแทน ซึ่งโดยทั่วไปมี 3 วิธีคือ [Goldberg, V.M. 1987, Doron, I. และ Amy, L. 2002]

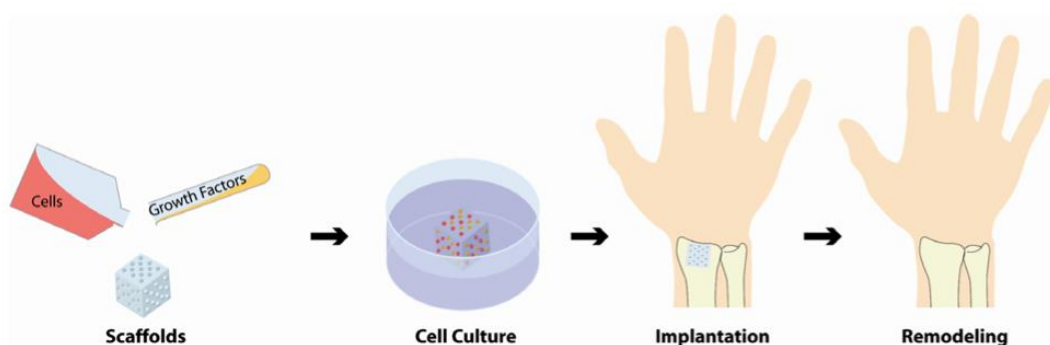
1. การปลูกถ่ายกระดูกจากตัวผู้ป่วยเอง (autograft) เป็นวิธีการรักษาแบบมาตรฐาน เนื่องจากไม่ก่อให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อต้านและไม่นำพาเชื้อโรค อีกทั้งมีประสิทธิภาพสูงกว่าการใช้วัสดุทดแทนชนิดอื่น เนื่องจากมีเนื้อเยื่อที่สามารถเจริญไปเป็นกระดูก (osteogenic) จึงสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างกระดูก (osteoinductive) และ ชักนำเนื้อเยื่อกระดูก (osteoconductive) แต่ต้องทำการผ่าตัดหลายครั้งเพื่อให้ได้จำนวนกระดูกจากผู้ป่วยที่มากพอ ทำให้เกิดความเจ็บปวด อีกทั้งการผ่าตัดที่มากครั้งยังเพิ่มความเสี่ยงในการติดเชื้อซึ่งก่อให้เกิดการอักเสบ และอาจกระทบอวัยวะข้างเคียง
2. การปลูกถ่ายกระดูกจากผู้อื่น (allograft) เป็นวิธีการรักษาโดยนำกระดูกที่ได้รับจากสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน แต่ไม่ใช่ของตัวผู้ป่วยเองมาผ่านกระบวนการเตรียมก่อนปลูกถ่ายในผู้ป่วย เนื่องจากไม่ได้ใช้กระดูกจากตัวผู้ป่วยเองจึงหลีกเลี่ยงอาการบาดเจ็บ

บริเวณที่ต้องตัดชิ้นกระดูกของผู้ป่วย สามารถรวบรวมจากผู้บริจาคหลายคน ทำให้มีกระดูกที่จะนำมาปลูกถ่ายมากเพียงพอ แต่มีข้อเสียคือ เสี่ยงต่อการติดเชื้อและมีการแพร่ของเชื้อโรคจากผู้บริจาคกระดูก เช่น เชื้อเอชไอวี (Human immunodeficiency virus, HIV) และเชื้อไวรัสตับอักเสบบ เป็นต้น กระดูกผู้บริจาคถูกนำมาผ่านกระบวนการเตรียมได้เป็นผลิตภัณฑ์หลายประเภท เช่น 1) กระดูกสำหรับปลูกถ่ายชนิดแช่เย็นจัด (fresh frozen allograft) มีสมบัติความแข็งแรงเชิงกลเหมือนกระดูกทั่วไปแต่สามารถก่อให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ (immunogenicity) 2) กระดูกสำหรับปลูกถ่ายชนิดทำให้แห้งด้วยความเย็น (freeze dry bone allograft, FDBA) มีสมบัติความแข็งแรงเชิงกลน้อยกว่ากระดูกทั่วไปถึงร้อยละ 50 สามารถก่อให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ แต่มีอัตราการเกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันน้อยกว่ากระดูกปลูกชนิดแช่เย็นจัด และ 3) กระดูกสำหรับปลูกถ่ายชนิดที่ผ่านการลดปริมาณแร่ธาตุและแคลเซียม (demineralized allograft) มีคุณสมบัติชักนำการเกิดเนื้อเยื่อกระดูกที่ดี แต่มีคุณสมบัติเหนียวนำไปเกิดการสร้างกระดูกไม่ดีจึงต้องอาศัยการกระตุ้นจากเซลล์และสารกระตุ้นการเจริญ (growth factor) เพื่อให้เกิดการสร้างกระดูกต่อไป

3. การปลูกถ่ายกระดูกจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น (xenograft) เป็นวิธีการรักษาโดยนำกระดูกที่ได้รับจากสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันมาผ่านกระบวนการเตรียมและปลูกถ่ายในผู้ป่วย เช่น การปลูกกระดูกวัวเพื่อทดแทนกระดูกคน เป็นต้น การปลูกกระดูกชนิดนี้ได้ผลที่ดี ราคาไม่แพง ไม่มีปัญหาในแง่ศีลธรรม แต่เสี่ยงต่อการเกิดโรคติดต่อจากสัตว์สู่คน (zoonosis) และการเกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกายที่ต่อต้านกระดูกที่ปลูกถ่าย

การรักษาด้วยวิธีการปลูกถ่ายกระดูกทุกวิธีนั้นยังต้องการการพัฒนาเพื่อให้ได้การรักษาที่ดียิ่งขึ้น โดยเฉพาะการพัฒนากระดูกทดแทนโดยใช้ความรู้ทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ซึ่งประกอบด้วยองค์ประกอบ 3 ส่วน คือ โครงเลี้ยงเซลล์ (scaffold) เซลล์ (cell) และสารกระตุ้นการเจริญเติบโต (growth factor) ดังรูปที่ 2.1 องค์ประกอบทั้ง 3 ส่วนล้วนเกี่ยวข้องและเสริมซึ่งกันและกัน โดยโครงเลี้ยงเซลล์สามารถเหนียวนำไปให้เซลล์มายึดเกาะ และกระตุ้นการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อกระดูกใหม่ในร่างกาย มักจะพัฒนาจากชีววัสดุที่ได้จากธรรมชาติเพื่อให้มีความสามารถในการเข้ากันได้กับเซลล์ของมนุษย์และไม่เป็นพิษต่อเซลล์ หรือพัฒนาจากวัสดุสังเคราะห์ซึ่งสามารถผลิตใน

ปริมาณที่มากและสามารถควบคุมสมบัติต่าง ๆ ได้ตามต้องการ จากนั้นเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ถูกคัดแยกออกมาจากผู้ป่วยในโครงเลี้ยงเซลล์ เซลล์นั้นจะขยายพันธุ์จนมีปริมาณมากพอในโครงเลี้ยงเซลล์ในระดับห้องปฏิบัติการและนำไปปลูกถ่ายในสิ่งมีชีวิต จากนั้นเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในโครงเลี้ยงเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเนื้อเยื่อกระดูกและซ่อมแซมกระดูกให้เป็นปกติ การปลูกถ่ายกระดูกด้วยวัสดุทดแทนมีข้อดีคือ ไม่มีการติดต่อของโรคจากคนสู่คนหรือจากสัตว์สู่คน แต่อาจก่อให้เกิดภาวะภูมิคุ้มกันต่อต้านได้หากวัสดุทดแทนนั้นได้มาจากสิ่งมีชีวิต



รูปที่ 2.1 หลักการเบื้องต้นของวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกประกอบไปด้วย โครงเลี้ยงเซลล์ 3 มิติ เซลล์ และสารกระตุ้นการเจริญของเซลล์ จากนั้นจึงเพาะเลี้ยงเซลล์ในระดับห้องปฏิบัติการ และนำไปปลูกถ่ายในสิ่งมีชีวิตเพื่อซ่อมแซมกระดูก

[Drosse, I. และคณะ 2008]

2.2 โครงเลี้ยงเซลล์ (scaffold)

โครงเลี้ยงเซลล์ หรือ Artificial Extracellular Matrices คือ โครงสร้างสามมิติที่สามารถให้เซลล์ยึดเกาะเจริญเติบโตและเปลี่ยนแปลงเป็นเนื้อเยื่อที่ต้องการ โดยทำการเพาะเซลล์เข้าไปในโครงเลี้ยงเซลล์ ซึ่งต้องมีการแพร่ผ่านเข้าออกโครงเลี้ยงเซลล์ของสารอาหารและสารชนิดอื่นๆ เช่น สารกระตุ้นการเจริญเติบโต เป็นต้น อีกทั้งยังต้องมีสิ่งกระตุ้นทางกายภาพ สิ่งกระตุ้นเชิงกล การควบคุมอุณหภูมิและความดัน และการขนส่งมวลสาร ปัจจัยเหล่านี้ต้องมีการควบคุมปริมาณให้เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเซลล์ และการเปลี่ยนไปเป็นเซลล์ที่ต้องการและเนื้อเยื่อต่อไป [Peter, X.M. และคณะ 2004 , Karageorgiou, V. และ Kaplan, D. 2005, Hutmacher, D.W. 2000]

โครงเลี้ยงเซลล์ที่นำมาใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก ต้องคำนึงถึงสมบัติทางกายภาพ สมบัติทางเคมี สมบัติเชิงกล และการย่อยสลายได้ทางชีวภาพ โดยหลักที่ต้องคำนึงถึงในการสร้างโครงเลี้ยงเซลล์โดยทั่วไป คือ

1. เป็นโครงสร้างสามมิติ เพื่อเป็นโครงสร้างค้ำจุนให้เซลล์สามารถเจริญเติบโต
2. มีโครงสร้างทางกายภาพที่มีความพรุนสูง โดยมีความพรุนมากกว่าร้อยละ 90 และรูพรุนต้องมีขนาดที่เหมาะสม (ขนาดประมาณ 100-200 ไมโครเมตร) และรูพรุนควรเชื่อมต่อกัน (Interconnected pore) เพื่อให้เซลล์และเนื้อเยื่อสามารถเจริญเติบโตได้ เสริมการสร้างเส้นเลือดใหม่ในเนื้อเยื่อ อีกทั้งสารอาหารและของเสียต่างๆสามารถส่งผ่านภายในโครงเลี้ยงเซลล์ได้อย่างสะดวก
3. มีสมบัติทางกลศาสตร์ซึ่งให้ความแข็งแรง คงทน ไม่เกิดการยุบตัวขณะใช้ในพื้นที่ปลูกถ่าย
4. มีสมบัติทางเคมีเชื่อมต่อการยึดเกาะของเซลล์ (attachment) การเจริญเติบโต (proliferation) และเปลี่ยนแปลงไปเป็นเนื้อเยื่อที่ต้องการได้ (differentiation)
5. ไม่เป็นพิษต่อเซลล์และมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatible) และสามารถย่อยสลายได้ (biodegradable) และถูกกำจัดออกจากร่างกายโดยผลผลิตที่เกิดขึ้นไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ อีกทั้งต้องมีอัตราการย่อยสลายที่เหมาะสมกับอัตราการเกิดของเนื้อเยื่อใหม่
6. สามารถผ่านการฆ่าเชื้อได้โดยไม่เกิดความเสียหายต่อโครงเลี้ยงเซลล์

จากสมบัติข้างต้นพบว่าวัสดุหลายกลุ่มที่สามารถนำมาผลิตเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ได้ วัสดุที่นิยมได้แก่ เซรามิคประเภทไฮดรอกซีอะพาไทต์ (hydroxyapatite) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของสารอนินทรีย์ในกระดูก วัสดุอีกชนิดหนึ่งคือ พอลิเมอร์ โดยพอลิเมอร์ธรรมชาติที่นิยมใช้ ได้แก่ คอลลาเจน เจลาติน กรดไฮยาลูรอนิก แอลจีเนต และไคโตซาน เป็นต้น และพอลิเมอร์สังเคราะห์ที่นิยมใช้ ได้แก่ พอลิไกลโคลิก (polyglycolic acid) พอลิแลคติก (polylactic acid) เป็นต้น

2.3 กระดูก (bone)

กระดูกเป็นส่วนหนึ่งของระบบโครงร่างของร่างกายที่สำคัญ (skeleton system) โดยในระบบจะประกอบด้วยกระดูก (bone) ตั้งแต่สองชิ้นขึ้นไปมาประกบกันกลายเป็นข้อต่อ (joint) โดยมีเอ็นยึดข้อต่อ (articular ligament) และเยื่อหุ้มข้อ (joint capsule) ยึดเอาไว้ ระบบนี้ทำหน้าที่เป็นโครงร่างเพื่อการเคลื่อนไหวของร่างกาย โดยกระดูกจะมีการเคลื่อนไหวตามกล้ามเนื้อรอบกระดูกนั้นที่มีการหดและคลายตัว อีกทั้งยังเป็นเกราะป้องกันอวัยวะภายในต่างๆ รวมทั้งระบบประสาทส่วนกลาง ไม่ให้ได้รับอันตรายจากภายนอก และเป็นแหล่งสะสมแร่ธาตุแคลเซียมของร่างกายด้วย [Jee, W.S. 1998, Hancox, N.M. 1972, Bronzino, J.D. และคณะ 2006]

ส่วนประกอบทางเคมีของกระดูก

กระดูกสดจะมีน้ำเป็นส่วนประกอบร้อยละ 50 และของแข็งร้อยละ 50 ในส่วนที่เป็นของแข็งนั้นร้อยละ 67 เป็นสารประกอบอนินทรีย์และอีกร้อยละ 33 เป็นสารประกอบอินทรีย์

1. สารอนินทรีย์ ประกอบด้วยสารประกอบแคลเซียมฟอสเฟต (calcium phosphate) แคลเซียมคาร์บอเนต (calcium carbonate) แคลเซียมฟลูออไรด์ (calcium fluoride) แมกนีเซียมฟอสเฟต (magnesium phosphate) และโซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) โดยแคลเซียมฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบหลักอยู่ในรูปไฮดรอกซีอะพาไทต์ ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) สารดังกล่าวนี้อยู่ในส่วนของกระดูกเปลือกนอก (cortical) และโครงกระดูกยึดต่อกายใน (trabecular) โดยมีหน้าที่สำคัญในการเป็นโครงสร้างของกระดูกเองและมีส่วนในระบบเมตาบอลิซึมด้วย โดยกระดูกที่เกิดขึ้นใหม่ชนิด woven bone ยังไม่มีแร่ธาตุสะสมมากเท่ากับ lamellar bone แต่มีอนุภาคของผลึกขนาดเล็กกว่าจึงอาจเกิดการสลายตัวได้มากกว่า
2. สารอินทรีย์ ประกอบด้วยเซลล์ หลอดเลือด และสารที่มีลักษณะคล้ายวุ้นประมาณร้อยละ 90 ของสารอินทรีย์ในกระดูกเป็นคอลลาเจนชนิดที่ 1 (collagen type I) ส่วนที่เหลือเป็นไกลโคโปรตีนที่ไม่มีคอลลาเจน (noncollagenous glycoprotein) ฟอสโฟโปรตีน (phosphoprotein) โปรตีโอไลปิด (proteolipid) มิวโคโพลีแซคคาไรด์ (mucopolysaccharide) และคอลลาเจนชนิดอื่นๆ รวมทั้ง

ไซโตไคน์ (cytokine) และสารกระตุ้นการเจริญ (growth factor) สารทั้งหมดนี้รวมเรียกว่า เนื้อเยื่อกระดูกอ่อน (osteoid) ซึ่งจะกลายเป็นกระดูกใหม่ในเวลาต่อมา สารอินทรีย์เป็นตัวกำหนดโครงสร้าง สมบัติทางชีวเคมี และสมบัติเชิงกลของกระดูก

อัตราส่วนของสารอินทรีย์และสารอินทรีย์ในกระดูกจะเป็นตัวกำหนดสมบัติเชิงกลของกระดูก โดยกระดูกของเด็กมีสารอินทรีย์น้อยแต่มีสารอินทรีย์มากกว่าผู้ใหญ่ ดังนั้นกระดูกจึงยืดหยุ่นได้มาก ไม่หักง่าย เมื่ออายุมากขึ้นสารอินทรีย์จะมากขึ้นตามลำดับ ดังนั้นกระดูกของผู้สูงอายุจึงหักง่ายและเชื่อมต่อยาก

การแบ่งชนิดของกระดูกตามลักษณะรูปร่าง

กระดูกแข็งสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ชนิดคือ

1. กระดูกแข็งยาว (long bone) เป็นกระดูกที่มีรูปร่างยาวทรงกระบอก (tubular) มีความยาวมากกว่าความกว้าง กระดูกในกลุ่มนี้ได้แก่ กระดูกแขนและกระดูกขา เป็นต้น
2. กระดูกแข็งสั้น (short bone) เป็นกระดูกที่มีความยาวและความกว้างพอๆกัน เช่น กระดูกข้อมือ (carpal bones) กระดูกข้อเท้า (tarsal bone)
3. กระดูกแบน (flat bone) เป็นกระดูกที่มีรูปร่างแบน ประกอบด้วยกระดูกแข็งเนื้อแน่น (compact bone) 2 ชั้น ประกอปกันโดยมีกระดูกแข็งที่มีลักษณะพรุน (spongy bone) แทรกอยู่ตรงกลาง เช่น กะโหลกศีรษะ กระดูกซี่โครง กระดูกสะบัก (scapula)
4. กระดูกที่มีรูปร่างอื่นๆ (irregular bone) กระดูกในกลุ่มนี้ได้แก่ กระดูกสะโพก (hip bone) กระดูกสันหลัง (vertebra) กระดูกขากรรไกรล่าง (mandible) เป็นต้น

ลักษณะทางจุลกายวิภาคของกระดูกแข็ง (microscopic structure of bone)

กระดูกแข็งประกอบด้วยสารประเภท intercellular substance ที่มีการสะสมแคลเซียม มีลักษณะเป็นแผ่น เรียงตัวซ้อนกันเป็นชั้นๆ เรียกว่า lamellae โดยระหว่าง lamellae จะมีเซลล์ของกระดูกแข็งชนิด osteocyte ที่บรรจุอยู่ในช่องว่างเรียกว่า lacunae เรียงตัวอยู่เป็นระยะ แต่ละ lacunae จะเชื่อมติดต่อกันโดยช่องทางเล็กๆ เรียกว่า canaliculi ซึ่งเกิดจาก cytoplasmic process ของ osteocyte เซลล์หนึ่งยื่นไปติดต่อกับเซลล์ข้างเคียง ทำให้สารอาหารและก๊าซออกซิเจน

สามารถเชื่อมผ่านจากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่งได้ โดยทั่วไปกระดูกสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทตามลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดังนี้

1. **Woven bone** เป็นกระดูกแรกเริ่มหรือกระดูกที่ยังเจริญไม่เต็มที่ โดยปกติพบในตัวอ่อนระยะเอมบริโอและทารกแรกเกิด พบในกระดูกเกิดใหม่ภายหลังกระดูกหัก (fracture callus) และในส่วน metaphysis ของกระดูกยาว (long bone) นอกจากนี้ยังพบได้บ่อยในบริเวณที่มีพยาธิสภาพของโรคเนื้องอกของกระดูก กระดูก Woven bone มีลักษณะเป็นเส้นใยหยาบ ประกอบด้วยเส้นใยคอลลาเจนที่มีการจัดเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ มีจำนวนเซลล์ต่อปริมาตรมากกว่ากระดูก lamellar bone ด้วยเหตุนี้จึงมีสมบัติเชิงกลเป็น isotropic property กล่าวคือ มีลักษณะทางกลศาสตร์คล้ายคลึงกันโดยไม่ขึ้นอยู่กับการทิศทางของแรงที่มากระทำ
2. **Lamellar bone** เริ่มเกิดขึ้นในทารกหลังคลอด 1 เดือน เมื่ออายุ 1 ปี จะเริ่มเกิดการปรับแต่งของกระดูก woven bone และกระดูก lamellar bone จะค่อยๆเจริญแทนที่ woven bone ในที่สุดเมื่ออายุ 4 ปีจะมีกระดูกส่วนใหญ่เป็น lamellar bone โดยกระดูก lamellar bone พบได้ในกระดูกที่เจริญเต็มที่ทั้งกระดูกพรุน (cancellous bone) และกระดูกทึบ (compact bone) กระดูก lamellar bone สามารถเจริญด้วยกระบวนการ intramembranous หรือ endochondral ossification กระดูกชนิดนี้ประกอบด้วยเส้นใยคอลลาเจนที่เรียงตัวเป็นระเบียบ สมบัติเชิงกลเป็น anisotropic property กล่าวคือ มีลักษณะทางกลศาสตร์แตกต่างกันขึ้นอยู่กับการทิศทางของแรงที่มากระทำ โดยมีความแข็งแรงสูงสุดในแนวแกนตามการเรียงตัวของเส้นใยคอลลาเจน

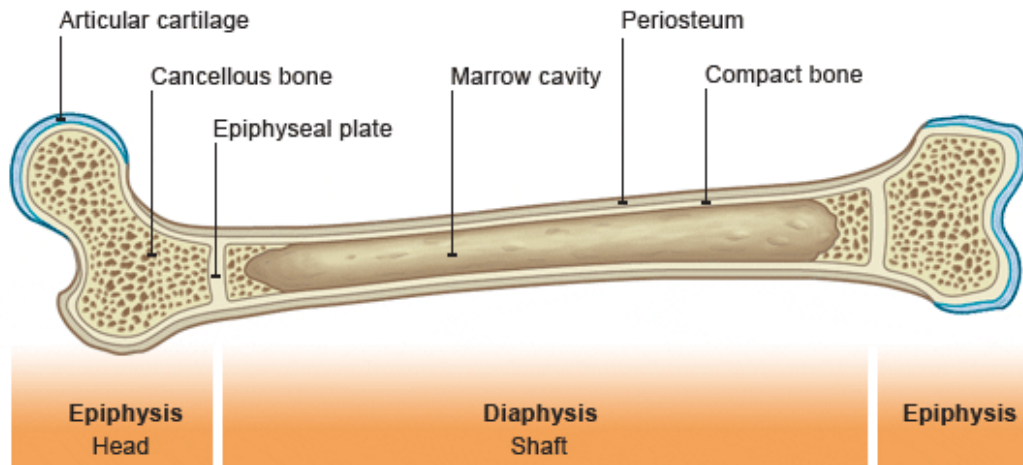
ลักษณะทางมหภาคของกระดูก (macroscopic structure of bone)

กระดูกที่เป็นแท่งยาวจะประกอบด้วย 2 ส่วนคือ shaft of diaphysis และ epiphysis ซึ่งอยู่ที่ปลายทั้ง 2 ข้าง ในส่วน diaphysis นั้นตรงกลางจะมีโพรงใหญ่เรียกว่า Medullary cavity ซึ่งบรรจุด้วยไขกระดูก (bone marrow) ดังรูปที่ 2.2 ส่วน epiphysis ประกอบด้วยกระดูกทึบ (compact bone) เป็นส่วนใหญ่แต่ภายในจะมีกระดูกพรุน (sponge bone) ด้วย โดยลักษณะทางกายวิภาคของกระดูกทึบและกระดูกพรุนจะแตกต่างกันอย่างชัดเจนดังรูปที่ 2.3 ผิวนอกของกระดูกจะถูกหุ้มต่อด้วยเยื่อหุ้มกระดูก เรียกว่า periosteum ซึ่งจะมีหลอดเลือดที่เข้ามาเลี้ยง

กระดูก หลอดน้ำเหลือง และเส้นประสาท นอกจากนี้ยังมีอีกหลอดเลือดหนึ่งที่สำคัญคือ หลอดเลือด Nutrient artery ซึ่งเข้าสู่ diaphysis ไปเลี้ยง medullary cavity

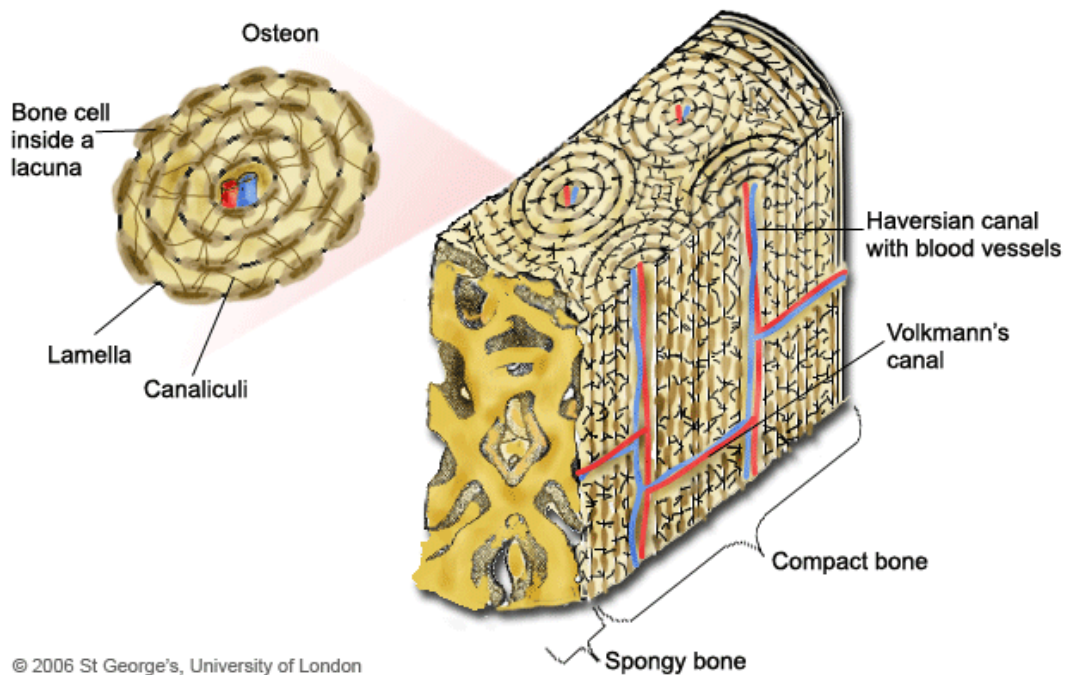
กระดูกทึบ (dense, compact หรือ cortical bone) เป็นกระดูกมีลักษณะแน่นแข็ง สีขาว คล้ายงาช้าง มีมวลกระดูกมากกว่ากระดูกพรุนถึง 4 เท่า ประกอบด้วย lamellae เรียงตัวเป็นวงกลมซ้อนกันหลายชั้นอย่างเป็นระเบียบคล้ายเส้นวงของต้นไม้ โดย 1 กลุ่มของวงกลมที่ซ้อนกันนั้นนับเป็น 1 หน่วยของโครงสร้างที่เรียกว่า osteon ส่วนกลางของ osteon เป็นท่อยาวเรียกว่า Haversian canal หรือ central canal ระหว่าง osteon มี interstitial lamellae แทรกเรียงตัวอยู่อย่างไม่เป็นระเบียบ เรียกระบบทั้งหมดนี้ว่า Haversian system ดังรูปที่ 2.3 Haversian system จึงเป็นโครงสร้างพื้นฐานของกระดูกแข็ง ทำหน้าที่เป็นทางผ่านของหลอดเลือด หลอดน้ำเหลือง และเส้นประสาทที่มาเลี้ยงเซลล์ของกระดูกแข็ง Haversian canal แต่ละอันเชื่อมติดต่อกันและติดต่อกับ osteon ผ่านทางท่อที่เรียกว่า Volkmann's canal ซึ่งอยู่ในแนวตั้งฉากกับแกนยาวของกระดูกแข็ง

กระดูกพรุน (trabecular, cancellous หรือ spongy bone) เป็นกระดูกที่มีลักษณะพรุน คล้ายฟองน้ำสามารถเห็นได้ด้วยตาเปล่า ประกอบด้วยกระดูกแข็งชิ้นเล็กๆ เรียกว่า trabeculae เรียงตัวสานกันไปมาเป็นร่างแห มีช่องว่างเล็กๆ ที่บรรจุไขกระดูก (bone marrow) เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะพบว่า กระดูกพรุนประกอบด้วย lamellae ที่เรียงตัวไม่เป็นระเบียบและมีจำนวนไม่มากนัก กระดูกพรุนมีการผลัดเปลี่ยนหมุนเวียน (turnover) สูงมากกว่า 8 เท่าของกระดูกทึบ เนื่องจากกระดูกพรุนมีพื้นที่ผิวสำหรับเซลล์มากกว่ากระดูกทึบ



รูปที่ 2.2 ลักษณะทางมหกายวิภาคของกระดูก

[http://www.bbc.co.uk/schools/gcsebiteize/pe/appliedanatomy/2_anatomy_skeleton_re_v4.shtml]



© 2006 St George's, University of London

รูปที่ 2.3 ลักษณะทั่วไปของกระดูกพรุนและกระดูกทึบ

[http://open.jorum.ac.uk/xmlui/bitstream/handle/123456789/2507/content/composition_of_bone.htm]

เซลล์ของกระดูกแข็ง

เซลล์ของกระดูกแข็งมีทั้งหมด 4 ชนิด [Baron, R. 2003, Lian, J.B., Stein, G.S. และ Aubin, J.E. 2003, Bilezikian, H.P., Raisz, L.G. และ Rodan, G.A. 2002] ดังนี้

1. Osteoprogeniator cell

เป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์กระดูกแข็ง เจริญมาจาก embryonic mesenchymal cells มีลักษณะคล้าย fibroblast มักพบบริเวณผิวของกระดูกแข็ง ใกล้กับเยื่อหุ้มกระดูก (periosteum) ของกระดูกแข็งบริเวณ endosteum อดอาศัยอยู่ใน Haversian และ Volkmann's canal เซลล์นี้มีความสามารถในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน และเมื่อเซลล์ชนิดนี้ถูกกระตุ้นจะเจริญเปลี่ยนสภาพเป็นเซลล์กระดูกแข็งชนิด osteoblast และสร้างเนื้อกระดูกแข็งหรือซ่อมแซมเนื้อกระดูกส่วนที่ถูกทำลายหรือแตกหักให้มาเชื่อมติดกันตรงบริเวณรอยหักเรียกว่า callus

2. Osteoblast

เป็นเซลล์ที่พบบริเวณผิวกระดูกใหม่ในเยื่อหุ้มกระดูก (periosteum) ในโพรงกระดูก (endosteum) และบริเวณผิวของกระดูกพรุน รวมทั้งในช่อง Haversian canal เซลล์มีขนาดใหญ่ มีลักษณะเป็นรูปทรงสี่เหลี่ยมคล้ายลูกบาศก์ (cuboid) เรียงตัวเป็นแถวชิดกัน ไซโตพลาสซึมติดสีน้ำเงิน (basophilic stains) เซลล์มีนิวเคลียสอยู่ตรงข้ามกับผิวของกระดูก ลักษณะทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบนิวเคลียสขนาดใหญ่ rough endoplasmic reticulum มีจำนวนมากเพื่อสังเคราะห์โปรตีนส่งออกนอกเซลล์ และ Golgi apparatus อยู่ใกล้กับนิวเคลียส นอกจากนี้ยังมี mitochondria และ cytoskeleton กระจายทั่วไปในไซโตพลาสซึม

เซลล์ Osteoblast ทำหน้าที่สร้าง intercellular substance ให้กับกระดูก ซึ่งต่อมาเกิดการตกผลึกและเชื้อแร่ธาตุต่างๆ โดยเฉพาะแคลเซียม (mineralization หรือ calcification) กลายเป็นเนื้อกระดูกแข็ง สร้างเส้นใยคอลลาเจนชนิดที่ 1 (type I collagen) รวมทั้งสังเคราะห์ osteocalcin และ bone sialoprotein ซึ่งเป็นโปรตีนในเนื้อพื้นกระดูก เซลล์ osteoblasts มีการสร้างเอนไซม์ alkaline phosphatase (ALP) ซึ่งตรวจพบได้โดยการศึกษาทางชีวเคมีและทาง histochemistry

3. Osteocyte

เป็นเซลล์ Osteoblast ที่ถูกล้อมรอบด้วย calcification intercellular substance จึงเป็นเซลล์กระดูกที่เจริญเติบโตเต็มที่ อีกทั้งยังมีจำนวนมากที่สุด เซลล์มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ แต่มีออร์แกเนลล์ (organelle) ในไซโตพลาสซึมน้อย แต่ละเซลล์อาศัยอยู่ใน lacuna โดยติดต่อกันด้วย canaliculi และ cytoplasmic processes ที่ยื่นเข้าไปใน canaliculi เพื่อเกิดการแลกเปลี่ยนสารอาหาร ของเสีย ติดต่อกับเซลล์หรือระหว่างเซลล์ที่อยู่ลึกเข้าไปในเนื้อกระดูกกับหลอดเลือดที่อยู่ภายใน central canal ด้วย gap junction

เซลล์ Osteocyte มีความสามารถสร้างและสลายเนื้อกระดูกได้ในขอบเขตจำกัด ทำหน้าที่บำรุงรักษาและซ่อมแซมเนื้อกระดูกบริเวณที่เซลล์นั้นอยู่และช่วยควบคุมปริมาณแคลเซียมในเลือดภายใต้อิทธิพลของ parathyroid hormone

4. Osteoclast

เป็นเซลล์ที่เจริญมาจากเซลล์ต้นกำเนิดของเม็ดเลือดในไขกระดูก (monocyte macrophage lineage precursors) เซลล์มีขนาดใหญ่มาก มีหลายนิวเคลียส (multinucleated giant cell) ลักษณะทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าภายในเซลล์มี rough endoplasmic reticulum จำนวนน้อยมากแต่มีไมโทคอนเดรีย (mitochondria) ปนอยู่กับ vesicles ผิวเรียบจำนวนมาก ลักษณะเด่นของเซลล์คือ มีเยื่อหุ้มเซลล์ด้านที่ชิดติดกับเนื้อกระดูกยื่นออกมาเรียกว่า ruffled (brush) border ซึ่งเกิดจากการม้วนพับของเยื่อหุ้มเซลล์เป็นหยัก ไซโตพลาสซึมบริเวณนี้มี vesicles ที่บรรจุเอนไซม์ย่อย acid phosphatase และมีผลึกแร่ธาตุจำนวนมาก

เซลล์ Osteoclasts พบอยู่ตรงบริเวณผิวของกระดูกที่กำลังมีการกักร่อนโดยอยู่ในแอ่งที่เรียกว่า Howship's lacuna อยู่ชิดติดกับผิวกระดูกโดยอาศัยโปรตีนจับยึดบนเยื่อหุ้มเซลล์ที่เรียกว่า integrins ซึ่งสามารถจับกับโปรตีนอื่นในเนื้อพื้นกระดูกด้วยลำดับกรดอะมิโนที่จำเพาะ คือ RGD (arginine-glycine-aspartate) แล้วกระตุ้นให้เซลล์ Osteoclast ทำหน้าที่กักร่อนสลายเนื้อกระดูก

เซลล์ Osteoclast สามารถกักร่อนสลายเนื้อกระดูกได้ เนื่องจากมี proton pump ATPase อยู่หนาแน่นบริเวณ ruffled border โดยได้รับโปรตอนจาก carbonic anhydrase system ซึ่งเปลี่ยนคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำเป็นไบคาร์บอเนต (bicarbonate) และไฮโดรเจน

ไฮดรอน (hydrogen ions) ดังนั้น pH บริเวณนั้นลดต่ำลง อีกทั้งยังมีการปลดปล่อยเอนไซม์ acid-hydrolase จากถุง vesicles เพื่อละลายผลึก apatite crystals และยังมีการสังเคราะห์เอนไซม์ tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) จึงเกิดการสลายแร่ธาตุรวมและสารอินทรีย์ที่อยู่ในเนื้อฟันกระดูก ทำให้เนื้อกระดูกบางลง มีการปล่อยแคลเซียมออกสู่กระแสเลือดมากขึ้น

การเกิดและเจริญของกระดูกแข็ง

การเกิดและเจริญของกระดูกแข็งมี 2 วิธี [Yang, Y. 2009] คือ

1. Intramembranous (Periosteal) ossification

การเกิดกระดูกโดยวิธีนี้จะเริ่มจากเซลล์ของตัวอ่อนเรียกว่า Mesenchymal cell มาเรียงตัวอัดกันแน่นเป็นแผ่น (membrane) ต่อมา Mesenchymal cell มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็น Osteoblast ทำหน้าที่สร้าง bone matrix ออกมาและเกิดการตกผลึกและแข็งแร่ธาตุต่าง ๆ โดยเฉพาะแคลเซียม (calcification) ได้เนื้อกระดูกแข็ง จากนั้น Osteoblast ถูกกักอยู่ใน lacunae กลายเป็น Osteocyte

การเกิดกระดูกแข็งวิธีนี้ สามารถเกิดพร้อมกันได้หลายตำแหน่ง ทำให้ได้กระดูกแข็งชิ้นเล็กๆ (trabaculae) เรียงตัวสานกันกลายเป็นกระดูกพรุน (spong bone) ต่อมาผิวด้านนอกของกระดูกพรุนทั้งสองข้างมีการจัดเรียงตัวของ lamellae ใหม่ กลายเป็นกระดูกทึบ (compact bone) ทำให้ได้กระดูกที่มีลักษณะเป็นกระดูกพรุนที่หนาบข้างด้วยกระดูกทึบทั้ง 2 ด้าน โดยการเกิดกระดูกโดยวิธีนี้พบในกระดูกที่มีลักษณะแบน (flat bone) และบริเวณผิวของกระดูกยาว (long bone)

