

การศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติการสร้างกระดูกใหม่ในสิ่งมีชีวิต
ด้วยการใช้โครงเลี้ยงเซลล์โคโคซาน/กรดไตรคาร์บอกซิลิก ที่ฝังเซลล์เอ็นดอทีทนต์ของมนุษย์



นายธีรวัฒน์ สุขไผ่ตา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

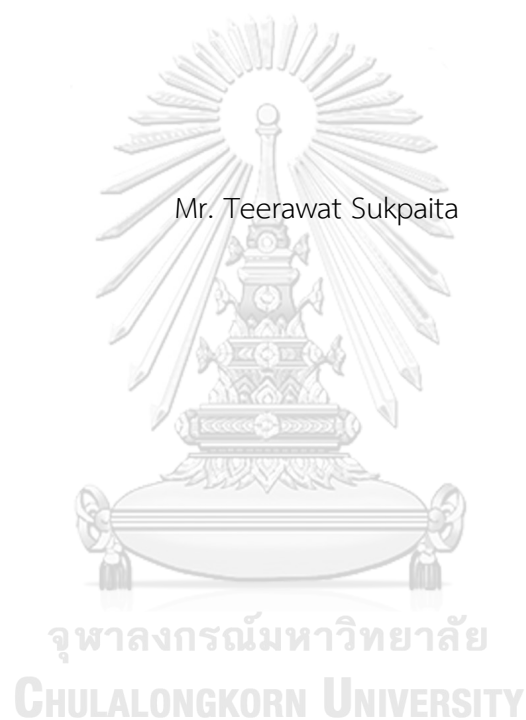
สาขาวิชาสัตวศาสตร์ช่องปากและแม็กซิลโลเฟเชียล ภาควิชาสัตวศาสตร์

คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2560

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

COMPARATIVE STUDY OF IN VIVO BONE REGENERATION USING
CHITOSAN/DICARBOXYLIC ACID SCAFFOLD IMPLANTED WITH HUMAN PERIODONTAL
LIGAMENT CELLS



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Oral and Maxillofacial Surgery
Department of Oral and Maxillofacial Surgery
Faculty of Dentistry
Chulalongkorn University
Academic Year 2017
Copyright of Chulalongkorn University

Thesis Title COMPARATIVE STUDY OF IN VIVO BONE
REGENERATION USING CHITOSAN/DICARBOXYLIC
ACID SCAFFOLD IMPLANTED WITH HUMAN
PERIODONTAL LIGAMENT CELLS

By Mr. Teerawat Sukpaita

Field of Study Oral and Maxillofacial Surgery

Thesis Advisor Associate Professor Atiphan Pimkhaokham, D.D.S.,
Ph.D

Thesis Co-Advisor Associate Professor Ruchanee Ampornaramveth,
D.D.S., Ph.D
Professor Suwabun Chirachanchai, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University in Partial
Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

..... Dean of the Faculty of Dentistry
(Assistant Professor Suchit Poolthong, D.D.S., Ph.D)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman
(Associate Professor Somchai Sessirisombat, M.D., D.D.S.)

..... Thesis Advisor
(Associate Professor Atiphan Pimkhaokham, D.D.S., Ph.D)

..... Thesis Co-Advisor
(Associate Professor Ruchanee Ampornaramveth, D.D.S., Ph.D)

..... Thesis Co-Advisor
(Professor Suwabun Chirachanchai, Ph.D.)

..... External Examiner
(Associate Professor Prisana Pripatananont, D.D.S.)

ธีรวัฒน์ สุขไผ่ตา : การศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติการสร้างกระดูกใหม่ในสิ่งมีชีวิตด้วยการใช้โครงเลี้ยงเซลล์โคโตซาน/กรดไคคาร์บอกซิลิก ที่ฝังเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ของมนุษย์ (COMPARATIVE STUDY OF IN VIVO BONE REGENERATION USING CHITOSAN/DICARBOXYLIC ACID SCAFFOLD IMPLANTED WITH HUMAN PERIODONTAL LIGAMENT CELLS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ทพ. ดร.อาทิพันธุ์ พิมพ์ขาวขำ, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. ทญ. ดร. รัชณี อัมพรอร่ามเวทย์, ศ. ดร. สุวบุญ จิรชาญชัย, 67 หน้า.

การละลายตัวของสันกระดูกขากรรไกรภายหลังการสูญเสียฟันส่งผลต่อการใส่ฟันทดแทน โดยเฉพาะการฝังรากฟันเทียม หนึ่งในวิธีการที่ได้รับความสนใจในการป้องกันการละลายตัวของสันกระดูกขากรรไกรคือกระบวนการคงสภาพสันกระดูกขากรรไกรด้วยวิธีการทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อ คณะผู้วิจัยได้พัฒนาโครงเลี้ยงเซลล์โคโตซานซาน ที่ขึ้นรูปผ่านการละลายและเชื่อมโยงข้ามด้วยกรดไคคาร์บอกซิลิกชนิดมีหมู่ไคคาร์บอกซิลสองหมู่ขึ้น แต่ยังไม่มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับคุณสมบัติของวัสดุชนิดนี้ในการกระตุ้นการสร้างกระดูกใหม่ในสิ่งมีชีวิต การศึกษาวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติการกระตุ้นการสร้างกระดูกใหม่ของโครงเลี้ยงเซลล์โคโตซาน/กรดไคคาร์บอกซิลิก ซึ่งได้รับการฝังหรือไม่ฝังเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ของมนุษย์ ในรอยวิการกะโหลกศีรษะหนูทดลอง

ทำการศึกษาโดยใช้รอยวิการกะโหลกศีรษะหนูเมาส์จำนวน 18 ตัว แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว ได้แก่ กลุ่มที่ใส่โครงเลี้ยงเซลล์โคโตซานชนิดที่ฝังเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ กลุ่มที่ใส่โครงเลี้ยงเซลล์โคโตซานชนิดที่ไม่ฝังเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ และกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่โครงเลี้ยงเซลล์ลงในรอยวิการกะโหลกศีรษะ และทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบกระดูกที่สร้างขึ้นใหม่ด้วยการถ่ายภาพรังสีไมโครคอมพิวเตอร์โทโมกราฟีและการวิเคราะห์ทางจุลกายวิภาคในสัปดาห์ที่ 6 และสัปดาห์ที่ 12 หลังการผ่าตัด ผลการศึกษาพบว่ากลุ่มที่ใส่โครงเลี้ยงเซลล์โคโตซานชนิดที่ฝังเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ และกลุ่มที่ใส่โครงเลี้ยงเซลล์โคโตซานชนิดที่ไม่ฝังเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ สามารถกระตุ้นการสร้างกระดูกใหม่ได้มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระยะเวลา 6 และ 12 สัปดาห์

ผลการวิจัยสรุปได้ว่า โครงเลี้ยงเซลล์โคโตซาน/กรดไคคาร์บอกซิลิก มีคุณสมบัติที่ดีในการเป็นโครงยึดเกาะให้กับเซลล์ต้นกำเนิด และสามารถกระตุ้นการสร้างกระดูกใหม่ในรอยวิการกะโหลกศีรษะของหนูทดลอง

ภาควิชา	ศัลยศาสตร์	ลายมือชื่อนิสิต
สาขาวิชา	ศัลยศาสตร์ช่องปากและแม็กซิลโลเฟเชียล	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก
	เชียล	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม
ปีการศึกษา	2560	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5875814032 : MAJOR ORAL AND MAXILLOFACIAL SURGERY

KEYWORDS: CHITOSAN/DICARBOXYLIC ACID SCAFFOLD / PERIODONTAL LIGAMENT CELLS / BONE REGENERATION / ALVEOLAR RIDGE PRESERVATION

TEERAWAT SUKPAITA: COMPARATIVE STUDY OF IN VIVO BONE REGENERATION USING CHITOSAN/DICARBOXYLIC ACID SCAFFOLD IMPLANTED WITH HUMAN PERIODONTAL LIGAMENT CELLS. ADVISOR: ASSOC. PROF. ATIPHAN PIMKHAOKHAM, D.D.S., Ph.D, CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. RUCHANEE AMPORNARAMVETH, D.D.S., Ph.D, PROF. SUWABUN CHIRACHANCHAI, Ph.D., 67 pp.

After tooth loss, a consequent atrophy of the alveolar process always takes place and adversely affect the reconstruction process especially by dental implant. A novel chitosan/dicarboxylic acid scaffold (CS/DA scaffold) has been developed and proven to be an excellent candidate material in bone tissue engineering. This study aimed to evaluate the effects of a CS/DA scaffold with and without seeded primary human periodontal ligament cells (hPDLCs) in mouse calvarial defect model. Eighteen mice were divided into 3 groups of 6 each. Four-millimeter calvarial defects were created on both side of parietal bone and implanted with either CS/DA scaffold or CS/DA scaffold with hPDLCs. The empty bony defects were kept as control. New bone formation was assessed using microcomputed tomography and histological analyses 6 and 12 weeks after surgery. Results showed that In vivo bone regeneration at 6 and 12 weeks was significantly enhanced by CS/DA scaffold alone and CS/DA scaffold implanted with hPDLCs ($P < 0.05$). Histological staining confirmed these findings and impressive new bone formation was observed in CS/DA scaffold and CS/DA scaffold with hPDLCs compared with control.

Conclusion: Our study proposes CS/DA scaffold as a novel bone regenerative material with good osteoinductive/osteoconductive properties.

Department:	Oral and Maxillofacial	Student's Signature
	Surgery	Advisor's Signature
Field of Study:	Oral and Maxillofacial	Co-Advisor's Signature
	Surgery	Co-Advisor's Signature

Academic Year: 2017

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deep gratitude to my research advisers, Dr. Atiphan Pimkhaokham, Dr. Ruchanee Ampornaramveth and Dr. Suwabun Chirachanchai as well as our Dean and Chairman, oral and maxillofacial surgery, faculty of dentistry, Chulalongkorn University, Dr. Suchit Poolthong and Dr. Somchai Sessirisombat who gave me the opportunity to do this project on the topic "Comparative study of in vivo bone regeneration using chitosan/dicarboxylic acid scaffold implanted with human periodontal ligament cells" which also helped me in doing a lot of research and I came to know about so many new things I am really thankful to them.

I would also like to extend my thanks to the technicians of the laboratory of the oral pathology department and everyone in microbiology department for their always helped me a lot in finalizing this project.

Finally, I wish to thank my family for their support and encouragement throughout my study.



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT	iv
ENGLISH ABSTRACT	v
ACKNOWLEDGEMENTS	vi
CONTENTS	vii
CHAPTER 1 INTRODUCTION	11
1.1 Background and Rationale.....	11
1.2 Research question.....	13
1.3 Research objective.....	13
1.4 Hypothesis	13
1.5 Expected benefits.....	13
1.6 Conceptual framework.....	14
CHAPTER 2 LITERATURE REVIEW.....	15
2.1 Bone structure and properties	15
2.2 Bone tissue engineering	16
2.3 Requirements for an ideal scaffold.....	19
2.4 Types of scaffolds	20
2.5 Chitosan for bone tissue engineering applications	22
2.6 Bone regeneration using periodontal ligament stem cell	25
CHAPTER 3 MATERIAL AND METHODS.....	28
3.1 Material.....	28
3.1.1 Primary human periodontal ligament cells.....	28
3.1.2 chitosan/dicarboxylic acid scaffold.....	28

	Page
3.1.3 Animal	29
3.2 Methods	29
3.2.1 <i>In vitro</i> differentiation assay	29
3.2.2 Real time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).....	30
3.2.3 Mouse calvaria defect model	30
3.2.4 Micro-Computed Tomography (Micro-CT)	32
3.2.5 Histological Examination.....	32
3.3 Statistical Analysis	33
CHAPTER 4 RESULT	34
4.1 Human periodontal ligament cells isolation and differentiation	34
4.2 CS/DA scaffold promoted osteoblast-related genes expression by hPDLCs.....	35
4.3 CS/DA scaffold enhanced <i>in vivo</i> bone regeneration in mice calvariae.....	36
CHAPTER 5 DISCUSSION.....	41
CHAPTER 6 CONCLUSION	45
REFERENCES	53
VITA 67	

List of table

Table 1 Select criteria for bone tissue engineering scaffold.	18
Table 2 Considerations for scaffold design used in bone tissue engineering. (24).....	19
Table 3 Type of biomaterials for scaffolds used in bone regeneration.....	21



List of figures

Figure 1 Long bone macrostructure	15
Figure 2 Proportion of scaffolds used in bone tissue engineering applications.....	20
Figure 3 Chemical Structures of chitin and chitosan	23
Figure 4 Gross structure and microstructure of chitosan/dicarboxylic acid scaffold....	29
Figure 5 Mouse calvaria defect model.....	31
Figure 6 (A) The primary periodontal ligament cells extracted from periodontal ligament were cultured for 14 days. (B) Mineral deposition of hPDLs after 10 days in osteogenic medium observed by Alizarin red staining.....	34
Figure 7 RT-PCR for osteoblast differentiation associated gene expression analysis. (independent samples t-test between OM group and OM+C/D scaffold group.....	35
Figure 8 Effect of CS/DA scaffold on bone regeneration in mouse calvaria defects as assessed by micro-CT scanning.....	37
Figure 9 Effect of CS/DA scaffold on bone regeneration in mouse calvaria defects as assessed by H&E staining (x20).....	41
Figure 10 Effect of CS/DA scaffold on bone regeneration in mouse calvaria defects as assessed by Masson's Trichrome staining (x20).	41
Figure 11 Effect of CS/DA scaffold on bone regeneration in mouse calvaria defects as assessed by Undecalcified Von Kosa staining (x20).....	41

CHAPTER 1 INTRODUCTION

1.1 Background and Rationale

After tooth loss, a consequent atrophy of the alveolar bone always takes place. Many studies have shown that resorption of the alveolar bone adversely result in the loss of functional and esthetical consequences. Insufficient height and width of alveolar bone usually found at the extraction site which often impair the execution of both traditional dentures and dental implant. (1-3)

Alveolar ridge preservation methods have been introduced to maintain a sufficient ridge contour in extraction areas especially at the site with aesthetic concern. In fact, several methods have already been introduced for alveolar ridge preservation such as socket grafting with autografts, allografts, xenografts and alloplasts, however, each of which has a limitation. Some approaches are even far from ideal, the material may not successfully be replaced by bone for years. Development of bone tissue engineering materials is therefore a crucial step for advancing alveolar ridge preservation techniques. (4-8)

In bone tissue engineering, 3D porous scaffold is an indispensable role in stimulate new bone formation and controlling bone cells function. The required property of scaffolding for bone tissue engineering is osteoconduction in which allow osteoprogenitor cells to migrate, proliferate and finally differentiate to form new bone. (9, 10)

Chitosan have been introduced to use as tissue regenerative scaffolds because its provide good mechanical structure and promote cell proliferation and differentiation. As natural-derived product, chitosan has high biocompatibility and

therefore meet all criteria to be an excellence candidate for tissue engineering materials. Still, the major limitations of chitosan is difficult solubility in aqueous solutions. While chitosan scaffold is considered to be an ideal polymer for making bioactive compounds, there is a potential in their toxic byproducts. The use of acid or chemical crosslinkers reagents for solvents make problems about final product contamination. (11, 12)

Previously, the conventional method to prepare chitosan is to dissolve in mono-carboxylic acids, such as acetic acid and formic acid. This reaction requires the subsequent utilization of crosslinking agent such as glutaraldehyde in order to form the scaffold. Besides mono-carboxylic acids, there are various types of multi-carboxylic acids, acids that have two or more carboxyl group. Several of these acids are naturally non-toxic solvent and widely use in food and medicinal-related industries. Moreover, multi-carboxylic acids not only solubilized chitosan scaffold in aqueous solutions but also improved chitosan scaffold properties through its non-covalent bond. (13-15)

Recently, Valderruten et al. (16) reported the usage of natural dicarboxylic acids as dissolving and crosslinking agents to preparation of chitosan hydrogels, serving as high biocompatibility material. This method was the green method for chitosan preparation, enormously relieved crosslinkers contamination of the final byproduct. However, there was no studies report the effect of chitosan prepared by multi/di-carboxylic acids dissolving/cross-linking method on bone tissue regeneration properties. In the present study, we evaluated bone regeneration property of a novel chitosan/dicarboxylic acid scaffold prepared by utilizing dicarboxylic as dissolving and cross-linking agents implanted with or without primary human periodontal ligament cells in mouse calvarial defects by micro-computed tomography analysis.

