

รายงานการวิจัย

เรื่อง

การพัฒนาวีสดูทดแทนกระดูกสำหรับการผ่าตัดกระดูก
Development of Bone-Substituted Bioimplant Materials

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน
ประจำปีงบประมาณ 2552
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดย

สิทธิศักดิ์ ธรรมชาติ

มีนาคม 2553

รายงานการวิจัย

เรื่อง

การพัฒนาวัสดุทดแทนกระดูกสำหรับการผ่าตัดกระดูก
Development of Bone-Substituted Bioimplant Materials

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน
ประจำปีงบประมาณ 2552
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดย

สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก

มีนาคม 2553

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้สำเร็จเรียบร้อยด้วยดี เนื่องจากได้รับการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2552 คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย คณะวิจัยขอขอบพระคุณศูนย์วิจัย Chulalongkorn Medical Research Center (Chula MRC) ชั้น 9 และ 10 อาคารอปร รวมทั้งห้องปฏิบัติการวิจัย ภาควิชาชีวเคมี ชั้น 7 อาคารแพทยพัฒน์ และสำนักสัตว์ทดลอง ชั้น 3 อาคารพยาธิวิทยา ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ ตลอดจนเครื่องมือวัสดุอุปกรณ์สำหรับทำการศึกษาทดลองในการวิจัย

เลขหมู่

เลขทะเบียน 014684

วัน, เดือน, ปี 27 ต.ค. 53

บทคัดย่อภาษาไทย

ชื่อโครงการวิจัย: การพัฒนาวัสดุทดแทนกระดูกสำหรับการผ่าตัดกระดูก

ชื่อผู้วิจัย: สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก

เดือน และ ปี: มีนาคม 2553

บทคัดย่อ

การศึกษาวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกของลำไส้เล็กหมุ่ชั้นสับมิวโคซา (small intestinal submucosa; SIS) และเนื้อกระดูกที่ผ่านการลดปริมาณเกลือแร่ (demineralized bone matrix; DBM) โดยทำการแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก 7 วัน หลังจากทำการเพาะเลี้ยง พบเซลล์ลักษณะคล้าย fibroblasts เรียงตัวอยู่โดยรอบขึ้นเนื้อเยื่อ จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ทำการวิเคราะห์ความสามารถของ DBM และ SIS ต่อการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกด้วย tryphan blue staining assay พบว่าเซลล์ที่ได้จากเยื่อหุ้มกระดูกหลังจากกระตุ้นด้วย SIS มีการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์เพิ่มขึ้นที่ปริมาณ 5 และ 10 มิลลิกรัม และในกลุ่มที่กระตุ้นด้วย DBM หรือ SIS ผสมกับ DBM พบว่ามีการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้น (กลุ่มควบคุม) จากนั้นทำการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่บ่งชี้ถึงการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก เช่น ยีน Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) ยีน alkaline phosphates (ALP) และยีน collagen type I (COL I) เป็นต้น ด้วยวิธี RT-PCR พบว่ามีการแสดงออกของยีน RUNX2, COL I และ ALP ในกลุ่มที่กระตุ้นด้วย DBM และ DBM ผสมกับ SIS การแสดงออกของยีนด้วย cDNA array ของยีน Biglycan (BGN), Transforming growth factor, beta 1 (TGF β 1), Transforming growth factor, beta receptor 1 (TGF β R1), RUNX2 และ Vascular endothelial growth factor (VEGF) พบมีอัตราส่วนมากกว่า 2 และ Collagen, type XIV, alpha 1 (COL 14A1) พบมีอัตราส่วนที่มีค่าน้อยกว่า 0.5 ในการศึกษาความสามารถการพัฒนาเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกไปเป็นเซลล์กระดูกด้วยวิธี alkaline phosphatase assay พบว่าในกลุ่มที่กระตุ้นด้วย DBM ผสมกับ SIS มีระดับการทำงานของเอนไซม์ ALP เพิ่มสูงขึ้นกว่ากลุ่มอื่น ซึ่งสอดคล้องกับการทำ alkaline phosphatase staining ซึ่งเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นมีการย้อมติดสีแดงให้ผลบวก การวิเคราะห์ความสามารถของ DBM, SIS และ DBM ผสมกับ SIS ในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ในสัตว์ทดลอง (Wistar rat) พบว่า DBM และ DBM ผสมกับ SIS มีความสามารถในการกระตุ้นให้มีการสร้างกระดูกใหม่เกิดขึ้น ส่วนในกลุ่มที่กระตุ้นด้วย SIS พบว่าไม่มีการสร้างกระดูก

คำหลัก: กระดูกที่ผ่านการลดปริมาณเกลือแร่, การเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก, ลำไส้หมุ่ชั้นสับมิวโคซา

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Project Title: Development of Bone-Substituted Bioimplant Materials

Name of the Investigators: Sittisak Honsawek

Year: 2010

Abstracts

The objective of this research was to study osteoinductive potential of porcine small intestinal submucosa and demineralized bone matrix. We analyzed the effects of demineralized bone matrix (DBM) and porcine small intestinal submucosa (SIS) on proliferation of periosteal derived stem cells using Tryphan blue staining assay. The results showed that SIS exhibited highest proliferation at 5 and 10 mg. The cells treated with DBM or mixture (DBM + SIS) were significantly increased compared with controls ($p < 0.05$). Furthermore we analyzed gene expression of osteoblastic markers for osteoblast differentiation including runt-related transcription factor 2 (RUNX 2), collagen type I (COL I) and alkaline phosphatase (ALP) by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The results showed that the cells stimulated with DBM and mixture (DBM+SIS) highly expressed RUNX2, COL I and ALP. In addition, we analyzed gene expression by cDNA array. The result showed that the cells stimulated with DBM had ratio treatment/control more than 2 times of biglycan, Transforming growth factor, beta 1 (TGF β 1), Transforming growth factor, beta receptor 1 (TGF β R1), RUNX2 and Vascular endothelial growth factor (VEGF). And the cells had ratio treatment/control less than 0.5 time of Collagen, type XIV, alpha 1 (COL14A1). Then we studied osteoblast differentiation of periosteal derived stem cells treated with DBM, SIS and mixture (DBM + SIS) using alkaline phosphatase assay. The result showed that the cells stimulated with mixture (DBM+ SIS) had highest ALP activity. Then we analyzed osteoinductive potentials of DBM, SIS and mixture (DBM + SIS) using *in vivo* animal (Wistar rat) bioassay. The result showed that DBM and mixture (DBM+SIS) had capability to induce new bone formation whereas SIS did not exhibit such capability.

Keywords: Demineralized bone matrix, Osteoblast differentiation, Small intestinal submucosa

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	1
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	2
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	3
สารบัญ	4
สารบัญตาราง	5
สารบัญภาพ	6
บทที่ 1 บทนำ	8
- วัตถุประสงค์ของการวิจัย	13
- ขอบเขตของการวิจัย	13
- ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	14
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	15
- เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	15
- วิธีดำเนินการวิจัย	15
- การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	19
บทที่ 3 ผลการวิจัย	25
บทที่ 4 อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ	43
- อภิปรายผลการวิจัย	43
- สรุปผลการวิจัย	47
- ข้อเสนอแนะ	48

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. รายชื่อและรายละเอียดของยีนซึ่งแสดงบน osteogenesis cDNA array	20
2. ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนที่ควบคุมการแสดงออก ของยีน RUNX2, ALP, COL I และ GAPDH	24

สารบัญภาพ

ภาพประกอบที่	หน้า
1. ลักษณะของลำไส้หนู	25
2. ลักษณะของ SIS	25
3. ลักษณะของ DBM	25
4. ลักษณะเซลล์เจริญเพิ่มจำนวนเรียงตัวล้อมรอบเนื้อเยื่อหุ้มกระดูก	26
5. ลักษณะของเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อหุ้มกระดูก	26
6. แสดง 2D histogram จาก CD antigen ชนิดต่างของเซลล์ periosteal derived cells	27
7. ผลของ DBM ต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก	28
8. ผลของ SIS ต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก	29
9. ผลของ DBM ผสม SIS ต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก	30
10. การเปรียบเทียบการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก	30
11. การแสดงออกของยีน RUNX2 ในเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก	31
12. การแสดงออกของยีน ALP ในเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก	32
13. การแสดงออกของยีน COL I ในเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก	33
14. เปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มโดยใช้วิธี cDNA array	34
15. การแสดงออกของยีนในเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกด้วยวิธี cDNA array	34
16. การวิเคราะห์ RT-PCR แสดงการแสดงออกเพิ่มขึ้นของ Biglycan	35
17. การวิเคราะห์ RT-PCR แสดงการแสดงออกลดลงของ COL14A1	35
18. กราฟแสดงระดับการแสดงออกของยีน Biglycan	36
19. กราฟแสดงระดับการแสดงออกของยีน COL14A1	36
20. ผลการกระตุ้นของ DBM ต่อการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก	37
21. ผลการกระตุ้นของ SIS ต่อการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก	38
22. ผลการกระตุ้นของ DBM ผสมกับ SIS ต่อการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก	39
23. ระดับเอนไซม์ ALP หลังจากกระตุ้นด้วย DBM, SIS และ DBM ผสมกับ SIS	40
24. ผลของ DBM ต่อการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูกด้วยวิธี Alkaline phosphatase staining assay	40
25. ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์หลังจากทำการฝังด้วย SIS เป็นเวลา 6 สัปดาห์	41

- | | |
|---|----|
| 26. ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์หลังจากทำการฝังด้วย DBM เป็นเวลา 6 สัปดาห์ | 42 |
| 27. ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์หลังจากทำการฝังด้วย DBM ผสมกับ SIS
เป็นเวลา 6 สัปดาห์ | 42 |

บทนำ

ปัจจุบันโรคหรือกลุ่มอาการต่าง ๆ ของกระดูกรวมทั้งความบกพร่องของกระดูกที่เกิดจากอุบัติเหตุ มีจำนวนเพิ่มมากขึ้นทุกปี เช่น กระดูกหัก กระดูกแห้ว เนื้ออกในกระดูก กระดูกติดเชื้อจากแบคทีเรีย เชื้อรา และวัณโรค เป็นต้น ซึ่งภาวะหรือโรคนี้พบได้บ่อยอาจส่งผลให้เกิดความพิการและทุพพลภาพของผู้ป่วย และยังคงผลเสียต่อการดำรงชีวิตในหลายด้านอีกด้วย ความบกพร่องของกระดูกที่เกิดขึ้นบางกรณีต้องใช้เวลาในการรักษาและซ่อมแซมกระดูกเป็นเวลานาน เซลล์สร้างกระดูกในผู้ป่วยสามารถสร้างได้จำกัด ทำให้กระดูกใหม่ที่เกิดขึ้นอาจไม่สมบูรณ์เหมือนกับกระดูกเดิม และกระดูกอาจไม่เชื่อมติดกัน กระดูกมีความสามารถในการซ่อมแซมอย่างจำกัด รวมถึงสภาวะของผู้ป่วยไม่ว่าจะเป็น เพศ อายุ การหมดประจำเดือน การขาดฮอร์โมน ทำให้ความสามารถในการสร้างกระดูกของผู้ป่วยแต่ละคนมากน้อยต่างกัน นอกจากนี้ยังส่งผลให้เกิดเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของประชากรในประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ป่วยโรคเนื้ออกในกระดูก และผู้สูงอายุที่ป่วยเป็นโรคกระดูกติดเชื้อ ซึ่งจำเป็นต้องได้รับการผ่าตัด นำเอาส่วนของกระดูกบริเวณที่มีพยาธิสภาพออก จึงจำเป็นต้องได้รับการทดแทน และซ่อมแซมเพื่อเสริมสร้างเนื้อเยื่อกระดูกให้กลับคืนสู่สภาพปกติ ซึ่งในปัจจุบันได้มีการศึกษาค้นคว้าวิธีการรักษาความบกพร่องของกระดูก อาทิเช่น การใช้เทคโนโลยีทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก หรือแม้แต่การรักษาโดยการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อกระดูกมาใส่ทดแทนบริเวณที่มีการแห้วหรือบกพร่องของกระดูก

การรักษาในปัจจุบันนั้นมีความจำเป็นต้องได้รับชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อกระดูกมาใส่ทดแทนบริเวณที่ได้รับการผ่าตัด การปลูกถ่ายกระดูกโดยใช้ชิ้นส่วนของกระดูกจากตัวผู้ป่วยเอง ซึ่งอาจจะก่อให้เกิดภาวะแทรกซ้อน เช่น การเจ็บปวด การติดเชื้อ และการสูญเสียบริเวณ donor site รวมถึงการใช้วัสดุอื่น ๆ ได้แก่ วัสดุจากธรรมชาติ วัสดุที่ได้จากโพลิเมอร์สังเคราะห์เพื่อใช้ผลิตวัสดุทดแทน วัสดุที่ทำให้เกิดการกระตุ้นการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูก วัสดุที่มีความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก ทำให้มีการสร้างกระดูกใหม่ในบริเวณที่เกิดความภาวะผิดปกติต่าง ๆ ของกระดูก วัสดุที่ได้จากโพลิเมอร์สังเคราะห์ เช่น polyglycolic acid (PGA), polylactic acid (PLA), poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) เป็นต้น สำหรับวัสดุจากธรรมชาติ เช่น collagen, alginate, chitosan สำหรับวัสดุจากธรรมชาติ เช่น collagen, alginate, chitosan ได้มีการศึกษาถึงความสามารถในการนำมาใช้กระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดไปเป็นเซลล์ปลายทางของกระดูก โดยมีสารกระตุ้นการเจริญเปลี่ยนแปลงด้วยโปรตีน growth factors และ cytokines เช่น insulin-like growth factor (IGF), fibroblast growth factor (FGF), platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor- β (TGF- β), bone morphogenetic proteins (BMPs) เป็นต้น [1,2]

ก่อนหน้านี้ได้มีการศึกษาถึงวัสดุทดแทนกระดูก demineralized bone matrix (DBM) หรือที่รู้จักกันดีว่าเป็นเนื้อเยื่อกระดูกที่ได้ผ่านกระบวนการลดปริมาณเกลือแร่ ซึ่งเป็นวัสดุที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นให้เกิดการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิด กระตุ้นให้เกิดการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ต้นกำเนิดไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก และมีการสร้างกระดูกใหม่ ดังนั้นการนำกระดูกจากผู้บริจาคอวัยวะมาใช้เป็นวัสดุทดแทนถือเป็นทางเลือกหนึ่งของการรักษาที่สำคัญ ส่วนวัสดุที่ได้จากธรรมชาติที่หาได้ง่าย และสะดวกในการนำมาประยุกต์ใช้ ได้แก่ porcine small intestinal submucosa (SIS) ซึ่งได้จากชั้นใต้เยื่อผิวของลำไส้เล็กหมู มีองค์ประกอบเป็น คอลลาเจน ชนิดที่ 1 และชนิดที่ 3 มากกว่า 90% และมี growth factors เช่น FGF, TGF- β , epidermal growth factor (EGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), IGF-1 และ glycosaminoglycans, fibronectin, chondroitin sulfates, hyaluronic acid, heparins, heparin sulfates เป็นต้น สารดังกล่าวมีผลในการกระตุ้นให้เกิดการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิด และกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันต่ำ นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการยึดเกาะของเซลล์ และมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดไปเป็นเซลล์ปลายทางได้ [1,2] และด้วยเหตุที่ว่า SIS เป็นวัสดุธรรมชาติที่สะดวกในการนำมาศึกษาทดลองและสามารถเตรียมได้ในปริมาณมากพอต่อการนำไปใช้ในการรักษาทางคลินิกได้ รวมทั้งผลจากการศึกษาก่อนหน้าถึงคุณสมบัติของ DBM ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อกระดูกที่ได้รับการผ่านกระบวนการลดปริมาณเกลือแร่ที่อยู่ในกระดูก เช่น แคลเซียม ฟอสฟอรัส เป็นต้น แต่ยังคงมีองค์ประกอบของคอลลาเจน และโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจน (noncollagenous proteins) รวมทั้งโปรตีนต่าง ๆ เช่น growth factors และ bone morphogenetic proteins ซึ่งมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ และชักนำการเจริญเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์สร้างกระดูก และชักนำให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ อย่างไรก็ตาม พบว่าข้อมูลการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับวัสดุชีวภาพทดแทนกระดูกในประเทศไทยมีน้อยมาก แม้จะมีการนำเข้าวัสดุอุปกรณ์เหล่านี้เข้ามาในประเทศแต่ก็ยังไม่เป็นที่นิยมแพร่หลายนัก

ด้วยเหตุผลดังกล่าวมา การศึกษาวิจัยเพื่อหาวัสดุทดแทนกระดูกจากวัสดุที่มีในประเทศ เพื่อให้ได้สารทดแทนกระดูกจึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่งในประเทศไทย คณะผู้วิจัยมีแนวคิดที่จะออกแบบประดิษฐ์วัสดุทางชีวภาพทดแทนกระดูกสำหรับการผ่าตัดศัลยกรรมกระดูก เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาพัฒนาวัสดุอุปกรณ์อื่นๆ ในอนาคต โดยอาศัยการใช้วัสดุและเทคโนโลยีภายในประเทศ และมีขั้นตอนการผลิตที่ไม่ยุ่งยาก ใช้งบประมาณในการผลิตไม่มาก ซึ่งจะเป็นการนำวัสดุที่มีอยู่ภายในประเทศมาเพิ่มมูลค่า (Value added) และช่วยลดการนำเข้าวัสดุทดแทนทางการแพทย์ที่มีราคาสูงมากจากต่างประเทศ อันจะก่อให้เกิดการพัฒนาและกระตุ้นเศรษฐกิจของประเทศไทย แล้วส่งผลให้คุณภาพชีวิตความเป็นอยู่ของประชากรในประเทศดีขึ้น

เนื้อเยื่อกระดูกประกอบด้วยเซลล์กระดูกที่มีส่วนสำคัญในการสร้างและการก่อรูปของกระดูกขึ้น เซลล์กระดูกแบ่งออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่ เซลล์ชนิดที่ 1 เซลล์ osteoblasts เป็นเซลล์สร้างเนื้อกระดูกที่เจริญพัฒนามาจากเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์กระดูก (osteoprogenitor cells) ซึ่งเซลล์นี้จะอยู่ตามขอบของเนื้อกระดูก และสร้างสารประเภท extracellular matrix เรียกว่า osteoid จากนั้นเกิดการสะสมของผลึกแร่ธาตุทำให้เกิดเป็นกระดูกได้ เซลล์กระดูกมีลักษณะเป็นรูปทรงสี่เหลี่ยมคล้ายลูกเต๋ามีการเรียงตัวชิดกันเป็นแถว เซลล์ osteoblasts จะมีการ สร้างเส้นใยคอลลาเจน ชนิดที่ 1 สังเคราะห์ osteocalcin และโปรตีนที่พบในเนื้อพื้นกระดูก ที่เรียกว่า bone sialoprotein และยังพบ osteopontin กับ osteonectin ซึ่งมีส่วนช่วยในการจับกัน ของผลึกแร่ธาตุกับ collagen matrix ในการเจริญพัฒนาของเซลล์ต้นกำเนิดไปเป็นเซลล์ osteoblasts สามารถตรวจสอบได้จากเอนไซม์ alkaline phosphatase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ เซลล์ osteoblasts สร้างออกมาในช่วงที่ยังไม่มีการเจอแร่ธาตุ เซลล์ชนิดที่ 2 เซลล์ osteocytes เป็นเซลล์ที่เจริญต่อมาจาก osteoblasts ที่ได้สร้างเนื้อกระดูกจนล้อมรอบตัวเซลล์ และเป็นเซลล์กระดูกที่เจริญเต็มที่ และเซลล์ชนิดที่ 3 เซลล์ osteoclasts เป็นเซลล์ขนาดใหญ่ที่มีหลายนิวเคลียสและเจริญมาจาก monocyte stem cells เป็นเซลล์ซึ่งมีหน้าที่สำคัญในกระบวนการปรับแต่งกระดูก (bone remodeling)[3]

กระบวนการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกมีการแสดงออกของยีนตามลำดับ โดยในช่วงแรกจะมีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต เช่น c-myc และ c-fos ช่วงต่อมาเซลล์มีการสร้าง osteoid matrix, collagen type I, fibronectin และ growth factors บางชนิดที่เกี่ยวข้อง ซึ่งในขณะที่เซลล์สร้างกระดูกเจริญไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกที่เติบโตเต็มที่จะมีการสังเคราะห์โปรตีนของเซลล์เปลี่ยนแปลงไปซึ่งจะสังเคราะห์ collagen type I, alkaline phosphatase, bone sialoprotein และ osteocalcin เป็นต้น [4]

เซลล์ต้นกำเนิดเนื้อประสาน (mesenchymal stem cells; MSCs) เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ได้มาก และเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์เนื้อประสานต่าง ๆ หลังจากที่ได้รับสิ่งกระตุ้น แหล่งที่สำคัญของ MSCs คือ ไขกระดูก นอกจากนี้ยังได้จากเนื้อเยื่อไขมัน เยื่อหุ้มกระดูก (periosteum) กล้ามเนื้อ กระดูกอ่อน เป็นต้น MSCs เป็นเซลล์ที่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนได้ง่าย ได้มีการศึกษาโดย Frieden Stein ในปี ค.ศ. 1966 พบว่า MSCs เป็นเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์ fibroblasts ซึ่งมีความสามารถในการยึดเกาะกับพื้นวัสดุเพาะเลี้ยง และสามารถเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ปลายทาง เช่น กระดูก กระดูกอ่อน ไขมัน กล้ามเนื้อ เอ็น เป็นต้น การกระตุ้นจากสิ่งกระตุ้นโปรตีนที่หลังจากเซลล์ต่าง ๆ เช่น TGF- β (transforming growth factor- β เป็น growth factor ชนิดหนึ่งที่สามารถกระตุ้นการเจริญเพิ่มจำนวน mesenchymal cells ของกระดูก สามารถกระตุ้นให้เซลล์ preosteoblasts แบ่งตัวเพิ่มจำนวน สร้างคอลลาเจนในกระดูก และยับยั้งการสลายตัวของกระดูก bone

morphogenetic proteins (BMPs) เป็นโปรตีนที่จัดอยู่ในกลุ่ม TGF- β มีหน้าที่ควบคุมการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ปลายทางได้ สามารถชักนำให้เกิดการเจริญเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ต้นกำเนิดไปเป็นเซลล์ในสายเซลล์กระดูก และสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกได้ [3]