2. Endochondral (Intracartilagenous) ossification

การเกิดกระดูกวิธีนี้เป็นการแทนที่แม่พิมพ์ซึ่งเป็นกระดูกอ่อน พบในกระดูกที่มีลักษณะยาว (long bone) โดยเริ่มจากการเจริญเพิ่มจำนวนและเพิ่มขนาดของเซลล์กระดูกอ่อน (chondrocyte) มีการแข็งแร่ธาตุในเนื้อกระดูกอ่อน และเกิดการตายของเซลล์กระดูกอ่อนแบบ apoptosis ทำให้เกิดช่องว่างภายในเนื้อกระดูกอ่อนที่เป็นแม่พิมพ์ ต่อมา มีการสร้างหลอดเลือดแทรกเข้าไปในช่องว่างเหล่านั้นทำให้เซลล์ต้นกำเนิดของไขกระดูกแข็ง (mesenchymal stem cells) เข้าไปบริเวณตรงกลางของกระดูกซึ่งเป็นตำแหน่งของการสร้างกระดูกปฐมภูมิ (primary

ossification center) และเกิดการสร้างเนื้อกระดูกแข็งขยายออกไปที่ปลายทั้ง 2 ข้างของแท่งกระดูก เรียกการสร้างกระดูกแบบนี้ว่า diaphyseal ossification ในขณะที่เดียวกันมีการสร้างกระดูกบริเวณปลายทั้งสองข้างของกระดูก ซึ่งเป็นตำแหน่งของการสร้างกระดูกทุติยภูมิ (secondary ossification center) โดยเกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงกระดูกเช่นเดียวกัน เรียกการสร้างกระดูกแบบนี้ว่า epiphyseal ossification ซึ่งสร้างกระดูกแผ่ขยายลงไปชิดกับ diaphyseal ossification โดยมีแผ่นของกระดูกอ่อนกั้นระหว่าง epiphyseal ossification และ diaphyseal ossification เรียกว่า epiphyseal plate แผ่นของกระดูกอ่อนนี้จะคงอยู่และเจริญเพิ่มความยาวให้กับกระดูกจนกว่าร่างกายจะหยุดเจริญเติบโต epiphyseal cartilage จึงจะหายไปกลายเป็นกระดูกแข็งทั้งหมด

สมบัติของกระดูก

สมบัติของกระดูกที่มีความสำคัญอย่างมากคือ มีความแข็งแรงแต่น้ำหนักเบา ทำให้เกิดความคล่องตัวในการเคลื่อนไหว กระดูกขนาด 1 ตารางนิ้วจะสามารถรับน้ำหนักได้ถึง 2 ตัน สมบัติด้านความทนแรงดึง (Tensile strength) ของกระดูกมีค่าใกล้เคียงสมบัติด้านความทนแรงดึงของโลหะ แต่ขณะเดียวกันน้ำหนักของกระดูกจะน้อยกว่าโลหะถึง 3 เท่าและมีความยืดหยุ่นมากกว่า 10 เท่า ดังแสดงตัวอย่างในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 สมบัติด้านความทนแรงดึงและค่ามอดูลัสของกระดูกชนิดต่างๆ

[Karageorgiou, V. และ Kaplan, D. 2005]

Type of bone	Direction and type of load	Ultimate strength (MPa)	Modulus of elasticity (GPa)	Reference
Cortical (midfemoral)	Longitudinal tension	133	17	[125]
	Longitudinal compression	193	17	[125]
	Longitudinal shear	68	3	[125]
	Transverse tension	51	11.5	[125]
	Transverse compression	33	11.5	[125]
Trabecular (proximal tibia)		5.3	0.445	[126]
Trabecular (proximal femoral)	Axial	6.8	0.441	[127]

2.4 เซลล์ต้นกำเนิดเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Mesenchymal stem cells)

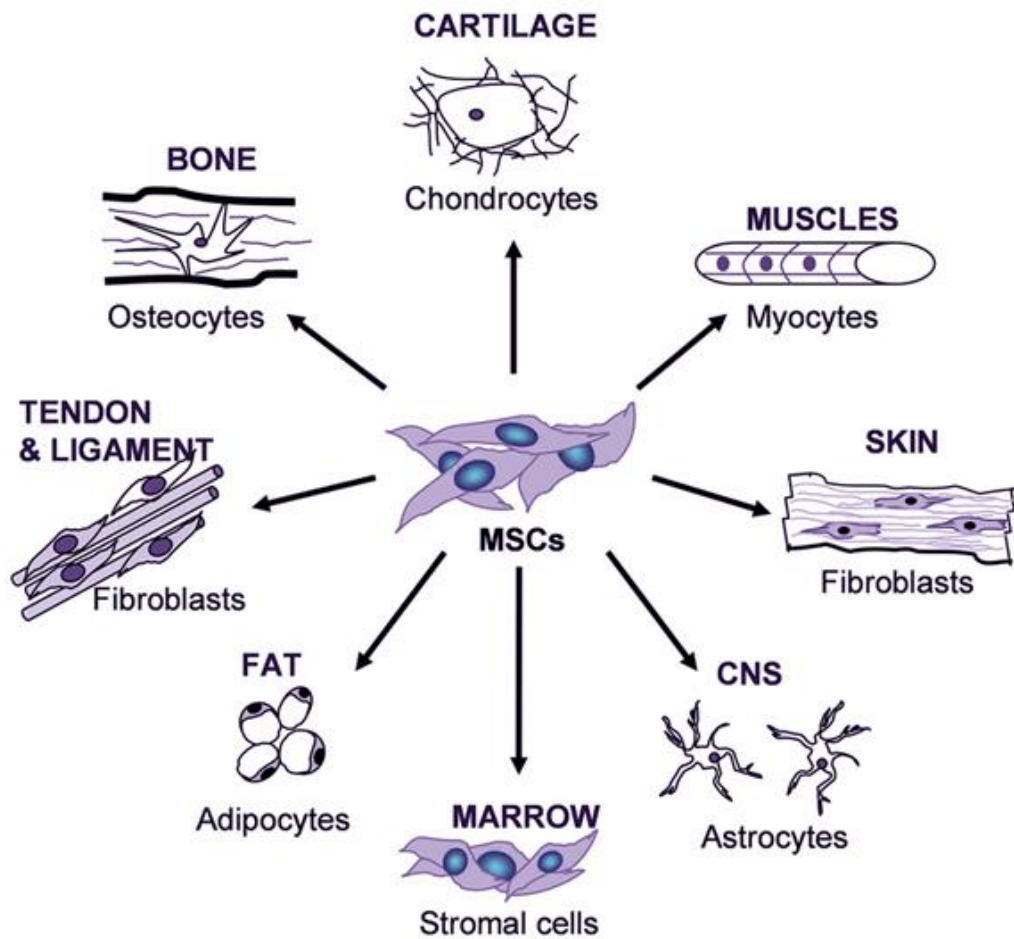
เซลล์ต้นกำเนิด (stem cells) เป็นเซลล์ที่พบได้ในมนุษย์และสัตว์ มีคุณสมบัติเฉพาะ คือ สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ขึ้นใหม่ได้เอง (self-renewal) และเป็นเซลล์ที่มีลักษณะไม่จำเพาะ (unspecialization) จึงสามารถเจริญเปลี่ยนแปลงสภาพ (differentiation) ไปเป็นเซลล์ตั้งต้นสายพันธุ์ (progenitor cells) แล้วเจริญเปลี่ยนแปลงสภาพต่อเป็นเซลล์เฉพาะทางชนิดใดชนิดหนึ่งหรือหลายชนิดได้

เซลล์ต้นกำเนิดเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (mesenchymal stem cells, MSC) จัดอยู่ในเซลล์ต้นกำเนิดที่เติบโตแล้ว (adult stem cells) พบในร่างกายมนุษย์ มีความสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ได้มาก และเมื่อได้รับสิ่งกระตุ้นที่เหมาะสมจะเจริญเปลี่ยนแปลงสภาพเป็นเซลล์สายพันธุ์ต่างๆ ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เช่น กระดูก กระดูกอ่อน กล้ามเนื้อ เอ็นและไขมัน ดังแสดงในรูปที่ 2.4 เซลล์ MSC ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่ออย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะวิศวกรรมเนื้อเยื่อของกระดูกและกล้ามเนื้อ เช่น การสร้างเนื้อเยื่อกระดูก กระดูกอ่อน หมอนรองเข่า (meniscus) เอ็นเอ็น (tendon) และเอ็นยึดข้อ (ligament) เป็นต้น เนื่องจากสามารถแยกเซลล์ MSC จากแหล่งกำเนิดและเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนในหลอดทดลองได้ง่าย [Satija, N.K. และคณะ 2007]

คุณสมบัติของเซลล์ที่ใช้จำแนกเพื่อเป็นเซลล์ต้นกำเนิดเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน

International Society of Cell Therapy (ISCT) ได้กำหนดคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน [Baksh, D. และคณะ 2004] ดังนี้

1. สามารถเกาะติดกับจานอาหารเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงเซลล์มาตรฐานได้
2. มีการแสดงออกของ CD105, CD73 และ CD90 แต่ไม่มีการแสดงออกของ CD45, CD34, CD14 หรือ CD11b, CD79 หรือ CD19 และ HLA-DR
3. สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ osteoblasts, adipocytes และ chondrocytes ภายใต้การเพาะเลี้ยงในระดับห้องปฏิบัติการได้



รูปที่ 2.4 ความสามารถของเซลล์ MSC ในการเจริญเปลี่ยนสภาพเป็นเซลล์สายพันธุ์ต่างๆของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน

[<http://stem-cell-solutions.com.au/test/training/research/111-adult-mesenchymal-stem-cells>]

การแยกเซลล์ต้นกำเนิดเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและการเพาะเลี้ยง

การแยกเซลล์ต้นกำเนิดต้องพิจารณาจากแหล่งที่มาของเซลล์ โดยแหล่งของเซลล์ MSC ที่สำคัญคือ ไขกระดูก (bone marrow) เนื้อเยื่อไขมัน (adipose tissue) เยื่อหุ้มกระดูก (periosteum) เยื่อข้อ (synovial membrane) กล้ามเนื้อ ผิวหนัง กระดูก กระดูกอ่อน เลือดสายสะดือและรก โดยเมื่อเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ MSC ของมนุษย์ในไขกระดูก เลือดสายสะดือและเนื้อเยื่อไขมัน พบว่าเนื้อเยื่อไขมันมีเซลล์ MSC จำนวนมากที่สุด ขณะที่เลือดสายสะดือมีเซลล์

MSC จำนวนน้อยที่สุดแต่เพาะเลี้ยงได้นานที่สุดและสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้สูงที่สุด และ เซลล์ MSC จากไขกระดูกสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ต่ำที่สุด [Kern, S. และคณะ 2006, Sakagushi, Y. และคณะ 2005] อีกปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพและปริมาณของเซลล์ MSC คือ อายุ เนื่องจากเมื่อทำการแยกเซลล์ MSC จากคนที่มีอายุมาก เซลล์ MSC จะมีจำนวนลดลง อีกทั้งความสามารถในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและการเจริญเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ MSC ก็ลดต่ำลงด้วย

ไขกระดูกเป็นแหล่งที่มาของเซลล์ MSC ที่นิยมใช้ เพราะแยกเก็บเซลล์ได้ง่าย ถึงแม้พบ เซลล์ MSC ได้เพียงร้อยละ 0.001-0.01 โดยประมาณของเซลล์ที่มีนิวเคลียสทั้งหมด การแยก เซลล์ MSC นิยมทำโดยวิธีปั่นเหวี่ยงในสาร Ficoll หรือ Percoll ซึ่งแยกตามความหนาแน่นของ เซลล์ (density gradient centrifugation) จากนั้นนำเซลล์มาเพาะลงในจานเลี้ยงเซลล์ และทำการ ล้างเซลล์ที่ไม่ยึดเกาะกับจานเลี้ยงเซลล์ออกไป เซลล์ที่ยึดเกาะกับจานเลี้ยงเซลล์นั้นมีรูปร่างเรียวยาวคล้ายกระสวย (spindle) ซึ่งคล้ายกับเซลล์ fibroblast จากนั้นทำการตรวจสอบชนิดของเซลล์ อย่างละเอียดด้วยการตรวจตัวบ่งชี้ที่ผิวของเซลล์ โดยผิวของเซลล์ MSC จะมีตัวบ่งชี้ เช่น CD29 CD44 CD90 และ CD105 เป็นต้น ส่วนเซลล์เม็ดเลือดแดงจะมีตัวบ่งชี้ที่ต่างออกไปคือ CD34 และ CD45 เป็นต้น [Gomillion, C. T. และ Burg, K. J. 2006]

เซลล์ MSC สามารถเจริญเปลี่ยนแปลงสภาพเป็นเซลล์ osteoblasts และเกิดการสร้างกระดูก ใหม่ได้ จึงนิยมนำมาใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก โดยการเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีสาร dexamethasone, β -glycerophosphate, ascorbic acid และ 1,25-dihydroxy vitamin D3 เพื่อให้เซลล์ MSC มีการเจริญเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์กระดูก สามารถตรวจสอบการเจริญ เปลี่ยนสภาพไปโดยการวัดปริมาณเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphate, ALP) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ของเซลล์ preosteoblasts และตรวจสอบการจับแคลเซียมของเนื้อพื้้นนอกเซลล์ (calcification of extracellular matrix) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ของเซลล์ mature osteoblasts [Liao, S. และคณะ 2008, Seong, J. M. และคณะ 2010]

2.5 ชีววัสดุ

2.5.1 ไฟโบรอินไหมไทย (Thai silk fibroin)

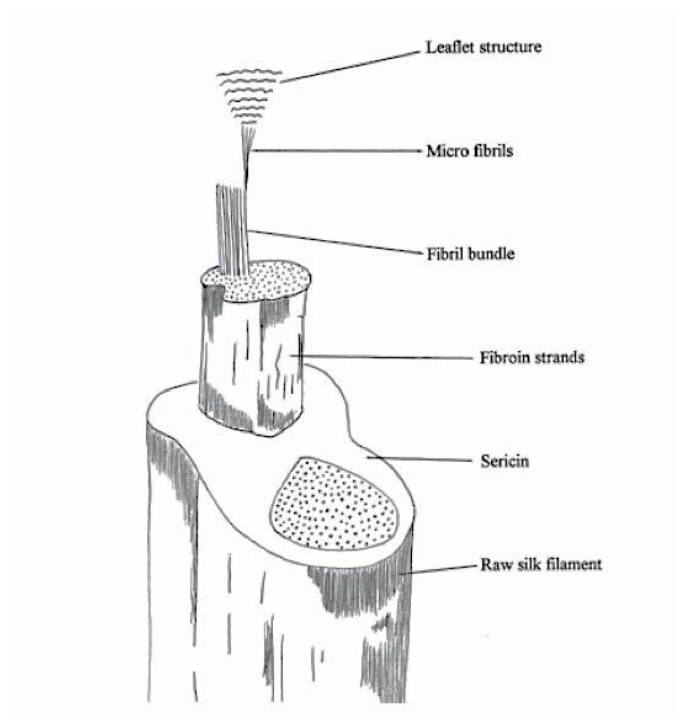
ไหมเป็นเส้นใยธรรมชาติที่ได้มาจากแมลง และหนอนของแมลง เช่น แมงมุม แมงป่อง หนอนผีเสื้อ เป็นต้น โดยเส้นไหมที่นิยมนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมเครื่องนุ่งห่มและทางการแพทย์ จะเป็นไหมที่ได้จากหนอนผีเสื้อที่เรียกว่า หนอนไหม หรือ ตัวไหม ซึ่งสร้างเส้นใยขึ้นมา ห่อหุ้มตัวเองอย่างหนาแน่นในระยะดักแด้เพื่อป้องกันการเป็นเหยื่อของนักล่า โดยทั่วไปสามารถ จำแนกหนอนไหมออกเป็น 2 ประเภทดังนี้ [Vepari, C. และคณะ 2007, Hardy, J.G. และ Scheibel, T.R. 2010]

1. ไหมป่า (Wild silk หรือ Non mulberry silk) เป็นหนอนไหมที่อยู่ตามธรรมชาติ มนุษย์ ไม่ได้เพาะเลี้ยงให้อาหาร ดักแด้ของหนอนไหมจะเจาะรังไหมออกมาเอง ทำให้รังไหมขาดจึงได้เส้นไหมที่สั้นกว่าไหมจากไหมเลี้ยง ไหมป่ามีหลายชนิด เช่น ไหมป่าทาร์ซา (*Antheraea paphia*) ไหมป่าอีรี (*Philosamia ricini*)
2. ไหมเลี้ยง (Domestic silk หรือ mulberry silk) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Bombyx mori* เป็นไหมที่มนุษย์เพาะเลี้ยงโดยการให้อาหารด้วยใบหม่อนสด จากนั้นต้มรังไหมเพื่อให้ดักแด้ตายในรังและสาวไหมออกมา เส้นไหมที่ได้จะเป็นเส้นยาว ไหมชนิดนี้จะมีสีค่อนข้างขาว มีความมันเงา โดยไหมไทยจัดอยู่ในไหมประเภทนี้ แต่ไหมไทยจะแตกต่างจากไหม *Bombyx mori* ชนิดอื่น ๆ คือ รังไหมมีสีเหลือง และมีกาวไหมมากกว่าไหมเลี้ยงชนิดอื่น ไหมเลี้ยงนิยมนำมาใช้ประโยชน์ในเชิงอุตสาหกรรมสิ่งทอและทางการแพทย์

องค์ประกอบของเส้นใยไหม

เส้นใยไหมเป็นเส้นใยโปรตีนที่มีโครงสร้าง 3 แบบคือ เบต้าชีท (β -sheet structure) แรนดอม คอยน์ (random coil) และ แบบเกลียว (α -helical structure) เส้นใยไหมมีส่วนประกอบหลัก 2 ส่วนคือ เส้นใยไฟโบรอิน ประมาณร้อยละ 75-83 โดยน้ำหนัก ทำหน้าที่เป็นแกนของเส้นใย และเซรีซินหรือกาวไหมมีประมาณร้อยละ 17-25 โดยน้ำหนัก ทำหน้าที่เป็นกาวห่อหุ้มเส้นใยไฟโบรอินไว้ นอกจากนี้ยังมีองค์ประกอบรองอื่น ๆ ได้แก่ ไขมันและน้ำมันอีกประมาณร้อยละ

ละ 1.5 โดยน้ำหนัก และสารธรรมชาติชนิดอื่น ๆ ร้อยละ 1-2 โดยน้ำหนัก [Robson, R. M. 1985, Srihanam, P. และคณะ 2009] ดังรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 โครงสร้างของเส้นไหม

[หนังสือ Sandoz colour chronicle, 1990]

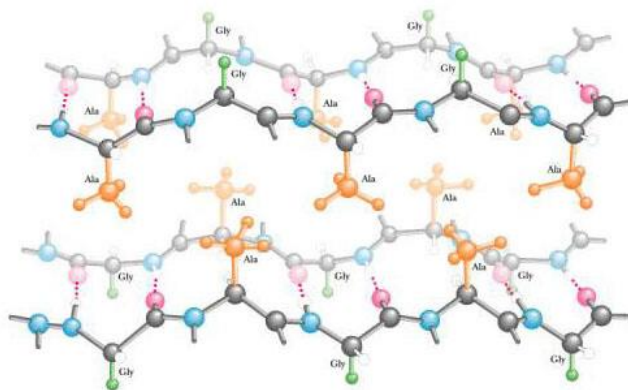
เซรีซิน (sericin)

เซรีซินหรือกาวไหมเป็นไกลโคโปรตีน ทำหน้าที่ยึดเส้นใยไฟโบรอิน 2 เส้นไว้ด้วยกัน เพื่อให้เส้นไหมมีความแข็งแรง เซรีซินมีลักษณะเป็นยางเหนียวประกอบด้วยกรดอะมิโนหลายชนิด ได้แก่ ทรีโอนิน (threonine) เซรีซิน (sericin) กรดกลูตามิก (glutamic acid) กรดแอสปาทิก (aspartic acid) กรดอาร์จินิน (arginine) และไลซีน (lysine) เซรีซินมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 10-300 กิโลดาลตัน ซึ่งสามารถถูกไฮโดรไลซิสให้เป็นโมเลกุลเล็ก ๆ ที่ละลายน้ำได้

ไฟโบรอิน (fibroin)

ไฟโบรอินมีลักษณะเป็นเส้นใยโปรตีนที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 10-25 ไมโครเมตร ไฟโบรอินประกอบด้วย 3 ส่วน ได้แก่ โปรตีนขนาดใหญ่ (heavy chain) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 350 กิโลดาลตัน โปรตีนขนาดเล็ก (light chain) ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 25 กิโลดาลตัน อีกทั้งยังมีไกลโคโปรตีนขนาดเล็ก ที่เรียกว่า P25 มีน้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณ 30 กิโลดาลตัน อยู่ร่วมกันโดยโปรตีนขนาดใหญ่ทำพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) กับโปรตีนขนาดเล็ก และไกลโคโปรตีน P25 นั้นได้จับกับอีก 2 ส่วนด้วยแรงประเภท non-covalent hydrophobic interaction อัตราส่วนของทั้ง 3 องค์ประกอบในโปรตีนไฟโบรอินได้แก่ โปรตีนขนาดใหญ่:โปรตีนขนาดเล็ก:P25 เท่ากับ 6:6:1 โดยโปรตีนขนาดใหญ่นั้นมีความไม่ชอบน้ำสูงทำให้ไฟโบรอินไม่ละลายน้ำ [Inoue, S. และคณะ 2000]

ไฟโบรอินประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 15 ชนิดดังแสดงในตารางที่ 2.2 โดยมีกรดอะมิโนหลัก 4 ชนิดคือ ไกลซีน (Glycine) อะลานีน (Alanine) เซรีน (Serine) และไทโรซีน (Tyrosine) ดังนั้นโครงสร้างปฐมภูมิของไฟโบรอินส่วนใหญ่จึงเป็นแบบ (Gly-Ala-Gly-X)_n โดย Gly คือ ไกลซีน Ala คือ อลานีน และ X คือ เซรีนหรือไทโรซีน โครงสร้างทุติยภูมิหลักของไฟโบรอินเป็นแผ่นพับหรือแบบเบต้าชีทเพลท (β -pleated sheet) หลายแผ่นต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจน และมีแรงแวนเดอร์วาลส์ระหว่างแผ่น ทำให้ไฟโบรอินมีความแข็งแรงสูง เหนียว สามารถยืดได้ ดังรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 โครงสร้างของเส้นใยไฟโบรอิน

[http://www.concord.org/~btinker/workbench_web/unitIV_revised/silk/silk_beta.html]

สมบัติของเส้นใยไหม

เส้นใยไหมสามารถคงสภาพ (stable) ที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส และสลายตัวเมื่อได้รับความร้อน (thermal decomposition) ที่อุณหภูมิสูงกว่า 150 องศาเซลเซียส ไหมที่มีเซรีซินจะมีความหนาแน่น 1320-1400 กรัมต่อลูกบาศก์เมตร และไหมที่ไม่มีเซรีซินจะมีความหนาแน่น 1300-1380 กรัมต่อลูกบาศก์เมตร เส้นใยไหมโดยธรรมชาตินั้นมีสมบัติในการต้านทานแรงดึงได้สูง มีความเหนียวและยืดหยุ่นสูง เส้นใยไหมสามารถคงรูปได้ในอุณหภูมิสูงถึง 250 องศาเซลเซียส [Lee, S.M. และคณะ 2005]

การนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์

ไฟโบรอินจากไหมถูกนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านชีววัสดุได้หลากหลาย โดยเฉพาะนำมาเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เพราะมีสมบัติเชิงกลที่ดี คือ มีความแข็งแรงและมีความยืดหยุ่นสูง อีกทั้งมีสมบัติทางชีวภาพที่ดีเพราะสามารถเข้ากันได้กับเซลล์ของมนุษย์ จึงสามารถใช้เป็นวัสดุทดแทนและปลูกถ่ายลงในร่างกายมนุษย์ได้โดยไม่ก่อให้เกิดการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ไฟโบรอินสามารถนำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ได้หลากหลายเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ที่แตกต่างกันทั้งในรูปแบบฟิล์ม โครงสามมิติที่มีรูพรุน เส้นใย ไฮโดรเจล และอนุภาคทรงกลมขนาดไมโคร [Meinel, L. และคณะ 2005]

ตารางที่ 2.2 กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในเส้นใยไฟโบรอิน (residues/1000residues)

[Robson,R.M. และคณะ 1985]

Amino acid	B.mori fibre
Glycine	446.0
Alanine	294.0
Valine	22.0
Leucine	5.3
Isoleucine	6.6
Serine	121.0
Threonine	9.1
Aspartic acid	13.0
Glutamic acid	10.2
Lysine	3.2
Arginine	4.7
Histidine	1.4
Tyrosine	51.7
Phenylalanine	6.3
Proline	3.6
Tryptophan	1.1
Methionine	1.0
(Cysteine) ²	2.0

ชนิดของเจลาติน

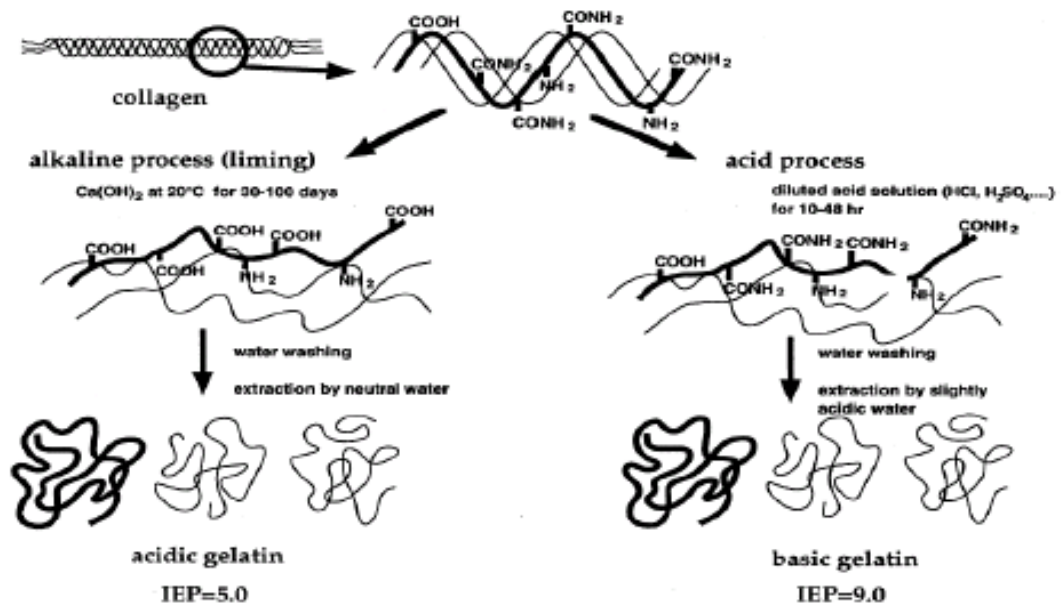
เจลาตินสามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ดังรูปที่ 2.8 ได้แก่

1. เจลาตินชนิด เอ (basic gelatin หรือ type A gelatin)

เจลาตินชนิดนี้ได้จากการไฮโดรไลซิสคอลลาเจนด้วยกรด เช่น กรดไฮโดรคลอริก (HCl) กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) เป็นต้น กระบวนการนี้จะได้เจลาตินที่มีหมู่อะมิโนอยู่เป็นจำนวนมากทำให้เจลาตินมีประจุเป็นบวก มีค่าความเป็นกรดต่างอยู่ที่ 3.8 - 5.5 และค่าไอโซอิเล็กตริก (Isoelectric point) ที่ 7.0 - 9.0 ซึ่งใกล้เคียงกับคอลลาเจน เจลาตินชนิดนี้เหมาะกับการใช้งานร่วมกับโปรตีนที่มีสมบัติเป็นกรด

2. เจลาตินชนิด บี (acidic gelatin หรือ type B gelatin)

เจลาตินชนิดนี้ได้จากการไฮโดรไลซิสคอลลาเจนด้วยด่าง เช่น แคลเซียมไฮดรอกไซด์ ($Ca(OH)_2$) เป็นการไฮโดรไลซิสกลุ่มเอไมด์ในคอลลาเจน ซึ่งจะได้เจลาตินที่มีกลุ่มคาร์บอกซิลจำนวนมากทำให้เจลาตินมีประจุลบ มีค่าความเป็นกรดต่างอยู่ที่ 5.0 - 7.5 และมีค่าไอโซอิเล็กตริก (Isoelectric point) ที่ 4.6 - 5.2 เจลาตินชนิดนี้เหมาะกับการใช้งานร่วมกับโปรตีนที่มีสมบัติเป็นเบส สมบัติของเจลาตินชนิด A และ B สรุปดังตารางที่ 2.3



รูปที่ 2.8 กระบวนการผลิตเจลาตินชนิด เอ และ บี

[Tabata, Y. และ Ikada, Y. 1998]

การนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์

เจลาตินถูกนำมาใช้ในการผลิตเครื่องสำอางอย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีความสามารถในการเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ของสิ่งมีชีวิต (biocompatibility) กล่าวคือ ไม่กระตุ้นให้เกิดกระบวนการในระบบภูมิคุ้มกัน อีกทั้งยังสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable) ทำให้เจลาตินถูกนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านเภสัชกรรมโดยใช้เป็นส่วนประกอบของยา และทางการแพทย์ อีกทั้งยังนำมาใช้ในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อด้วยเนื่องจากเจลาตินมีสมบัติในการช่วยสนับสนุนให้เซลล์สามารถยึดเกาะและเจริญเติบโตได้ดี โดยสามารถขึ้นรูปเจลาตินให้มีลักษณะหลากหลายตามความต้องการ

2.5.3 กรดไฮยาลูรอนิก (Hyaluronic acid)

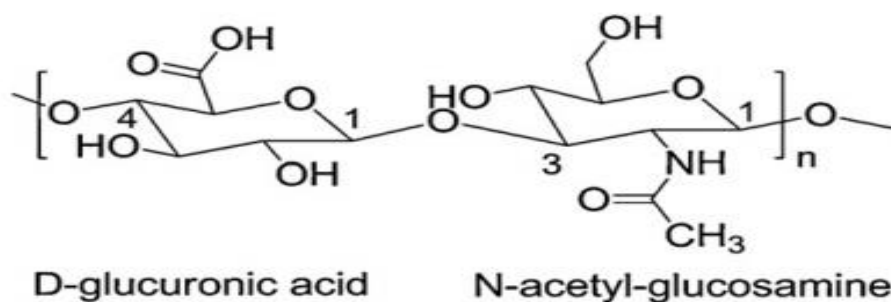
กรดไฮยาลูรอนิกเป็นสารประเภทไกลโคซามิโนไกลแคน (glycosaminoglycan) ตามธรรมชาติ ถูกค้นพบครั้งแรกโดย Meyer, K. และ Palmer, J. ในปีคริสต์ศักราช 1934 โดยชื่อกรดไฮยาลูรอนิกนั้นเป็นการผสมคำของคำว่า ไฮยาลอยด์ (hyaloids) ที่มีความหมายว่า ความคล้ายกับแก้ว (vitreous) และคำว่า กรดยูรอนิก (uronic acid) กรดไฮยาลูรอนิกนั้นยังสามารถเรียกได้อีกชื่อหนึ่งว่า ไฮยาลูรอน (hyaluronan) ตามการบัญญัติของ Balázs, E.A. และคณะในปีคริสต์ศักราช 1986

กรดไฮยาลูรอนิกสามารถพบได้ในร่างกาย โดยพบมากที่เนื้อเยื่อและ extracellular matrix ของระบบกล้ามเนื้อและกระดูก อีกทั้งยังพบกรดไฮยาลูรอนิกความเข้มข้นสูงในระหว่างการพัฒนาผิวหนังของตัวอ่อนมนุษย์ (fetal) มีรายงานว่ากรดไฮยาลูรอนิกเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่ชนิดแรกที่ปรากฏใน extracellular matrix ในกระบวนการสมานแผล (wound healing) [Alexander, S.A. และคณะ 1980, Fraser, J.R.E. และ Laurent, T.C. 1989, Schantéa, C. E. และคณะ 2011]

กรดไฮยาลูรอนิกถูกนำมาใช้ในเครื่องสำอางและการแพทย์ นิยมสกัดจากมาเนื้อเยื่อของสัตว์ เช่น หงอนไก่ ลูกตา สายสะดือ หรือผลิตจากกระบวนการหมักของจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรียสายพันธุ์ *Streptococcus spp.* เนื่องจากพบกรดไฮยาลูรอนิกในส่วนแคปซูลของแบคทีเรียเหล่านี้ กรดไฮยาลูรอนิกได้รับความสนใจในการนำมาเป็นชีววัสดุอย่างมากเนื่องจากเป็นสารที่พบได้ในธรรมชาติ สามารถสกัดได้ มีสมบัติที่สามารถเข้ากันได้กับเซลล์ของสิ่งมีชีวิต กล่าวคือ ไม่กระตุ้นให้เกิดกระบวนการในระบบภูมิคุ้มกัน สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ อีกทั้งยังเอื้อต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกและเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก อีกทั้งยังส่งเสริมการสร้างเนื้อเยื่อกระดูก (Osteoinduction) ได้ [Sasaki, T. และ Watanabe, C. 1995, Zanchetta, P. และคณะ 2003, Lei, Y. และคณะ 2011]

โครงสร้างของกรดไฮยาลูรอนิก

กรดไฮยาลูรอนิกเป็นพอลิเมอร์สายโซ่ตรงที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วงกว้าง ตั้งแต่ 1 ถึง 10,000 กิโลดาลตัน ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย คือ d-glucuronic acid และ N-acetyl glucosamine ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ $\beta(1,4)$ และ $\beta(1,3)$ glycosidic bonds ดังแสดงในรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.9 หน่วยย่อยของกรดไฮยาลูรอนิก

[Schanté, C.E. และคณะ 2011]

สมบัติของกรดไฮยาลูรอนิก

กรดไฮยาลูรอนิกมีประจุเป็นลบ (polyanionad) และมีค่า pKa ใกล้เคียง 2.9 [Soltés, L. และ Mendischi, R. 2003] สามารถละลายน้ำได้ แต่เมื่อละลายน้ำจะมีความหนืดสูง เนื่องจากมีน้ำหนักโมเลกุลสูงและพันธะภายในมีความแข็งแรง การเติมกรดหรือเบสลงไปจะช่วยเพิ่มการไฮโดรไลซิสสายพอลิเมอร์ของกรดไฮยาลูรอนิก ทำให้ความยาวของสายพอลิเมอร์ลดลงและละลายน้ำได้ดียิ่งขึ้น

การปรับปรุงกรดไฮยาลูรอนิก

กรดไฮยาลูรอนิกมักจะได้รับปรับปรุงเพื่อให้มีสมบัติที่ตรงกับความต้องการใช้งาน เช่น มีอัตราการย่อยสลายที่ช้าลง ละลายน้ำได้ลดลง เป็นต้น โดยนำไปทำปฏิกิริยากับสารเคมี เพื่อให้ได้กรดไฮยาลูรอนิกที่มีหมู่ฟังก์ชัน (functional group) เพิ่มขึ้นหรือลดลง ดังตารางที่ 2.3 เพื่อ

สามารถนำไปทำปฏิกิริยากับสารชนิดอื่นตามต้องการได้ วิธีการตัดแปรรัดไฮยาลูรอนิกเพื่อเพิ่มหมู่ฟังก์ชัน มีดังนี้

1. การสลายพันธะระหว่างสายพอลิเมอร์ของกรดไฮยาลูรอนิกด้วยการใช้ความร้อน แรงดัน รังสีอัลตราไวโอเล็ต และเอนไซม์ เป็นต้น เพื่อให้สายพอลิเมอร์ของกรดไฮยาลูรอนิกสั้นลง ได้กรดไฮยาลูรอนิกที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำประมาณ 1 – 500 กิโลดาลตัน
2. การปรับปรุงสารละลายกรดไฮยาลูรอนิกที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำใน aqueous solution และตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvents) เช่น ไดเมทิลซัลไฟไซด์ (dimethyl sulfoxide หรือ DMS) และเฮกซะฟลูออโรไอโซโพรพานอล (hexafluoroisopropanol) โดยการปรับปรุงจะมุ่งเน้นไปที่หมู่คาร์บอกซิลของกรดไฮยาลูรอนิก เนื่องจากเป็นตำแหน่งที่ เอนไซม์ไฮยาลูรอนิเดส (hyaluronidase) สามารถใช้จับกับกรดไฮยาลูรอนิกและเกิดการย่อยสลาย การเปลี่ยนจากหมู่คาร์บอกซิลให้กลายเป็นหมู่ฟังก์ชันชนิดอื่นจึงลดการจับของ เอนไซม์ไฮยาลูรอนิเดส ทำให้การย่อยสลายของกรดไฮยาลูรอนิกในร่างกายมนุษย์เกิดได้ ช้าลง เหมาะกับการนำไปเป็นวัสดุทางการแพทย์มากยิ่งขึ้น และการมีหมู่ฟังก์ชันชนิดอื่นที่ เพิ่มขึ้นทำให้สามารถนำกรดไฮยาลูรอนิกที่ถูกรับปรุงนี้ไปทำปฏิกิริยากับสารชนิดอื่นๆได้ ต่อไป

การตัดแปรรัดไฮยาลูรอนิกอีกวิธีหนึ่งที่น่าสนใจ คือ การเชื่อมขวาง โดยการเชื่อมขวางจะช่วยให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ละลายน้ำ หรือ ละลายน้ำได้น้อยลง สารเชื่อมขวางที่นิยมใช้ ได้แก่ ไดอิพอกซีบิวเทน (1,2,3,4-diepoxybutane) ในสารละลายต่าง, ไดไวนิลซัลโฟน (divinyl sulfone) ในสารละลายต่าง, ฟอรัลดีไฮด์ (formaldehyde), กลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde), ไดเมทิล-ออกอลูเรีย (dimethylolurea), ไดเมทิลอลออลิซีน ยูเรีย (dimethylolethylene urea), เอธิลีน-ออกไซด์ (ethylene oxide), พอลิอะซิไรดิน (polyaziridine), พอลิไอโซไซยาเนต (polyisocyanate) และคาร์โบไดอิมิดประเภทที่ละลายน้ำได้ (watersoluble carbodiimides)

ตารางที่ 2.3 ตัวอย่างการเพิ่มหมู่ฟังก์ชันของกรดไฮยาลูรอนิกโดยใช้สารที่ทำปฏิกิริยาต่างๆ [Oh, E.J. และคณะ 2010]

Reaction schemes for the preparation of various kinds of hyaluronic acid derivatives.