1.2 Research question

Does a chitosan/dicarboxylic acid scaffold with and without primary human periodontal ligament cells have potentiality to stimulate new bone formation in mouse calvarial defects?

1.3 Research objective

To compare new bone formation by means of histologic response and Micro-computed tomography analysis of chitosan/dicarboxylic acid scaffold with and without primary human periodontal ligament cells in mouse calvarial defects.

1.4 Hypothesis

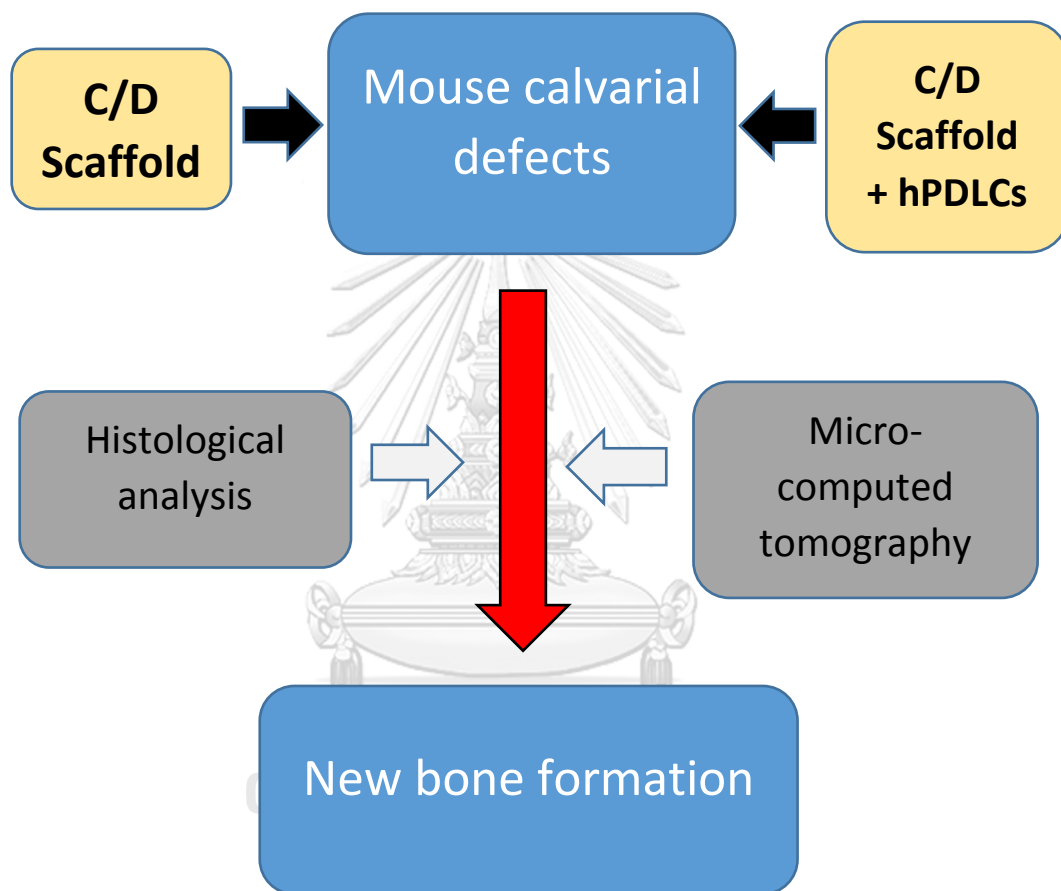
Ho : Chitosan/dicarboxylic acid scaffold with and without primary human periodontal ligament cells do not have potentiality to stimulate bone formation in mouse calvarial defects.

H1 : Chitosan/dicarboxylic acid scaffold with and without primary human periodontal ligament cells have potentiality to stimulate bone formation in mouse calvarial defects.

1.5 Expected benefits

The information about potentiality to stimulate bone formation of chitosan/dicarboxylic acid scaffold has been described, proposing an alternative material for bone regeneration. This study strengthens the possibility to develop new bone substitute material from natural source in the near future.

1.6 Conceptual framework



CHAPTER 2 LITERATURE REVIEW

2.1 Bone structure and properties

Bone tissue is a complex living organ which structurally compose of cortical and cancellous bone (Fig. 1). Bone is hard and many of its functions depend on that hardness. These architectures allow bone tissue to perform its biological and mechanical functions. Compact bone is the outer most compartment, and accounts for 80% of the total bone mass. Beside its main function as core framework to support and protect other organs, provide levers for movement, and (shared with cancellous bone) acts as reservoir to store minerals content of our body. The inner compartment of bone is referred as the trabecular or cancellous bone. Trabecular bone, also known as cancellous bone, a sponge-like tissue, compose of the lacunae and osteocytes in a lattice- like network in trabecular space. Trabecular bone contain a lot more surface area with higher metabolic activity. (17)

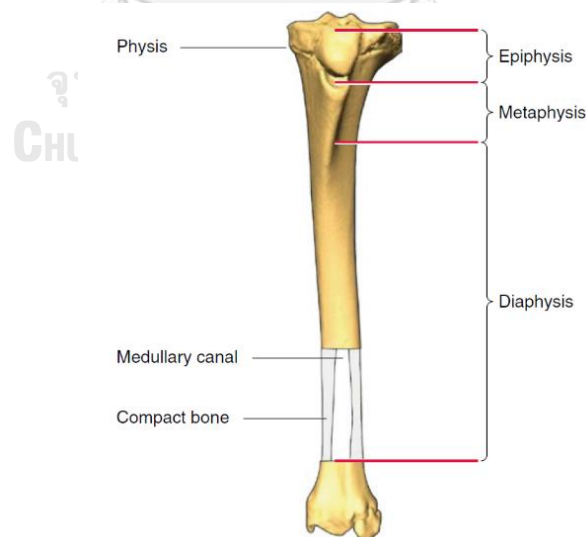


Figure 1 Long bone macrostructure

Bone contains a relatively small number of cells entrenched in a matrix of collagen fibers that provide a surface for inorganic salt crystals to adhere. Although bone cells compose a small amount of the bone volume, they are crucial to the function of bones. Four types of cells are found within bone tissue: osteoblasts, osteocytes, osteogenic cells, and osteoclasts. Osteoblasts develop from undifferentiated precursor of the mesenchymal origin while osteocytes are osteoblasts those are entombed in calcified matrix. Whereas osteoclasts arise from blood-borne monocytes which derived from distinctively different hematopoietic stem cells origin. The processes of bone remodeling require both deposition of a new bone by osteoblasts in concert with matrix resorption capability of osteoclasts. These processes shape and reshape bones during growth and continue throughout the life making bone the vital organs. Physiologic remodeling does not change bone shape due to the balance between bone resorption and bone deposition in the same location.

Over the years, bone grafts have been used as the standard treatment of bone augmentation. Although these methods are the standard treatments, shortcomings are encountered with their usage. The size of the defect and the viability of the host bed can limit their application. Not only the operating time required for harvesting autografts is bothersome, but often the donor tissue is scarce, and several adverse consequences might occur such as donor site morbidity, associated infection, pain, and hematoma. Moreover, allograft and xenograft introduces the risk of disease or cross-infection. (9, 18)

2.2 Bone tissue engineering

Bone tissue engineering uses the principles of engineering and biology for developing biological substitutes in order to restore, maintain, or improve its function.

Recently, the concept of tissue engineering has emerged as a promising alternative concept for treatment bone defect. Bone tissue engineering requires three components: (1) morphogenetic growth signal, (2) the cells that will be respond to the signal, (3) a suitable scaffold that can serve for the host cells. (19, 20)

2.2.1 Cell approaches in bone tissue engineering

One of the key component of mineralized tissue engineering is progenitor cells. Providing osteoprogenitor cells that have intrinsic potential to regenerate bone could give rise to a better result. However, the identification of the cell sources that have potential to differentiate into osteoblasts and form neo-vasculature those can be implanted into bone defect are the main obstacle. Identification of possible candidates for cell transplantation can be explained by the finding that those cells demonstrate capability to reconstruction osseous tissue by undergo a progressive differentiation from an undifferentiated progenitors to biosynthetically mature cells. Therefore this therapeutic strategies can support the healing process at different stages of bone tissue development. (20)

2.2.2 Scaffold

Scaffold materials for cells seeding play important role in bone tissue engineering. Scaffold is important for cell homing, proliferating and forming of new osseous tissue in three dimensions. Critical consideration to select an ideal scaffold for bone tissue engineering (Table 1) include, for example, biocompatibility, biodegradability, promote cellular activities and possess proper physical and mechanical properties.

Challenging topic in bone tissue engineering is the development of scaffolds that give the promising result in bone regeneration processes. The development of such scaffold could follow some or all the stages listed included: (1) scaffold fabrication (2) incorporation of growth factor (3) testing for in vitro bone regeneration in a static culture (petri dish) (4) testing for in vivo regeneration potential in a dynamic environment. (5) growth of mature tissue in a physiologic environment. (6) surgical transplantation of the scaffold. (7) tissue-engineered transplant assimilation/remodeling. (21)

Table 1 Select criteria for bone tissue engineering scaffold.

Bone tissue engineering scaffold properties
1. Osteoinduction
2. Osteoconduction
3. Degradation rates of scaffold according with new bone growth
4. Appropriate mechanical and physical properties
5. Good bony apposition
6. Promotes osteoblast ingrowth
7. Does not induce soft tissue growth
8. Average pore sizes approximately 200 - 400 μm
9. Minimal inflammation of surrounding tissue
10. Sterilizable without loss of properties

2.3 Requirements for an ideal scaffold

The requirements of scaffolds for bone tissue engineering are complicate. A variety of parameters (Table 2) such as degradation rate, mechanical strength, porosity, pore size, pore microstructures, surface chemistry, and topography, should be carefully considered for the design and fabrication of scaffolds to meet the needs of a specific tissue engineering application. (9, 18, 19, 22, 23)

Table 2 Considerations for scaffold design used in bone tissue engineering. (24)

Criteria	Function
Biocompatibility	Ability of a material to perform with an appropriate host response in a specific situation without immune response
Biodegradability	The degradation rate of scaffold consistent to new bone formation
Mechanical properties	Appropriate mechanical properties to provide temporary support
Osteoinductivity	Osteoprogenitor cells can be stimulated when presence of scaffolds
Porosity	Proper pore size to allow Osteoprogenitor cells ingrowth

2.4 Types of scaffolds

There is a rapid increase in the number of novel scaffolds that has been developed for bone tissue engineering over the years, using varied materials and fabricated in different forms (Table 3). Polymers remain to be the most commonly investigated, followed by ceramics and often used in combination as composites (Fig. 2). (23, 24)

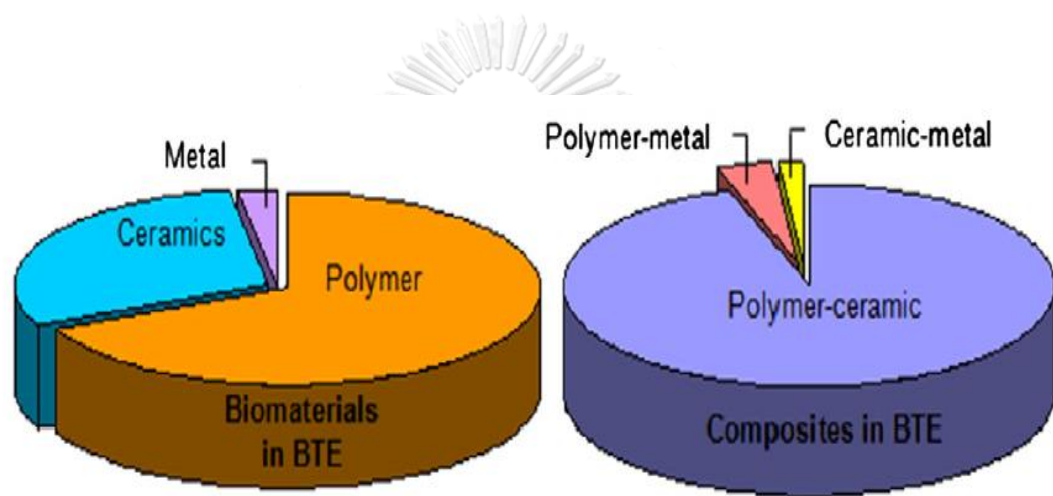


Figure 2 Proportion of scaffolds used in bone tissue engineering applications. (24)

