รายงานการวิจัย

เรื่อง

การพัฒนาวัสดุทดแทนกระดูกสำหรับการผ่าตัดกระดูก

Development of Bone-Substituted Bioimplant Materials

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน
ประจำปีงบประมาณ 2550
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดย

สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก

ธันวาคม 2550

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยนี้สำเร็จเรียบร้อยด้วยดี เนื่องจากได้รับการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2550 คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย คณะวิจัยขอขอบพระคุณศูนย์วิจัย Chulalongkorn Medical Research Center (Chula MRC) ชั้น 9 และ 10 ตึก อปร รวมทั้งห้องปฏิบัติการวิจัย ภาควิชาชีวเคมีที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ ตลอดจนเครื่องมือสำหรับทำการศึกษาทดลองในการวิจัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อภาษาไทย

ชื่อโครงการวิจัย: การพัฒนาวัสดุทดแทนกระดูกสำหรับการผ่าตัดกระดูก

ชื่อผู้วิจัย: สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก

เดือน และ ปี: ธันวาคม 2550

บทคัดย่อ

คณะวิจัยได้ทำการศึกษาผลของเนื้อกระดูก demineralized bone matrix (DBM) ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์และการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก โดยศึกษาเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับเนื้อกระดูก DBM พบว่า DBM ที่มีปริมาณแคลเซียมเหลืออยู่ 2% มีระดับ alkaline phosphatase activity สูงที่สุด ลักษณะของเซลล์กลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับเนื้อกระดูก DBM ที่แยกเลี้ยงในจานทดลองเป็นเซลล์รูปกระสวยยาวเรียว เรียงตัวชิดกัน จากการศึกษาพบว่าเซลล์กลุ่มที่ได้รับเนื้อเยื่อกระดูก DBM มีการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์น้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อศึกษาถึงความสามารถในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก เซลล์กลุ่มที่ได้รับเนื้อกระดูก DBM มีลักษณะกลมแบน ในขณะที่เซลล์กลุ่มควบคุมไม่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์แตกต่างไปจากเดิมหลังจากเลี้ยงไว้ในตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7 วัน ในการทดลองย้อมเซลล์ด้วย alkaline phosphatase เซลล์กลุ่มที่ได้รับเนื้อเยื่อกระดูก DBM ติดสีม่วงแดง นอกจากนี้เมื่อทำการย้อมด้วย Von Kossa และ osteocalcin ก็ให้ผลบวก ซึ่งยืนยันว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก ในขณะที่เซลล์กลุ่มควบคุมไม่มีการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว การศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้รับเนื้อเยื่อกระดูก DBM สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกได้ ผลที่ได้จากการศึกษานี้เป็นแนวทางเลือกใหม่ที่สำคัญในการศึกษาพัฒนาวิธีการนำไปใช้ในการสร้างเนื้อเยื่อวิศวกรรมต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Project Title: Development of Bone-Substituted Bioimplant Materials

Name of the Investigators: Sittisak Honsawek

Year: 2007

Abstracts

Demineralized bone matrix (DBM) can induce ectopic bone formation that is used to enhance bone healing in a number of clinical applications. DBM can be prepared by acid extraction of allograft bone, resulting in loss of some mineralized component but retention of collagen and noncollagenous proteins. The effects of variable residual calcium levels were investigated using a cell culture-based in vitro bioassay. Human fibroblastic cells were treated with or without DBM and determined over 7 days of culture. Cell proliferation was examined by direct cell counting. Osteogenic differentiation of the fibroblastic cells was analyzed with alkaline phosphatase activity and staining assays. Slightly DBM and overly DBM exhibited moderate osteoinductive potential whereas DBM 2% residual calcium provided for maximum osteoinductive potential. Phenotypic characteristics of human fibroblastic cells were spindle and stellate shapes with fine homogenous cytoplasm. The control cells (without DBM treatment) exhibited a spindle shape with little extracellular matrix whereas the DBM treated cells appeared shortened and flattened. DBM inhibited the growth of the fibroblastic cells by 50%, as determined by direct cell counting. Morphologic and histochemical studies confirmed that DBM had a strong stimulatory effect on the alkaline phosphatase activities of fibroblastic cells, a very early marker of cell differentiation into the osteogenic lineage. In addition, the DBM treated cells was positive in Von Kossa staining and osteocalcin immunohistochemistry assay. Human fibroblastic cells could differentiate along an osteogenic lineage and thus provide an alternative source for tissue engineering and bone regeneration.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ.....ii
บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....iii
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....iv
สารบัญ.....v
สารบัญตาราง.....vi
สารบัญภาพ.....vii
คำย่อที่ใช้ในการวิจัย.....viii
บทที่ 1 บทนำ.....1
- ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....1
- วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....6
- ขอบเขตของการวิจัย.....6
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย.....7
- เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....7
- วิธีดำเนินการวิจัย.....7
- การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....9
บทที่ 3 ผลการวิจัย.....10
บทที่ 4 อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ.....17
- อภิปรายผลการวิจัย.....17
- สรุปผลการวิจัย.....18
- ข้อเสนอสำหรับการวิจัยในอนาคต.....18

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางประกอบ หน้า

1. ลำดับนิวคลิโอไทด์ที่ใช้เป็นตัวเริ่มต้นในการวิเคราะห์ด้วยวิธี RT-PCR.....8

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพประกอบ หน้า

1. เซลล์ที่ได้จากการทำ primary culture (x 10) เจริญเต็มพื้นที่ภายใน 14 วัน.....11
2. ผลการทดสอบ alkaline phosphatase activity assayของ human fibroblastic cells.....12
3. ผลการทดสอบ Trypan blue proliferation assay ของเซลล์ human fibroblastic cells.....12
4. ผลการทดสอบ alkaline phosphatase activity assay ของ human fibroblastic cells.....12
5. Alkaline phosphatase staining assay (x10) ของเซลล์ human fibroblastic cells.....13
6. เซลล์ที่ย้อมด้วย Von Kossa.....13
7. เซลล์ที่ย้อมด้วย osteocalcin.....13
8. การวิเคราะห์ RT-PCR แสดงการแสดงออกเพิ่มขึ้นของ RUNX2.....14
9. การวิเคราะห์ RT-PCR แสดงการแสดงออกเพิ่มขึ้นของ SMAD2.....14
10. การวิเคราะห์ทดสอบความแข็งแรงและความคงทนต่อแรงกดของวัสดุ.....15

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อที่ใช้ในการวิจัย

DBM	Demineralized bone matrix
HCl	Hydrochloric acid
OD	Optical density
RNA	Ribonucleic acid
RT-PCR	Reverse transcriptase-polymerase chain reaction

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

ผู้ป่วยและผู้สูงอายุซึ่งมีภาวะความผิดปกติของกระดูกมีผลทำให้เกิดความเปราะบางของกระดูก เกิดภาวะกระดูกพรุน กระดูกหักได้มากขึ้น และพบบ่อยในผู้สูงอายุไทย เนื่องจากอายุเฉลี่ยของประชากรเพิ่มสูงขึ้น การผ่าตัดทางศัลยกรรมกระดูกนั้น สามารถปรับเปลี่ยนทดแทนได้โดยการปลูกถ่ายกระดูกหรือการอุดช่องว่างในกระดูกด้วยการใช้วัสดุทดแทนทางชีวภาพ ซึ่งบางครั้งจำเป็นต้องใช้วัสดุทดแทนกระดูกเสริมให้ในภาวะหรือโรคที่เกิดความผิดปกติและจำเป็นต้องได้รับการผ่าตัด เช่น กระดูกหัก กระดูกไม่ติดกัน กระดูกแหว่ง เนื้องอกในกระดูก และกระดูกติดเชื้อเนื่องจากแบคทีเรีย วัณโรค และเชื้อรา ซึ่งเป็นภาวะหรือโรคที่พบได้บ่อยอันจะก่อให้เกิดความพิการและทุพพลภาพต่อผู้ป่วย อีกทั้งยังเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของประชากรในประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ป่วยโรคเนื้องอกในกระดูก และผู้สูงอายุที่ป่วยเป็นโรคกระดูกติดเชื้อซึ่งจำเป็นต้องได้รับการผ่าตัดนำเอาส่วนของกระดูกบริเวณที่มีพยาธิสภาพออก จำเป็นต้องได้รับการทดแทน และซ่อมแซมเพื่อเสริมสร้างเนื้อเยื่อกระดูกให้กลับคืนสู่สภาพปกติ

ในการรักษานั้นจึงมีความจำเป็นต้องได้รับชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อกระดูกมาใส่ทดแทนบริเวณที่ได้รับการผ่าตัด การปลูกถ่ายกระดูกโดยใช้ชิ้นส่วนของกระดูกจากตัวผู้ป่วยเอง ซึ่งอาจจะก่อให้เกิดภาวะแทรกซ้อน เช่น การเจ็บปวด การติดเชื้อ และ การสูญเสียบริเวณ donor site ถึงแม้ได้มีการนำวัสดุสังเคราะห์ เช่น โลหะ เซรามิค และโพลิเมอร์ เป็นต้น มาใช้ในการรักษาโรคดังกล่าว แต่อย่างไรก็ตามวัสดุสังเคราะห์เหล่านี้มีข้อจำกัดหลายประการ กล่าวคือ เป็นสารแปลกปลอมที่มีองค์ประกอบไม่เหมือนกันกับเนื้อเยื่อของคน มีสภาพแตกต่างจากเนื้อเยื่อของคน และไม่สามารถชักนำให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ อีกทั้งยังมีราคาแพง ไม่สามารถผลิตได้เองภายในประเทศ และต้องพึ่งเทคโนโลยีในการนำเข้ามาจากต่างประเทศ ดังนั้นทางเลือกวิธีหนึ่งของการรักษา คือ การศึกษาวิจัยนำกระดูกจากผู้บริจาคอวัยวะมาใช้ทดแทน ที่สำคัญคือ demineralized bone matrix