HA derivative	Reactant	Solvent	Reagent	Reaction time (h)	Reference
HA-ADH	Adipic acid dihydrazide	H ₂ O/ethanol	EDC ^a	2	[45,46]
HA-HMDA	Hexamethylene diamine	H ₂ O	EDC, sulfo-NHS ^b	24	[45,46]
HA-Cystamine	Cystamine	H ₂ O	EDC, HOBt ^c	12	[45,46]
HA-NHS	N-Hydroxy succinimide	H ₂ O	EDC, NHS	24	[47]
HA-ALD	Aldehyde	H ₂ O	Sodium periodate	2	[48]
HA-SH	Cystamine/DTT	H ₂ O	EDC, HOBt	12	[49]
HA-PDPH	3-(2-Pyridyldithio) propionyl hydrazide	H ₂ O	EDC, sulfo-NHS	24	[50]
HA-I	NaI	H ₂ O	Bromoacetic anhydride	24	[51]
HA-Tyramine	Tyramine	H ₂ O	EDC, sulfo-NHS	12	[52]
HA-Dopa	Dopamine	H ₂ O	EDC, sulfo-NHS	2	[53]
HA-TBA	Tetra- <i>n</i> -butyl ammonium	H ₂ O	Dowex 50WX8-40 ion-exchange resin	3	[32]
HA-AEMA	Aminoethyl methacrylate	Dimethyl sulfoxide	BOP ^d , DIPEA ^e	12	[32]
HA-APMAm	Aminopropyl methacrylamide	Dimethyl sulfoxide	BOP, DIPEA	12	[32]
HA-VS	Vinyl sulfone	Dimethyl sulfoxide	BOP, DIPEA	24	[54]

^a 1-ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl] carbodiimide.

^b N-hydroxysuccinimide.

^c Hydroxybenzotriazole.

^d benzotriazol-1-yloxy-tris(dimethylamino) phosphonium hexafluorophosphate.

^e N,N-diisopropylethylamine.

การนำไปใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์

กรดไฮยาลูรอนิกนิยมนำไปใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เนื่องจากเชื่อว่าจะสามารถเพิ่มความชุ่มชื้นให้แก่ผิวหนังได้ และยังสามารถนำไปใช้ในทางการแพทย์ โดยองค์การอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกา (U.S. Food and Drug Administration, FDA) รับรองการใช้กรดไฮยาลูรอนิกเป็นสารเติมแต่งประเภท dermal fillers, joint viscosupplements, vitreous substitutes และ abdominal adhesion barriers ในทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อได้นำกรดไฮยาลูรอนิกมาใช้ในรูปแบบต่างๆ เช่น ฟิล์ม เจล โครจเลี้ยงเซลล์ เป็นต้น ตัวอย่างการใช้ในทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ คือ การใช้กรดไฮยาลูรอนิกในการสร้างเส้นเลือดเทียมและผิวหนังเทียม [Choi, Y.S. และคณะ 1999, Nishida, S. และคณะ 1993, Kogan, G. และคณะ 2007, Price, R. D. และคณะ 2007]

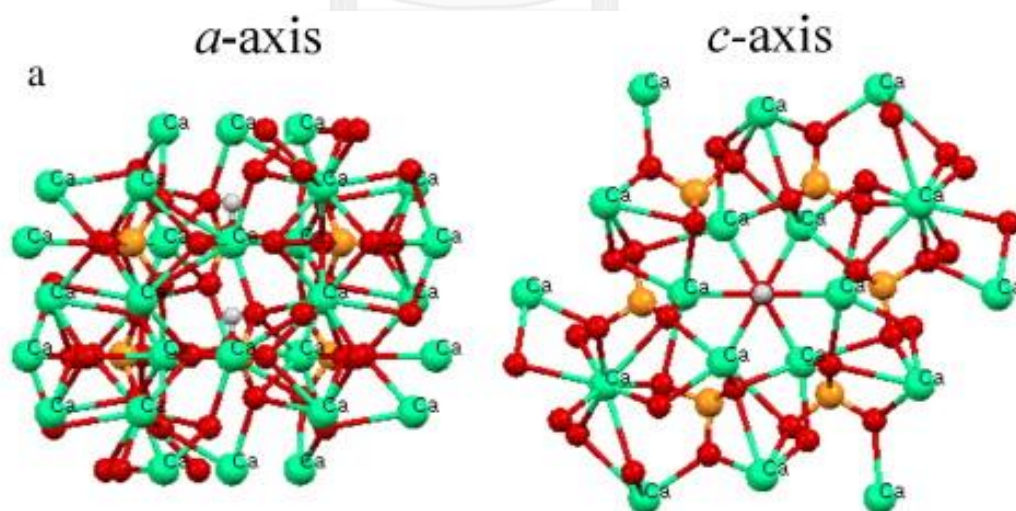
2.5.4 ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (Hydroxyapatite, HAp)

ไฮดรอกซีอะพาไทต์ เป็นสารประกอบอนินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบของกระดูกและฟัน เป็นส่วนประกอบที่ทำให้กระดูกมีความแข็งแรง จัดอยู่ในกลุ่มของเซรามิกทางชีวภาพ (bioceramics) ซึ่งเป็นกลุ่มของวัสดุเซรามิกที่มีความสามารถในการสร้างพันธะระหว่างวัสดุและเซลล์ในร่างกาย

ได้ดี มีสมบัติเข้ากันได้กับเซลล์ของสิ่งมีชีวิต สามารถเพิ่มการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกของ osteoblast ส่งเสริมการเคลื่อนย้ายของเซลล์กระดูกที่มีการเปลี่ยนแปลงแล้วนั้นไปยังบริเวณที่เกิดบาดแผล (osteoconduction) และเพิ่มการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกได้ [Chang, B. S. และคณะ 2000] จากสมบัติที่ได้กล่าวมาข้างต้น จึงได้มีการศึกษาการใช้ไฮดรอกซีอะพาไทต์ในทางการแพทย์อย่างกว้างขวาง เช่น การใช้เป็นวัสดุด้านทันตกรรม และการใช้แทนกระดูก แต่มีข้อจำกัดในการใช้เป็นวัสดุทดแทนกระดูกมนุษย์ในส่วนที่ต้องรับน้ำหนักมาก เนื่องจากไฮดรอกซีอะพาไทต์มีข้อเสียคือ มีสมบัติทางกลต่ำและเปราะ จึงเกิดการแตกหักเสียหายได้ง่าย [Wu, C. และ Xiao, Y. 2009]

โครงสร้างและองค์ประกอบของไฮดรอกซีอะพาไทต์

ไฮดรอกซีอะพาไทต์มีสูตรโมเลกุล $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ไฮดรอกซีอะพาไทต์บริสุทธิ์มีองค์ประกอบทางทฤษฎีคือ มีแคลเซียมร้อยละ 39.68 โดยน้ำหนัก และฟอสฟอรัสร้อยละ 18.45 โดยน้ำหนัก และมีอัตราส่วนระหว่างแคลเซียม:ฟอสฟอรัส คือ 2.151 โดยน้ำหนัก หรือ 1.67 โดยโมล ไฮดรอกซีอะพาไทต์มีลักษณะโครงสร้างเป็นผลึก ดังรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.10 โครงสร้างผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทต์

[Hu, W. และคณะ 2012]

การใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์

จากสมบัติของไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่มีความสามารถในการสร้างพันธะระหว่างวัสดุหรืออุปกรณ์การแพทย์และเซลล์ในร่างกายได้ดี รวมถึงมีความสามารถเข้ากันได้กับเซลล์ของสิ่งมีชีวิตได้ดี จึงมีผลิตภัณฑ์เชิงพาณิชย์จากไฮดรอกซีอะพาไทต์เพื่อใช้ในทางการแพทย์อย่างมาก สารไฮดรอกซีอะพาไทต์แบบผง สามารถใช้เคลือบลงบนอวัยวะเทียมประเภทโลหะ เช่น ข้อสะโพกเทียม เป็นต้น เพื่อให้อวัยวะเทียมนั้นมีความเข้ากันได้กับเซลล์ของสิ่งมีชีวิตมากยิ่งขึ้น เพิ่มความทนทานของโลหะต่อการกัดกร่อนจากของเหลวภายในร่างกาย และยังช่วยสร้างพันธะระหว่างอวัยวะเทียมกับกระดูกของผู้ป่วยด้วย

นอกจากการใช้ประโยชน์ในการเคลือบผิวโลหะแล้ว ยังมีการใช้ไฮดรอกซีอะพาไทต์เป็นกระดูกเทียม ทั้งการใช้ในรูปแบบฉีด แบบโครงสร้างสามมิติ และแบบผง อีกทั้งยังใช้ในการซ่อมแซมอวัยวะ อาทิโรค ทางปริทันตวิทยา (periodontal disease) การฟื้นฟูขากรรไกรบน (maxillofacial reconstruction) อีกด้วย [Yoshikawa, H. และคณะ 2009, Cox, S. C. และคณะ 2015]

2.6 การเชื่อมขวาง

การเชื่อมขวางเป็นกระบวนการปรับปรุงสมบัติของพอลิเมอร์ให้เป็นไปตามต้องการในกระบวนการสร้างวัสดุทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ โดยปรับปรุงวัสดุให้มีสมบัติทางกล (mechanical properties) อัตราการย่อยสลาย (degradation rate) และความสามารถในการบวมน้ำ (swelling capacity) ที่เหมาะสมตามลักษณะการใช้งาน ซึ่งกระบวนการเชื่อมขวางนั้นมีอยู่ 2 วิธีหลักคือ การเชื่อมขวางทางเคมี และการเชื่อมขวางทางกายภาพ

2.6.1 การเชื่อมขวางทางเคมี

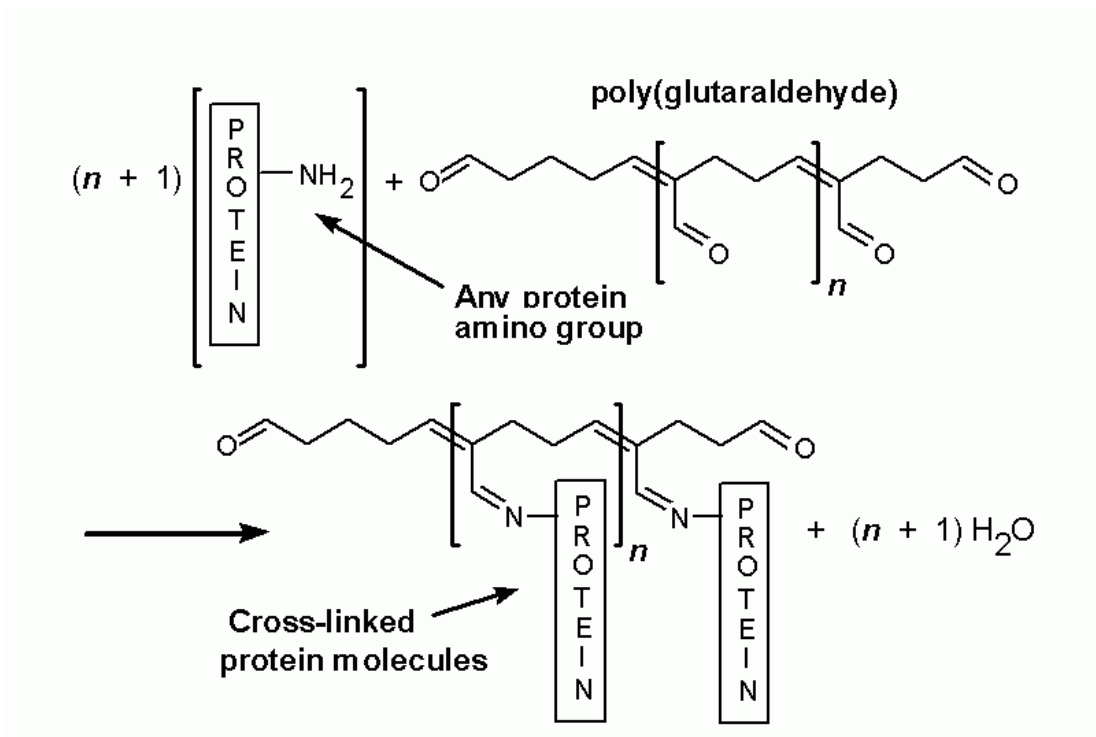
การเชื่อมขวางทางเคมีเป็นกระบวนการเชื่อมขวางที่ใช้สารเคมีทำปฏิกิริยากับสารหรือโครงเลี้ยงเซลล์ที่เราต้องการปรับปรุง โดยสารเคมีที่นิยมใช้มักเป็นสารที่มีหมู่แอลดีไฮด์ เช่น กลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde, GA) ฟอรัลดีไฮด์ (formaldehyde) เป็นต้น หรือการเชื่อมขวาง

ด้วย N-hydroxysuccinimide (NHS) และ 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) เป็นต้น [Zhang, Y. และคณะ 2006]

2.6.1.1 การเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ (Glutaraldehyde, GA)

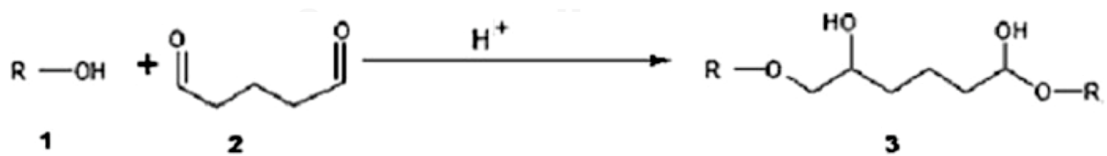
กลูตารัลดีไฮด์เป็นสารประเภทคาร์บอนจำนวนห้าอะตอมที่ต่อกันแบบสายโซ่ตรง โดยที่ปลายทั้งสองข้างของสายจะมีหมู่แอลดีไฮด์ (-CHO) อยู่ ซึ่งหมู่แอลดีไฮด์สามารถเชื่อมขวางกับหมู่เอมีน (-NH₂) ของโปรตีนได้ [Aragon, C. และ Lopez-Corcuera, B. 2003] เช่นการเชื่อมขวางกับคอลลาเจน หรือ เจลาติน เป็นต้น ดังรูปที่ 2.11 อีกทั้งยังสามารถเชื่อมขวางกับหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ของพอลิแซคคาไรด์ได้ (polysaccharide) [Collins, M.N. และ Birkinshaw, C. 2007] ดังรูปที่ 2.12

การใช้กลูตารัลดีไฮด์ในการเชื่อมขวางนั้นมีข้อดีคือ การเชื่อมขวางจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูง แต่มีข้อเสียคือ กลูตารัลดีไฮด์เป็นสารที่มีพิษต่อร่างกายและเซลล์ ดังนั้นเมื่อทำการเชื่อมขวางเสร็จสิ้นแล้วต้องทำการกำจัดกลูตารัลดีไฮด์ที่เหลือออกโดยการล้างด้วยไกลซีน (glycine) เพื่อให้ทำปฏิกิริยากับกลูตารัลดีไฮด์ที่เหลืออยู่และล้างออกด้วยน้ำ อย่างไรก็ตาม กลูตารัลดีไฮด์ได้รับการรับรองความปลอดภัยจากองค์การอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกาแล้วในปัจจุบัน (U.S. Food and Drug Administration, FDA)



รูปที่ 2.11 การเชื่อมขวางของโปรตีนด้วยกลูตารัลดีไฮด์

[<http://publish.uwo.ca/~jkiernan/formglut.htm>]



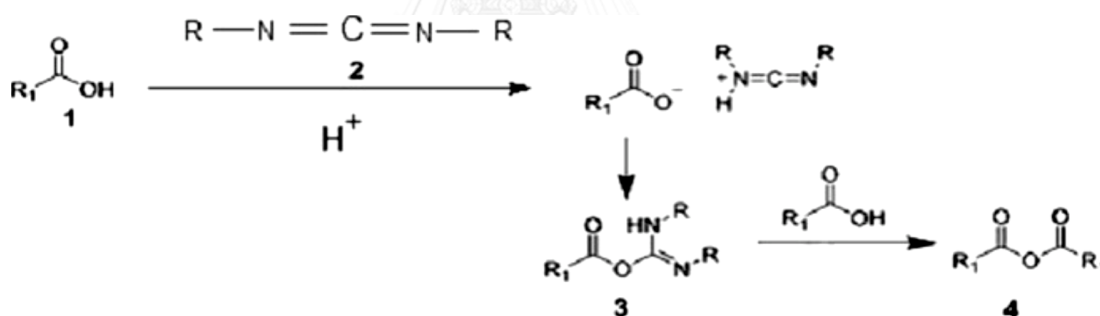
รูปที่ 2.12 การเชื่อมขวางของพอลิแซคคาไรด์ (polysaccharide) ด้วยกลูตารัลดีไฮด์

[Collins, M.N. และ Birkinshaw, C. 2007]

2.6.1.2 การเชื่อมขวางด้วย 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC)

1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide มีหมู่คาร์บอกซิล (-COOH) ซึ่งสามารถสร้างพันธะเอไมด์กับหมู่เอมีน (-NH₂) ของโปรตีนได้ เช่นการเชื่อมขวางกับคอลลาเจนหรือ เจลาติน และสามารถสร้างพันธะเอสเทอร์กับหมู่คาร์บอกซิล (-COOH) ของพอลิแซคคาไรด์ได้ เช่น การเชื่อมขวางกับกรดไฮยาลูรอนิก เป็นต้น [Collins, M. N. และ Birkinshaw, C. 2007] ดังรูปที่ 2.13 ภายหลังจากเสร็จสิ้นกระบวนการเชื่อมขวางด้วย EDC นั้นจะได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นอนุพันธ์ของยูเรีย (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)urea) ซึ่งไม่เป็นพิษต่อร่างกายและกำจัดออกได้ด้วยการล้างน้ำ จึงไม่เกิดสารพิษตกค้างในผลิตภัณฑ์

ถึงแม้การเชื่อมขวางด้วย EDC นั้นไม่เกิดสารพิษตกค้างดังเช่นการเชื่อมขวางด้วยกลูตาไรต์ไฮด์ แต่ EDC ยังไม่ได้รับการรับรองความปลอดภัยจากองค์การอาหารและยา



รูปที่ 2.13 การเชื่อมขวางของพอลิแซคคาไรด์ (polysaccharide) ด้วย EDC

[Collins, M.N. และ Birkinshaw, C. 2007]

2.6.2 การเชื่อมขวางด้วยความร้อน (dehydrothermal treatment, DHT)

การเชื่อมขวางด้วยความร้อนเป็นการเชื่อมขวางทางกายภาพอย่างหนึ่ง โดยเชื่อมขวางระหว่างสายโซ่โปรตีน เมื่อมีการให้ความร้อน สายโซ่โปรตีนจะกำจัดน้ำออกมา 1 โมเลกุล และหมู่เอมีน (-NH₂) ของโปรตีนนั้นจะเกิดการเชื่อมขวางกับหมู่คาร์บอกซิล (-COOH) ของโปรตีนที่อยู่ใกล้เคียงกันเท่านั้น ความสามารถในการเชื่อมขวางด้วยวิธีนี้จึงมีข้อจำกัด จึงควรทำการเชื่อมขวางด้วยวิธีอื่นควบคู่กันเพื่อเพิ่มระดับการเชื่อมขวาง การเชื่อมขวางด้วยความร้อนนั้นมีข้อดีคือ ไม่มี

การใช้สารเคมี จึงไม่เกิดสารเคมีตกค้างในวัสดุ แต่ข้อเสียของการเชื่อมขวางวิธีนี้คือ มีการใช้ความร้อนสูง ซึ่งอาจทำให้สารบางประเภทโปรตีนเกิดการเสื่อมสภาพได้ [Wess, T. และคณะ 2000, Friess W. และคณะ 1998]

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.7.1 ผลการตอบสนองของเซลล์ในระดับห้องปฏิบัติการต่อชีววัสดุชนิดต่าง ๆ

รายงานผลการตอบสนองของเซลล์ในระดับห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) ต่อชีววัสดุชนิดต่าง ๆ แสดงในตารางที่ 2.4



ตารางที่ 2.4 รายงานผลการทดสอบของเซลล์ในระดับห้องปฏิบัติการ (in vitro) ต่อชีววัสดุชนิดต่างๆ

ชนิดของวัสดุ	ชนิดของเซลล์	ผลการทดลอง	แหล่งอ้างอิง
โครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน และกรดไฮยาลูรอนิค	เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนู (L929)	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจนและกรดไฮยาลูรอนิคที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย EDC ไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์	Park, S. N. และคณะ (2002)
โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่เชื่อมขวางกับหมู่อะมิโน RGD และโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน	เซลล์ต้นกำเนิดของมนุษย์	เซลล์สามารถยึดเกาะบนโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่มีการปรับปรุงด้วยการเชื่อมขวางกับหมู่อะมิโน RGD ได้เป็นอย่างดี อีกทั้งยังพบการเกิดกระดูกใหม่บนโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่มีการปรับปรุงด้วยการเชื่อมขวางกับหมู่อะมิโน RGD ได้มากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินและโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน	Meinel, L. และคณะ (2004)

ตารางที่ 2.4 รายงานผลการตอบสนองของเซลล์ในระดับห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) ต่อชีววัสดุชนิดต่างๆ (ต่อ)

ชนิดของวัสดุ	ชนิดของเซลล์	ผลการทดลอง	แหล่งอ้างอิง
<p>เมมเบรนกรดไฮยาลูรอนิค และไฮดรอกซีอะพาไทต์</p>	<p>Primary human osteoblast-like cells (HOBs)</p>	<p>เมมเบรนกรดไฮยาลูรอนิคและไฮดรอกซีอะพาไทต์ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ และไม่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ ผลการศึกษาการดูดซับโปรตีนภายหลังการแช่ในอาหารเลี้ยงเซลล์และพลาสมาของมนุษย์ พบว่าเมมเบรนที่ผลิตจากวัสดุผสมมีการดูดซับไฟโบรเนคตินซึ่งเป็นโปรตีนที่ช่วยให้การยึดเกาะของเซลล์ HOBs ได้มากกว่าเมมเบรนชนิดอื่น</p>	<p>Giordano, C. และคณะ (2006)</p>
<p>โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ ไทยและเจลาติน</p>	<p>เซลล์กระดูกของหนู (MC3T3-E1)</p>	<p>โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เชื่อมขวางกับเจลาตินสามารถส่งเสริมการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์ MC3T3-E1 และยังพบว่าเซลล์มีรูปร่างแผ่ออกภายหลังการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 14 วัน เทียบกับรูปร่างของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่มีรูปร่างกลม</p>	<p>Chamchongkaset, J. และคณะ (2008)</p>

ตารางที่ 2.4 รายงานผลการตอบสนองของเซลล์ในระดับห้องปฏิบัติการ (in vitro) ต่อชีววัตถุชนิดต่างๆ (ต่อ)

ชนิดของวัสดุ	ชนิดของเซลล์	ผลการทดลอง	แหล่งอ้างอิง
<ul style="list-style-type: none"> - พืชัมและโครมดีเอียงเซลล์ไฮดรอกซีอะพาไทต์/ไฟโบรอิน - พืชัมและโครมดีเอียงเซลล์ไฟโบรอินเหนไทยที่เชื่อมขวางกับเจลาติน - พืชัมและโครมดีเอียงเซลล์ไฮดรอกซีอะพาไทต์/ไฟโบรอินที่เชื่อมขวางกับเจลาติน - พืชัมและโครมดีเอียงเซลล์ไฮดรอกซีอะพาไทต์/ไฟโบรอินที่เชื่อมขวางกับเจลาตินและโครมดีเอียงเซลล์ที่ผลิตจากไฟโบรอินที่เชื่อมขวางกับเจลาตินและไฮดรอกซีอะพาไทต์สามารถส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกของเซลล์ทั้ง 2 ชนิด โดยพิจารณาจากการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตส และสัดส่วนของแคลเซียมที่เพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตามโครมดีเอียงเซลล์ที่มีไฮดรอกซีอะพาไทต์และโคโคไตซานที่มีค่า Degree of deacetylation ต่ำเป็นองค์ประกอบนั้นไม่สามารถเพิ่มการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ อนึ่ง การผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ลงในโครมดีเอียงเซลล์จะได้ผลการทดสอบการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกที่น้อยกว่าโครมดีเอียงเซลล์ไฟโบรอินที่มีการสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ ผลการศึกษาสมบัติของเซลล์ทั้ง 2 ชนิด พบว่าเซลล์ทั้งสองมีความเหมือนกันทั้งการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก และเซลล์ MC3T3-E1 จะมีอัตราการเจริญเติบโตที่มากกว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกของหนู 	<p>เซลล์กระดูกของหนู (MC3T3-E1) และเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกของหนู</p>	<p>พืชัมและโครมดีเอียงเซลล์ที่ผลิตจากไฟโบรอินที่เชื่อมขวางกับเจลาตินสามารถเชื่อมต่อการเกาะและการเจริญของเซลล์ ในขณะที่พืชัมและโครมดีเอียงเซลล์ที่ผลิตจากไฟโบรอินที่เชื่อมขวางกับเจลาตินและไฮดรอกซีอะพาไทต์สามารถส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกของเซลล์ทั้ง 2 ชนิด โดยพิจารณาจากการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตส และสัดส่วนของแคลเซียมที่เพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตามโครมดีเอียงเซลล์ที่มีไฮดรอกซีอะพาไทต์และโคโคไตซานที่มีค่า Degree of deacetylation ต่ำเป็นองค์ประกอบนั้นไม่สามารถเพิ่มการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ อนึ่ง การผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ลงในโครมดีเอียงเซลล์จะได้ผลการทดสอบการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกที่น้อยกว่าโครมดีเอียงเซลล์ไฟโบรอินที่มีการสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ ผลการศึกษาสมบัติของเซลล์ทั้ง 2 ชนิด พบว่าเซลล์ทั้งสองมีความเหมือนกันทั้งการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก และเซลล์ MC3T3-E1 จะมีอัตราการเจริญเติบโตที่มากกว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกของหนู</p>	<p>Vachiraroj, N. และคณะ (2009)</p>

ตารางที่ 2.4 รายงานผลการตอบสนองของเซลล์ในระดับห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) ต่อชีววัสดุชนิดต่างๆ (ต่อ)

ชนิดของวัสดุ	ชนิดของเซลล์	ผลการทดลอง	แหล่งอ้างอิง
โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอิน และกรดไฮยาลูรอนิก	เซลล์ประสาทของหนู Sprague-Dawley	โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีอัตราส่วนระหว่างไฟโบรอินต่อกรดไฮยาลูรอนิก เป็น 94:6 (6%HA/fibrin) สามารถส่งเสริมให้เซลล์ประสาทที่มีชีวิตรอด มีการเคลื่อนที่ และมีการยึดเกาะกับพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์	Ren, Y.J. และคณะ (2009)
โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอิน และกรดไฮยาลูรอนิก	เซลล์ต้นกำเนิด	โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินและกรดไฮยาลูรอนิกที่อัตราส่วน 60:40 สามารถเชื่อมต่อการเจริญของเซลล์และการสร้างเนื้อเยื่อใหม่มากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินเพียงอย่างเดียว โดยพิจารณาจากการแสดงออกของ ยีนของสาร 3 ชนิดคือ glycosaminoglycan คอลลาเจนชนิดที่ 1 และ คอลลาเจนชนิดที่ 3	Garcia-Fuentes, M. (2009)
โครงเลี้ยงเซลล์โคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่มีการดูดซับหมู่	เซลล์ไขกระดูก	โครงเลี้ยงเซลล์โคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่มีการดูดซับหมู่ อะมิโนที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร มี อัตราการยึดเกาะของเซลล์เท่ากับร้อยละ 71.6 และ 80.7 ตามลำดับ ส่วนโครงเลี้ยงเซลล์โคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่มีการยึดเกาะของ เซลล์ร้อยละ 54.7 ผลการตรวจวัดปริมาณเอนไซม์แอลคาไลน์-ฟอสฟาเตส พบว่า เซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนโครงเลี้ยงเซลล์โคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่มีการดูดซับหมู่อะมิโนมีปริมาณของเอนไซม์แอลคาไลน์-ฟอสฟาเตสมากกว่าที่เพาะเลี้ยงบนโครงเลี้ยงเซลล์โคโตซาน/ไฮดรอกซี-อะพาไทต์ถึง ร้อยละ 103	Qu, Z. และคณะ (2010)

ตารางที่ 2.4 รายงานผลการทดสอบของเซลล์ในระดับห้องปฏิบัติการ (in vitro) ต่อที่ไวรัสชนิดต่างๆ (ต่อ)

ชนิดของวัสดุ	ชนิดของเซลล์	ผลการทดลอง	แหล่งอ้างอิง
<p>โครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินและกรดไฮยาลูรอนิค</p>	<p>เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนู (L929)</p>	<p>โครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินและกรดไฮยาลูรอนิคไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์และเชื้อต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ L929 ได้ดี โดยพบว่า การเพิ่มอัตราส่วนของเจลาตินในโครงเลี้ยงเซลล์มีผลต่อการเพิ่มการเจริญเติบโตของเซลล์ L929</p>	<p>Zhang, F. และคณะ (2011)</p>
<p>โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทย เจลาตินและโคโตโอติโอติโอแซคคาไรด์</p>	<p>เซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก</p>	<p>โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่มีการเชื่อมขวางกับเจลาตินและโคโตโอติโอแซคคาไรด์สามารถส่งเสริมการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์ อีกทั้งเมื่อเพิ่มอัตราส่วนโคโตโอติโอแซคคาไรด์ในโครงเลี้ยงเซลล์มากขึ้นจะส่งผลให้เซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกได้ดียิ่งขึ้น พิจารณาจากลักษณะของเซลล์ภายหลังการเพาะเลี้ยงที่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกไปเป็นเซลล์กระดูก และการเพิ่มขึ้นของปริมาณเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตส และปริมาณแคลเซียม</p>	<p>Wongputtaraksa, T. และคณะ (2012)</p>

ตารางที่ 2.4 รายงานผลการตอบสนองของเซลล์ในระดับห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) ต่อชีววัสดุชนิดต่างๆ (ต่อ)

ชนิดของวัสดุ	ชนิดของเซลล์	ผลการทดลอง	แหล่งอ้างอิง
<p>โครงเลี้ยงเซลล์เคโติซาน คอลลาเจน และ กรดไฮยาลูรอนิค</p>	<p>เซลล์ต้นกำเนิดของ มนุษย์</p>	<p>โครงเลี้ยงเซลล์สามารถเชื่อมต่อการยึดเกาะของเซลล์ การเจริญเติบโตของเซลล์และการเคลื่อนที่ของเซลล์ เซลล์สามารถรอดชีวิตได้สูง อีกทั้งยังเชื่อมต่อการสร้างกระดูก โดยพบเอนไซม์แอลคาไลน์-ฟอสฟาเตสสูงในสูตรที่มีกรดไฮยาลูรอนิคปริมาณน้อย และมีการพบ osteocalcin ซึ่งเป็นสารที่บ่งชี้ได้ว่าเซลล์ต้นกำเนิดนั้นได้มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก</p>	<p>Mathews, S. และคณะ (2014)</p>
<p>โครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน ไฮดรอกซีอะพาไทต์ ฝังก ไคติน และสารกระตุ้นการ เจริญเติบโต PRGF (PHCE) และสะสมแร่ธาตุ (PHCE-M)</p>	<p>human osteoblast- like cells (MG-63)</p>	<p>โครงเลี้ยงเซลล์ชนิด PHCE และโครงเลี้ยงเซลล์ชนิด PHCE-M มีการยึดเกาะของเซลล์และการเจริญของเซลล์ที่เต็มเต็มรูปของโครงเลี้ยงเซลล์มากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน การทดสอบการสะสมแร่ธาตุพบผลึกแร่ธาตุสะสมอยู่บนโครงเลี้ยงเซลล์ชนิด PHCE ในขณะที่โครงเลี้ยงเซลล์ชนิด PHCE-M พบการสะสมแร่ธาตุที่เป็นรูปแบบมากกว่าผลการทดสอบการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์โดยการตรวจวัดการปลดปล่อยเจลาติน พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ชนิด PHCE-M มีการปลดปล่อยเจลาตินมากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์อีก 2 ชนิด</p>	<p>Rodriguez, I และคณะ (2014)</p>

ตารางที่ 2.4 รายงานผลการตอบสนองของเซลล์ในระดับห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) ต่อชีววัสดุชนิดต่างๆ (ต่อ)

ชนิดของวัสดุ	ชนิดของเซลล์	ผลการทดลอง	แหล่งอ้างอิง
โครงเลี้ยงเซลล์แคลเซียม แอลจีเนต และเจลาติน	เซลล์ต้นกำเนิดของ มนุษย์	โครงเลี้ยงเซลล์ชนิดนี้สามารถเชื่อมต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยพบ การยึดเกาะ การเจริญเติบโตโตของเซลล์ และสามารถเชื่อมต่อการเปลี่ยนแปลง แปลงไปเป็นเซลล์กระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดของมนุษย์ได้ โดยพิจารณา จากการเพิ่มขึ้นของเซลล์และปริมาณแอนิเมคคาไลนฟอสฟาเตส	Cuadros, T.R. และคณะ (2015)
โครงเลี้ยงเซลล์เส้นใยนาโน poly(L-lactic acid)-co-poly- (ε-caprolactone) ฟิบริน กรดแอสคอร์บิก tetracycline hydrochloride (PLACL/SF/AA/TC) และ นาโนไฮดรอกซีอะพาไทต์ (PLACL/SF/AA/TC/n-HA)	เซลล์ต้นกำเนิดของ มนุษย์	การเจริญของเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์เส้นใยนาโนชนิด PLACL/SF/AA/TC และ PLACL/SF/AA/TC/n-HA เพิ่มขึ้นอย่างมี นัยสำคัญ เมื่อเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ PLACL พบการเจริญของเซลล์ และการสะสมแร่ธาตุบนโครงเลี้ยงเซลล์ PLACL/SF/AA/TC/n-HA มาก ที่สุด อีกทั้งพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ PLACL/SF/AA/TC และโครงเลี้ยงเซลล์ PLACL/SF/AA/TC/n-HA มีปริมาณแอนิเมคคาไลนฟอสฟาเตสมากกว่า ว่าโครงเลี้ยงเซลล์ PLACL อย่างมีนัยสำคัญ ผลการวิเคราะห์หาตุพบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ PLACL/SF/AA/TC/n-HA มีปริมาณฟอสฟอรัสและ แคลเซียมมากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ PLACL อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ เซลล์ต้นกำเนิดมีลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก และมีมีการ แสดงออกของ Osteocalcin บนโครงเลี้ยงเซลล์ PLACL/SF/AA/TC/n-HA มากที่สุดเมื่อเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดอื่น	Gandhimathi, C. และคณะ (2015)

2.7.2 ผลการตอบสนองและการสร้างกระดูกในสัตว์ทดลองต่อชีวิสต์ชนิดต่าง ๆ

รายงานผลการตอบสนองและการสร้างกระดูกในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) ต่อชีวิสต์ชนิดต่าง ๆ
สรุปดังแสดงในตารางที่ 2.5



ตารางที่ 2.5 รายงานผลการตอบสนองและการสร้างกระดูกในสัตว์ทดลอง (in vivo) ของวิธีวัสดุชนิดต่างๆ