วัสดุทดแทนกระดูก DBM เป็นวัสดุจากกระดูกที่ได้รับการผ่านขั้นตอนการลดปริมาณเกลือแร่ที่อยู่ในกระดูก เช่น แคลเซียม และฟอสฟอรัส แต่ยังคงเหลือองค์ประกอบที่สำคัญของ collagen และ noncollagen อีกทั้งโปรตีน เช่น bone morphogenetic proteins และ growth factors [5] ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญต่อการชักนำให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ DBM นี้สามารถนำมาใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่มีความจำเป็นต้องได้รับชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อกระดูกมาใส่ทดแทนบริเวณที่ได้รับการผ่าตัด เพื่อเสริมสร้างเนื้อเยื่อกระดูกให้กลับคืนสู่สภาพปกติ DBM นี้สามารถพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ที่สำคัญในการรักษาผู้ป่วย วัสดุทางชีวภาพทดแทนกระดูกทางการแพทย์ DBM สามารถประดิษฐ์และผลิตขึ้นได้ในลักษณะรูปแบบต่างๆ เช่น รูปแบบที่เป็นผง (powder) ชิ้นส่วนเล็กๆ (chip) รูปแบบที่เป็นลูกเต๋า (cube) เม็ดขนาดต่างๆ (pellet) หรือ เส้นใย (fiber) นอกจากนี้ สามารถนำมาผสมกับสารตัวกลาง (carrier) ทำให้มีลักษณะคล้ายกับเจล (gel) หรือ คล้ายยาสีฟัน (paste) และสามารถปั้นเป็นรูปต่างๆ ตามต้องการได้ (pliable and moldable) การใช้วัสดุทดแทนประเภทนี้เป็นที่ยอมรับและใช้กันอย่างแพร่หลายในวงการแพทย์ ด้วยเหตุผลที่ว่า DBM มีคุณสมบัติเป็นโครงร่างเพื่อให้เซลล์กระดูกเจริญเพิ่มจำนวน (osteoconduction) และมีโปรตีนชักนำเซลล์กระดูกให้เปลี่ยนแปลงเพิ่มจำนวนในบริเวณโครงร่างดังกล่าว (osteoinduction) เพื่อสร้างกระดูกใหม่ตามธรรมชาติ [6,7] ดังนั้นจึงทำให้กระดูกเจริญและสมานเชื่อมติดกันได้ตามปกติ รวมทั้งลดโอกาสการเกิดปฏิกิริยาต่อต้านเนื้อเยื่อแปลกปลอม (graft rejection) ในการนำ DBM มาใช้เป็นวัสดุทดแทนนั้นมีข้อดีและเหมาะสมกว่า เพราะมีองค์ประกอบและสภาพเหมือนกันกับเนื้อเยื่อของคน และสามารถชักนำให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ได้ เป็นที่ทราบกันดีว่าคุณสมบัติการชักนำเพื่อสร้างกระดูกใหม่ของ DBM นั้นหลากหลายแตกต่างกันตามขั้นตอน วิธีการผลิต การเก็บรักษา และขึ้นอยู่กับคุณภาพและปริมาณของโปรตีนชักนำให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ [8,9] จากการศึกษาของคณะผู้วิจัยพบว่าโปรตีนชักนำให้เกิดการสร้างกระดูกซึ่งสามารถตรวจสอบได้ [10] และพบว่ามีความสัมพันธ์กันกับการชักนำสร้างกระดูกในหนูทดลอง [11] จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการศึกษาวิจัยถึงวัสดุสังเคราะห์ชีวภาพดังกล่าว โดยการทดสอบในหลอดทดลอง และในสัตว์ทดลองก่อนที่จะนำมาใช้ในคนเพื่อทดสอบประสิทธิภาพและความปลอดภัยของวัสดุที่นำมาใช้ทดแทนกระดูก

การศึกษาของ Zhang และคณะ ในปี ค.ศ. 1997 ทำการศึกษาใน in vivo (หนูทดลอง athymic mice) และใน in vitro (human periosteal cells) เพื่อวิเคราะห์ปริมาณความสามารถในการชักนำการสร้างกระดูกของ DBM โดยทำการฝัง DBM ในชั้นกล้ามเนื้อของหนู พบว่ามีการกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูก (osteoinductive) มากกว่าการฝังที่ได้ผิวหนัง และการสร้างกระดูกใหม่ในกลุ่มที่ฝังในชั้นกล้ามเนื้อ

มีการสร้างกระดูกใหม่ในระหว่างสัปดาห์ที่ 1-4 และไม่มีความแตกต่างทางสถิติของน้ำหนัก ในสัปดาห์ที่ 5 พบว่า เริ่มมีการเพิ่มขึ้นของวัสดุที่เอาออกมา แสดงให้เห็นว่าในช่วงนี้มีการสะสมแคลเซียมเพิ่มขึ้น จากนั้นทำการฝังวัสดุในปริมาณที่แตกต่างกัน เพื่อศึกษาถึงผลการตอบสนองของความเข้มข้นของวัสดุที่ใช้แตกต่างกัน พบว่าใน *in vivo* ที่ 20 มิลลิกรัม ของ DBM มีการตอบสนองดีที่สุด ส่วนการศึกษาใน *in vitro* วิเคราะห์ด้วย alkaline phosphatase activity ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ของ osteoblasts พบว่าในวันที่ 5 หลังเติม DBM มีระดับการทำงานของเอนไซม์สูงสุด และในการศึกษาปริมาณของ DBM ที่แตกต่างกัน พบว่า ปริมาณ 5 และ 10 มิลลิกรัม ของ DBM มีระดับ alkaline phosphatase activity มากที่สุด ซึ่งความสัมพันธ์ระหว่างการศึกษาใน *in vivo* กับ ใน *in vitro* พบว่าใน *in vitro* ปริมาณ DBM ที่ใช้มีผลต่อความสามารถในการเป็นสารกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูก (osteoinductivity) ของ DBM [11] รายงานก่อนหน้านี้เกี่ยวกับ DBM โดย Gao J และคณะ ในปี ค.ศ. 2004 ซึ่งได้ทำการศึกษาศามารถของ allogeneic demineralized bone matrix ต่อ resurface osteochondral defect ในกระต่าย โดยจากการสันนิษฐานถึง intrinsic cytokines ใน DBM จะชักนำให้เซลล์เจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์สายพันธุ์ osteochondrogenic จาก bone marrow และทำหน้าที่ซ่อมแซม osteochondral defect ได้ ซึ่งทดสอบโดยการเลี้ยง bone marrow-derived mesenchymal stem cells ลงบนโครงร่างวัสดุ demineralized trabecular bone matrix แล้วเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน พบว่าเซลล์เกาะกับโครงร่างวัสดุ และเจริญอยู่ใน demineralized trabecular bone matrix จากนั้นจึงนำไปฝังลงในบริเวณ osteochondral defect ของกระต่ายเป็นเวลา 6-12 สัปดาห์ พบว่ามีการซ่อมแซมบริเวณที่กระดูกบกพร่องมากถึง 95% ส่วนการใช้ demineralized cortical bone matrix พบว่า มี subchondrol bone และชั้นบนสุดพบมีกระดูกอ่อน (cartilage) เรียงและแทรกอยู่ แต่ส่วนมากจากการซ่อมแซมโดยใช้ demineralized trabecular bone matrix จะพบ fibril ที่พื้นผิวและไม่มีการแทรกตัวของกระดูกอ่อน ซึ่งจากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า demineralized cortical bone matrix อาจจะมีคุณสมบัติในการซ่อมแซม osteochondral defect ได้ [12]

Small intestinal submucosa (SIS) ซึ่งได้มาจากลำไส้เล็กของหนูชั้น submucosa โดยการลอกเอาชั้น tunica serosa และ tunica muscularis ออก SIS มีองค์ประกอบเป็นคอลลาเจน ชนิดที่ 1 และชนิดที่ 3 มากกว่า 90% และยังพบคอลลาเจน ชนิดที่ 5 จำนวนเล็กน้อย [13] นอกจากนี้ใน SIS ยังมีโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ กระตุ้นการเจริญเปลี่ยนแปลงของเซลล์ได้ ซึ่งโปรตีนดังกล่าวเป็นสารประเภทไซโตไคน์ (cytokines) เช่น FGF, TGF- β , epidermal growth factor (EGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) และ IGF-1 เป็นต้น ซึ่งมีผลทำให้มีการกระตุ้นการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดได้ รวมทั้ง SIS กระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันได้น้อย มีคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการยึดเกาะของเซลล์ และมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการเจริญเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดได้ [1, 2] Zhao Lin และคณะ ได้ทำการศึกษา tissue-engineer membrane เลียนแบบ

เยื่อหุ้มกระดูก (periosteum) ที่เตรียมใน *in vitro* เพื่อทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกชั้นใหม่ โดยใช้ porcine SIS เป็น scaffold ในการเพาะเลี้ยง MSCs ซึ่งในงานวิจัยนี้ทำให้เกิด bone defect เพื่อตรวจสอบความสามารถในการกระตุ้นการสร้างเนื้อเยื่อกระดูก พบว่า tissue-engineer membrane นี้มีความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกได้ [14] Suckow และคณะ ในปี 1999 ได้ทำการศึกษาความสามารถของ SIS ต่อการเจริญของกระดูกที่เกิดความบกพร่องของกระดูกยาวใน Sprague-Dawley rat เนื่องจาก SIS เป็นวัสดุที่นำมาใช้ศึกษาทดลองได้ง่าย โดยนำมาใช้ในการทดลองทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ในการศึกษานี้ได้ทำการฝัง SIS, demineralized cortical bone หรือ ovalbumin เข้าไปยังบริเวณกระดูกที่บกพร่อง แล้วดูการเจริญพัฒนาของกระดูกที่บกพร่องในสัปดาห์ที่ 3, 6, 12 และ 24 ผลที่ได้จากการศึกษาพบว่า หลังจากที่ได้ฝัง SIS หรือ demineralized cortical bone นาน 3 สัปดาห์ ลักษณะที่เกิดขึ้นนั้นเกิดจากมีการแทรกตัวของ mononuclear cells แล้วยัง พบว่ามีเนื้อเยื่อเกิดขึ้นใหม่ใน 3 สัปดาห์แรกพบมีกระดูกอ่อนเกิดขึ้น และ 6 สัปดาห์ พบมีการสร้างกระดูกในหนูที่ถูกฝังด้วย SIS [15]

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ

1. เพื่อศึกษาความสามารถในการชักนำและกระตุ้นให้เซลล์ต้นกำเนิดมีการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูกในหลอดทดลอง
2. เพื่อตรวจสอบผลของวัสดุต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์เพาะเลี้ยง และศึกษาการแสดงออกของยีนที่บ่งชี้ในการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูก
3. เพื่อทดสอบความสามารถในการชักนำและเสริมสร้างให้เซลล์ที่ได้รับวัสดุเนื้อเยื่อกระดูก DBM ผสมอยู่กับสารจากเยื่อบุลำไส้หมู SIS มีการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูกและสร้างกระดูกใหม่ในสัตว์ทดลอง

ขอบเขตของการวิจัย

ผลิตวัสดุชีวภาพทดแทนกระดูกสำหรับใช้ทดลองในเซลล์เพาะเลี้ยง (*in vitro*) ศึกษาการแสดงออกของยีนในขณะเจริญไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก และการชักนำให้มีการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูกในหลอดทดลอง และศึกษาความสามารถของ DBM และ SIS ในการชักนำให้มีการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์สร้างกระดูกและสร้างกระดูกใหม่ในสัตว์ทดลอง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ทราบถึงความสามารถของเซลล์ต้นกำเนิด (mesenchymal stem cell) ในการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูกเมื่อได้รับสารเหนี่ยวนำจาก DBM และจากเยื่อบุลำไส้หนู (SIS)
2. ได้ทราบการแสดงออกระดับยีนของเซลล์ต้นกำเนิด (mesenchymal stem cell) ในการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูกเมื่อได้รับสารเหนี่ยวนำจาก DBM และจากเยื่อบุลำไส้หนู (SIS)
3. ได้ทราบถึงศักยภาพของ DBM และจากเยื่อบุลำไส้หนู (SIS) ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ โดยวิธี cell-based bioassay
4. ได้ทราบถึงความสามารถของ DBM และจากเยื่อบุลำไส้หนู (SIS) ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ โดยการตรวจสอบในสัตว์ทดลอง

วิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

CO₂ cell culture incubator, centrifuge, micro centrifuge high speed, laminar flow hood, ultrasonic, multiskan EX, water bath, thermocycler, spectrophotometer, electrophoresis chamber set

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียม demineralized bone matrix

นำกระดูกตัดให้มีชิ้นขนาดประมาณ 1 นิ้ว แล้วนำชิ้นกระดูกที่ได้มาทำความสะอาด จากนั้นนำชิ้นกระดูกที่ได้ทำให้แห้งด้วยความเย็น (lyophilization) โดยนำเข้าเครื่อง freeze drier นำกระดูกที่ได้ไปบดเป็นผงแล้วทำการคัดกรองขนาด จากนั้นทำการลดปริมาณเกลือแร่ของเนื้อเยื่อกระดูกด้วยสารละลาย HCl ซึ่งจะทำให้การเปลี่ยนสารละลาย HCl ใหม่ โดยทำการเปลี่ยนทุก ๆ ชั่วโมง จนครบ 8 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการล้างผงกระดูกด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำ DBM ที่ได้ทำให้แห้งโดยการทำ lyophilization (รูปที่ 1) และนำส่วนหนึ่งมาทำการศึกษาเพื่อหาปริมาณแคลเซียม (calcium assay) โดยตรวจวัดปริมาณแคลเซียมที่เหลืออยู่ด้วย calcium reagent Arsenazo III (DBM ที่นำมาใช้ในการวิจัย ต้องมีปริมาณแคลเซียมที่เหลืออยู่ไม่เกิน 3% ของปริมาณแคลเซียมทั้งหมดที่มี) และก่อนที่จะนำ DBM ไปใช้ต้องผ่านกระบวนการปราศจากเชื้อ (sterilization) โดยการอบ ethylene oxide gas

2. การเตรียม small intestinal submucosa (SIS)

นำลำไส้เล็กของหนูสดที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์ล้างทำความสะอาด และตัดให้เป็นชิ้นขนาดประมาณ 3 นิ้ว จากนั้นทำการลอกชั้น muscularis externa ชั้น serosa และชั้น mucosa ออกเพื่อให้เหลือแต่ชั้น submucosa ของลำไส้หนูเท่านั้น แล้วนำไปแช่ด้วย 70% ethanol นำชิ้นที่ได้แช่ในน้ำ sterile cold deionized water ที่มี antibiotic (penicillin + streptomycin 200 หน่วย/มิลลิลิตร) (รูปที่ 2) แล้วนำมาเข้าเครื่องบดปั่น (grinder mill) ให้ละเอียด จากนั้นนำมาแช่ใน 3% acetic acid ผสมกับ 0.1% pepsin และล้างกรดออกให้หมดด้วยน้ำกลั่น หรือ phosphate buffer saline แล้วนำไปทำ lyophilization นำ SIS ที่ได้เก็บที่อุณหภูมิ -80°C (รูปที่ 3) ก่อนที่จะนำไปใช้ได้ผ่านกระบวนการปราศจากเชื้อ (sterilization) โดยการอบด้วย ethylene oxide gas

3. การแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก (periosteum)

นำเยื่อหุ้มกระดูกมาทำ primary culture โดยวิธี outgrowth technique และทำการเพิ่มจำนวนเซลล์ที่ได้

4. การตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

4.1 การวิเคราะห์ Cell Surface marker (CD antigen) ของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกด้วยเทคนิค flow cytometry

ทำการรวบรวมเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมาแล้วประมาณ passage ที่ 2 - 3 ด้วยวิธี trypsinization ปั่นล้างเซลล์ด้วย PBS ที่มีส่วนผสมของ sodium azide และ BSA และทำการแบ่งเซลล์ลง 15 ml centrifuge tube ให้ได้หลอดละประมาณ 500,000 เซลล์ โดยใช้เซลล์หนึ่งหลอดต่อการทดสอบ CD antigen หนึ่งชนิด และมีอีกหนึ่งหลอดที่ไม่ทำการย้อมด้วย antibodies ใดๆ ให้เป็น negative control จากนั้นนำ CD marker antibodies แต่ละตัว (CD29, CD34, CD44, CD45, CD90, CD 105) มา incubate ในที่มืด แช่ในน้ำแข็งประมาณ 20 นาที จากนั้นนำมาล้างใน PBS จำนวน 2 รอบ แล้วทำการ fix เซลล์ใน PBS ที่มีส่วนผสมของ 0.5% formaldehyde เป็นเวลา 5 นาทีในที่มืด จากนั้นจึงนำเข้าเครื่อง BD FACSCalibur เพื่อวิเคราะห์การแสดงออกของ CD antigen บนผิวเซลล์ต่อไป แล้วทำการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ด้วยโปรแกรม BD CellQuest Pro Software

4.2 การศึกษาการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก

นำเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกมากระตุ้นด้วยสารกระตุ้นที่แตกต่างกัน ดังนี้

- | | |
|---------------|--|
| กลุ่มตัวอย่าง | - กระตุ้นด้วย SIS 5, 10, 20 มิลลิกรัม/flask |
| | - กระตุ้นด้วย DBM 5 มิลลิกรัม/flask |
| | - กระตุ้นด้วย DBM 2.5 มิลลิกรัม/flask ผสมกับ SIS 2.5 มิลลิกรัม/flask |
| กลุ่มควบคุม | - ไม่ได้รับการกระตุ้น |

แล้วทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3, 5, 7 และ 10 วัน จากนั้นทำการวิเคราะห์การเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก ซึ่งวิเคราะห์จากจำนวนเซลล์ด้วยวิธี trypan blue staining assay (เซลล์ที่มีชีวิตอยู่จะไม่ติดสีย้อมของ trypan blue ส่วนเซลล์ที่ตายจะติดสีย้อมของ trypan blue เป็นสีน้ำเงิน)

การคำนวณจำนวนเซลล์

จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต = ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ที่ไม่ติดสี $\times 10^4 \times$ dilution factor
 10^4 คือ ปริมาตรต่อหนึ่ง square

4.3 การศึกษาผลของ DBM และ SIS ต่อการเกิด osteoblast differentiation โดยการแสดงออกของยีนที่บ่งชี้ถึงการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูก

4.3.1 ศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis โดยทำการแบ่งเป็นกลุ่ม ดังนี้

- กระตุ้นด้วย SIS 5 มิลลิกรัม
- กระตุ้นด้วย DBM 5 มิลลิกรัม
- กระตุ้นด้วย SIS ผสมกับ DBM อย่างละ 2.5 มิลลิกรัม
- กลุ่มควบคุม (ไม่ได้รับการกระตุ้น)

ทำการกระตุ้นเป็นเวลา 0, 3, 5, 7 และ 10 วัน

4.3.2 การสกัด RNA

ทำการสกัด RNA จากเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกด้วย RNA isolation RNeasy Mini kit (Qiagen) จากนั้นทำการวิเคราะห์ความเข้มข้น RNA ที่ได้ด้วย spectrophotometer

4.3.3 การตรวจวิเคราะห์ด้วย osteogenic cDNA array analysis

จากการทดลองแยกสกัด RNA ของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก ในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับ DBM และกลุ่มทดลองที่ได้รับ DBM เป็นเวลา 7 วัน แล้วทำการแยกสกัด RNA นำ total RNA ที่แยกสกัดได้มาทำการเปลี่ยนเป็น cDNA ซึ่งติดฉลากด้วย biotin จากนั้นทำการ hybridization เข้ากับ cDNA array เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนใดที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างกระดูกบน human osteogenesis gene arrays ซึ่งมีจำนวน 96 ยีน จากการวิเคราะห์ภาพที่ได้โดยอาศัยโปรแกรม ScanAlyze ภาพที่ได้จากการวางเทียบกับจุดตำแหน่งบน array และวิเคราะห์แต่ละจุดบน array ทำโดยการวัดความเข้มโดยปรับเทียบค่าพื้นหลังของแผ่น array แล้วนำมาหาค่าอัตราส่วนความเข้มของแต่ละจุดของแต่ละยีน โดยเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุม อัตราส่วนที่มีค่ามากกว่า 2 แปลผลว่ามีการแสดงออกเพิ่มขึ้น (up-regulation) อัตราส่วนที่มีค่าน้อยกว่า 0.5 แปลผลว่ามีการแสดงออกลดลง (down-regulation) ตารางที่ 1 แสดงชื่อ หมายเลข และรายละเอียดของยีนแต่ละยีนที่อยู่บนแผ่น cDNA array ในแผ่น cDNA array นี้มียีน PUC18 เป็นตัวควบคุมเชิงลบ (negative control) และยีน GAPDH, cyclophilin A, RPL13A และ β -actin เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) ซึ่งนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยและเทียบค่าพื้นฐานให้เท่ากัน

4.3.5 การตรวจพิสูจน์ผลการศึกษาค้นคว้าการแสดงออกของยีน cDNA array

ทำการตรวจพิสูจน์การแสดงผลการศึกษาค้นคว้าการแสดงออกของยีน cDNA array ด้วยวิธี RT-PCR analysis โดยใช้ RNA ของเซลล์กลุ่มควบคุม และเซลล์กลุ่มทดลอง เช่นเดียวกับที่ใช้ศึกษาด้วยวิธี cDNA array แล้วทำการตรวจยืนยันด้วย RT-PCR analysis โดยการเลือกยีน biglycan สำหรับยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น และยีน collagen 14A1 สำหรับยีนที่มีการแสดงออกลดลง และใช้ GAPDH เป็นยีนควบคุม

4.3.6 การสังเคราะห์ cDNA ของยีน osteoblastic marker ด้วยวิธี RT-PCR

โดยใช้ RNA ที่สกัดได้จากเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ cDNA และใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนที่ควบคุมการแสดงออกของ alkaline phosphatase (ALP), Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) และ collagen type I (COL I)

4.4 การศึกษาผลของ DBM และ SIS ต่อการเกิด osteoblast differentiation ด้วยวิธี alkaline phosphatase assay

4.4.1 ทำการศึกษาผลของ DBM, SIS และ DBM ผสมกับ SIS ต่อการเกิด osteoblast differentiation ของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก โดยแบ่งเป็นกลุ่มจากการกระตุ้น ดังนี้

- กระตุ้นด้วย SIS 5 มิลลิกรัม/flask
- กระตุ้นด้วย DBM 5 มิลลิกรัม/flask
- กระตุ้นด้วย DBM 2.5 มิลลิกรัม/flask ผสมกับ SIS 2.5 มิลลิกรัม/flask
- กลุ่มควบคุม (ไม่ได้รับการกระตุ้น)

เป็นเวลา 0, 3, 5, 7 และ 10 วัน จากนั้นทำการคำนวณวิเคราะห์ระดับการทำงานของ alkaline phosphatase โดยเปรียบเทียบกับปริมาณโปรตีนทั้งหมดของเซลล์

4.5 การศึกษาผลของ DBM osteoblast differentiation ด้วยวิธี alkaline phosphatase staining assay

การทดลองนี้ต้องการทดสอบการแสดงผลการศึกษาค้นคว้าการแสดงออกของ alkaline phosphatase ระหว่างเซลล์ที่ไม่ได้รับ DBM และเซลล์ที่ได้รับ DBM โดยวิธี alkaline phosphatase staining assay ซึ่งทำได้โดยเซลล์จะถูก fix ด้วย formaldehyde/methanol แล้วทำการย้อมด้วย propandiol solution ที่มี 1-naphthyl phosphate sodium salt เป็นสารตั้งต้น และ variamine blue B salt เป็นสารย้อม ปฏิกริยาที่ได้ผลลบต่อ alkaline phosphatase staining assay เซลล์จะติดสีน้ำเงินเข้ม

แสดงว่าไม่มี osteoblastic differentiation ปฏิกริยาที่ได้ผลบวกต่อ alkaline phosphatase staining เซลล์จะติดสีม่วงแดง แสดงว่ามีการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูก

4.6 การศึกษาการกระตุ้นให้เกิด new bone formation ของ DBM, SIS และ DBM ผสมกับ SIS ในสัตว์ทดลอง

ทำการศึกษาความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ในหนูทดลอง โดยทำการแบ่งเป็นกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลองที่ทำการฝัง ดังนี้

- | | |
|-------------|--|
| กลุ่มควบคุม | - Gel foam® |
| กลุ่มทดลอง | - กระตุ้นด้วย SIS 20 มิลลิกรัม |
| | - กระตุ้นด้วย DBM 20 มิลลิกรัม |
| | - กระตุ้นด้วย DBM 10 มิลลิกรัม ผสมกับ SIS 10 มิลลิกรัม |

โดยทำการฝังสารตัวอย่างลงในชั้นกล้ามเนื้อเป็นเวลา 6 สัปดาห์ หลังจากครบกำหนดเวลา ทำการเก็บเนื้อเยื่อส่วนกล้ามเนื้อรอบ ๆ บริเวณที่ทำการฝังสารตัวอย่าง แล้วนำชิ้นเนื้อเนื้อมาทำการวิเคราะห์ โดยทำการย้อมสีย้อม hematoxylin & eosin เพื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณของกระดูกที่สร้างขึ้นใหม่

การวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการเก็บรวบรวมข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในแต่ละกลุ่ม นำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) นำข้อมูลที่ได้จากการศึกษามาใช้ในการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลอง ได้แก่ unpaired t-test หรือ Chi-square tests โดยจะถือว่าความแตกต่างนั้นมีนัยสำคัญทางสถิติก็ต่อเมื่อ $p < 0.05$

ตารางที่ 1 รายชื่อและรายละเอียดของยีนซึ่งแสดงบน osteogenesis cDNA array

No.	GeneBank	Symbol	Description
1	NM_000478	ALPL	Alkaline phosphatase, liver/bone/kidney
2	NM_001154	ANXA5	Annexin A5
3	NM_000047	ARSE	Arylsulfatase E (chondrodysplasia punctata 1)
4	NM_199173	BGLAP	Bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein (osteocalcin)
5	NM_001711	BGN	Biglycan
6	NM_006129	BMP1	Bone morphogenetic protein 1
7	NM_001200	BMP2	Bone morphogenetic protein 2
8	NM_001201	BMP3	Bone morphogenetic protein 3 (osteogenic)
9	NM_130851	BMP4	Bone morphogenetic protein 4
10	NM_021073	BMP5	Bone morphogenetic protein 5
11	NM_001718	BMP6	Bone morphogenetic protein 6
12	NM_001719	BMP7	Bone morphogenetic protein 7 (osteogenic protein 1)
13	NM_001720	BMP8B	Bone morphogenetic protein 8b (osteogenic protein 2)
14	NM_004329	BMPRI1A	Bone morphogenetic protein receptor, type IA
15	NM_000388	CASR	Calcium-sensing receptor (hypocalciuric hypercalcemia 1, severe neonatal hyperparathyroidism)
16	NM_000072	CD36	CD36 antigen (collagen type I receptor, thrombospondin receptor)
17	NM_005505	SCARB1	Scavenger receptor class B, member 1
18	NM_015659	RSL1D1	Ribosomal L1 domain containing 1
19	NM_000493	COL10A1	Collagen, type X, alpha 1 (Schmid metaphyseal chondrodysplasia)
20	NM_080629	COL11A1	Collagen, type XI, alpha 1
21	NM_004370	COL12A1	Collagen, type XII, alpha 1
22	NM_021110	COL14A1	Collagen, type XIV, alpha 1 (undulin)
23	NM_001855	COL15A1	Collagen, type XV, alpha 1
24	NM_001856	COL16A1	Collagen, type XVI, alpha 1

No.	GeneBank	Symbol	Description
25	NM_000494	COL17A1	Collagen, type XVII, alpha 1
27	NM_001858	COL19A1	Collagen, type XIX, alpha 1
28	NM_000088	COL1A1	Collagen, type I, alpha 1
29	NM_001844	COL2A1	Collagen, type II, alpha 1 (primary osteoarthritis, spondyloepiphyseal dysplasia)
30	NM_000090	COL3A1	Collagen, type III, alpha 1 (Ehlers-Danlos syndrome type IV, autosomal dominant)
31	NM_000091	COL4A3	Collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen)
32	NM_000092	COL4A4	Collagen, type IV, alpha 4
33	NM_033380	COL4A5	Collagen, type IV, alpha 5 (Alport syndrome)
34	NM_000093	COL5A1	Collagen, type V, alpha 1
35	NM_000094	COL7A1	Collagen, type VII, alpha 1 (epidermolysis bullosa, dystrophic)
36	NM_001852	COL9A2	Collagen, type IX, alpha 2
37	NM_000758	CSF2	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)
38	NM_000759	CSF3	Colony stimulating factor 3 (granulocyte)
39	NM_000396	CTSK	Cathepsin K (pseudodeficiency)
40	NM_001920	DCN	Decorin
41	NM_001963	EGF	Epidermal growth factor (beta-urogastrone)
42	NM_005228	EGFR	Epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene)
43	NM_000800	FGF1	Fibroblast growth factor 1 (acidic)
44	NM_002006	FGF2	Fibroblast growth factor 2 (basic)
45	NM_005247	FGF3	Fibroblast growth factor 3 (murine mammary tumor virus integration site (v-int-2))
46	NM_000604	FGFR1	Fibroblast growth factor receptor 1 (fms-related tyrosine kinase 2, Pfeiffer syndrome)
47	NM_000141	FGFR2	Fibroblast growth factor receptor 2 (bacteria-expressed kinase, keratinocyte growth factor receptor, craniofacial dysostosis 1, Crouzon syndrome, Pfeiffer syndrome.)
48	NM_000142	FGFR3	Fibroblast growth factor receptor 3 (achondroplasia, thanatophoric dwarfism)
49	NM_002019	FLT1	Fms-related tyrosine kinase 1 (vascular endothelial growth factor receptor)
50	NM_002026	FN1	Fibronectin 1
51	NM_004962	GDF10	Growth differentiation factor 10

No.	GeneBank	Symbol	Description
52	NM_000201	ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1 (CD54), human rhinovirus receptor
53	NM_000618	IGF1	Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)
54	NM_000875	IGF1R	Insulin-like growth factor 1 receptor
55	NM_000612	IGF2	Insulin-like growth factor 2 (somatomedin A)
56	NM_181501	ITGA1	Integrin, alpha 1
57	NM_002203	ITGA2	Integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)
58	NM_002204	ITGA3	Integrin, alpha 3 (antigen CD49C, alpha 3 subunit of VLA-3 receptor)
59	NM_000632	ITGAM	Integrin, alpha M (complement component receptor 3, alpha; also known as CD11b (p170), macrophage antigen alpha polypeptide)
60	NM_002210	ITGAV	Integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)
61	NM_002211	ITGB1	Integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, MDF2, MSK12)
62	NM_005900	SMAD1	SMAD, mothers against DPP homolog 1 (Drosophila)
63	NM_005901	SMAD2	SMAD, mothers against DPP homolog 2 (Drosophila)
64	NM_005902	SMAD3	SMAD, mothers against DPP homolog 3 (Drosophila)
65	NM_005359	SMAD4	SMAD, mothers against DPP homolog 4 (Drosophila)
66	NM_005903	SMAD5	SMAD, mothers against DPP homolog 5 (Drosophila)
67	NM_005585	SMAD6	SMAD, mothers against DPP homolog 6 (Drosophila)
68	NM_005904	SMAD7	SMAD, mothers against DPP homolog 7 (Drosophila)
69	NM_005905	SMAD9	SMAD, mothers against DPP homolog 9 (Drosophila)
70	NM_002425	MMP10	Matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)
71	NM_002427	MMP13	Matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3)
72	NM_004530	MMP2	Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)
73	NM_002424	MMP8	Matrix metalloproteinase 8 (neutrophil collagenase)
74	NM_004994	MMP9	Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)
75	NM_002448	MSX1	Msh homeobox homolog 1 (Drosophila)
76	NM_002449	MSX2	Msh homeobox homolog 2 (Drosophila)

No.	GeneBank	Symbol	Description
77	NM_003998	NFKB1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (p105)
79	NM_004348	RUNX2	Runt-related transcription factor 2
80	NM_001235	SERPINH1	Serpin peptidase inhibitor, clade H (heat shock protein 47), (collagen binding protein 1)
81	NM_001235	SERPINH1	Serpin peptidase inhibitor, clade H (heat shock protein 47), (collagen binding protein 1)
82	NM_000346	SOX9	SRY (sex determining region Y)-box 9 (campomelic dysplasia, autosomal sex-reversal)
83	NM_003118	SPARC	Secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)
84	NM_000582	SPP1	Secreted phosphoprotein 1 (osteopontin, bone sialoprotein I)
85	NM_000660	TGFB1	Transforming growth factor, beta 1 (Camurati-Engelmann disease)
86	NM_003238	TGFB2	Transforming growth factor, beta 2
87	NM_003239	TGFB3	Transforming growth factor, beta 3
88	NM_004612	TGFBR1	Transforming growth factor, beta receptor I (activin A receptor type II-like kinase)
89	NM_003242	TGFBR2	Transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa)
90	NM_000594	TNF	Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)
91	NM_000474	TWIST1	Twist homolog 1 (acrocephalosyndactyly 3; Saethre-Chotzen syndrome) (Drosophila)
92	NM_001078	VCAM1	Vascular cell adhesion molecule 1
93	NM_000376	VDR	Vitamin D (1,25- dihydroxyvitamin D3) receptor
94	NM_003376	VEGF	Vascular endothelial growth factor
95	NM_003377	VEGFB	Vascular endothelial growth factor B
96	NM_005429	VEGFC	Vascular endothelial growth factor C
97	L08752	PUC18	PUC18 Plasmid DNA
98	L08752	PUC18	PUC18 Plasmid DNA
99	L08752	PUC18	PUC18 Plasmid DNA
100			
101			
102			
103	NM_002046	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
104	NM_002046	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

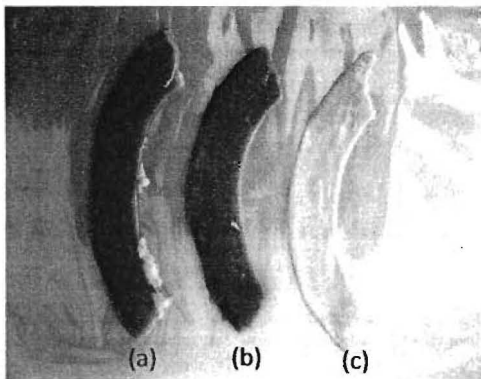
No.	GeneBank	Symbol	Description
105	NM_021130	PPIA	Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)
106	NM_021130	PPIA	Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)
107	NM_021130	PPIA	Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)
108	NM_021130	PPIA	Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)
109	NM_012423	RPL13A	Ribosomal protein L13a
110	NM_012423	RPL13A	Ribosomal protein L13a
111	NM_001101	ACTB	Actin, beta
112	NM_001101	ACTB	Actin, beta

ตารางที่ 2 ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนที่ควบคุมการแสดงออกของ RUNX2, ALP, COL I และ GAPDH

Name	Sequence (5'-3')	Size product (bp)	Tm (°C)
Runx2	Forward : 5' CCCCACGACAACCGCACCAT 3' Reverse: 5' CACTCCGGCCCACAAATC 3'	270	64
ALP	Forward : 5' TGGAGCTTCAGAAGCTCAACACCA 3' Reverse: 5' ATCTCGTTGTCTGAGTACCAGTCC 3'	453	60
COL I	Forward : 5' TAACCACTGCTCCACTCTGG 3' Reverse: 5' GGACACAATGGATTGCAAGG 3'	461	60
GAPDH	Forward : 5' ACCACAGTCCATGCCATCAC 3' Reverse: 5' TCCACCACCCTGTTGCTGTA 3'	452	60

ผลการวิจัย

การศึกษาความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกของลำไส้เล็กหมูชั้นสับมิวโคซา และเนื้อกระดูกที่ผ่านการลดปริมาณเกลือแร่ ในการเตรียมลำไส้หมูชั้น submucosa พบว่าหลังจากทำการลอกชั้น muscularis externa และชั้น serosa ออก ลำไส้หมูมีลักษณะเป็นเยื่อสีขาว มีความเหนียว (รูปที่ 1) จากนั้นนำลำไส้หมูส่วนที่ได้บดป่นให้ละเอียดมากที่สุดแช่ใน 3% acetic acid ผสมกับ 0.1% pepsin เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วทำให้แห้งด้วยกระบวนการ lyophilization พบว่าลำไส้หมูมีการเกาะตัวกันเป็นก้อนที่มีความเหนียว (รูปที่ 2) และจากการเตรียม DBM พบว่ามีลักษณะเป็นผงขนาดระหว่าง 125–850 ไมครอน มีสีขาวขุ่น (รูปที่ 3)

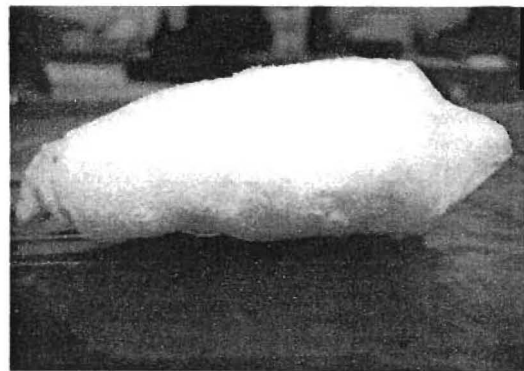


รูปที่ 1 ลักษณะของลำไส้เล็กหมู

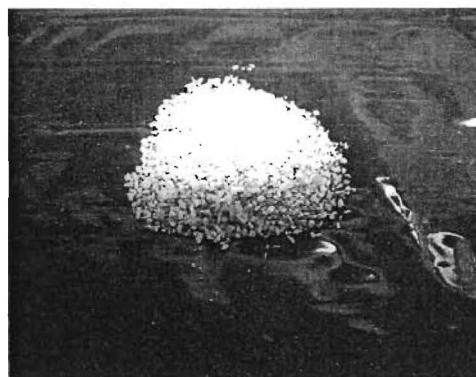
(a) ลำไส้เล็กหมูสด

(b) ลำไส้เล็กหมูชั้น muscularis externa

(c) ลำไส้เล็กหมูชั้น submucosa

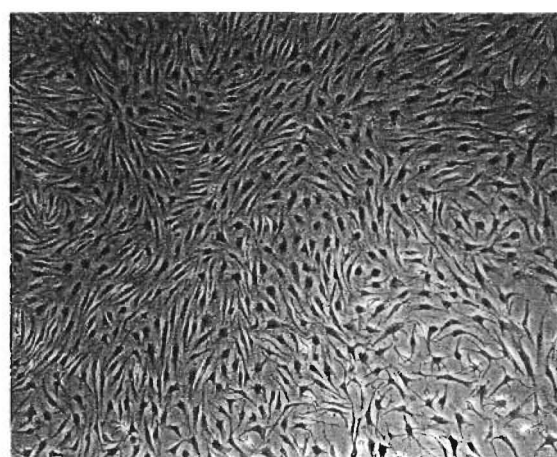
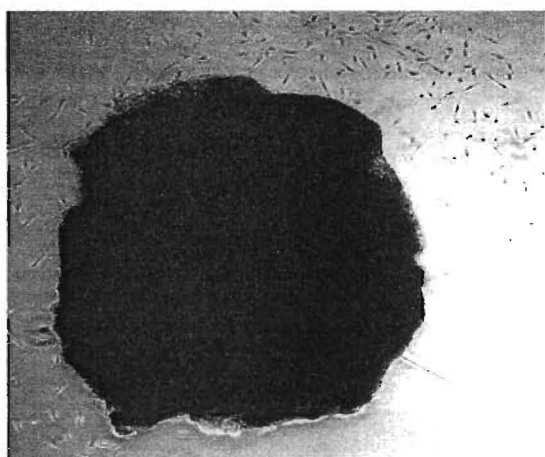


รูปที่ 2 ลักษณะของ SIS



รูปที่ 3 ลักษณะของ DBM

การแยกเพาะเลี้ยงและเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกด้วยวิธี outgrowth technique (primary cell culture) พบว่าหลังจากทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใน T25 flask เพื่อทำการแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกเป็นเวลา 7 วัน พบมีเซลล์เจริญเพิ่มจำนวนเรียงตัวล้อมรอบขึ้นเนื้อเยื่อ (รูปที่ 4) และเมื่อเซลล์มีจำนวนมากขึ้น จึงทำการเพิ่มจำนวนเซลล์โดยการลอกเซลล์ออกจากภาชนะเพาะเลี้ยงด้วย 0.25% trypsin ทำการเพาะเลี้ยงใน T75 flask ที่มี α -MEM, 10% FBS และ penicillin/streptomycin 100 หน่วย/มิลลิลิตร พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกมีลักษณะคล้ายเซลล์ fibroblast (รูปที่ 5) เมื่อเซลล์เจริญเพิ่มจำนวนมากขึ้นจนเต็มภาชนะเพาะเลี้ยง แล้วจึงนำเซลล์ที่ได้ไปทำการวิเคราะห์การเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิด และวิเคราะห์การเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงเซลล์ต้นกำเนิดไปเป็นเซลล์กระดูก



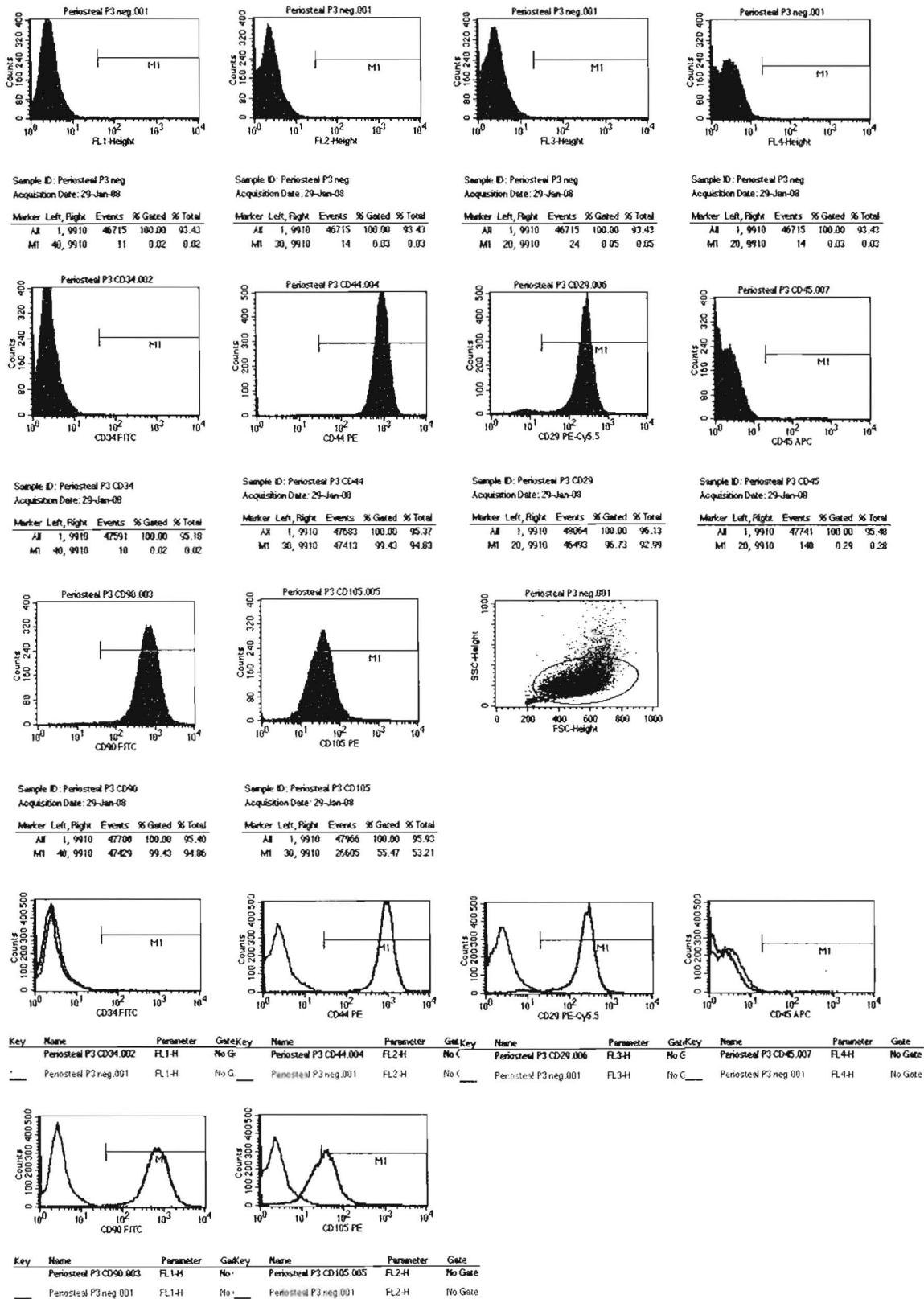
รูปที่ 4 เซลล์เจริญเพิ่มจำนวนเรียงตัวล้อมรอบ

รูปที่ 5 ลักษณะของเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อ

เนื้อเยื่อหุ้มกระดูก (กำลังขยาย x4)

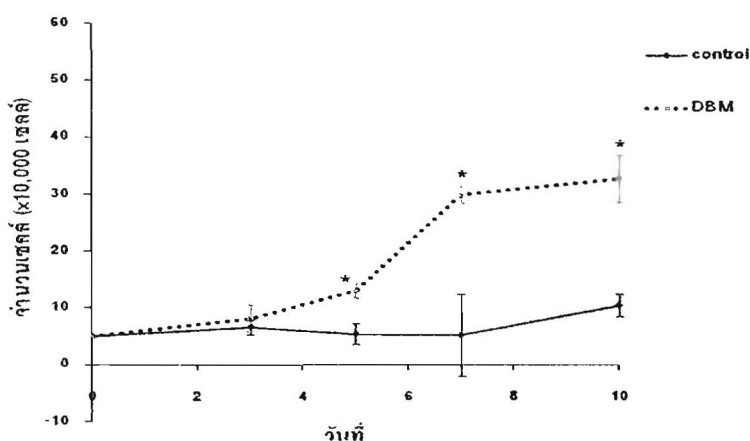
หุ้มกระดูก (กำลังขยาย x10)

จากการวิเคราะห์การแสดงออกของ CD antigen บนผิวเซลล์โดยเลือก CD34 และ CD45 ซึ่งเป็น hematopoietic stem cell (HSC) markers ใช้เป็น rule out exclusion และเลือก CD29, CD44, CD90 และ CD105 ซึ่งเป็น mesenchymal stem cell (MSC) marker (rule in inclusion) ปรากฏว่าเซลล์จากเยื่อหุ้มกระดูกมีการแสดงออกของ HSC markers น้อยกว่า 1% โดยมีการแสดงออกของ CD34 < 0.02% และ CD45 < 0.29% ตามลำดับ ในขณะที่มีการแสดงออกของ MSC markers ในระดับสูง ดังนี้ CD29, CD44, CD90 และ CD105 มีการแสดงออกจำนวน 92.99%, 99.43%, 99.43% และ 55.47% ตามลำดับ (รูปที่ 6) ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าเซลล์ปฐมภูมิ periosteal derived cells มีคุณสมบัติของเซลล์ mesenchymal stem cells



รูปที่ 6 แสดง 2D histogram จาก CD antigen ชนิดต่างๆของเซลล์ periosteal derived cells