ปัจจุบันวัสดุทดแทนกระดูกที่นำมาใช้เปลี่ยนถ่ายหรือทดแทนในผู้ที่สูญเสียกระดูกมักนำเข้ามาจากต่างประเทศซึ่งมีราคาแพงมาก ปกติแพทย์สามารถใช้กระดูกของผู้ป่วยเองจากส่วนอื่นของร่างกาย หรือกระดูกของผู้ที่เสียชีวิตไปแล้ว และเก็บไว้ในคลังกระดูก แต่ก็ยังมีไม่เพียงพอต่อการผ่าตัด อีกทั้งคุณภาพไม่ได้ตามที่ต้องการของแพทย์และผู้ป่วย การปลูกถ่ายกระดูกจากสัตว์เป็นอีกวิธีหนึ่งที่เสี่ยงต่อการติดเชื้อไวรัส หรือ prion และการปฏิเสธจากร่างกายของผู้รับเพราะการไม่ยอมรับเข้ากันของเนื้อเยื่อ ยิ่งไปกว่านั้น การนำกระดูกจากตำแหน่งอื่นในร่างกายของผู้ป่วยเอง (autogenous bone graft) มาเชื่อมต่อตรงบริเวณที่เป็นโรคนั้นทำได้ยาก เนื่องจากไม่สามารถหากระดูกที่เหมาะสมนำมาใช้ได้ นอกจากนี้แล้ววิธีการนี้ยังสร้างความทุกข์ทรมานแก่

ผู้ป่วยอีกด้วย มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับวัสดุชีวภาพทดแทนกระดูกมากมายในต่างประเทศ โดยอาศัยพื้นฐานการศึกษาวิจัยในสหสาขา รวมทั้งสาขาแพทยศาสตร์ สาขาวัสดุศาสตร์ สาขาวิศวกรรมศาสตร์ สาขาวิทยาศาสตร์ สาขาการออกแบบวัสดุ อย่างไรก็ตาม พบว่าข้อมูลการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับวัสดุชีวภาพทดแทนกระดูกในประเทศไทยมีน้อยมาก แม้จะมีการนำเข้าวัสดุอุปกรณ์เหล่านี้เข้ามาในประเทศ แต่ก็ยังไม่เป็นที่นิยมแพร่หลายนัก เหตุผลอาจเป็นเพราะราคาแพง และไม่สอดคล้องกับขนาดรูปร่างของผู้สูงอายุไทย

ด้วยเหตุผลดังที่กล่าวมา การศึกษาวิจัยเพื่อหาวัสดุทดแทนกระดูกจากวัสดุที่มีในประเทศเพื่อให้ได้สารทดแทนกระดูกจึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่งในประเทศไทย คณะผู้วิจัยมีแนวคิดที่จะออกแบบประดิษฐ์วัสดุทางชีวภาพทดแทนกระดูกสำหรับการผ่าตัดศัลยกรรมกระดูก เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาพัฒนาวัสดุอุปกรณ์อื่นๆในอนาคต โดยอาศัยการใช้วัสดุและเทคโนโลยีภายในประเทศ และมีขั้นตอนการผลิตที่ไม่ยุ่งยาก ใช้งบประมาณในการผลิตไม่มาก ซึ่งจะเป็นการนำวัสดุที่มีอยู่ภายในประเทศมาเพิ่มมูลค่า (Value added) และช่วยลดการนำเข้าวัสดุทดแทนทางการแพทย์ที่มีราคาสูงมากจากต่างประเทศ อันจะก่อให้เกิดการพัฒนาและกระตุ้นเศรษฐกิจของประเทศไทย แล้วส่งผลให้คุณภาพชีวิตความเป็นอยู่ของประชากรในประเทศดีขึ้น

กระดูกหัก กระดูกแหว่ง เนื้องอกในกระดูก และกระดูกติดเชื้อเนื่องจากแบคทีเรีย วัณโรค และเชื้อรา เป็นภาวะที่พบได้บ่อยอันจะก่อให้เกิดความพิการและทุพพลภาพต่อผู้ป่วยโรคกระดูก อีกทั้งเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของประชากรในประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ป่วยโรคเนื้องอกในกระดูก และผู้ป่วยโรคกระดูกติดเชื้อที่จำเป็นต้องได้รับการผ่าตัดนำเอาส่วนของกระดูกบริเวณที่มีพยาธิสภาพออก จำเป็นต้องได้รับการซ่อมแซมเพื่อเสริมสร้างเนื้อเยื่อกระดูกให้กลับคืนสู่สภาพปกติ ในการรักษานั้นจึงมีความจำเป็นต้องได้รับชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อกระดูกมาใส่ทดแทนบริเวณที่ได้รับการผ่าตัดซึ่งมีการแหว่งหายของกระดูกส่วนที่มีพยาธิสภาพออกไปเนื่องจากการปลูกถ่ายกระดูกโดยใช้ชิ้นส่วนของกระดูกจากตัวผู้ป่วยเองที่บริเวณสะโพก (autogenous bone graft) ก่อให้เกิดภาวะแทรกซ้อน การติดเชื้อเพิ่มเติม และ morbidity สูงขึ้น ทางเลือกวิธีหนึ่งของการรักษาคือการนำ demineralized bone matrix จากผู้บริจาคอวัยวะมาใช้ทดแทน (demineralized bone matrix allograft) demineralized bone matrix เป็นเนื้อเยื่อกระดูกที่ได้รับการผ่านขั้นตอนการลดปริมาณเกลือแร่ที่อยู่ในกระดูก เช่น แคลเซียม และฟอสฟอรัส แต่ยังคงเหลือองค์ประกอบที่สำคัญของ collagen และ noncollagen อีกทั้งโปรตีน เช่น bone morphogenetic proteins และ growth factors ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญอย่างยิ่งต่อการชักนำและเสริมสร้างกระดูกใหม่ วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาและประเมินประสิทธิภาพของผงกระดูกซึ่งมีปริมาณแคลเซียมที่แตกต่างกันในการชักนำเสริมสร้างกระดูกใหม่ในเซลล์เพาะเลี้ยง (cell culture)

กระดูกประกอบด้วยเซลล์และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันรอบเซลล์ (extracellular matrix) bone matrix มีองค์ประกอบของสารอินทรีย์ 35% และสารอนินทรีย์ 65% (1) สารอนินทรีย์ของกระดูกนั้นส่วนใหญ่พบแคลเซียมและฟอสเฟตร่วมกันอยู่ในรูปของผลึก hydroxyapatite ส่วนสารอินทรีย์ในกระดูกถูกแบ่งออกเป็นโปรตีนชนิด collagen ประมาณ 90% และ noncollagen ประมาณ 10% เซลล์ที่มีส่วนสำคัญต่อการสร้าง bone matrix คือ bone-forming cells หรือ osteoblasts เซลล์กระดูกที่เจริญเติบโตเต็มที่นั้นมีรูปร่าง cuboidal และติดสีเข้มเมื่อย้อม alkaline phosphatase เซลล์ดังกล่าวนี้สามารถสังเคราะห์ alkaline phosphatase ที่ปรากฏบนผนังเซลล์ collagen ชนิดที่ 1 และโปรตีน noncollagen อื่น ๆ เช่น osteocalcin bone sialoprotein (2)

เซลล์ osteoblasts มีต้นกำเนิดมาจาก pluripotent mesenchymal stem cells ซึ่งจะพบได้บริเวณ endosteum (เรียกเซลล์ที่อยู่บริเวณนี้ว่า bone marrow stromal stem cells) และบริเวณ periosteum ของกระดูก (เรียกเซลล์บริเวณนี้ว่า connective tissue mesenchymal stem cells) เซลล์ตั้งต้นเหล่านี้เมื่อได้รับสิ่งกระตุ้นที่เหมาะสมจะเจริญเติบโตและเปลี่ยนไปเป็นเซลล์ preosteoblasts และเจริญเป็นเซลล์ osteoblasts ที่เจริญเต็มที่ เซลล์ preosteoblasts มักจะปรากฏอยู่บริเวณผิวของกระดูกมีรูปร่าง elliptical และมีนิวเคลียสยาวสามารถที่เจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ได้

กระบวนการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ osteoblasts มีการแสดงออกของยีนและหน้าที่ที่เป็นไปตามลำดับขั้นเริ่มจากระยะเริ่มต้น จะมีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต เช่น c-myc และ c-fos ต่อมาเซลล์ osteoblasts สร้าง osteoid matrix, collagen ชนิดที่ 1, fibronectin growth factors ที่เกี่ยวข้องบางชนิด ขณะที่เซลล์เหล่านี้เจริญไปเป็นเซลล์ที่โตเต็มที่ (mature osteoblasts) หน้าที่และการสังเคราะห์โปรตีนของเซลล์เหล่านี้จะเปลี่ยนแปลงไปโดยสร้าง collagen type 1 และ alkaline phosphatase ลดลง ขณะเดียวกันจะสร้าง bone sialoprotein และ osteocalein เพิ่มขึ้น (3)

Osteoinduction คือความสามารถของ mesenchymal stem cells ซึ่งได้รับสิ่งกระตุ้นที่จะเปลี่ยนแปลงและ differentiate ไปสู่ chondroblastic และ osteoblastic lineage และนำไปสู่การชักนำและสร้างกระดูกใหม่ (4,5) จากการศึกษาที่ผ่านมาได้มีการนำ nondemineralized bone matrix มาใช้ในการชักนำเพื่อสร้างเนื้อเยื่อกระดูกใหม่ อย่างไรก็ตามพบว่าใช้เวลานานหลายเดือนและไม่ได้ผลดีเท่าที่ควร (6) ต่อมา Urist และคณะได้ทำการศึกษาและพบว่ากระดูกที่ได้ผ่านขบวนการ decalcification ด้วย hydrochloric acid มีความสามารถที่จะชักนำให้เกิดการสร้งกระดูกใหม่ได้ดีกว่ากระดูกที่ไม่ได้ผ่านขบวนการ decalcification (7) จากการศึกษาของ Reddi และคณะยืนยันว่ากระดูกซึ่งได้ผ่านกระบวนการ demineralization จะ