ชนิดของวัสดุ	สัตว์ทดลอง (ตำแหน่งที่ทดลอง/ ขนาดของdefect)	ระยะเวลา	ผลการทดลอง	แหล่งอ้างอิง
โครงเลี้ยงเซลล์ ไฮดรอกซีอะพาไทต์	สุนัขทดลอง พันธุ์บีเกิ้ล (กระดูกสันหลัง ระหว่างส่วน L2 และ L3)	6 เดือน	ผลการศึกษาในสัตว์ทดลอง พบว่า ในรูปของโครงเลี้ยงเซลล์ไฮดรอกซี- อะพาไทต์นั้นถูกเติมด้วยกระดูกที่สร้างใหม่ และเซลล์ไขกระดูกประมาณร้อยละ 50 ซึ่ง ได้ผลดีเทียบเท่ากับการฝังกระดูกทดแทน ชนิด allograft ที่ได้จากกระดูกเชิงกราน และ พบการสร้างเส้นเลือดใหม่ในทั้งสองกลุ่ม ทดลอง โดยพิจารณาจากการถ่ายภาพรังสี เอกซเรย์ การถ่ายภาพด้วยเครื่องเอกซเรย์ คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร และการ ทดสอบทางจุลพยาธิวิทยา	Kaito, T. และคณะ (2006)

ตารางที่ 2.5 รายงานผลการตอบสนองและการสร้างกระดูกในสัตว์ทดลอง (in vivo) ของวิธีวัสดุชนิดต่างๆ (ต่อ)

ชนิดของวัสดุ	สัตว์ทดลอง (ตำแหน่งที่ทดลอง/ ขนาดของdefect)	ระยะเวลา	ผลการทดลอง	แหล่งอ้างอิง
โครงเลี้ยงเซลล์ไฮดรอกซีอะพาไทต์ และ กรดไฮยาลูรอนิค	หนูทดลอง (ได้วิวนั่งบริเวณหลัง)	4 สัปดาห์	ผลการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการโดยเพาะเลี้ยงเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่ด้วยสารละลายไฮยาลูรอนิค พบว่ามีการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกใหม่ในทั้งสองกลุ่มโครงเลี้ยงเซลล์ให้ผลที่ไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ผลการศึกษาในสัตว์ทดลอง พบว่ามีการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกใหม่จำนวนมากในรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ผ่านการแช่ด้วยสารละลายไฮยาลูรอนิค	Yoshikawa, M. และคณะ (2005)
แผ่นไฮดรเจลจากกรดไฮยาลูรอนิคร่วมกับ BMP-2 และเซลล์ต้นกำเนิดของมนุษย์	หนูทดลอง (กระดูกซี่โครง/ เส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร)	4 สัปดาห์	ผลการศึกษาในสัตว์ทดลอง พบการเพิ่มขึ้นของ osteocalcin และพบเนื้อเยื่อกระดูกที่เจริญแล้วร่วมกับการตรวจพบ CD31 และ vascular endothelial growth factors มากที่สุดในกลุ่มทดลองที่ใช้กรดไฮยาลูรอนิคชนิดไฮโดรเจลร่วมกับ BMP-2 และเซลล์ต้นกำเนิดของมนุษย์	Kim, J. และคณะ (2007)

ตารางที่ 2.5 รายงานผลการตอบสนองและการสร้างกระดูกในสัตว์ทดลอง (in vivo) ของชีวิตชนิดต่างๆ (ต่อ)

ชนิดของวัสดุ	สัตว์ทดลอง (ตำแหน่งที่ทดลอง/ ขนาดของdefect)	ระยะเวลา	ผลการทดลอง	แหล่งอ้างอิง
โครงเลี้ยงเซลล์กรวด ไฮดรอกซีอะคริลิกผสมกับเซลล์ต้น กำเนิดจากไขกระดูกของ กระต่าย	กระต่าย (ส่วนหัวของกระดูก ต้นขา/ เส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร ลึก 1.5 มิลลิเมตร)	24 สัปดาห์	ผลการศึกษาในสัตว์ทดลอง พบการสร้างกระดูกใหม่ เกิดขึ้นบริเวณที่เสียหายได้เกือบสมบูรณ์ และพบว่าในกลุ่มที่ฝัง โครงเลี้ยงเซลล์กรวดไฮดรอกซีอะคริลิกผสม MSC จะมีการซ่อมแซม กระดูกที่มีความหนาพื้กว่ากลุ่มที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์กรวดไฮดร อกซีอะคริลิกโดยไม่มีเซลล์	Løken, S. และคณะ (2008)
โครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน และไฮดรอกซีอะพาทิต	หนู Wistar rats (กระโหลกศีรษะ/ เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร)	28 วัน	ผลการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่า โครงเลี้ยง เซลล์คอลลาเจนและไฮดรอกซีอะพาทิตสามารถเชื่อมต่อกับ เจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกของเซลล์ MC3T3-E1 ได้ดีกว่าโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจนอย่างมีนัยสำคัญ โดยพบการเจริญของเซลล์และการสะสมแร่ธาตุในปริมาณที่เพิ่ม มากขึ้นตามการเพิ่มขึ้นของไฮดรอกซีอะพาทิต ผลการศึกษาในระดับสัตว์ทดลอง พบการสร้างกระดูก ใหม่และการสะสมแคลเซียมเพิ่มขึ้นตามการเพิ่มขึ้นของ ไฮดรอกซีอะพาทิตในโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจนและไฮดรอกซี- อะพาทิต	Gleeson, J.P. และคณะ (2010)

ตารางที่ 2.5 รายงานผลการตอบสนองและการสร้างกระดูกในสัตว์ทดลอง (in vivo) ของชีววัสดุชนิดต่างๆ (ต่อ)

ชนิดของวัสดุ	สัตว์ทดลอง (ตำแหน่งที่ทดลอง/ ขนาดของ defect)	ระยะเวลา	ผลการทดลอง	แหล่งอ้างอิง
<ul style="list-style-type: none"> - โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอิน ใหม่ไทย - โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอิน ใหม่ที่เชื่อมขวางด้วย เจลาติน - โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอิน ใหม่ที่มีการสะสม ไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่พื้นผิว - โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอิน ใหม่ที่เชื่อมขวางด้วย เจลาตินและมีการสะสม ไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่พื้นผิว 	<p>หนูทดลอง (ฝังใต้ผิวหนัง)</p>	<p>12 สัปดาห์</p>	<p>ผลการทดสอบการตอบสนองต่อเนื้อเยื่อของโครง เลี้ยงเซลล์ในสิ่งมีชีวิตเป็นเวลา 2 สัปดาห์และ 4 สัปดาห์ ภายหลังการฝังโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 4 สูตร ตามมาตรฐาน ISO10993-6 พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 4 ชนิดถูกประเมินอยู่ ในกลุ่มวัสดุประเภท “ไม่ระคายเคือง” ถึง “ระคายเคือง เล็กน้อย” เมื่อเปรียบเทียบกับ Gelfoam[®] ซึ่งเป็นวัสดุทางการแพทย์ เชิงพาณิชย์ที่ใช้ในกลุ่มควบคุม</p>	<p>Tungtasana, H. และคณะ (2010)</p>

ตารางที่ 2.5 รายงานผลการตอบสนองและการสร้างกระดูกในสัตว์ทดลอง (in vivo) ของวัสดุชนิดต่างๆ (ต่อ)

ชนิดของวัสดุ	สัตว์ทดลอง (ตำแหน่งที่ทดลอง/ ขนาดของdefect)	ระยะเวลา	ผลการทดลอง	แหล่งอ้างอิง
ผงแคลเซียมฟอสเฟต และเจลาติน	กระดูก (condyle of femurs/ เส้นผ่าศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร ยาว 13 มิลลิเมตร)	4, 12 และ 24 สัปดาห์	ผลการศึกษาในระดับสัตว์ทดลอง พบว่า มีการสร้างกระดูกใหม่ในกลุ่มทดลองที่ฝังผงแคลเซียมฟอสเฟตและเจลาตินมากกว่ากลุ่มที่ฝังผงแคลเซียมฟอสเฟตประมาณ 5 เท่า โดยมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นตามปริมาณของเจลาตินที่เพิ่มขึ้น โดยพิจารณาจากการถ่ายภาพรังสี การถ่ายภาพด้วยเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร และการทดสอบทางจุลพยาธิวิทยา	Kasuya, A. และคณะ (2012)
โครงเลี้ยงเซลล์ไฮดรอกซี- อะพาไทต์ เจลาติน และ ซีโอเซน (GEMOSIL) ร่วมกับ TiO ₂	หนูทดลอง (กระดูกซี่โครง/ เส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร)	8 สัปดาห์	ผลการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ GEMOSIL ที่มีการเติมและไม่มีเติม TiO ₂ สามารถเชื่อมต่อการเจริญเติบโตและเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกของเซลล์ MC3T3-E1 ได้ โดยพบการสะสมแร่ธาตุของเซลล์ในโครงเลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิด ผลการศึกษาในระดับสัตว์ทดลอง พบการสร้างกระดูกใหม่ในทั้งสองกลุ่มทดลอง แต่คุณภาพของกระดูกที่สร้างใหม่ในกลุ่มที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ GEMOSIL ที่มีการเติม TiO ₂ จะดีกว่ากลุ่มที่ไม่มีเติม TiO ₂	Chiu, C. และคณะ (2012)

ตารางที่ 2.5 รายงานผลการตอบสนองและการสร้างกระดูกในสัตว์ทดลอง (in vivo) ของสัตว์ชนิดต่างๆ (ต่อ)

ชนิดของวัสดุ	สัตว์ทดลอง (ตำแหน่งที่ทดลอง/ ขนาดของ defect)	ระยะเวลา	ผลการทดลอง	แหล่งอ้างอิง
โครงเลี้ยงเซลล์ไฮดรอกซี-อะพาไทต์ ไคโตซาน และ แอลจีเนต	หนูทดลอง severe combined immunodeficient (SCID) (กระดูกซี่โครง/ เส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร)	4 และ 8 สัปดาห์	<p>ผลการศึกษาในระดับปฏิบัติการ พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ไฮดรอกซีอะพาไทต์ ไคโตซาน และแอลจีเนต ไม่มีพิษต่อเซลล์ MG-63 cells และเชื้อต่อการเจริญของเซลล์ได้มากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซานและแอลจีเนต</p> <p>ผลการศึกษาในระดับสัตว์ทดลอง ที่ 4 สัปดาห์ พบการสะสมแร่ธาตุในโครงเลี้ยงเซลล์ไคโตรลได้สูง แต่ไม่พบการสะสมแร่ธาตุในอะพาไทต์ ไคโตซาน และแอลจีเนต แต่ไม่พบการสะสมแร่ธาตุในโครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซานและแอลจีเนต ที่ 8 สัปดาห์ พบการสร้างกระดูกใหม่ในกลุ่มที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฮดรอกซีอะพาไทต์ ไคโตซาน และแอลจีเนต มากที่สุด โดยพิจารณาจากการถ่ายภาพด้วยเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร และการทดสอบทางจุลพยาธิวิทยา</p>	Jin, H.H. และคณะ (2012)

ตารางที่ 2.5 รายงานผลการตอบสนองและการสร้างกระดูกในสัตว์ทดลอง (in vivo) ของยีนส์ชนิดต่างๆ (ต่อ)

ชนิดของยีนส์	ยีนส์ที่ทดลอง (ตำแหน่งที่ทดลอง/ ขนาดของ defect)	ระยะเวลา	ผลการทดลอง	แหล่งอ้างอิง
<p>โครงเลี้ยงเซลล์ไฮดรอกซี-อะพาไทต์ เกลาตินและแคลเซียมซีลีไลท์ (HGCS)</p>	<p>หนูทดลอง (กระดูกซี่โครง/ เส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร)</p>	<p>12 สัปดาห์</p>	<p>ผลการศึกษาในระดับข้อปฏิบัติการ พบว่า เซลล์ MC3T3-E1 สามารถยึดเกาะและเจริญเติบโตบนโครงเลี้ยงเซลล์ HGCS ได้ดีกว่าบนโครงเลี้ยงเซลล์ decellularized bone matrix (DECBM)</p> <p>ผลการศึกษาในระดับสัตว์ทดลอง พบการสะสมแร่ธาตุและการเคลื่อนที่เข้าไปในโครงเลี้ยงเซลล์ในกลุ่มที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ HGCS ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ multipotent adult progenitor cells (MAPCs) มากที่สุด รองลงมาคือกลุ่มที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ HGCS ซึ่งทั้งสองกลุ่มนี้ให้ผลที่ดีกว่ากลุ่มที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ DECBM ซึ่งสอดคล้องกับผลการถ่ายภาพด้วยเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร และการทดสอบทางจุลพยาธิวิทยา</p>	<p>Lee, D.J. และคณะ (2014)</p>

ตารางที่ 2.5 รายงานผลการตอบสนองและการสร้างกระดูกในสัตว์ทดลอง (in vivo) ของสัตว์ชนิดต่างๆ (ต่อ)

ชนิดของวัสดุ	สัตว์ทดลอง (ตำแหน่งที่ทดลอง/ ขนาดของdefect)	ระยะเวลา	ผลการทดลอง	แหล่งอ้างอิง
โครงเลี้ยงเซลล์ biphasic calcium phosphate กรดไฮดรอกซีอะลิวมินาติค และแคลเซียม (HGB) และมีสาร platelet-rich plasma (PRP)	หนูทดลอง (กระดูกซี่โครง/ เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร)	4 และ 8 สัปดาห์	ผลการศึกษาในระดับปฏิบัติการ พบว่า เซลล์ MC3T3-E1 สามารถยึดเกาะ และเจริญเติบโตในโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีสารเติม PRP ได้มากกว่ากรณีไม่มีเติม PRP การเติมกรดไฮดรอกซีอะลิวมินาติคและแคลเซียมในโครงเลี้ยงเซลล์ biphasic calcium phosphate สามารถเพิ่มการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ในทุกช่วงเวลาเมื่อเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ biphasic calcium phosphate ผลการศึกษาในระดับสัตว์ทดลอง โดยการทดสอบการถ่ายภาพด้วยเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร พบว่าที่ 4 สัปดาห์ สัตว์ทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ HGB มีการสร้างกระดูกใหม่มากที่สุด ในขณะที่สัตว์ที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ HGB-PRP สร้างกระดูกใหม่โดยที่สุด แสดงว่า PRP ไม่ได้มีส่วนสำคัญในการช่วยสร้างกระดูก ที่ 8 สัปดาห์ พบการสร้างกระดูกใหม่ขึ้นมาจนเกือบเต็มช่องว่างในทั้ง 3 สัปดาห์ และพบการสร้างกระดูกใหม่ของสัตว์ที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ HGB มากที่สุด ส่วนสัตว์ที่ฝัง HGB-PRP มีการสร้างกระดูกใหม่โดยที่สุดเช่นเดิม	Son, S. และคณะ (2015)

ตารางที่ 2.5 รายงานผลการตอบสนองและการสร้างกระดูกในสัตว์ทดลอง (in vivo) ของตัวรับชนิดต่างๆ (ต่อ)

ชนิดของวัสดุ	สัตว์ทดลอง (ตำแหน่งที่ทดลอง/ ขนาดของdefect)	ระยะเวลา	ผลการทดลอง	แหล่งอ้างอิง
โครงเลี้ยงเซลล์แบบแผ่น สันเยนาโนจากโคโตซาน ไฟโบรอิน และนาโน- ไฮดรอกซีอะพาไทต์	หนู nude mice (ได้ผิวหนัง)	4 และ 8 สัปดาห์	<p>ผลการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่า การเจริญเติบโตของเซลล์ hMSCs ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มทดลองที่สะสมและไม่สะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ พบการเพิ่มขึ้นของปริมาณอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตส การสะสมแคลเซียม การแสดงออกของ Osteopontin และ osteocalcin ในโครงเลี้ยงเซลล์โคโตซาน/ไฟโบรอินที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์โครงเลี้ยงเซลล์โคโตซาน/ไฟโบรอิน/30% ไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์และโครงเลี้ยงเซลล์โคโตซาน/ไฟโบรอินที่มีการสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์</p> <p>ผลการศึกษาในระดับสัตว์ทดลองภายหลังการเพาะเลี้ยงเซลล์ hMSCs บนโครงเลี้ยงเซลล์โคโตซาน/ไฟโบรอิน/30% ไฮดรอกซีอะพาไทต์และผังที่ได้ผิวหนังของหนู พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูก และมีการสร้างใหม่ของเส้นเลือดเข้ามาในโครงเลี้ยงเซลล์ โดยพิจารณาจากการถ่ายภาพด้วยเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร และการทดสอบทางจุลพยาธิวิทยา</p>	Lai, G. และคณะ (2015)

ตารางที่ 2.5 รายงานผลการตอบสนองและการสร้างกระดูกในสัตว์ทดลอง (in vivo) ของชีววัสดุชนิดต่างๆ (ต่อ)

ชนิดของวัสดุ	สัตว์ทดลอง (ตำแหน่งที่ทดลอง/ ขนาดของ defect)	ระยะเวลา	ผลการทดลอง	แหล่งอ้างอิง
<p>โครงเลี้ยงเซลล์ชนิดเส้นใย นาโนจากไฟโบรอิน พอลิ- คาร์โพลีเอสเตอร์ (SF/PCL) โครงเลี้ยงเซลล์พอลิ- คาร์โพลีเอสเตอร์ (PCL)</p>	<p>กระต่าย (กระดูกทศริษะ/ เส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร)</p>	<p>1, 2, 4 และ 8 สัปดาห์</p>	<p>ผลการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่า การยึดเกาะ และเจริญเติบโตของเซลล์ hMSCs บนโครงเลี้ยงเซลล์ SF/PCL 2/98 และ SF/PCL 6/94 มีมากกว่าบนโครงเลี้ยงเซลล์ PCL อย่าง มีนัยสำคัญ อีกทั้งอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ และการเจริญเติบโต เต็มรูปของโครงเลี้ยงเซลล์ SF/PCL มีมากกว่าบนโครงเลี้ยง เซลล์ PCL ผลการทดสอบการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ SF/PCL 6/94 มีการสะสมแคลเซียมมาก ที่สุด และพบการแสดงออกของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตส Osteocalcin และ Runx2 ในโครงเลี้ยงเซลล์ SF/PCL 2/98 และ SF/PCL 6/94 มากกว่าในโครงเลี้ยงเซลล์ PCL</p> <p>ผลการศึกษาในระดับสัตว์ทดลองพบการสร้างกระดูก ใหม่ในโครงเลี้ยงเซลล์ SF/PCL การทดสอบทางจุลพยาธิวิทยา ที่ 4 สัปดาห์ พบว่า ในกลุ่มที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ SF/PCL 2/98 มีการ สร้างกระดูกใหม่ และในกลุ่มที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ SF/PCL 6/94 พบการสร้างเส้นเลือดใหม่มากที่สุด ที่ 8 สัปดาห์ พบว่า ในกลุ่มที่ ฝัง SF/PCL มีการสร้างกระดูกใหม่มากกว่ากลุ่ม PCL อย่างมี นัยสำคัญ และพบการสร้างกระดูกเต็มช่องว่างอย่างสมบูรณ์ ในกลุ่ม SF/PCL 6/94</p>	<p>Kim, B.S. และคณะ (2015)</p>

ตารางที่ 2.5 รายงานผลการตอบสนองและการสร้างกระดูกในสัตว์ทดลอง (in vivo) ของวัสดุชนิดต่างๆ (ต่อ)

ชนิดของวัสดุ	สัตว์ทดลอง (ตำแหน่งที่ทดลอง/ ขนาดของ defect)	ระยะเวลา	ผลการทดลอง	แหล่งอ้างอิง
โครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน พอลิเมอร์ และ biphasic calcium phosphate (Gel- Pec-BCP) ร่วมกับสาร กระตุ้นการเจริญชนิด BMP-2 และ VEGF	หนูทดลอง (กระดูกซี่โครง/ เส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร)	2 และ 4 สัปดาห์	ผลการศึกษาในระดับปฏิบัติการ พบว่า การตรึงสาร กระตุ้นการเจริญเติบโต VEGF และ BMP-2 ในโครงเลี้ยงเซลล์ จะเพิ่มการเคลื่อนที่ และการเจริญของเซลล์ MC3T3-E1 ได้ มากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีสารกระตุ้นการเจริญเติบโต ผลการศึกษาในระดับสัตว์ทดลอง พบการสร้างกระดูก ใหม่ในโครงเลี้ยงเซลล์ Gel-Pec-BCP/BMP-2 และ Gel-Pec- BCP/VEGF โดยมีการสร้างกระดูกใหม่ใน Gel-Pec-BCP/BMP- 2 มากที่สุด โดยพิจารณาจากการถ่ายภาพด้วยเครื่องเอกซเรย์ คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร การทดสอบทางจุลพยาธิวิทยา และการแสดงออกของ osteopontin osteocalcin และ คอลลาเจน ชนิดที่ 1	Amirian, J. และคณะ (2015)

ตารางที่ 2.5 รายงานผลการตอบสนองและการสร้างกระดูกในสัตว์ทดลอง (in vivo) ของซีวีสดชนิดต่างๆ (ต่อ)

ชนิดของวัสดุ	สัตว์ทดลอง (ตำแหน่งที่ทดลอง/ ขนาดของdefect)	ระยะเวลา	ผลการทดลอง	แหล่งอ้างอิง
โครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน เพคติน และ biphasic calcium phosphate (Gel-Pec-BCP)	กระต่าย (กระดูก Femur/ เส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ยาว 6 มิลลิเมตร)	6 และ 12 สัปดาห์	ผลการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่า เซลล์ MC3T3-E1 สามารถยึดเกาะ และเจริญเติบโตบนโครงเลี้ยงเซลล์ และพบเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตสและการแสดงออกของ osteopontin ในโครงเลี้ยงเซลล์ Gel-Pec-BCP มากกว่าในโครง เลี้ยงเซลล์ Gel-Pec ผลการศึกษาในระดับสัตว์ทดลอง พบการสร้างกระดูก ใหม่ในโครงเลี้ยงเซลล์ Gel-Pec-BCP มากกว่าในโครงเลี้ยงเซลล์ Gel-Pec โดยพิจารณาจากการถ่ายภาพด้วยเครื่องเอกซเรย์ คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร การทดสอบทางจุลพยาธิวิทยา และการแสดงออกของ osteopontin osteocalcin คอลลาเจน ชนิดที่ 1 และคอลลาเจน ชนิดที่ 2	Nguyen, T.B. และคณะ (2015)

บทที่ 3

วัสดุและวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุและสารเคมี

- 3.1.1 รังไหม *Bombyx mori* (พันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 จากศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ จังหวัดศรีสะเกษ)
- 3.1.2 เจลาตินชนิด เอ (Type A gelatin, Mw 100,000 Da, pl = 9) (Nitta Gelatin Inc., Tokyo, Japan)
- 3.1.3 กรดไฮยาลูรอนิก (hyaluronic acid, Mw 722,000 Da) (Namsiang International CO.,LTD., Bangkok, Thailand)
- 3.1.4 Calcium chloride (CaCl_2) (Ajax finechem, Australia)
- 3.1.5 Sodium phosphate dibasic heptahydrate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Germany)
- 3.1.6 Sodium carbonate (Na_2CO_3) (Ajax finechem, Australia)
- 3.1.7 Lithium bromide (LiBr) (Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Germany)
- 3.1.8 เกลือ (NaCl, ขนาดผลึก 600-700 μm)
- 3.1.9 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) (EDC) (Sigma-Aldrich, USA)
- 3.1.10 N-hydroxy-succinimide (NHS) (Sigma-Aldrich, USA)
- 3.1.11 Alpha-modified wagle medium (α -MEM) (Hyclone, USA)
- 3.1.12 Dulbecco's modified eagle powder medium (D-MEM) (Hyclone, USA)
- 3.1.13 Fetal bovine serum (FBS) (Hyclone, USA)
- 3.1.14 สารละลาย Penicillin-Streptomycin (Hyclone, USA)
- 3.1.15 Phosphate buffer saline without calcium and magnesium (PBS (-) powder) (Nissui Pharmaceutical CO. Ltd, Japan)
- 3.1.16 Trypsin/EDTA (0.25% Trypsin in EDTA.4 Na) (Gibco BRL., Canada)
- 3.1.17 SDS lysis buffer
- 3.1.18 สารละลาย SSC (17.999g NaCl+8.823g $\text{Na}_3\text{Citrate} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ / 100ml)
- 3.1.19 สารละลาย Hoechst 33258

- 3.1.20 กระจกใส (MWCO 12000-16000) (Viskase Companies, Inc., Japan)
- 3.1.21 ยาละลายหนืดของ Isofuran (Pi ramal Critical Care, Inc., USA)
- 3.1.22 Iodine solution
- 3.1.23 70% Ethanol
- 3.1.24 10% formalin
- 3.1.25 สีย้อมขึ้นเนื้อ Hematoxylin & Eosin
- 3.1.26 สีย้อมขึ้นเนื้อ Masson's Trichrome
- 3.1.27 ภาดเลี้ยงเซลล์พลิสตรีน ขนาด 24 หลุม และ 48 หลุม (Corning, USA)
- 3.1.28 ภาดเลี้ยงเซลล์พลิสตรีน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 มิลลิเมตร (Corning, USA)
- 3.1.29 หลอดปั่นเหวี่ยงสาร (Corning, USA)

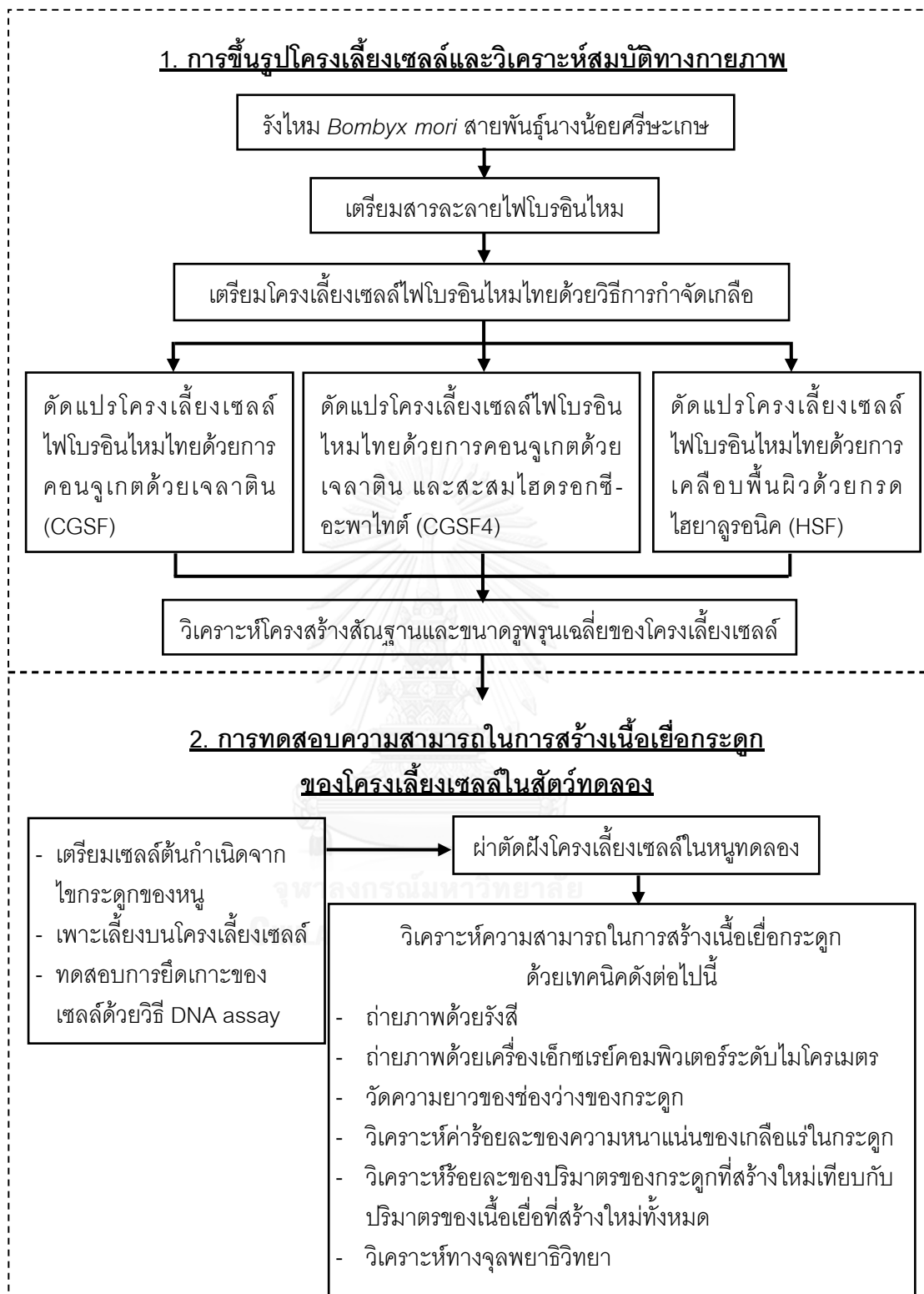
3.2 อุปกรณ์

- 3.2.1 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow) (HWS series 254473. Australia)
- 3.2.2 ตู้เพาะเชื้อบรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂ incubator) (series II 3110 Water Jacketed Incubator, Thermo Forma, USA)
- 3.2.3 เครื่อง Fluorescence microplate reader (FLUOstar Omega, BMG Labtech, Germany)
- 3.2.4 เครื่องดูดปล่อยสารอัตโนมัติ (micropipette) (Pipetman P20, P200, P1000, USA)
- 3.2.5 เครื่องดูดปล่อยสารอัตโนมัติ (Multi-channel pipette)
- 3.2.6 เครื่องชั่งน้ำหนักแบบดิจิทัล (AL204, Metter Toledo, USA)
- 3.2.7 เครื่องปั่นเหวี่ยงสาร (Centrifuge) (Kubota corporation 6500, Japan)
- 3.2.8 เครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน (Magnetic Stirrer/ Hot plate) (RCT basic, Ika labortechnik, Germany)
- 3.2.9 ตู้เย็น – 40 องศาเซลเซียส (Haier, China)
- 3.2.10 ตู้เย็น – 20 องศาเซลเซียส (Sandenintercool, Thailand)
- 3.2.11 ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส (NR-BU343, Panasonic, Thailand)

- 3.2.12 เครื่องทำแห้งแบบแช่แข็ง (Freeze dryer, CHRIST®, Germany)
- 3.2.13 ตู้อบแห้งแบบสุญญากาศ และปั๊ม Vacuum oven (VD23, Binder, Germany)
- 3.2.14 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscopy) (JSM-5410LV, JEOL Ltd., Japan)
- 3.2.15 กล้องจุลทรรศน์ (Eclipse 80i, Nikon, Japan)
- 3.2.16 กล้องจุลทรรศน์ (Eclipse TS100, Nikon, Japan)
- 3.2.17 Hemacytometer (Boeco, Germany)
- 3.2.18 อุปกรณ์ผ่าตัด
- 3.2.19 Oscilating saw
- 3.2.20 เครื่องถ่ายภาพรังสี (X-ray) (โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)
- 3.2.21 เครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร (micro-CT) (Skyscan 1173, Bruker Company, Belgium, หน่วยบริการสถานที่และเครื่องมือวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล)

3.3 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 2 ส่วนหลัก ได้แก่ การขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ และวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ และการทดสอบความสามารถในการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกของโครงเลี้ยงเซลล์ในสัตว์ทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 แผนการดำเนินงานวิจัยโดยรวม

3.3.1 การเตรียมสารละลายไฟโบรอินใหม่ไทย

การเตรียมสารละลายไฟโบรอินใหม่ไทยในน้ำจะดำเนินการตามรายงานของ Kim, U.J. และคณะ (2005) โดยนำรังไหมไทยพันธุ์นางน้อยศรีษะเกษ 1 มาต้มในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 0.02 M เป็นเวลา 20 นาที จำนวน 2 รอบเพื่อละลายเซรีซินหรือกาวไหมออก แล้วนำเส้นใยไฟโบรอินที่ผึ่งแห้งแล้วไปละลายด้วยสารละลายลิเทียมโบรไมด์ 9.3 M ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายไฟโบรอินที่ได้ไปไดอะไลซ์ด้วยน้ำปราศจากประจุที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน โดยทำการเปลี่ยนน้ำเมื่อครบเวลา 15 นาที 20 นาที และ 20 นาที จากนั้นเปลี่ยนน้ำ 3 ครั้งต่อวัน เพื่อกำจัดลิเทียมโบรไมด์ออก วิเคราะห์ความเข้มข้นของไฟโบรอินในสารละลายด้วยการชั่งน้ำหนักแห้งของไฟโบรอิน โดยควบคุมให้สารละลายที่ได้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วงร้อยละ 6 - 6.5 โดยน้ำหนัก

3.3.2 การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทย

การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยจะดำเนินการตามรายงานของ Kim, U.J. และคณะ (2005) โดยบรรจุสารละลายไฟโบรอินใหม่ไทยปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงในกระปุกทรงกระบอก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร สูง 3.3 เซนติเมตร และโรยผลึกเกลือ (NaCl) ขนาด 600-710 ไมโครเมตร ปริมาณ 7 กรัมลงไปในกระปุกอย่างช้าๆ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อให้สารละลายไฟโบรอินก่อตัวเป็นเจล จากนั้นนำไปแช่ในน้ำปราศจากประจุพร้อมปั่นกววน โดยเปลี่ยนน้ำทุกๆ 10 นาทีเป็นเวลา 5 ครั้งและแช่น้ำปราศจากประจุพร้อมปั่นกววนทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง เพื่อให้อนุภาคเกลือละลายน้ำออกมา ทำให้เกิดเป็นรูพรุนภายในโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอิน จากนั้นตากโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่อุณหภูมิห้องให้แห้ง และนำมาตัดเป็นชิ้นงานขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 11 มิลลิเมตร และหนา 2 มิลลิเมตร

3.3.3 การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจุกต์ด้วยเจลาติน (CGSF)

การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจุกต์ด้วยเจลาตินจะดำเนินการตามรายงานของ Chamchongkaset, J. และคณะ (2008) โดยแช่โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยในสารละลายเจลาตินความเข้มข้นร้อยละ 0.5 น้ำหนักต่อปริมาตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะ

สูญญากาศ จากนั้นนำโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้ไปผ่านกระบวนการทำแห้งด้วยความเย็น (Freeze drying) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้มาทำการเชื่อมขวางด้วยความร้อน (Dehydrothermal) โดยนำไปอบที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส ความดัน 0.4 บาร์ ที่สภาวะสูญญากาศเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการเชื่อมขวางโครงเลี้ยงเซลล์และเจลาตินด้วยสารเชื่อมขวาง 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) (EDC) และ N-hydroxy-succinimide (NHS) โดยแช่ในสารละลาย EDC ความเข้มข้น 14 มิลลิโมลต่อลิตร ผสมกับสารละลาย NHS ความเข้มข้น 5.5 มิลลิโมลต่อลิตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และแช่ในน้ำปราศจากประจุภายใต้สภาวะสูญญากาศ เป็นเวลา 30 นาที จำนวนทั้งสิ้น 3 รอบ เพื่อล้าง EDC และ NHS ที่ตกค้างออก นำโครงเลี้ยงเซลล์ออกมาตั้งทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

3.3.4 การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (CGSF4)

การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ จะดำเนินการตามรายงานของ Tungtasana, H. และคณะ (2010) โดยโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินนั้นจะได้รับการสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์บนพื้นผิวภายในโครงเลี้ยงเซลล์ ด้วยวิธีการแช่สลับในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) ความเข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตร เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นแช่โครงเลี้ยงเซลล์ในน้ำปราศจากประจุเป็นเวลา 10 นาที ก่อนนำไปแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) ความเข้มข้น 0.12 โมลต่อลิตร เป็นเวลา 30 นาที และแช่ในน้ำปราศจากประจุอีกครั้งหนึ่ง โดยทำซ้ำทั้งสิ้น 4 รอบ

3.3.5 การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิก (HSF)

เตรียมสารละลายกรดไฮยาลูรอนิกให้มีความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก นำโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยแช่ลงในสารละลายกรดไฮยาลูรอนิกเป็นเวลา 2 ชั่วโมงภายใต้สภาวะสูญญากาศ จากนั้นนำโครงเลี้ยงเซลล์ไปผ่านกระบวนการทำแห้งด้วยความเย็น

3.3.6 การศึกษาโครงสร้างพื้นฐานและขนาดรูพรุนเฉลี่ยของโครงเลี้ยงเซลล์

นำโครงเลี้ยงเซลล์ทั้งสามชนิดไปวิเคราะห์โครงสร้างพื้นฐานด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope) บันทึกภาพโครงสร้างพื้นฐานของโครงเลี้ยงเซลล์ และนำมาวิเคราะห์หาขนาดของรูพรุนด้วยโปรแกรม Semafore 5.21 โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนทั้งหมด 100 จุด และรายงานเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.3.7 การทดสอบความสามารถในการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกของโครงเลี้ยงเซลล์ในสัตว์ทดลอง

3.3.7.1 การเตรียมเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกของหนู (Rat bone marrow-derived mesenchymal stem cell, MSC)

การเตรียมเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกของหนูจะดำเนินการตามรายงานของ Takahashi, Y. และคณะ (2005) โดยสกัดเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกจากขาหลังของหนูวิสตา อายุ 3 สัปดาห์ โดยผ่าเอากระดูกต้นขาหลังของหนู เลาะเนื้อเยื่อออกให้สะอาด ตัดปลายของชิ้นกระดูกเพื่อเปิดช่องโพรงไขกระดูก จากนั้นใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 26 ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด α -MEM (Alpha-modified eagle medium ที่มี 15%FBS และ 50 U/ml penicillin streptomycin) 1 มิลลิลิตร ซะอาหารเลี้ยงเซลล์ผ่านชิ้นกระดูกหลายๆครั้งเพื่อชะไขกระดูกออกมาให้หมด ทำสารแขวนลอยให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยการฉีดพ่นซ้ำหลายๆครั้งและดูดีใส่จานเลี้ยงเซลล์ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาณ 10 มิลลิลิตรอยู่ เพาะเลี้ยงเซลล์โดยเลี้ยงในตู้บเพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์วันที่ 1 เพื่อกำจัดเซลล์ที่ไม่เกาะกับพื้นผิวของจานเลี้ยงเซลล์ จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์วันเว้นวัน จนกระทั่งเซลล์เติบโตเต็มจานเลี้ยง จากนั้นเซลล์จะถูกถ่ายลงจานใหม่ โดยการย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน-อีดีทีเอ ซึ่งจะย่อยเซลล์ให้หลุดออกจากพื้นผิวของจานเลี้ยง นับจำนวนเซลล์ด้วยแผ่นสไลด์นับเซลล์ (Hemocytometer) จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปเพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงชุดใหม่ที่ความหนาแน่นประมาณ 5×10^4 เซลล์/ตารางเซนติเมตร เมื่อเซลล์มีจำนวนมากขึ้นและมีการเรียงตัวหนาแน่นในจานเพาะเลี้ยง จึงทำการหว่านเซลล์ใหม่ทุก 5-7 วัน และนำเซลล์ passage ที่ 2 ไปใช้ในการทดสอบต่อไป

3.3.7.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์ลงบนโครงเลี้ยงเซลล์

เตรียมเซลล์ที่มีความหนาแน่น 41,666 เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิเมตรของโครงเลี้ยงเซลล์ จากนั้นเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดลงไปที่โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยก๊าซเอทิลีนออกไซด์ ด้วยวิธีการ agitation seeding ตามรายงานของ Takahashi, Y. และคณะ (2005) โดยการเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีในตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด α -MEM (Alpha-modified eagle medium ที่มี 15% FBS และ 50 U/ml penicillin streptomycin) จากนั้นนำโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ไปทำการฝังในสัตรีทลดองทันทดั่งหัวข้อที่ 3.3.7.4 และนำโครงเลี้ยงเซลล์อีกชุดหนึ่งไปวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ที่ยึดเกาะบนโครงเลี้ยงเซลล์ดังหัวข้อที่ 3.3.7.3

3.3.7.3 การทดสอบการยึดเกาะของเซลล์ ด้วยวิธี DNA assay

การทดสอบการยึดเกาะของเซลล์จะตรวจสอบปริมาณของเซลล์ภายหลังกระบวนการ agitation seeding โดยการวิเคราะห์ปริมาณ DNA ด้วยวิธีการตรวจวัดปริมาณสารเรืองแสง Hoechst 33258 ซึ่งเป็นสารที่สามารถแทรกเข้าไปในบริเวณ Double stand ของ DNA และตรวจวัดด้วยเครื่อง spectrofluorimeter [Takahashi, Y. และคณะ (2005)] โดยมีขั้นตอนดังนี้

การเตรียมสารละลายมาตรฐานของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก

- เตรียมสารละลายมาตรฐานของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกของหนูที่มีความหนาแน่นเซลล์ 2×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 5 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ เเทอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง
- เติม SDS lysis buffer และนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกจะแตกและปลดปล่อย DNA ออกมา
- เจือจางสารละลายมาตรฐานของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกให้มีความหนาแน่นของเซลล์เป็น 1×10^6 ถึง 1.5625×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

การเตรียมเซลล์จากโครงเลี้ยงเซลล์

- นำโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการ agitation seeding มาล้างด้วยสารละลาย PBS Buffer จากนั้นตัดโครงเลี้ยงเซลล์จนละเอียด
- เติม SDS lysis buffer และเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำตัวอย่างมาตั้งที่อุณหภูมิห้องเพื่อละลายผลึกน้ำแข็งในตัวอย่าง ทำซ้ำทั้งสิ้น 3 รอบ ผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นระหว่างการแช่แข็งตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจะช่วยให้เซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกของหนูเกิดการแตกมากขึ้น และปลดปล่อย DNA ออกจากเซลล์มากขึ้น

การเตรียมสารละลาย Hoechst 33258

- นำ Hoechst 33258 ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำปราศจากประจุปริมาณ 19 มิลลิลิตร และ SSC ปริมาณ 1 มิลลิลิตร

การวัดปริมาณ DNA

- นำสารละลายมาตรฐานของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกและสารตัวอย่างที่ผ่านการแช่แข็งตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาตั้งที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้สารทั้งสองละลายเป็นของเหลว จากนั้นเปิดสารแต่ละชนิดลงในภาด 96 หลุม ปริมาณ 100 ไมโครลิตร
- เติมสารละลาย Hoechst 33258 ลงไปในแต่ละหลุมปริมาณ 100 ไมโครลิตร
- วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrofluorimeter โดยช่วงความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้นที่ 355 นาโนเมตร และช่วงความยาวคลื่นของการแผ่รังสีที่ 460 นาโนเมตร
- วิเคราะห์ปริมาณเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกหนูในสารตัวอย่าง โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของค่าการดูดกลืนแสงและปริมาณเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกหนูในสารละลายมาตรฐานของเซลล์

3.3.8 การผ่าตัดฝังโครงเลี้ยงเซลล์ในหนูทดลอง

การทดสอบในสัตว์ทดลองจะดำเนินการภายใต้การอนุมัติจากคณะกรรมการจริยบรรณการใช้สัตว์ทดลอง คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลขที่ 1431073 (วันที่ 3 กันยายน พ.ศ. 2557) โดยทำการฝังชิ้นงาน ขนาด 2x2x6 มิลลิเมตร ลงในช่องกระดูกเรเดียส (Radius) ของหนูพันธุ์วิสตา (Wistar rat) อายุ 12 สัปดาห์ ซึ่งถูกตัดออกยาว 6 มิลลิเมตร ด้วย

เลื่อยไฟฟ้า (Oscilating saw) โดยรอยตัดมีลักษณะเรียบตรง ไม่ทำให้เกิดความเสียหายแก่เยื่อหุ้มกระดูกของปลายกระดูกขึ้นบนและล่าง โดยขนาดช่องว่างของกระดูกเรเดียสยาว 6 มิลลิเมตรนี้เป็นขนาดของ Critical size defect ซึ่งกระดูกเรเดียสของหนูทดลองจะไม่สามารถสร้างกระดูกใหม่เพื่อเติมเต็มช่องว่างได้อย่างสมบูรณ์ด้วยตัวเอง [Hollinger, J. O. และ Kleinschmidt, J. C. 1990] การทดสอบนี้ใช้หนูทดลองกลุ่มละ 3 ตัว โดยฝังโครงเลี้ยงเซลล์ 1 ชิ้นในขาซ้ายของหนูแต่ละตัว หนูทดลองได้รับการดูแลและให้อาหารตามหลักสากล [Ratanavaraporn, J. และคณะ 2012]

โดยกลุ่มที่ทำการศึกษาทั้งหมด 7 กลุ่ม ได้แก่

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม (sham)

กลุ่มที่ 2 โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาติน (CGSF)

กลุ่มที่ 3 โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (CGSF4)

กลุ่มที่ 4 โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิก (HSF)

กลุ่มที่ 5 โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ (CGSF with cells)

กลุ่มที่ 6 โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ (CGSF4 with cells)

กลุ่มที่ 7 โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิกที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ (HSF with cells)

ขั้นตอนการผ่าตัดหนูทดลอง

- วางยาสลบ Isoflurane แก่หนูวิศดำ โคนขนบริเวณต้นขาหลังด้วยปัตตาเลี่ยน และทำความสะอาดผิวหนังด้านนอกด้วยตัวสวาลละลายไอโอดีน
- กรีดมีดผ่าตัดลงบนผิวหนังของหนูทดลองตามแนวยาวของขาหน้าข้างซ้ายของหนู และเลาะตามร่องของกล้ามเนื้อจนพบกระดูกขา (Radius)
- วัดความยาวของบริเวณที่จะตัดด้วยไม้บรรทัดและ ตัดบริเวณกลางกระดูก (central of shaft diaphysis) ของกระดูก Radius ด้วยเลื่อยไฟฟ้า (Oscilating saw) ให้เป็นขนาดแผลเรียบตรง ความยาว 6 มิลลิเมตร

- ทำการฝังโครงเลี้ยงเซลล์สูตรที่ไม่ได้ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยก๊าซเอทิลีนออกไซด์แล้ว และโครงเลี้ยงเซลล์สูตรที่ผ่านการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกลงไปแทนที่ตำแหน่งกระดูกที่ถูกตัดออกไป
- เย็บปิดแผล

3.3.9 การทดสอบความสามารถในการเจริญเป็นเนื้อเยื่อกระดูกในสัตว์ทดลองด้วยการถ่ายภาพรังสี (X-ray)

การทดสอบความสามารถในการเจริญเป็นเนื้อเยื่อกระดูกในสัตว์ทดลองด้วยการถ่ายภาพด้วยรังสีจะดำเนินการภายหลังการฝังโครงเลี้ยงเซลล์ทันที เพื่อพิจารณารอยตัดและตำแหน่งที่ตัดกระดูก และทำการถ่ายภาพด้วยรังสี เพื่อตรวจการสร้างกระดูกใหม่ที่เวลา 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 สัปดาห์

3.3.10 การทดสอบความสามารถในการเจริญเป็นเนื้อเยื่อกระดูกในสัตว์ทดลองด้วยเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร (micro-CT)

เมื่อฝังโครงเลี้ยงเซลล์ในช่องว่างของกระดูกเรเดียสขาหน้าข้างซ้ายของหนูทดลองเป็นเวลา 12 สัปดาห์ หนูทดลองจะถูกทำให้เสียชีวิตโดยการรมด้วยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ และผ่าตัดซาก จากนั้นนำขาหน้าข้างซ้ายของหนูทดลองที่มีการฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไปแช่ในสารละลายฟอร์มาลีน ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร เพื่อคงสภาพของเนื้อเยื่อและกระดูกของหนูทดลอง จากนั้นจึงวิเคราะห์ความสามารถในการเจริญเป็นเนื้อเยื่อกระดูกในสัตว์ทดลองโดยการถ่ายภาพด้วยเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตรเพื่อเปรียบเทียบการสร้างกระดูกใหม่จากภาพสามมิติ ภายหลังการฝังโครงเลี้ยงเซลล์ 12 สัปดาห์

กระดูกเรเดียสของหนูทดลองจะถูกวัดความยาวของช่องว่างของกระดูก ด้วยโปรแกรม CT analysis โดยการลากเส้นความยาวจากปลายของกระดูกที่สร้างใหม่ส่วนต้นไปจรดส่วนปลายของกระดูกที่สร้างใหม่ส่วนปลายของภาพสามมิติที่ผ่านการถ่ายภาพด้วยเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร โดยทำการวัดช่วงที่แคบที่สุด จากนั้นทำการคำนวณค่าความหนาแน่นของเกลือแร่ในกระดูก (Bone mineral density, BMD) ในบริเวณส่วนต้นของกระดูกเรเดียสของหนูทดลอง ด้วยโปรแกรม CT analysis ซึ่งได้จากการเทียบความหนาแน่น (Density) ของกระดูกที่ตำแหน่งที่วัดได้กับค่าความหนาแน่นมาตรฐานที่วัดได้จากกระดูกเทียม (Phantom) โดยจะทำการวิเคราะห์

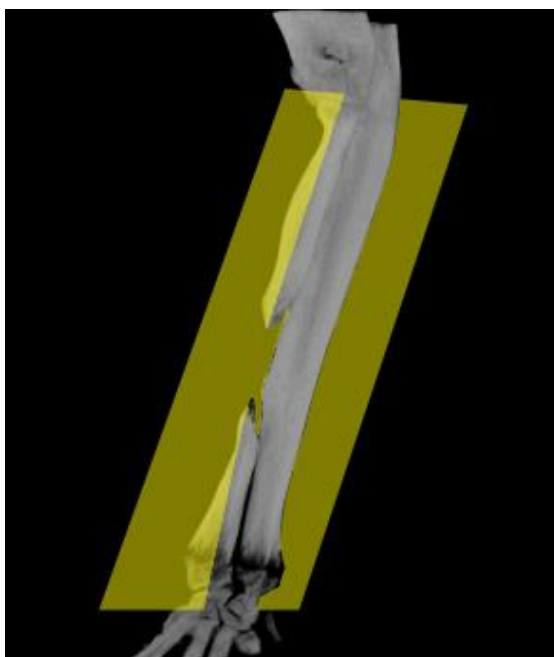
ในตำแหน่งที่กระดูกสร้างใหม่ และตำแหน่งของกระดูกปกติ (บริเวณเหนือกว่าตำแหน่งที่ฝังชิ้นงาน ประมาณ 6 มิลลิเมตร) จากนั้นจึงคำนวณค่าร้อยละของความหนาแน่นของเกลือแร่ในกระดูก (%Bone mineral density, % BMD) โดยการเปรียบเทียบค่าความหนาแน่นของเกลือแร่ในกระดูกที่สร้างใหม่ กับค่าความหนาแน่นของเกลือแร่ในกระดูกปกติ ดังสมการต่อไปนี้

$$\%BMD = \frac{\text{ค่าความหนาแน่นของเกลือแร่ในกระดูกที่สร้างใหม่}}{\text{ค่าความหนาแน่นของเกลือแร่ในกระดูกปกติ}} \times 100$$

นอกจากนี้ กระดูกเรเดียสทางส่วนต้นของหนูทดลองจะถูกวิเคราะห์หรือร้อยละของปริมาตรของกระดูกที่สร้างใหม่เทียบกับปริมาตรของเนื้อเยื่อที่สร้างใหม่ทั้งหมด (% Bone volume) เพื่อพิจารณาว่าในเนื้อเยื่อที่สร้างใหม่ มีเนื้อเยื่อกระดูกมากน้อยเพียงใด โดยนำปริมาตรของกระดูกที่สร้างใหม่ส่วนต้นของกระดูกเรเดียส (Bone volume, BV) มาหารด้วยปริมาตรของเนื้อเยื่อทั้งหมดในบริเวณกระดูกที่สร้างใหม่ส่วนต้นของกระดูกเรเดียส (Tissue volume, TV) และทำให้เป็นร้อยละ ซึ่งค่าทั้งหมดดังกล่าวถูกวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CT analysis โดยค่า % Bone volume จะเป็นค่าที่บ่งชี้ว่าในเนื้อเยื่อที่สร้างใหม่ มีเนื้อเยื่อกระดูกมากน้อยเพียงใด

3.3.11 การทดสอบความสามารถในการเจริญเป็นเนื้อเยื่อกระดูกในสัตว์ทดลองด้วยการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา

กระดูกขาหน้าข้างซ้ายและเนื้อเยื่อบริเวณของหนูทดลองที่ผ่านการแช่ในสารละลายฟอรัมาลีน ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร จะถูกนำไปกำจัดแคลเซียมออก (decalcification) โดยการแช่ในสารละลายกรดไนตริก ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร เป็นเวลาทั้งสิ้น 3 วัน เพื่อให้เนื้อเยื่อและกระดูกมีความอ่อนนุ่มมากพอที่จะตัดเป็นชิ้นได้ จากนั้นจึงผ่ากลางกระดูกเรเดียสและกระดูกอัลนาในแนวขนานกับความยาวของกระดูก ดังรูปที่ 3.2 จากนั้นนำชิ้นเนื้อทั้ง 2 ส่วนใส่ในบล็อกและแช่ในสารละลายพาราฟิน เพื่อทำชิ้นเนื้อจากพาราฟินบล็อก (paraffin-embedded specimen) จากนั้นนำชิ้นเนื้อเยื่อที่ผ่านการฝังในพาราฟินบล็อก มาตัดด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อ (rotary microtome) เพื่อให้ได้เนื้อเยื่อแผ่นบางๆสำหรับนำไปย้อมสี Hematoxylin and Eosin (H&E) และสี Masson's trichrome เพื่อดูลักษณะภายในของเนื้อเยื่อกระดูก ตัวอย่างทั้งหมดจะได้รับการประเมินโดยสัตวแพทย์สาขาพยาธิวิทยา โดยไม่ระบุชนิดตัวอย่างให้ทราบ (blind samples)



รูปที่ 3.2 ระนาบการตัดกระดูกเรเดียสและกระดูกอัลนา เพื่อทำชิ้นเนื้อจากพาราฟินบล็อก (paraffin-embedded specimen) สำหรับการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา

บทที่ 4

ผลการทดลอง และการวิเคราะห์ผลการทดลอง

4.1 โครงสร้างพื้นฐานของโครงเลี้ยงเซลล์

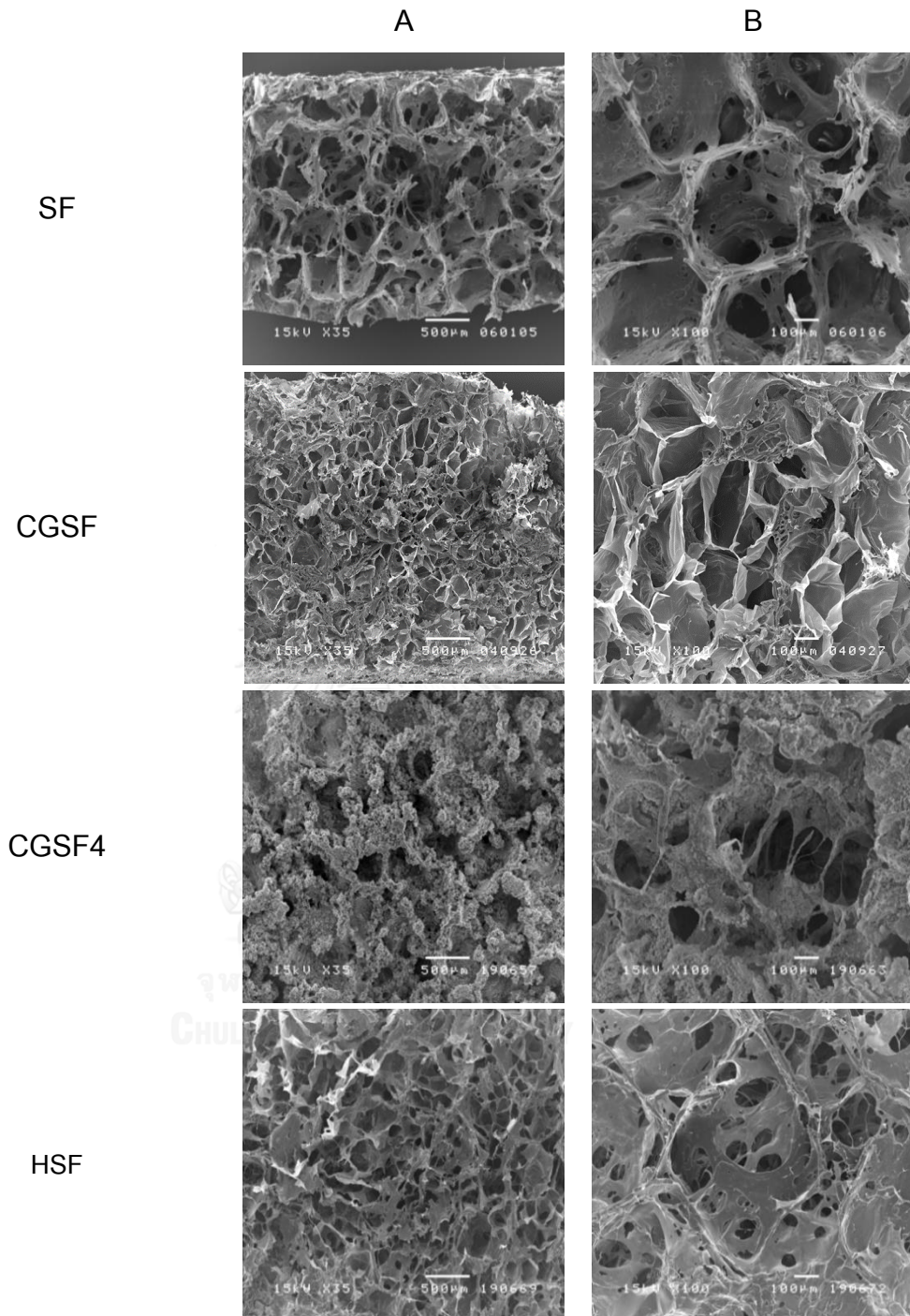
การวิเคราะห์โครงสร้างพื้นฐานของโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 3 ชนิด เทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ได้ผลของลักษณะโครงสร้างรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ดังแสดงในรูปที่ 4.1 และขนาดรูพรุนเฉลี่ยของโครงเลี้ยงเซลล์ดังสรุปในตารางที่ 4.1 จากการวิเคราะห์พบว่า ลักษณะโครงสร้างพื้นฐานของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทย (SF) มีรูพรุนเชื่อมต่อกันเป็นเครือข่าย มีความพรุนสม่ำเสมอ พื้นผิวภายในเรียบ โดยขนาดรูพรุนเฉลี่ยของโครงเลี้ยงเซลล์เท่ากับ 511 ± 40 ไมโครเมตร ซึ่งเล็กกว่าขนาดอนุภาคของเกล็ด $600-710$ ไมโครเมตร ที่นำมาใช้เป็นสารที่ทำให้เกิดรูพรุน (รูปที่ 4.2) เมื่อเปรียบเทียบขนาดรูพรุนเฉลี่ยของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยนี้กับขนาดรูพรุนเฉลี่ยของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เคยมีการรายงาน พบว่า ขนาดรูพรุนเฉลี่ยของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยมีขนาดเล็กกว่าขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยจากรายงานของ Chamchongkaset, J. และคณะ (2008) และ Wongputtaraksa, T. และคณะ (2012) ซึ่งพบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่ผลิตโดยวิธีการกำจัดเกล็ดออก มีขนาดรูพรุนเฉลี่ย 557 ± 54 ไมโครเมตร และ 570 ± 52 ไมโครเมตร ตามลำดับ

โครงสร้างพื้นฐานของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอลลอยด์ด้วยเจลาติน (CGSF) มีลักษณะรูพรุนขนาดเล็ก ซึ่งเกิดจากสารละลายเจลาตินที่เข้าไปแทรกอยู่ภายในรูพรุนขนาดใหญ่ของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยและถูกทำให้แห้งด้วยความเย็น จึงเกิดเป็นรูพรุนขนาดเล็กเชื่อมโยงเป็นเครือข่ายภายในรูพรุนเดิมของโครงเลี้ยงเซลล์ใหม่ไทยที่เตรียมโดยวิธีกำจัดเกล็ด โดยขนาดรูพรุนเฉลี่ยของโครงเลี้ยงเซลล์เท่ากับ 351 ± 65 ไมโครเมตร ซึ่งเล็กกว่ารูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอลลอยด์ด้วยเจลาตินของ Tungtasana, H (2010) ที่รายงานขนาดรูพรุนเฉลี่ยเท่ากับ 485 ± 42 ไมโครเมตร

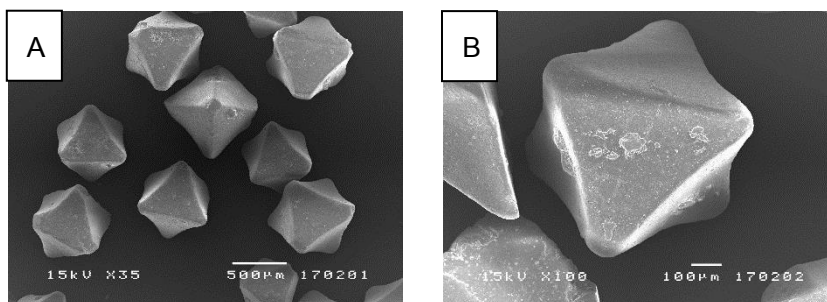
ในขณะที่โครงสร้างพื้นฐานของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอลลอยด์ด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (CGSF4) มีลักษณะการสร้างผนังรูพรุนใหม่ เกิดเป็นรูพรุนขนาดเล็กเชื่อมโยงเป็นเครือข่ายภายในรูพรุนเดิมเช่นเดียวกับพื้นฐานของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่

ไทยที่ค่อนจุกด้วยเจลาติน และยังพบการสะสมผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์บนพื้นผิวรูพรุนของโครง
 เลียงเซลล์ ทำให้พื้นผิวโครงเลียงเซลล์มีลักษณะขรุขระ ไม่เรียบ โดยขนาดรูพรุนเฉลี่ยของโครง
 เลียงเซลล์เท่ากับ 242 ± 45 ไมโครเมตร และมีร้อยละโดยน้ำหนักของไฮดรอกซีอะพาไทต์ในโครง
 เลียงเซลล์เท่ากับร้อยละ 39.76 ซึ่งมีขนาดรูพรุนเฉลี่ยเล็กกว่าและมีร้อยละโดยน้ำหนักของ
 ไฮดรอกซีอะพาไทต์น้อยกว่าโครงเลียงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่ค่อนจุกด้วยเจลาตินความ
 เข้มข้นร้อยละ 0.5 น้ำหนักต่อปริมาตรและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ของ Tungtasana, H. (2010)
 ที่รายงานขนาดรูพรุนเฉลี่ยเท่ากับ 286 ± 82 ไมโครเมตรและมีร้อยละโดยน้ำหนักของไฮดรอกซี-
 อะพาไทต์ในโครงเลียงเซลล์เท่ากับร้อยละ 45 (อัตราส่วนระหว่างสารอินทรีย์ (ไฟโบรอินไหมไทย
 และเจลาติน) ต่อสารอนินทรีย์ (ไฮดรอกซีอะพาไทต์) ในโครงเลียงเซลล์เท่ากับ $55 \pm 0.40 : 45 \pm$
 0.40)

โครงสร้างพื้นฐานของโครงเลียงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยา-
 ลูรอนิก (HSF) มีลักษณะเป็นรูพรุนคล้ายกำแพง ซึ่งเกิดจากกรดไฮยาลูรอนิกเข้าไปอยู่ภายใน
 รูพรุนของโครงเลียงเซลล์ไหมไทยที่เตรียมโดยวิธีกำจัดเกลือออก เกิดเป็นรูพรุนขนาดเล็ก มีขนาด
 รูพรุนเฉลี่ยเท่ากับ 235 ± 63 ไมโครเมตร



รูปที่ 4.1 ลักษณะโครงสร้างพื้นฐานของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย (SF) โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจุกต์ด้วยเจลาติน (CGSF) โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจุกต์ด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (CGSF4) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิก (HSF) (A) สเกลบาร์เท่ากับ 500 ไมโครเมตร (B) สเกลบาร์เท่ากับ 100 ไมโครเมตร



รูปที่ 4.2 ลักษณะอนุภาคของผลึกเกลือ (NaCl) ขนาด 600-710 ไมโครเมตร ที่ใช้เป็นสารที่ทำให้เกิดรูพรุนในโครงเลี้ยงเซลล์ (A) สเกลบาร์เท่ากับ 500 ไมโครเมตร (B) สเกลบาร์เท่ากับ 100 ไมโครเมตร

ตารางที่ 4.1 ขนาดรูพรุนเฉลี่ยและอัตราส่วนระหว่างสารอินทรีย์ต่อสารอนินทรีย์ของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย (SF) โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจุกต์ด้วยเจลาติน (CGSF) โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจุกต์ด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (CGSF4) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิก (HSF)

โครงเลี้ยงเซลล์	ร้อยละของสารประกอบ โดยน้ำหนัก	ขนาดรูพรุนเฉลี่ย
SF	ไฟโบรอินไหมไทย 100%	511±40 μm
CGSF	ไฟโบรอินไหมไทย 92.45% เจลาติน 7.55%	351±65 μm
CGSF4	ไฟโบรอินไหมไทย 56.36% เจลาติน 3.88% ไฮดรอกซีอะพาไทต์ 39.76%	242±45 μm
HSF	ไฟโบรอินไหมไทย 78.03% กรดไฮยาลูรอนิก 21.97%	235±63 μm

4.2 การทดสอบปริมาณเซลล์ที่ยึดเกาะบนโครงเลี้ยงเซลล์ก่อนทำการฝังในสัตว์ทดลอง

เซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกจากหนูวิสต้าถูกเพาะเลี้ยงลงบนโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีความหนาแน่น 1×10^6 เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์ (41,666 เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิเมตร) ภายใต้การสั่น (agitation seeding) เป็นเวลา 6 ชั่วโมงก่อนทำการฝังโครงเลี้ยงเซลล์ลงในสัตว์ทดลอง แต่เนื่องจากในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเซลล์อาจมีเซลล์ที่ไม่สามารถยึดเกาะบนโครงเลี้ยงเซลล์ จึงต้องมีการตรวจวัดปริมาณของเซลล์ที่ยึดเกาะได้จริงบนโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธี DNA assay จากผลการวิเคราะห์แสดงดังตารางที่ 4.2 พบว่า ปริมาณเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกที่สามารถยึดเกาะบนพื้นผิวของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาติน (CGSF) โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (CGSF4) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิก (HSF) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีปริมาณเซลล์เท่ากับ $10.36 \pm 0.67 \times 10^4$ เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์, $10.64 \pm 0.27 \times 10^4$ เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์ และ $14.11 \pm 4.07 \times 10^4$ เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์ ตามลำดับ แต่ปริมาณเซลล์ที่ยึดเกาะมีน้อยกว่าของ Vachiraroj, N. และคณะ (2009) ที่รายงานปริมาณเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกหนูที่ยึดเกาะบนโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาติน และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์โดยประมาณ $3.50 - 8.00 \times 10^5$ เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์ (จากความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น 2,632 เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิเมตร) อีกทั้งยังน้อยกว่าของ Wongputtaraksa, T. และคณะ (2012) ที่รายงานปริมาณเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกหนูที่ยึดเกาะบนโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาติน และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์โดยประมาณ $2.00 - 2.50 \times 10^5$ เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์ (จากความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น 2,212 เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิเมตร)

ตารางที่ 4.2 จำนวนเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกที่ยึดเกาะและร้อยละการยึดเกาะของเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาติน (CGSF) โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (CGSF4) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิก (HSF) ภายหลังจากเพาะเลี้ยงแบบสั้นเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเซลล์ธรรมดาที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO₂ (จำนวนเซลล์เริ่มต้นที่เพาะเลี้ยง 1×10⁶ เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์ หรือ 41,666 เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิเมตร)

โครงเลี้ยงเซลล์	ปริมาณเซลล์ที่ยึดเกาะ (×10 ⁴ เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์)	ร้อยละการยึดเกาะ
CGSF	10.36±0.67 ^a	10.36±0.67%
CGSF4	10.64±0.27 ^a	10.64±0.27%
HSF	14.11±4.07 ^a	14.11±4.07%

(a) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ, p>0.05)

4.3 ผลการทดสอบความสามารถในการเจริญเป็นเนื้อเยื่อกระดูกในสัตว์ทดลองด้วยการถ่ายภาพรังสี (X-ray)

เมื่อทำการฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาติน (CGSF) โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (CGSF4) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิก (HSF) ทั้งกลุ่มที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกและกลุ่มที่ไม่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ ลงในช่องว่างตรงกึ่งกลางกระดูกกระดูกเรเดียส (radius) ข้างซ้ายของหนูทดลอง และถ่ายภาพด้วยรังสีเพื่อติดตามการเจริญของกระดูกที่ระยะเวลาต่างๆ เทียบกับกลุ่มควบคุม (sham) ซึ่งไม่มีการใส่โครงเลี้ยงเซลล์ในช่องว่างกระดูก ได้ผลการวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 4.3 และตารางที่ 4.4 โดยพบว่าภาพถ่ายรังสีภายหลังจากผ่าตัดฝังโครงเลี้ยงเซลล์ แสดงรอยตัดบริเวณกึ่งกลางของกระดูกเรเดียสโดยรอยตัด มีลักษณะเรียบตรง ขนาดยาว 6 มิลลิเมตร ทั้งนี้ไม่สามารถมองเห็นโครงเลี้ยงเซลล์ได้ในภาพถ่ายรังสี



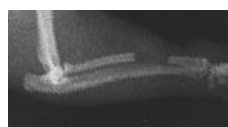




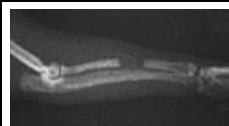
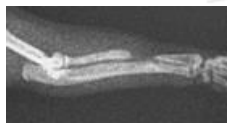
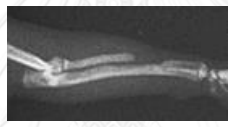
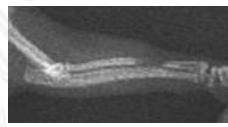
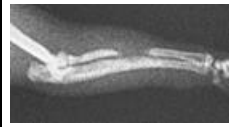







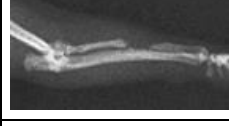








เมื่อพิจารณาภาพถ่ายรังสีภายหลังจากผ่าตัดฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาติน (CGSF) โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (CGSF4) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิก (HSF) เทียบกับกลุ่มควบคุม (sham) ที่เวลาต่างๆ พบว่า เกิดการสร้างกระดูกใหม่จากบริเวณรอยตัดกระดูกทางส่วนต้น (proximal) ของกระดูกในหนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 3 ชนิดและกลุ่มควบคุม การสร้างกระดูกใหม่ทางส่วนต้นนี้มีลักษณะเป็นปลายแหลมยื่น ออกจากรอยตัดกระดูกเดิมที่มีลักษณะเรียบตรง โดยเริ่มพบการสร้างกระดูกใหม่ในสัปดาห์ที่ 4 ภายหลังจากฝังโครงเลี้ยงเซลล์ พบเช่นเดียวกับการสร้างกระดูกใหม่ในกลุ่มควบคุม (ไม่มีการฝังโครงเลี้ยงเซลล์) เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบภาพถ่ายรังสีของหนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 3 ชนิด พบว่า การสร้างกระดูกใหม่ในหนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาติน (CGSF) โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (CGSF4) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิก (HSF) มีความคล้ายกัน ไม่มีความแตกต่างจากภาพถ่ายรังสี

เมื่อพิจารณาภาพถ่ายรังสีภายหลังจากผ่าตัดฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (CGSF with cells) โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (CGSF4 with cells) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิกที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (HSF with cells) เทียบกับกลุ่มควบคุม (sham) ที่เวลาต่างๆ (ตารางที่ 4.4) พบว่า ในหนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (CGSF with cells) โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิกที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (HSF with cells) และกลุ่มควบคุม เกิดการสร้างกระดูกใหม่จากบริเวณรอยตัดกระดูกทางส่วนต้นของกระดูกในลักษณะเป็นปลายแหลมยื่น ออกจากรอยตัดกระดูกเดิม เช่นเดียวกับการสร้างกระดูกใหม่ของหนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยเริ่มพบการสร้างกระดูกใหม่ในสัปดาห์ที่ 4 ภายหลังจากฝังโครงเลี้ยงเซลล์ และไม่พบความแตกต่างของการสร้างกระดูกใหม่ในหนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้ง 2 ชนิดเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ทั้งนี้ไม่พบการสร้างกระดูกใหม่ในหนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (CGSF4 with cells) อนึ่ง ผลการวิเคราะห์



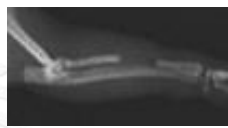


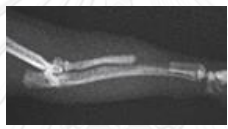







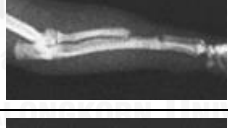


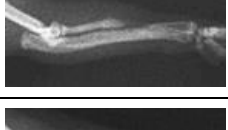


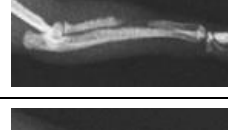
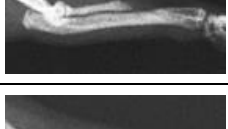

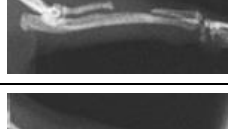
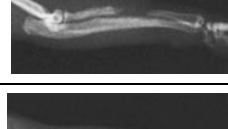




ในกลุ่มนี้ได้จากจำนวนของหนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วย เจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (CGSF4 with cells) เพียง 1 ตัวเท่านั้น (เนื่องจากสูญเสียหนูทดลองไปในระหว่างการผ่าตัด 1 ตัว และพบ การสลายของกระดูกเรเดียสส่วนต้นในหนูทดลองอีกตัวหนึ่ง) ในขณะที่ผลการวิเคราะห์ในกลุ่ม อื่นๆ ได้จากการวิเคราะห์หนูทดลองจำนวน 3 ตัว (n=3) ผลการวิเคราะห์ในกลุ่มโครงเลี้ยงเซลล์ ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (CGSF4 with cells) จึงมีความน่าเชื่อถือต่ำกว่ากลุ่มอื่นๆ