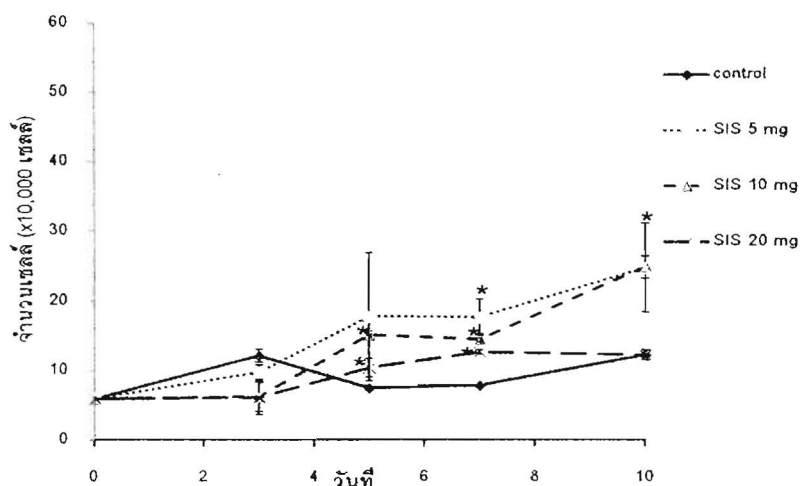
จากการศึกษาผลของ SIS และ DBM ต่อการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกในการวิจัยนี้ใช้กระดูกที่ผ่านการลดปริมาณเกลือแร่ที่มีปริมาณแคลเซียมเหลืออยู่น้อยกว่า 3% และใช้จำนวนเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกเริ่มต้น 5×10^4 เซลล์/flask เท่ากันทุกกลุ่ม การทดลอง จากนั้นทำการกระตุ้นเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากเยื่อหุ้มกระดูก แล้วทำการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วยวิธี tryphan blue staining assay เมื่อครบ 3, 5, 7 และ 10 วันหลังจากที่กระตุ้น พบว่าเซลล์เยื่อหุ้มกระดูกหลังจากถูกกระตุ้นด้วย DBM 5 มิลลิกรัม ในวันที่ 5 เซลล์มีจำนวน 1.3×10^5 เซลล์ ในวันที่ 7 หลังจากกระตุ้นเซลล์มีจำนวน 2.99×10^5 เซลล์ แสดงให้เห็นว่าเซลล์มีการเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการกระตุ้น และเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ซึ่งจะเพิ่มขึ้นสูงที่สุดในวันที่ 10 หลังจากกระตุ้นเซลล์มีจำนวน 3.3×10^5 เซลล์ แสดงให้เห็นว่าเซลล์มีการเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการกระตุ้น (รูปที่ 7)



รูปที่ 7 ผลของ DBM ต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก (* $p < 0.05$)

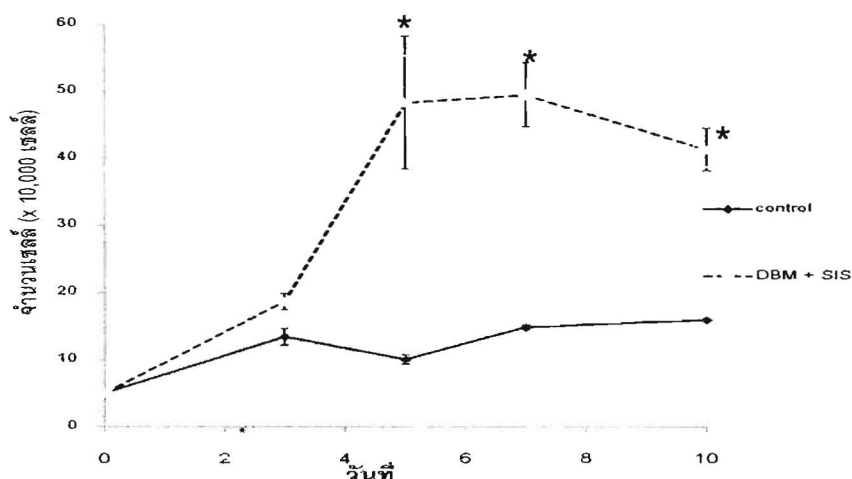
ผลจากการศึกษาความสามารถของ SIS ต่อการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก โดยกระตุ้นด้วย SIS ในปริมาณแตกต่างกัน พบว่าในการกระตุ้นด้วย SIS ปริมาณ 5 มิลลิกรัม ในวันที่ 7 มีผลต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เซลล์มีจำนวน 1.78×10^5 เซลล์ และในวันที่ 10 เซลล์มีจำนวน 2.48×10^5 เซลล์ เซลล์มีจำนวนเพิ่มขึ้นมากที่สุด สำหรับเซลล์ที่กระตุ้นด้วย SIS ปริมาณ 10 มิลลิกรัม ในวันที่ 5 หลังจากกระตุ้นเซลล์มีจำนวน 1.51×10^5 เซลล์ มีการเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 10 หลังจากกระตุ้น มีเซลล์ประมาณ 2.49×10^5 เซลล์ และในการกระตุ้นด้วย 5 หรือ 10 มิลลิกรัม ในวันที่ 10 ไม่แตกต่างกันในทางสถิติ ส่วนเซลล์ที่กระตุ้นด้วย SIS ปริมาณ 20 มิลลิกรัม พบว่าในวันที่ 5 มีจำนวนเซลล์เท่ากับ 1.04×10^5 เซลล์ เซลล์มีการเจริญเพิ่มขึ้น อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) แต่มีการเจริญเพิ่ม

จำนวนน้อยกว่าในกลุ่มที่กระตุ้นด้วย SIS ปริมาณ 5 และ 10 มิลลิกรัม แสดงให้เห็นว่า SIS ปริมาณ 5 และ 10 มิลลิกรัม มีผลในการกระตุ้นให้เกิดการเจริญเพิ่มจำนวนได้ดีที่สุด และเป็นปริมาณที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้ในการกระตุ้นให้เกิดการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ (รูปที่ 8)



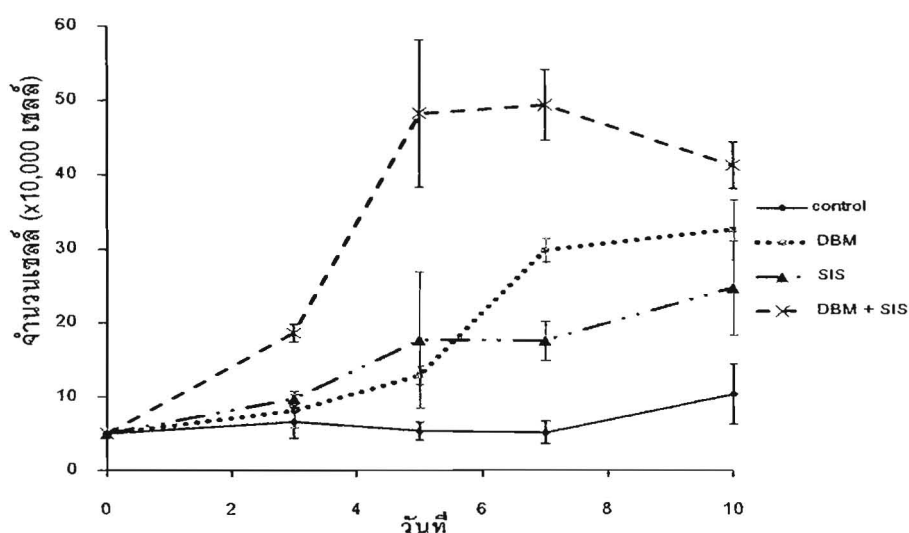
รูปที่ 8 ผลของ SIS ต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก (* $p < 0.05$)

จากผลการทดลองก่อนหน้านี้ SIS ปริมาณ 5 มิลลิกรัม และ DBM 5 มิลลิกรัม มีความสามารถในการกระตุ้นการเจริญเพิ่มจำนวนได้ดีที่สุด จึงเลือกที่จะใช้ปริมาณของ DBM ผสมกับ SIS รวมเป็น 5 มิลลิกรัม โดยใช้ SIS และ DBM อย่างละ 2.5 มิลลิกรัม จากการศึกษาความสามารถของ DBM ผสมกับ SIS ต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก พบว่าในวันที่ 3 เซลล์มีจำนวน 1.86×10^5 เซลล์ เซลล์มีการเจริญเพิ่มจำนวนสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) และเซลล์มีการเจริญเพิ่มจำนวนสูงสุดในวันที่ 5 มีเซลล์เท่ากับ 4.83×10^5 เซลล์ เซลล์มีการเจริญเพิ่มจำนวนสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) และมีการลดลงในวันที่ 10 หลังจากกระตุ้นเซลล์มีจำนวน 4.13×10^5 เซลล์ เซลล์มีการเจริญเพิ่มจำนวนสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) (รูปที่ 9)



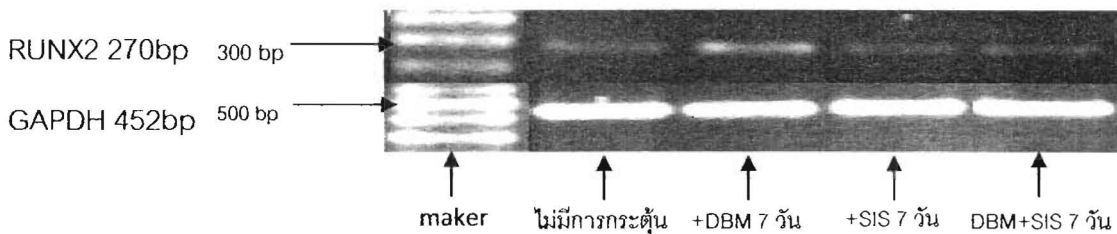
รูปที่ 9 ผลของ DBM ผสม SIS ต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก (* $p < 0.05$)

จากการเปรียบเทียบการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกหลังจากที่ได้รับ การกระตุ้นด้วย DBM, SIS และ DBM ผสมกับ SIS พบว่าหลังจากกระตุ้นด้วย DBM ผสมกับ SIS มีการ เจริญเพิ่มจำนวนสูงชันกว่ากลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วย DBM และ SIS เพียงชนิดเดียวตั้งแต่วันที่ 3 หลังจากกระตุ้น และพบว่าวันที่ 7 หลังจากกระตุ้นด้วย DBM การเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์สูงกว่าในกลุ่ม ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย SIS แสดงว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกมีการเจริญเพิ่มจำนวนได้ดีที่สุด หลังจากกระตุ้นด้วย DBM ผสมกับ SIS (รูปที่ 10)

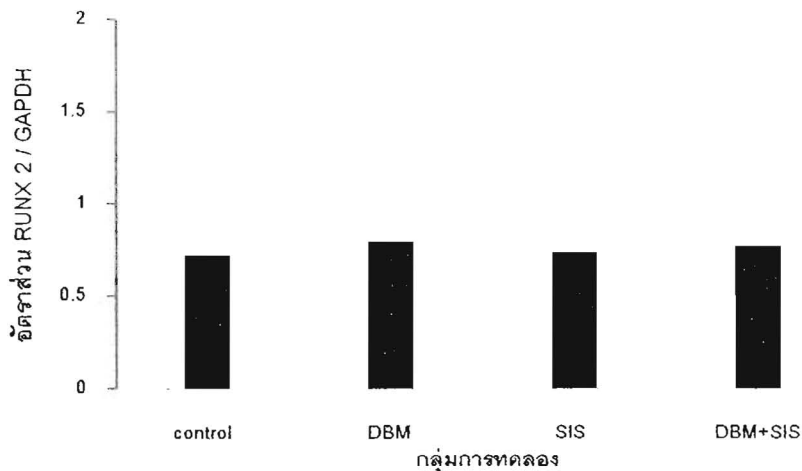


รูปที่ 10 การเปรียบเทียบการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก

จากผลการทดลองตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีนที่มีการแสดงออกของ ALP, RUNX2 และ COL 1 ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน RUNX2 พบว่า ยีน RUNX2 มีขนาด 270 bp ระดับการแสดงออกของยีน RUNX 2 หลังจากกระตุ้นด้วย DBM, SIS, DBM ผสมกับ SIS และกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้นมีระดับการแสดงออกในอัตราส่วน RUNX 2/GAPDH เท่ากับ 0.80, 0.74, 0.78 และ 0.72 ตามลำดับ หลังจากการกระตุ้นด้วย DBM, SIS และ DBM ผสมกับ SIS พบว่ามีระดับการแสดงออกสูงขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้น เมื่อเทียบกับระหว่างกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วย DBM, SIS และ DBM ผสมกับ SIS พบว่ากลุ่มที่กระตุ้นด้วย DBM มีระดับการแสดงออกสูงที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่น (รูปที่ 11)



(a)



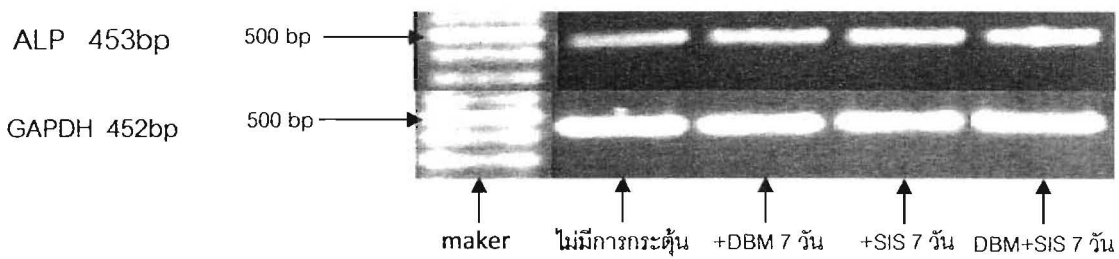
(b)

รูปที่ 11 การแสดงออกของยีน RUNX2 ในเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก

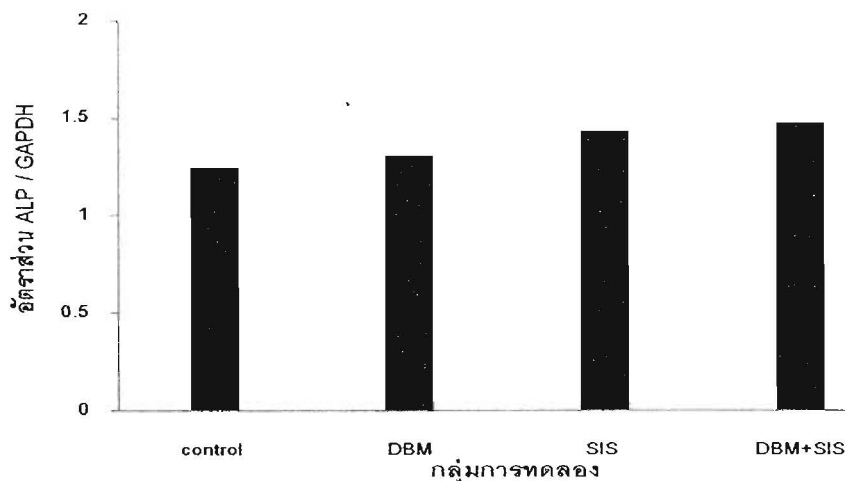
(a) การแสดงออกของยีน RUNX2 จากการทดสอบด้วยวิธี RT-PCR

(b) ระดับการแสดงออกของยีน RUNX 2

การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน ALP พบแถบของ DNA ที่มีขนาด 453 bp จากนั้นวิเคราะห์ความเข้มของแถบ DNA พบว่า หลังจากกระตุ้นเป็นเวลา 7 วัน ระดับการแสดงออกของยีน ALP ในเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย DBM, SIS, DBM ผสมกับ SIS และกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้นมีระดับการแสดงออกในอัตราส่วน ALP/GAPDH เท่ากับ 1.31, 1.44, 1.6 และ 1.25 ตามลำดับ พบว่าหลังจากกระตุ้นด้วย DBM, SIS และ DBM ผสมกับ SIS มีการแสดงออกของยีน ALP ในทุกกลุ่มทั้งที่ได้รับการและไม่ได้รับการกระตุ้น (รูปที่ 12)



(a)



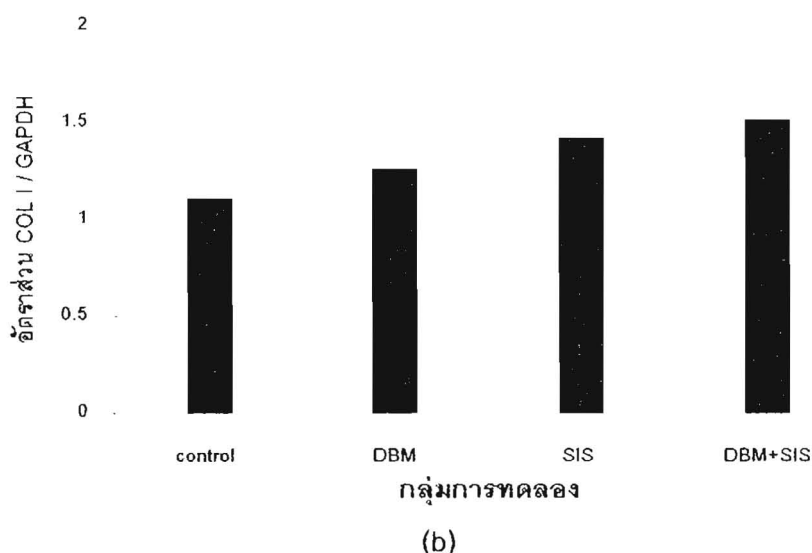
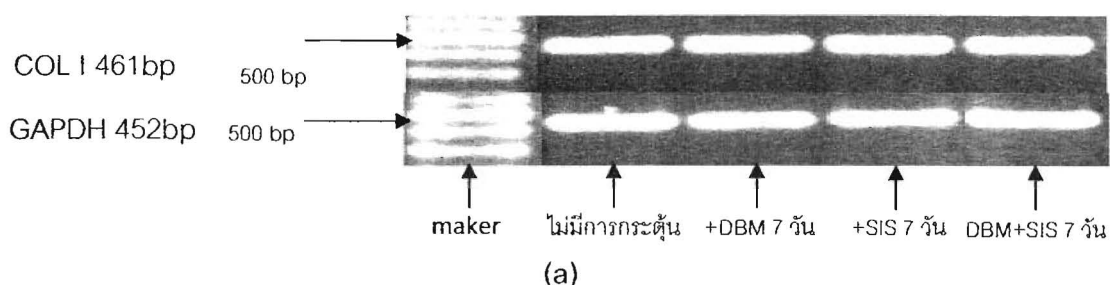
(b)

รูปที่ 12 การแสดงออกของยีน ALP ในเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก

(a) การแสดงออกของยีน ALP จากการทดสอบด้วยวิธี RT-PCR

(b) ระดับการแสดงออกของยีน ALP

ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน COL I พบแถบของ DNA ที่ได้มีขนาด 461 bp พบว่าหลังจากกระตุ้นด้วย DBM, SIS, DBM ผสมกับ SIS และกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้น ยีน COL I ระดับการแสดงออกในอัตราส่วน COL I/GAPDH เท่ากับ 1.23, 1.43, 1.52 และ 1.12 ตามลำดับ หลังจากที่ได้รับ การกระตุ้นด้วย DBM, SIS และ DBM ผสมกับ SIS มีระดับการแสดงออกของ COL I สูงขึ้น รวมทั้งกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้นก็มีการแสดงของยีน COL I (รูปที่ 13)

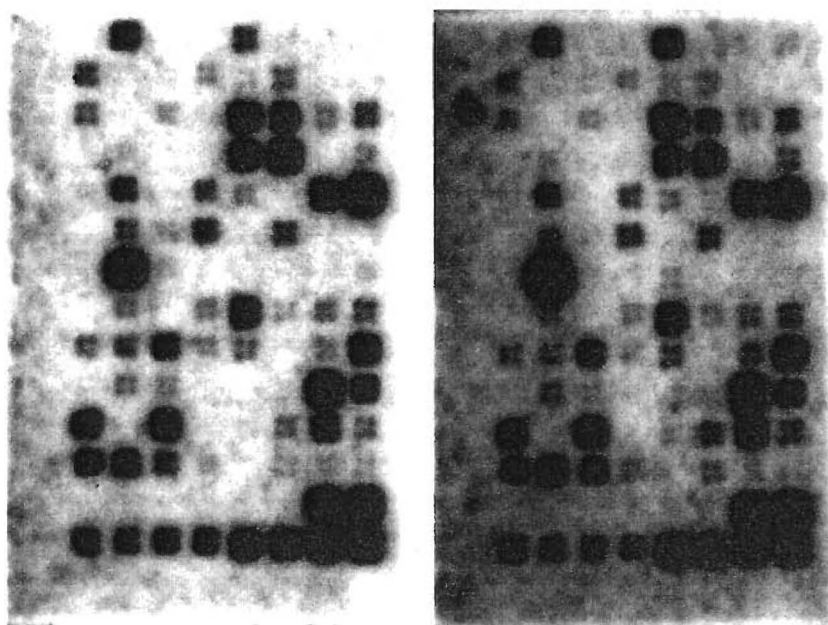


รูปที่ 13 การแสดงออกของยีน COL I ในเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก

(a) การแสดงออกของยีน COL I จากการทดสอบด้วยวิธี RT-PCR









(b) ระดับการแสดงออกของยีน COL I

ผลการทดลองการแสดงออกของยีนด้วย cDNA array ของเซลล์กลุ่มควบคุม และเซลล์กลุ่มทดลอง เมื่อทำการวิเคราะห์โดยใช้เกณฑ์อัตราส่วนความเข้มของจุดซึ่งแสดงถึงยีนแต่ละยีนที่ตรงกันระหว่างเซลล์กลุ่มทดลองกับเซลล์กลุ่มควบคุมมีค่ามากกว่า 2 พบว่า มีจำนวน 3 ยีน ได้แก่ ยีน Biglycan, TGFB1, TGFB1R1, RUNX2 และ VEGF และอัตราส่วนที่มีค่าน้อยกว่า 0.5 พบว่ามีจำนวน 1 ยีน คือ ยีน COL 14A1 (รูปที่ 14 และ 15)



กลุ่มควบคุม (เซลล์ไม่ได้รับ DBM) กลุ่มทดลอง (เซลล์ที่ได้รับ DBM)

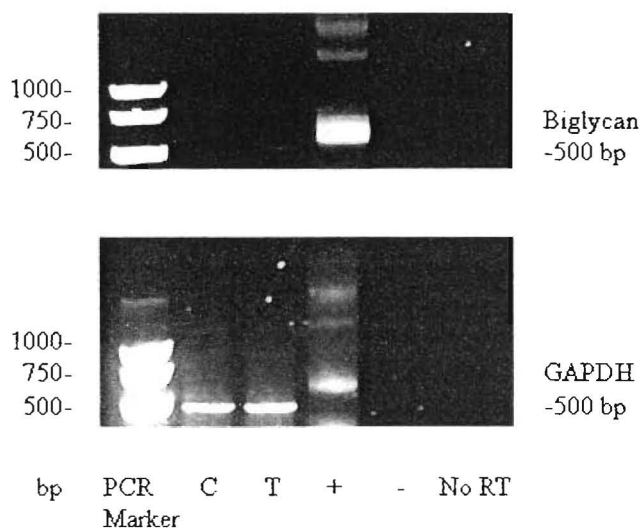
รูปที่ 14 เปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง โดยใช้วิธี cDNA array

Control	Treatment	Gene Name	Ratio Treatment/Control
		Biglycan	>2
		TGF-β1	>2
		TGF-βR1	>2
		Collagen 14A1	<0.5

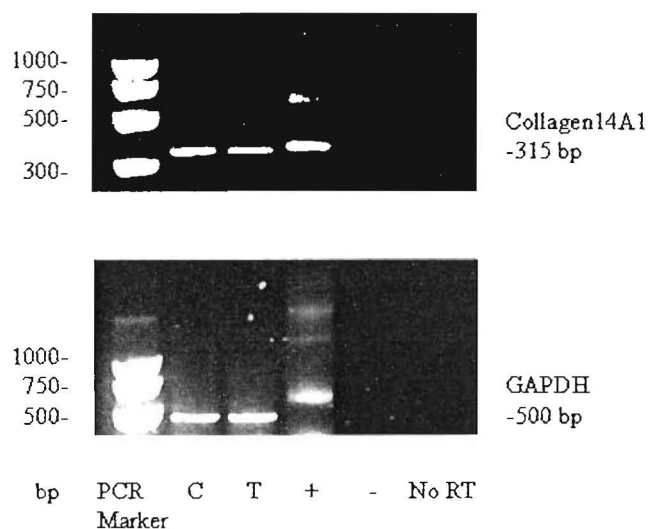
Comparison of control and DBM-CM treatment by array analysis of HPO cells.