Table 3 Type of biomaterials for scaffolds used in bone regeneration

Material type	Advantage	Disadvantage	Example materials
Metal	- Good compressive strengths	- Biomolecules cannot be integrated - Not biodegradable - Concerns about ion release	Tantalum, titanium Magnesium (alloy) Iron (alloy)
Ceramic	- Good biocompatibility - Good osteoinductive properties	- Low fracture toughness - Difficulties in forming process.	Bioglass calcium sulphate hemihydrate (CSH) Calcium carbonate Dicalcium phosphate Octacalcium phosphate β -Tricalcium phosphate Biphasic calcium phosphate hydroxyapatite
Polymer	- Good biocompatibility - Easy formability	- Low osteoinductive capacity	Poly lactides (PLA) Polyglycolides (PGA) Polycaprolactone (PCL)

	<ul style="list-style-type: none"> - Good mechanical properties - Biodegradability 		Cellulose Hyaluronan Fibrin Collagen Chitosan
Composite	<ul style="list-style-type: none"> - Combine desirable properties of different materials 		Amorphous CaP PLGA β -TCP Chitosan-gelatin HA-Collagen HA-PLGA

2.5 Chitosan for bone tissue engineering applications

The history of chitosan dates back to the 19th century, when the deacetylated form of chitosan was carried out by Rouget in 1859.⁽²⁵⁾ Studies on chitosan have been raised as biomaterials for tissue engineering applications during the past 40 years. Chitosan is a linear polysaccharide, composed of glucosamine and N-acetyl glucosamine units linked by β (1-4) glycosidic bonds (Fig. 3).⁽²⁶⁾

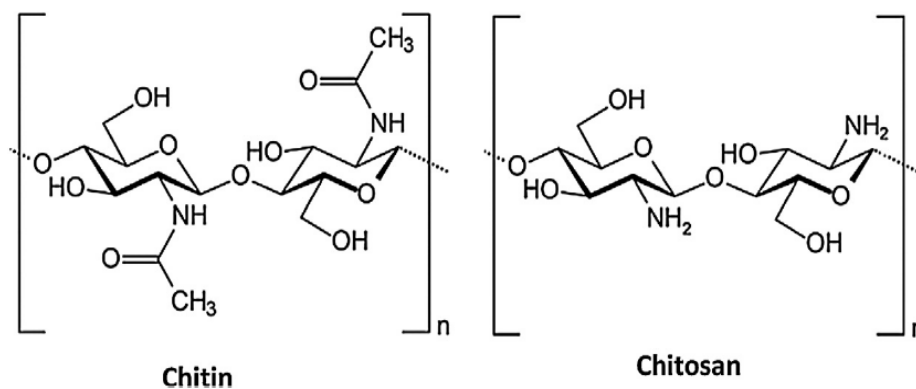


Figure 3 Chemical Structures of chitin and chitosan

Chitosan is a deacetylated form of chitin procured mainly from the exoskeleton of shrimps and crabs. Chitosan is biodegradable and has good biocompatibility with almost all the tissues of the body. Chitosan and its derivatives show excellent biological properties including biodegradability, immunological, antibacterial and wound-healing activities. Moreover, chitosan has displayed significant osteoconductivity, but minimal osteoinductive property. It induces proliferation of osteoblast cells, mesenchymal cells and induces in vivo neovascularization. (27-30) For bone engineering applications, Chitosan can also be prepared in a variety of forms like sponges, fibers, films, hydrogel and other complex structures. Thus, Chitosan satisfies most of the properties supporting its candidature for tissue engineering applications. (29, 31, 32)

In its crystalline form, chitosan is normally insoluble in aqueous solution above pH 7, however, in dilute acids (pH 6.0), the protonated free amino groups on glucosamine facilitate solubility of the molecule. Generally, chitosan has three types of reactive functional groups, an amino group as well as both primary and secondary hydroxyl groups at the C(2), C(3), and C(6) positions, respectively. These groups allow modification of chitosan like graft copolymerization for specific applications, which can produce various useful scaffolds for tissue engineering applications. The chemical nature of chitosan in turn provides many possibilities for covalent and ionic modifications which allow extensive adjustment of mechanical and biological properties. Previously, the most popular acid solutions used for chitosan dissolution were monocarboxylic acids with only one carboxyl group, such as acetic acid and formic acid and requires the use of a crosslinking agent such as glutaraldehyde for the

formation of scaffold. Besides monocarboxylic acids, there are many kinds of multi-carboxylic acids with more than one carboxyl group. They are found naturally non-toxic solvent and are widely used in the food and medical-related industries. Moreover, multi-carboxylic acids not only solubilizing the chitosan in water but also improves the property of the scaffold through its non-covalent cross-linking interaction with chitosan. (13-15)

Valderruten and colleagues (16) reported the preparation of chitosan hydrogels using natural dicarboxylic acids as nontoxic dissolving and cross-linking agents, contributing to the biocompatibility of the material. This was the green method of preparation, greatly reduced contamination of the final product, resulting in highly pure, biocompatible materials that could likely be useful in various aspects of biomedicine.

Chitosan has been extensively used in bone tissue engineering since it was shown to promote growth and mineral rich matrix deposition by osteoblasts in culture. Also chitosan is biocompatible, biodegradable, and can be molded into porous structures to allow osteoconduction. (33) Chitosan matrices have been combined with osteogenic materials, like hydroxyapatite, calcium phosphate and sulfate, and others. The purpose of the combination of those biomaterials is to obtain organic and inorganic composites that simulate the bone structure. (11)

Chitosan composites have been tested in bone defects in experimental models successfully for bone regeneration. Chitosan hydrogel, gelifiable by blue light, was used for BMP-2 release and showed good bone regeneration in a femoral defect in rat. (34) Similar results were observed with the use of a lyophilized porous membrane, a

compound of chitosan and hydroxyapatite, in a calvarial defect in rat, the composite membrane filled up the defect as compared to a control, in addition, the presence of osteogenic markers was more abundant in the experimental group. (35)

Chitosan/nanohydroxyapatite composites have shown a relevant effect for tissue engineering, because of its ability to induce a good proliferative response in osteoblasts, and in a tibial defect in a rabbit it showed good bone regeneration at 8 weeks seen by microcomputerized tomography. (36)

Regenerative medicine is facing new challenges in the way to induce tissue repair in live tissue. At present, chitosan is one of the most promising biopolymers for tissue engineering and possible orthopedic applications. In particular, the possibility to generate structures with predictable pore sizes and degradation rates make chitosan a suitable material as a bone graft alternative in orthopedic procedures.

However, efforts to improve the mechanical properties of chitosan composite biomaterials are essential for this type of application. Great importance is the ability of chitosan to bind anionic molecules such as growth factors, glycosaminoglycans and DNA. In fact, the combination of good biocompatibility, intrinsic antibacterial activity, ability to bind to growth factors and to be processed in a variety of different shapes makes chitosan a promising candidate scaffold material for cartilage, intervertebral disc and bone tissue engineering in clinical practice.

2.6 Bone regeneration using periodontal ligament stem cell

In addition to having an appropriate scaffold, another essential element in bone tissue engineering is stem cell transplantation. Recent advances in stem cell biology and regenerative medicine enable the development of novel treatment using cell-

based therapeutics that are likely to stimulate regeneration with superior efficacy and predictability. (37, 38)

Mesenchymal stem cells isolated from tooth and surrounding tissue of tooth can be efficiently harvested and can commit to the desired phenotype in combination with prefabricated scaffolds and might be used for various regenerative therapies. (39, 40)

Periodontal ligament cells (PDLs) were shown to have excellent potential to differentiate into bone forming osteoblasts therefore making them a honest candidate to be used for autologous bone replacement. (40, 41) The periodontal ligament is a special connective tissue, situated between alveolar bone and. Periodontal ligament is also involved in maintaining homeostasis in periodontal tissues by supplying progenitor cells. Multipotent stem cells have been isolated from periodontal ligament and were shown to have similar characteristics to bone marrow stem cells, with the potential to differentiate into adipocytes, osteoblasts and chondrocytes under specified differentiation conditions, and were subsequently named periodontal ligament stem cells. Periodontal ligament stem cells have the ability to form cementum and periodontal ligament structures when transplanted into surgically created periodontal defects in animals, demonstrating their potential use for regeneration of periodontal tissues.

Stem cells cultured from the periodontal ligament possess characteristics of MSC such as cell surface marker expression (CD105+, CD90+, CD44+, CD73+, CD45-, CD31-, and CD34-) and multilineage differentiation ability (into osteoblasts,

chondrocytes, and adipocytes). Shaohua et al. (42) concluded that PDLSCs combined with a scaffold can be used in bone tissue engineering.



CHAPTER 3 MATERIAL AND METHODS

3.1 Material

3.1.1 Primary human periodontal ligament cells

Teeth from healthy patient, age 18 to 25 year-old, were extracted as recommended by their dentist. Each subject was without oral and systemic infection. The cell isolation procedure used in this study modified from the protocol by Mrozik et al. (43) The periodontal ligament attached to the middle one-third of the root surface was cut off with a surgical blade. The tissue explants were seeded in culture medium (10% FBS, 1% L-Gluamine, 0,5 mg/ml gentamicin and 3 mg/ml amphotericin B in DMEM, #11960, Gibco, Life Technologies Corporation, Grand Island, NY) until outgrowing cells reached confluence. The cells were incubated at 37° C humidified atmosphere with 5% CO₂. The primary human PDL cells at the 3rd-8th passage were used for the following experiments. The Ethics Committee of the Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Thailand was approved the study to be carry out according to the protocol (HREC-DCU 2017-018).

3.1.2 chitosan/dicarboxylic acid scaffold

Preparation from The Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University, Thailand. Briefly, chitosan was dissolved homogeneously in succinic acid solution (4% w/w). After stir for 10 min, the solution was poured into a beaker and frozen at -20C for 36 h. The frozen mass was immersed in 1N NaOH, and then washed with distilled deionized water to a pH 7 to obtain transparent chitosan/succinic acid hydrogels. Then, the hydrogels were freeze dry to obtain chitosan/dicarboxylic acid scaffold and cut into cylindrical shape 4x1 mm pieces.

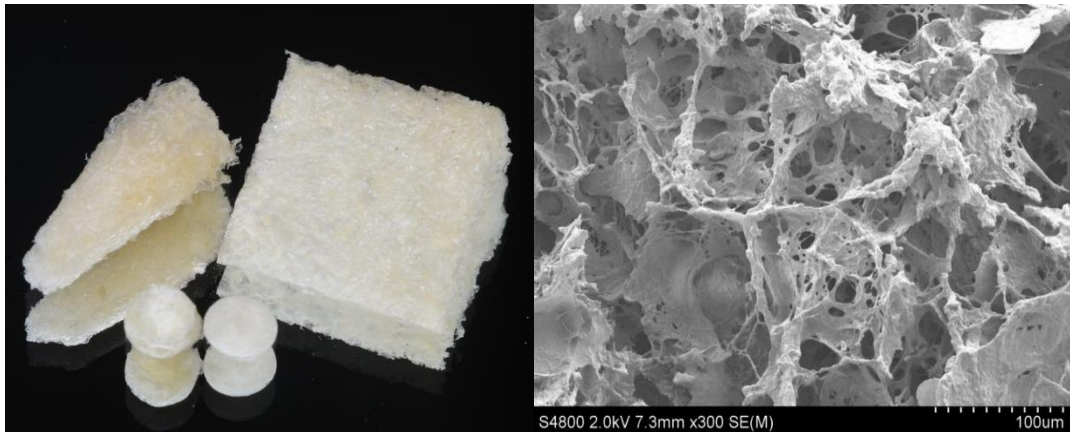


Figure 4 Gross structure and microstructure of chitosan/dicarboxylic acid scaffold

3.1.3 Animal

Eighteen 8-week-old male C57BL/6Mlac mice (National Laboratory Animal Centre, Mahidol University, Bangkok, Thailand) were used in this study, The experiment was approved by Chulalongkorn University Animal Care and Use Committee (CU-ACUC), Thailand (Animal Use Protocol No. 1732002).

3.2 Methods

3.2.1 *In vitro* differentiation assay

In vitro differentiation to osteogenic lineage was performed as follows. hPDLcs were initially culture in growth medium. After confluence, the media was replaced by osteogenic medium. The cells were incubated in osteogenic medium (DMEM supplemented with 10% FBS, 50mg/ml L-ascorbate-2-phosphate, 0.25mM dexamethasone, and 5 mM β -glycerophosphate) for 10 days. Mineral deposition was analyzed by Alizarin red staining.

3.2.2 Real time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

To estimate effect of chitosan scaffold in expression of osteoblast-related genes by hPDL cells, semiquantitative, and real-time RT-PCR were performed. After incubation with and without chitosan scaffold for 5, 10 days in osteogenic medium. PCR primer for runt-related transcription factor 2 (RUNX2), type I collagen (COL1), osterix (OSX), bone sialoprotein (BSP), alkaline phosphatase (ALP), osteopontin (OPN) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) were used to screen the osteoblast-related genes. Three independent experiments were repeated in each sample.

3.2.3 Mouse calvaria defect model

The animal procedure used in this study modified from protocol by Spicer et al. (44) and Huynh et al. (45) On the operation day, 1×10^6 hPDLs in 100 μ l of growth medium were seeded onto chitosan scaffold for 1 h before implantation. General anesthesia was induced by intraperitoneal injection of pentobarbital (NEMBUTAL® Sodium Solution, Akorn, Inc., Lake Forest, IL). Surgical sites were exposed with a 1.5 cm sagittal incision. Two bilateral full-thickness bony defects (4mm in diameter) in the center of each parietal bone were created using a biopsy punch (Stiefel, GSK, NC, USA) with a normal saline rinsed.

The mice were randomly divided into three groups of 6 each as follows: (1) the defects were filled with Chitosan scaffold, (2) the defects were filled with Chitosan scaffold and hPDL cells and (3) the defects were left empty. [Fig. 4].