เมื่อเปรียบเทียบผลของการเพาะเลี้ยงเซลล์ในโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดเดียวกัน ทั้งกรณี โครง เลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาติน (CGSF และ CGSF with cells) และโครง เลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิก (HSF และ HSF with cells) ภาย หลังการฝังที่ช่วงเวลาเดียวกัน พบว่า การสร้างกระดูกใหม่ไม่แตกต่างกัน หนึ่ง ไม่สามารถ พิจารณาเปรียบเทียบภาพถ่ายรังสีภายหลังการผ่าตัดฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่ คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (CGSF4) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิด จากไขกระดูก (CGSF4 with cells) ได้ เนื่องจากจำนวนหนูทดลองในกลุ่มโครงเลี้ยงเซลล์ ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (CGSF4 with cells) มีเพียง 1 ตัวดังกล่าวแล้วข้างต้น

ตารางที่ 4.3 ภาพถ่ายรังสีภายหลังจากผ่าตัดฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วย เจลาติน (CGSF) โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (CGSF4) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิก (HSF) ในกระดูกเรเดียสของหนูทดลอง ที่เวลาต่างๆ เทียบกับกลุ่มควบคุม (sham) ซึ่งไม่มีการฝังโครงเลี้ยงเซลล์ในช่องว่างกระดูก

โครงเลี้ยง เซลล์	SHAM	CGSF	CGSF4	HSF
ภายหลัง การผ่าตัด ทันที				
สัปดาห์ที่ 2				
สัปดาห์ที่ 4				
สัปดาห์ที่ 6				
สัปดาห์ที่ 8				
สัปดาห์ที่ 10				
สัปดาห์ที่ 12				

ตารางที่ 4.4 ภาพถ่ายรังสีภายหลังจากผ่าตัดฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจูเกตด้วย เจลาตินที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (CGSF with cells) โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (CGSF4 with cells) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิคที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (HSF with cells) ในกระดูกเรเดียสของหนูทดลอง ที่เวลาต่างๆ เทียบกับกลุ่มควบคุม (sham) ซึ่งไม่มีการฝังโครงเลี้ยงเซลล์ในช่องว่างกระดูก

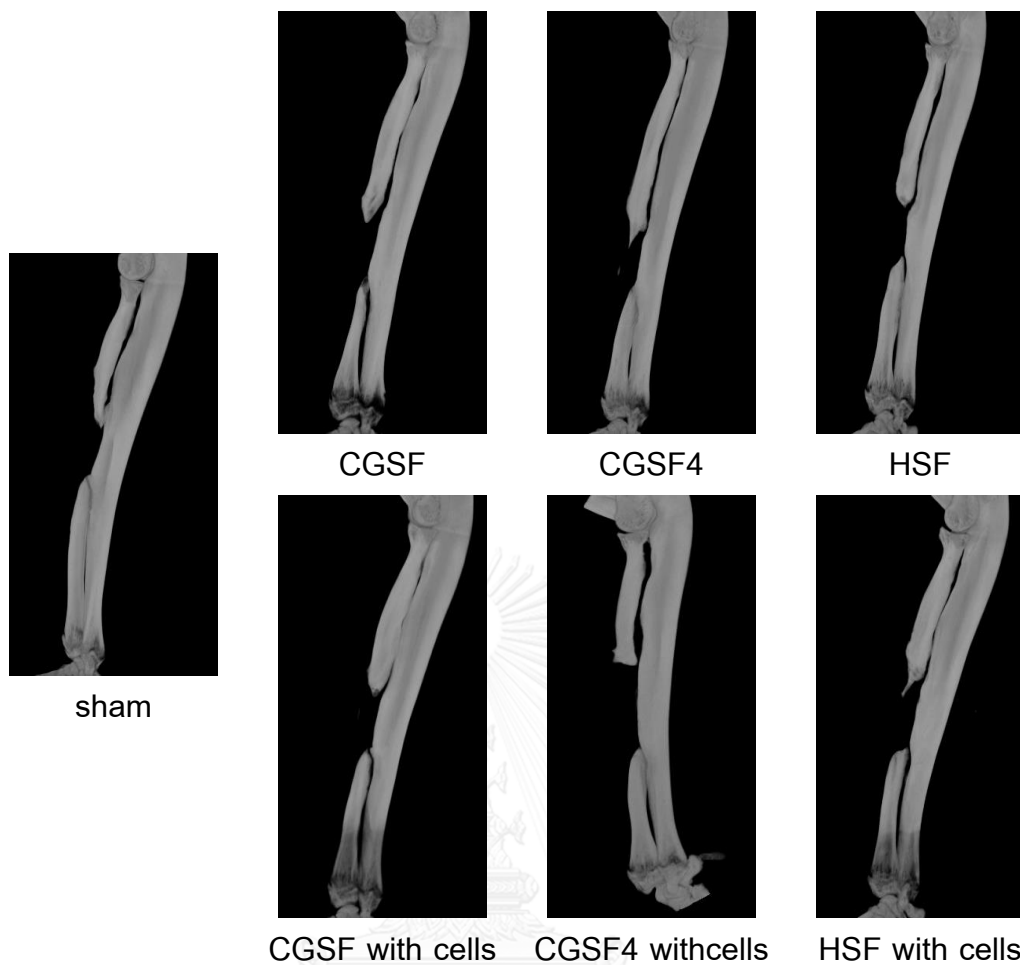
โครงเลี้ยงเซลล์	SHAM	CGSF with cells	CGSF4 with cells	HSF with cells
ภายหลังการผ่าตัดทันที				
สัปดาห์ที่ 2				
สัปดาห์ที่ 4				
สัปดาห์ที่ 6				
สัปดาห์ที่ 8				
สัปดาห์ที่ 10				
สัปดาห์ที่ 12				

4.4 ผลการทดสอบความสามารถในการเจริญเป็นเนื้อเยื่อกระดูกในสัตว์ทดลองด้วยเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร (micro-CT)

เมื่อทำการฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาติน (CGSF) โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (CGSF4) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิก (HSF) ทั้งกลุ่มที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกและกลุ่มที่ไม่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ ลงในช่องว่างตรงกึ่งกลางกระดูกกระดูกเรเดียส (radius) ข้างซ้ายของหนูทดลอง เป็นเวลา 12 สัปดาห์ หนูทดลองในกลุ่มที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์และกลุ่มควบคุม (sham) ถูกทำให้เสียชีวิตด้วยการรวมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และนำขาหน้าของหนูทดลองไปถ่ายภาพด้วยเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร เพื่อวิเคราะห์การสร้างใหม่ของกระดูกขาหน้า (กระดูกเรเดียส) ผลการวิเคราะห์แสดงในรูปที่ 4.3 ซึ่งพบว่า โดยส่วนมากเกิดการสร้างกระดูกใหม่จากบริเวณรอยตัดกระดูกทั้งส่วนต้น (proximal) และส่วนปลาย (distal) ของกระดูก การสร้างกระดูกใหม่นี้มีลักษณะเป็นปลายแหลมยื่นออกจากรอยตัดกระดูกที่เดิมมีลักษณะเรียบตรง ทั้งนี้ไม่สามารถมองเห็นโครงเลี้ยงเซลล์ได้ในภาพที่ถ่ายภาพด้วยเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร

เมื่อพิจารณาการสร้างกระดูกใหม่เฉพาะส่วนต้นของกระดูกเรเดียส พบว่า เกิดการสร้างกระดูกใหม่ทั้ง 6 กลุ่มทดลอง ยกเว้นหนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (CGSF4 with cells) ซึ่งพบว่ากระดูกเรเดียสส่วนต้นไม่เกิดการสร้างใหม่ ลักษณะรอยตัดยังเรียบตรงอยู่ โดยผลที่ได้นี้สอดคล้องกับภาพถ่ายรังสีในหัวข้อ 4.3 ข้างต้น

เมื่อพิจารณาการสร้างกระดูกใหม่เฉพาะส่วนปลายของกระดูกเรเดียส พบว่า กระดูกมีการสร้างใหม่ โดยมีทิศทางการสร้างเข้าหากระดูกอัลนา (ulna) ซึ่งอยู่ข้างกระดูกเรเดียส และพบการเชื่อมต่อของกระดูกที่สร้างใหม่กับกระดูกอัลนาในบางกลุ่มทดลอง ซึ่งแสดงว่ากระดูกเรเดียสส่วนปลายไม่มีความแข็งแรงมากพอจะรับน้ำหนักกดทับจากการเคลื่อนที่ของหนูทดลองได้ กระดูกที่สร้างใหม่จึงมีทิศทางการสร้างที่เบนเข้าหากระดูกอัลนาและเกิดการเชื่อมต่อกัน เพื่อถ่ายเทน้ำหนักกดทับจากการเคลื่อนที่ของหนูทดลองสู่กระดูกอัลนา

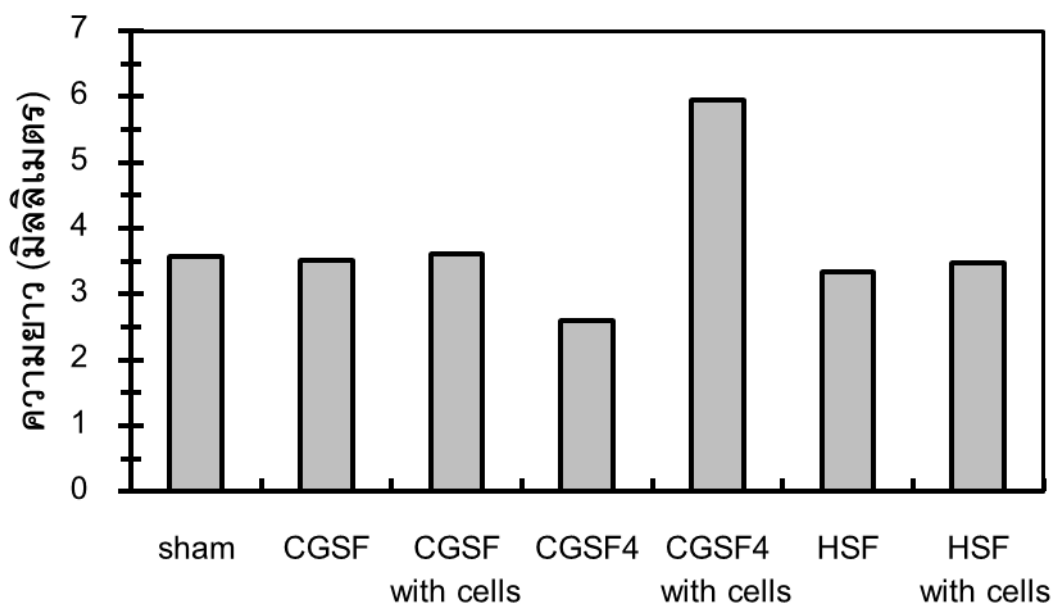


รูปที่ 4.3 ภาพสามมิติที่ได้จากการถ่ายภาพด้วยเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร (micro-CT) ภายหลังจากการผ่าตัดฝังโครงเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาติน (CGSF) โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (CGSF4) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิก (HSF) โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (CGSF with cells) โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (CGSF4) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิกที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (HSF with cells) เทียบกับกลุ่มควบคุม (sham)

4.4.1 ความยาวของช่องว่างของกระดูก

จากภาพสามมิติที่ผ่านการถ่ายภาพด้วยเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร ในรูปที่ 4.3 สามารถวิเคราะห์ความยาวของช่องว่างของกระดูกได้ถูกวัดด้วยโปรแกรม CT analysis โดยการลากเส้นความยาวจากปลายของกระดูกที่สร้างใหม่ส่วนต้นไปจรดส่วนปลายของกระดูกที่สร้างใหม่ส่วนปลาย โดยทำการวัดช่วงที่แคบที่สุด รูปที่ 4.4 แสดงความยาวของช่องว่างของกระดูกขาหน้าของหนูทดลองที่ได้รับการฝังโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 6 ประเภท เทียบกับกลุ่มควบคุม ภายหลังจากผ่าตัดฝังโครงเลี้ยงเซลล์ลงในช่องว่างของกระดูกขนาด 6 มิลลิเมตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า หนูทดลองกลุ่มควบคุมมีความยาวของช่องว่างกระดูกเท่ากับ 3.58 มิลลิเมตร โดยมีความยาวใกล้เคียงกับความยาวของช่องว่างกระดูกในหนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์กลุ่มอื่นๆ ยกเว้นหนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (CGSF4) ซึ่งมีความยาวของช่องว่างกระดูกน้อยที่สุดเท่ากับ 2.61 มิลลิเมตร และน้อยกว่าความยาวของช่องว่างกระดูกในหนูทดลองกลุ่มควบคุม

อนึ่ง ในหนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (CGSF4 with cells) มีความยาวของช่องว่างของกระดูกมากที่สุด คือเท่ากับ 5.9 มิลลิเมตร ซึ่งใกล้เคียงกับความยาวของช่องว่างกระดูกที่ถูกตัดออกก่อนทำการฝังโครงเลี้ยงเซลล์ ทั้งนี้ จำนวนของหนูทดลองที่ทำการฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (CGSF4 with cells) และถูกวิเคราะห์ความยาวของช่องว่างของกระดูกมีเพียง 1 ตัวดังที่กล่าวไว้ข้างต้น



รูปที่ 4.4 ความยาวของช่องว่างของกระดูกเรเดียสของหนูทดลองภายหลังการผ่าตัดฝังโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 6 กลุ่ม เป็นเวลา 12 สัปดาห์ เทียบกับกลุ่มควบคุม (sham) วัดจากภาพสามมิติที่ผ่านการถ่ายภาพด้วยด้วยเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร

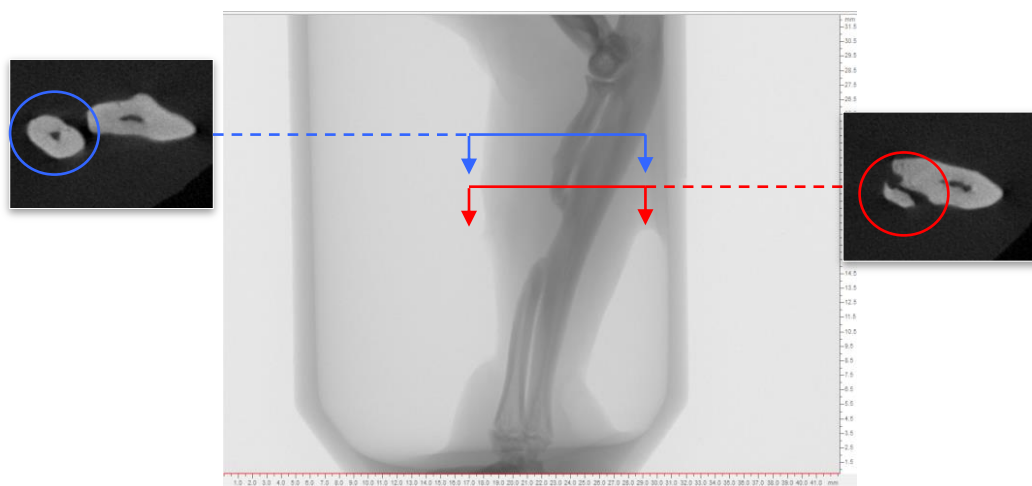
4.4.2 ค่าร้อยละของความหนาแน่นของเกลือแร่ในกระดูก (% Bone mineral density, % BMD) และร้อยละของปริมาตรของกระดูกที่สร้างใหม่เทียบกับปริมาตรของเนื้อเยื่อที่สร้างใหม่ทั้งหมด (% Bone volume)

ผลการวิเคราะห์ด้วยภาพสามมิติจากเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตรของกระดูกเรเดียสของหนูทดลองได้ถูกนำมาวิเคราะห์ค่าร้อยละของความหนาแน่นของเกลือแร่ในกระดูก (% Bone mineral density, % BMD) โดยคำนวณจากสัดส่วนค่าความหนาแน่นของเกลือแร่ในกระดูก (BMD) ในตำแหน่งของกระดูกที่สร้างใหม่ทางส่วนต้นของกระดูกเรเดียสเทียบกับค่าความหนาแน่นของเกลือแร่ในกระดูกเรเดียสปกติ (ส่วนที่ไม่ได้ตัดช่องว่างของกระดูก) ดังรูปที่ 4.5 ผลการวิเคราะห์ค่า % BMD ของหนูทดลองที่ได้รับการฝังโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 6 ประเภท เทียบกับกลุ่มควบคุม (Sham) แสดงในรูปที่ 4.6 พบว่า หนูทดลองกลุ่มควบคุม มี % BMD เท่ากับร้อยละ 51.89 และหนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (CGSF4) มี % BMD ของกระดูกที่สร้างใหม่ด้านส่วนต้นกระดูก เทียบกับกระดูกปกติสูงที่สุดถึงร้อยละ 66.44 และสูงกว่าในกลุ่มควบคุม ซึ่งแสดงว่ากระดูกที่สร้างใหม่นี้มี

ความหนาแน่นของเกลือแร่ในกระดูกใกล้เคียงกับกระดูกปกติมากที่สุด ค่า % BMD นี้แสดงถึงคุณภาพของกระดูกที่สร้างใหม่ ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (CGSF4) สามารถชักนำให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ได้ดีที่สุด

เมื่อพิจารณา ค่า % BMD ของหนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาติน (CGSF) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินที่ผ่านการเพาะ เลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (CGSF with cells) จะพบว่ามีค่าเท่ากับร้อยละ 19.17 และ 35.73 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์ลงบนโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาติน (CGSF) มีผลต่อการเพิ่มความหนาแน่นของเกลือแร่ในกระดูก แต่เมื่อพิจารณาค่า % BMD ของหนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิก (HSF) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิกที่ผ่านการเพาะ เลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (HSF with cells) พบว่า ทั้งสองกลุ่มมี % BMD ไม่แตกต่างกัน โดยมีค่า %BMD เท่ากับร้อยละ 40.77 และ 37.03 ตามลำดับ ทั้งนี้ น่าจะเนื่องมาจากกระบวนการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิกนั้นไม่ได้มีการเชื่อมขวางกรดไฮยาลูรอนิกกับโครงเลี้ยงเซลล์ และกรดไฮยาลูรอนิกเป็นสารที่มีความชอบน้ำสูง ละลายน้ำได้ง่าย กรดไฮยาลูรอนิกจึงสามารถละลายออกจากโครงเลี้ยงเซลล์ในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเซลล์ก่อนนำไปฝังในหนูทดลอง โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิกที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกจึงอาจไม่มีกรดไฮยาลูรอนิกเหลืออยู่ในโครงเลี้ยงเซลล์ดังกล่าว ซึ่งกรดไฮยาลูรอนิกเป็นสารที่มีรายงานว่า มีผลต่อการกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ (Osteoinduction) ในสัตว์ทดลอง [Sasaki, T. และ Watanabe, C. (1995), Yoshigawa, M. และคณะ (2007) และ Loken, S. และคณะ (2008)] ผลการวิเคราะห์ที่ได้จึงใกล้เคียงกับกลุ่มโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิก (HSF) นอกจากนี้ เซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกที่เพาะเลี้ยงลงบนโครงเลี้ยงเซลล์นั้น คัดแยกได้จากหนูทดลองอีกตัวหนึ่งซึ่งไม่ใช่หนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ เซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกนี้จึงเป็นเซลล์ที่ปลูกถ่ายชนิด allograft ซึ่งอาจกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของหนูทดลองและอาจไม่มีความสามารถในการเปลี่ยนไปเป็นเซลล์กระดูกได้ การเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกลงบนโครงเลี้ยงเซลล์ก่อนการฝังในหนูทดลองในการศึกษานี้จึงไม่เห็นผลกระทบต่อส่งเสริมการสร้างของกระดูกใหม่อย่างมีนัยสำคัญ

อนึ่ง โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (CGSF4 with cells) ไม่สามารถคำนวณค่า % BMD ได้ ดังเหตุผลที่กล่าวไว้ในหัวข้อ 4.4.1



รูปที่ 4.5 ตำแหน่งระนาบตัดขวางของภาพสามมิติจากเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตรและภาพตัดขวางที่ได้ของกระดูกที่สร้างใหม่ทางส่วนต้นของกระดูกเรเดียส (ในวงกลมสีแดง) และกระดูกเรเดียสปกติในส่วนที่ไม่ได้ตัดช่องว่างของกระดูก (ในวงกลมสีน้ำเงิน) ที่ใช้วิเคราะห์ค่าร้อยละของความหนาแน่นของเกลือแร่ในกระดูก (% Bone mineral density, % BMD)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ผลการวิเคราะห์ร้อยละของปริมาตรของกระดูกที่สร้างใหม่เทียบกับปริมาตรของเนื้อเยื่อที่สร้างใหม่ทั้งหมด (% Bone volume) ที่คำนวณได้จากการนำปริมาตรของกระดูกที่สร้างใหม่ส่วนต้นของกระดูกเรเดียส (Bone volume, BV) มาหารด้วยปริมาตรของเนื้อเยื่อทั้งหมดในบริเวณกระดูกที่สร้างใหม่ส่วนต้นของกระดูกเรเดียส (Tissue volume, TV) ซึ่งค่าดังกล่าวถูกวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CT analysis โดยค่า % Bone volume จะเป็นค่าที่บ่งชี้ว่าในเนื้อเยื่อที่สร้างใหม่ มีเนื้อเยื่อกระดูกมากน้อยเพียงใด จากรูปที่ 4.7 ซึ่งแสดง % Bone volume ของกระดูกที่สร้างใหม่ทางส่วนต้นของกระดูกเรเดียสของหนูทดลองที่ได้รับการฝังโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 6 ประเภท เทียบกับกลุ่มควบคุม ภายหลังจากผ่าตัดฝังโครงเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า กลุ่มควบคุมมี % Bone volume เท่ากับร้อยละ 77.20 และหนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (CGSF with cells) มี %

Bone volume มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มทดลองอื่นๆ โดยมีค่าเท่ากับร้อยละ 82.00 ซึ่งมีค่ามากกว่าในกลุ่มควบคุมด้วย ค่า % Bone volume นี้แสดงถึงปริมาณของกระดูกที่สร้างใหม่ ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า หนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (CGSF with cells) มีปริมาณของกระดูกที่สร้างใหม่มากที่สุด รองลงมาคือ หนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (CGSF4) ซึ่งมี % Bone volume เท่ากับร้อยละ 77.81 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม อนึ่ง หนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิกที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (HSF with cells) มีค่า % Bone volume น้อยที่สุดเท่ากับร้อยละ 45.60 และน้อยกว่ากลุ่มควบคุม ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า หนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิกที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (HSF with cells) มีปริมาณของกระดูกที่สร้างใหม่น้อยที่สุด

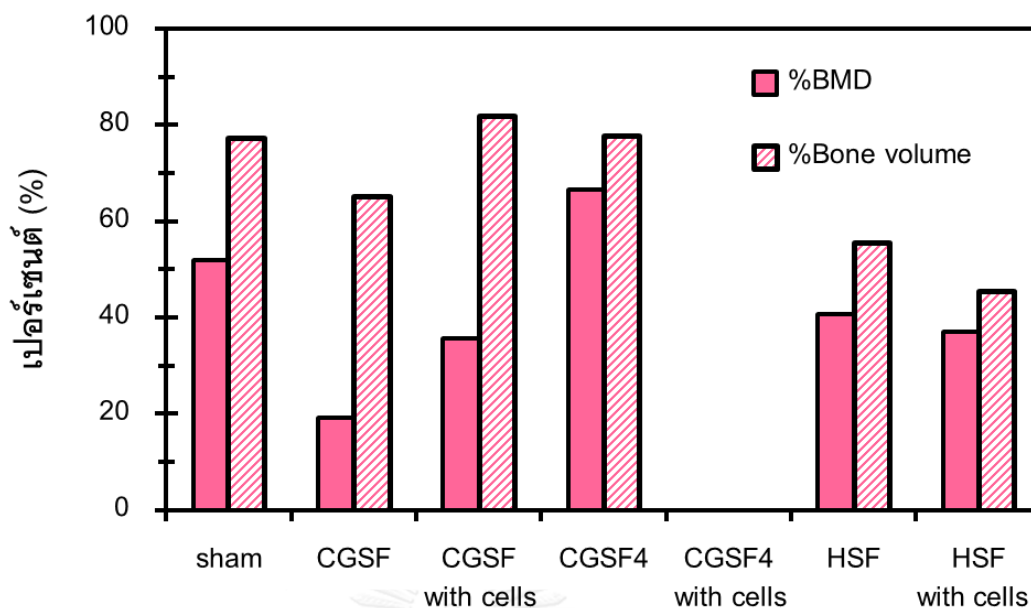
เมื่อพิจารณา ค่า % Bone volume ของหนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาติน (CGSF) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (CGSF with cells) พบว่า % Bone volume เท่ากับร้อยละ 65.13 และ 82.00 ตามลำดับ ซึ่ง % Bone volume ของหนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกมีมากกว่าในกลุ่มที่ไม่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ จึงสรุปได้ว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์ลงบนโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาติน (CGSF) ก่อนการฝังในหนูทดลอง ช่วยส่งเสริมให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ในปริมาณที่มากขึ้น

แต่เมื่อพิจารณาค่า % Bone volume ของหนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิก (HSF) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิกที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (HSF with cells) พบว่า % Bone volume เท่ากับร้อยละ 55.61 และ 45.60 ตามลำดับ ซึ่งหนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิกที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก มี % Bone volume น้อยกว่ากลุ่มทดลองที่ไม่ได้ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ แสดงการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกลงบนโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิก (HSF) ก่อนการฝังในหนูทดลอง ไม่มีผลต่อการส่งเสริมการสร้างกระดูกใหม่ อาจ

เนื่องมาจากโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิคที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกอาจสูญเสียกรดไฮยาลูรอนิคไปในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเซลล์ และข้อจำกัดของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกที่ปลูกถ่ายเป็นชนิด allograft ดังที่กล่าวไว้ข้างต้น

อนึ่ง โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (CGSF4 with cells) ไม่สามารถคำนวณค่า % Bone volume ได้ ดังเหตุผลที่กล่าวไว้ในหัวข้อ 4.4.1

เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์ทั้ง 2 ค่า ได้แก่ ค่าร้อยละของความหนาแน่นของเกลือแร่ในกระดูก (% BMD) ที่แสดงถึงคุณภาพของกระดูกที่สร้างใหม่ทางส่วนต้นของกระดูกเรเดียส และค่าร้อยละของปริมาตรของกระดูกที่สร้างใหม่เทียบกับปริมาตรของเนื้อเยื่อที่สร้างใหม่ทั้งหมด (% Bone volume) ที่แสดงถึงปริมาตรของกระดูกที่สร้างใหม่ทางส่วนต้นของกระดูกเรเดียส พบว่า หนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (CGSF4) มี % BMD มากกว่าทุกกลุ่มทดลอง ในขณะที่มี % Bone volume สูงใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม แสดงถึงศักยภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (CGSF4) ที่สามารถเชื่อมต่อการเจริญของเนื้อเยื่อกระดูกทั้งในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพได้เป็นอย่างดี



รูปที่ 4.6 ค่าเปอร์เซ็นต์ความหนาแน่นของเกลือแร่ในกระดูกที่สร้างใหม่เทียบกับกระดูกปกติ (% BMD) และร้อยละของปริมาตรของกระดูกที่สร้างใหม่เทียบกับปริมาตรของเนื้อเยื่อที่สร้างใหม่ทั้งหมด (% Bone volume) ทางส่วนต้นของกระดูกเรเดียสในหนูทดลอง ภายหลังจากผ่าตัดฝังโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 6 กลุ่ม เป็นเวลา 12 สัปดาห์ เทียบกับกลุ่มควบคุม (sham)

หมายเหตุ: ค่า %BMD และ %Bone volume ของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (CGSF4 with cells) ไม่สามารถคำนวณได้

4.4.3 การเกิดเนื้อเยื่อกระดูกบริเวณกึ่งกลางโครงเลี้ยงเซลล์

ในการวิเคราะห์ภาพจากเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร เพื่อวิเคราะห์การสร้างใหม่ของกระดูกเรเดียสของหนูทดลอง มีการพบการเกิดเนื้อเยื่อกระดูกบริเวณกึ่งกลางของช่องว่างของกระดูกเรเดียสซึ่งมีโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดต่าง ๆ ฝังอยู่ จากภาพตัดขวางบริเวณกึ่งกลางของช่องว่างของกระดูกเรเดียส ผลการวิเคราะห์ภาพตัดขวางบริเวณกึ่งกลางของโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตรแสดงในตารางที่ 4.5 จะเห็นว่า ไม่พบการสร้างกระดูกใหม่บริเวณกึ่งกลางช่องว่างนี้ในหนูทดลองกลุ่มควบคุม (sham) ที่ไม่มีการฝังโครงเลี้ยงเซลล์ลงในช่องว่างของกระดูกนั้น

เมื่อพิจารณาภาพตัดขวางบริเวณกึ่งกลางของช่องว่างกระดูกในหนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 6 ชนิด พบว่า ในหนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ 5 ชนิด พบการเกิดเนื้อเยื่อกระดูกใหม่บริเวณกึ่งกลางของช่องว่างกระดูกที่มีการฝังโครงเลี้ยงเซลล์ ซึ่งแสดงว่าโครงเลี้ยงเซลล์มีความสามารถในการชักนำเซลล์กระดูกจากเยื่อหุ้มกระดูกให้เข้ามาในโครงเลี้ยงเซลล์ และมีการเจริญเติบโตเป็นเนื้อเยื่อกระดูกได้ ยกเว้นในกลุ่มทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิกที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (HSF with cells) ซึ่งไม่พบการสร้างกระดูกใหม่บริเวณกึ่งกลางของโครงเลี้ยงเซลล์เช่นเดียวกับกลุ่มควบคุม

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบการเกิดเนื้อเยื่อกระดูกบริเวณกึ่งกลางของโครงเลี้ยงเซลล์ระหว่างหนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดเดียวกันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์และไม่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยการวิเคราะห์ความยาวของกระดูกที่เกิดใหม่ตรงกลางโครงเลี้ยงเซลล์ตามแนวยาวของช่องว่างของกระดูกและค่า % BMD ของเนื้อเยื่อกระดูกใหม่บริเวณกึ่งกลางโครงเลี้ยงเซลล์นี้ พบว่า หนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (CGSF with cells) มีกระดูกที่สร้างใหม่บริเวณกึ่งกลางของโครงเลี้ยงเซลล์ยาวเท่ากับ 1.257 มิลลิเมตร ซึ่งมากกว่าหนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาติน (CGSF) ซึ่งมีความยาวกระดูกเพียง 0.233 มิลลิเมตร อีกทั้งกระดูกที่สร้างใหม่บริเวณกึ่งกลางของโครงเลี้ยงเซลล์ในหนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (CGSF with cells) มีค่า % BMD ถึงร้อยละ 112.6 โดยไม่สามารถคำนวณค่า % BMD ของกระดูกที่สร้างใหม่บริเวณกึ่งกลางของโครงเลี้ยงเซลล์ในหนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาติน (CGSF) ได้ เนื่องจากชิ้นกระดูกมีขนาดเล็กเกินไป ซึ่งสอดคล้องกับผลวิเคราะห์กระดูกที่สร้างใหม่ทางส่วนต้นของกระดูกเรเดียสในรูปที่ 4.6

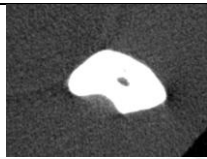
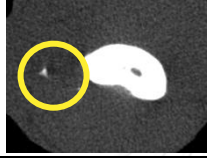
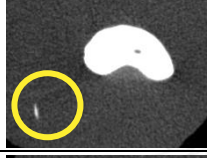
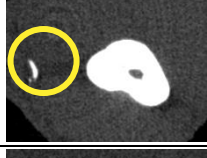
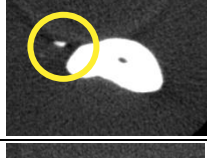
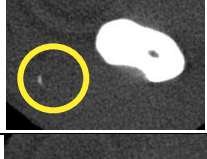
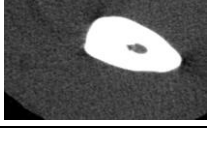
เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบการเกิดเนื้อเยื่อกระดูกบริเวณกึ่งกลางของโครงเลี้ยงเซลล์ระหว่างหนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (CGSF4) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (CGSF4 with cells) พบว่า หนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (CGSF4 with cells) มีความยาวของกระดูกที่สร้างใหม่บริเวณกึ่งกลางของโครงเลี้ยงเซลล์มากกว่า โดยมีความยาวของ

กระดูกเท่ากับ 1.78 มิลลิเมตร แต่ไม่สามารถคำนวณค่า % BMD ในชั้นกระดูกที่สร้างใหม่นี้ได้ เนื่องจากคำนวณค่า % BMD จากพื้นที่หน้าตัดของกระดูก เมื่อชั้นกระดูกมีลักษณะเรียวยาว จึงมีพื้นที่หน้าตัดไม่เพียงพอสำหรับการคำนวณ % BMD ในขณะที่กระดูกที่สร้างใหม่บริเวณกึ่งกลางของโครงเลี้ยงเซลล์ของหนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาติน และสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (CGSF4) มีความยาวของกระดูกเท่ากับ 0.909 มิลลิเมตร แต่สามารถคำนวณ % BMD ได้ โดยมีค่า %BMD มากถึงร้อยละ 120.8

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบการเกิดเนื้อเยื่อกระดูกบริเวณกึ่งกลางของโครงเลี้ยงเซลล์ระหว่างหนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิก (HSF) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิกที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (HSF with cells) พบว่า หนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิก (HSF) มีความยาวของกระดูกที่สร้างใหม่บริเวณกึ่งกลางของโครงเลี้ยงเซลล์ เท่ากับ 0.639 มิลลิเมตร โดยไม่สามารถคำนวณ % BMD ได้ เนื่องจากชั้นกระดูกมีขนาดเล็กเกินไป ในขณะที่หนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิกที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (HSF with cells) ไม่พบการสร้างใหม่ของกระดูกบริเวณกึ่งกลางของโครงเลี้ยงเซลล์ อาจเนื่องมาจากโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิกที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกอาจสูญเสียกรดไฮยาลูรอนิกที่เคลือบผิวของโครงเลี้ยงเซลล์ไปในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเซลล์ และข้อจำกัดของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกที่เป็นเซลล์ปลูกถ่ายชนิด allograft ดังที่กล่าวข้างต้น ทำให้ไม่สามารถสรุปผลของการเพาะเลี้ยงเซลล์ในโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิกที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (HSF with cells) ได้

จากผลการเปรียบเทียบการเกิดเนื้อเยื่อกระดูกบริเวณกึ่งกลางของโครงเลี้ยงเซลล์ระหว่างหนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ชนิด CGSF ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์และไม่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ อาจสรุปได้ว่า เซลล์ที่เพาะเลี้ยงลงบนโครงเลี้ยงเซลล์นั้นสามารถเจริญเป็นเนื้อเยื่อกระดูกได้ อีกทั้ง โครงเลี้ยงเซลล์มีความสามารถในการชักนำเซลล์กระดูกจากเยื่อหุ้มกระดูกให้เข้ามาในโครงเลี้ยงเซลล์ ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเซลล์ในโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาติน (CGSF) ก่อนฝังลงในหนูทดลองน่าจะมีส่วนช่วยเสริมศักยภาพการชักนำให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาติน (CGSF)

ตารางที่ 4.5 ผลการวิเคราะห์การสร้างกระดูกใหม่บริเวณกึ่งกลางโครงเลี้ยงเซลล์ภายหลังการผ่าตัดฝังโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 6 กลุ่ม เทียบกับกลุ่มควบคุม (sham) เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ในวงกลมสีเหลืองคือกระดูกที่สร้างใหม่บริเวณกึ่งกลางโครงเลี้ยงเซลล์ และกระดูกที่อยู่ข้างเคียง คือกระดูกอัลนา

โครงเลี้ยงเซลล์	ภาพตัดขวางตรงกึ่งกลางของช่องกระดูก	ความยาวกระดูก (mm)	%BMD เทียบกับกระดูกปกติทางส่วนต้น
Sham		-	-
CGSF		0.233	คำนวณไม่ได้
CGSF with cells		1.257	ร้อยละ 112.6
CGSF4		0.909	ร้อยละ 120.8
CGSF4 with cells		1.78	คำนวณไม่ได้
HSF		0.639	คำนวณไม่ได้
HSF with cells		-	-

4.5 ผลการทดสอบความสามารถในการเจริญเป็นเนื้อเยื่อกระดูกในสัตว์ทดลองด้วยการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา

ภายหลังการผ่าตัดฝังโครงเลี้ยงเซลล์ในช่องว่างของกระดูกขาหน้าข้างซ้าย (กระดูกเรเดียส) ของหนูทดลองเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ กระดูกขาหน้าข้างซ้ายและเนื้อเยื่อโดยรอบของหนูทดลองจะถูกตรึงสภาพในน้ำยาฟอรัมาลินที่มีความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตรก่อนเข้าสู่กระบวนการ การกำจัดแคลเซียมออก และผ่ากลางกระดูกออกเป็น 2 ซีก แล้วทำการฝังในพาราฟิน จากนั้นทำการตัดให้ได้เนื้อเยื่อแผ่นบางๆ และนำไปย้อมด้วยสี Hematoxylin and Eosin (H&E stain) และสี Masson's trichrome เพื่อดูลักษณะทางจุลพยาธิของช่องกระดูกที่เกิดการซ่อมแซมกระดูกผ่านกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง การซ่อมแซมกระดูกในหนูทดลองนี้เป็นกระบวนการที่เรียกว่า การซ่อมแซมกระดูกที่หักแบบทุติยภูมิ (Secondary bone healing) เนื่องจากเป็นการเหนี่ยวนำให้มีการหักที่ปลายกระดูกแยกออกจากกัน และไม่ได้มีการตามช่วยในกระบวนการซ่อมแซม ซึ่งขบวนการซ่อมแซมจะเริ่มจากการเกิดก้อนเลือด (hematoma) ที่เกิดขึ้นภายหลังการตัดกระดูก ต่อมาจะมีการสร้างเนื้อเยื่อพังผืด (fibrous tissue) ที่ประกอบไปด้วยเส้นใยคอลลาเจน (collagen fiber) ที่สร้างจากเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) เพื่อช่วยในการยึดส่วนกระดูกที่เสียหาย หลังจากนั้นจะมีการสร้างหลอดเลือดใหม่ (neovascularization) เพื่อนำสารอาหารที่จำเป็นต่อการสร้างกระดูกเข้ามายังตำแหน่งที่จะสร้างกระดูกใหม่ และจะมีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกไปเป็นเซลล์ Osteoblast และเคลื่อนสู่บริเวณกระดูกที่ต้องการซ่อมแซม ซึ่งเซลล์ Osteoblast นี้จะทำหน้าที่สร้าง bone matrix ก่อนเกิดการตกผลึกและแข็งแร่ธาตุต่าง ๆ โดยเฉพาะแคลเซียม (calcification) เกิดเป็นเนื้อกระดูกแข็งต่อไป และมีการสร้างสารแข็งคล้ายกระดูก (callus formation) ห่อหุ้มกระดูกที่หักหรือช่องว่างของกระดูกที่ถูกตัด

ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการเจริญเป็นเนื้อเยื่อกระดูกในเชิงกึ่งปริมาณ (semi-quantitative) ของหนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 6 ชนิดเทียบกับกลุ่มควบคุม (sham) ดังแสดงในตารางที่ 4.6 และภาพตัวอย่างเนื้อเยื่อของช่องกระดูกที่มีการฝังโครงเลี้ยงเซลล์ที่ย้อมด้วยสี H&E stain และสี Masson's trichrome ดังแสดงในรูปที่ 4.7 และ 4.8 พบว่า หนูทดลองในกลุ่มที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ทุกสูตรมีโครงเลี้ยงเซลล์เหลืออยู่ในช่องว่างของกระดูก แต่ไม่พบเซลล์ที่แสดงถึงการอักเสบหรือการปฏิเสธโครงเลี้ยงเซลล์ที่ปลูกถ่าย เช่น เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล (Neutrophils) ลิมโฟไซต์ (Lymphocytes) มาโครเฟจ (Macrophages) และ เซลล์ยักษ์ (Giant

cells) ในขณะที่ไม่สามารถวิเคราะห์ผลในหนูทดลองกลุ่มควบคุม (sham) ได้เนื่องจากไม่มีเนื้อเยื่อใด ๆ ในช่องว่างของกระดูก

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบการเติมเต็มของเซลล์ Osteoblast (Osteoblast infiltration) ในโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 6 กลุ่ม พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินที่ผ่านการและไม่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (CGSF และ CGSF with cells) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิกที่ผ่านการและไม่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (HSF และ HSF with cells) มีการเติมเต็มของเซลล์ Osteoblast มากที่สุด โดยมีอยู่ในช่วงประมาณร้อยละ 31-70 ของตำแหน่งที่มีการฝังโครงเลี้ยงเซลล์ ดังนั้นหนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินที่ผ่านการและไม่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (CGSF และ CGSF with cells) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิกที่ผ่านการและไม่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (HSF และ HSF with cells) จึงมีโอกาสในการเกิดเนื้อเยื่อกระดูกใหม่มากที่สุด เนื่องจากเซลล์ Osteoblast เป็นเซลล์ที่มีหน้าที่ในการสร้าง osteoid ก่อนที่จะมีการสะสมแร่ธาตุ โดยเฉพาะแคลเซียมเพื่อเปลี่ยนเป็นกระดูกแข็งต่อไป

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบการเติมเต็มของเซลล์ Osteoblast ระหว่างหนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดเดียวกันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์และไม่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ พบว่า หนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาติน (CGSF) มีการเติมเต็มของเซลล์ Osteoblast เท่ากับหนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (CGSF with cells) ก่อนฝังในหนูทดลอง เช่นเดียวกับกรณีของหนูทดลองในกลุ่มที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิกที่ผ่านการและไม่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (HSF และ HSF with cells) และหนูทดลองในกลุ่มที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ผ่านการและไม่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (CGSF4 และ CGSF4 with cells) ซึ่งอาจเป็นเพราะเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกที่เพาะเลี้ยงลงบนโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 3 ชนิดนั้นมีการตายหรือไม่สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ Osteoblast ได้ เนื่องจากเป็นเซลล์ปลูกถ่ายชนิด allograft ที่คัดแยกจากหนูทดลองตัวอื่น อีกทั้งโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาติน (CGSF) โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (CGSF4) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่

เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิก (HSF) อาจมีศักยภาพในการชักนำเซลล์กระดูกให้เคลื่อนที่เข้ามาบริเวณโครงเลี้ยงเซลล์ได้ด้วยตนเอง การเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกบนโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 3 ชนิดก่อนการฝังในหนูทดลองจึงไม่ก่อให้เกิดความแตกต่างของปริมาณเซลล์ Osteoblast เมื่อเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ในกลุ่มที่ไม่ได้ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบการเกิดเนื้อเยื่อพังผืด (Fibrosis) ในโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 6 กลุ่มพบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินที่ผ่านและไม่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (CGSF และ CGSF with cells) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิกที่ผ่านและไม่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (HSF และ HSF with cells) มีการเกิดเนื้อเยื่อพังผืดมากที่สุด ประมาณร้อยละ 70-100 ของตำแหน่งที่มีการฝังโครงเลี้ยงเซลล์ ซึ่งเนื้อเยื่อพังผืดนี้แสดงถึงความสามารถในการเกิดกระบวนการซ่อมแซมกระดูก ดังนั้นโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินที่ผ่านและไม่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (CGSF และ CGSF with cells) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิกที่ผ่านและไม่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (HSF และ HSF with cells) จึงสามารถชักนำให้เกิดการซ่อมแซมกระดูกได้มากที่สุด

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบการเกิดเนื้อเยื่อพังผืดระหว่างหนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดเดียวกันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์และไม่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ พบว่า หนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาติน (CGSF) มีการเกิดเนื้อเยื่อพังผืดเท่ากับหนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (CGSF with cells) เช่นเดียวกับกรณีของหนูทดลองในกลุ่มที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิกที่ผ่านและไม่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (HSF และ HSF with cells)

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบการเกิดเนื้อเยื่อพังผืดในหนูทดลองในกลุ่มที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ผ่านและไม่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (CGSF4 และ CGSF4 with cells) พบว่า มีการเกิดเนื้อเยื่อพังผืดในหนูทดลองในกลุ่มที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (CGSF4 with cells) มากกว่าในหนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและ

สะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (CGSF4) จึงอาจสรุปได้ว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์ลงบนโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจุกต์ด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (CGSF4) ก่อนการฝังลงในหนูทดลองจะชักนำให้เกิดกระบวนการซ่อมแซมกระดูกเพิ่มมากขึ้น

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบการสร้างหลอดเลือดใหม่ (Neovascularization) ในโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 6 กลุ่ม พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจุกต์ด้วยเจลาตินที่ผ่านและไม่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (CGSF และ CGSF with cells) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิกที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (HSF with cells) มีการสร้างหลอดเลือดใหม่มากที่สุด ประมาณร้อยละ 70-100 ของตำแหน่งที่มีการฝังโครงเลี้ยงเซลล์ ซึ่งแสดงถึงความสามารถของโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีศักยภาพในการชักนำให้เกิดการสร้างหลอดเลือดใหม่เพื่อขนส่งออกซิเจน สารอาหาร และไซโตไคน์ที่จำเป็นต่อการซ่อมแซมกระดูกมายังบริเวณช่องว่างของกระดูกนี้

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบการสร้างหลอดเลือดใหม่ระหว่างหนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดเดียวกันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์และไม่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ พบว่า หนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจุกต์ด้วยเจลาติน (CGSF) มีการสร้างหลอดเลือดใหม่เท่ากับหนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจุกต์ด้วยเจลาตินที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (CGSF with cells) ประมาณร้อยละ 70-100 ของตำแหน่งที่มีการฝังโครงเลี้ยงเซลล์ จึงอาจสรุปได้ว่า โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจุกต์ด้วยเจลาตินที่ผ่านและไม่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (CGSF และ CGSF with cells) มีศักยภาพในการชักนำให้สร้างหลอดเลือดใหม่ได้ดีมาก

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบการสร้างหลอดเลือดใหม่ในหนูทดลองกลุ่มที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิกที่ผ่านและไม่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (HSF และ HSF with cells) พบว่า หนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิกที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (HSF with cells) มีการสร้างหลอดเลือดใหม่มากกว่าในหนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิก (HSF) เช่นเดียวกับกรณีของหนูทดลองในกลุ่มที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจุกต์ด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ผ่านและไม่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (CGSF4 และ CGSF4 with cells) จึงอาจสรุปได้ว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์ลงในโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยา-

ลูอรอนิค (HSF) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (CGSF) ก่อนการฝังในหนูทดลองมีศักยภาพในการเพิ่มการสร้างหลอดเลือดใหม่ได้

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบการเกิดสารแข็งคล้ายกระดูก (Callus formation) ในโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 6 กลุ่ม พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินที่ (CGSF) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิคที่ผ่านและไม่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (HSF และ HSF with cells) มีการเกิดสารแข็งคล้ายกระดูกมากที่สุด ประมาณร้อยละ 70-100 ของตำแหน่งที่มีการฝังโครงเลี้ยงเซลล์ ซึ่งสารแข็งคล้ายกระดูกนี้เป็นส่วนหนึ่งของกระบวนการซ่อมแซมกระดูก โดยอาจสร้างมาจากกระดูกเรเดียสเองหรือมาจากปฏิกิริยาตอบสนองของเยื่อหุ้มกระดูกของกระดูกอัลนาที่อาจถูกรบกวนในขั้นตอนการผ่าตัดฝังโครงเลี้ยงเซลล์ก็เป็นได้

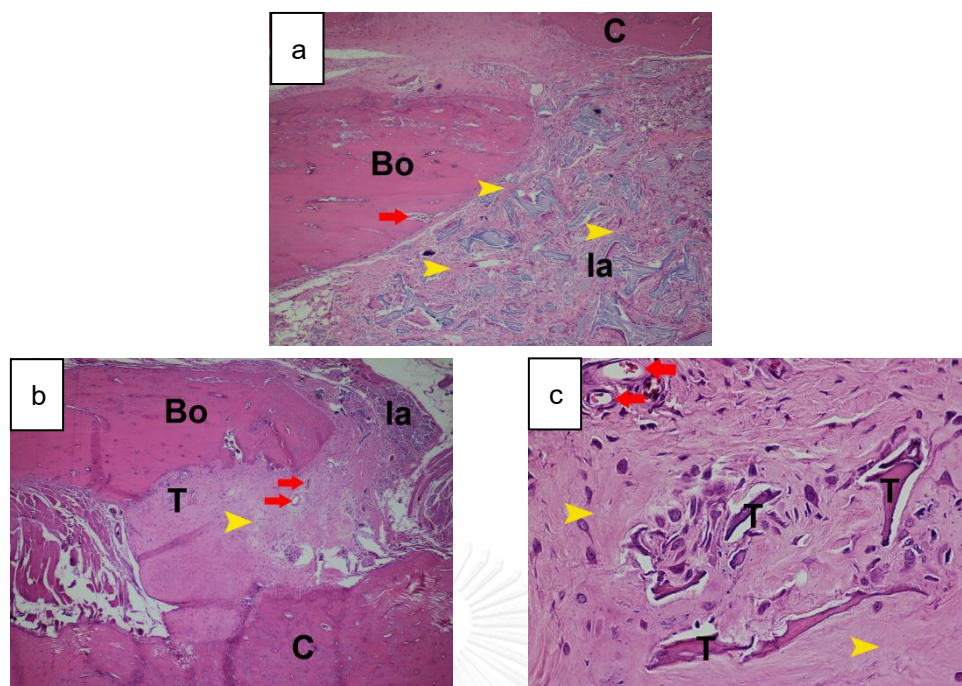
เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบการเกิดสารแข็งคล้ายกระดูกระหว่างหนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดเดียวกันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์และไม่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ พบว่า หนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิค (HSF) และหนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิคที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (HSF with cells) มีการเกิดสารแข็งคล้ายกระดูกเท่ากัน เช่นเดียวกับหนูทดลองในกลุ่มที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (CGSF4) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (CGSF4 with cells)

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบการเกิดสารแข็งคล้ายกระดูกระหว่างหนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาติน (CGSF) และ โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (CGSF with cells) พบว่า ในหนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาติน (CGSF) มีการเกิดสารแข็งคล้ายกระดูกมากกว่า จึงอาจสรุปได้ว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์ลงบนโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาติน (CGSF) ไม่สามารถชักนำให้เกิดการซ่อมแซมกระดูกที่มากขึ้น

ตารางที่ 4.6 ผลการวิเคราะห์ทางจุลพยาธิวิทยาของช่องกระดูกที่มีการฝังโครงเลี้ยงเซลล์ภายหลังการผ่าตัดฝังโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 6 กลุ่ม เทียบกับกลุ่มควบคุม (sham) เป็นเวลา 12 สัปดาห์

โครงเลี้ยง เซลล์	ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา			
	Osteoblast infiltration	Fibrosis	Neovascularization	Callus formation
sham	ND	ND	ND	ND
CGSF	++	+++	+++	+++
CGSF with cells	++	+++	+++	++
CGSF4	+	+	+	+
CGSF4 with cells	+	++	++	+
HSF	++	+++	++	+++
HSF with cells	++	+++	+++	+++

หมายเหตุ : ND; ไม่พบ (not determined), +; mild (ประมาณร้อยละ 1-30 ของตำแหน่งที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์), ++; moderate (ประมาณร้อยละ 31-70 ของตำแหน่งที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์) และ +++marked (ประมาณร้อยละ 70-100 ของตำแหน่งที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์)

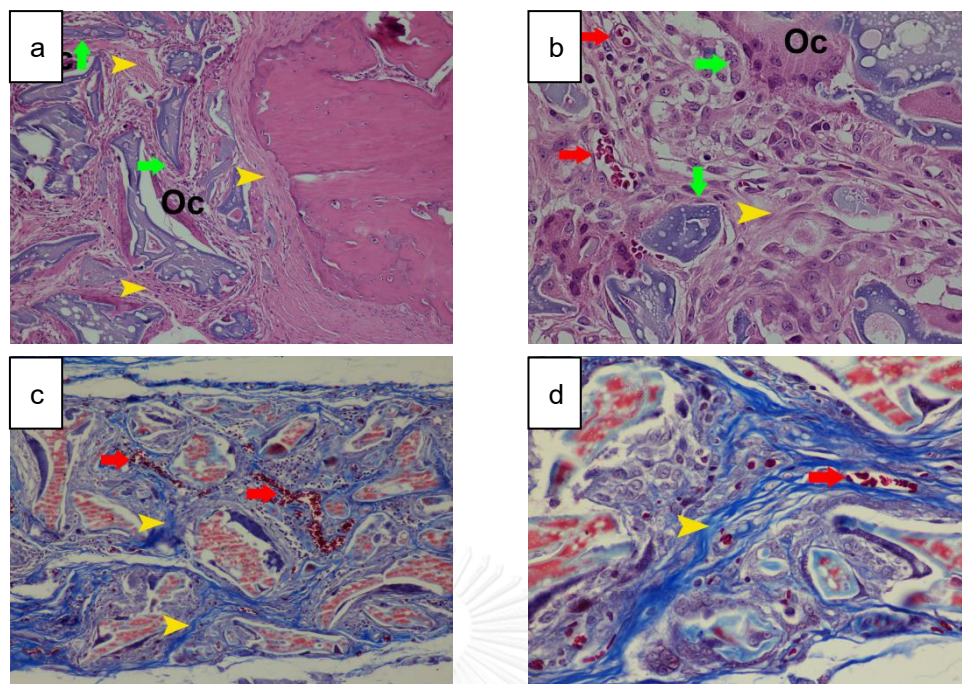


รูปที่ 4.7 ภาพตัวอย่างเนื้อเยื่อกระดูกที่ย้อมด้วยสี H&E ภายหลังจากการฝังโครงเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 12 สัปดาห์ แสดงการเกิดสารแข็งคล้ายกระดูก (Callus formation) โครงเลี้ยงเซลล์ที่เหลืออยู่และปฏิกิริยาของเนื้อเยื่อต่อโครงเลี้ยงเซลล์ (tissue reaction)

a) ภาพกำลังขยาย 4 เท่า ของตำแหน่งของปลายกระดูกเรเดียสที่ถูกตัดให้เป็นช่องว่าง (Bo) โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (CGSF4 with cells) ที่เหลืออยู่ในช่องว่างของกระดูก (Ia) และสารแข็งคล้ายกระดูก (Callus formation) ที่สร้างขึ้นห่อหุ้มช่องว่างของกระดูก โดยพบหลอดเลือดที่สร้างใหม่ในกระดูกเรเดียสที่สร้างใหม่และเนื้อเยื่อพังผืดในบริเวณโครงเลี้ยงเซลล์

b) และ c) ภาพกำลังขยาย 4 เท่าและ 40 เท่า ของตำแหน่งของปลายกระดูกเรเดียสที่ถูกตัดให้เป็นช่องว่าง (Bo) โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาติน (CGSF) ที่เหลืออยู่ในช่องว่างของกระดูก (Ia) สารแข็งคล้ายกระดูก (Callus formation) ที่สร้างขึ้นห่อหุ้มช่องว่างของกระดูก และ bone trabecular (T) โดยพบเนื้อเยื่อพังผืดและหลอดเลือดที่สร้างใหม่ในบริเวณกระดูกที่สร้างใหม่

หมายเหตุ : Bo= กระดูกเรเดียสปกติ, C= callus formation, T=bone trabecular, หัวลูกศรสีเหลือง= เนื้อเยื่อพังผืด (fibrosis), ลูกศรสีแดง = หลอดเลือดที่สร้างใหม่ (neovascularization)



รูปที่ 4.8 ภาพตัวอย่างเนื้อเยื่อกระดูกภายหลังการฝังโครงเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 12 สัปดาห์ แสดงโครงเลี้ยงเซลล์ที่เหลืออยู่และปฏิกิริยาของเนื้อเยื่อต่อโครงเลี้ยงเซลล์ (tissue reaction) โดยย้อมด้วยสี H&E (a และ b) และสี Masson's Trichrome (c และ d)

a) แสดงโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิก (HSF) ที่เหลืออยู่ในช่องว่างของกระดูก โดยพบเนื้อเยื่อพังผืด เซลล์ Osteoblast และเซลล์ Osteoclast ในบริเวณโครงเลี้ยงเซลล์ (กำลังขยาย 10 เท่า)

b) แสดงโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาติน (CGSF) ที่เหลืออยู่ในช่องว่างของกระดูก โดยพบเนื้อเยื่อพังผืด หลอดเลือดที่สร้างใหม่ เซลล์ Osteoblast และเซลล์ Osteoclast ในบริเวณโครงเลี้ยงเซลล์ (กำลังขยาย 40 เท่า)

c) และ d) แสดงโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (CGSF with cells) ที่เหลืออยู่ในช่องว่างของกระดูก โดยพบเนื้อเยื่อพังผืด จำพวกเส้นใยคอลลาเจนที่ย้อมติดสีน้ำเงินในการย้อมด้วยสี Masson's Trichrome และหลอดเลือดที่สร้างใหม่ในบริเวณโครงเลี้ยงเซลล์ ภาพ c) และ d) กำลังขยาย 10 และ 40 เท่า ตามลำดับ

หมายเหตุ : Bo= กระดูกเรเดียสปกติ, C= callus formation, T=bone trabecular, หัวลูกศรสีเหลือง= เนื้อเยื่อพังผืด (fibrosis), ลูกศรสีเขียว= เซลล์ osteoblast, ลูกศรสีแดง = หลอดเลือดที่สร้างใหม่ (neovascularization)

Vachiraroj, N. และคณะ (2009) ได้รายงานความสามารถในการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกในระดับห้องปฏิบัติการของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาติน (CGSF) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (CGSF4) ซึ่งพบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 2 ชนิดมีศักยภาพในการเชื่อมต่อการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกในระดับห้องปฏิบัติการได้ดี โดยโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาติน (CGSF) สามารถเชื่อมต่อการเกาะและการเจริญของเซลล์กระดูกของหนู (MC3T3-E1) และเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกของหนู ในขณะที่โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (CGSF4) สามารถส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกของเซลล์กระดูกของหนู (MC3T3-E1) และเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกของหนูได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบความสามารถในการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกในสัตว์ทดลองนี้ ซึ่งพบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (CGSF4) สามารถเชื่อมต่อการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกใหม่ได้ดีในหนูทดลองภายหลังการฝังเป็นเวลา 12 สัปดาห์ โดยพบความยาวของช่องว่างกระดูกน้อยที่สุดและน้อยกว่ากลุ่มควบคุม อีกทั้งยังพบ % BMD ของกระดูกที่สร้างใหม่ด้านส่วนต้นกระดูกเทียบกับกระดูกปกติสูงที่สุดถึงร้อยละ 66.44 ซึ่งสูงกว่ากลุ่มควบคุม และ % Bone volume มีค่าเท่ากับร้อยละ 77.81 ซึ่งใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยังมีการพบกระดูกที่สร้างใหม่บริเวณกึ่งกลางโครงเลี้ยงเซลล์ยาว 0.909 มิลลิเมตร และมี % BMD ของกระดูกที่สร้างใหม่นี้เท่ากับร้อยละ 120.8

อนึ่ง ผลการทดสอบความสามารถในการเจริญเป็นเนื้อเยื่อกระดูกในหนูทดลองของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาติน (CGSF) แสดงให้เห็นว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์ลงบนโครงเลี้ยงเซลล์ก่อนการฝังในหนูทดลองสามารถเชื่อมต่อการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกในสัตว์ทดลองได้ดีกว่า หนูทดลองที่ฝังโดยโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ (CGSF with cells) เป็นเวลา 12 สัปดาห์ % BMD ของกระดูกที่สร้างใหม่ด้านส่วนต้นกระดูกเทียบกับกระดูกปกติสูงกว่าหนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ และ % Bone volume มีค่าเท่ากับร้อยละ 82.00 ซึ่งมีมากที่สุดและมากกว่ากลุ่มควบคุม อีกทั้งยังพบกระดูกที่สร้างใหม่บริเวณกึ่งกลางโครงเลี้ยงเซลล์ยาว 1.257 มิลลิเมตร และมี % BMD ของกระดูกที่สร้างใหม่นี้เท่ากับร้อยละ 112.6 ในขณะที่ผลการวิเคราะห์ทางจุลพยาธิวิทยาแสดงถึงความสามารถในการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกในเชิงปริมาณที่ใกล้เคียงกันของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาติน (CGSF) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ (CGSF with cells) โดยโครง

เลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาติน (CGSF) จะมีการสร้างสารแข็งคล้ายกระดูก (Callus formation) มากกว่า

จากรายงานของ Tungtasana, H. และคณะ (2010) ที่ศึกษาการตอบสนองต่อเนื้อเยื่อในสิ่งมีชีวิตของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาติน (CGSF) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (CGSF4) โดยทดสอบตามมาตรฐาน ISO10993-6 พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 2 ชนิดถูกประเมินอยู่ในกลุ่มวัสดุประเภท “ไม่ระคายเคือง” ถึง “ระคายเคืองเล็กน้อย” เมื่อเปรียบเทียบกับ Gelfoam® ซึ่งเป็นวัสดุทางการแพทย์เชิงพาณิชย์ที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุม ซึ่งแสดงถึงการไม่เป็นพิษต่อเซลล์และมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 2 ชนิด ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบความสามารถในการเจริญเป็นเนื้อเยื่อกระดูกในสัตว์ทดลอง ที่พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาติน (CGSF) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (CGSF4) ไม่ก่อให้เกิดการอักเสบหรือการปฏิเสธโครงเลี้ยงเซลล์ที่ปลูกถ่ายเมื่อฝังลงในกระดูกเรเดียสของหนูทดลอง โดยพิจารณาจากผลการวิเคราะห์ทางจุลพยาธิวิทยาซึ่งไม่พบเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล (Neutrophils) ลิมโฟไซต์ (Lymphocytes) มาโครเฟจ (Macrophages) และ เซลล์ยักษ์ (Giant cells) ในเนื้อเยื่อบริเวณที่มีการฝังโครงเลี้ยงเซลล์

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาโครงสร้างฐานของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจุกต์ด้วยเจลาติน (CGSF) โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจุกต์ด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (CGSF4) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิก (HSF) และความสามารถในการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกในสัตว์ทดลองของโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 3 ชนิดที่ผ่านและไม่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยด้วยวิธีการกำจัดเกลือออก ซึ่งพบว่าลักษณะโครงสร้างฐานของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยมีรูพรุนเชื่อมต่อกันเป็นเครือข่าย มีความพรุนสม่ำเสมอ พื้นผิวภายในเรียบ และมีขนาดรูพรุนเฉลี่ยเท่ากับ 551 ± 40 ไมโครเมตร

เมื่อตัดแปรรโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยโดยการคอนจุกต์ด้วยเจลาติน (CGSF) พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์มีรูพรุนขนาดเล็กเชื่อมโยงเป็นเครือข่ายภายในรูพรุนเดิม โดยมีขนาดรูพรุนเฉลี่ยเท่ากับ 351 ± 65 ไมโครเมตร ซึ่งเกิดจากสารละลายเจลาตินเข้าไปแทรกอยู่ภายในรูพรุนขนาดใหญ่ของโครงเลี้ยงเซลล์และถูกทำให้แห้งด้วยความเย็น สอดคล้องกับรายงานของ Chamchongkaset, J. และคณะ (2008) เมื่อตัดแปรรโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยโดยการคอนจุกต์ด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (CGSF4) พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์มีรูพรุนขนาดเล็กเชื่อมโยงเป็นเครือข่ายภายในรูพรุนเดิม พื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์มีลักษณะขรุขระ ไม่เรียบ ซึ่งเกิดจากการสะสมเกลือไฮดรอกซีอะพาไทต์บนพื้นผิวของโครงเลี้ยงเซลล์ โดยมีขนาดรูพรุนเฉลี่ยเท่ากับ 242 ± 45 ไมโครเมตร และมีร้อยละโดยน้ำหนักของไฮดรอกซีอะพาไทต์ในโครงเลี้ยงเซลล์เท่ากับร้อยละ 39.76 เมื่อตัดแปรรโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิก (HSF) พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์มีรูพรุนคล้ายกำแพง ซึ่งเกิดจากสารละลายกรดไฮยาลูรอนิกเข้าไปแทรกอยู่ภายในรูพรุนขนาดใหญ่ของโครงเลี้ยงเซลล์และถูกทำให้แห้งด้วยความเย็น โดยมีขนาดรูพรุนเฉลี่ยเท่ากับ 235 ± 63 ไมโครเมตร

จากการทดสอบปริมาณเซลล์ที่ยึดเกาะบนโครงเลี้ยงเซลล์ก่อนทำการฝังในสัตว์ทดลอง พบว่า ปริมาณเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกหนูที่ยึดเกาะบนโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาติน (CGSF) โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (CGSF4) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิก (HSF) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีปริมาณเซลล์เท่ากับ $10.36 \pm 0.67 \times 10^4$ เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์, $10.64 \pm 0.27 \times 10^4$ เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์ และ $14.11 \pm 4.07 \times 10^4$ เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์ ตามลำดับ (จากปริมาณเซลล์เริ่มต้น 1×10^6 เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์ หรือเท่ากับ 41,666 เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิเมตร)

การศึกษาความสามารถในการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกในสัตว์ทดลองของโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 6 ชนิด เทียบกับกลุ่มควบคุม (sham) ภายหลังจากฝังลงในหนูทดลองเป็นเวลา 12 สัปดาห์ สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 5.1 โดยการศึกษาความสามารถในการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกในสัตว์ทดลองด้วยการถ่ายภาพรังสี (X-ray) และการถ่ายภาพด้วยเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร (micro-CT) พบว่า เกิดการสร้างกระดูกใหม่บริเวณส่วนต้นของกระดูกเรเดียสในลักษณะปลายแหลมยื่นจากรายตัดเดิมที่เรียบตรง โดยพบในหนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์และกลุ่มควบคุม ยกเว้นในหนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ (CGSF4 with cells) หนึ่ง ผลการวิเคราะห์ในกลุ่มนี้มีความน่าเชื่อถือต่ำกว่ากลุ่มอื่นๆ เพราะวิเคราะห์ผลจากหนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ (CGSF4 with cells) เพียง 1 ตัวเท่านั้น และเมื่อพิจารณาการสร้างใหม่ของกระดูกเฉพาะส่วนปลายของกระดูกเรเดียส พบว่า กระดูกมีการสร้างใหม่ โดยมีทิศทางการสร้างเข้าหากระดูกอัลนา และพบการเชื่อมต่อของกระดูกที่สร้างใหม่นี้กับกระดูกอัลนา ซึ่งแสดงว่ากระดูกเรเดียสส่วนปลายไม่มีความแข็งแรงมากพอจะรับน้ำหนักกดทับจากการเคลื่อนไหวของหนูทดลองได้ จึงต้องเชื่อมต่อกับกระดูกอัลนาเพื่อถ่ายน้ำหนักกดทับของหนูทดลองสู่กระดูกอัลนา

จากผลการวิเคราะห์ด้วยภาพสามมิติจากเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร (micro-CT) สามารถวิเคราะห์ความยาวของช่องว่างกระดูกเรเดียสที่มีการฝังโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 6 ชนิด และกลุ่มควบคุม ภายหลังจากฝังลงในหนูทดลองเป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ (CGSF4) สามารถชักนำให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ได้ดีที่สุด โดยมีความยาวของช่องว่างกระดูกน้อยที่สุดและน้อยกว่า

กลุ่มควบคุม และในหนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและ
 สะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ (CGSF4 with cells) มีความยาวของช่องว่าง
 กระดูกมากที่สุดและใกล้เคียงกับช่องว่างกระดูกที่ทำการตัดก่อนฝังโครงเลี้ยงเซลล์ ซึ่งอาจเพราะ
 หนูทดลองได้มีการเจริญเติบโตขึ้นในระยะเวลา 12 สัปดาห์ที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ ทำให้กระดูก
 เติบโตเองมีความยาวเพิ่มมากขึ้น ช่องว่างกระดูกจึงขยายและยาวมากยิ่งขึ้น

นอกจากนี้ ค่าร้อยละของความหนาแน่นของเกลือแร่ในกระดูก (%BMD) และค่าร้อยละ
 ของปริมาตรของกระดูกที่สร้างใหม่เทียบกับปริมาตรของเนื้อเยื่อที่สร้างใหม่ทั้งหมด (% Bone
 volume) ซึ่งคำนวณได้จากภาพสามมิติจากเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร (micro-
 CT) แสดงให้เห็นว่า หนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและ
 สะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ (CGSF4) สามารถชักนำให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ได้ดีที่สุด โดยพบ
 % BMD ที่สูงที่สุดและสูงกว่ากลุ่มควบคุม และมี % Bone volume ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม
 ซึ่งแสดงถึงศักยภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ในการเชื่อมต่อการเจริญของเนื้อเยื่อกระดูกทั้งในเชิง
 ปริมาณและเชิงคุณภาพได้เป็นอย่างดี ในขณะที่หนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่
 คอนจูเกตด้วยเจลาตินที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ (CGSF with cells) มีปริมาตรของกระดูกที่
 สร้างใหม่มากที่สุด และมากกว่ากลุ่มควบคุม

ในการวิเคราะห์ภาพจากเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร (micro-CT) มีการ
 พบการเกิดเนื้อเยื่อกระดูกบริเวณกึ่งกลางของช่องว่างของกระดูกเรเดียสในหนูทดลองที่ฝังโครง
 เลี้ยงเซลล์เกือบทุกกลุ่ม ยกเว้นในหนูทดลองกลุ่มควบคุมและหนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์
 ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิกที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ (HSF with cell)
 ในขณะที่หนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินที่ผ่านการ
 เพาะเลี้ยงเซลล์ (CGSF with cells) มีการเกิดเนื้อเยื่อกระดูกบริเวณกึ่งกลางของช่องว่างของ
 กระดูกในเชิงคุณภาพและปริมาณมากที่สุด

ในการวิเคราะห์ความสามารถในการเจริญเป็นเนื้อเยื่อกระดูกทางจุลพยาธิวิทยาของช่องกระดูก
 ที่เกิดการซ่อมแซมกระดูกของหนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 6 ชนิดเทียบกับกลุ่มควบคุม
 (sham) พบว่า หนูทดลองในกลุ่มที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ทุกสูตรมีโครงเลี้ยงเซลล์เหลืออยู่ในช่องว่าง
 ของกระดูก แต่ไม่พบเซลล์ที่แสดงถึงการอักเสบหรือการปฏิเสธโครงเลี้ยงเซลล์ที่ปลูกถ่าย ในขณะที่
 ที่ไม่สามารถวิเคราะห์ผลในหนูทดลองกลุ่มควบคุม (sham) ได้เนื่องจากไม่มีเนื้อเยื่อใด ๆ ใน
 ช่องว่างของกระดูก

ในการวิเคราะห์ความสามารถในการเจริญเป็นเนื้อเยื่อกระดูกทางจุลพยาธิในเชิงที่ ปริมาณของช่องกระดูกที่เกิดการซ่อมแซมกระดูกของหนูทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 6 ชนิด พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินที่ผ่านและไม่ผ่านการเพาะเลี้ยง เซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (CGSF และ CGSF with cells) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ ไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิกที่ผ่านและไม่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจาก ไขกระดูก (HSF และ HSF with cells) มีการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกใหม่มากที่สุด โดยพบการเติมเต็ม ของเซลล์ Osteoblast การเกิดเนื้อเยื่อพังผืด การสร้างหลอดเลือดใหม่มากที่สุด ซึ่งแสดงถึง ความสามารถในการเกิดกระบวนการซ่อมแซมกระดูก และศักยภาพในการชักนำให้เกิดการสร้าง หลอดเลือดใหม่เพื่อขนส่งออกซิเจน สารอาหาร และไซโตไคน์ที่จำเป็นต่อการซ่อมแซมกระดูก มายังบริเวณช่องว่างของกระดูก นอกจากนี้โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วย เจลาตินที่ (CGSF) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิกที่ ผ่านและไม่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (HSF และ HSF with cells) ยังเกิด สารแข็งคล้ายกระดูกมากที่สุด ทั้งนี้การเพาะเลี้ยงเซลล์ลงในโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่ คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (CGSF4) ก่อนการฝังลงในหนูทดลองนั้นพบ การเกิดเนื้อเยื่อพังผืดที่เพิ่มมากขึ้น และการเพาะเลี้ยงเซลล์ลงในโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทย ที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิก (HSF) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วย เจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (CGSF) ก่อนการฝังในหนูทดลองมีศักยภาพในการเพิ่ม การสร้างหลอดเลือดใหม่ได้

จากผลศึกษาสามารถสรุปได้ว่า โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาติน และสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ (CGSF4) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วย เจลาติน (CGSF) สามารถชักนำให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ได้ดี และมีศักยภาพในการประยุกต์ใช้ ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก

ตารางที่ 5. 1 สรุปผลความสามารถในการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกในสัตว์ทดลองของโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 6 ชนิด เทียบกับกลุ่มควบคุม (sham) ภายหลังการฝังลงในหูของทดลองเป็นเวลา 12 สัปดาห์

การวิเคราะห์	sham	CGSF	CGSF with cells	CGSF4	CGSF4 with cells	HSF	HSF with cells
การถ่ายภาพรังสี (X-ray)	พบการสร้างกระดูกใหม่	พบการสร้างกระดูกใหม่	พบการสร้างกระดูกใหม่	พบการสร้างกระดูกใหม่	ไม่พบการสร้างกระดูกใหม่	พบการสร้างกระดูกใหม่	พบการสร้างกระดูกใหม่
ความยาวของช่องว่างกระดูกเรเดียส (จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร)	3.60 มิลลิเมตร	ใกล้เคียงกลุ่มควบคุม	ใกล้เคียงกลุ่มควบคุม	น้อยที่สุด	น้อยที่สุด	ใกล้เคียงกลุ่มควบคุม	ใกล้เคียงกลุ่มควบคุม
ค่าร้อยละความหนาแน่นของเกลือแร่ในกระดูก (%BMD) (จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร)	ร้อยละ 51.89	น้อยกว่ากลุ่มควบคุม	น้อยกว่ากลุ่มควบคุม	สูงที่สุด	ไม่สามารถวิเคราะห์ได้	น้อยกว่ากลุ่มควบคุม	น้อยกว่ากลุ่มควบคุม
ค่าร้อยละของปริมาตรของกระดูกที่สร้างใหม่เทียบกับปริมาตรของเนื้อเยื่อที่สร้างใหม่ทั้งหมด (% Bone volume) (จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร)	ร้อยละ 77.20	น้อยกว่ากลุ่มควบคุม	สูงที่สุด	สูงกว่ากลุ่มควบคุม	ไม่สามารถวิเคราะห์ได้	น้อยกว่ากลุ่มควบคุม	น้อยกว่ากลุ่มควบคุม
การเกิดเนื้อเยื่อกระดูกบริเวณกึ่งกลางของช่องว่างของกระดูกเรเดียส (จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร)	ไม่พบการสร้างกระดูกใหม่	พบการสร้างกระดูกใหม่	พบการสร้างกระดูกใหม่	%BMD ของกระดูกใหม่สูงที่สุด	ความยาวกระดูกใหม่มากที่สุด	พบการสร้างกระดูกใหม่	ไม่พบการสร้างกระดูกใหม่
การวิเคราะห์ทางจุลพยาธิในเชิงปริมาณ	ไม่สามารถวิเคราะห์ได้	พบการสร้างกระดูกใหม่มากกว่า	พบการสร้างกระดูกใหม่มากกว่า	พบการสร้างกระดูกใหม่ น้อยกว่า	พบการสร้างกระดูกใหม่ น้อยกว่า	พบการสร้างกระดูกใหม่ มากกว่า	พบการสร้างกระดูกใหม่ มากกว่า

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรพัฒนาการเชื่อมขวางกรดไฮยาลูรอนิคบนโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทย เพื่อลดการสูญเสียกรดไฮยาลูนิคไปในกระบวนการเพาะเลี้ยงเซลล์
2. ควรทดสอบการตอบสนองของเซลล์ในระดับห้องปฏิบัติการของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิค
3. ควรทำการทดสอบความสามารถในการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกในหนูทดลองอีกครั้ง และทำการทดสอบความสามารถในการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกในสัตว์ทดลองชนิดอื่นต่อไป



รายการอ้างอิง

- Alexander, S.A. and R.B. Donoff. "The Histochemistry of Glycosaminoglycans within Hypertrophic Scars." *Journal of Surgical Research* 28, no. 2 (1980): 171-181.
- Amirian, J., N. T. Linh, Y. K. Min and B. T. Lee. "Bone Formation of a Porous Gelatin-Pectin-Biphasic Calcium Phosphate Composite in Presence of Bmp-2 and Vegf." *International Journal of Biological Macromolecules* 76, (2015): 10-24.
- Aragon, C. and B. Lopez-Corcuera. "Structure, Function and Regulation of Glycine Neurotransmitters." *European Journal of Pharmacology* 479, no. 1-3 (2003): 249-62.
- Baksh, D., L. Song and R. S. Tuan. "Adult Mesenchymal Stem Cells: Characterization, Differentiation, and Application in Cell and Gene Therapy." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 8, no. 3 (2004): 301-316.
- Balazs, E. A., T. C. Laurent and R. W. Jeanloz. "Nomenclature of Hyaluronic Acid." *Biochemical Journal* 235, no. 3 (1986): 903.
- Baron, R. *General Principles of Bone Biology*. 5 ed. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. Philadelphia: American Society for Bone and Mineral Research 2003.
- Bilezikian, John P., Lawrence G. Raisz and Gideon A. Rodan. *Principles of Bone Biology*. 2 vols. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 2002.
- Bronzino, Joseph D. *Biomedical Engineering Fundamentals*. 3rd ed. The electrical engineering handbook series. Boca Raton: CRC/Taylor & Francis,, 2006.