รูปที่ 15 การแสดงออกของยีนในเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง โดยใช้วิธี cDNA array

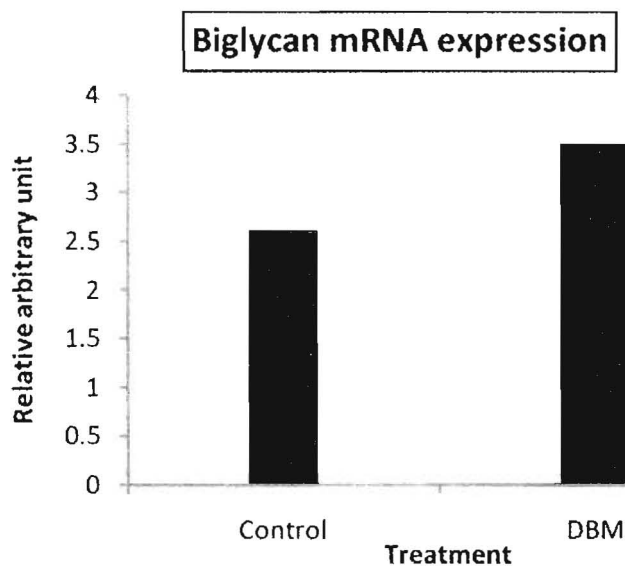
เพื่อเป็นการตรวจพิสูจน์ผลการศึกษากการแสดงออกของยีน cDNA array จึงทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี RT-PCR analysis พบว่า ผลที่ได้จาก RT-PCR สอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้จากการศึกษาด้วยวิธี cDNA array (รูปที่ 16, 17, 18 และ 19) เมื่อนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบระดับการแสดงออกโดยการวัดความเข้มของแถบ (band) ที่ได้เปรียบเทียบกับกัน สามารถยืนยันผลการทดลองข้างต้นได้ดังกราฟซึ่งสอดคล้องกันกับผลที่ได้จาก cDNA array analysis



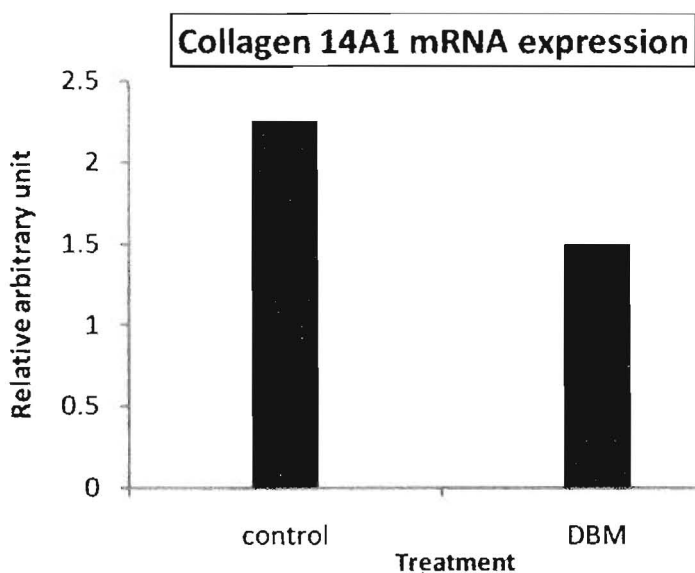
รูปที่ 16 การวิเคราะห์ RT-PCR แสดงการแสดงออกเพิ่มขึ้นของ Biglycan ในเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก โดยใช้ GAPDH เป็นยีนควบคุม (C=Control, T=Treatment, No RT= no reverse transcriptase enzyme)



รูปที่ 17 การวิเคราะห์ RT-PCR แสดงการแสดงออกลดลงของ COL14A1 ในเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกโดยใช้ GAPDH เป็นยีนควบคุม (C=Control, T=Treatment, No RT= no reverse transcriptase enzyme)

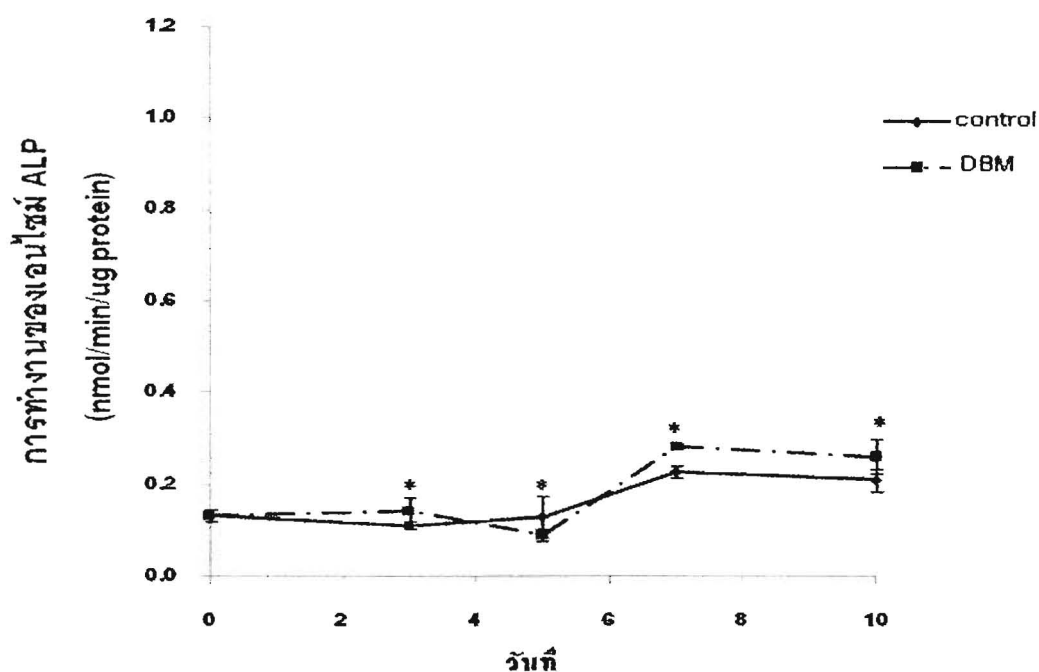


รูปที่ 18 กราฟแสดงระดับการแสดงออกของยีน Biglycan ที่ได้จากการวิเคราะห์ RT-PCR ของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองในวันที่ 7



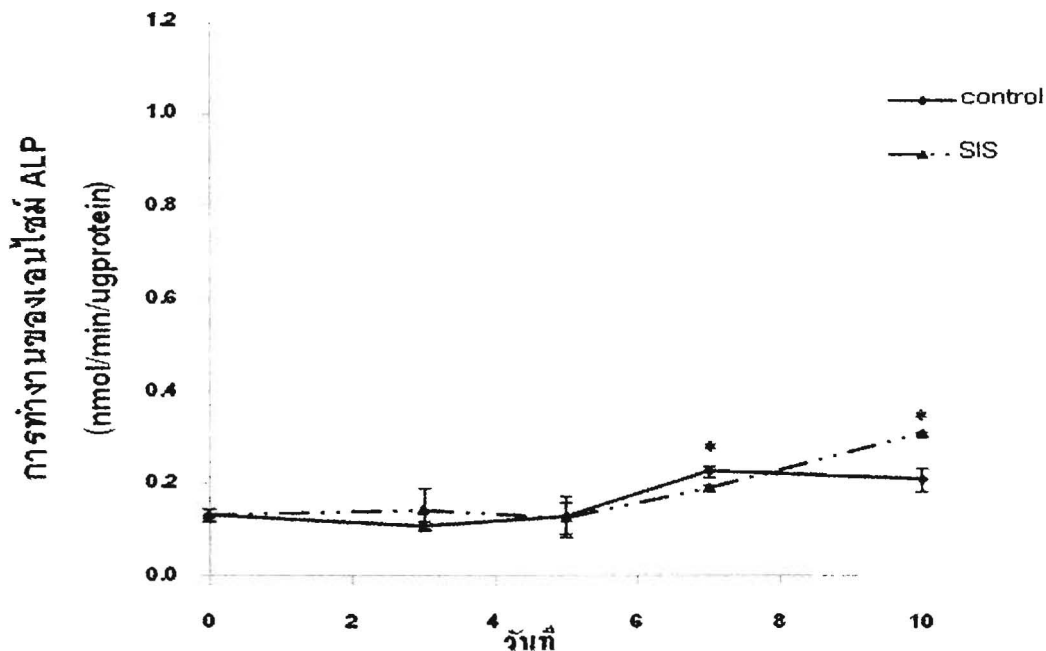
รูปที่ 19 กราฟแสดงระดับการแสดงออกของยีน COL14A1 ที่ได้จากการวิเคราะห์ RT-PCR ของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองในวันที่ 7

การวิเคราะห์การเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก โดยวิเคราะห์ระดับการทำงานของเอนไซม์ ALP หลังจากกระตุ้นด้วย DBM, SIS และ DBM ผสมกับ SIS เป็นเวลา 3, 5, 7, 10 และเซลล์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้น พบว่าหลังจากกระตุ้นด้วย DBM เป็นเวลา 3, 5, 7, 10 และกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้น มีระดับการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 0.14, 0.09, 0.28, 0.26 และ 0.13 นาโนโมล/นาที/ปริมาณโปรตีนเป็นไมโครกรัม หลังจากที่ได้รับกระตุ้นด้วย DBM ในช่วง 5 วันแรกของการกระตุ้น มีระดับการทำงานของเอนไซม์ ALP ไม่แตกต่างกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้น ในวันที่ 7 หลังจากกระตุ้นด้วย DBM มีระดับการทำงานของเอนไซม์ ALP สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้น ($p < 0.05$) จากนั้นลดลงในวันที่ 10 หลังจากกระตุ้นและไม่แตกต่างกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้น (รูปที่ 20)



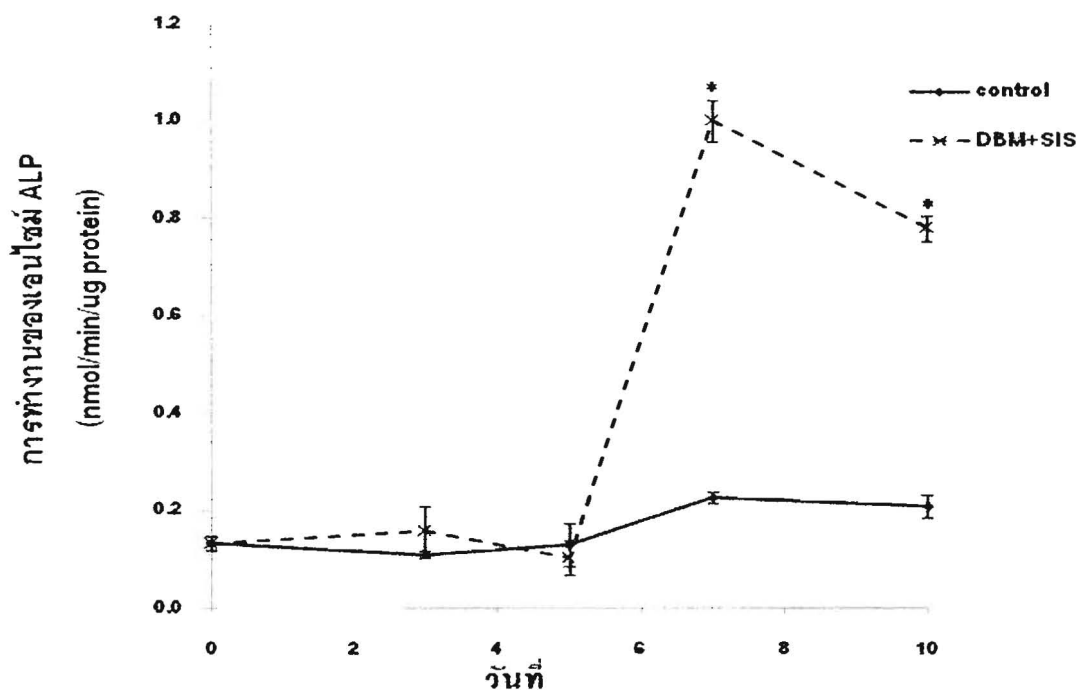
รูปที่ 20 ผลการกระตุ้นของ DBM ต่อการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก (* $p < 0.05$)

ผลจากการกระตุ้นด้วย SIS เป็นเวลา 3, 5, 7, 10 และกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้น พบว่ามีระดับการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 0.14, 0.13, 0.19, 0.31 และ 0.13 นาโนโมล/นาที/ปริมาณโปรตีนเป็นไมโครกรัม ในช่วง 7 วันแรกหลังจากกระตุ้นด้วย SIS ระดับการทำงานของเอนไซม์ ALP ไม่มีการเปลี่ยนแปลงและไม่แตกต่างกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้น และ วันที่ 10 ของการกระตุ้นมีระดับการทำงานของเอนไซม์ ALP เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้น ($p < 0.05$) (รูปที่ 21)



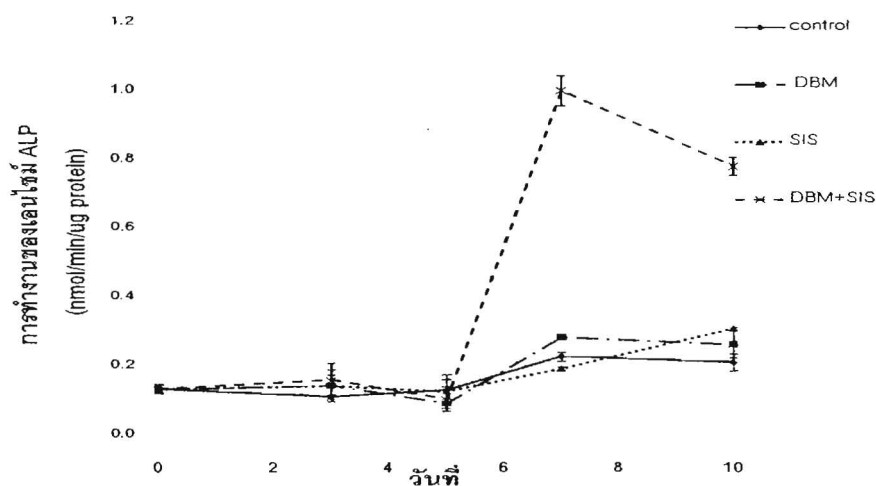
รูปที่ 21 ผลการกระตุ้นของ SIS ต่อการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก (* $p < 0.05$)

หลังจากกระตุ้นด้วย DBM ผสมกับ SIS เป็นเวลา 3, 5, 7, 10 และกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้น พบว่ามีระดับการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 0.15, 0.10, 0.99, 0.78 และ 0.13 นาโนโมล/นาที/ปริมาณโปรตีน เป็นไมโครกรัม ในช่วง 5 วันแรกของการกระตุ้นด้วย SIS มีระดับการทำงานของเอนไซม์ ALP ไม่แตกต่างกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้น และหลังจากนั้นในวันที่ 7 ของการกระตุ้นมีระดับการทำงานของเอนไซม์ ALP เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้น ($p < 0.05$) จากนั้นระดับการแสดงออกของเอนไซม์มีการแสดงออกลดลงในวันที่ 10 หลังจากการกระตุ้น DBM ผสมกับ SIS (รูปที่ 22)



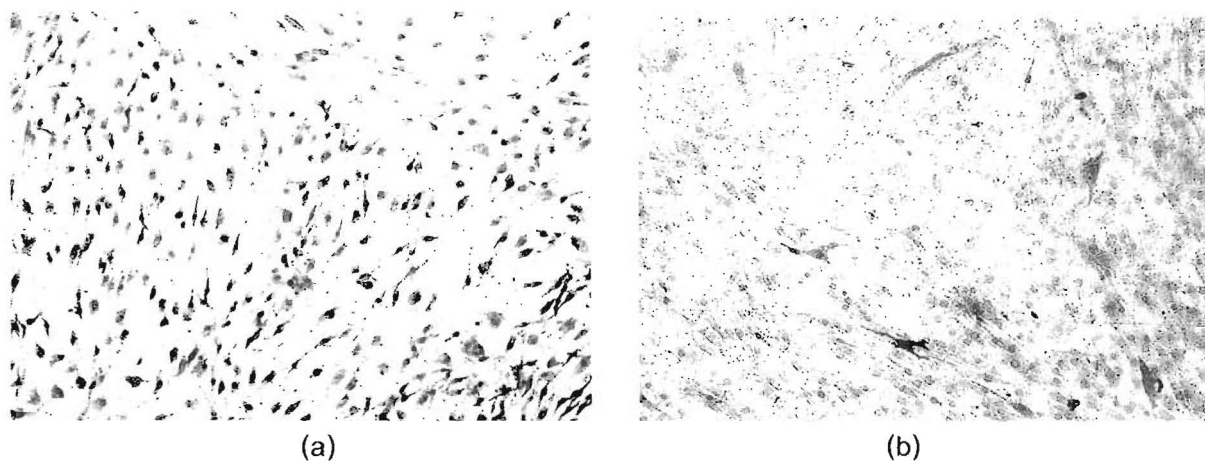
รูปที่ 22 ผลการกระตุ้นของ DBM ผสมกับ SIS ต่อการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็น เซลล์สร้างกระดูก (* $p < 0.05$)

จากการเปรียบเทียบระดับการทำงานของเอนไซม์ ALP ที่ได้รับการกระตุ้นที่แตกต่างกัน พบว่า 5 วันแรกของการกระตุ้นด้วย DBM, SIS และ DBM ผสมกับ SIS มีระดับการทำงานของเอนไซม์ ALP ไม่แตกต่างกัน ในวันที่ 7 หลังจากกระตุ้นด้วย DBM ผสมกับ SIS ระดับการทำงานของเอนไซม์ ALP มีระดับการทำงานเพิ่มขึ้นมากกว่าการกระตุ้นด้วย DBM, SIS และกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้น หลังจากนั้นในวันที่ 10 พบว่ามีระดับการทำงานของเอนไซม์ ALP ลดลง ระดับการทำงานของเอนไซม์ ALP ในวันที่ 7 หลังจากกระตุ้นด้วย DBM มีระดับการทำงานของเอนไซม์สูงกว่ากลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วย SIS (รูปที่ 23) และจากการวิเคราะห์การเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อสายสะดือไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก พบว่ามีระดับการทำงานของเอนไซม์ ALP ของเซลล์ที่ได้รับ DBM ในช่วงวันที่ 3 และวันที่ 5 นั้นอยู่ในระดับต่ำ (น้อยกว่า $0.01 \text{ nmol/min}/\mu\text{g protein}$) และเพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 7 (ค่าเฉลี่ย = $0.087745 \text{ nmol/min}/\mu\text{g protein}$, $SD = \pm 0.0061$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และลดลงในวันที่ 10 ใกล้เคียงกับในช่วงต้น แสดงว่าเซลล์ในกลุ่มทดลองที่ได้รับ DBM มีการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก



รูปที่ 23 ระดับเอนไซม์ ALP หลังจากกระตุ้นด้วย DBM, SIS และ DBM ผสมกับ SIS

เนื่องจาก alkaline phosphatase เป็นเอนไซม์ที่พบอยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ osteoblast จึงสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ที่ต่อการเจริญเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกซึ่งสามารถตรวจได้ด้วยวิธี alkaline phosphatase staining assay ในการทดลองนี้ทำการทดสอบระหว่างเซลล์ที่ไม่ได้รับ DBM และเซลล์ที่ได้รับ DBM โดยวิธี alkaline phosphatase staining พบว่าเซลล์ที่ไม่ได้รับ DBM ติดสีน้ำเงินเข้ม แสดงว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูก (no osteoblastic differentiation) เซลล์ที่ได้รับ DBM ติดสีม่วงแดง แสดงว่ามีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก (รูปที่ 24) และมีการแสดงออกของ alkaline phosphatase ที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์

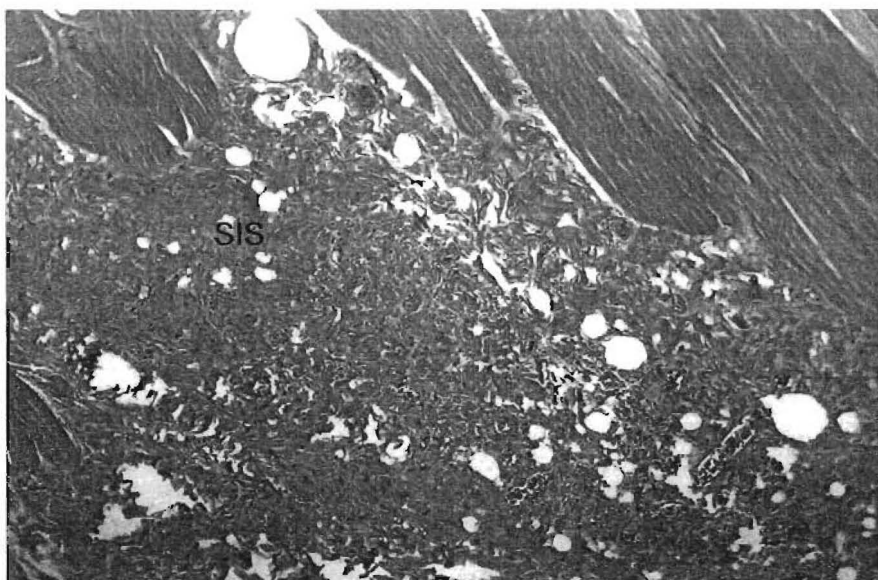


รูปที่ 24 ผลของ DBM ต่อการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูกด้วยวิธี alkaline phosphatase staining assay (กำลังขยาย x10)