สามารถชักนำการสร้างกระดูกใหม่ได้ดีในสัตว์ทดลอง (8) ในระยะแรกของ osteogenesis mesenchymal cells จะถูกชักนำให้มาชุมนุมรวมกันและเจริญเปลี่ยนแปลงไปเป็น chondroblasts และ osteoblasts (9) ต่อจากนั้นเกิดการสะสมของสารเกลือแร่แคลเซียมและแร่ธาตุต่าง ๆ (calcification) แล้วเกิดการสร้างกระดูกใหม่รวมทั้งไขกระดูกด้วย

การผ่าตัดในผู้ป่วยโรคกระดูก และข้อจำเป็นต้องใช้วัสดุทดแทนกระดูกเสริมให้ในภาวะที่เกิดความผิดปกติจำเป็นต้องได้รับการผ่าตัด เช่น กระดูกหัก กระดูกไม่ติดกัน กระดูกแหว่ง เนื้องอกในกระดูก และกระดูกติดเชื้อเนื่องจากแบคทีเรีย วัณโรค และเชื้อรา ซึ่งเป็นภาวะหรือโรคที่พบได้บ่อยอันจะก่อให้เกิดความพิการและทุพพลภาพต่อผู้ป่วย อีกทั้งยังเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของประชากรในประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ป่วยโรคเนื้องอกในกระดูก และผู้สูงอายุที่ป่วยเป็นโรคกระดูกติดเชื้อที่จำเป็นต้องได้รับการผ่าตัดนำเอาส่วนของกระดูกบริเวณที่มีพยาธิสภาพออก จำเป็น ต้องได้รับการทดแทน และซ่อมแซมเพื่อเสริมสร้างเนื้อเยื่อกระดูกให้กลับคืนสู่สภาพปกติ

ในการรักษานั้นจึงมีความจำเป็นต้องได้รับชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อกระดูกมาใส่ทดแทนในบริเวณที่ได้รับการผ่าตัด การปลูกถ่ายกระดูกโดยใช้ชิ้นส่วนของกระดูกจากตัวผู้ป่วยเอง (autogenous bone graft) อาจจะก่อให้เกิดภาวะแทรกซ้อน เช่น การเจ็บปวด การติดเชื้อ และการสูญเสียบริเวณ donor site ถึงแม้ได้มีการนำวัสดุสังเคราะห์ เช่น โลหะ เซรามิค และโพลิเมอร์ เป็นต้น มาใช้ในการรักษาโรคดังกล่าว แต่อย่างไรก็ตามวัสดุสังเคราะห์เหล่านี้มีข้อจำกัดหลายประการ กล่าวคือ เป็นสารแปลกปลอมที่มีองค์ประกอบไม่เหมือนกันกับเนื้อเยื่อของคน มีสภาพแตกต่างจากเนื้อเยื่อของคน และไม่สามารถชักนำให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ อีกทั้งยังมีราคาแพง ไม่สามารถผลิตได้เองภายในประเทศ และต้องพึ่งเทคโนโลยีในการนำเข้ามาจากต่างประเทศ ดังนั้นทางเลือกวิธีหนึ่งของการรักษา คือการศึกษาวิจัยนำกระดูกจากผู้บริจาคอวัยวะมาใช้ทดแทน เช่น demineralized bone matrix

เนื้อเยื่อกระดูก demineralized bone matrix เป็นวัสดุจากกระดูกที่ได้รับการผ่านขั้นตอนการลดปริมาณเกลือแร่ที่อยู่ในกระดูก เช่น แคลเซียม และฟอสฟอรัส แต่ยังคงเหลือองค์ประกอบที่สำคัญของ collagen และ noncollagen อีกทั้งโปรตีน เช่น bone morphogenetic proteins และ growth factors (10) ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญอย่างยิ่งต่อการชักนำและเสริมสร้างกระดูกใหม่ demineralized bone matrix นี้สามารถนำมาใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่มีความจำเป็นต้องได้รับชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อกระดูกมาใส่ทดแทนบริเวณที่ได้รับการผ่าตัดซึ่งมีการแหว่งหายของกระดูกหรือส่วนที่มีพยาธิสภาพเพื่อเสริมสร้างเนื้อเยื่อกระดูกให้กลับคืนสู่สภาพปกติ demineralized bone matrix นี้สามารถพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ที่สำคัญในการรักษาผู้ป่วยทางศัลยกรรมกระดูก (orthopaedic surgery) ทางทันตกรรม (periodontal and maxillofacial surgery) และ

ทางศัลยกรรมตกแต่ง (plastic surgery) วัสดุทางชีวภาพทดแทนกระดูกทางการแพทย์ demineralized bone matrix สามารถประดิษฐ์และผลิตขึ้นได้ในลักษณะรูปแบบต่างๆ เช่น รูปแบบที่เป็นผง (powder) ชิ้นส่วนเล็กๆ (chip) รูปแบบที่เป็นลูกเต๋า (cube) เม็ดขนาดต่างๆ (pellet) หรือ เส้นใย (fiber) นอกจากนี้ สามารถนำมาผสมกับสารตัวกลาง (carrier) ทำให้มีลักษณะคล้ายกับเจล (gel) หรือ คล้ายยาสีฟัน (paste) และ สามารถปั้นเป็นรูปต่างๆ ตามต้องการได้ (pliable and moldable)

การใช้วัสดุทดแทนประเภทนี้เป็นที่ยอมรับและใช้กันแพร่หลายในวงการแพทย์ด้วยเหตุผลที่ว่า demineralized bone matrix มีคุณสมบัติเป็นโครงร่างเพื่อให้เซลล์กระดูกเจริญเพิ่มจำนวน (osteoconduction) และมีโปรตีนชักนำเซลล์กระดูกให้เปลี่ยนแปลงเพิ่มจำนวนในบริเวณโครงร่างดังกล่าว (osteoinduction) เพื่อสร้างกระดูกใหม่ตามธรรมชาติ (11, 12) ดังนั้นจึงทำให้กระดูกเจริญและสมานเชื่อมติดกันได้ตามปกติ รวมทั้งลดโอกาสการเกิดปฏิกิริยาต่อต้านเนื้อเยื่อแปลกปลอม (graft rejection) จากการศึกษาของคณะผู้วิจัยพบว่ามีโปรตีนชักนำให้เกิดการสร้างกระดูกซึ่งสามารถตรวจสอบได้ (13) และพบว่ามีความสัมพันธ์กันกับการชักนำสร้างกระดูกในหนูทดลอง (14) จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการศึกษาวิจัยถึงกระบวนการผลิตวัสดุสิ่งประดิษฐ์ทางชีวภาพดังกล่าว โดยการทดสอบในหลอดทดลอง และในสัตว์ทดลองก่อนที่จะนำมาใช้ในคนเพื่อทดสอบประสิทธิภาพและความปลอดภัยของวัสดุที่นำมาใช้ทดแทนกระดูก

สำหรับการนำ demineralized bone matrix มาใช้ทดแทนมีข้อดีและเหมาะสมกว่า เพราะมีองค์ประกอบและสภาพเหมือนกันกับเนื้อเยื่อของคน และสามารถชักนำให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ได้ เป็นที่ทราบกันดีว่า คุณสมบัติการชักนำเพื่อสร้างกระดูกใหม่ของ demineralized bone matrix นั้นหลากหลายแตกต่างกันตามขั้นตอน วิธีการผลิต การเก็บรักษา และขึ้นอยู่กับคุณภาพและปริมาณของโปรตีนชักนำให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ (15-17) ปัจจุบันในต่างประเทศได้มีการพัฒนา demineralized bone matrix มาใช้ทดแทนวัสดุสังเคราะห์ แต่อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์ demineralized bone matrix จากต่างประเทศมีราคาแพงมาก อีกทั้งการศึกษาวิจัยเพื่อการพัฒนา demineralized bone matrix มาใช้ภายในประเทศไทยมีน้อยมาก และไม่เพียงพอต่อความต้องการที่เพิ่มมากขึ้นของผู้ป่วยและศัลยแพทย์

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ

1. เพื่อศึกษาวิเคราะห์วิจัย และพัฒนาวัสดุทดแทนทางการแพทย์ไว้ใช้ในการผ่าตัดศัลยกรรมกระดูกของประเทศไทย
2. เพื่อคัดเลือกวัสดุ Biomaterial ที่เหมาะสมสำหรับทดแทนกระดูกและเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อของร่างกาย
3. เพื่อศึกษาผลของ bone matrix ต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cell proliferation)
4. เพื่อศึกษาผลของ bone matrix ต่อการเจริญเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก (osteoblastic differentiation)
5. เพื่อศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในขณะที่มีการเจริญเปลี่ยนแปลงของเซลล์กระดูก

ขอบเขตของการวิจัย

การออกแบบและผลิตวัสดุชีวภาพทดแทนกระดูก สำหรับใช้ทดลองในเซลล์เพาะเลี้ยง (in vitro) และทดสอบความแข็งแรงคงทนต่อแรงกด และการชักนำให้มีการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูกในหลอดทดลองเพื่อนำข้อมูลไปพัฒนาวัสดุทดแทนกระดูกสำหรับรักษาในผู้ป่วยที่มีความจำเป็นต้องได้รับการผ่าตัดทางศัลยกรรมกระดูก

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ทราบถึงองค์ความรู้ และแนวคิดพื้นฐานในการประยุกต์ใช้ในการออกแบบวัสดุอื่น ๆ ที่จำเป็นสำหรับการผ่าตัดทางศัลยกรรมกระดูก
2. เพื่อให้ทราบถึงกลไกและผลของ bone matrix ซึ่งมีระดับแคลเซียมที่แตกต่างกันต่อการเจริญเพิ่มจำนวนและเปลี่ยนไปเป็นเซลล์กระดูก อันจะนำไปสู่การประยุกต์ใช้ demineralized bone matrix ที่มีระดับแคลเซียมที่เหมาะสมต่อการชักนำและสร้างกระดูกใหม่ในการรักษาภาวะกระดูกหักต่อไป
3. เพื่อให้ทราบถึงความสัมพันธ์ของการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกันกับการเจริญเพิ่มจำนวนและเปลี่ยนแปลงไปสู่เซลล์กระดูก ซึ่งจะนำไปสู่ความเข้าใจที่ดียิ่งขึ้นของขบวนการชักนำและเสริมสร้างกระดูกใหม่ และอาจจะนำไปใช้พัฒนาการรักษาหรือป้องกันโรคกระดูกพรุน (osteoporosis) และโรคกระดูกอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง
4. เพื่อเป็นงานวิทยานิพนธ์ของนิสิตปริญญาโทสาขาชีวเคมีทางการแพทย์

วิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

Incubator, laminar flow hood, water bath, cell and tissue culture hood, centrifuge RNA spectrophotometer, thermocycler, homogenizer, sonicator

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่าง

กระดูกยาว (long bone) ส่วนแขนหรือขาซึ่งได้รับบริจาคจากผู้บริจาคอวัยวะ (donor) จะถูกนำมาผ่านขั้นตอนการล้างไขกระดูก เลือด และ soft tissues จากนั้นนำกระดูกที่ได้มาเป็นปั่นด้วยเครื่อง pulverizer เพื่อให้ได้ขนาดเล็กกว่า 1000 ไมครอน (หรือ 1 มิลลิเมตร) bone matrix ดังกล่าวจะผ่านกระบวนการ demineralization ด้วย 0.5 N HCl ด้วยระยะเวลาที่แตกต่างกัน (60, 120, 180, 240 และ 300 นาที ตามลำดับ) รวมทั้งสิ้น 5 กลุ่ม ปริมาณแคลเซียม (% calcium content) ของ demineralized bone matrix ในแต่ละกลุ่มสามารถประเมินและตรวจสอบได้ด้วย DMA calcium assay kit

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์และตรวจทางห้องปฏิบัติการ

ทำการแยกเพาะเลี้ยงและเพิ่มจำนวนเซลล์จากเยื่อหุ้มกระดูก (periosteum) โดยวิธี outgrowth technique (primary cell culture) (รูปที่ 1)

2.1 กลุ่มตัวอย่าง : human fibroblastic cells ซึ่งได้รับ demineralized bone matrix ที่มีปริมาณแคลเซียมที่แตกต่างกัน

กลุ่มควบคุม : human fibroblastic cells ซึ่งไม่ได้รับ demineralized bone matrix

ทั้งกลุ่มตัวอย่างและกลุ่มควบคุมจะถูกนำมาเพาะเลี้ยงในตู้อบ (incubator) เป็นเวลา 7 วัน

2.2 ประเมินจำนวนเซลล์ในกลุ่มตัวอย่างและกลุ่มควบคุมด้วยวิธี Trypan blue staining assay

2.3 ประเมินการเจริญเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก (osteoblastic differentiation) ด้วยวิธี alkaline phosphatase activity assay

2.4 ตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน alkaline phosphatase ด้วยวิธี alkaline phsophatase staining assay

เซลล์กลุ่มศึกษาและเซลล์กลุ่มตัวอย่างจะถูก fix ด้วย formaldehyde/ methanol แล้วทำการย้อมด้วย propandiol solution ซึ่งมี 1-naphthyl phosphate sodium salt เป็นสารตั้งต้น และ variamine blue B salt เป็นสารย้อม ปฏิกิริยาที่ได้ผลบวกต่อ alkaline phosphatase staining เซลล์จะติดสีน้ำตาลแดง แสดงว่ามี osteoblast differentiation ปฏิกิริยาที่ได้ผลลบต่อ alkaline phosphatase staining เซลล์จะติดสีน้ำเงิน แสดงว่าไม่มี osteoblast differentiation

2.5 การศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ osteoblast differentiation

โดยวิธี RT-PCR analysis

2.5.1 การแยกสกัด RNA

เซลล์กลุ่มศึกษาและเซลล์กลุ่มตัวอย่าง นำมาทำการสกัด total RNA โดยวิธี acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform method แล้วนำไปคำนวณและแปลผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของ RNA (μg/ml) = OD ที่ 260 x 50 x dilution factor ความบริสุทธิ์ของ RNA ดูได้จากอัตราส่วน OD ที่ 260 ต่อ OD ที่ 280 ควรมีค่าใกล้เคียง 2

2.5.2 RT-PCR analysis

ตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ osteoblast differentiation ได้แก่ RUNX2 และ SMAD2 ร่วมกับยีนควบคุม GADPH ซึ่งเป็น house keeping gene

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลิโอไทด์ที่ใช้เป็นตัวเริ่มต้นในการวิเคราะห์ด้วยวิธี RT-PCR

No.	Name	Sequences (5' -3')	product	Tm
1.	RUNX2 (Cbfa1)	Foward : $^{5'}$ CCCCACGACAACCGCACCAT $^{3'}$ Reverse: $^{5'}$ CACTCCGGCCCACAAATC $^{3'}$	270bp	64°C
2.	SMAD2	Foward : $^{5'}$ AGAGAGTTGAGACACCAGTTTTGC $^{3'}$ Reverse: $^{5'}$ ATAGTCATCCAGAGGCGGAAGTT $^{3'}$	86 bp	60°C
3.	GADPH	Foward : $^{5'}$ ACCACAGTCCATGCCATCAC $^{3'}$ Reverse: $^{5'}$ TCCACCACCCTGTTGCTGTA $^{3'}$	370 bp	60°C

3. การทดสอบความแข็งแรงและความคงทนต่อแรงกด

โดยทำการวัดความเค้น (stress, MPa) และความเครียด (strain, %) แล้วคำนวณค่า compressive modulus

<u>การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ</u>

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในแต่ละกลุ่มจะนำมาทำการคำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) การทดสอบทางสถิติที่ใช้เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ศึกษา(กลุ่มตัวอย่างและกลุ่มควบคุม) ได้แก่ Chi-square tests และ unpaired *t* tests โดยความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ใช้เป็นตัวชี้วัดเมื่อ $P < 0.05$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการวิจัย

จากการทดลองเมื่อนำ bone matrix มาผ่านกระบวนการ demineralization ด้วย 0.5 N HCl ด้วยระยะเวลาที่แตกต่างกัน (60, 120, 180, 240 และ 300 นาที ตามลำดับ) รวมทั้งสิ้น 5 กลุ่ม ปริมาณแคลเซียม (% residual calcium content) ของ demineralized bone matrix (DBM) ในแต่ละกลุ่มได้ผลดังนี้ 30%, 20%, 10%, 2% และ 1% ตามลำดับ หลังจากนั้นทำการตรวจวัดระดับ alkaline phosphatase activity ในเซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อตรวจสอบว่า DBM กลุ่มที่มีปริมาณแคลเซียมเหลืออยู่ค่าใดชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ osteoblasts ได้สูงที่สุด ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 2 พบว่า DBM ที่มีปริมาณแคลเซียมเหลืออยู่ 2% มีระดับ alkaline phosphatase activity สูงที่สุด

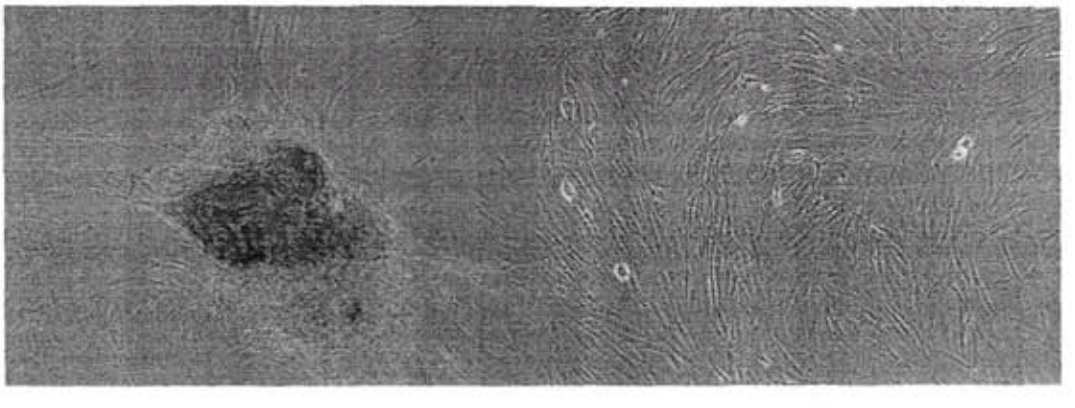
ในการศึกษาผลของ DBM 2% residual calcium ต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cell proliferation) และต่อการเจริญเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก (osteoblastic differentiation) ในระยะเวลาที่แตกต่างกันตั้งแต่วันที่ 0, 3, 5, 7 และ 10 ด้วย Trypan blue staining assay และ alkaline phosphatase activity assay เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับ DBM การทดสอบผลของ DBM ต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ในระดับเซลล์ทดลอง (*in vitro*) โดยการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น α-MEM ที่มีส่วนผสมของ 2% FBS กับยาปฏิชีวนะ penicillin และ streptomycin โดยเริ่มต้นเซลล์ที่จำนวน 5.0×10^5 เซลล์/T-25 flask ซึ่งแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มทดลองซึ่งได้รับ DBM จำนวน 5 mg และกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับ DBM เป็นเวลา 10 วัน แล้วทำการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable cells) ในวันที่ 0, 3, 5, 7, และ 10 โดยการย้อมด้วยสารละลาย trypan blue แล้วทำการวิเคราะห์จำนวนเซลล์ด้วยการนับบน hemocytometer chamber โดยเซลล์ที่มีชีวิตจะไม่ติดสีน้ำเงินของสารละลาย trypan blue ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3 พบว่าจำนวนเซลล์ในกลุ่มควบคุมเพิ่มขึ้นเป็น 8×10^6 เซลล์/T-25 flask ในขณะที่จำนวนเซลล์ในกลุ่มที่ได้รับ DBM มีจำนวนเซลล์ประมาณ 4.0×10^6 เซลล์/T-25 flask ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์สูงที่สุดประมาณวันที่ 5-7 ทั้งสองกลุ่ม โดยกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับ DBM นั้นมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์มากกว่า ในขณะที่กลุ่มทดลองที่ได้รับ DBM นั้นมีการเพิ่มของจำนวนเซลล์น้อยกว่า ซึ่งเป็นไปได้ว่าอาจเกิดกระบวนการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลง (differentiation) ไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก

จากรูปที่ 4 พบว่า ระดับ alkaline phosphatase activity ของเซลล์ human fibroblastic cells ที่ได้รับ DBM ในช่วงแรก (วันที่ 0, 3, 5) นั้นอยู่ในระดับต่ำ (น้อยกว่า 0.01 nmol/min/μg protein) และเพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 7 (ค่าเฉลี่ย = 0.087745 nmol/min/ug protein, SD = $\pm$ 0.0061) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และลดลงในวันที่ 10 ใกล้เคียงกับในช่วงต้น แสดงว่าเซลล์ใน

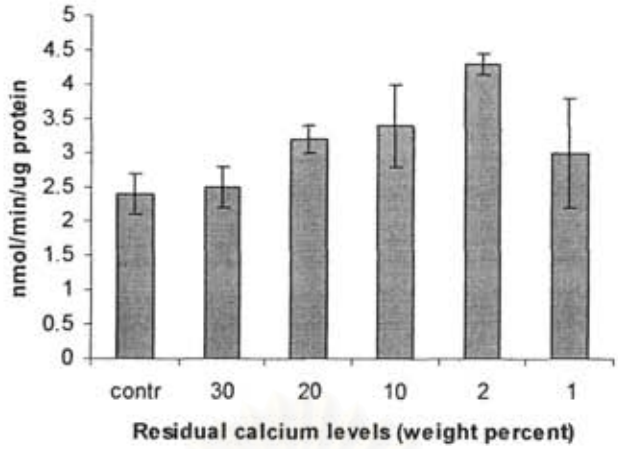
กลุ่มทดลองที่ได้รับ DBM มีการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก (osteoblastic differentiation)

ในการทดลองนี้ต้องการศึกษาผลของ demineralized bone matrix (DBM) ต่อการเจริญของhuman fibroblastic cells ดังนั้นจึงทำการทดลองโดยแบ่ง human fibroblastic cells ออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ไม่ได้รับ DBM ขณะที่ในกลุ่มที่ 2 ได้รับ DBM 2% residual calcium หลังจากนั้น 7 วัน จึงทำการประเมินโดยดูเซลล์ทั้ง 2 กลุ่ม ด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าเซลล์กลุ่มที่ได้รับ DBM มีการเจริญเปลี่ยนแปลงไป และเซลล์มีรูปร่างที่แตกต่างกับเซลล์กลุ่มที่ไม่ได้รับ DBM กล่าวคือ เซลล์กลุ่มที่ไม่ได้รับ DBM มีลักษณะ spindle shape (รูปกระสวย) ในขณะที่เซลล์กลุ่มที่ได้รับ DBM มีลักษณะ cuboidal shape (รูปสี่เหลี่ยม) (รูปที่ 5)

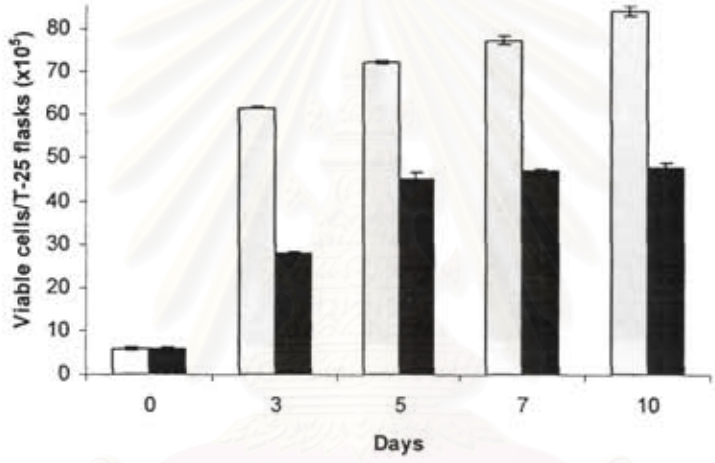
เนื่องจาก alkaline phosphatase เป็นเอนไซม์ที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ พบได้เป็นจำนวนมากในเซลล์กระดูก (osteoblast) ดังนั้นจึงใช้ alkaline phosphatase เป็นตัวบ่งชี้ที่จำเพาะ (marker) สำหรับ osteoblastic differentiation ซึ่งสามารถตรวจได้ด้วยวิธี alkaline phosphatase staining assay ในการทดลองนี้ต้องการทดสอบการแสดงออกของ alkaline phosphatase ระหว่างเซลล์ที่ไม่ได้รับ DBM และเซลล์ที่ได้รับ DBM 2% residual calcium จึงทำการทดลองโดยวิธี alkaline phosphatase staining assay ซึ่งทำได้โดยเซลล์จะถูก fix ด้วย formaldehyde/ methanol แล้วทำการย้อมด้วย propandiol solution ซึ่งมี 1-naphthyl phosphate sodium salt เป็นสารตั้งต้น และ variamine blue B salt เป็นสารย้อม ปฏิกิริยาที่ได้ผลลบต่อ alkaline phosphatase staining assay เซลล์จะติดสีน้ำเงินเข้ม แสดงว่าไม่มี osteoblastic differentiation ปฏิกิริยาที่ได้ผลบวกต่อ alkaline phosphatase staining เซลล์จะติดสีน้ำตาลแดง แสดงว่ามีการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูก (osteoblastic differentiation) พบว่าเซลล์ที่ไม่ได้รับ DBM ติดสีน้ำเงิน แสดงว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูก (no osteoblastic differentiation) เซลล์ที่ได้รับ DBM ติดสีน้ำตาลแดง แสดงว่ามีการเปลี่ยนเป็นเซลล์กระดูก (osteoblastic differentiation) และมีการแสดงออกของ alkaline phosphatase (รูปที่ 5)



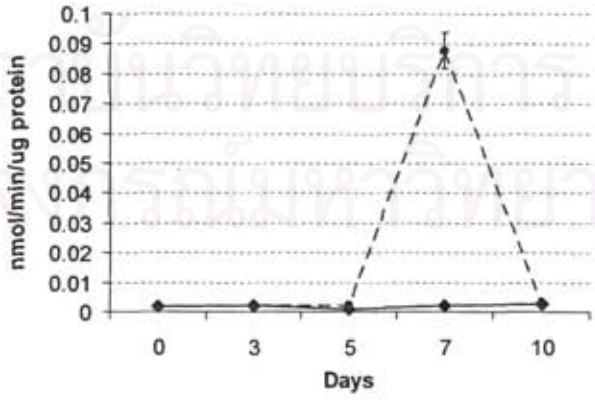
รูปที่ 1 เซลล์ที่ได้จากการทำ primary culture (x 10) เจริญเต็มพื้นที่ภายใน 14 วัน



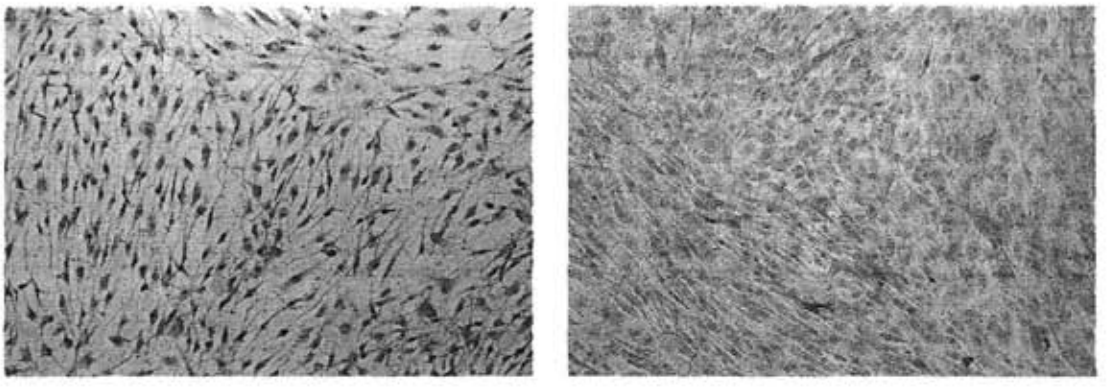
รูปที่ 2 ผลการทดสอบ alkaline phosphatase activity assay ของ human fibroblastic cells ในกลุ่มควบคุม (contr) ซึ่งไม่ได้รับ DBM และกลุ่มทดลองซึ่งได้รับ DBM ที่มีปริมาณแคลเซียมเหลืออยู่แตกต่างกันตั้งแต่ 30%, 20%, 10%, 2% และ 1% ตามลำดับ



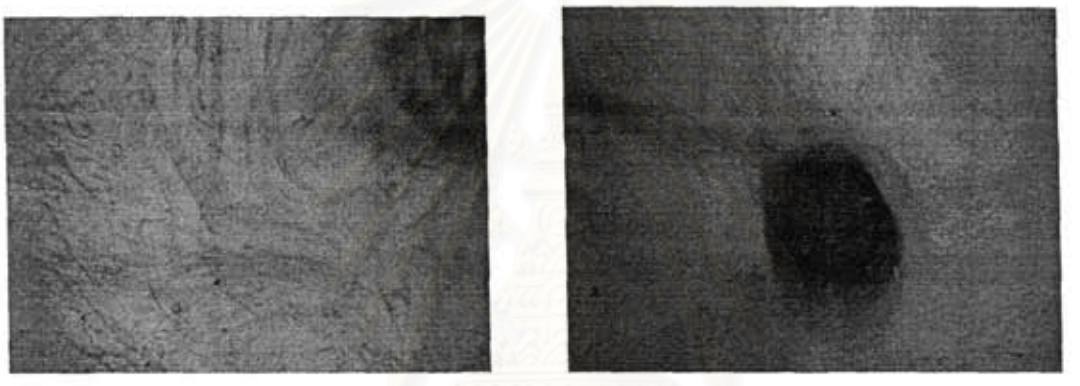
รูปที่ 3 ผลการทดสอบ Trypan blue proliferation assay ของเซลล์ human fibroblastic cells ในกลุ่มทดลองซึ่งได้รับ DBM (แท่งสีดำ) และเซลล์ในกลุ่มควบคุม (แท่งสีขาว) ซึ่งไม่ได้รับ DBM ณ วันที่ 0, 3, 5, 7 และ 10 ตามลำดับ