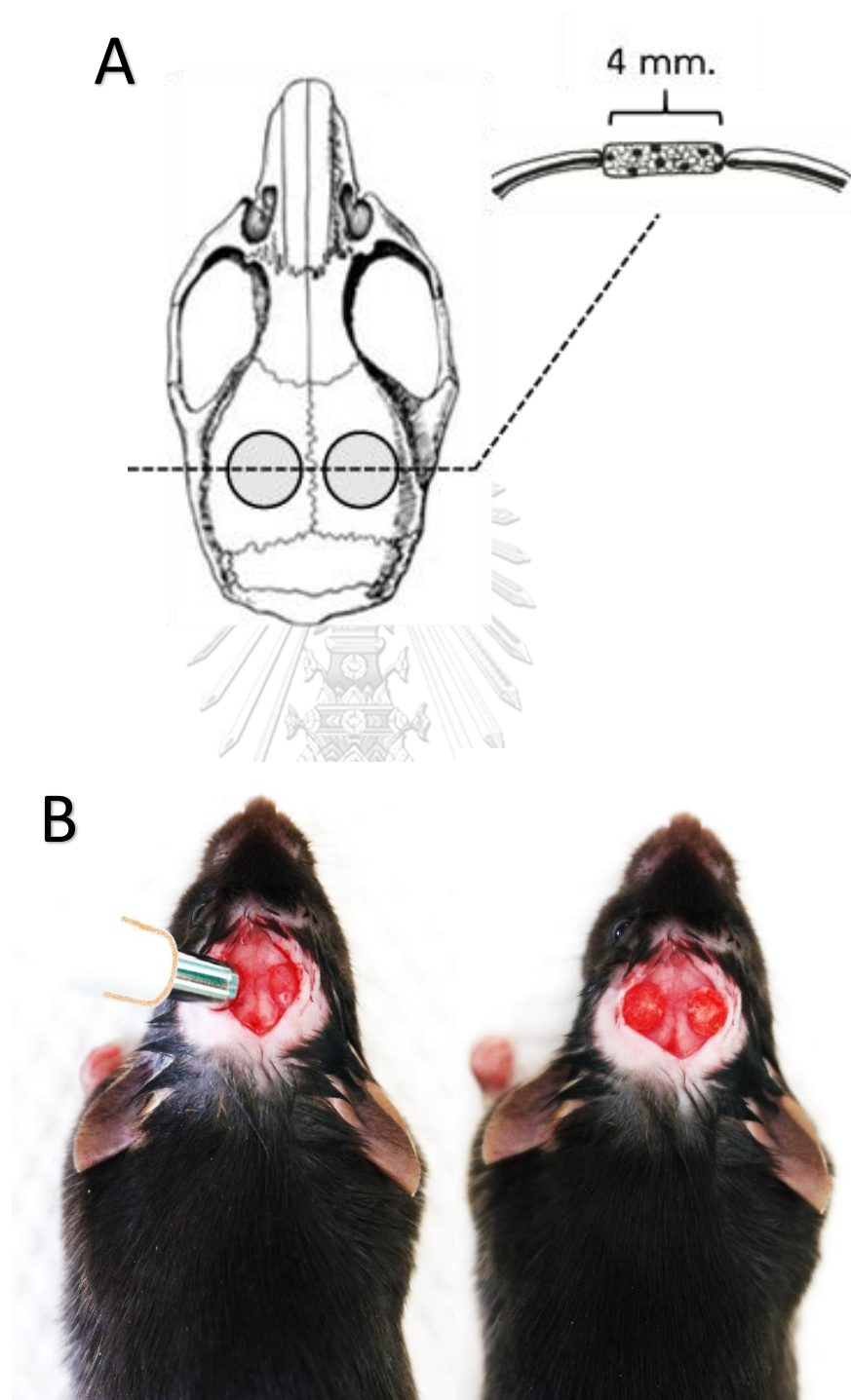


Figure 5 Mouse calvaria defect model. (A) Anatomical location of defects. (B) Defect were created using a biopsy punch and inserted C/D scaffolds.

3.2.4 Micro-Computed Tomography (Micro-CT)

After being euthanized at 6 weeks and 12 weeks, calvaria bones were excised, and fixed immediately in 10% buffered formalin. Bone formation in the defect were analysed using micro-CT imaging according to Bouxsein's guideline. (46) Samples were scanned using a micro-CT scanner (SCANCO Medical AG, μ CT 35, Switzerland). The reference lines were created from scout view to determine the analyzed area. The exposure parameters were 70 kV, 114 μ A, 8 W. The micro CT program was adjusted to a threshold of 241. The mineral density and the morphology of skull cavity were evaluated. The analyses were performed using 3D analysis software from Scanco Medical (SCANCO Medical AG, Switzerland).

3.2.5 Histological Examination

After taking the micro-CT scans, samples were fixed in 10% formalin for 2 weeks and dehydrated through a graded series of alcohols. After dehydration, all specimens were cut in half lengthwise and randomly half of specimens were embedded without prior decalcification in methylmethacrylate solutions (ACROS Organics, USA) and embedded in a catalyzed mixture of Osteo-Bed resin solution containing 2.5 g of benzoyl peroxide per 100 ml for 2 weeks. Longitudinal sections of 5 μ m were prepared using a microtome (Microm HM355S, Richard Allan Scientific, USA). Sections from each specimen were then stained with von Kossa to detect mineralized bone structure. The remained specimens were decalcified using Decalcifier II (#3800420, Leica Biosystems, Wetzlar, Germany) and embed in paraffin. Samples were then cut along the larger diameter of the defect. Sections at 10 μ m each was mount onto individual slides, and stain with hematoxylin and eosin (H&E) and Masson's Trichrome for reveals the cellular reactions that indicate bone formation.

3.3 Statistical Analysis

For statistical analysis, One-way analysis of variance (ANOVA) were utilized for mineral density of micro-CT data and independent samples comparison t-test were utilized for each data set of gene expression. Statistical significant was consider at $P < 0.05$. All statistical analyses were performed using Statistical Package for the Social Science (SPSS) Statistics software package version 22 (IBM, New York, USA).



CHAPTER 4 RESULT

4.1 Human periodontal ligament cells isolation and differentiation

The isolated primary human periodontal ligament cells (hPDLCs) of initial culture had typical fibroblastic morphology with spindle and fusiform shape (Fig. 5A). The primary hPDLCs reached confluence after 14 days in culture. The hPDLCs were then tested for its osteogenic differentiation potential by bone nodule formation assay. After being cultured in osteogenic medium for 10 days, the lines demonstrated intense staining for calcium deposition resemble mineralization nodules were chosen for further experiment (Fig.5B).

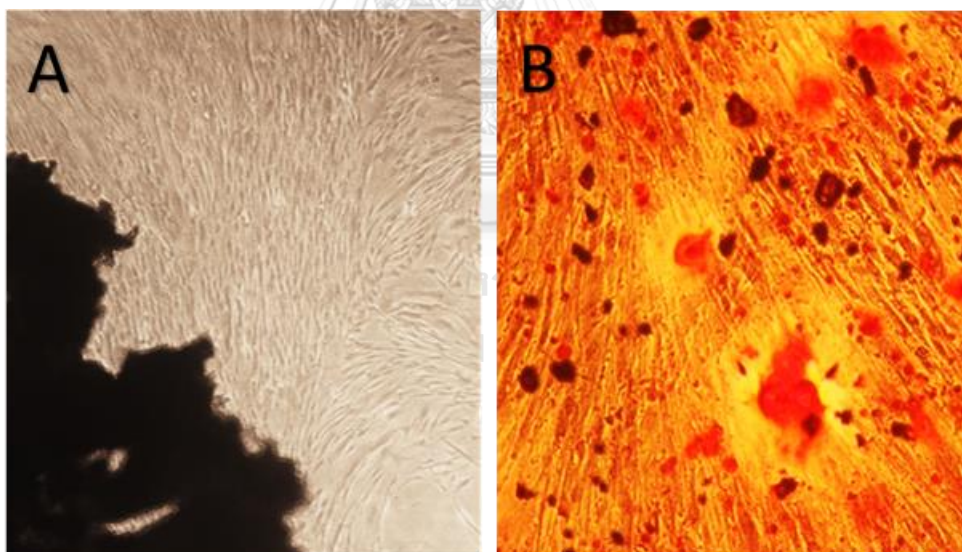


Figure 6 (A) The primary periodontal ligament cells extracted from periodontal ligament were cultured for 14 days. (B) Mineral deposition of hPDLCs after 10 days in osteogenic medium observed by Alizarin red staining. Magnification, x10 for A; Magnification, x40 for B.

4.2 CS/DA scaffold promoted osteoblast-related genes expression by hPDLcs

To analyse expression of osteoblast-related genes, we quantified gene expression of the initial undifferentiated population and after 5, 10 days. We measured changes in expression levels of seven osteoblast-related genes. There was significant fold difference in expression levels of most of these genes in hPDLcs on CS/DA scaffold compared to those of control group. After 5 days incubated with CS/DA scaffold in osteogenic medium, markedly increase in expression of RUNX2 was observed. Similar results were also found in the upregulated expression of ALP and OSX. Whereas, the other intermediate to late markers of bone matrix such as COL1 and OPN were highest express at days 10 on CS/DA scaffold group. [Fig. 6].

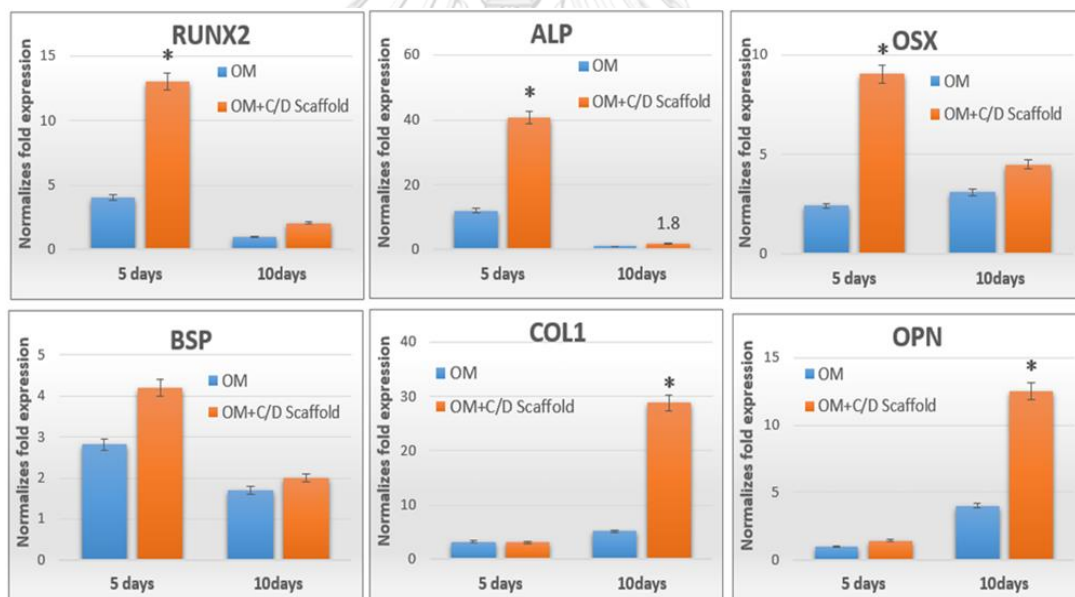


Figure 7 RT-PCR for osteoblast differentiation associated gene expression analysis.

(independent samples t-test between OM group and OM+C/D scaffold group, * P < 0.05, n=3)

4.3 CS/DA scaffold enhanced in vivo bone regeneration in mice calvariae

CS/DA scaffold could enhance in vivo bone regeneration in mice calvariae defect. New bone formation as assessed by Micro-CT analysis demonstrated the promoting effect apparently at both 6 and 12 weeks after implantation. It was interest that newly formed bone was present both in the center of the defects and from the periphery. (Fig. 7). Quantification of bone volume/tissue volume (BV/TV) showed amount of new bone formation at 6 weeks of the CS/DA scaffold implanted with hPDLCs group significantly greater than those of CS/DA scaffold alone or control defects ($P < 0.05$). While at 12 weeks, CS/DA scaffold implanted with hPDLCs group and CS/DA scaffold alone group was significantly higher than surgical control group ($P < 0.05$).

Histological analysis of sections at both 6 and 12 weeks after implantation stained with H&E revealed that the bone defects were filled with newly formed dense tissue in the CS/DA scaffold implanted with hPDLCs group and CS/DA scaffold alone group (Fig. 8A). Masson's Trichrome staining demonstrated an increase in the amount of collagen and bone matrix in both CS/DA scaffold with and without hPDLCs group (Fig. 8B). Undecalcified section Von Kosa staining of both scaffold alone and scaffold loaded with cells group showed intense mineralized calcium nodule (Fig. 8C). There was no bone formation found in defects without scaffolds at either time point.

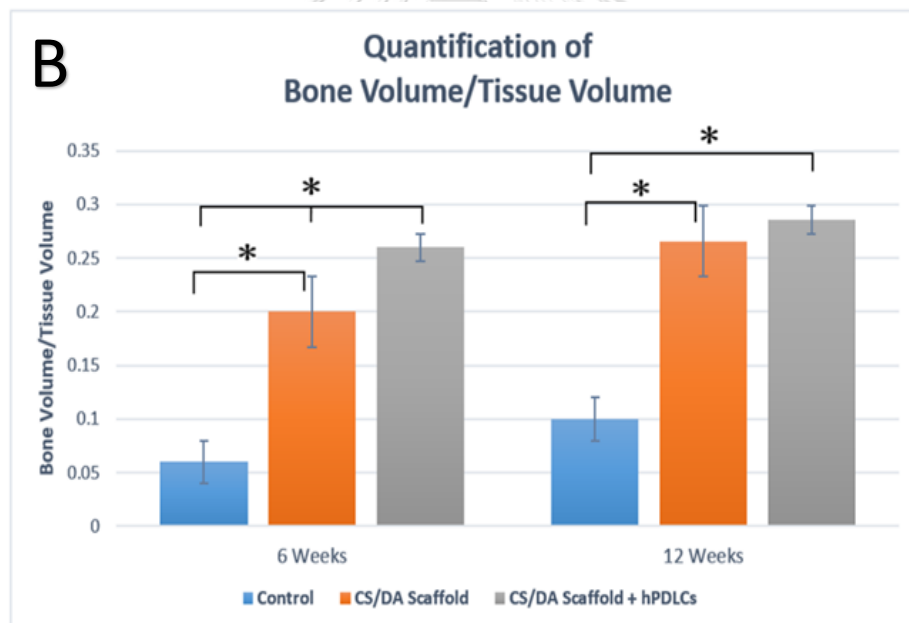
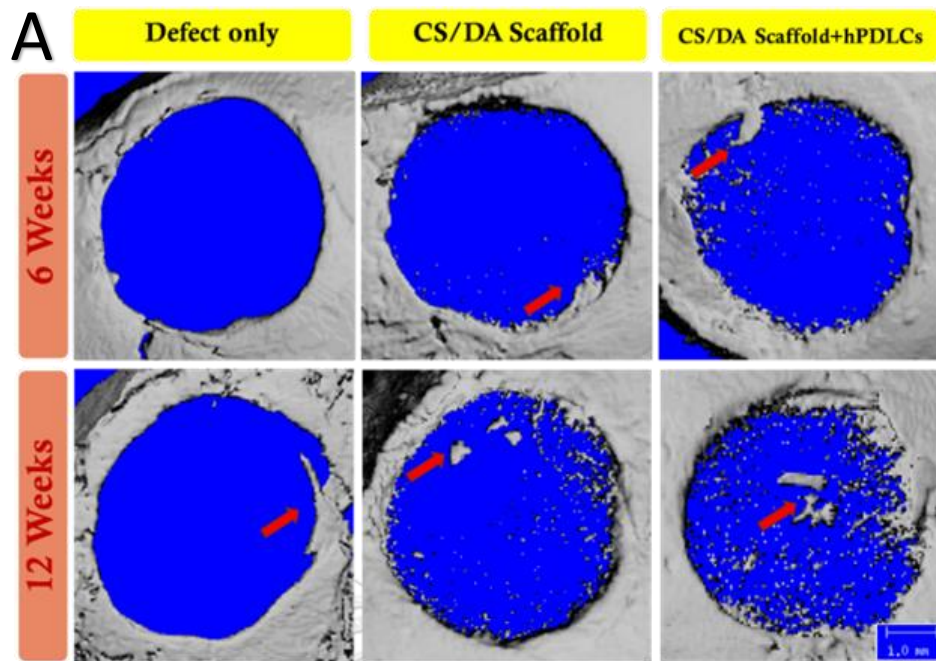