(a) เซลล์เยื่อหุ้มกระดูกกลุ่มที่ไม่ได้รับ DBM

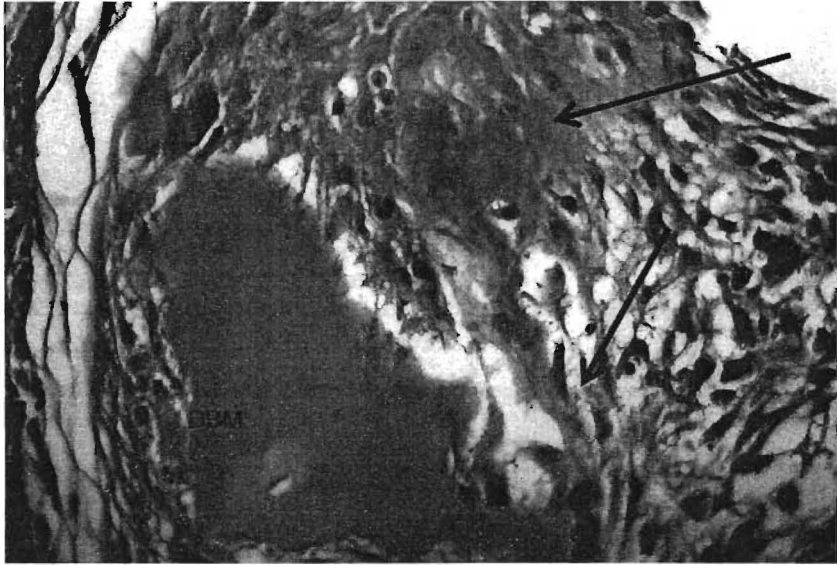
(b) เซลล์เยื่อหุ้มกระดูกกลุ่มที่ได้รับ DBM

จากการศึกษาความสามารถของ DBM, SIS และ DBM ผสมกับ SIS ในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ในสัตว์ทดลอง โดยทำการฝังสิ่งกระตุ้นในชั้นกล้ามเนื้อบริเวณต้นขาหลังของหนูเป็นเวลา 6 สัปดาห์ หลังจากนั้นทำการตรวจวิเคราะห์โดยกล้องจุลทรรศน์ ด้วยการย้อม hematoxylin & eosin จากรูปที่ 25 แสดงให้เห็นผลจากการกระตุ้นด้วย SIS พบว่า SIS ย้อมติดสีชมพู ภายในและบริเวณโดยรอบ SIS พบมีการเจริญของเซลล์เม็ดเลือดขาว (ย้อมติดสีม่วง) มาเก็บกินสิ่งแปลกปลอม (SIS) และภายใน SIS พบมีการสร้างหลอดเลือดเกิดขึ้น จากการฝังด้วย SIS พบว่าไม่มีการสร้างกระดูกใหม่เกิดขึ้น



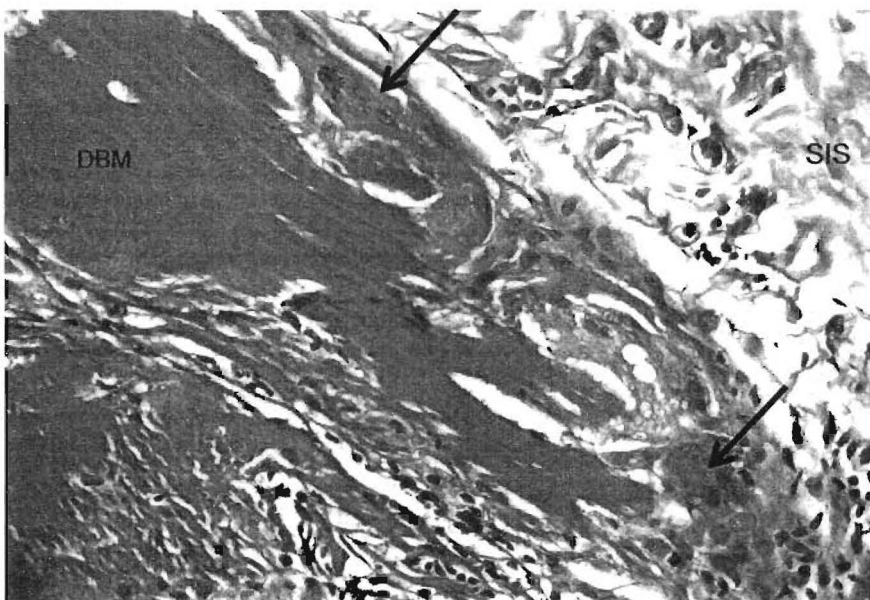
รูปที่ 25 ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์หลังจากทำการฝังด้วย SIS เป็นเวลา 6 สัปดาห์ (กำลังขยาย X40)

จากรูปที่ 26พบว่าหลังจากการฝังด้วย DBM พบว่ามีการกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ โดยกระดูกใหม่ที่เกิดขึ้นย้อมติดสีชมพูอมม่วงอ่อน (บริเวณลูกศรชี้) DBM ที่หลงเหลือย้อมติดสีชมพูเข้ม บริเวณเนื้อเยื่อรอบ DBM พบมีการสร้างหลอดเลือดเกิดขึ้นและพบเม็ดเลือดขาวชนิด lymphocytes และ macrophages บริเวณโดยรอบ DBMจำนวนมากเข้ามาเก็บกินสิ่งแปลกปลอม (DBM) นอกจากนี้ยังพบมีการเจริญของเซลล์ osteoblasts (ย้อมติดสีม่วง) บริเวณโดยรอบของ DBM



รูปที่ 26 ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์หลังจากทำการฝังด้วย DBM เป็นเวลา 6 สัปดาห์ (กำลังขยาย X40)
(—> ลูกศรชี้บริเวณที่มีการสร้างกระดูก)

จากรูปที่ 27 แสดงให้เห็นว่าหลังจากฝังด้วย DBM ผสมกับ SIS พบว่ามีการกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่เกิดขึ้นบริเวณโดยรอบของ DBM แต่ไม่พบกระดูกที่สร้างขึ้นใหม่ในบริเวณที่เป็น SIS นอกจากนี้ยังพบมีการสร้างหลอดเลือดเกิดขึ้นบริเวณ โดยรอบ DBM ซึ่งเป็นการนำพาเซลล์เม็ดเลือดขาวเข้ามาเก็บกินสิ่งแปลกปลอม (DBM และ SIS) และบริเวณขอบ DBM พบมีการเจริญของเซลล์ osteoblasts บริเวณโดยรอบและภายใน DBM ที่หลงเหลืออยู่



รูปที่ 27 ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์หลังจากทำการฝังด้วย DBM ผสมกับ SIS เป็นเวลา 6 สัปดาห์ (กำลังขยาย X40) (—> ลูกศรชี้บริเวณที่มีการสร้างกระดูก)

อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

อภิปรายผลการวิจัย

จากผลการทดลอง พบว่า เซลล์ที่ได้จากเยื่อหุ้มกระดูกมีรูปร่างคล้ายคลึงกับเซลล์ fibroblasts จากการศึกษาวิเคราะห์โปรตีนผิวเซลล์ด้วย flow cytometric analysis ของเซลล์ที่ได้จากเยื่อหุ้มกระดูก พบว่าให้ผลลบต่อ CD34 และ CD45 ซึ่งเป็นโปรตีนบ่งชี้ผิวเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือด (hematopoietic cell surface markers) แสดงว่าเซลล์ดังกล่าวไม่ใช่เซลล์ในระบบเลือด เมื่อตรวจสอบโปรตีนบ่งชี้ผิวเซลล์ CD29 CD44 CD90 และ CD105 พบว่าให้ผลบวก ดังนั้นเซลล์เหล่านี้จึงเป็นเซลล์ที่จะเจริญเป็นเนื้อเยื่อประสาน (mesenchymal cells)

ในการศึกษาความสามารถของ DBM ต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก โดยใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้น 50,000 เซลล์/flask เท่ากันทุกกลุ่มการทดลอง จากนั้นทำการกระตุ้นเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกเป็นเวลา 3, 5, 7 และ 10 วัน แล้วทำการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วยวิธี Tryphan blue staining assay การกระตุ้นใช้ DBM 5 มิลลิกรัม เนื่องจากมีรายงานจากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Zhang และคณะในปี 1997 รายงานไว้ว่า DBM ในปริมาณ 5 มิลลิกรัม มีผลต่อการกระตุ้นให้เกิดการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกได้ดีที่สุดในระดับเซลล์เพาะเลี้ยง และเนื่องจากยังไม่เคยมีการรายงานก่อนหน้าถึงผลที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย SIS จึงทำการแปรผันปริมาณ SIS สำหรับงานวิจัยครั้งนี้ ปริมาณ SIS ที่ใช้ 5, 10 และ 20 มิลลิกรัม สำหรับการกระตุ้นด้วย DBM ผสมกับ SIS ใช้ปริมาณอย่างละ 2.5 มิลลิกรัม ในการกระตุ้นด้วย DBM 5 มิลลิกรัม พบว่า เซลล์มีการเจริญเพิ่มจำนวนมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการกระตุ้น แสดงให้เห็นว่า DBM มีความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกได้ ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าถึงความสามารถของ DBM ในการกระตุ้นให้เกิดการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้ สำหรับในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วย SIS ปริมาณ 5 และ 10 มิลลิกรัม มีผลต่อการกระตุ้นให้เกิดการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เช่นเดียวกับในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วย SIS ปริมาณ 20 มิลลิกรัม เซลล์มีการเจริญเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม จากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า SIS ปริมาณ 5 และ 10 มิลลิกรัม มีผลในการกระตุ้นให้เกิดการเจริญเพิ่มจำนวนได้ดีที่สุด และเป็นปริมาณที่เหมาะสมแก่การนำมาใช้ในการกระตุ้นให้เกิดการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ จากผลที่ได้พบว่า SIS ปริมาณ 5 มิลลิกรัม และ DBM 5 มิลลิกรัม มีความสามารถในการกระตุ้นการเจริญเพิ่มจำนวนได้ดีที่สุด จึงเลือกที่จะใช้ DBM ผสมกับ SIS รวมกันเป็น 5 มิลลิกรัม โดยใช้ SIS และ DBM อย่างละ 2.5 มิลลิกรัม ในการกระตุ้นให้เกิดการเจริญเพิ่มจำนวนและการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกไปเป็นเซลล์

สร้างกระดูก ซึ่งก่อนหน้านี้ยังไม่มีการศึกษาถึงความสามารถของ DBM ผสมกับ SIS ต่อการกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูก การศึกษาความสามารถของ DBM ผสมกับ SIS ต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก พบว่าในวันที่ 7 เซลล์มีการเจริญเพิ่มจำนวนสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) และยังพบว่ามีการกระตุ้นให้เกิดการเจริญเพิ่มจำนวนได้ดีกว่าการกระตุ้นด้วย SIS หรือ DBM เพียงชนิดเดียว โดยจำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากันทุกกลุ่มการทดลอง และหลังจากนั้นพบว่าจำนวนเซลล์มีการลดลง เนื่องมาจากเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกมีการแบ่งตัวลดลงร่วมกับมีการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์สร้างกระดูกมากขึ้น ซึ่งในการกระตุ้นด้วย DBM, SIS และ DBM ผสม SIS ต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้ เนื่องจาก growth factors ที่มีอยู่ใน DBM และ SIS มีการหลั่งออกมากระตุ้นให้เกิดการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์มากขึ้นได้

การตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่บ่งชี้ถึงการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก ยีนที่ควบคุมการแสดงออกของ RUNX2 เป็น osteoblast-specific transcription factor มีบทบาทในการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast differentiation) ซึ่งมีการแสดงออกในช่วงแรกของกระบวนการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ osteoblasts ยีนนี้มีขนาด 270 bp หลังจากกระตุ้นด้วย DBM พบว่ามีการแสดงออกของ RUNX2 สูงขึ้น แสดงให้เห็นว่า DBM มีความสามารถในการชักนำให้เซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกมีการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกได้ เพราะว่า DBM มีองค์ประกอบของ BMP ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นให้เกิดการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก ยีนที่ควบคุมการแสดงออกของ ALP ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม hydrolase พบมากในเซลล์ที่ทำหน้าที่สร้างกระดูก (osteoblasts) โปรตีนนี้พบอยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ osteoblasts ยีนที่ควบคุมการแสดงออกของ ALP มีขนาด 453 bp หลังจากกระตุ้นด้วย DBM, SIS และ DBM ผสมกับ SIS พบว่ามีระดับการแสดงออกของ ALP เพิ่มสูงขึ้น จากผลที่พบแสดงให้เห็นว่า DBM ผสมกับ SIS มีคุณสมบัติในการกระตุ้นให้เซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกมีการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกได้ สำหรับยีนที่ควบคุมการแสดงออกของ COL I เป็น osteoblastic markers เนื่องจากคอลลาเจน ชนิดที่ 1 เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเนื้อกระดูกและสร้างโดยเซลล์สร้างกระดูก (osteoblasts) จากที่พบแสดงให้เห็นว่ายีนควบคุมการแสดงออกของ COL I มีขนาด 461 bp พบว่าหลังจากกระตุ้นด้วย DBM, SIS และ DBM ผสมกับ SIS มีระดับการแสดงออกของ COL I สูงขึ้น ในการศึกษาการแสดงออกของยีนด้วย cDNA array analysis เซลล์กลุ่มที่ได้รับ DBM เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับ DBM เป็นเวลา 7 วัน แล้วทำการวิเคราะห์โดยใช้เกณฑ์อัตราส่วนความเข้มของจุดซึ่งแสดงถึงยีนแต่ละยีนที่ตรงกันระหว่างเซลล์กลุ่มทดลองกับเซลล์กลุ่มควบคุมมีค่ามากกว่า 2 ได้แก่ ยีน Biglycan, TGF β 1, TGF β R1, RUNX2 และ VEGF และอัตราส่วนที่มีค่าน้อยกว่า 0.5 พบว่ามีจำนวน 1 ยีน คือ ยีน

COL14A1 ยีน RUNX2 เป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญของเซลล์กระดูก (osteoblastic marker) ในการเจริญพัฒนา และเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูก ซึ่งมีส่วนช่วยในการสร้างและการเจริญเติบโตของกระดูก นอกจากนี้ TGFβ1, TGFβR1 และ VEGF เป็นยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการเจริญสร้างกระดูก และหลอดเลือดใหม่ รวมทั้ง Biglycan ซึ่งเป็นส่วนสำคัญของสารเนื้อพื้บนนอกเซลล์ของกระดูก (extracellular matrix protein) มีการแสดงออกสูงขึ้น ในทางตรงกันข้าม COL14A1 มีการแสดงออกลดลงซึ่งอาจมีส่วนเกี่ยวข้องในระหว่างเกิดกระบวนการเจริญของเซลล์กระดูก

การศึกษาการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast differentiation) ด้วยวิธี alkaline phosphatase assay เพื่อศึกษาระดับการทำงานของเอนไซม์ ALP เทียบกับปริมาณโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก หลังจากกระตุ้นด้วย DBM, SIS และ DBM ผสมกับ SIS เป็นเวลา 3, 5, 7, 10 วัน และกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้นเนื่องจาก ALP เป็นตัวที่ใช้บ่งชี้ osteoblastic phenotype ซึ่งโปรตีนนี้พบอยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ osteoblasts กลไกการทำงานของ ALP เกิดขึ้น โดยช่วยเร่งปฏิกิริยา transphosphorylation ของ p-nitrophenylphosphate (p-NPP) ไปเป็น p-nitrophenol (p-NP) ซึ่งเป็นสารละลายที่มีสีเหลืองความเข้มข้นของ p-NP ที่เกิดขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับระดับการทำงานของเอนไซม์ ALP ในการกระตุ้นด้วย DBM พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกที่ได้รับการกระตุ้นด้วย SIS พบว่าในช่วง 7 วันแรกระดับการทำงานของเอนไซม์ ALP ไม่มีการเปลี่ยนแปลง และหลังจากนั้นในวันที่ 10 ของการกระตุ้นมีระดับการทำงานของเอนไซม์ ALP เพิ่มขึ้น อาจเนื่องมาจากในเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกในภาวะปกติมีการทำงานของเอนไซม์ ALP อยู่ในระดับหนึ่ง (basal level) ในการกระตุ้นด้วย DBM ผสมกับ SIS ต่อการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก พบว่าระดับการทำงานของเอนไซม์ ALP เพิ่มสูงขึ้นในวันที่ 7 และการกระตุ้นด้วย DBM ผสมกับ SIS มีระดับการทำงานของเอนไซม์ของ ALP เพิ่มสูงขึ้นมากกว่าการกระตุ้นด้วย DBM หรือ SIS เพียงอย่างเดียว แสดงว่า DBM ผสมกับ SIS มีความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกได้ดีกว่าการกระตุ้นด้วย DBM หรือ SIS เพียงชนิดเดียว และจากผลการทดลองระดับการทำงานของเอนไซม์ ALP มีระดับการทำงานสูงที่สุดในวันที่ 7 หลังจากกระตุ้นด้วย DBM หรือ DBM ผสมกับ SIS แสดงให้เห็นว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกมีการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกในวันที่ 7 หลังจากกระตุ้น การศึกษาการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อสายสะดือไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกจากผลการทดลองที่ได้ระดับการทำงานของเอนไซม์ ALP ของเซลล์ที่ได้รับ DBM ในช่วงแรกอยู่ในระดับต่ำ และเพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 7 แสดงว่าเซลล์ในกลุ่มทดลองที่ได้รับ DBM มีการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก และจากการศึกษาด้วยวิธี alkaline phosphatase staining assay ในการทดลองนี้ต้องการทดสอบการแสดงออกของ alkaline phosphatase

ระหว่างเซลล์ที่ไม่ได้รับ DBM และเซลล์ที่ได้รับ DBM จึงทำการทดลองโดยวิธี alkaline phosphatase staining assay ซึ่งปฏิกิริยาที่ได้ผลลบต่อ alkaline phosphatase staining assay เซลล์จะติดสีน้ำเงินเข้ม แสดงว่าไม่มี osteoblastic differentiation ปฏิกิริยาที่ได้ผลบวกต่อ alkaline phosphatase staining assay เซลล์จะติดสีม่วงแดง แสดงว่ามีการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูก จากผลการทดลองเซลล์ที่ไม่ได้รับ DBM ติดสีน้ำเงินเข้มแสดงว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูก ส่วนเซลล์ที่ได้รับ DBM ติดสีม่วงแดงแสดงว่ามีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก

จากการศึกษาความสามารถของ DBM, SIS และ DBM ผสมกับ SIS ในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ในสัตว์ทดลอง โดยทำการฝังในชั้นกล้ามเนื้อบริเวณต้นขาหลังของหนูเป็นเวลา 6 สัปดาห์ จากนั้นทำการตรวจวิเคราะห์โดยการย้อมสีย้อม hematoxylin & eosin และใช้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าบริเวณที่เป็นกล้ามเนื้อจะย้อมติดสีชมพูและเห็นกล้ามเนื้อมีการเรียงตัวกันเป็นระเบียบส่วนบริเวณที่เป็น DBM จะย้อมติดสีชมพูเข้ม กระดูกที่สร้างขึ้นมาใหม่จะย้อมติดสีชมพูอมม่วงอ่อน ๆ และเซลล์เม็ดเลือดขาว osteoblasts พบมีการย้อมติดสีม่วง จากผลการวิเคราะห์พบว่าในกลุ่มที่ทำการฝังด้วย DBM มีการกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ ซึ่งมีเป็นรวมตัวกันของคอลลาเจนโดยเกิดเป็น matrix ที่ยังไม่มีการสะสมแร่ธาตุ พบบริเวณขอบ DBM และบริเวณที่มีการสลายตัวของ DBM และพบว่าบริเวณโดยรอบของ DBM มีการอักเสบ เนื่องจากการชุมนุมของเซลล์เม็ดเลือดขาวในปริมาณมากเข้ามาเก็บกิน DBM ที่เป็นสิ่งแปลกปลอม เม็ดเลือดขาวที่พบเป็นชนิด lymphocytes และ macrophages สามารถเข้ามาเก็บกินสิ่งแปลกปลอมได้โดยการนำพาของหลอดเลือดที่มีการสร้างใหม่ในบริเวณเนื้อเยื่อรอบ DBM ทำให้ DBM ที่พบมีการสลายไปแต่ก็ยังพบ DBM ที่หลงเหลืออยู่ บริเวณขอบ DBM ที่หลงเหลืออยู่ และบริเวณกระดูกที่สร้างขึ้นมาใหม่พบเซลล์ osteoblasts มีลักษณะคล้ายลูกเต๋าที่มีการเรียงตัวกันเป็นระเบียบบริเวณรอบ DBM การที่พบเซลล์ osteoblasts บริเวณรอบ DBM ได้เนื่องมาจาก BMP ที่หลั่งออกมาจาก DBM ผลไปกระตุ้นให้เซลล์ต้นกำเนิดเนื้อเยื่อประสานบริเวณรอบ DBM นั้นได้รับการกระตุ้นจึงเกิดการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก (osteoblasts) และทำให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ สำหรับกลุ่มที่ทำการฝังด้วย DBM ผสมกับ SIS พบว่ามีการกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่บริเวณโดยรอบ DBM มีลักษณะเป็น osteoid เป็นเนื้อพื้นกระดูกที่มีการรวมตัวกันของคอลลาเจนและยังไม่มีการสะสมของแร่ธาตุ และมีการสร้างหลอดเลือดบริเวณรอบและช่องว่างภายใน DBM เนื่องจาก DBM มีโปรตีน growth factors ที่เป็นองค์ประกอบใน DBM มีการกระตุ้นให้เกิดการสร้างหลอดเลือดได้ และมีการนำพาของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด lymphocytes และ macrophages เข้ามาเก็บกินสิ่งแปลกปลอม (DBM และ SIS) ทำให้มีการสลายไปของ DBM และ SIS แล้วยังส่งผลกระตุ้นให้เกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อบริเวณนั้น นอกจากนี้ยังพบอีกว่ามีการเจริญของ osteoblasts บริเวณโดยรอบขอบของ DBM ที่มีการสลายไป เนื่องจากการกระตุ้นของโปรตีนที่หลั่งออกมาจาก DBM ส่วนในกลุ่มที่ฝังด้วย SIS เพียงชนิดเดียว พบว่า

ไม่มีการสร้างกระดูกเกิดขึ้น เนื่องจาก SIS ไม่มี BMP ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นให้เกิดการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก ทำให้ไม่มีสิ่งไปกระตุ้นให้เกิดการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก (osteoblasts) นอกจากนี้พบมีการสร้างหลอดเลือดบริเวณภายในและโดยรอบของ SIS เนื่องจากได้รับการกระตุ้นของโปรตีน growth factors ที่เป็นองค์ประกอบของ SIS ซึ่งมีคุณสมบัติในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างหลอดเลือด เช่น fibroblast growth factor และ vascular endothelial growth factor เป็นต้น โปรตีนเหล่านี้อาจหลั่งออกมาจาก SIS ไปกระตุ้นให้เกิดการสร้างหลอดเลือดขึ้น นอกจากนี้พบเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด lymphocytes และ macrophages บ้างภายใน SIS และบริเวณโดยรอบแต่พบในปริมาณที่น้อยกว่าบริเวณรอบ DBM ในกลุ่มที่มีการฝังด้วย DBM และกลุ่มที่มีการฝังด้วย DBM ผสมกับ SIS จากผลที่เกิดขึ้นแสดงให้เห็นว่า DBM และ DBM ผสมกับ SIS มีความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ได้ สำหรับ SIS เพียงชนิดเดียวไม่มีความสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ได้