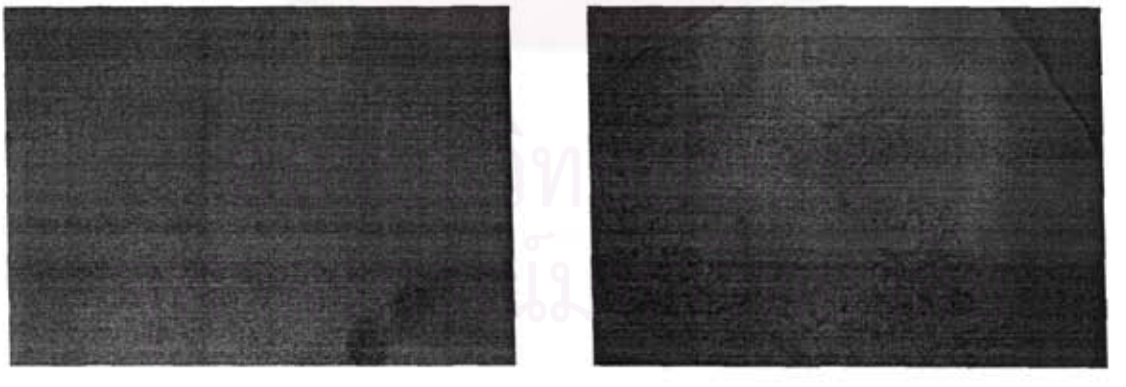
รูปที่ 4 ผลการทดสอบ alkaline phosphatase activity assay ของ human fibroblastic cells ในกลุ่มทดลองซึ่งได้รับ DBM (เส้นประ) และเซลล์ในกลุ่มควบคุม (เส้นทึบ) ซึ่งไม่ได้รับ DBM ณ วันที่ 0, 3, 5, 7 และ 10 ตามลำดับ



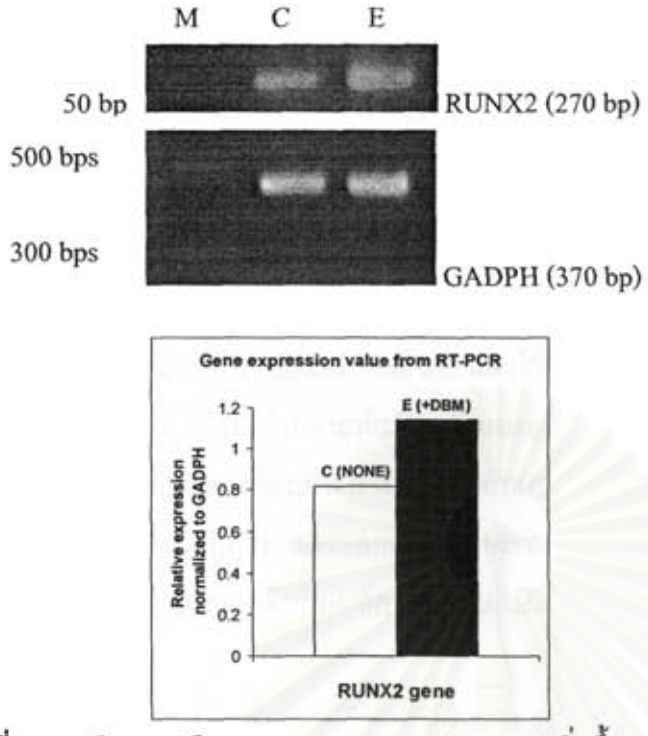
รูปที่ 5 Alkaline phosphatase staining assay (x10) **ของเซลล์** human fibroblastic cells **ใน** กลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับ DBM (ซ้าย) และในกลุ่มทดลองซึ่งได้รับ DBM (ขวา) ณ วันที่ 7



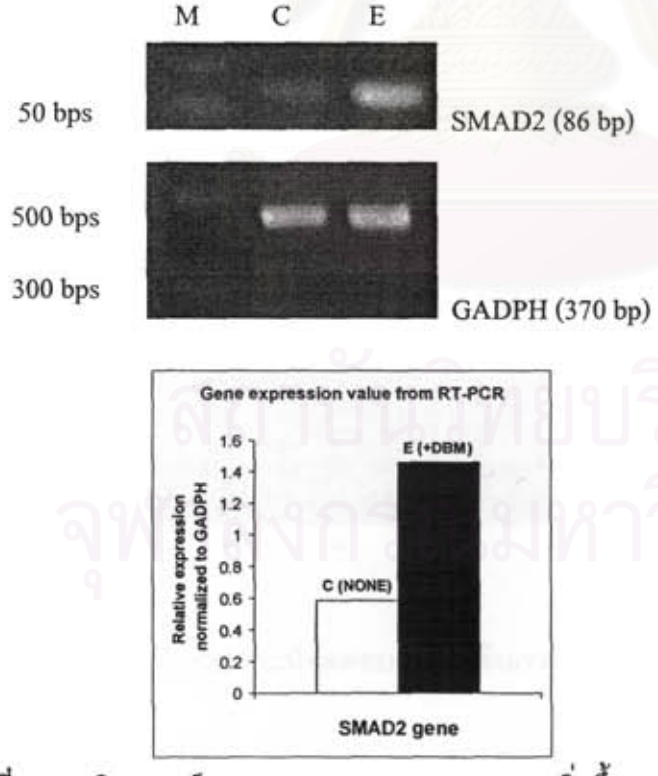
รูปที่ 6 เซลล์ที่ย้อมด้วย Von Kossa ในกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับ DBM (ซ้าย) และในกลุ่มทดลองซึ่ง ได้รับ DBM (ขวา) ในวันที่ 21



รูปที่ 7 เซลล์ที่ย้อมด้วย osteocalcin ในกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับ DBM (ซ้าย) และในกลุ่มทดลอง ซึ่งได้รับ DBM (ขวา) ในวันที่ 21



รูปที่ 8 การวิเคราะห์ RT-PCR แสดงการแสดงออกเพิ่มขึ้นของ RUNX2 โดยใช้ GADPH เป็นยีนควบคุม (M=Molecular weight marker, C=Control, E=Experiment)

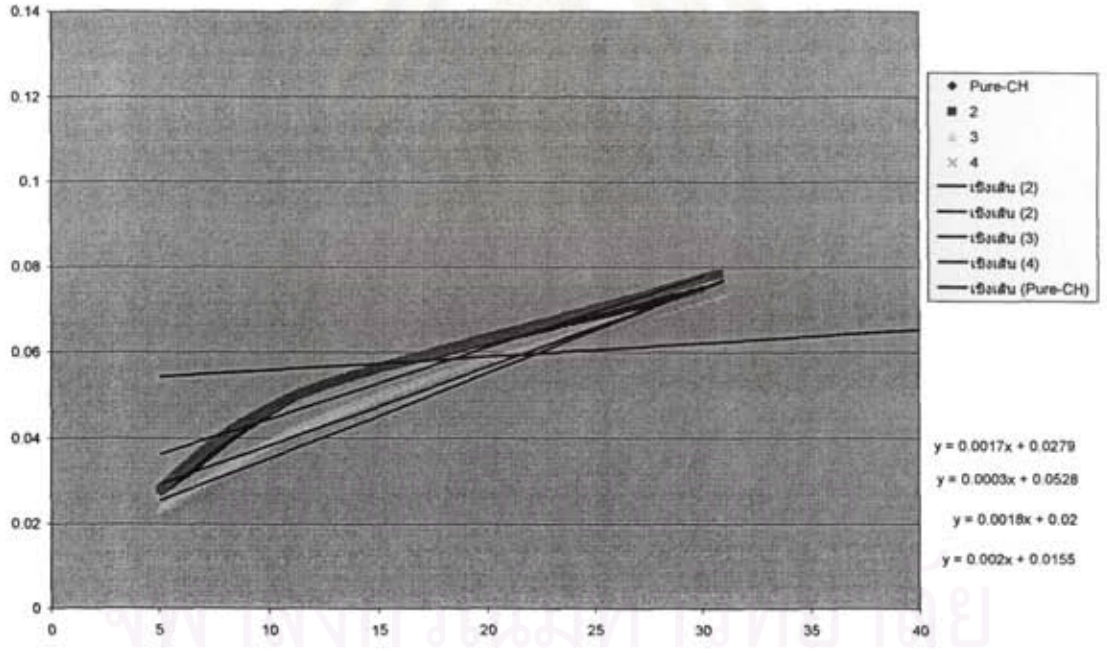


รูปที่ 9 การวิเคราะห์ RT-PCR แสดงการแสดงออกเพิ่มขึ้นของ SMAD2 โดยใช้ GADPH เป็นยีนควบคุม (M=Molecular weight marker, C=Control, E=Experiment)

เพื่อตรวจสอบและยืนยันว่ามีการเจริญเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก จึงทำการทดสอบด้วยการย้อม Von Kossa และ osteocalcin ในเซลล์กลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับ DBM และ เซลล์ในกลุ่มทดลองที่ได้รับ DBM ผลปรากฏดังรูปที่ 5 และ 6 เซลล์กลุ่มทดลองให้ผลบวกต่อการย้อมด้วย Von Kossa และ osteocalcin ในขณะที่เซลล์กลุ่มควบคุมให้ผลลบต่อการย้อมด้วยวิธีดังกล่าว

เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนในการเจริญเป็นเซลล์กระดูก (osteoblast differentiation) จึงทำการตรวจวิเคราะห์ด้วย RT–PCR analysis จากการตรวจ RT-PCR analysis โดยการเลือกยีน RUNX2, SMAD2 และใช้ GAPDH เป็นยีนควบคุม พบว่าผลที่ได้แสดงในรูปที่ 8 และ 9 เมื่อนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบระดับการแสดงออกโดยการวัดความเข้มข้นของแถบ (band) ที่ได้เปรียบเทียบกัน สามารถยืนยันผลการทดลองข้างต้นได้ดังกราฟ ปรากฏว่ายีน RUNX2 และ SMAD2 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในเซลล์กลุ่มทดลองเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม (รูปที่ 8-9) แสดงว่ามีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก

ผลของการทดสอบความแข็งแรงและความคงทนต่อแรงกดของวัสดุแสดงในรูปที่ 10



รูปที่ 10 การวิเคราะห์ทดสอบความแข็งแรงและความคงทนต่อแรงกดของวัสดุ

เมื่อทำการวัดความเค้น (stress) และความเครียด (strain) แล้วคำนวณค่า compressive modulus จากการทดสอบตรวจวัดความแข็งแรงทนทานของวัสดุที่ขึ้นรูป โดยวัดความเค้น (stress) และความเครียด (strain) ของวัสดุ โดยทำการตรวจวัดวัสดุตัวอย่างทั้งสิ้น 4 ครั้ง แสดงผลดังกราฟ (Compressive Modulus) ได้เป็น 170, 30, 180 และ 200 ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยที่ได้เท่ากับ 183.33

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

อภิปรายผลการวิจัย

จากผลการทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์ human fibroblastic cells ในกลุ่มตัวอย่างและกลุ่มควบคุม แล้วนำมาศึกษา ลักษณะรูปร่างของเซลล์ (cell morphology) และตรวจวัดตัวบ่งชี้ของเซลล์กระดูก (osteoblastic marker) โดยการย้อมด้วย alkaline phosphatase staining assay พบว่า เซลล์ที่ได้รับ demineralized bone matrix มีจำนวนเซลล์ลดลง และมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่มีลักษณะของกระดูก (osteoblast) ซึ่งสังเกตได้จากการที่ลักษณะรูปร่างของเซลล์เป็น cuboidal shape และติดสีน้ำตาลแดงของการย้อม alkaline phosphatase แสดงว่าเซลล์มีการแสดงออกของ alkaline phosphatase และมีการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูก (osteoblastic differentiation) ผลที่ได้จากการศึกษานี้ อาจจะสามารถนำเซลล์ human fibroblastic cells มาประยุกต์ใช้ในการทดสอบความสามารถในการชักนำให้เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก (osteoinductivity) ของเนื้อเยื่อกระดูก demineralized bone matrix ในหลอดทดลอง (*in vitro* cell culture assay) ได้

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเซลล์ human fibroblastic cells เมื่อนำมาเลี้ยงไว้ในน้ำเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนผสมของซีรัมปริมาณ 10% โดยปริมาตร ทำให้ได้เซลล์ซึ่งยึดติดกับจานเพาะเลี้ยงเซลล์ เซลล์เหล่านี้มีลักษณะคล้ายเซลล์ osteoblasts เมื่อนำมาเลี้ยงไว้ในจานทดลองที่ใส่ demineralized bone matrix (DBM) เมื่อทำการสังเกตรูปร่างลักษณะของเซลล์ และศึกษาการติดสีเมื่อย้อมด้วย alkaline phosphatase ทำให้สนับสนุนได้ว่า DBM สามารถชักนำเซลล์ human fibroblastic cells ให้มีการเจริญเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ osteoblasts ได้

จากผลการทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์ human fibroblastic cells ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง แล้วนำมาศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์และตรวจสอบตัวบ่งชี้ของเซลล์กระดูก โดยการย้อมด้วย alkaline phosphatase staining assay การย้อมด้วย Von Kossa และ osteocalcin เซลล์ที่ได้รับ DBM มีจำนวนเซลล์ลดลงและมีการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์กระดูก จากการย้อมแล้วให้ผลบวก แสดงว่าเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก จากผลการทดลองตรวจสอบการแสดงออกของยีน พบว่ายีน RUNX2 และ SMAD2 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในเซลล์กลุ่มทดลองที่ได้รับ DBM เปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุม จากการตรวจ RT – PCR analysis โดยการเลือกยีน RUNX2 และ SMAD2 และใช้ GAPDH เป็นยีนควบคุม พบว่าเมื่อนำผลมาวิเคราะห์เปรียบเทียบระดับการแสดงออกโดยการวัดความเข้มข้นของแถบ (band) ที่ได้เปรียบเทียบกัน สามารถยืนยันผลการทดลองได้ว่า ยีน RUNX2 และ SMAD2 มีบทบาทสำคัญ

ในกระบวนการถอดรหัสและส่งสัญญาณ signal transduction จากโปรตีนตัวรับ (receptor) และสามารถกระตุ้นให้มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกได้ในหลอดทดลอง ผลการแสดงออกของยีน RUNX2 และ SMAD2 ที่สูงขึ้นสอดคล้องกับการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าเซลล์ human fibroblastic cells สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการทดสอบความสามารถในการชักนำให้เปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูก (osteoinductivity) ของเนื้อเยื่อกระดูก DBM ในหลอดทดลองได้ในอนาคต

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาวัสดุทดแทนกระดูก ในการศึกษานี้พัฒนาวัสดุทดแทนกระดูกโดยทำเป็นผงกระดูกที่มีปริมาณแคลเซียมที่เหลืออยู่แตกต่างกัน และทดสอบผลต่อการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก พบว่าปริมาณแคลเซียมที่เหลืออยู่ในผงกระดูกประมาณ 2% มีผลกระตุ้นและชักนำ human fibroblastic cells ให้เจริญเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกได้สูงที่สุด ซึ่งตรวจสอบได้จากระดับของ alkaline phosphatase activity ในเซลล์กลุ่มที่ได้รับผงกระดูก (Demineralized bone matrix, DBM) ที่มีปริมาณแคลเซียมเหลืออยู่ 2% มีค่าสูงสุด เมื่อตรวจสอบผลของ DBM ต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์พบว่าเซลล์กลุ่มทดลองที่ได้รับ DBM มีการเพิ่มจำนวนเซลล์น้อยกว่ากลุ่มควบคุม แสดงว่าอาจเกิดกระบวนการเจริญเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก รวมทั้งลักษณะรูปร่างของเซลล์คล้ายเซลล์กระดูก

การศึกษานี้ยังได้ทำการตรวจสอบผลของเนื้อกระดูก DBM ต่อ human fibroblastic cells ในการเจริญและเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก พบว่าเซลล์มีการเจริญเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก จากการตรวจดูลักษณะรูปร่างของเซลล์ และการย้อมสีแล้วให้ผลบวกต่อ alkaline phosphatase, Von Kossa และ osteocalcin นอกจากนี้เซลล์ในกลุ่มทดลองมีการแสดงออกของยีน RUNX2 และ SMAD2 เพิ่มสูงขึ้น สรุปได้ว่าเนื้อกระดูก DBM มีผลกระตุ้นให้ human fibroblastic cells เจริญเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกได้

ข้อเสนอแนะ

ความสามารถของวัสดุทดแทนกระดูกในการกระตุ้นและชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ osteoblasts และมีส่วนช่วยให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่นี้ สามารถนำมาประยุกต์ใช้ซ่อมแซมกระดูกส่วนที่ชำรุดหายไปได้ อย่างไรก็ดียังต้องมีการศึกษาถึงความเป็นไปได้ในสัตว์ทดลอง และการนำมาประยุกต์ใช้ในการทำเนื้อเยื่อกระดูก โดยต้องทำการศึกษาทดลองในปัจจัยต่าง ๆ เช่น จำนวนของเซลล์ที่เหมาะสม สภาวะแวดล้อมที่ใช้ในการกระตุ้นให้เกิดการเจริญเติบโตและเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก เพื่อชักนำให้สร้างกระดูกใหม่ เป็น

ต้น จนกระทั่งปัจจุบันนี้ จำเป็นต้องทำการศึกษาทั้งในระดับเซลล์ทดลอง (in vitro cell culture-based bioassay) และในระดับสัตว์ทดลอง (in vivo animal-based bioassay) จึงจะสามารถนำมาช่วยในการพัฒนาและประยุกต์วัสดุทดแทนกระดูกไว้ใช้สำหรับการผ่าตัดศัลยกรรมกระดูกในอนาคต

บรรณานุกรม

1. Martin JJ, Ng KW, Nicholson GC. Baillieres Clinical endecrinology and metabolism 2nd ed. New york : Mackays of Chautham PLC Press, 1988; 1, Cell Biology in bone P. 1-29
2. Young MF, Kerr JM, Ibaraki K, Heegaard AM, Robey PG. Structure, expression and regulation of the major non collagenons matrix proteins of bone. Clin Orthop. 1992;281:275-294.
3. Stein GS, Lian JB. Molecular mechanisms mediating proliferation /differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype, Endocr Rev. 1993,14:424-442.
4. Urist MR. Surface-decalcified allogeneic bone (SDAB) implants. A preliminary report of 10 cases and 25 comparable operations with undecalcified lyophilized bone implants. Clin Orthop 1968, 56:37-50.
5. Urist MR, Nogami H, Mikulski A. A bone morphogenetic polypeptide. Calcif Tissue Res 1976;21:81-87.
6. Urist MR. Bone Morphogenetic protein, bone regeneration, heterotopic ossification and the bone-bone marrow consortium. In:Peck WA, ed. Bone and Mineral Research 16. New York:Elsevier Science Publishers. 1989;57-111.
7. Urist MR. Bone for mation by autoinduction. Science. 1965;150:893-899.
8. Reddi AH, Weintroub S, Muthukumaran N. Biologic principles of bone induction. Orthop Clin North Am. 1987;18:207-212.
9. Reddi AH. Implant-stimulated interface reactions during collagenous bone-matrix-induced boneformation. J Biomed Mater Res. 1985:19:233-239.
10. Iwata H, Sakano S, Itoh T, and Bauer TW. Demineralized bone matrix and native bone morphogenetic protein in orthopaedic surgery. Clin Orthop Relat Res. 2002
11. Michelson J and Leigh A. Use of demineralized bone matrix in hindfoot

arthrodesis. Clinical Orthopaedics and Related Research. 1996

12. Shelton W, Papendick L, and Dukes A. Autograft versus allograft anterior cruciate ligament reconstruction. Arthroscopy 1997
13. Honsawek S, Powers RM, Wolfinbarger L. Extractable bone morphogenetic protein and correlation with induced new bone formation in an in vivo assay in the athymic mouse model. Cell Tissue Bank. 2005
14. Zhang M, Powers RM Jr, Wolfinbarger L Jr. A quantitative assessment of osteoinductivity of human demineralized bone matrix. J Periodontol. 1997
15. Honsawek S, Dhitiseith D. Content of bone morphogenetic protein-4 in human demineralized bone: relationship to donor age and ability to induce new bone formation. J Med Assoc Thai. 2005;88:S260-5.
16. Han B, Tang B, Nimni ME. Quantitative and sensitive in vitro assay for osteoinductive activity of demineralized bone matrix. J Orthop Res. 2003
17. Zhang M, Powers RM Jr, Wolfinbarger L Jr. Effect(s) of the demineralization process on the osteoinductivity of demineralized bone matrix. J Periodontol. 1997

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติคณะผู้วิจัย

<u>หัวหน้าโครงการ</u>

1. ชื่อ - สกุล

   (ภาษาไทย) นายสิทธิศักดิ์ หรรษาเวก

   (ภาษาอังกฤษ) Mr Sittisak Honsawek

2. รหัสประจำตัวนักวิจัยแห่งชาติ (ถ้ามี)

   -

3. ตำแหน่งปัจจุบัน

   ผู้ช่วยศาสตราจารย์

4. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail

   ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

   ถนน พระรามสี่ กรุงเทพฯ 10330

   โทรศัพท์ 02-256-4482 โทรสาร 02-256-4482

   E-mail fmedshs@md.chula.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

	คุณวุฒิ	<u>ปี พ.ศ. ที่จบ</u>	ชื่อสถานศึกษาและประเทศ
1	แพทยศาสตรบัณฑิต	2537	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ประเทศไทย
2	Doctor of Philosophy (Biomedical Science)	2546	Old Dominion University, USA

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

   Molecular Biology, Biochemistry

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย เป็นต้น

   7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย

   -

   7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย

   7.2.1 โครงการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูกในเซลล์ต้นกำเนิดจากสายสะดือ

7.2.2 โครงการศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับ receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand/ osteoprotegerin ในซีรั่มและตัวบ่งชี้ทางชีวเคมี ในผู้ป่วยท่อน้ำดีอุดตันที่มีภาวะกระดูกพรุน

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อข้อเสนอการวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และสถานภาพในการทำวิจัย

7.3.1 โครงการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง IL-8 และการเกิดพยาธิสภาพของโรค biliary atresia (ทุนสนับสนุนพัฒนาอาจารย์ใหม่ / นักวิจัยใหม่ กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พ.ศ.2546 เป็นผู้วิจัยหลัก)

<u>ผลงานตีพิมพ์</u>

Honsawek S, Chongsrisawat V, Vejchapipat P, Thawornsuk N, Tangkijvanich P, Poovorawan Y. Serum Interleukin-8 in Children with Biliary Atresia: Relationship with Disease Stage and Biochemical Parameters. Pediatr Surg Int. 2005

7.3.2 โครงการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง Stem Cell Factor และการเกิดพยาธิสภาพของโรค biliary atresia (ทุนสนับสนุนพัฒนาอาจารย์ใหม่/นักวิจัยใหม่กองทุนรัชดาภิเษกสมโภชจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการเงิน พ.ศ.2546 เป็นผู้วิจัยหลัก)

<u>ผลงานตีพิมพ์</u>

Honsawek S, Chongsrisawat V, Vejchapipat P, Thawornsuk N, Tangkijvanich P, Poovorawan Y. Serum Stem Cell Factor in Children with Biliary Atresia Post Kasai Operation. (Manuscript in preparation)

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อข้อเสนอการวิจัย และสถานภาพในการทำวิจัย

7.4.1 การเปลี่ยนแปลงระดับ receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand/ osteoprotegerin ในซีรั่มและตัวบ่งชี้ทางชีวเคมี ในผู้ป่วยท่อน้ำดีอุดตันที่มีภาวะกระดูกพรุน (ทุนสนับสนุนอาจารย์ใหม่/นักวิจัยใหม่ สกว. พ.ศ.2548 เป็นผู้วิจัยหลัก) ขณะนี้งานดำเนินไปแล้วประมาณ 10% และจะเสร็จสมบูรณ์ในเดือน มิถุนายน 2550

ผู้ร่วมโครงการวิจัย

1. ชื่อ - สกุล

   (ภาษาไทย) พญ.วรนุช ธนากิจ

   (ภาษาอังกฤษ) Dr. Voranush Tanakit

2. รหัสประจำตัวนักวิจัยแห่งชาติ (ถ้ามี)

   -

3. ตำแหน่งปัจจุบัน

   รองศาสตราจารย์

4. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail

   ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

   ถนน พระรามสี่ กรุงเทพฯ 10330

   โทรศัพท์ 02-252-8181 โทรสาร 02-252-8181

   E-mail vopun@hotmail.com

5. ประวัติการศึกษา

	คุณวุฒิ	ปี พ.ศ. ที่จบ	ชื่อสถานศึกษาและประเทศ
1	แพทยศาสตรบัณฑิต	2535	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ประเทศไทย
2	วว.พยาธิวิทยา	2539	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ประเทศไทย

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

   พยาธิวิทยาทั่วไป

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย เป็นต้น

   7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย

   -

   7.2 ผู้ร่วมโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย

   -

   7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อข้อเสนอการวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และสถานภาพในการทำวิจัย

7.3.1 โครงการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเนื้องอกไขมันและการเกิดพยาธิ

สภาพของระบบประสาท (ผู้ร่วมวิจัย)

ผลงานตีพิมพ์

Taweevisit M, Thanakit V. Neurological deficit from metastatic low grade liposarcoma.

J Med Assoc Thai. 2005

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อข้อเสนอการวิจัย และสถานภาพในการทำวิจัย

-

ผู้ร่วมโครงการวิจัย

1. ชื่อ - สกุล

(ภาษาไทย) นพ.พงศ์ศักดิ์ ยุกตะนันทน์

(ภาษาอังกฤษ) Pongsak Yuktanangana

2. รหัสประจำตัวนักวิจัยแห่งชาติ (ถ้ามี)

-

3. ตำแหน่งปัจจุบัน

รองศาสตราจารย์

4. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail

ภาควิชาออร์โธปิดิคส์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ถนน พระรามสี่ กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-256-4510 โทรสาร 02-256-4510

E-mail fmedpyt@md.chula.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

	คุณวุฒิ	ปี พ.ศ. ที่จบ	ชื่อสถานศึกษาและประเทศ
1	แพทยศาสตรบัณฑิต	2528	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ประเทศไทย
2	วว. สาขาออร์โธปิดิคส์	2533	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ประเทศไทย

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ เวชศาสตร์การกีฬา (sport medicine), ออร์โธปิดิคส์ทางเมตาบอลิกของกระดูก

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย เป็นต้น

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย

-

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย

การวิจัยการผลิตสารเร่งกระดูก

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อข้อเสนอการวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และสถานภาพในการทำวิจัย

7.3.1 โครงการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเนื้องอกไขมันและการเกิดพยาธิ

สภาพของระบบประสาท (ผู้ร่วมวิจัย)

ผลงานตีพิมพ์

Jitapunkul S, Yuktanandana P, Parkpian V. Risk factors of hip fracture among Thai female patients. J Med Assoc Thai. 2001 Nov;84(11):1576-81

Jitapunkul S, Yuktanandana P. Consequences of hip fracture among Thai women aged 50 years and over: a prospective study. J Med Assoc Thai. 2000;83(12):1447-51.

Demont RG, Lephart SM, Giraldo JL, Giannantonio FP, Yuktanandana P, Fu FH. Comparison of two abdominal training devices with an abdominal crunch using strength and EMG measurements. J Sports Med Phys Fitness. 1999;39(3):253-8.

งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อข้อเสนอการวิจัย และสถานภาพในการทำวิจัย -

ผู้ร่วมโครงการวิจัย

1. ชื่อ - สกุล

(ภาษาไทย) นพ.ถนอม บรรณประเสริฐ

(ภาษาอังกฤษ) Dr. Thanorm Bunprasert

2. รหัสประจำตัวนักวิจัยแห่งชาติ (ถ้ามี)

-

3. ตำแหน่งปัจจุบัน

อาจารย์

4. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail
ภาควิชาโสต นาสิก ลาริงซ์วิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ถนน พระรามสี่ กรุงเทพฯ 10330
โทรศัพท์ 02-256-4103 โทรสาร 02-256-4103

5. ประวัติการศึกษา

	คุณวุฒิ	ปี พ.ศ. ที่จบ	ชื่อสถานศึกษาและประเทศ
1	แพทยศาสตรบัณฑิต	2523	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, ประเทศไทย
2	วว. โสต นาสิก ลาริงซ์วิทยา	2539	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ประเทศไทย

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
Biomaterials, Orthopaedic surgery

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย เป็นต้น

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย

-

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย

การวิจัยเนื้อเยื่อวิศวกรรม, Tissue engineering

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อข้อเสนอการวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และสถานภาพในการทำวิจัย

7.3.1 โครงการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเนื้องอกไขมันและการเกิดพยาธิ

สภาพของระบบประสาท (ผู้ร่วมวิจัย)

ผลงานตีพิมพ์

-

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อข้อเสนอการวิจัย และสถานภาพในการทำวิจัย

-