Figure 8 Effect of CS/DA scaffold on bone regeneration in mouse calvaria defects as assessed by micro-CT scanning. (A) New bone formation in mouse calvaria defect (red arrows). (B) Quantification of bone volume related to tissue volume (BV/TV). One-way ANOVA, Turkey HSD post hoc test , * $p = 0.05$

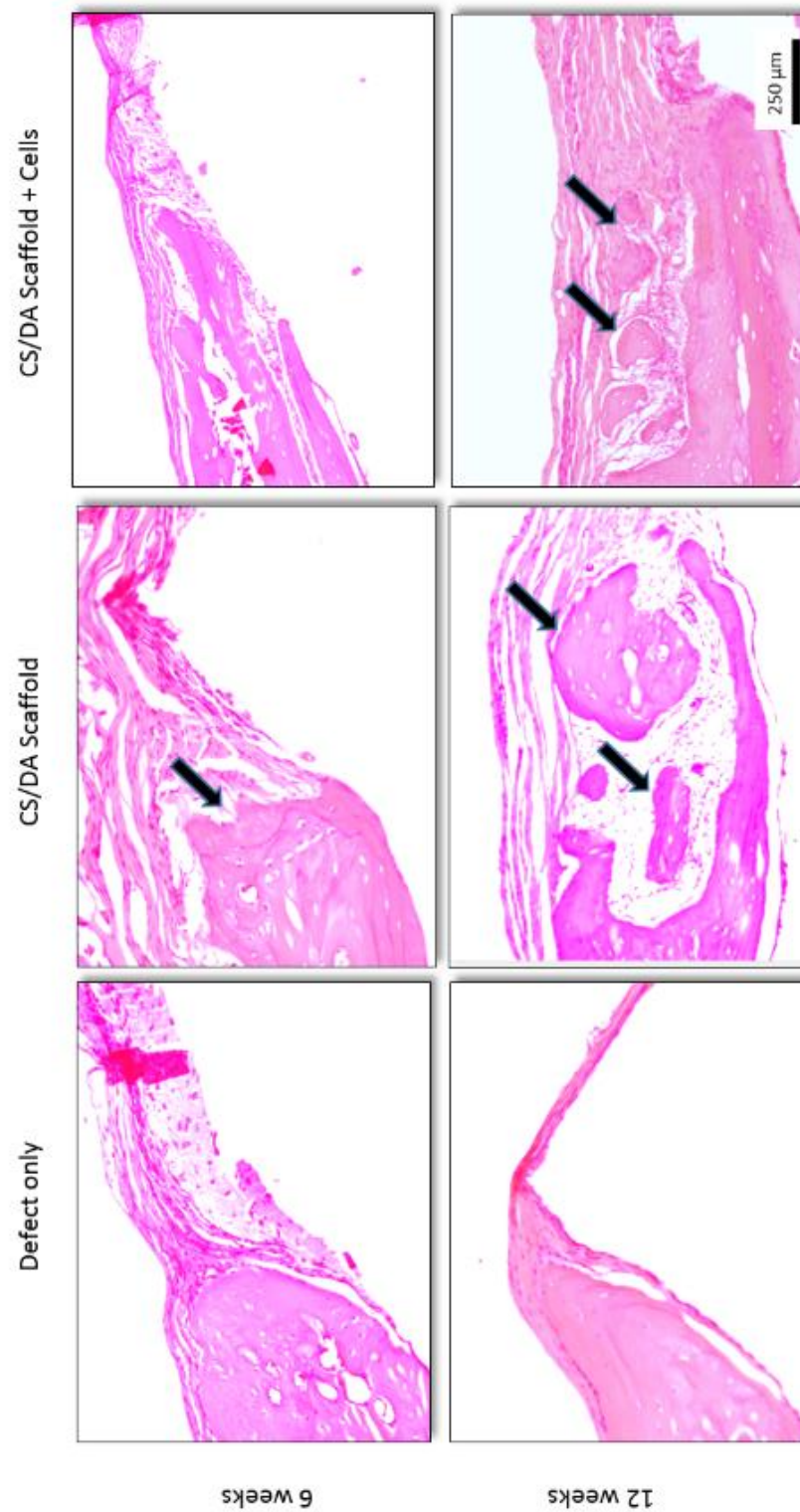


Figure 9 Effect of CS/DA scaffold on bone regeneration in mouse calvaria defects as assessed by H&E staining (x20); black arrows point to new bone formation.

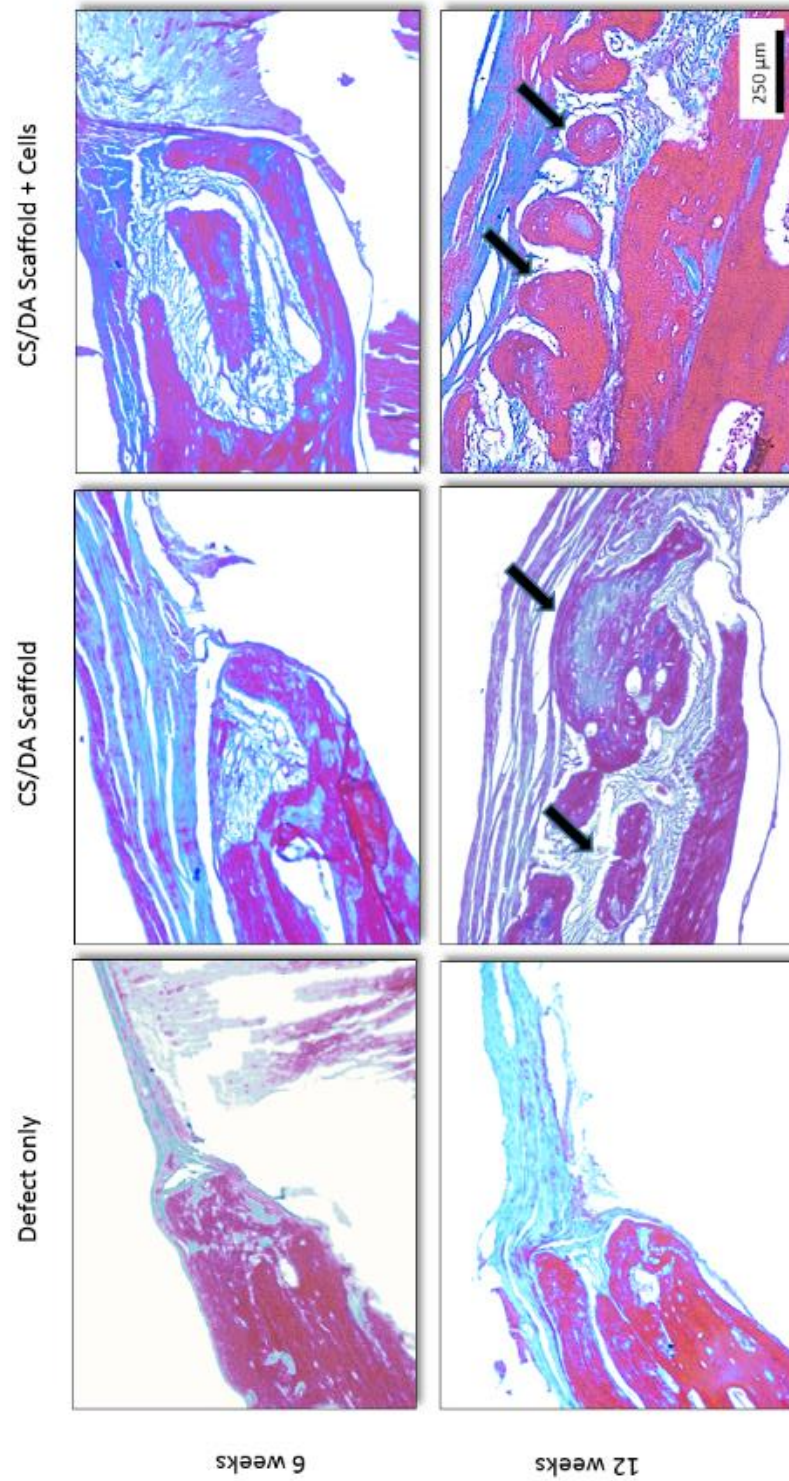


Figure 10 Effect of CS/DA scaffold on bone regeneration in mouse calvaria defects as assessed by Masson's Trichrome staining ($\times 20$); black arrows point to new bone formation.

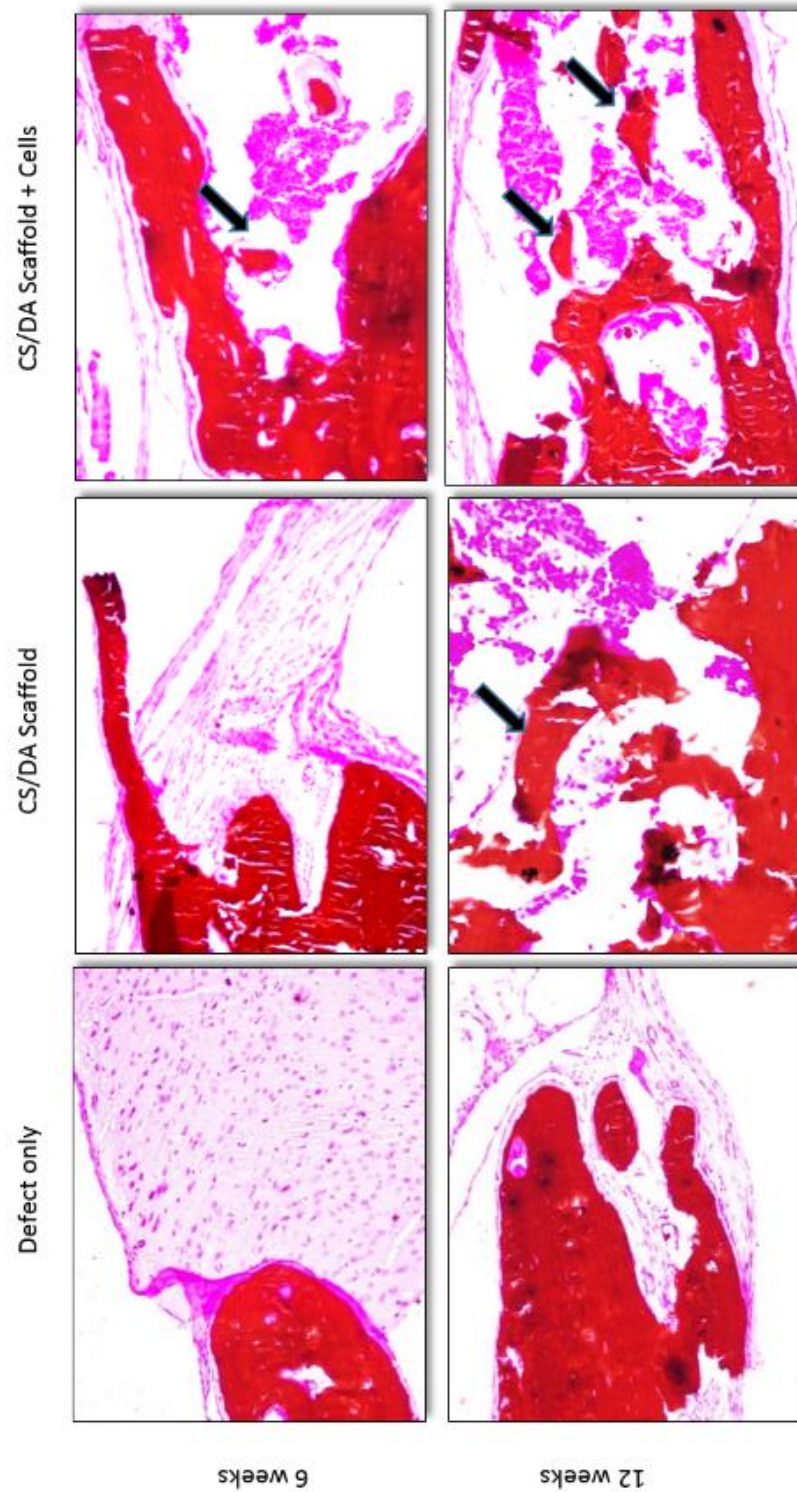


Figure 11 Effect of CS/DA scaffold on bone regeneration in mouse calvaria defects as assessed by Undecalcified Von Kosa staining (x20); black arrows point to new bone formation.

CHAPTER 5 DISCUSSION

Regenerative medicine is a challenging science in the way to induce tissue repair in live tissue. Advance development in this field have been attempted to provide the availability of bioactive compounds for repairing damaged tissue. (18, 20) Currently, significant progresses have been achieved to treat bone defect and stimulate new bone formation with cell and scaffold based bone tissue engineering strategies. Chitosan is one of the most promising polymers for tissue engineering and possible orthopedic applications. Chitosan scaffold has been extensively used in bone tissue engineering since it was shown to promote growth and mineral rich matrix deposition by osteoblasts in culture. Also chitosan is biocompatible, biodegradable, intrinsic antibacterial nature, and can be molded into porous structures to allows osteoconduction. (33)

Recently, Valderruten and colleagues (16) reported the novel fabrication of chitosan using dicarboxylic acids as nontoxic dissolving and cross-linking agents which greatly reduced contamination of the final toxic byproducts. In this study, we demonstrated the use of novel 3D porous CS/DA scaffold with and without seeded primary human periodontal ligament cells (hPDLCs) in mouse calvarial defects. We found that CS/DA scaffold was able to promote significant new bone formation either with or without hPDLCs. This is a first report on evaluation of osteogenic potential of CS/DA scaffold with and without seeded stem cells. Osteogenic differentiation of stem cells seeded on scaffold is the key issue determining the success in new bone formation. (47) Corresponded with previous reports (40, 48), hPDLCs demonstrated excellence capability to differentiate into bone forming osteoblasts as shown by

intense staining for calcium deposition and formed mineralization nodules as revealed by Alizarin red staining. Moreover, there is significant increase in expression levels of osteoblast-related genes by hPDLCs on CS/DA scaffold compared to control group. The hPDLCs cultured on CS/DA scaffold showed marked increase in expression level of RUNX2 and its downstream effector OSX, considering the key transcription factor required for differentiation of pre-osteoblasts to mature osteoblasts. (49) The other osteoblast-related genes such as COL1, ALP and OPN, which are mostly associated with mineralization (50), showed several fold increases in levels of expression in CS/DA scaffold. These findings suggest that CS/DA scaffold can enhance the differentiation of hPDLCs into osteoblasts mainly by upregulating most of osteoblast-related genes. According to Ho et al. (51) reported that chitosan can stimulate osteoblast proliferation and maturation through a Runx2-dependent pathway.