สรุปผลการวิจัย

การแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก พบว่ามีเซลล์เจริญเพิ่มจำนวนออกมาโดยรอบเยื่อหุ้มกระดูกหลังจากเพาะเลี้ยง 7 วัน และเซลล์มีลักษณะคล้ายเซลล์ fibroblasts จากนั้นทำการวิเคราะห์การแสดงออกของ CD antigen บนผิวเซลล์ที่แยกได้จากเยื่อหุ้มกระดูกนั้นมีความสัมพันธ์ของเซลล์ mesenchymal stem cells จากนั้นนำเซลล์มาทำการวิเคราะห์การเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก พบว่าในการกระตุ้นด้วย DBM, SIS และ DBM ผสมกับ SIS เซลล์มีการเจริญเพิ่มจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้น (กลุ่มควบคุม) และเมื่อเปรียบเทียบกับระหว่างกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นที่แตกต่างกันพบว่า DBM ผสมกับ SIS กระตุ้นให้เกิดการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้ดีกว่าการกระตุ้นด้วย SIS หรือ DBM เพียงชนิดเดียว

การแสดงออกของยีน osteoblastic markers ที่บ่งชี้การเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูก พบว่าการแสดงออกของยีน osteoblastic markers ของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก มีระดับการแสดงออกของ RUNX2 สูงขึ้นหลังจากที่กระตุ้นด้วย DBM, SIS และ DBM ผสมกับ SIS เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้น (กลุ่มควบคุม) และพบว่ามีการแสดงออกสูงที่สุดหลังจากกระตุ้นด้วย DBM สำหรับระดับการแสดงออกของยีน ALP พบว่าหลังจากที่กระตุ้นด้วย DBM, SIS และ DBM ผสมกับ SIS มีระดับการแสดงออกของยีน ALP สูงขึ้น รวมทั้งกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้นสำหรับระดับการแสดงออกของยีน COL I หลังจากที่ได้รับกระตุ้นด้วย DBM, SIS และ DBM ผสมกับ SIS พบว่ามีระดับการแสดงออกสูงขึ้นในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นและกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้น และการแสดงออกของยีน Biglycan (BGN), Transforming growth factor, beta 1 (TGFβ1), Transforming growth factor, beta receptor 1

(TGF β R1), RUNX2 และ Vascular endothelial growth factor (VEGF) พบมีอัตราส่วนมากกว่า 2 และ Collagen, type XIV, alpha 1 (COL 14A1) พบมีอัตราส่วนที่มีค่าน้อยกว่า 0.5

การเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกไปเป็นเซลล์กระดูก โดยวิเคราะห์จากการทำงานของเอนไซม์ ALP พบว่าหลังจากกระตุ้นด้วย DBM มีระดับการทำงานของเอนไซม์ ALP สูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาด้วยวิธี alkaline phosphatase staining เซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย DBM มีการติดสีแดง ส่วนในเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย DBM ผสมกับ SIS และในกลุ่มที่กระตุ้นด้วย SIS อย่างเดียวมีระดับการทำงานของเอนไซม์ ALP เพิ่มสูงขึ้นในวันที่ 10 หลังจากกระตุ้นเมื่อเปรียบเทียบกับระดับการทำงานของเอนไซม์ ALP ระหว่างกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นที่แตกต่างกันพบว่า DBM ผสมกับ SIS กระตุ้นให้เกิดการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก การกระตุ้นด้วย SIS หรือ DBM เพียงชนิดเดียว

ความสามารถของ DBM, SIS และ DBM ผสมกับ SIS ในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ในสัตว์ทดลอง โดยทำการฝังลงในชั้นกล้ามเนื้อของหนูทดลอง (Wistar rat) เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าในกลุ่มที่มีการฝังด้วย DBM และ DBM ผสมกับ SIS มีการสร้างกระดูกเกิดขึ้น พบเซลล์ osteoblasts และการสร้างหลอดเลือดเกิดขึ้นบริเวณเนื้อเยื่อโดยรอบ และมีการอักเสบเกิดขึ้นเนื่องจากเซลล์เม็ดเลือดขาวจำนวนมากบริเวณโดยรอบ DBM ส่วนในกลุ่มที่ฝังด้วย SIS เพียงชนิดเดียว พบว่ามีการสร้างหลอดเลือดเกิดขึ้น แต่ไม่พบว่าการสร้างกระดูกใหม่เกิดขึ้น และมีการกระตุ้นให้เกิดการอักเสบโดยพบเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งบริเวณโดยรอบ SIS และภายใน SIS แต่พบในปริมาณที่น้อยกว่ากลุ่มที่มีการฝังด้วย DBM

ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาระดับเซลล์เพาะเลี้ยงควรอยู่ในภาวะปราศจากเชื้อทุกขั้นตอน รวมทั้งอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการศึกษา เนื่องจากการศึกษาระดับเซลล์เพาะเลี้ยงเกิดการปนเปื้อนได้ง่ายไม่ว่าจะเป็นการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรีย หรือเชื้อรา เป็นต้น

การฝัง DBM และ DBM ผสมกับ SIS ในชั้นกล้ามเนื้อของหนูทดลอง ควรทำให้ DBM ที่ทำการฝังนั้นมีการจับตัวกันในระดับหนึ่ง เนื่องจากเมื่อทำการฝังไปแล้วหนูทดลองมีการเคลื่อนไหวตามปกติได้ ทำให้ DBM ที่ฝังลงไปอาจมีการเคลื่อนตำแหน่งเป็นผลให้เกิดความผิดพลาดในการเก็บตัวอย่างชิ้นได้ อาจจะมี DBM หลงเหลืออยู่ได้ทำให้ผลการทดลองคลาดเคลื่อน

บรรณานุกรม

- [1] Ahn Hee Hyun, et al. Porcine small intestinal submucosa sheet as a scaffold for human bone marrow stem cell. Biological Macromolecular 41 (2007) : 590-596.
- [2] Kim Suk Moon, et al. Preparation of porcine small intestinal submucosa sponge and their application as a wound dressing in full-thickness skin defect of rat. Biological Macromolecular 36 (2005):54-60.
- [3] สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก และ วินัย พากเพียร. วิทยาศาสตร์การแพทย์ของกระดูกเซลล์ต้นกำเนิดและวิศวกรรมเนื้อเยื่อ. 2550. ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- [4] Stein GS. and Lian JB. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. Endocrine Reviews (14)1993:424-442.
- [5] 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
- [6] Michelson J and Leigh A. Use of demineralized bone matrix in hindfoot arthrodesis. Clinical Orthopaedics and Related Research. 1996
- [7] Shelton W, Papendick L, and Dukes A. Autograft versus allograft anterior cruciate ligament reconstruction. Arthroscopy 1997
- [8] 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
- [9] Zhang M, Powers RM Jr and Wolfinbarger L Jr. A quantitative assessment of osteoinductivity of human deinneralized bone matrix. Journal of Periodontology 68 (1997):1076-1084.
- [10] 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.
- [11] Han B, Tang B, Nimni ME. Quantitative and sensitive in vitro assay for osteoinductive activity of demineralized bone matrix. J Orthop Res. 2003
- [12] Gao J, et al. Osteochondral defect repair by demineralized cortical bone matrix. Clinical Orthopaedics and Related Research 427 (2004): 62-66.

- [13] Graham MF, et al. Collagen content and types in the intestinal stricture of Crohn's disease. Gastroenterology 94 (1988): 257-265.
- [14] Zhao Lin, Zhao Jun-Li, Wan Lin and Wang Shuan-Ke. The study of the feasibility of segmental bone defect repair with tissue-engineered bone membrane: a qualitative observation. Strat Traum Limb Recon 3(2) (2008): 57-64.
- [15] Suckow M.A., et al. Enhanced bone regeneration using porcine small intestinal submucosa. Journal of Investigative Surgery 12 (1999): 277-287.

TISSUE ENGINEERING AND REGENERATIVE MEDICINE

조직공학과 재생의학

Official Journal of the Korean Tissue Engineering and Regenerative Medicine Society

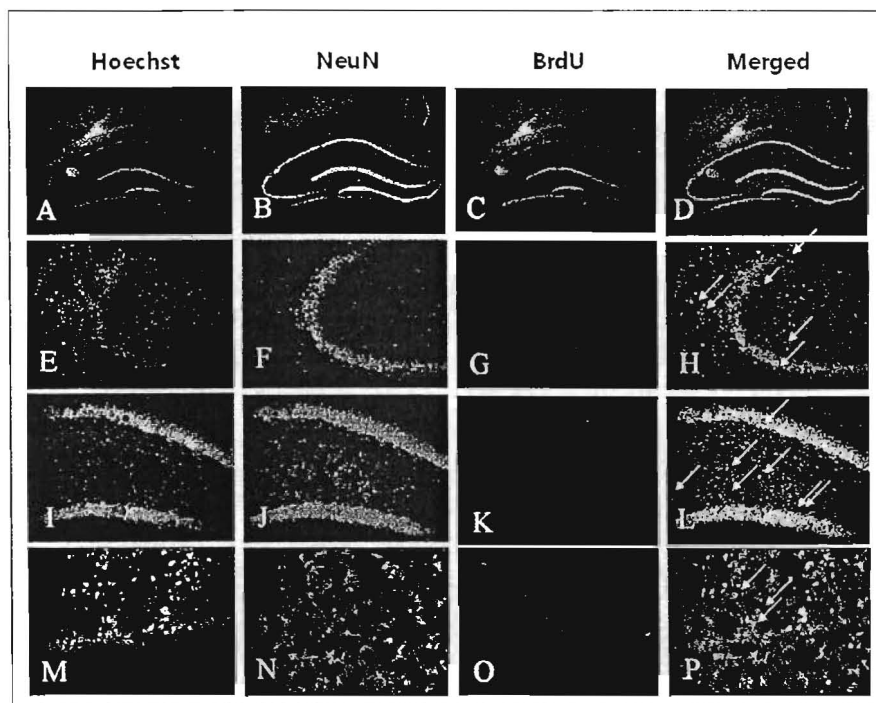
Abstract

TERMIS 2nd World Congress

In conjunction with 2009 Seoul Stem Cell Symposium

Lotte Hotel World, Seoul, Republic of Korea

August 31~September 3, 2009



<http://term.or.kr>

NOW INDEXED BY SCI(E)



한국 조직공학 · 재생의학회

Korean Tissue Engineering and Regenerative Medicine Society

499 NIPAAm-co-Butylacrylate Hydrogels Support Oral Mucosal Epithelium for Corneal Epithelium Biosubstitutes Production

Natalia Becerra,^{1,2} Betty L. López,² Luz M. Restrepo^{1,*}

¹Grupo Ingeniería de Tejidos y Terapias Celulares, Universidad de Antioquia, Fac. Med, Colombia

²Grupo Ciencia de los Materiales, Universidad de Antioquia, SIU, Colombia

(*lrestre@quimbaya.udea.edu.co)

Severe loss of vision can result on corneal epithelium damages. Cultivated oral mucosal epithelium and limbal stem cells grafts are alternative treatments in regeneration of corneal epithelium (Liu, 2007). Autologous epithelial sheets can be made using hydrogels. N-isopropylacrylamide (NIPAAm) hydrogels are useful as carrier free cell layers. They can swell and unswell in response to small temperature variations. (Nishida, 2004). In previous studies, we have synthesized NIPAAm-co-Butylacrylate copolymers to be used as oral mucosal cell culture support in order to obtain corneal epithelial sheets biosubstitutes (Becerra, 2007). Hydrogels were characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM) to correlate the morphology with the cell growth. Its textural porosity make them a good supports to obtain cells layers and to transport nutrients and gases. Oral mucosal cell culture behavior on these hydrogels was studied. Cell viability by direct contact and MTT tests and histomorphological analysis were performed. Cell cultures on TCPS were used as controls. The cells proliferated and formed sheets on the hydrogels and their morphology was similar to the corneal epithelium. These results suggest that NIPAAm-co-butylacrylate hydrogels can be used for tissue engineered corneal epithelium. In order to determine protein adhesion effect, other studies are being conducted.

501 Design of Printed, Porous Scaffolds for Enhanced Oxygenation and Functioning of Embedded Cells

Natalja E. Fedorovich,^{1,*} Elseke Kuipers,¹ Jacqueline Alblas,¹ Wouter J.A. Dhert^{1,2}

¹Department of Orthopaedics, University Medical Center Utrecht, P.O. Box 85500, The Netherlands

²Veterinary Medicine, Utrecht University, P.O. Box 80154, The Netherlands

(*n.e.fedorovich@umcutrecht.nl)

An important focus in bone tissue engineering is the development of large clinically relevant grafts. The challenge is to ensure survival of the seeded multipotent stromal cells (MSCs). The use of porous scaffolds supports the diffusion of oxygen and nutrients to the embedded cells. 3D fiber deposition is a rapid-prototyping technique used here to build porous, cell-laden hydrogel scaffolds. The aim of this study is to investigate the effect of scaffold porosity on oxygenation, survival and osteogenic differentiation of MSCs. Goat MSCs were encapsulated in alginate hydrogel from which porous (50%) and solid rectangular scaffolds (10x10x1mm) were built and incubated in expansion- or osteogenic medium for various time periods (n=4). *In vitro* analysis of cultured scaffolds showed that after 14 days 70% of the cells were alive in porous scaffolds versus 5% in solid grafts. Up to 33% of cells underwent apoptosis inside solid grafts. Osteogenic differentiation, assessed by determining the presence of alkaline phosphatase and collagen type I, was more pronounced in porous scaffolds. Analysis of glucose consumption relative to production of lactate demonstrated that solid scaffolds produced more lactate than porous grafts, indicative of a higher level of anaerobic respiration. To determine the hypoxic status of the cells *in vivo* we detected the presence of hypoxia marker Glut-1 after subcutaneous implantation of porous and solid scaffolds in nude mice, demonstrating that cells embedded in solid scaffolds were highly positive for this marker. Above results demonstrate that porous scaffolds promote oxygenation, survival and functionality of the printed cells.

500 Human Periosteal Mesenchymal Stem Cells in Demineralized Bone Matrix Scaffolds for Bone Tissue Engineering

Dhagoon Dhitiseith,¹ Piyanuch Bamrunpanichtaworn,² Sittisak Honsawek^{2,*}

¹Biomedical Engineering Program, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand, ²Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

(*sittisak.h@chula.ac.th)

Objectives: Mesenchymal stem cells are multipotential cells capable of differentiating into osteoblasts, chondrocytes, adipocytes, and myoblasts. Human periosteal cells contains stem cells that are a rich source of primitive multipotent mesenchymal cells. Demineralized bone matrix (DBM) has been used in orthopedic, periodontal, and maxillofacial applications and investigated as a material to induce new bone formation. The aims of this study were to characterize human periosteal cells (HPO) and to examine interaction between DBM scaffolds with HPO.

Material and methods: The altered gene expression during osteogenesis of HPO was investigated. HPO were studied using *in vitro* functional mesenchymal stem cell assay and were determined their cell surface antigen expression. Osteoblast differentiation of HPO was determined using alkaline phosphatase assay, osteocalcin, and Von Kossa staining assay. Total RNA was isolated from HPO in the absence or presence of DBM scaffolds and analyzed using osteogenesis cDNA gene expression array. The selected genes were verified using RT-PCR.

Results and conclusions: Analysis by flow cytometry demonstrated that HPO express cell surface antigens used to define MSCs isolated from periosteum such as CD29, CD44, CD90 and CD105. DBM-treated HPO were differentiated into osteoblasts that stained positive for alkaline phosphatase, mineralization (calcification) and expressed osteocalcin. When analyzed by cDNA array and RT-PCR, we found that the highly upregulated genes were biglycan, runx2, tgf β 1, tgf β 1 and vegf whereas the highly downregulated genes were collagen 14A1. These results indicated that HPO with DBM scaffolds could provide an alternative approach for bone engineering.

This investigation was supported by TRF (DBG4980017).

502 Biodegradation of Injectable Calcium Silicate Bone Graft Substitutes

Meng-Heng Lai,¹ David Chan-Hen Chen,² Shinn-Jyh Ding^{1,*}

¹Institute of Oral Biology and Biomaterials Science, Chung-Shan Medical University, Taichung City, Taiwan 402, Republic of China

²Institute of Veterinary Microbiology, National Chung-Hsing University, Taichung City, Taiwan 402, Republic of China

(*sjding@csmu.edu.tw)

A variety of biomimetic materials with structural and mechanical equivalence to bone have been developed to repair bone defects. A novel injectable bone substitute material was developed which consisted of gelatin-containing calcium silicate powder as the solid phase and chitosan oligosaccharide solution as the liquid phase. To evaluate the biodegradation, the diametral tensile strength, morphology, phase composition, and weight loss of the composite cements were evaluated after immersion in pH 7.4 Tris-HCl solution. When mixed with water, the cement specimens underwent a hydration step to form a colloidal gel, principally calcium silicate hydrate, which hardened to form a solid cement structure within 30 min. The formation of pores/cracks on immersed surface depended on the immersion time to some extent, consistent with the results of weight loss. Interestingly, the immersion time imposed in this study did have a statistically enhanced effect on mechanical properties. When immersed for 30 days in Tris-HCl solution, the strength values of immersed specimens with and without gelatin and chitosan became 4.4 and 4.2 MPa from the initial strength of 2.6 MPa and 2.2 MPa, respectively, having an increase of about 70%. The immersion-induced increase in mechanical strength was possibly attributable to the more complete hardening during immersion, which was confirmed by phase composition analysis. The incorporation of gelatin and chitosan oligosaccharide into the bone cement may not result in degradation of the mechanical properties of the composite cement. The organic-inorganic hybrid composites might be an acceptable material candidate for bone tissue repair.

803 Mesenchymal Progenitor Cells Derived from Synovium and Infrapatellar Fat Pad as a Promising Source for Superficial Zone Cartilage Tissue Engineering

Sang Yang Lee,^{1,2*} Toshiyuki Nakagawa,¹ and A. Hari Reddi¹

¹Center for Tissue Regeneration and Repair, Department of Orthopaedic Surgery, University of California-Davis, Sacramento, California 95817, USA

²Department of Orthopaedic Surgery, Kobe University Graduate School of Medicine, Kobe, 6500017, Japan

(*sanyang@beige.plala.or.jp)

Superficial zone protein (SZP) is a boundary lubricant of articular cartilage in joints. Since superficial zone chondrocytes selectively synthesize and secrete SZP, SZP has been considered as a zonal molecular marker for superficial zone of articular cartilage. As SZP at the surface of articular cartilage plays an important role in the normal function of synovial joints, the localization of SZP-secreting cells at the surface of tissue-engineered cartilage is prerequisite. The aim of this study is the identification of suitable progenitor cell sources for tissue engineering of superficial zone cartilage. We investigated whether mesenchymal progenitor cells (MPCs) from synovium and infrapatellar fat pad (IFP) have the potential for secretion of SZP following chondrogenic differentiation in an aggregate pellet culture system. SZP was immunolocalized in pellets from synovium-MPCs and IFP-MPCs. The ELISA analysis of SZP demonstrated that chondrogenically differentiated synovium-MPC and IFP-MPC pellets secreted SZP into media. Real-time PCR analysis showed significant up-regulation of SZP mRNA in synovium-MPC and IFP-MPC pellets after chondrogenic differentiation. The synovium-MPCs demonstrated the higher colony-forming, proliferative, and chondrogenic potential, and exhibited greater SZP-secretion following chondrogenic induction compared to IFP-MPCs. Our results indicated that S-MPCs and IFP-MPCs may be possible and useful source of chondroprogenitor cells with SZP-producing ability. In conclusion, both synovium and IFP are promising cell sources for tissue engineering of superficial zone cartilage.

805 Isolation and Characterization of Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Term Chorionic Placenta for Bone Tissue Engineering

Kanok Preativatanyou,¹ Dhagoon Dhitiseith,² Piyanch Bannrunpanichtaworn,¹ Vorapong Phupong,¹ and Sittisak Honsawek^{1*}

¹Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

²Biomedical Engineering Program, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

(*sittisak.h@chula.ac.th)

Objectives: Mesenchymal stem cells (MSC) are extensively used cell source in tissue engineering and regenerative medicine because they can be readily expanded and differentiated *in vitro* as well as *in vivo*. MSC can be obtained from a variety of tissues including human term chorionic placenta. The purpose of this work was to investigate growth, phenotypic characteristics and differentiation potential of isolated mesenchymal stem cells from human term chorionic placenta. Material and methods: We analyzed the cell surface antigen expression of freshly isolated chorionic placenta cells using flow cytometry analysis. The antibodies used were CD29, CD34, CD44, CD45, CD90. The differentiation ability of mesenchymal lineages was detected using specific culture conditions and determined by morphology, histochemical staining and immunocytochemistry. We also determined the osteogenic potential of isolated MSC using alkaline phosphatase assay and reversed transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). Results and conclusions: Flow cytometry of cells demonstrated typical MSC phenotype, positive for CD29, CD44, and CD90, but negative for CD34 and CD45. We have studied the biological activity and osteogenic differentiation capacity of isolated chorionic cells in conditioned media. The cell population consisted of spindle-shaped cells and large flat cells. The cells exhibited potential of differentiation into osteoblasts. Our study shows that chorionic placenta derived cells can differentiate into mesenchymal lineages and be induced to form osteoblast-like cells. Thus, human term chorionic placenta might be a novel promising tissue source for further application of these stem cells in tissue engineering and regenerative medicine. This research was supported by Thailand Research Fund (DBG4980017).

804 Osteogenic Potential of Human Chorion-Derived Stem Cells Induced by rhBMP-2

Kanok Preativatanyou,¹ Natthaporn Tan,² and Sittisak Honsawek^{1*}

¹Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

²Biomedical Science Program, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

(*sittisak.h@chula.ac.th)

Objectives: Human chorion-derived stem cells (CDSCs) display mesenchymal characteristics but little is known about bone tissue engineering aspects. Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) plays an important role in osteoblast differentiation and its bioactivity is widely investigated both *in vitro* and *in vivo*. Therefore, the aim of this study was to evaluate osteogenic potential of CDSCs upon rhBMP-2 stimulation. Materials and methods: A cDNA encoding mature human BMP-2 was amplified by RT-PCR using total RNA isolated from osteosarcoma cells. The BMP-2 construct was cloned into a pRSETc expression vector and then transformed into BL21(DE3) *E. coli*. After IPTG induction, inclusion bodies were harvested and solubilized under denaturing condition. Subsequently, affinity his-tag chromatography and dialysis were performed. Refolded purified rhBMP-2 was further confirmed by SDS-PAGE and Western blot. Bioactivity assay was tested by stimulation of CDSCs cultures with 10-1,000 ng/ml rhBMP-2 for 3 and 7 days. Cytotoxicity was determined by MTT assay. Expression of early osteoblastic markers was verified by semi-quantitative RT-PCR using specific primers such as alkaline phosphatase, Smad2, Runx2, collagen type I and standardized with GAPDH expression. Results and conclusions: MTT assay demonstrated no significant reduction in cell viability. Gene expression analysis revealed that Runx2, a master regulator, was markedly up-regulated 2-fold and 3-fold after incubated with rhBMP-2 (1,000 ng/ml) for 3 and 7 days respectively. Consistently, osteoblast-like morphology was also observed. These findings supported the potential of CDSCs as a promising cell source for a future application in bone tissue regeneration. This investigation was supported by Thailand Research Fund (DBG4980017).