[http://login.ezproxy1.lib.asu.edu/login?url=http://www.netLibrary.com/urlapi.asp?action=summary&v=1&bookid=154167.](http://login.ezproxy1.lib.asu.edu/login?url=http://www.netLibrary.com/urlapi.asp?action=summary&v=1&bookid=154167)

Cancedda, R., B. Dozin, P. Giannoni and R. Quarto. "Tissue Engineering and Cell Therapy of Cartilage and Bone." *Matrix Biology* 22, no. 1 (2003): 81-91.

Chamchongkaset, J., S. Kanokpanont, D.L. Kaplan and S. Damrongsakkul. "Modification of Thai Silk Fibroin Scaffolds by Gelatin Conjugation for Tissue Engineering." *Advanced Material Research* 55-57, (2008): 685-688.

Chang, B. S., K. S. Hong, H. J. Youn, H. S. Ryu, S. S. Chung and K. W. Park. "Osteoconduction at Porous Hydroxyapatite with Various Pore Configurations." *Biomaterials* 21, (2000): 1291–1298.

Chiu, C. , J. Ferreira, T.M. Luo, H. Geng, F. Lin and C. Ko. "Direct Scaffolding of Biomimetic Hydroxyapatite-Gelatin Nanocomposites Using Aminosilane Cross-Linker for Bone Regeneration." *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 23, no. 9 (2012): 2115–2126.

Choi, Y. S., S. R. Hong, Y. M. Lee, K. W. Song, M. H. Park and Y. S. Nam. "Studies on Gelatin-Containing Artificial Skin: II. Preparation and Characterization of Cross-Linked Gelatin-Hyaluronate Sponge." *Journal of Biomedical Materials Research* 48, no. 5 (1999): 631-9.

Collins, M. N. and C. Birkinshaw. "Comparison of the Effectiveness of Four Different Crosslinking Agents with Hyaluronic Acid Hydrogel Films for Tissue-Culture Applications." *Journal of Applied Polymer Science* 104, no. 5 (2007): 3183-3191.

- Cox, S. C., J. A. Thornby, G. J. Gibbons, M. A. Williams and K. K. Mallick. "3d Printing of Porous Hydroxyapatite Scaffolds Intended for Use in Bone Tissue Engineering Applications." *Materials Science and Engineering C* 47, (2015): 237–247.
- Cuadros, T. R., A. A. Erices and J. M. Aguilera. "Porous Matrix of Calcium Alginate/Gelatin with Enhanced Properties as Scaffold for Cell Culture." *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 46, (2015): 331-342.
- Doron, I. and L. Amy. "Bone Graft Substitutes." *Operative Techniques in Plastic and Reconstructive Surgery* 9, no. 4 (2002): 151-160.
- Drosse, Inga, Elias Volkmer, Rodolfo Capanna, Pietro De Biase, Wolf Mutschler and Matthias Schieker. "Tissue Engineering for Bone Defect Healing: An Update on a Multi-Component Approach." *Injury* 39, (2008): S9-S20.
- Fraser, J. R. E. and T. C. Laurent. "Turnover and Metabolism of Hyaluronan." In *The Biology of Hyaluronan. Ciba Foundation Symposium 143*, edited by Wehlan J. (in): Evered D., 41-59. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 1989.
- Friess, W. "Review Article Collagen – Biomaterial for Drug Delivery." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 45, (1988): 113-136.
- Gaihre, B., S. Aryal, N.A.M. Barkat and H. Y. Kim. "Gelatin Stabilized Iron Oxide Nanoparticles as a Three Dimensional Template for the Hydroxyapatite Crystal Nucleation and Growth." *Materials Science and Engineering C* 28, (2008): 1297–1303
- Gandhimathi, C., J. R. Venugopal, A. Y. Tham, S. Ramakrishna and S. D. Kumar. "Biomimetic Hybrid Nanofibrous Substrates for Mesenchymal Stem Cells

Differentiation into Osteogenic Cells." *Materials Science and Engineering C: Materials for Biological Applications* 49, (2015): 776-85.

Garcia-Fuentes, M., A. J. Meinel, M. Hilbe, L. Meinel and H. P. Merkle. "Silk Fibroin/Hyaluronan Scaffolds for Human Mesenchymal Stem Cell Culture in Tissue Engineering." *Biomaterials* 30, no. 28 (2009): 5068-76.

Giordano, C., V. Sanginario, L. Ambrosio, L. D. Silvio and M. Santin. "Chemical-Physical Characterization and in Vitro Preliminary Biological Assessment of Hyaluronic Acid Benzyl Ester-Hydroxyapatite Composite." *Journal of Biomaterials Applications* 20, no. 3 (2006): 237-52.

Gleeson, J.P., N.A. Plunkett and F.J. O'Brien. "Addition of Hydroxyapatite Improves Stiffness, Interconnectivity and Osteogenic Potential of a Highly Porous Collagen-Based Scaffold for Bone Tissue Regeneration " *European Cells and Materials* 20, (2010): 218-230.

Goldberg, V. M. and S. Stevenson. "Natural History of Autografts and Allografts." *Clinical Orthopaedics and Related Research*, no. 225 (1987): 7-16.

Gomillion, C. T. and K. J. Burg. "Stem Cells and Adipose Tissue Engineering." *Biomaterials* 27, no. 36 (2006): 6052-63.

Hancox, N. M. *Biology of Bone* Biological Structure and Function. Cambridge Eng.: University Press, 1972.

Hardy, J. G. and T. R. Scheibel. "Composite Materials Based on Silk Proteins." *Progress in Polymer Science* 35, no. 9 (2010): 1093-1115.

- Hollinger, J. O. and J. C. Kleinschmidt. "The Critical Size Defect as an Experimental Model to Test Bone Repair Materials." *Journal of Craniofacial Surgery* 1, no. 1 (1990): 60-8.
- Hu, W., J. Ma, J. Wang and S. Zhang. "Fine Structure Study on Low Concentration Zinc Substituted Hydroxyapatite Nanoparticles." *Materials Science and Engineering : C* 32, no. 8 (2012): 2404-2410.
- Hutmacher, D.W. . "Scaffolds in Tissue Engineering Bone and Cartilage." *Biomaterials* 21, (2000): 2529-2543.
- Inoue, S. , K. Tanaka, F. Arisaka, S. Kimura, K. Ohtomo and S. Mizuno. "Silk Fibroin of Bombyxmori Is Secreted, Assembling a High Molecular Mass Elementary Unit Consisting of H-Chain, L-Chain, and P25, with a 6:6:1 Molar Ratio." *Journal of Biological Chemistry* 275, (2000): 40517–40528.
- Jee, W.S. . *The Skeletal Tissues*. Cell and Tissue Biology: A Textbook of Histology., Edited by editor In: Weiss L. Baltimore, MA: Urban and Schwarzenberg, 1998.
- Jin, H., D. Kim, T. Kim, K. Shin, J. Jung, H. Park and S. Yoon. "In Vivo Evaluation of Porous Hydroxyapatite/Chitosan–Alginate Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering." *International Journal of Biological Macromolecules* 51, (2012): 1079-1085.
- Kaito, T., Y. Mukai, M. Nishikawa, W. Ando, H. Yoshikawa and A Myoui. "Dual Hydroxyapatite Composite with Porous and Solid Parts: Experimental Study Using Canine Lumbar Interbody Fusion Model." *Journal of Biomedical Materials Research Part B* 78, (2006): 378–384.

Karageorgiou, V. and D. Kaplan. "Porosity of 3d Biomaterial Scaffolds and Osteogenesis." *Biomaterials* 26, no. 27 (2005): 5474-91.

Kasuya, A., S. Sobajima and M. Kinoshita. "In Vivo Degradation and New Bone Formation of Calcium Phosphate Cement-Gelatin Powder Composite Related to Macroporosity after in Situ Gelatin Degradation." *Journal of Orthopaedic Research* 30, no. 7 (2012): 1103-11.

Kern, S., H. Eicher, J. Stoeve, H. Klüter and K. Bieback. "Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells of Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue." *Stem cells* 24, (2006): 1294-1301.

Kim, B. S., K. E. Park, M. H. Kim, H. K. You, J. Lee and W. H. Park. "Effect of Nanofiber Content on Bone Regeneration of Silk Fibroin/Poly(Epsilon-Caprolactone) Nano/Microfibrous Composite Scaffolds." *International Journal of Nanomedicine* 10, (2015): 485-502.

Kim, J., I. S. Kim, T. H. Cho, K. B. Lee, S. J. Hwang, G. Tae, I. Noh, S. H. Lee, Y. Park and K. Sun. "Bone Regeneration Using Hyaluronic Acid-Based Hydrogel with Bone Morphogenetic Protein-2 and Human Mesenchymal Stem Cells." *Biomaterials* 28, no. 10 (2007): 1830-1837.

Kim, U. J., J. Park, H. J. Kim, M. Wada and D. L. Kaplan. "Three-Dimensional Aqueous-Derived Biomaterial Scaffolds from Silk Fibroin." *Biomaterials* 26, no. 15 (2005): 2775-85.

Kogan, G., L. Soltes, R. Stern and P. Gemeiner. "Hyaluronic Acid: A Natural Biopolymer with a Broad Range of Biomedical and Industrial Applications." *Biotechnology Letters* 29, no. 1 (2007): 17-25.

- Lai, G. J., K. T. Shalumon and J. P. Chen. "Response of Human Mesenchymal Stem Cells to Intrafibrillar Nanohydroxyapatite Content and Extrafibrillar Nanohydroxyapatite in Biomimetic Chitosan/Silk Fibroin/Nanohydroxyapatite Nanofibrous Membrane Scaffolds." *International Journal of Nanomedicine* 10, (2015): 567-84.
- Langer, R. and J. P. Vacanti. "Tissue Engineering." *Science* 260, no. 5110 (1993): 920-6.
- Lee, D.J. , R. Padilla, H. Zhang, W. Hu and C. Ko. "Biological Assessment of a Calcium Silicate Incorporated Hydroxyapatite-Gelatin Nanocomposite: A Comparison to Decellularized Bone Matrix." *BioMed Research International* 2014, (2014): 1-12.
- Lee, S. M., D. Cho, W. H. Park, S. G. Lee, S. O. Han and L. T. Drzal. "Novel Silk/Poly(Butylene Succinate) Biocomposites: The Effect of Short Fibre Content on Their Mechanical and Thermal Properties." *Composites Science and Technology* 65, (2005): 647-657.
- Lei, Y., S. Gojgini, J. Lam and T. Segura. "The Spreading, Migration and Proliferation of Mouse Mesenchymal Stem Cells Cultured inside Hyaluronic Acid Hydrogels." *Biomaterials* 32, no. 1 (2011): 39-47.
- Lian, J.B., G.S. Stein and J.E. Aubin. *Bone Formation: Maturation and Functional Activities of Osteoblast Lineage Cells* Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism, Edited by 5th ed.: Philadelphia:American Society for Bone and Mineral Research, 2003.

- Liao, S., C. K. Chan and S. Ramakrishna. "Stem Cells and Biomimetic Materials Strategies for Tissue Engineering." *Materials Science and Engineering: C* 28, no. 8 (2008): 1189-1202.
- Loken, S., R. B. Jakobsen, A. Aroen, S. Heir, A. Shahdadfar, J. E. Brinchmann, L. Engebretsen and F. P. Reinholt. "Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in a Hyaluronan Scaffold for Treatment of an Osteochondral Defect in a Rabbit Model." *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy* 16, no. 10 (2008): 896-903.
- Mathews, S., R. Bhonde, P. K. Gupta and S. Totey. "Novel Biomimetic Tripolymer Scaffolds Consisting of Chitosan, Collagen Type 1, and Hyaluronic Acid for Bone Marrow-Derived Human Mesenchymal Stem Cells-Based Bone Tissue Engineering." *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 102, no. 8 (2014): 1825-1834.
- Meinel, L., R. Fajardo, S. Hofmann, R. Langer, J. Chen, B. Snyder, G. Vunjak-Novakovic and D. Kaplan. "Silk Implants for the Healing of Critical Size Bone Defects." *Bone* 37, no. 5 (2005): 688-98.
- Meinel, L., V. Karageorgiou, S. Hofmann, R. Fajardo, B. Snyder, C. Li, L. Zichner, R. Langer, G. Vunjak-Novakovic and D. L. Kaplan. "Engineering Bone-Like Tissue in Vitro Using Human Bone Marrow Stem Cells and Silk Scaffolds." *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 71, no. 1 (2004): 25-34.
- Nguyen, T. B., Y. K. Min and B. T. Lee. "Nanoparticle Biphasic Calcium Phosphate Loading on Gelatin-Pectin Scaffold for Improved Bone Regeneration." *Tissue Engineering Part A* 21, no. 7-8 (2015): 1376-87.

- Nishida, S., Y. Tanaka and T. Uragami. "Water Insoluble Biocompatible Hyaluronic and Polyion Complex and the Method Same." In *European Patent*, EP0544259 A1, 1993.
- Oh, E. J., K. Park, K. S. Kim, J. Kim, J. A. Yang, J. H. Kong, M. Y. Lee, A. S. Hoffman and S. K. Hahn. "Target Specific and Long-Acting Delivery of Protein, Peptide, and Nucleotide Therapeutics Using Hyaluronic Acid Derivatives." *Journal of Controlled Release* 141, no. 1 (2010): 2-12.
- Park, S. N., J. Park, H. O. Kim, M. J. Song and H. Suh. "Characterization of Porous Collagen/Hyaluronic Acid Scaffold Modified by 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)Carbodiimide Cross-Linking." *Biomaterials* 23, (2002): 1205-1212.
- Peter, X. M. . "Scaffolds for Tissue Fabrication." *Materialstoday*, (2004): 30-40.
- Price, R. D., M. G. Berry and H. A. Navsaria. "Hyaluronic Acid: The Scientific and Clinical Evidence." *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery* 60, no. 10 (2007): 1110-9.
- Qu, Z., J. Yan, B. Li, J. Zhuang and Y. Huang. "Improving Bone Marrow Stromal Cell Attachment on Chitosan/Hydroxyapatite Scaffolds by an Immobilized Rgd Peptide." *Biomedical Materials* 5, no. 6 (2010): 065001.
- Ratanavaraporn, J., H. Furuya and Y. Tabata. "Local Suppression of Pro-Inflammatory Cytokines and the Effects in Bmp-2-Induced Bone Regeneration." *Biomaterials* 33, no. 1 (2012): 304-16.

- Ren, Y. J., Z. Y. Zhou, B. F. Liu, Q. Y. Xu and F. Z. Cui. "Preparation and Characterization of Fibroin/Hyaluronic Acid Composite Scaffold." *International Journal of Biological Macromolecules* 44, no. 4 (2009): 372-8.
- Robson, R. M. . *Silk; Composition, Structure and Properties*. Vol. 4 Handbook of Fibre Science and Technology, Edited by M. and Pearce Edited by Lewin, E.M. New York: Marcel Dekker Inc., 1985.
- Rodriguez, Isaac, Gunjan Saxena, Scott Sell and Gary Bowlin. "Mineralization and Characterization of Composite Lyophilized Gelatin Sponges Intended for Early Bone Regeneration." *Bioengineering* 1, no. 1 (2014): 62-84.
- Sakagushi, Y., I. Sekiya, K. Yakishita and T. Muneta. "Comparasion of Human Stem Cells Derived from Various Mesenchymal Tissues:Superiority of Synovium as a Cell Source." *Arthritis & Rheumatology* 5, (2005): 2521-2529.
- Sasaki, T. and C. Watanabe. "Stimulation of Osteoinduction in Bone Wound Healing by High-Molecular Hyaluronic Acid." *Bone* 16, (1995): 9-15.
- Satija, N. K., G. U. Guradutta, S. Sharma, F. Afrin, P. Gupta and Y. K. Verma. "Mesenchymal Stemcells: Molecular Targets for Tissue Engineering." *Stem Cells and Development* 16, (2007): 7-23.
- Schantéa, C. E., G. Zuberá, C. Herlinb and T. F. Vandammea. "Review Chemical Modifications of Hyaluronic Acid for the Synthesis of Derivatives for a Broad Range of Biomedical Applications." *Carbohydrate Polymers* 85, (2011): 469-489.

- Seong, J. M., B. C. Kim, J. H. Park, I. K. Kwon, A. Mantalaris and Y. S. Hwang. "Stem Cells in Bone Tissue Engineering." *Biomedical Materials* 5, no. 6 (2010): 062001.
- Soltes, L. and R. Mendichi. "Molecular Characterization of Two Host-Guest Associating Hyaluronan Derivatives." *Biomedical Chromatography* 17, no. 6 (2003): 376-84.
- Son, S. R., S. K. Sarkar, B. L. Nguyen-Thuy, A. R. Padalhin, B. R. Kim, H. I. Jung and B. T. Lee. "Platelet-Rich Plasma Encapsulation in Hyaluronic Acid/Gelatin-Bcp Hydrogel for Growth Factor Delivery in Bcp Sponge Scaffold for Bone Regeneration." *Journal of Biomaterials Applications* 29, no. 7 (2015): 988-1002.
- Srihanam, P., W. Simcheur and Y. Srisuwan. "Study on Silk Sericin and Chitosan Blend Film: Morphology and Secondary Structure Characterizations." *Pakistan Journal of Biological Sciences* 12, no. 22 (2009): 1487-90.
- Tabata, Y. and Y. Ikada. "Protein Release from Gelatin Matrices." *Advanced Drug Delivery Reviews* 31 (1998): 287-301.
- Takahashi, Y., M. Yamamoto and Y. Tabata. "Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells in Biodegradable Sponges Composed of Gelatin and Beta-Tricalcium Phosphate." *Biomaterials* 26, no. 17 (2005): 3587-96.
- Tungtasana, H., S. Shuangshoti, S. Shuangshoti, S. Kanokpanont, D. L. Kaplan, T. Bunaprasert and S. Damrongsakkul. "Tissue Response and Biodegradation of Composite Scaffolds Prepared from Thai Silk Fibroin, Gelatin and Hydroxyapatite." *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 21, no. 12 (2010): 3151-62.

- Vachiraroj, N., J. Ratanavaraporn, S. Damrongsakkul, R. Pichyangkura, T. Banaprasert and S. Kanokpanont. "A Comparison of Thai Silk Fibroin-Based and Chitosan-Based Materials on in Vitro Biocompatibility for Bone Substitutes." *International Journal of Biological Macromolecules* 45, no. 5 (2009): 470-7.
- Vepari, C. and D.L. Kaplan. "Silk as a Biomaterial." *Progress in polymer Science* 32, (2007): 991-1007.
- Wess, T. J. and J. P. Orgel. "Changes in Collagen Structure: Drying, Dehydrothermal Treatment and Relation to Long Term Deterioration." *Thermochimica Acta* 365, (2000): 119-128.
- Wongputtaraksa, T. , J. Ratanavaraporn, R. Pichyangkura and S. Damrongsakkul. "Surface Modification of Thai Silk Fibroin Scaffolds with Gelatin and Chitooligosaccharide for Enhanced Osteogenic Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells." *Journal of Biomedical Materials Research Part B* 100B, no. 8 (2012): 2307–2315.
- Wu, C. and Y. Xiao. "Evaluation of the in Vitro Bioactivity of Bioceramics." *Bone and Tissue Regeneration Insights* 2, (2009): 25-29.
- Yang, Y. . "Skeletal Morphogenesis During Embryonic Development." *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* 19, (2009): 197-218.
- Yoshikawa, H. and A. Myoui. "Bone Tissue Engineering with Porous Hydroxyapatite Ceramics." *Journal of Artificial Organs* 8, no. 3 (2005): 131-6.

Yoshikawa, H., N. Tamai, T. Murase and A. Myoui. "Interconnected Porous Hydroxyapatite Ceramics for Bone Tissue Engineering." *Journal of the Royal Society Interface* 6 Suppl 3, (2009): 341-348.

Zanchetta, P., N. Lagarde and J. Guezenec. "A New Bone-Healing Material: A Hyaluronic Acid-Like Bacterial Exopolysaccharide." *Calcified Tissue International* 72, no. 1 (2003): 74-9.

Zhang, F., C. He, L. Cao, W. Feng, H. Wang, X. Mo and J. Wang. "Fabrication of Gelatin-Hyaluronic Acid Hybrid Scaffolds with Tunable Porous Structures for Soft Tissue Engineering." *International Journal of Biological Macromolecules* 48, no. 3 (2011): 474-81.

Zhang, Y., J. Venugopal, Z. Huang, C. Lim and S. Ramakrishna. "Crosslink of the Electrospun Gelatin Nanofibers." *Polymer* 47, (2006): 2911-2917.

ชินธเนศ, วิไล, ถันวา ตันสถิตย์ and มนต์กานต์ ตันสถิตย์. กายวิภาคศาสตร์ของมนุษย์.

กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์เฟื่องฟ้า, 2539.

ดำรงศักดิ์กุล, ศิริพร. "การทดสอบความปลอดภัยของกระดูกเทียมที่ทำจากไหมไทยและโคโตซานตามมาตรฐาน." โครงการวิจัยบูรณาการด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อเพื่อการพัฒนากระดูกเทียมระยะที่ 2 สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (2554).

หรรษาเวก, สิทธิศักดิ์. ชีววิทยาของกระดูก: ชีวเคมีระดับเซลล์และโรคที่พบบ่อย. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์จามจุรีโปรดักท์, 2553.

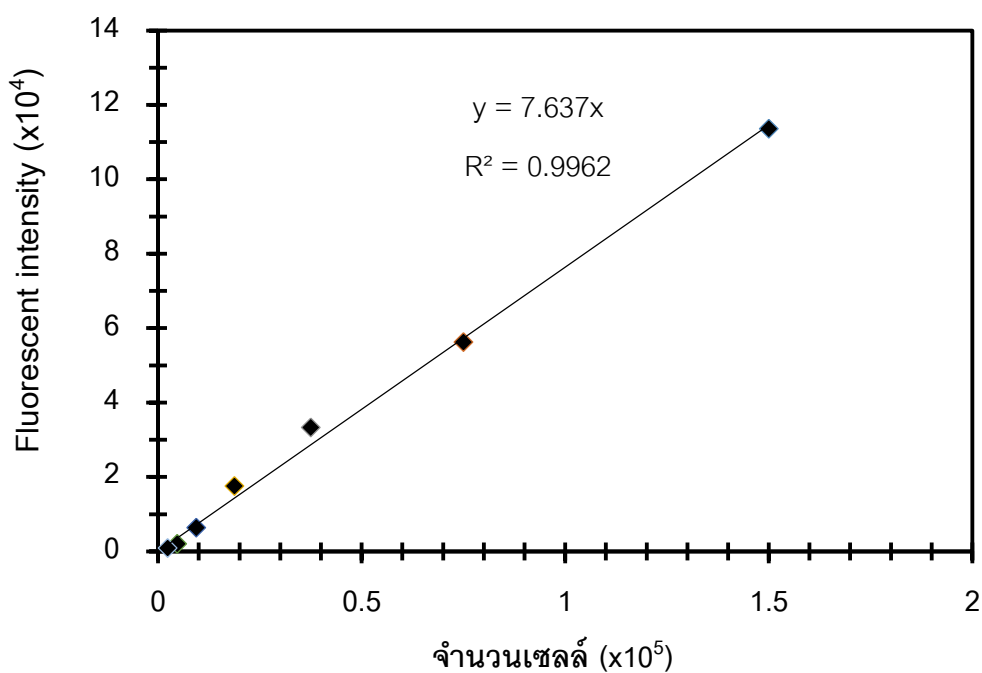
อิทธิระวิวงศ์, พิบูลย์. กระดูก วัสดุชีวภาพ กลศาสตร์ชีวภาพ. กรุงเทพมหานคร: บริษัท เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชัน จำกัด, 2547.



ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

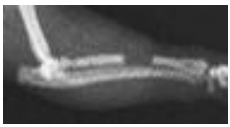
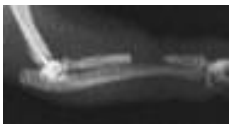
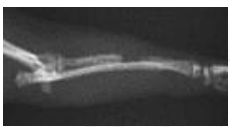

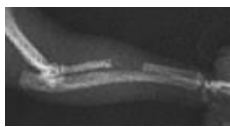

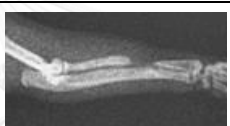






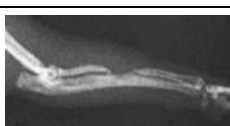






กราฟมาตรฐานของการวัดจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกของหนูโดยวิธี DNA





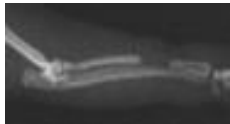
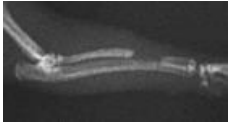

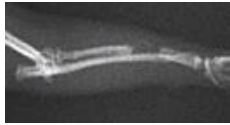














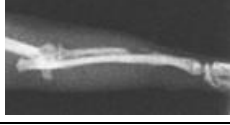
รูปที่ ก. 1 กราฟมาตรฐานของการวัดจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกของหนูโดยวิธี DNA (ช่วงความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้นที่ 355 นาโนเมตร และช่วงความยาวคลื่นของการแผ่รังสีที่ 460 นาโนเมตร)

ภาคผนวก ข.

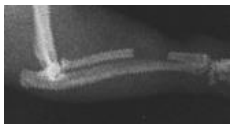

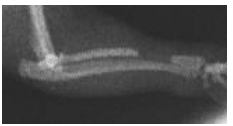
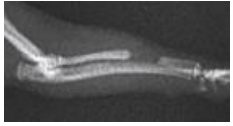
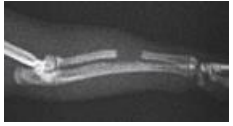
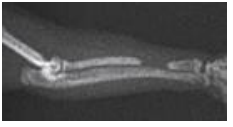














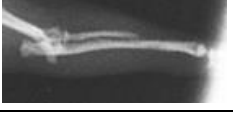
ตารางที่ ข.1 ภาพถ่ายรังสี (X-ray) ภายหลังจากการผ่าตัดในหนูกลุ่มควบคุม (sham) ซึ่งไม่มีการฝังโครงเลี้ยงเซลล์ในช่องว่างกระดูก

โครงเลี้ยงเซลล์	SHAM	SHAM	SHAM
ภายหลังจากผ่าตัดทันที			NA
สัปดาห์ที่ 2			
สัปดาห์ที่ 4			
สัปดาห์ที่ 6			
สัปดาห์ที่ 8			
สัปดาห์ที่ 10			
สัปดาห์ที่ 12			


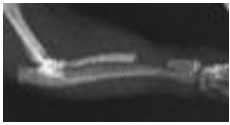
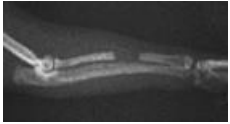










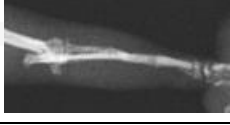
ตารางที่ ข.2 ภาพถ่ายรังสี (X-ray) ภายหลังจากผ่าตัดฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่
คอนจุกต์ด้วยเจลลาติน (CGSF) ในช่องว่างกระดูก

โครงเลี้ยง เซลล์	CGSF	CGSF	CGSF
ภายหลังการ ผ่าตัดทันที			
สัปดาห์ที่ 2			
สัปดาห์ที่ 4			
สัปดาห์ที่ 6			
สัปดาห์ที่ 8			
สัปดาห์ที่ 10			
สัปดาห์ที่ 12			

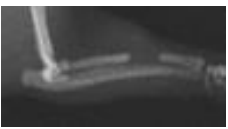

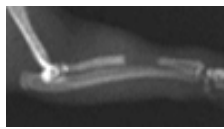
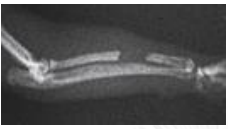
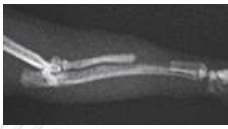
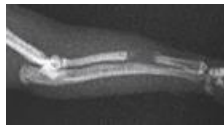
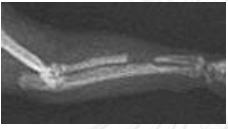

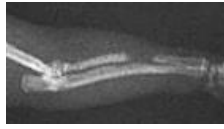












ตารางที่ ข.3 ภาพถ่ายรังสี (X-ray) ภายหลังจากผ่าตัดฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่
 คอนจุกต์ด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (CGSF4) ในช่องว่างกระดูก

โครงเลี้ยง เซลล์	CGSF4	CGSF4	CGSF4
ภายหลังการ ผ่าตัดทันที			
สัปดาห์ที่ 2			
สัปดาห์ที่ 4			
สัปดาห์ที่ 6			
สัปดาห์ที่ 8			
สัปดาห์ที่ 10			
สัปดาห์ที่ 12			

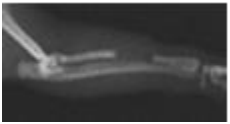
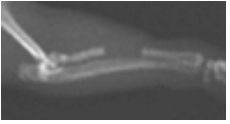
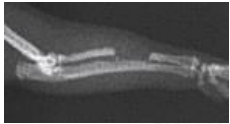

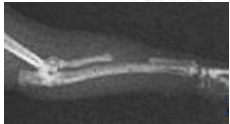
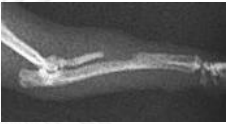
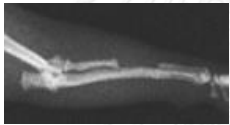
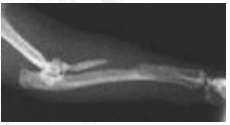
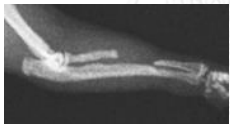

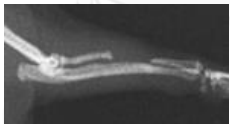
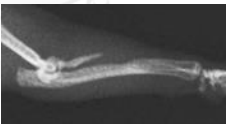

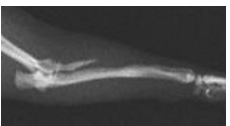
ตารางที่ ข.4 ภาพถ่ายรังสี (X-ray) ภายหลังจากการผ่าตัดฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิก (HSF) ในช่องว่างกระดูก

โครงเลี้ยงเซลล์	HSF	HSF	HSF
ภายหลังจากผ่าตัดทันที			NA
สัปดาห์ที่ 2			NA
สัปดาห์ที่ 4			NA
สัปดาห์ที่ 6			NA
สัปดาห์ที่ 8			NA
สัปดาห์ที่ 10			NA
สัปดาห์ที่ 12			NA


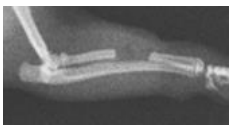
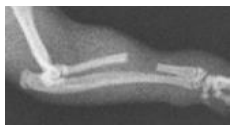
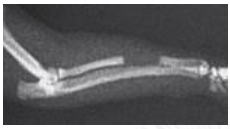

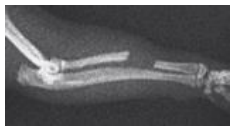
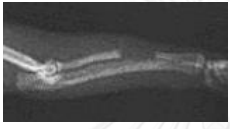

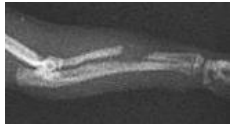












ตารางที่ ข.5 ภาพถ่ายรังสี (X-ray) ภายหลังจากผ่าตัดฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่
 คอนจุกต์ด้วยเจลาติน ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (CGSF with cells) ใน
 ช่องว่างกระดูก

โครงเลี้ยง เซลล์	CGSF with cells	CGSF with cells	CGSF with cells
ภายหลังการ ผ่าตัดทันที			
สัปดาห์ที่ 2			
สัปดาห์ที่ 4			
สัปดาห์ที่ 6			
สัปดาห์ที่ 8			
สัปดาห์ที่ 10			
สัปดาห์ที่ 12			

ตารางที่ ข.6 ภาพถ่ายรังสี (X-ray) ภายหลังจากผ่าตัดฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (CGSF4 with cells) ในช่องว่างกระดูก

โครงเลี้ยง เซลล์	CGSF4 with cells	CGSF4 with cells	CGSF4 with cells
ภายหลังการ ผ่าตัดทันที			NA
สัปดาห์ที่ 2			NA
สัปดาห์ที่ 4			NA
สัปดาห์ที่ 6			NA
สัปดาห์ที่ 8			NA
สัปดาห์ที่ 10			NA
สัปดาห์ที่ 12			NA

ตารางที่ ข.7 ภาพถ่ายรังสี (X-ray) ภายหลังจากผ่าตัดฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่เคลือบพื้นผิวด้วยกรดไฮยาลูรอนิกที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (HSF with cells) ในช่องว่างกระดูก

โครงเลี้ยงเซลล์	HSF with cells	HSF with cells	HSF with cells
ภายหลังการผ่าตัดทันที			
สัปดาห์ที่ 2			
สัปดาห์ที่ 4			
สัปดาห์ที่ 6			
สัปดาห์ที่ 8			
สัปดาห์ที่ 10			
สัปดาห์ที่ 12			

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวต้นพร ล้ำเลิศ เกิดเมื่อวันที่ 21 พฤศจิกายน พ.ศ. 2531 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร เข้าศึกษาระดับชั้นมัธยมศึกษาที่โรงเรียนแอดเวนติส เอกมัย สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2553 และเข้าศึกษาต่อระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ในหลักสูตรวิศวกรรมชีวเวช คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2554

ผลงานในการประชุมวิชาการ

ต้นพร ล้ำเลิศ, กัมปนาท สุนทรวิภาต, ไศรดา กนกพานนท์ และศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล, ความสามารถในการสร้างกระดูกในหนูทดลองของโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีไฟโบรอินใหม่ไทยเป็นองค์ประกอบหลัก, การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 53 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (53rd Kasetsart University Annual Conference), มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร, ประเทศไทย, วันที่ 3 - 6 กุมภาพันธ์ 2558