The osteogenic properties of chitosan have been reported in various animal models. Pang et al. (52) presented chitosan solution promoted the synthesis of collagen type I and facilitated the differentiation of hPDLCs into osteoblast and has significant potential to accelerate new bone formation in rat calvarial defects. Nandi et al. (53) developed controlled release growth factor incorporated in chitosan scaffold and reported their ability to promote bone healing and regeneration in a rabbit model.

In order to explore the potential of clinical applications, an in vivo study of the scaffold to repair a critical-sized calvaria defect was performed. In our study, we mainly evaluated the ability of CS/DA scaffold with and without hPDLCs in promoting bone formation. Our data clearly demonstrated a significant increase in BV/TV in the defects of the CS/DA scaffold implanted with hPDLCs and CS/DA scaffold alone both at 6 and 12 weeks postsurgery. Especially at 6 weeks, defect closure and new bone

area in the CS/DA scaffold implanted with hPDLCs group were significantly greater than those in the other groups ($p < 0.05$). The μ CT images also supported the enhanced bone ingrowth in CS/DA scaffolds cultured with hPDLCs. Some of the images clearly showed an appearance of mineralized nodules in the central part of the defect. However, by 12 weeks, no significant difference between scaffolds alone groups and scaffolds loaded with stem cells can be observed. hPDLCs can accelerate early onset of osteogenesis but does not affect bone formation over time. Since hPDLCs exhibit osteoprogenitor cell properties, the presence of more amount of osteoprogenitor cells, therefore, can stimulates early onset of bone formation. However, when entering reparative phase of healing, mesenchymal stem cells derived from surrounding environment might have been recruited, proliferate, differentiate into osteogenic cells and generate bony callus formation in the defect. This might explain why we observed no difference between scaffolds alone and scaffolds loaded with hPDLCs at later time point, 12 weeks. Moreover, in microscopic view, we found more bone ingrowth into the mouse calvaria defect in scaffolds alone and scaffolds loaded with hPDLCs group, with more positive area of H&E staining for cellular reactions that indicate bone formation without any inflammatory reaction, Masson's Trichrome staining for amount of collagen and mineralized matrix, and von Kossa staining for mineralized bone structure. Altogether the results of the present study demonstrated that CS/DA scaffold has significant potential to induce new bone formation *in vivo* either with or without hPDLCs.

Although C/D scaffold has been shown to be very useful in biomedical and tissue engineering, there still exist questions about the *in vivo* degradation rate of these scaffold. We found that there were only 20% to 30% of scaffold left in defects at 6

weeks after implantation, represent to the degradation rate of CS/DA scaffold was too fast. Corresponded with Emilia et al. (54) reported that poor long-term stability of pure chitosan is a substantial drawback in the scaling-up of chitosan in tissue engineering applications. Further research in the future should be conducted to improve CS/DA scaffold stability.



CHAPTER 6 CONCLUSION

In conclusion, this study suggests that CS/DA scaffold with and without seeded primary hPDLs were suitable for bone defect repair in a critical size mouse calvarial defect model. The novel CS/DA scaffold could be serve as carrier for stem cells to repair bone defect. This scaffold has an enormous potential to develop as materials for bone tissue engineering applications. Further experimental and clinical studies should be conducted to confirm these results.



References

1. De Risi V, Clementini M, Vittorini G, Mannocci A, De Sanctis M. Alveolar ridge preservation techniques: a systematic review and meta-analysis of histological and histomorphometrical data. *Clin Oral Implants Res.* 2015;26(1):50-68.
2. Petrokovski J, Starinsky R, Arensburg B, Kaffe I. Morphologic characteristics of bony edentulous jaws. *J Prosthodont.* 2007;16(2):141-7.
3. Serrano Mendez CA, Lang NP, Caneva M, Ramirez Lemus G, Mora Solano G, Botticelli D. Comparison of allografts and xenografts used for alveolar ridge preservation. A clinical and histomorphometric RCT in humans. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2017;19(4):608-15.
4. Chanchareonsook N, Junker R, Jongpaiboonkit L, Jansen JA. Tissue-engineered mandibular bone reconstruction for continuity defects: a systematic approach to the literature. *Tissue Eng Part B Rev.* 2014;20(2):147-62.
5. Vignoletti F, Matesanz P, Rodrigo D, Figuero E, Martin C, Sanz M. Surgical protocols for ridge preservation after tooth extraction. A systematic review. *Clin Oral Implants Res.* 2012;23 Suppl 5:22-38.
6. Marei MK, Nouh SR, Saad MM, Ismail NS. Preservation and regeneration of alveolar bone by tissue-engineered implants. *Tissue Eng.* 2005;11(5-6):751-67.
7. Lee AMH, Poon CY. The Clinical Effectiveness of Alveolar Ridge Preservation in the Maxillary Anterior Esthetic Zone-A Retrospective Study. *J Esthet Restor Dent.* 2017;29(2):137-45.
8. Zimmerer RM, Jehn P, Kokemuller H, Abedian R, Lalk M, Tavassol F, et al. In vivo tissue engineered bone versus autologous bone: stability and structure. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2017;46(3):385-93.

9. Burg KJ, Porter S, Kellam JF. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2000;21(23):2347-59.
10. Wei G, Ma PX. Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2004;25(19):4749-57.
11. Rodriguez-Vazquez M, Vega-Ruiz B, Ramos-Zuniga R, Saldana-Koppel DA, Quinones-Olvera LF. Chitosan and Its Potential Use as a Scaffold for Tissue Engineering in Regenerative Medicine. *Biomed Res Int*. 2015;2015:821279.
12. Phongying S, Aiba S-i, Chirachanchai S. Direct chitosan nanoscaffold formation via chitin whiskers. *Polymer*. 2007;48(1):393-400.
13. Chen P-H, Kuo T-Y, Liu F-H, Hwang Y-H, Ho M-H, Wang D-M, et al. Use of Dicarboxylic Acids To Improve and Diversify the Material Properties of Porous Chitosan Membranes. *J Agric Food Chem*. 2008;56(19):9015-21.
14. Mitra T, Sailakshmi G, Gnanamani A, Mandal AB. Studies on Cross-linking of succinic acid with chitosan/collagen. *J Mater Res*. 2013;16:755-65.
15. Bodnár M, Hartmann JF, Borbély J. Nanoparticles from Chitosan. *Macromol Symp*. 2005;227(1):321-6.
16. Valderruten NE, Valverde JD, Zuluaga F, Ruiz-Durántez E. Synthesis and characterization of chitosan hydrogels cross-linked with dicarboxylic acids. *React Funct Polym*. 2014;84:21-8.
17. Hutmacher DW, Sittinger M. Periosteal cells in bone tissue engineering. *Tissue Eng*. 2003;9 Suppl 1:S45-64.
18. Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromol Biosci*. 2004;4(8):743-65.

19. Velasco MA, Narvaez-Tovar CA, Garzon-Alvarado DA. Design, materials, and mechanobiology of biodegradable scaffolds for bone tissue engineering. *Biomed Res Int.* 2015;2015:729076.
20. Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Crit Rev Biomed Eng.* 2012;40(5):363-408.
21. Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials.* 2000;21(24):2529-43.
22. Olszta MJ, Cheng X, Jee SS, Kumar R, Kim Y-Y, Kaufman MJ, et al. Bone structure and formation: A new perspective. *Mater Sci Eng R Rep.* 2007;58(3-5):77-116.
23. Bose S, Roy M, Bandyopadhyay A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends Biotechnol.* 2012;30(10):546-54.
24. Liu Y, Lim J, Teoh SH. Review: development of clinically relevant scaffolds for vascularised bone tissue engineering. *Biotechnol Adv.* 2013;31(5):688-705.
25. Dodane V, Vilivalam VD. Pharmaceutical applications of chitosan. *Pharm Sci Technolo Today.* 1998;1(6):246-53.
26. Dornish M, Kaplan D, Skaugrud O. Standards and guidelines for biopolymers in tissue-engineered medical products: ASTM alginate and chitosan standard guides. American Society for Testing and Materials. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;944:388-97.
27. Costa-Pinto AR, Reis RL, Neves NM. Scaffolds based bone tissue engineering: the role of chitosan. *Tissue Eng Part B Rev.* 2011;17(5):331-47.
28. Croisier F, Jérôme C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *Eur Polym J.* 2013;49(4):780-92.

29. LogithKumar R, KeshavNarayan A, Dhivya S, Chawla A, Saravanan S, Selvamurugan N. A review of chitosan and its derivatives in bone tissue engineering. *Carbohydr Polym.* 2016;151:172-88.
30. Bellich B, D'Agostino I, Semeraro S, Gamini A, Cesaro A. "The Good, the Bad and the Ugly" of Chitosans. *Mar Drugs.* 2016;14(5).
31. Islam S, Bhuiyan MAR, Islam MN. Chitin and Chitosan: Structure, Properties and Applications in Biomedical Engineering. *J Polym Environ.* 2016:1-13.
32. Muzzarelli RA, El Mehtedi M, Bottegoni C, Aquili A, Gigante A. Genipin-Crosslinked Chitosan Gels and Scaffolds for Tissue Engineering and Regeneration of Cartilage and Bone. *Mar Drugs.* 2015;13(12):7314-38.
33. Di Martino A, Sittinger M, Risbud MV. Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials.* 2005;26(30):5983-90.
34. Kim S, Bedigrew K, Guda T, Maloney WJ, Park S, Wenke JC, et al. Novel osteoinductive photo-cross-linkable chitosan-lactide-fibrinogen hydrogels enhance bone regeneration in critical size segmental bone defects. *Acta Biomater.* 2014;10(12):5021-33.
35. Young Hoon K, Ho Cheol K, Sang Hun S, Hong Sung K, Kyu Cheon K, Shi Hyun L. Original Article : Osteoconductive Effect of Chitosan/Hydroxyapatite Composite Matrix on Rat Skull Defect. *Tissue Eng Regen Med.* 2011;8(1):23-31.
36. Lee JS, Baek SD, Venkatesan J, Bhatnagar I, Chang HK, Kim HT, et al. In vivo study of chitosan-natural nano hydroxyapatite scaffolds for bone tissue regeneration. *Int J Biol Macromol.* 2014;67:360-6.

37. Busilacchi A, Gigante A, Mattioli-Belmonte M, Manzotti S, Muzzarelli RA. Chitosan stabilizes platelet growth factors and modulates stem cell differentiation toward tissue regeneration. *Carbohydr Polym.* 2013;98(1):665-76.
38. Ullah I, Subbarao RB, Rho GJ. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Biosci Rep.* 2015;35(2).
39. Otsu K, Kumakami-Sakano M, Fujiwara N, Kikuchi K, Keller L, Lesot H, et al. Stem cell sources for tooth regeneration: current status and future prospects. *Front Physiol.* 2014;5:36.
40. Hu L, Liu Y, Wang S. Stem cell-based tooth and periodontal regeneration. *Oral Dis.* 2017.
41. Huynh NC, Everts V, Akira N, Pavasant P, Ampornaramveth RS. Histone deacetylase inhibition enhances in-vivo bone regeneration induced by human periodontal ligament cells. *Bone.* 2016.
42. Ge S, Zhao N, Wang L, Yu M, Liu H, Song A, et al. Bone repair by periodontal ligament stem cellseeded nanohydroxyapatite-chitosan scaffold. *Int J Nanomedicine.* 2012;7:5405-14.
43. Mroziak K, Gronthos S, Shi S, Bartold PM. A Method to Isolate, Purify, and Characterize Human Periodontal Ligament Stem Cells. *Methods Mol Biol.* 2017;1537:413-27.
44. Spicer PP, Kretlow JD, Young S, Jansen JA, Kasper FK, Mikos AG. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nat Protoc.* 2012;7(10):1918-29.

45. Huynh NC, Everts V, Nifuji A, Pavasant P, Ampornaramveth RS. Histone deacetylase inhibition enhances in-vivo bone regeneration induced by human periodontal ligament cells. *Bone*. 2017;95:76-84.
46. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Muller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res*. 2010;25(7):1468-86.
47. Yousefi AM, James PF, Akbarzadeh R, Subramanian A, Flavin C, Oudadesse H. Prospect of Stem Cells in Bone Tissue Engineering: A Review. *Stem Cells Int*. 2016;2016:6180487.
48. Flores MG, Yashiro R, Washio K, Yamato M, Okano T, Ishikawa I. Periodontal ligament cell sheet promotes periodontal regeneration in athymic rats. *J Clin Periodontol*. 2008;35(12):1066-72.
49. Zhang C. Transcriptional regulation of bone formation by the osteoblast-specific transcription factor *Osx*. *J Orthop Surg Res*. 2010;5:37.
50. Kulterer B, Friedl G, Jandrositz A, Sanchez-Cabo F, Prokesch A, Paar C, et al. Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation. *BMC Genomics*. 2007;8:70.
51. Ho MH, Liao MH, Lin YL, Lai CH, Lin PI, Chen RM. Improving effects of chitosan nanofiber scaffolds on osteoblast proliferation and maturation. *Int J Nanomedicine*. 2014;9:4293-304.
52. Pang EK, Paik JW, Kim SK, Jung UW, Kim CS, Cho KS, et al. Effects of chitosan on human periodontal ligament fibroblasts in vitro and on bone formation in rat calvarial defects. *J Periodontol*. 2005;76(9):1526-33.

53. Nandi SK, Kundu B, Basu D. Protein growth factors loaded highly porous chitosan scaffold: a comparison of bone healing properties. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2013;33(3):1267-75.
54. Szymanska E, Winnicka K. Stability of chitosan-a challenge for pharmaceutical and biomedical applications. *Mar Drugs.* 2015;13(4):1819-46.