806 The Effect of Cartilage Engineering Using Chondrocyte-hydrogel Combination Covered with Cultured Perichondrial Cell Sheet

Se-Il Park,¹ Jae-Ho Jeong,² Kyu-Shik Jeong,³ Young-Mi Moon² and Myun-Whan Ahn^{4*}

¹Department of Plastic & Reconstructive Surgery, Yeungnam University, Daegu 705-717, Republic of Korea

²Stemtec Korea, Noblesse Plastic Surgery, Daegu 706-190, Republic of Korea

³Department of Veterinary Pathology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Republic of Korea

⁴Department of Orthopedic Surgery, Yeungnam University, Daegu 705-717, Republic of Korea

(*mwahn@med.yu.ac.kr)

A special mesenchymal tissue layer called perichondrium has a chondrogenic capacity and is a candidate tissue for engineering of cartilage. To overcome limited potential for chondrocyte proliferation and re-absorption, we studied a method of cartilage tissue engineering comprising chondrocyte-hydrogel pluronic F-127 complex (CPC) and cultured perichondrial cell sheet (cPCs) which entirely cover CPC. For effective cartilage regeneration, cell-sheet engineering technique of high-density culture was used for fabrication of cPCs. Hydrogel pluronic F-127 as a biomimetic cell carrier used for stable and maintains the chondrocytes. The cPCs was harvested as a single layer and entirely covered CPC. The tissue engineered constructs were implanted into the dorsal subcutaneous tissue pocket on nude mice (n=6). CPC without cPCs were used as a controls (N=6). Engineered cartilage specimens were harvested at 8 weeks after implantation and evaluated with gross morphology and histological examination. Biological analysis was also performed for glycosaminoglycan (GAG) and type II collagen. Grossly, the size of cartilage specimen of cPCs covered group was larger than that of the control. On histological examination, the specimen of cPCs covered group showed typical characteristics of cartilage tissue. The contents of GAG and type II collagen were higher in cPCs covered group than that of the control. These studies demonstrated the potential of such CPC/cPCs constructs to support chondrogenesis *in vivo*. In conclusion, the method of cartilage tissue engineering using cPCs supposed to be an effective method with higher cartilage tissue gain. We suggest a new method of cartilage tissue engineering using cultured perichondrial cell sheet as a promising strategy for cartilage tissue reconstruction.

807 Preparation and Characterization of a Novel Chitosan/demineralized Bone Matrix Composite Scaffold for Bone Regeneration

Sittisak Honsawek,^{1*} Panudda Dechwongya,² Korbtham Sathirakul,² Dhagoon Dhitiseith,³ and Yongyudh Vajaradul²

¹Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

²Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok, Thailand

³Biomedical Engineering Program, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

(*sittisak.h@chula.ac.th)

Objectives: A propitious alternative to supply bone substitutes is to develop living tissue substitutes based on biodegradable materials, which is called bone tissue engineering. Chitosan scaffolds have been shown to possess biological and mechanical properties suitable for tissue engineering and clinical applications. The purpose of this study was to develop a novel chitosan/demineralized bone matrix (DBM) composite scaffold and investigated its potential compared to plain chitosan scaffolds to be used as a bone graft substitute. **Material and methods:** Chitosan scaffolds reinforced by DBM were fabricated with a low-cost, bioclean freeze-drying technique via thermally induced phase separation. The microstructure, mechanical performance, and biological activity of the scaffolds were studied. Scanning electron microscopy was employed to monitor the surface variation of chitosan/DBM porous scaffolds. **Results and conclusions:** Both scaffolds had porosities and pore sizes between 80 and 250 micron. The compressive modulus of composite scaffolds was significantly higher than chitosan scaffolds. The chitosan/DBM scaffolds have been developed with adequate pore structure and mechanical properties to serve as a support for osteoblasts. In parallel studies, the scaffolds are implanted into subcutaneous tissues of rat to evaluate the osteoinductivity of and efficacy of the scaffolds. We have evaluated the biological ability of this chitosan/DBM constructs to induce new bone formation. These studies have demonstrated that composite scaffolds have mechanical properties and porosity sufficient to support ingrowth of new bone tissue, and cell attachment and proliferation data indicate composite scaffolds are promising for bone regeneration. This investigation was supported by Thailand Research Fund (DBG4980017).

809 Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells as an Autologous Source of Neuron-like Cells

Renato Nieto-Aguilar,¹ Deyanira Serrato,¹ Ingrid Garzón,¹ Olga Roda,² Miguel Alaminos,¹ and Antonio Campos^{1*}

¹Tissue Engineering Group, Department of Histology, University of Granada, Spain

²Department of Anatomy and Embryology, University of Granada, Spain (*acampos@ugr.es)

INTRODUCTION: Autologous artificial tissues generated by tissue engineering are potentially useful in regenerative medicine. In this context, human adipose-derived mesenchymal stem cells (HAMSC) can differentiate in vitro into a variety of lineages, suggesting that these cells could be pluripotent. **MATERIAL AND METHODS:** In this experiment, human adipose-derived mesenchymal stem cells (HAMSC) were isolated and cultured from human subcutaneous adipose tissue explants. Subconfluent cultures of HAMSC were incubated in neurogenic medium for 24 h, 10 and 20 days. After this, the cells were subjected to histological analysis and immunofluorescence using nestin antibodies. **RESULTS:** HAMSC were successfully isolated and transdifferentiated into neuron-like cells after incubation in neurogenic medium. The percentage of transdifferentiated HAMSC that expressed the neuronal marker nestin by immunofluorescence was 3.59% in cells incubated in inductive medium for 24 hours, with 20.96% of positive cells after 10 days and 30.05% after 20 days of culture in neurogenic medium. Also, transdifferentiated cells showed that at 24 h of induction 31% of the cells developed a cytoplasmic cell prolongation that resembled a rudimentary axon-like process. When the cells were incubated in neurogenic medium for 10 and 20 days, 44% of the cells showed large axon-like prolongations as well as some small dendritiform cellular extensions. **CONCLUSIONS:** Our results support the neurogenic potential of HAMSC and the potential use of autologous HAMSC as a model for neural disease studies. Supported by SAS P10135/2007 from Junta de Andalucía.

808 Human Mesenchymal Adipose-derived Stem Cells as Inducible Chondro and Osteoprogenitor Cells

Renato Nieto-Aguilar,¹ Deyanira Serrato,¹ Ingrid Garzón,¹ Álvaro Morales,² Miguel Alaminos,¹ and Antonio Campos^{1*}

¹Tissue Engineering Group, Department of Histology, University of Granada, Spain

²Division of Traumatology, University Hospital Virgen de las Nieves, Granada, Spain

(*acampos@ugr.es)

INTRODUCTION: Bioengineered artificial bone and cartilage generated by tissue engineering using autologous stem cell sources, could have potential utility in maxillofacial surgery. In this milieu, one of the most promising sources of stem cells is the adipose tissue, due to its easy access and the high number of stem cells that reside on this tissue. The goal of this study was to generate and characterize transdifferentiated osteocyte-like and chondrocyte-like cells using human adipose-derived mesenchymal stem cells (HAMSC). **MATERIAL AND METHODS:** For this purpose, four explants of skin of complete thickness were obtained, cultured and subcultivated separately in osteogenic or chondrogenic induction medium for 20 days. As controls, non-induced HAMSC were cultured in DMEM basal medium. Then, osteoinduced and chondroinduced HAMSC were stained with alizarin red S and with alcian blue stains respectively to verify the osteogenic and chondrogenic differentiation. Immunofluorescence was carried out using alkaline phosphatase and type II collagen primary antibodies. **RESULTS AND CONCLUSIONS:** HAMSC incubated in osteogenic medium for 20 days generated abundant calcified deposits, which were verified by alizarin red S staining and immunofluorescence. Similarly, chondroinduced cells synthesized high amounts of mucopolysaccharides after 10 days of induction as determined by alcian blue staining, with positive signal for collagen II. These results support the use of autologous HAMSC for the generation of cartilage and bone cells in the laboratory. Supported by P06-CTS-2191 from Junta de Andalucía.

810 Optimization of Protocols of Cryopreservation for Tissues Generated by Tissue Engineering

Ingrid Garzón,¹ Ismael A. Rodríguez,² Salvador Oyonarte,³ Antonio Fernández-Montoya,³ Miguel Alaminos,¹ and Antonio Campos^{1*}

¹Tissue Engineering Group, Department of Histology, University of Granada, Spain

²Histology Department B, Faculty of Odontology, National University of Córdoba, Argentina

³Centro Regional de Transfusión Sanguínea y Banco de Tejidos de Granada y Almería

(*acampos@ugr.es)

INTRODUCTION: After long-term storage of bioengineered tissues, it is necessary to ensure that both cell viability and the rheological properties of these tissues are adequate. However, the most adequate methods and protocols for the preservation and storage of these live bioengineered tissues are still unknown and this is one of the major obstacles in the serial production of these tissues for future clinical applications. In this work, we evaluated the cell viability of live bioengineered tissues subjected to several protocols of cryopreservation. **MATERIALS AND METHODS:** Tissue engineered oral mucosa substitutes consisting of human oral fibroblasts immersed within a fibrin-agarose scaffold were cryopreserved for 60 days in liquid nitrogen using six distinct protocols (A, B, C, D and E, with different concentrations of albumin, M199, glycerol and DMSO; and F, with DMEM medium). Each group of samples was subjected to different freezing and thawing times using a programmable tissue freezer. Analysis of the cryopreserved tissues was performed by determining cell viability by using LIVE/DEAD[®] assay kit. **RESULTS AND CONCLUSIONS:** Cryopreservation of the artificial tissues in DMEM medium resulted in 72% of dead cells, whereas 41%, 67%, 44%, 48%, 75%, 51% and 31% of the cells were alive after cryopreservation using protocols A to G. These results support the use of the protocol E for the cryopreservation of bioengineered oral mucosa substitutes at liquid nitrogen temperature. Supported by P06-CTS-2191 from Junta de Andalucía.

839 Intracellular Calcium Responses of MG-63 Depend on Shear Flow Pattern

So Hee Park,^{1,2} Ok Chan Jeong,¹ and Jung-Woog Shin^{1,2*}

¹National Research Lab of Cellular & Biomech, Dept. of Biomedical Engineering, Inje University, Republic of Korea

²Team of BK21, Dept. of Biomedical Engineering, Inje University, Gimhae, Republic of Korea

(*sjw@bme.inje.ac.kr)

It is known that fluid flow is one of fundamental physiological factors which affect bone remodeling. Therefore, the investigation of an optimal condition of fluid flow is very important in tissue engineering related researches. The degree of intracellular Ca²⁺ expression, one of the secondary messengers, is known to be the parameter in evaluating the cellular responses under flow-induced shear stresses. However, the optimal pattern of shear stressing due to the flow for a specific cell type is still left unidentified. In this study the intracellular Ca²⁺ expression of a single cell (MG-63) was quantitatively measured under various pattern of shear flow to figure out the optimal pattern for the cell. The microchip was used as a flow chamber made of PDMS (polydimethylsiloxane). The channel was coated by fibronectin. The flow rate was controlled by a syringe pumping system (KDS100, KDScientific) and the shear stress was adjusted as 0.5Pa. The experimental groups were classified into 5 based on the pattern of flow patterns: 50s, 100s, 150s, 200s, and 250s (on and off, ex: 50s = 50 sec. flow and 50sec resting). The total duration of flow was 20 minutes. The higher expression of intracellular Ca²⁺ was observed when the cells were stimulated as 100s and 100s for flowing and resting, respectively. From this study, we came to the conclusion that the specific cell of MG-63 has higher cellular activities when it experiences periodic stimulation, especially to the pattern of 100s(on and off). Also, this methodology and system can apply to investigate the cellular responses of other types of cells.

841 Osteoinductivity of Demineralized Bone Matrix/Small Intestinal Submucosa as a Scaffolds for Tissue-Engineered Bone

Dhagoon Dhitiseith,¹ Piyanuch Bamrungranchitaworn,² and Sittisak Honsawek^{2*}

¹Biomedical Engineering Program, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

²Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

(*sittisak.h@chula.ac.th)

Objectives: Demineralized bone matrix (DBM) is extensively used in orthopedic, periodontal, and maxillofacial applications and investigated as a material to induce new bone formation. Small intestinal submucosa (SIS) derived from the submucosa layer of porcine intestine has widely utilized as biomaterial with minimum immune response. The objective of this study was to determine the osteoinductive potential of DBM/SIS scaffolds in the *in vitro* cell culture assay and *in vivo* animal bioassay. **Material and methods:** Human periosteal (HPO) cells were treated with or without DBM/SIS scaffold over 7 days of culture. Cell proliferation was examined by direct cell counting. Osteogenic differentiation of the HPO cells was analyzed with alkaline phosphatase assay. Expression of osteoblastic differentiation of HPO cells was examined by RT-PCR analysis using specific primers for alkaline phosphatase, Runx2, osteocalcin and standardized with GAPDH expression. The Wistar rat muscle implant model was used to evaluate the osteoinductive potential of the DBM and DBM/SIS composites. The scaffold composites were intramuscularly implanted into Wistar rats to evaluate their *in vivo* bone-forming capability. Histological assessments were carried out at 42 days after implantation to determine the new bone formation. **Results and conclusions:** HPO cells could differentiate along osteogenic lineage when treated with either DBM or DBM/SIS. Histological and alkaline phosphatase analysis showed the comparable osteoinductivity of DBM and DBM/SIS. These findings suggest that DBM and DBM/SIS composites could retain their osteoinductivity. Therefore, HPO with DBM/SIS scaffolds may provide an alternative approach for tissue-engineered bone. This research was supported by Thailand Research Fund (DBG4980017).

840 Poly(N-acryloylpiperazine) as Non-Viral Gene Delivery Vector

Jung Im Yun, Yun Suk Jo, Seung Tae Lee, and Jeffrey A. Hubbell*

Integrative Biosciences Institute, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, CH-1015 Lausanne, Switzerland

(*jeffrey.hubbell@epfl.ch)

Delivery of DNA and SiRNA into mammalian cells in gene therapy and basic science is a powerful technique. Here we present the Poly(N-acryloylpiperazine)(PAZ) synthesized by RAFT polymerization as a new class of potential non-viral gene delivery system. GFP-expressing plasmid DNA was condensed with PAZ to transfect mammalian cells. Polyplexes, less than 100 NM, were determined by dynamic light scattering (DLS) and confirmed by transmission electron microscopy (TEM). From zeta potential measurement, polyplexes exhibited positive surface charges between +20 MV and +30 MV in average at from 5 to 80 of N/P ratio. DNA retardation assay confirmed that DNA was effectively condensed with PAZ into polyplexes with positive surface charge. From cell viability tests and *in vitro* transfection experiment performed with HELA cells, PAZ inhibited cell proliferation substantially less than linear-PEI (LPEI), a commercially available transfection agent, and showed comparable transfection efficiency to LPEI in the absence or presence of fetal bovine serum (FBS). PAZ was used to deliver SiRNA for the silencing of GFP gene expression and polyplexes had the ability enough to do the down-regulation of GFP gene, regardless of the absence of FBS. The efficiency of transfection was not different from or significantly higher than LPEI. These results suggest that PAZ can be used as an alternative transfection agent with high safety and efficiency.

842 Cryogel Kits for Plasmid DNA Purification

Güneş Kibar, Erhan Pişkin

Hacettepe University, Chemical Engineering Department and Bioengineering Division, and Biomedtek, Ankara, Turkey

(*kibar@hacettepe.edu.tr, piskin@hacettepe.edu.tr)

Genetic manipulation in diverse applications including gene therapy, the transformation, transcription, ligation, sequence analysis, etc. are made by using Plasmid DNA which carries the respective genes to be transferred to animal cells or microorganisms. It is specifically designed and synthesized, and then multiplied in bacteria, such as *E. Coli* to reach enough amounts, and then purified and used for transfections. It should be pure and in active form which of course depends on the separation protocol applied. There are various systems and materials available with advantages and disadvantages. In this study it is proposed to use polycationic cryogels as purification material. The main matrix that It have been used was polyacrylamide which is a well known material for preparation of cryogels with high porosities and highly open pore structures and N,N-dimethylaminopropyl metakrilat (DMAPMA), polietilenimin (PEI), chitosan were included to create positive charge on the pore surfaces of the cryogels which would allow us to electrostatically adsorb the negatively charged plasmid DNA. Various cryogels were produced by applying standard cryogelation protocol at different conditions including ingredients ratios, temperature and time. Cryogels with different porosities and pore morphologies swell abilities, mechanical properties and charge densities were produced. Pore properties were determined by several optical techniques. Orange-G (negatively charged and fluorescence activity) was used to determine the ion exchange capacity of the cryogel columns. Parallely, green fluorescence protein expressing plasmid was purchased and multiplied in *E. Coli*. Separation of this plasmid from these bacteria is under investigation by using different cryogels that were prepared in this study in order to obtain the most suitable/successful cryogel type.

851 Myoblast Sheet Attenuates Late Remodeling and Preserves Cardiac Function after Left Ventricular Restoration in Rats

Shunsuke Saito, Goro Matsumiya, Shigeru Miyagawa, Atsuhiko Saito, Toru Kuratani, Hajime Ichikawa, Yoshiaki Sawa
 Division of Cardiovascular Surgery, Department of Surgery, Osaka University Graduate School of Medicine, Suita, Osaka, Japan
 (*shunsaito@y-mail.plala.or.jp)

Objectives: To evaluate the preventive effects of myoblast sheet on late remodeling after LV restoration (LVR) in rat myocardial infarction model. **Material and Methods:** Rat myocardial infarction model was established 2 weeks after left anterior descending artery ligation. They were divided into the following 4 groups: sham operation (n=8; Group-Sh), myoblast sheet implantation (n=8; Group-Sheet), LVR by plicating the infarcted area (n=8; Group-LVR) and myoblast sheet implantation with LVR (n=8; Group-Sheet+LVR). LV function was followed-up echocardiographically and maximal LV end-systolic pressure-volume relationship (E_{max}) and LV end-diastolic pressure (LVEDP) were measured using micromanometer-tipped catheter and conductance catheter 4 weeks after the operation. **Results:** LV end-diastolic dimension (LVDd) and ejection fraction (LVEF) significantly improved after the operation in Group-LVR and in Group-Sheet+LVR. However, significant LV re-dilatation and decrease of LVEF were observed in Group-LVR. Addition of myoblast sheet implantation to LVR prevented those later deterioration of LV function in Group-Sheet+LVR. Cardiac catheter study demonstrated significantly higher E_{max} in Group-Sheet+LVR (3.05 ± 0.24 mmHg/ μ L) than in other groups (Group-Sh: 1.08 ± 0.19 mmHg/ μ L, Group-Sheet: 2.03 ± 0.72 mmHg/ μ L, Group-LVR: 0.91 ± 0.66 mmHg/ μ L, $p < 0.05$ vs. Group-Sheet+LVR, respectively) and significantly lower LVEDP in GroupSheet (2.0 ± 0.8 mmHg) and in GroupSheet+LVR (1.9 ± 1.0 mmHg) than in the other 2 groups without myoblast sheet (GroupSh: 5.9 ± 3.1 mmHg, GroupLVR: 8.8 ± 5.8 mmHg, $p < 0.05$ vs. GroupSheet and GroupSheet+LVR, respectively). **Conclusions:** Myoblast sheet implantation may improve long term effect of LVR for ischemic heart disease.

853 Miscibility of High Molecular β -Chitosan/Collagen Blends for Biomedical Application

Jae Sik Na*
 Department of Chemical Engineering, Kwangwoon University, Seoul, 139-701, Republic of Korea
 (*najaesik@kw.ac.kr)

The importance of polymer blending has been increased in recent years, because of the preparation of polymeric materials with desired properties, low basic cost, and improved process ability. Chitin, widely distributed in nature, is a substance that sustains and protects the body of crustaceans and microorganisms. Chitosan is a polyaminosaccharide, which is produced by partial N-deacetylation of chitin. Chitosan and collagen are amongst the most abundant natural polymers in life. Both have intrinsic properties that provide a strong but manipulable scaffolding structure in many multi-cellular organisms. The objective of this study is miscibility of high molecular β -chitosan(of weight)/collagen blends in aqueous solution. The beta-chitosan was prepared from cuttlebone in laboratory. The chitosan with a minimum 80% degree of deacetylation was prepared. The miscibility studies of beta-chitosan/collagen in aqueous solution were carried out by viscometry at 30 and 50, respectively. In this study alpha, beta-chitosan and collagen, as well as blends of these, were characterized and used.

852 Isolation and Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Placental and Musculoskeletal Tissues

Dhakoon Dhitiseith,¹ Natthaphon Tan,² Sittisak Honsawek^{3*}
¹Biomedical Engineering Program, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand
²Biomedical Science Program, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand
³Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand
 (*sittisak.h@chula.ac.th)

Abstract Multipotent mesenchymal stem cells (MSCs) have been known to be easily isolated and expanded from bone marrow aspirates and can differentiate into osteogenic, chondrogenic, adipogenic, and myogenic lineages. These cells are attractive sources of osteoprogenitor cells for bone regeneration. In this study, we characterized human MSCs from the placental tissues (Wharton's jelly umbilical cord and chorion) and the musculoskeletal tissues (periosteum, meniscus, muscle, ligament) using primary cell outgrowth. After confluent within 2 weeks, each cell type was plated and cultured with α -MEM, supplemented with 10% fetal bovine serum in 5% CO₂. The isolated cells during passage 2-4 were trypsinized, collected, and stained with conjugated fluorescent purified primary antibodies at predetermined optimum concentrations (e.g. anti-CD29, CD34, CD44, CD45, CD90, and CD105). The cell surface markers were identified by fluorescence-activated cell sorter (FACS) and analyzed using BD Cell Quest Pro Software. Osteoblast differentiation of MSCs was induced by osteogenic medium (ascorbic acid, dexamethasone, and β -glycerol phosphate) and tested using alkaline phosphatase activity assay. The results showed that these cells exhibited rapid proliferation and were similar to spindle fibroblast-like cells. They displayed high positive MSC cell surface markers such as CD29⁺, CD44⁺, CD90⁺, CD105⁺ but did not express hematopoietic markers (CD34⁻, CD45⁻). The MSCs treated with osteogenic medium demonstrated high alkaline phosphatase activity. These findings implicated that MSCs could be successfully isolated from placental and musculoskeletal tissues and had the capability to differentiate into osteoblasts, which makes them obtain great osteoinductivity. **Acknowledgements** The present study was supported by Thailand Research Fund, DBG4980017. **Key words** FACS, mesenchymal stem cell, osteogenic differentiation

854 Investigation of Antioxidant Activity for alpha, beta-Chitosan

Jae Sik Na*
 Department of Chemical Engineering, Kwangwoon University, Seoul 139-701, Korea
 (*najaesik@kw.ac.kr)

Chitin, found in the shell of crustaceans, the cuticles of insects, and the cell walls of fungi, is the second abundant biopolymer in the nature. Chitin and chitosan possesses many beneficially biological properties such as antimicrobial activity, biocompatibility, biodegradability, hemostatic activity and wound healing property, much attention has been paid to its biomedical applications. Antioxidant properties of fungal chitosan from stipes have also been studied. Chitosan was prepared by alkaline N-deacetylation of alpha, beta-chitin for 60-120min and its antioxidant properties studied. The antioxidant activity was determined by the conjugated diene method. Each alpha, beta-chitosan sample (0.1-10 mg/ml, 100 μ l) in 0.2% acetic acid solution was mixed with 2 ml of 10 ml linoleic acid emulsion in 200 ml sodium phosphate buffer (pH 6.5) in test tubes and placed in darkness at 25°C to accelerate oxidation. After incubation for 15 h, 6 ml of 60% methanol in deionized water was added, and the absorbance of the mixture was measured at 234 nm against a blank in a UV/vis spectrophotometer. Chitosans showed consistent antioxidant activity with increased concentration. Overall, crab chitosan was good in antioxidant activity, scavenging ability on hydroxyl radicals and chelating abilities on ferrous ions and may be used as a source of antioxidants, as a possible food supplement or ingredient in the pharmaceutical industry.