REFERENCES



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

APPENDIX

Quantification of bone volume/tissue volume (Group 6 weeks post-operative)

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
control 6	4	.0550	.04203	.02102	-.0119	.1219	.00	.10
scaffold 6	6	.1967	.04033	.01647	.1543	.2390	.14	.25
scaffold cell 6	6	.2717	.02563	.01046	.2448	.2986	.24	.31
Total	16	.1894	.09306	.02326	.1398	.2390	.00	.31

Test of Homogeneity of Variances

Quantification of bone volume/tissue volume

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.658	2	13	.534

ANOVA

Quantification of bone volume/tissue volume

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.113	2	.057	44.007	.000
Within Groups	.017	13	.001		
Total	.130	15			

Robust Tests of Equality of Means

Quantification of bone volume/tissue volume

	Statistic ^a	df1	df2	Sig.
Brown-Forsythe	41.124	2	9.174	.000

a. Asymptotically F distributed.

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Quantification of bone volume/tissue volume

	(I) Group	(J) Group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	control 6	scaffold 6	-.14167*	.02315	.000	-.2028	-.0805
		scaffold cell 6	-.21667*	.02315	.000	-.2778	-.1555
	scaffold 6	control 6	.14167*	.02315	.000	.0805	.2028
		scaffold cell 6	-.07500*	.02070	.008	-.1297	-.0203
	scaffold cell 6	control 6	.21667*	.02315	.000	.1555	.2778
		scaffold 6	.07500*	.02070	.008	.0203	.1297
Tamhane	control 6	scaffold 6	-.14167*	.02670	.005	-.2273	-.0560
		scaffold cell 6	-.21667*	.02348	.001	-.3034	-.1299
	scaffold 6	control 6	.14167*	.02670	.005	.0560	.2273
		scaffold cell 6	-.07500*	.01951	.013	-.1328	-.0172
	scaffold cell 6	control 6	.21667*	.02348	.001	.1299	.3034
		scaffold 6	.07500*	.01951	.013	.0172	.1328

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Homogeneous Subsets

Quantification of bone volume/tissue volume

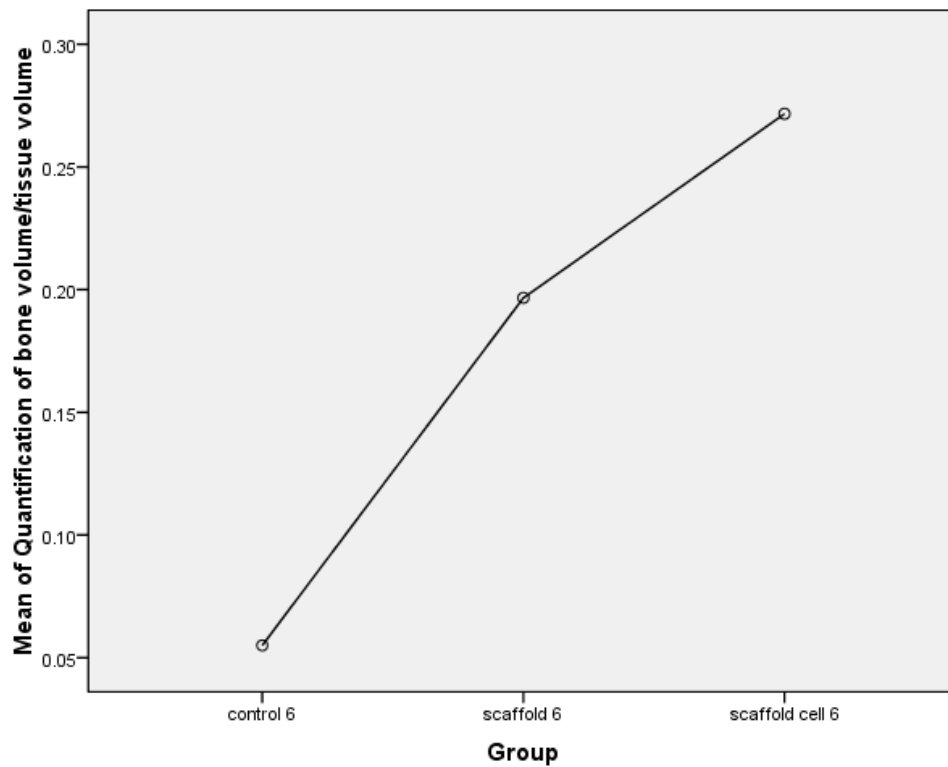
Group		N	Subset for alpha = 0.05		
			1	2	3
Tukey HSD ^{a,b}	control 6	4	.0550		
	scaffold 6	6		.1967	
	scaffold cell 6	6			.2717
Sig.			1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.143.
- The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.



Means Plots



Quantification of bone volume/tissue volume (Group 12 weeks post-operative)

Descriptives

Quantification of bone volume/tissue volume

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					control 12	4		
scaffold 12	6	1.4067	.03882	.01585	1.3659	1.4474	1.36	1.45
scaffold cell 12	6	1.4950	.07120	.02907	1.4203	1.5697	1.40	1.61
Total	16	1.3869	.13573	.03393	1.3145	1.4592	1.10	1.61

Test of Homogeneity of Variances

Quantification of bone volume/tissue volume

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.070	2	13	.371

ANOVA

Quantification of bone volume/tissue volume

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.220	2	.110	25.245	.000
Within Groups	.057	13	.004		
Total	.276	15			

Robust Tests of Equality of Means

Quantification of bone volume/tissue volume

	Statistic ^a	df1	df2	Sig.
Brown-Forsythe	21.898	2	7.252	.001

a. Asymptotically F distributed.

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Quantification of bone volume/tissue volume

	(I) Group	(J) Group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	control 12	scaffold 12	-.21167*	.04259	.001	-.3241	-.0992
		scaffold cell 12	-.30000*	.04259	.000	-.4124	-.1876
	scaffold 12	control 12	.21167*	.04259	.001	.0992	.3241
		scaffold cell 12	-.08833	.03809	.088	-.1889	.0122
	scaffold cell 12	control 12	.30000*	.04259	.000	.1876	.4124
		scaffold 12	.08833	.03809	.088	-.0122	.1889
LSD	control 12	scaffold 12	-.21167*	.04259	.000	-.3037	-.1197
		scaffold cell 12	-.30000*	.04259	.000	-.3920	-.2080
	scaffold 12	control 12	.21167*	.04259	.000	.1197	.3037
		scaffold cell 12	-.08833*	.03809	.037	-.1706	-.0060
	scaffold cell 12	control 12	.30000*	.04259	.000	.2080	.3920
		scaffold 12	.08833*	.03809	.037	.0060	.1706
Tamhane	control 12	scaffold 12	-.21167*	.04718	.037	-.4042	-.0191
		scaffold cell 12	-.30000*	.05310	.005	-.4794	-.1206
	scaffold 12	control 12	.21167*	.04718	.037	.0191	.4042
		scaffold cell 12	-.08833	.03311	.085	-.1887	.0120
	scaffold cell 12	control 12	.30000*	.05310	.005	.1206	.4794
		scaffold 12	.08833	.03311	.085	-.0120	.1887

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Homogeneous Subsets

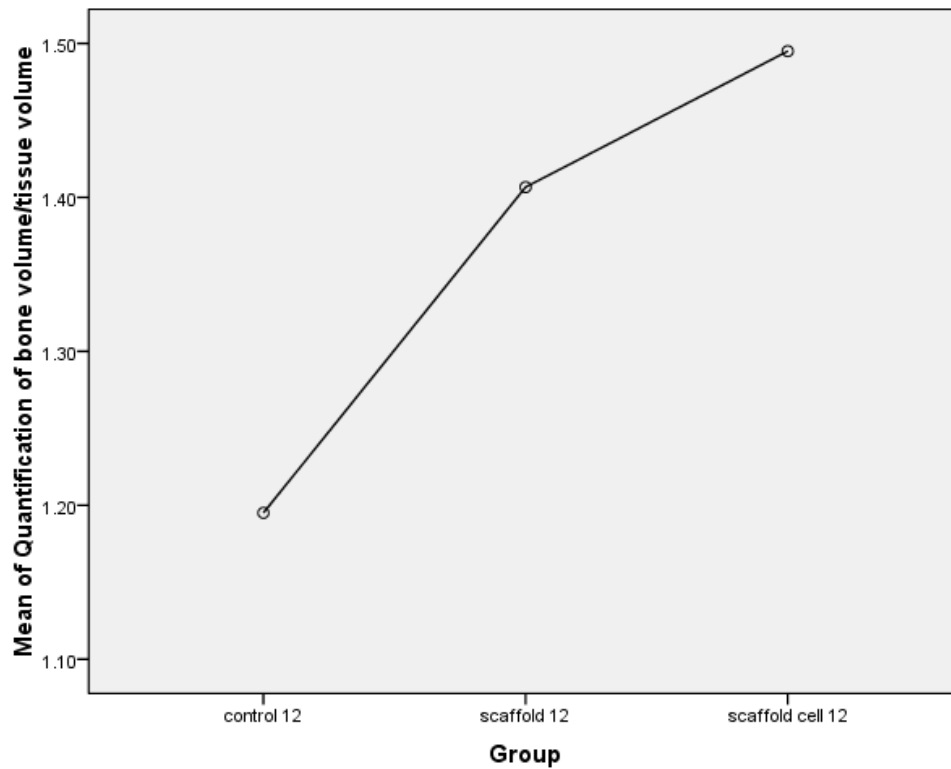
Quantification of bone volume/tissue volume

Group	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Tukey HSD ^{a,b} control 12	4	1.1950	
scaffold 12	6		1.4067
scaffold cell 12	6		1.4950
Sig.		1.000	.119

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.143.
- The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Means Plots



เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับอาสาสมัครที่เข้าร่วมในการวิจัย (Patient/Participant Information Sheet)

1. โครงการเรื่อง การศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติการสร้างกระดูกใหม่ในสิ่งมีชีวิต ด้วยการใช้โครงเลี้ยงเซลล์โคโดซาน/กรดไตรคาร์บอกซิลิก ที่ฝั่งเซลล์เอ็นยัดปริทันต์ของมนุษย์
2. ชื่อผู้วิจัยหลัก ทนตแพทย์ธีรวัฒน์ สุขไผ่ตา
สถาบันที่สังกัด ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ทพ.ดร.อาทิพันธุ์ พิมพ์ขาว
แหล่งทุนวิจัย อยู่ในระหว่างการดำเนินการจัดหา
3. วัตถุประสงค์ของโครงการ เพื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติการสร้างกระดูกในรอยวิการกะโหลกศีรษะหนู ด้วยโครงเลี้ยงเซลล์โคโดซาน/กรดไตรคาร์บอกซิลิก ที่ฝั่งหรือไม่ฝั่งเซลล์เอ็นยัดปริทันต์
4. สถานที่ดำเนินการวิจัย ภาควิชาศัลยศาสตร์ และ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
5. วิธีการที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย

หากท่านมีความประสงค์เข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านจะต้องได้รับการตรวจช่องปากจากทันตแพทย์ และถ่ายภาพรังสีพานอรามิก เพื่อประเมินว่าท่านมีคุณสมบัติตรงตามเกณฑ์ที่กำหนด คือ มีฟันที่ถูกวินิจฉัยว่ามีความจำเป็นต้องถอนหรือผ่าตัดออก โดยฟันที่ถูกถอนหรือผ่าฟันคุดต้องเป็นฟันที่ไม่มีรอยผุหรือการติดเชื้ออยู่ก่อนหน้า

หลังจากนั้น ผู้วิจัยจะวางแผนการรักษาสำหรับการถอนฟันหรือผ่าฟันคุดให้กับท่าน ซึ่งเป็นกระบวนการเดียวกับผู้ป่วยที่มาเข้ารับการรักษาตามปกติ กล่าวคืออาสาสมัครทุกท่านจะได้รับการแจ้งให้ทราบถึงขั้นตอน และความเสี่ยงของการผ่าตัด พร้อมทั้งลงลายมือชื่อในใบยินยอม เพื่อยินยอมรับการรักษา และมอบฟันที่ถูกถอนเพื่อการวิจัย จากนั้นในวันที่ถอนฟันหรือผ่าฟันคุด

ในวันที่อาสาสมัครมาทำการรักษา ทันตแพทย์จะทำการถอนฟันหรือผ่าฟันคุดตามขั้นตอนปกติ ฟันที่ถูกถอนหรือผ่าฟันคุดจะถูกนำไปใช้ทดลองในห้องปฏิบัติการต่อไป โดยข้อมูลอาสาสมัครจะถูกปิดเป็นความลับ จากนั้นท่านจะได้รับการนัดเพื่อติดตามผลการรักษา และตัดไหม 1 สัปดาห์หลังผ่าตัดตามขั้นตอน เช่นเดียวกับผู้ป่วยหลังถอนฟันหรือผ่าฟันคุดทั่วไป

6. เหตุผลที่เชิญเข้าร่วมเป็นอาสาสมัครในโครงการ ท่านได้รับเชิญเข้าร่วมการศึกษานี้ เนื่องจากท่านเป็นอาสาสมัครที่มีฟันที่ถูกวินิจฉัยว่ามีความจำเป็นต้องถอนหรือผ่าตัดออก โดยฟันที่ถูกถอนหรือผ่าฟันคุดต้องเป็นฟันที่ไม่มีรอยผุหรือการติดเชื้ออยู่ก่อนหน้า ท่านจะได้อ่านข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับโครงการนี้ก่อน ถ้าท่านมีข้อสงสัยใดๆเกี่ยวกับการศึกษานี้ สามารถซักถามผู้วิจัยได้ หากท่านตัดสินใจเข้าร่วมการศึกษานี้ ท่านจะได้รับสำเนาใบยินยอมที่ท่านเซ็นชื่อกำกับเก็บไว้ 1 ฉบับ

คุณสมบัติของผู้เข้าร่วมการวิจัยสามารถสรุปได้ดังต่อไปนี้

1. มีฟันที่ถูกวินิจฉัยว่ามีความจำเป็นต้องถอนหรือผ่าตัดออก
 2. ไม่เคยมีการอักเสบบริเวณที่ต้องการถอนฟันหรือผ่าฟันคุดมาก่อน
 3. เพศชายหรือหญิงที่มีอายุระหว่าง 18-25 ปี
 4. สุขภาพดี ไม่มีโรคประจำตัว
7. ความรับผิดชอบของอาสาสมัคร และระยะเวลาที่อาสาสมัครจะอยู่ในโครงการ
- 1 วัน ในการเก็บถอนฟันหรือการผ่าตัดฟันคุด ตามมาตรฐานการรักษา
8. ประโยชน์ของการวิจัยที่อาสาสมัครและ/หรือผู้อื่นที่อาจได้รับ
- อาสาสมัครจะไม่ได้รับประโยชน์โดยตรงจากงานวิจัยในครั้งนี้ แต่ข้อมูลจากการศึกษาวิจัยจะถูกนำไปพัฒนาโครงเลี้ยงเซลล์โคโตซาน เพื่อประยุกต์ในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกในอนาคต
9. ความเสี่ยงหรือความไม่สะดวกที่อาจเกิดขึ้นแก่อาสาสมัคร
- ท่านอาจมีความเสี่ยงต่อการเกิดผลแทรกซ้อนจากการผ่าตัดในช่องปากโดยทั่วไป เช่น มีอาการปวด บวม มีเลือดออก กระดูกเข้าฟันอักเสบ (dry socket) หรืออาจมีการติดเชื้อบริเวณแผล ภายหลังการผ่าตัด แต่ขอให้ท่านปฏิบัติตามที่ผู้วิจัยแนะนำ ทั้งนี้ผู้วิจัยตระหนักถึงผลแทรกซ้อนต่างๆ ที่อาจเกิดขึ้น และมีมาตรการในการลดความเสี่ยงเหล่านี้ โดยกระทำการรักษาตามมาตรฐานของวิชาชีพอย่างเคร่งครัด
10. ค่าใช้จ่ายที่อาสาสมัครจะต้องจ่าย หรืออาจจะต้องจ่าย
- อาสาสมัครจะมีค่าใช้จ่ายในการถอนฟัน (300 บาท) หรือผ่าตัดฟันคุด (1,000 บาท) ค่าถ่ายภาพรังสีพานอรามิก (250 บาทต่อภาพ) ตามอัตราที่กำหนดไว้โดยคณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- หากท่านเป็นผู้มีสิทธิเบิกจ่ายตรง ประกันสังคมหรือบัตรทอง ท่านสามารถเบิกค่ารักษาและค่าถ่ายภาพรังสี โดยอัตราที่สามารถเบิกได้ สามารถตรวจสอบจากผู้วิจัยหรือประชาสัมพันธ์ ด็กสมเด็จย่า 93 คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยได้
11. การชดเชยใดๆ และการรักษาที่จะจัดให้แก่อาสาสมัครในกรณีที่ได้รับอันตรายซึ่งเกี่ยวข้องกับการวิจัย
- ไม่มีอันตรายอื่นๆนอกเหนือจากอาการแทรกซ้อนหลังการผ่าฟันคุดหรือถอนฟัน ดังที่กล่าวไว้ในข้อ 9 ถ้าหากมีผลแทรกซ้อนเกิดขึ้นหลังถอนฟันหรือผ่าฟันคุด อาสาสมัครจะได้รับการตรวจรักษา และติดตามผลจนกว่าผลแทรกซ้อนจะหายตามหลักวิชาชีพ
12. การจ่ายค่าเดินทาง ค่าเสียเวลา (ถ้ามี ซึ่งต้องกำหนดไว้เป็นรายครั้ง) แก่อาสาสมัครที่เข้าร่วมในการวิจัย
- อาสาสมัครจะไม่ได้รับค่าใช้จ่ายสำหรับการเดินทาง
13. เหตุการณ์ที่อาจจะเกิดขึ้น หรือเหตุผลซึ่งผู้วิจัยจะต้องยกเลิกการเข้าร่วมในโครงการวิจัยของอาสาสมัคร

หากท่านตัดสินใจยกเลิกการเข้าร่วมวิจัย ฟันของท่านจะถูกนำไปกำจัดร่วมกับขยะติดเชื้อ
ของคณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

14. มีการเก็บชิ้นตัวอย่างที่ได้มาจากอาสาสมัครเอาไว้ใช้ในโครงการวิจัยในอนาคตหรือไม่ เก็บจำนวน
เท่าไร

อย่างไร และที่ไหน

หลังจากจบโครงการจะไม่มีเก็บตัวอย่างของอาสาสมัครไว้เป็นการส่วนตัว เซลล์ที่เหลือ
จากการวิจัย จะถูกทำลายร่วมกับขยะติดเชื้อของคณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

15. การกำกับดูแลและควบคุมการดำเนินโครงการ

ผู้กำกับดูแลการวิจัย ผู้ตรวจสอบ คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรม และคณะกรรมการที่
เกี่ยวข้อง สามารถเข้าไปตรวจสอบการดำเนินโครงการ รวมทั้ง ตรวจสอบบันทึกข้อมูลของอาสาสมัคร
เพื่อเป็นการยืนยันถึง ขั้นตอนในการวิจัยทางคลินิกและข้อมูลอื่นๆ โดยไม่ล่วงละเมิดเอกสิทธิ์ในการ
ปิดบังข้อมูลของอาสาสมัคร ตามกรอบที่กฎหมายและกฎระเบียบได้อนุญาตไว้ นอกจากนี้ โดยการลง
นามให้ความยินยอม อาสาสมัครหรือ ผู้แทนตามกฎหมายจะมีสิทธิตรวจสอบและมีสิทธิที่จะได้รับ
ข้อมูลด้วยเช่นกัน

16. จริยธรรมการวิจัย

การดำเนินการโครงการวิจัยนี้ ผู้วิจัยคำนึงถึงหลักจริยธรรมการวิจัย ดังนี้

1. หลักความเคารพในบุคคล (Respect for person) โดยการให้ข้อมูลจนอาสาสมัครเข้าใจ
เป็นอย่างดี

และตัดสินใจอย่างอิสระในการให้ความยินยอมเข้าร่วมในการวิจัย รวมทั้งการเก็บรักษา
ความลับของ

อาสาสมัคร

2. หลักการให้ประโยชน์ไม่ก่อให้เกิดอันตราย (Beneficence/Non-Maleficence) ซึ่งได้ระบุ
ในข้อ 8 และ 9

ว่าจะมีประโยชน์หรือความเสี่ยงกับอาสาสมัครหรือไม่

3. หลักความยุติธรรม (Justice) คือมีเกณฑ์คัดเข้าและคัดออกชัดเจน มีการกระจายความ
เสี่ยงและ

ผลประโยชน์อย่างเท่าเทียมกัน โดยวิธีสุ่มเข้ากลุ่มศึกษา

17. ข้อมูลที่อาจนำไปสู่การเปิดเผยตัวของอาสาสมัครจะได้รับการปกปิด ยกเว้นว่าได้รับคำยินยอมไว้
โดยกฎระเบียบ และกฎหมายที่เกี่ยวข้องเท่านั้น จึงจะเปิดเผยข้อมูลแก่สาธารณชนได้ ในกรณีที่
ผลการวิจัยได้รับการตีพิมพ์ ชื่อและที่อยู่ของอาสาสมัครจะต้องได้รับการปกปิดอยู่เสมอ

18. หากท่านมีข้อสงสัยต้องการสอบถามเกี่ยวกับสิทธิของท่านหรือผู้วิจัยไม่ปฏิบัติตามที่เขียนไว้ในเอกสารข้อมูล

คำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในการวิจัย ท่านสามารถติดต่อหรือร้องเรียนได้ที่ ฝ่ายวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตึกสมเด็จย่า 93 ชั้น 10 หรือที่หมายเลขโทรศัพท์ 02-218-8866 ในเวลาทำการ

19. หากท่านต้องการยกเลิกการเข้าร่วมเป็นอาสาสมัครในโครงการนี้ ให้ท่านกรอกและส่งเอกสารขอยกเลิกมาที่

ทันตแพทย์ธีรวัฒน์ สุขไผ่ตา

ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

34 ถนนอังรีดูนังค์ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

20. อาสาสมัครสามารถติดต่อผู้วิจัยได้ **ตลอด 24 ชั่วโมง** ที่:

1. ทันตแพทย์ธีรวัฒน์ สุขไผ่ตา

ที่อยู่ ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทรศัพท์ติดตามตัว 086-6108054

2. รศ.ทพ.ดร.อาทิพันธุ์ พิมพ์ขาวขำ

ที่อยู่ ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทรศัพท์ติดตามตัว 089-1308046

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

.....
(ทันตแพทย์ธีรวัฒน์ สุขไผ่ตา)

ผู้วิจัยหลัก

วันที่...../...../.....

หมายเหตุ - ให้พิมพ์ข้อความโดยละเอียดลงในช่องว่าง โดยใช้ตัวอักษร TH SarabunPKS
ขนาด 16

- หลังจากกรอกข้อความครบถ้วน พิมพ์เอกสารทั้งหมด แล้วให้ผู้วิจัยหลักลงนาม
- ทำสำเนาเอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับอาสาสมัครที่เข้าร่วมในการวิจัย

(Patient/Participant

Information Sheet) มอบให้อาสาสมัครแต่ละคนๆ ละ 1 ชุด

เอกสารยินยอมเข้าร่วมการวิจัย (Consent Form)

การวิจัยเรื่อง การศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติการสร้างกระดูกใหม่ในสิ่งมีชีวิต ด้วยการใช้โครงเลี้ยง เซลล์โคโตซาน/กรดโคคาร์บอกซิลิก ที่ฝั่งเซลล์เอ็นอีดีปริทันต์ของมนุษย์

ข้าพเจ้า (นาย/ นาง/ นางสาว/ เด็กชาย/

เด็กหญิง).....

อยู่บ้านเลขที่.....ถนน.....ตำบล/แขวง

.....

อำเภอ/เขต.....จังหวัด.....รหัสไปรษณีย์

.....

ก่อนที่จะลงนามในใบยินยอมให้ทำการวิจัยนี้

1. ข้าพเจ้าได้รับทราบรายละเอียดข้อมูลคำอธิบายสำหรับอาสาสมัครที่เข้าร่วมในการวิจัย รวมทั้งได้รับการ

อธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการทำวิจัย อันตรายหรืออาการที่อาจ เกิดขึ้นจากการทำวิจัย

หรือจากยาที่ใช้รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียดและมีความเข้าใจดี แล้ว

2. ผู้วิจัยรับรองว่าจะตอบคำถามต่างๆ ที่ข้าพเจ้าสงสัยด้วยความเต็มใจไม่ปิดบังซ่อนเร้นจน ข้าพเจ้าพอใจ

3. ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลเฉพาะเกี่ยวกับตัวข้าพเจ้าเป็นความลับและจะเปิดเผยได้เฉพาะ ในรูปที่เป็นสรุป

ผลการวิจัย การเปิดเผยข้อมูลเกี่ยวกับตัวข้าพเจ้าต่อหน่วยงานต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกระทำได้ เฉพาะกรณีจำเป็น

ด้วยเหตุผลทางวิชาการเท่านั้น และผู้วิจัยรับรองว่าหากเกิดอันตรายใดๆ จากการวิจัย ดังกล่าว ข้าพเจ้าจะได้รับ

การรักษาพยาบาลโดยไม่คิดมูลค่า

4. ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะบอกเลิกการเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้เมื่อใดก็ได้และการบอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัยนี้จะไม่

มีผลต่อการรักษาโรคที่ข้าพเจ้าจะพึงได้รับต่อไป

ข้าพเจ้าจึงสมัครใจเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ตามที่ระบุในเอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับอาสาสมัครและได้ลง นามในใบยินยอมนี้ด้วยความเต็มใจ และได้รับสำเนาเอกสารใบยินยอมที่

ข้าพเจ้าลงนามและลงวันที่ และเอกสารยกเลิกการเข้าร่วมวิจัย อย่างละ 1 ฉบับ เป็นที่เรียบร้อยแล้ว
ในกรณีที่อาสาสมัครยังไม่บรรลุนิติภาวะจะต้องได้รับการยินยอมจากผู้ปกครองด้วย

ลงนาม..... (อาสาสมัคร) (.....) วันที่...../...../.....	ลงนาม..... (ผู้ปกครอง) (.....) วันที่...../...../.....
ลงนาม..... (ผู้วิจัยหลัก) (.....) วันที่...../...../.....	ลงนาม..... (พยาน) (.....) วันที่...../...../.....

ข้าพเจ้าไม่สามารถอ่านหนังสือได้ แต่ผู้วิจัยได้อ่านข้อความในใบยินยอมนี้ให้แก่ข้าพเจ้าฟังจน
เข้าใจดีแล้ว ข้าพเจ้าจึงลงนาม หรือประทับลายนิ้วหัวแม่มือขวาของข้าพเจ้าในใบยินยอมนี้ด้วยความ
เต็มใจ

ลงนาม..... (อาสาสมัคร) (.....) วันที่...../...../.....	ลงนาม..... (ผู้ปกครอง) (.....) วันที่...../...../.....
ลงนาม..... (ผู้วิจัยหลัก) (.....) วันที่...../...../.....	ลงนาม..... (พยาน) (.....) วันที่...../...../.....

เอกสารยกเลิกการเข้าร่วมวิจัย (Withdrawal Form)

การวิจัยเรื่อง การศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติการสร้างกระดูกใหม่ในสิ่งมีชีวิต ด้วยการใช้โครงเลี้ยง เซลล์โคโตซาน/กรดไดคาร์บอกซิลิก ที่ฝังเซลล์เอ็นดอปริทันต์ของมนุษย์

ข้าพเจ้า (นาย/ นาง/ นางสาว/ เด็กชาย/

เด็กหญิง).....

อยู่บ้านเลขที่.....ถนน.....ตำบล/แขวง

.....

อำเภอ/เขต.....จังหวัด.....รหัสไปรษณีย์

.....

ขอยกเลิกการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ โดยมีเหตุผลในการยกเลิกการเข้าร่วมวิจัยคือ

- ย้ายภูมิลำเนา
- ไม่สะดวกในการเดินทาง
- เหตุผลอื่น

.....

ลงนาม.....ผู้ยกเลิก

(.....)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

ลงนาม.....พยาน

(.....)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

ลงนาม.....ผู้วิจัยหลัก

(.....)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

ที่อยู่สำหรับส่งเอกสาร ทันตแพทยธีรวัฒน์ สุขไผ่ตา

ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

34 ถนนอังรีดูนังค์ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

หมายเหตุ - สำเนาเอกสารยกเลิกการเข้าร่วมวิจัย แล้วมอบให้อาสาสมัครแต่ละคนๆ ละ 1 ชุด

VITA

Name : Teerawat sukpaitha

Date of birth : February 15, 1989

Place of birth : Bangkok, Thailand

Education : Doctor of dental surgery (1st class honors) from faculty of dentistry, Naresuan University, 2013





จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY