ประสิทธิภาพของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากสารสกัดผิวหนังผสมผงกระดูก ในการหายของแผลกะโหลกหนู

นาย อดิศร หาญวรวงศ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

The efficacy of dermal extracted-bone powder scaffold on the healing of rat 's calvarial bone defects

Mr. Adisorn Hanworawong

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Science
Faculty of Medicine
Chulalongkorn University
Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ประสิทธิภาพของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากสารสกัดผิวหนังผสมผงกระดูกในการหายของแผลกะโหลกหนู
โดย	นาย อดิศร หาญวรวงศ์
สาขาวิชา	สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ถนอม บรรณประเสริฐ

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะคณะแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ อดิศร ภัทราดูลย์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง วิไล ชินธเนศ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ถนอม บรรณประเสริฐ)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ทันตแพทย์ สมชาย เศรษฐศิริสมบัติ)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง วรนุช ธนากิจ)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(พันตำรวจเอก ทันตแพทย์ พิมล บำรุง)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อดิศร หาญวรวงศ์ : ประสิทธิภาพของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากสารสกัดผิวหนังผสมผงกระดูกในการหายของแผลกะโหลกหนู. (The efficacy of dermal extracted-bone powder scaffold on the healing of rat 's calvarial bone defects)

อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ถนอม บุรรณประเสริฐ, 154 หน้า.

วัตถุประสงค์ ศึกษาถึงประสิทธิภาพของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากสารสกัดผิวหนังผสมผงกระดูกซึ่งเป็นวัสดุโพลิเมอร์ธรรมชาติในการหายของแผลกะโหลกหนู โดยประเมินผลประสิทธิภาพของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ด้วยภาพถ่ายเอ็กซ์เรย์คอมพิวเตอร์โดยดูจากบริเวณทึบแสง และการเกิดเนื้อเยื่อกระดูกใหม่จากภาพทางจุลกายวิภาคศาสตร์

วัสดุและวิธีการ นำสารสกัดจากผิวหนัง สารสกัดจากผิวหนังผสมผงกระดูก คอลลาเจนชนิดที่หนึ่งจากวัว คอลลาเจนชนิดที่หนึ่งจากวัวผสมผงกระดูกมาขึ้นรูป แล้วนำไปฝังในแผลขนาด 5 มิลลิเมตรที่กะโหลกศีรษะของหนูวิสต้าร์ เพศเมีย อายุ 12-14 อาทิตย์ จำนวน 24 ตัว โดยแบ่งเป็น 6 กลุ่มกลุ่มละ 4 ตัว คือ กลุ่มจากสารสกัดจากผิวหนัง สารสกัดจากผิวหนังผสมผงกระดูก คอลลาเจนชนิดที่หนึ่งจากวัว คอลลาเจนชนิดที่หนึ่งจากวัวผสมผงกระดูก และผลิตภัณฑ์คอลลาเจนที่ขายในท้องตลาด (CollaPlug®) และกลุ่มสุดท้ายปล่อยให้เกิดการหายของแผลตามธรรมชาติ สิบสองสัปดาห์หลังจากการฝังชิ้นงาน หนูทั้งหมดถูกนำมาทำการุณยฆาต แล้วตัดกะโหลกศีรษะมาเปรียบเทียบการหายของแผลกระดูกทางภาพรังสีด้วยเครื่องเอ็กซเรย์คอมพิวเตอร์ และตรวจเนื้อเยื่อทางจุลกายวิภาคศาสตร์ด้วยการย้อม H&E เพื่อตรวจหาการเกิดเนื้อเยื่อกระดูกใหม่

ผลการศึกษา เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของความทึบแสงที่บริเวณกะโหลกศีรษะหนูจากภาพรังสีทั้งที่บริเวณขอบแผลและกลางแผลของกลุ่มสารสกัดจากผิวหนังและกลุ่มสารสกัดจากผิวหนังที่ผสมผงกระดูก พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ที่บริเวณขอบแผล($p=0.429$) และ ที่บริเวณกลางแผล($p=0.143$)แต่เมื่อเปรียบเทียบการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกใหม่ทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกลุ่มที่ฝังชิ้นงานที่ทำจากสารสกัดจากผิวหนังกับกลุ่มอื่นๆยกเว้นกลุ่มสารสกัดผิวหนังผสมผงกระดูก พบว่ากลุ่มสารสกัดจากผิวหนังมีการสร้างกระดูกใหม่มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) อย่างไรก็ตามเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับกลุ่มสารสกัดผิวหนังผสมผงกระดูก กลับพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p=0.143$) และไม่พบการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกทดแทนเต็มรอยวิการเลย

สรุป โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่ขึ้นรูปจากสารสกัดจากผิวหนังและสารสกัดผิวหนังผสมกระดูกต่างก็มีคุณสมบัติที่ดีในการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกใหม่เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่นๆ อย่างไรก็ตามกระดูกที่เติมลงไปไม่ได้มีส่วนช่วยให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกใหม่ที่ดีกว่าการใช้สารสกัดจากผิวหนังแต่เพียงอย่างเดียว

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต .....

ปีการศึกษา 2552 ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

5074845630 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS : BONE SCAFFOLD / DERMAL SKIN EXTRACTED / BONE POWDER / CALVARIAL BONE DEFECTS / BONE HEALING

ADISORN HANWORAWONG : THE EFFICACY OF DERMAL EXTRACTED – BONE POWDER SCAFFOLD ON THE HEALING OF RAT 'S CALVARIAL BONE DEFECTS . THESIS ADVISOR : ASST.PROF.TANOM BUNAPRASERT, M.D., 154 pp.

Objective: This study aimed to study the properties of the human dermal-extracted solution mixed with bone powder shaped into scaffold on the healing of rat's calvarial bone defects which are determined by radiopaque area in computed tomography (CT scan) and new bone formation in histological study.

Materials and methods: Dermal-extracted solution, dermal-extracted solution mixed with bone powder, bovine collagen type I, and bovine collagen type I mixed with bone powder were structured into scaffolds and embedded into 24 female, aged between 12-14 weeks, wistar rats' calvarial bone defects. The rats were divided into 6 groups which were dermal-extracted solution, dermal-extracted solution mixed with bone powder, bovine collagen type I, bovine collagen type I mixed with bone powder commercial collagen product (CollaPlug®) and sham group. The rats were sacrificed 12 weeks after embedded. The calvarial bone defects were cut and examined with CT scan and Histological study

Results: CT scans showed no statistically differences in both periphery and center of bone defects between dermal-extracted solution and dermal-extracted solution with bone powder (peripheral p=0.429, central p=0.143.) However, from histological study, the bone formation of dermal-extracted solution group was significantly more than the other groups except the dermal-extracted solution mixed with bone powder. The bone formation of dermal-extracted solution group was not statistically different from the dermal-extracted solution mixed with bone powder group. No complete bone bridge was found in any defects.

Conclusion: Scaffolds from dermal-extracted solution and dermal-extracted solution mixed with bone powder both have osteoinductive property. However, bone powder did not improve the property of scaffolds.

Field of Study : Medical Science Student's Signature .....

Academic Year : 2552 Advisor's Signature .....

กิตติกรรมประกาศ

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2551

ขอบคุณศูนย์เนื้อเยื่อชีวภาพ ศิริราชพยาบาลที่อนุเคราะห์เนื้อเยื่อกระดูก ในการทำวิจัย

ขอบคุณโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทยที่อนุเคราะห์ผิวหนังได้รับจากศพที่มีผู้บริจาคร่างกายภายหลังเสียชีวิต

นอกจากนี้คณะผู้ทำการวิจัยขอขอบพระคุณ อาจารย์ดังรายนามต่อไปนี้ที่มีส่วนช่วยให้งานวิจัยดำเนินไปได้อย่างดี ด้วยการให้ข้อมูลรวมไปจนถึงเสนอข้อคิดเห็นต่างๆ

รศ.นพ.ทพ.สมชาย เศรษฐศิริสมบัติ

รศ.ทพ.ดร.ประสิทธิ์ ภวสันต์

รศ.พญ.วิไล ชินธเนศ

พอ.ทพ.พิมล บำรุง

ทญ.เพกา จรุงกิจอนันต์

ในการอ่านผลทางพยาธิวิทยาได้รับความกรุณาจาก รศ. พญ. วรนุช ธนากิจ และในการประเมินผลทางภาพรังสีได้รับความร่วมมือจากอาจารย์ทันตแพทย์หญิงพสุเพ็ญ โกศัลลกุฐ

นอกจากนี้ยังได้รับความช่วยเหลือในเรื่องการทดลอง การเตรียมการผ่าตัดจากนิสิตระดับบัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาฯ และเจ้าหน้าที่นักวิทยาศาสตร์ทุกท่าน

นายฐากูร ฐิติเศรษฐ์

ดร.จุฑามาศ รัตนวราภรณ์

นสพ.อาจอง อาธิปธรรมวารี

นายเกษม ธีรกฤตยากร

และงานวิจัยนี้จะไม่สามารถเสร็จลุล่วงไปได้หากไม่ได้รับความร่วมมือจากน้อง ๆ นิสิตระดับบัณฑิตศึกษา คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาฯ ในความควบคุมของ

รศ.ดร.ศิริพร ดำรงศักดิ์กุล

ผศ.ดร.โสรดา กนกพานนท์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฎ

สารบัญภาพ..... ฎ

บทที่

1 บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา (Background and Rationale)..... 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย (objectives)..... 6

1.3ข้อตกลงเบื้องต้น (Assumption)..... 6

1.4 กรอบแนวความคิด (conceptual framework and scope of research)..... 7

1.5 สมมุติฐานในการวิจัย (hypothesis)..... 8

1.6 ข้อจำกัดในการวิจัย (Limitation)..... 8

1.7 ประโยชน์ที่จะได้รับ (Expected benefit and application)..... 8

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้องกับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Relevant Theory for Tissue Engineering)..... 9

2.1.1 การต่อต้านจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Immune response)..... 9

2.1.2 องค์ประกอบของสารนอกเซลล์ (Extracellular matrix composition)..... 9

2.1.3 ปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์และสารนอกเซลล์ (Cell-Extracellular matrix interactions)..... 10

2.2 สรีระวิทยาของกระดูก (Bone Physiology)..... 11

2.2.1 เมทริกซ์นอกเซลล์ของกระดูก (Bone Extracellular Matrix)..... 11

2.2.2 เซลล์กระดูกและเมตาบอลิซึมของกระดูก
(Bone Cell and Bone Metabolism)..... 12
2.2.3 โครงสร้างของกระดูก (Bone structure)..... 13
2.2.3.1โครงสร้างของกระดูกที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า
(macroscopic structure)..... 13
2.2.3.2โครงสร้างของกระดูกจากกล้องจุลทรรศน์
(microscopic structure)..... 13
2.2.4 กระบวนการสร้างกระดูก (Bone Formation) 13
2.2.4.1 Intramembranous ossification..... 13
2.2.4.2 Endochondral ossification..... 13
2.2.4.3 กระบวนการสร้างกระดูกทดแทน
(New Bone Formation)..... 13
2.3 Biomaterials..... 15
2.3.1 Regenerative Biomaterials..... 15
2.3.2 วัสดุแทนกระดูก (Bone Grafting Materials)..... 15
2.3.2.1 Autogenous Bone..... 15
2.3.2.2 Allografts..... 15
2.3.2.3 Xenografts..... 16
2.3.2.4 Alloplasts..... 16
2.4 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (Review of related literatures) 16

3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี..... 21
3.2 การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์สำหรับกระดูก..... 23
3.2.1 การเตรียมสารสกัดจากผิวหนัง..... 23
3.2.2 การเตรียมผงกระดูก..... 24
3.2.3 การเตรียมสารละลายคอลลาเจน..... 26
3.2.4 การขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์..... 26
3.3 ขั้นตอนก่อนผ่าตัด..... 27
3.3.1 สัตว์ทดลอง..... 27
3.3.2 การแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลอง..... 27

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.3 การเตรียมชิ้นงาน..... 28
3.3.4 ห้องผ่าตัด..... 28
3.3.5 แบบบันทึกข้อมูลสัตว์ทดลอง..... 28
3.4 ขั้นตอนการผ่าตัด 28
3.4.1 การดมยาหนู 28
3.4.2 การทำแผลบนกะโหลกศีรษะหนู..... 29
3.4.3 การฝังชิ้นงาน..... 30
3.5 การจัดการหนูหลังผ่าตัด..... 36
3.6 การเก็บข้อมูลหลังการผ่าตัด..... 36
3.6.1 การบันทึกติดตามอาการของหนูทดลอง..... 36
3.6.2 การเก็บตัวอย่างชิ้นงานจากกะโหลกศีรษะหนู..... 38
3.7การวิเคราะห์ข้อมูลทางจุลกายวิภาคศาสตร์ 41
3.8การวิเคราะห์ข้อมูลทางภาพรังสี..... 43
3.9 ค่าสถิติ..... 43

4.ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 ข้อมูลทางภาพรังสี..... 44
4.1.1ข้อมูลทางภาพรังสีกลุ่ม negative control..... 44
4.1.2 ข้อมูลทางภาพรังสีกลุ่ม CollaPlug®..... 46
4.1.3 ข้อมูลทางภาพรังสีกลุ่ม Bovine collagen type I..... 48
4.1.4 ข้อมูลทางภาพรังสีกลุ่ม Bovine collagen type I ผสมผงกระดูก..... 50
4.1.5ข้อมูลทางภาพรังสีกลุ่ม สารสกัดผิวหนัง..... 53
4.1.6ข้อมูลทางภาพรังสีกลุ่ม สารสกัดผิวหนังผสมผงกระดูก..... 56
4.2 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลเชิงเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มตัวอย่างทางภาพรังสี..... 58
4.3 ข้อมูลทางจุลกายวิภาคศาสตร์..... 60
4.3.1 ข้อมูลทางจุลกายวิภาคศาสตร์กลุ่ม negative control..... 60
4.3.2 ข้อมูลทางจุลกายวิภาคศาสตร์กลุ่ม CollaPlug®..... 63
4.3.3 ข้อมูลทางจุลกายวิภาคศาสตร์กลุ่ม Bovine collagen type I 66
4.3.4 ข้อมูลทางจุลกายวิภาคศาสตร์กลุ่ม Bovine collagen type I ผสมผง
กระดูก..... 69
4.3.5 ข้อมูลทางจุลกายวิภาคศาสตร์กลุ่ม สารสกัดผิวหนัง..... 72

4.3.6 ข้อมูลทางจุลกายวิภาคศาสตร์กลุ่ม สารสกัดผิวหนังผสมผง
กระดูก..... 76
4.4ผลการวิเคราะห์ข้อมูลเชิงเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มตัวอย่างทางจุลกายวิภาคศาสตร์.. 80

5.สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ
5.1 สรุปผลการวิจัย..... 81
5.2 อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ..... 82

รายการอ้างอิง..... 84

ภาคผนวก 88
ภาคผนวก ก แบบบันทึกข้อมูลสัตว์ทดลอง..... 89
ภาคผนวก ข ภาพรังสี..... 97
ภาคผนวก ค ผลวิเคราะห์ทางจุลกายวิภาคศาสตร์..... 113
ภาคผนวก ง ตารางสถิติ..... 136

ประวัติผู้แต่งวิทยานิพนธ์..... 154

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่1.1 ตารางเปรียบเทียบวัสดุแทนกระดูกชนิดต่างๆที่มีอยู่ในท้องตลาดใ..... 1
ตารางที่1.2 การเลือก Grafting material ใน bone defect ต่าง ๆ..... 3
ตารางที่1.3 เปรียบเทียบสารองค์ประกอบของ Extracellular matrix ในเนื้อเยื่อผิวหนังแท้....5
ตารางที่3.1 แสดงการฝังชิ้นงานในสัตว์ทดลองแบบสุ่ม..... 28
ตารางที่4.1 แสดงการเกิดการสะสมของแคลเซียมทีบริเวณกะโหลกศีรษะหนูที่บริเวณขอบแผล..... 59
ตารางที่4.2 แสดงการเกิดการสะสมของแคลเซียมทีบริเวณกะโหลกศีรษะหนูที่บริเวณกลางแผล..... 59
ตารางที่4.3 แสดงผลการเกิดเนื้อเยื่อกระดูกใหม่ที่บริเวณแผลที่กะโหลกศีรษะหนูที่ทำการฝังชิ้นงานชนิดต่างๆ..... 80

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่ 3.1 เนื้อเยื่อผิวหนังเมื่อลอกผิวหนังชั้นหนังกำพร้าออกจนหมด 23
ภาพที่ 3.2 สารละลายผิวหนังชั้นหนังแท้..... 24
ภาพที่ 3.3 กระดูกที่ผ่านการตัดด้วยเลื่อย..... 25
ภาพที่ 3.4 ผงกระดูกที่ผ่านการบด..... 26
ภาพที่ 3.5 การฉีดยาสลบหนู..... 28
ภาพที่ 3.6 แสดงการกรอกะโหลกศีรษะหนู..... 29
ภาพที่ 3.7 แสดงการหยิบชิ้นกระดูกออกจากกะโหลกศีรษะหนู..... 30
ภาพที่ 3.8 แสดงการวางชิ้น CollaPlug® ลงใน แผลบริเวณกะโหลกหนู..... 31
ภาพที่ 3.9 แสดงการวางชิ้น Bovine collagen type I ลงใน แผลบริเวณกะโหลกหนู..... 32
ภาพที่ 3.10 แสดงการวางชิ้น Bovine collagen type I ผสมผงกระดูกลงในแผลบริเวณ
กะโหลกหนู..... 33
ภาพที่ 3.11 แสดงการวางชิ้นงานจากสารสกัดผิวหนังลงในแผลบริเวณกะโหลกหนู..... 34
ภาพที่ 3.12 แสดงการวางชิ้นงานจากสารสกัดผิวหนังผสมผงกระดูกลงในแผลบริเวณ
กะโหลกหนู..... 35
ภาพที่ 3.13 แสดงกลุ่ม negative control..... 36
ภาพที่ 3.14 แสดงตัวอย่างแผลที่สัปดาห์ที่สองหลังการผ่าตัด..... 37
ภาพที่ 3.15 แสดงตัวอย่างแผลที่สัปดาห์ที่สี่หลังการผ่าตัด..... 37
ภาพที่ 3.16 แสดงตัวอย่างการเปิด flap 38
ภาพที่ 3.17 แสดงตัวอย่างการใช้ เครื่อง Micromotor ตัดด้วย diamond disc..... 39
ภาพที่ 3.18 แสดงชิ้นงานที่ฝังอยู่ในกะโหลกหนู..... 40
ภาพที่ 3.19 แสดงการจัดการชิ้นงานภายหลังผ่าแยกจากกะโหลกหนู..... 42
ภาพที่ 4.1 แสดงภาพตัดในแนว Axial จาก CT-Scan ของชิ้นงานกลุ่ม negative..... 44
ภาพที่ 4.2 แสดงภาพตัดในแนว coronal จาก CT-Scan ของชิ้นงานกลุ่ม negative..... 45
ภาพที่ 4.3 แสดง ภาพจาก X-ray Digital ของชิ้นงานกลุ่ม negative control ไม่พบว่ามีการ
ตกผลึกของแคลเซียมที่บริเวณกลางรอยวิการของกระดูก..... 45
ภาพที่ 4.4 แสดงภาพตัดในแนว Axial จาก CT-Scan ของชิ้นงานกลุ่ม CollaPlug®. 46
ภาพที่ 4.5 แสดงภาพตัดในแนว coronal จาก CT-Scan CollaPlug®..... 47
ภาพที่ 4.6 แสดง ภาพจาก X-ray Digital ของชิ้นงานกลุ่ม CollaPlug® 47

ภาพที่ 4.7 แสดงภาพตัดในแนว Axialจาก CT-Scan ของชิ้นงานกลุ่ม Bovine collagen type I (SM)..... 48
ภาพที่ 4.8 แสดงภาพตัดในแนว coronal จาก CT-Scan ของชิ้นงานกลุ่ม Bovine collagen type I (SM)..... 49
ภาพที่ 4.9 แสดง ภาพจาก X-ray Digital ของชิ้นงานกลุ่ม Bovine collagen type I (SM)...50
ภาพที่ 4.10 แสดงภาพตัดในแนว Axialจาก CT-Scan ของชิ้นงานกลุ่ม Bovine collagen type I + bone powder (SM/BP 40/60)..... 51
ภาพที่ 4.11 แสดงภาพตัดในแนว coronal จาก CT-Scan ของชิ้นงานกลุ่ม Bovine collagen type I + bone powder (SM/BP 40/60)..... 52
ภาพที่ 4.12 แสดง ภาพจาก X-ray Digital ของชิ้นงานกลุ่ม Bovine collagen type I + bone powder (SM/BP 40/60)..... 53
ภาพที่ 4.13 แสดงภาพตัดในแนว Axial จาก CT-Scan ของชิ้นงานกลุ่มสารสกัดจากผิวหนัง 54
ภาพที่ 4.14 แสดงภาพตัดในแนว coronal จาก CT-Scan ของชิ้นงานกลุ่มสารสกัดจากผิวหนัง 55
ภาพที่ 4.15 แสดง ภาพจาก X-ray Digital ของชิ้นงานกลุ่ม สารสกัดผิวหนัง ลูกศรสีแดงแสดงให้เห็นการตกผลึกของแร่ธาตุที่บริเวณกลางรอยแผล..... 55
ภาพที่ 4.16 แสดงภาพตัดในแนว Axial จาก CT-Scan ของชิ้นงานกลุ่มสารสกัดจากผิวหนังผสมผงกระดูก 56
ภาพที่ 4.17 แสดงภาพตัดในแนว Axial จาก CT-Scan ของชิ้นงานกลุ่มสารสกัดจากผิวหนังผสมผงกระดูก 57
ภาพที่ 4.18 แสดง ภาพจาก X-ray Digital ของชิ้นงานกลุ่ม สารสกัดผิวหนังผสมผงกระดูก 58
ภาพที่ 4.19 ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกลุ่ม negative control ที่กำลังขยาย 4X 60
ภาพที่ 4.20 ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกลุ่ม negative control ที่กำลังขยาย 10X 61
ภาพที่ 4.21 ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกลุ่ม negative control ที่กำลังขยาย 20X 62
ภาพที่ 4.22 ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกลุ่ม CollaPlug® ที่กำลังขยาย 4X..... 63
ภาพที่ 4.23 ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกลุ่ม CollaPlug® ที่กำลังขยาย 10X.....64

ภาพที่ 4.24 ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกลุ่ม CollaPlug® ที่กำลังขยาย 20X.....65
ภาพที่ 4.25 ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกลุ่ม Bovine collagen type I ที่
กำลังขยาย 4X 66
ภาพที่ 4.26 ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกลุ่ม Bovine collagen type I ที่
กำลังขยาย 10X 67
ภาพที่ 4.27 ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกลุ่ม Bovine collagen type I ที่
กำลังขยาย 20X 68
ภาพที่ 4.28 ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกลุ่ม Bovine collagen type I-BP ที่
กำลังขยาย 4X 69
ภาพที่ 4.29 ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกลุ่ม Bovine collagen type I-BP ที่
กำลังขยาย 10X 70
ภาพที่ 4.30 ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกลุ่ม Bovine collagen type I-BP ที่
กำลังขยาย 20X 71
ภาพที่ 4.31 ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกลุ่ม สารสกัดผิวหนัง ที่กำลังขยาย 4X...72
ภาพที่ 4.32 ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกลุ่มสารสกัดผิวหนัง ที่กำลังขยาย 10X..73
ภาพที่ 4.33 ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกลุ่มสารสกัดผิวหนัง ที่กำลังขยาย 20X..75
ภาพที่ 4.34 ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกลุ่มสารสกัดผิวหนังผสมผงกระดูก ที่
กำลังขยาย 4X.....76
ภาพที่ 4.35 ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกลุ่มสารสกัดผิวหนังผสมผงกระดูก ที่
กำลังขยาย 10X..... 77
ภาพที่ 4.36 ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกลุ่มสารสกัดผิวหนังผสมผงกระดูก ที่
กำลังขยาย 20X..... 79

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา (Background and Rationale)

ในปัจจุบันมีการใช้วัสดุแทนกระดูกเพื่อทดแทนความวิการของเนื้อเยื่อกระดูกบริเวณต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่บริเวณกระดูกขากรรไกรทั้งบนและล่าง เพื่อเพิ่มปริมาณเนื้อเยื่อกระดูกให้เพียงพอต่อการใส่ฟัน เช่นการทำงานรากฟันเทียม โดยกระดูกเบ้าฟัน (Alveolar process of jaw bone) เป็นบริเวณที่มีกระบวนการสร้างและทำลายของกระดูกในปริมาณที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับส่วนอื่นๆของกระดูกขากรรไกร ในปัจจุบันมีวัสดุแทนกระดูกหลายชนิดดังแสดงในตารางที่ 1 อย่างไรก็ตามการปลูกกระดูกด้วยเนื้อเยื่อกระดูกของผู้ป่วยเอง นับว่ามีความสำเร็จสูงกว่าการใช้วัสดุแทนกระดูกชนิดต่างๆ แต่การทำการปลูกกระดูกด้วยเนื้อเยื่อกระดูกของผู้ป่วยเอง ต้องมีการผ่าตัดหลายบริเวณ เพื่อให้ได้ปริมาณของกระดูกของผู้ป่วยเพียงพอที่จะนำมาปลูกในบริเวณที่มีการละลายตัวลงของกระดูกเบ้าฟัน ซึ่งสร้างความเจ็บปวดทรมานให้กับผู้ป่วยเป็นอย่างยิ่ง นอกจากนั้นอาจจะเกิดผลข้างเคียงมากมายตามมา ไม่ว่าจะเป็น การอักเสบจากการติดเชื้อ หรือการกระทบกระเทือนอวัยวะข้างเคียงเช่นเส้นประสาท ต่างๆ ทำให้เกิดอาการชาที่ริมฝีปากได้ (Charles A. Babbush 2010; Garg, 2004) ด้วยเหตุผลต่างๆที่กล่าวมา ทำให้ผู้ป่วยจำนวนมากเลือกที่จะใช้วัสดุแทนกระดูกที่มีขายอยู่ตามท้องตลาดซึ่งจัดแบ่งได้ดังตารางที่ 1.1

Graft material	resorption	Volume available	Relative cost
Mandibular symphysis	4-8 Mo	5 ML	-
Maxillary tuberosity	3-6 Mo	2-4 ML	-
Bone of surgical site	3-7 Mo	0.5-2.5 ML	-
Bone from drilling	1-3 Mo	0-0.5 ML	-
Allografts (Puros,FDBA,DFDBA, etc)	2-15 Mo	ไม่จำกัด	สูง
Alloplasts, Xenografts (Pepgen P-15,Bio-Oss,etc)	15-36 Mo	ไม่จำกัด	สูงมาก
Synthetic materials,ceramic (Perioglas, Biogran , etc)	18-24 Mo	ไม่จำกัด	ปานกลาง

ตารางที่1.1 ตารางเปรียบเทียบวัสดุแทนกระดูกชนิดต่างๆที่มีอยู่ในท้องตลาด
ที่มา แปลจาก Arun K. Garg , *Bone physiology for Dental Implantology*

วัสดุแทนกระดูกที่ขายอยู่ในท้องตลาดดังกล่าว ต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศ จึงมีราคาสูง แต่อย่างไรก็ตามยังมีความต้องการใช้วัสดุแทนกระดูกดังกล่าวในปริมาณที่สูง เนื่องจากคนไทยส่วนใหญ่มีการละลายตัวของกระดูกขากรรไกรในปริมาณสูง จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่ากระดูกเบ้าฟันมีการละลายตัวอย่างรวดเร็วมากในปีแรก และภายหลังถอนฟันเพียงสามปี กระดูกเบ้าฟันมีการละลายตัวลงในแนวดิ่ง 40 -60 % และละลายตัวลงต่อเนื่องอีกปีละ 0.25-0.5 % นอกจากนั้นแล้วในแนวขวางของสันกระดูก ยังมีการละลายตัวลง 50% ในปีแรกโดยที่สองในสามของระยะที่มีการละลายตัวลงเกิดขึ้นในสามเดือนแรกหลังการถอนฟัน (Irinakis, 2006) ดังนั้นการรักษาปริมาตรของกระดูกเบ้าฟันไม่ให้มีการละลายตัวลงภายหลังถอนฟัน ทั้งความกว้างและความสูงของระดับกระดูกเบ้าฟัน (Alveolar ridge preservation) จึงมีความจะเป็นอย่างยิ่งสำหรับการใส่ฟันด้วยรากฟันเทียม และในกรณีที่มีการละลายตัวลงของกระดูกเบ้าฟันแล้วก็จำเป็นที่จะต้องมีการปลูกกระดูกขึ้นทดแทน(Greenwald *et al.*, 2001)

อย่างไรก็ตามวัสดุแทนกระดูกส่วนใหญ่ยังมีข้อจำกัดและปัญหาในการใช้งาน ดังต่อไปนี้

1. วัสดุแทนกระดูกที่อยู่ในกลุ่มเซรามิค ไม่มีคุณสมบัติในการเหนี่ยวนำเอาเซลล์ต้นกำเนิดมายังบริเวณที่ปลูกกระดูก (Meijer *et al.*, 2008)
2. วัสดุในท้องตลาด ส่วนใหญ่มีลักษณะเป็น particle ทำให้ควบคุมรูปร่างยาก
3. วัสดุที่มีในท้องตลาดปัจจุบันส่วนใหญ่ ต้องใช้งานร่วมกับ GTR (Guided Tissue Regeneration) หรือ GBR (Guided Bone Regeneration) ทำให้ต้องทำการผ่าตัดหลายครั้ง(Charles A. Babbush 2010)
4. วัสดุแทนกระดูกที่นำเข้าจากต่างประเทศมีราคาสูงเช่น PepGen P-15 ราคาสูงมากส่วน Bio-Oss, Biogran และ Cerasorb ราคาค่อนข้างสูง เนื่องจากต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศ

โดยในปัจจุบันการเลือกใช้วัสดุแทนกระดูกชนิดต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นกระดูกจากร่างกายของผู้ป่วยเอง (Autogenous bone), กระดูกจากสิ่งมีชีวิตสปีชีส์เดียวกัน (Allografts bone), กระดูกจากการสังเคราะห์ (Alloplasts bone) หรือวัสดุแทนกระดูกชนิดสังเคราะห์ (Synthetic bone grafting material) ขึ้นอยู่กับ Osteogenic potential ของความวิการของกระดูก ตามตารางที่ 1.2

Osteogenic potential of defect	Recommended graft material
High	100% bone grafting material
Medium	40% Autogenous bone + 60% bone grafting material
Low	90% Autogenous bone + 10% bone grafting material

ตารางที่1.2 การเลือก Grafting material ใน bone defect ต่าง ๆ

ที่มา จาก Arun K. Garg , *Bone physiology for Dental Implantology*

โดยที่การพิจารณา osteogenic potential ของความวิการของกระดูก ดูจากปริมาณของกระดูกที่เหลืออยู่ หากมีปริมาณกระดูกที่เหลืออยู่มากแสดงให้เห็นถึง osteogenic potential ที่สูง และพิจารณาตำแหน่งของความวิการของกระดูก ว่าเป็นบริเวณที่มีการเคลื่อนไหวหรือรับแรงจากการบดเคี้ยวหรือไม่ นอกจากนั้นยังพิจารณาถึงการมีเส้นเลือดไปเลี้ยงในบริเวณความวิการของกระดูกอีกด้วย เช่น การทำการปลูกกระดูกบริเวณ maxillary sinus มี osteogenic potential ของ defect สูงกว่าการทำการปลูกกระดูกบริเวณ กระดูกขากรรไกรล่าง (mandible) อย่างไรก็ตาม โดยภาพรวมของความวิการของกระดูกเบ้าฟัน มี osteogenic potential อยู่ในระดับที่สูง หากไม่มีการติดเชื้อผ่านทางโพรงประสาทฟัน การอักเสบของเหงือก (gingivitis) หรือมีการอักเสบของเหงือกร่วมไปกับการละลายตัวของกระดูก (periodontitis) (Cawood and Howell, 1988; Garg, 2004)

ผู้ทำการวิจัยจึงต้องการที่จะพัฒนา bone grafting material ซึ่งจะเป็นวัสดุแทนกระดูกที่ใช้ในงานทันตกรรมรากเทียม มีคุณสมบัติที่ดีดังต่อไปนี้(Bartee, 2001)

1. มีความเข้ากันได้กับร่างกาย (Biocompatible)
2. มีความคงตัวสูง ควบคุมรูปร่างได้ ทำให้ใช้งานได้ง่ายในบริเวณกระดูกขากรรไกร (Machanical suitable property)
3. มีระยะเวลาในการสลายตัวอย่างเหมาะสมทำให้รักษาปริมาตรเพื่อรอให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ (Appropriate degradation)
4. มีคุณสมบัติที่ดีในการเป็นโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์สำหรับเซลล์กระดูก
5. ได้ผลิตภัณฑ์ราคาถูกและผลิตได้เองในประเทศ

ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกนั้น โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์สำหรับกระดูกถือเป็นความท้าทายอย่างยิ่ง เนื่องจากว่าหากพัฒนาโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์สำหรับกระดูก ที่มีคุณภาพที่ดีก็จะสามารถรักษาโครงสร้างสามมิติไว้ได้นานเพียงพอ สำหรับกระบวนการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกใหม่ขึ้น

และนอกจากนั้นหากโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์สำหรับกระดูกมีคุณสมบัติที่ทำให้เซลล์ต้นกำเนิด (Stem cell) ตอบสนองไปในทิศทางที่เราต้องการ เช่น สามารถส่งสัญญาณให้เกิดการชักนำเซลล์ต้นกำเนิดมายังบริเวณที่มีการทำการปลูกกระดูกรวมไปถึงชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวน (proliferation) และ เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกได้ (differentiation) ซึ่งก็จะทำให้กระบวนการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกใหม่เกิดขึ้นได้

ปัญหาที่เกิดขึ้นจากการนำเอาอินทรีย์สารไม่ว่าจะเป็นไตรแคลเซียมฟอสเฟต (Tricalcium phosphate) หรือ ไฮดรอกซีอะพาไทด์ (Hydroxyapatite) มาใช้เป็นวัสดุทดแทนกระดูก (Bone grafting material) ก็คือ การที่อนินทรียสารไม่สลายตัวไปในเวลาที่เหมาะสมทำให้เกิดการขัดขวางการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกขึ้นมาใหม่ (Mah *et al.*, 2004) จึงมีงานวิจัยมากมายที่นำเอาอินทรียสารไม่ว่าจะเป็นคอลลาเจน (Collagen) กรดไฮยาลูรอนิค (Hyaluronic acid) เป็นต้น ซึ่งมักจะเป็นโปรตีนพอลิเมอร์ (Protein polymer) ที่เป็นองค์ประกอบของเมทริกซ์นอกเซลล์ (Extracellular matrix) นำมาใช้ทำโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์สำหรับกระดูก อย่างไรก็ตามในงานวิจัยส่วนใหญ่จะสกัดแยกสารองค์ประกอบของ เมทริกซ์นอกเซลล์ออกมาเป็นชนิดๆไป เช่น คอลลาเจน , กรดไฮยาลูรอนิค, ไกลโคอะมิโนไกลแคน (Glycoaminoglycans, GAGs) เป็นต้น ทำให้โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์สำหรับกระดูก มีคุณสมบัติจากสารเพียงชนิดเดียวเท่านั้น อีกทั้งในขั้นตอนการสกัดสารออกมานั้นอาจจะทำให้สาร โปรตีนที่ได้ออกมาเสียคุณสมบัติไป จึงได้มีความพยายามในการที่จะสกัดเอา เมทริกซ์นอกเซลล์ ออกมาในรูปสารสกัดอย่างหยาบ (Crude extract) ซึ่งจะยังคงมีองค์ประกอบของ เมทริกซ์นอกเซลล์อยู่อย่างครบถ้วน ดังตารางที่ 1.3

ในส่วนของงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก จำเป็นที่จะต้องหาสารที่มีความเหมาะสมในการนำมาใช้เป็นวัสดุทดแทนเนื้อเยื่อกระดูก ซึ่งผิวหนังแท้ที่มีองค์ประกอบหลักเป็นคอลลาเจนชนิดที่ 1 เช่นเดียวกับในเนื้อเยื่อกระดูก นอกจากนั้นยังมีองค์ประกอบอื่นๆ ในเมทริกซ์นอกเซลล์ ที่คล้ายคลึงกับกระดูก จะแตกต่างไปบ้างก็เป็นในเรื่องของสัดส่วน ซึ่งก็จะขึ้นอยู่กับ ตำแหน่งของกระดูก ตำแหน่งของผิวหนังแท้ ระดับความลึก เพศ อายุ เป็นต้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารองค์ประกอบของเมทริกซ์นอกเซลล์	**ปริมาณที่พบในผิวหนังแท้ (ไมโครกรัม/มก.น้ำหนักแห้ง)**
โปรตีนโดยรวม	857.25
คอลลาเจน	598.50
ไกลโคอะมิโนไกลแคน โดยรวม	5.05
กรดไฮยาลูรอนิค	3.02

ตารางที่1.3 เปรียบเทียบสารองค์ประกอบของ Extracellular matrix ในเนื้อเยื่อผิวหนังแท้
ที่มา แปลมาจาก Shingo Tajima และคณะ,1983

สารสกัดจากผิวหนังเมื่อนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการทำโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อผิวหนัง พบว่า มีความปลอดภัยเนื่องจากในเบื้องต้นสารสกัดจากผิวหนังดังกล่าวได้รับมาจากมนุษย์ (allogenic graft) และผ่านการทดสอบสองขั้นตอน คือการทดสอบการตอบสนองของเซลล์โดยตรงบนพื้นผิวชิ้นงาน (Cytocompatibility) ตัวอย่างที่ทดสอบสามารถแสดงผลที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ได้ โดยผลของ mono layer ที่ใช้ทดสอบเปรียบเทียบกับชุดควบคุม พบว่าเซลล์มีลักษณะที่สมบูรณ์ไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปจากรูปร่าง (morphology) ของเซลล์ปกติ พบลักษณะการเจริญเติบโตของเซลล์ที่เป็นปกติและมีการยึดเกาะที่ดีบนพื้นผิว และในขั้นตอนที่สองคือการนำชิ้นงานไปฝังในสัตว์ทดลองโดยโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์สามารถเข้ากับเนื้อเยื่อในร่างกายโดยที่ไม่มีการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายอย่างผิดปกติ จากข้อมูลข้างต้นทำให้สารสกัดจากผิวหนังมีความเป็นไปได้ในการนำมาใช้เป็นวัสดุทดแทนเนื้อเยื่อกระดูกที่ใช้กับกระดูกเบ้าฟันได้เมื่อมีการปรับปรุงในส่วนของการขึ้นรูปให้มีความเหมาะสมกับการนำไปใช้

งานวิจัยนี้จึงเป็นการพัฒนาสารสกัดจากผิวหนัง ซึ่งเป็นโพลีเมอร์ธรรมชาติ ให้มีคุณสมบัติเหมาะสมกับการเป็นโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ (scaffold) สำหรับกระดูกเบ้าฟัน โดยใช้องค์ความรู้ทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ โดยเฉพาะในส่วนของปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์และเมทริกซ์นอกเซลล์ (cell and extracellular metrix interaction) กล่าวคือ เมทริกซ์นอกเซลล์มีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดไปเป็นเซลล์ปลายทางต่าง ๆ โดยในปี 1966 Hauschka และ Konigsberg พบว่าคอลลาเจนมีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ อีกทั้งในองค์ประกอบและสัดส่วนของเมทริกซ์นอกเซลล์มีผลต่อการพัฒนาการของทารกทั้งในส่วนของ

การแสดงออกทางพันธุกรรม (gene expression) และการเปลี่ยนแปลงโปรตีนต่าง ๆ ภายหลังสังเคราะห์ (posttranslational modification) ด้วย ผู้วิจัยมีแนวความคิดว่าองค์ประกอบอินทรีย์ในเมทริกซ์นอกเซลล์ของผิวหนังมี คอลลาเจน ชนิดที่ 1 เป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งเป็นคอลลาเจนชนิดเดียวกันกับที่พบในเนื้อเยื่อกระดูก(Glowacki and Mizuno, 2008) หากนำมาพัฒนาด้วยการผสมผงกระดูกซึ่งมีองค์ประกอบอนินทรีย์หลักคือ แคลเซียมฟอสเฟต อีกทั้งยังมี Bone morphogenic protein และ growth factor ต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดเนื้อเยื่อกระดูกเข้าไปในสารสกัดจากผิวหนังและ ขึ้นรูปให้เหมาะสมต่อการนำไปใช้ในบริเวณ ที่มีความวิการของกระดูกเบ้าฟันเช่น บริเวณที่มีการละลายตัวลงของกระดูกเบ้าฟันภายหลังสูญเสียฟัน โดยโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ จากสารสกัดผิวหนังผสมผงกระดูกจะถูกนำไปปลูกทดแทนบริเวณที่มีความวิการเกิดขึ้น และสลายตัวไปภายหลังจากที่มีการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกขึ้นมาใหม่ในเนื้อเยื่อกระดูก

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย (objectives)

ศึกษาถึงประสิทธิภาพในการเกิดกระดูกใหม่ของสารสกัดจากผิวหนังผสมผงกระดูกเมื่อนำมาทำเป็นโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์แล้วทดสอบในกะโหลกหนูวิสต้าร์โดยประเมินผลการเกิดเนื้อเยื่อกระดูกใหม่จากภาพรังสี และศึกษาถึงคุณสมบัติในการเหนี่ยวนำให้เกิดกระดูกใหม่โดยการตรวจทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อ โดยเปรียบเทียบกับ

1. การหายของแผลตามธรรมชาติ
2. โครงเลี้ยงเซลล์จากสารสกัดจากผิวหนังปราศจากผงกระดูก
3. คอลลาเจนชนิดที่ 1 จากวัว ผสมผงกระดูก
4. คอลลาเจนชนิดที่ 1 จากวัว ปราศจากผงกระดูก
5. วัสดุในท้องตลาด

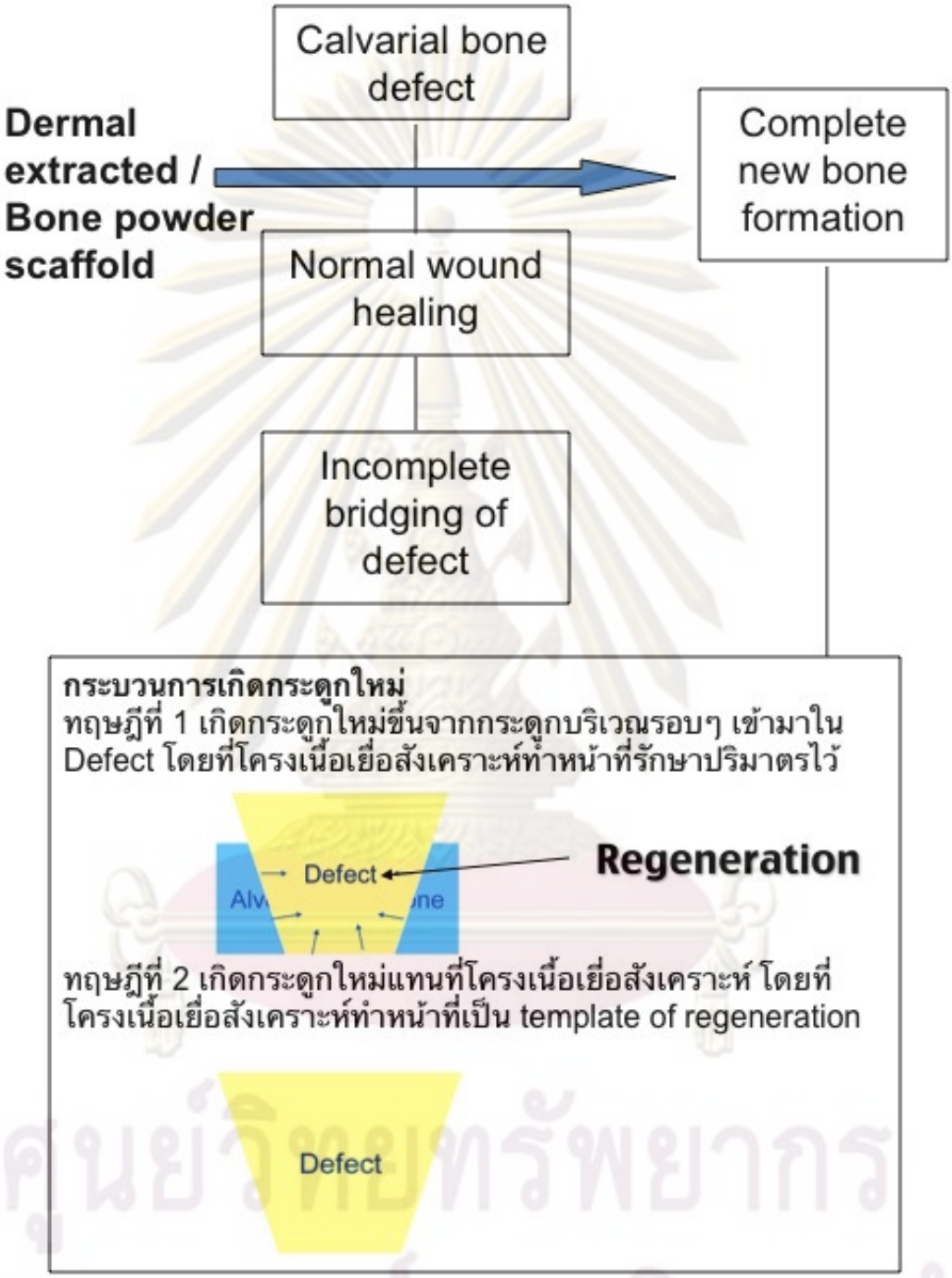
1.3 ข้อตกลงเบื้องต้น (Assumption)

1.3.1 แม้ว่าสัดส่วนองค์ประกอบของสารโปรตีนในผิวหนัง ของผู้บริจาคแต่ละรายจะมีความแตกต่างกันอยู่บ้าง แต่ในการทดลองนี้ผู้ทำการวิจัยได้ใช้สารสกัดจากผิวหนังที่เตรียมขึ้นมาครั้งเดียวกัน และผ่านการทดสอบ MTT > 15,000 เซลล์/ลบ.ม.

1.3.2 ผู้ทำการวิจัยได้ใช้ความวิการของกะโหลกหนูวิสต้าร์ เป็นตัวแทนของกระดูกบริเวณใบหน้าและขากรรไกร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.4 **กรอบแนวความคิด** (conceptual framework and scope of research)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.5 **สมมุติฐานในการวิจัย** (hypothesis)

สารสกัดจากผิวหนัง เมื่อนำมาขึ้นรูปเป็นโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์แล้ว จะมีประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำให้เกิดกระดูกใหม่เมื่อทดสอบในกะโหลกหนูวิสต้าร์

ผงกระดูกในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ จะเพิ่มประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำให้เกิดกระดูกใหม่เมื่อทดสอบ ในกะโหลกหนูวิสต้าร์

1.6 **ข้อจำกัดในการวิจัย** (Limitation)

เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นการทำวิจัยในสัตว์ทดลอง ซึ่งอาจจะมีความแตกต่างกันบ้าง ในสัตว์แต่ละตัว นอกจากนั้นหนูวิสต้าร์ถือเป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมขนาดเล็กทำให้การทดสอบในกระดูกเบ้าฟันเป็นไปได้ยาก ผู้ทำการวิจัยได้เลือกที่จะทำการผ่าตัดฝังชิ้นงานลงในกะโหลก ซึ่งถือเป็น Craniofacial bone มีการสร้างกระดูกแบบ intra membranous ossification เช่นเดียวกับกระดูกเบ้าฟัน(Cacciafesta *et al.*, 2001; Hollinger and Kleinschmidt, 1990) อย่างไรก็ตาม หากผลการทดลองออกมาตามสมมติฐานที่ตั้งไว้ก็สมควรที่จะศึกษาในกระดูกเบ้าฟันของสัตว์ใหญ่ต่อไป(Pearce *et al.*, 2007)

1.7 **ประโยชน์ที่จะได้รับ** (Expected benefit and application)

ทราบถึงคุณสมบัติในการเกิดกระดูกใหม่ของสารสกัดจากผิวหนังผสมผงกระดูก เมื่อนำมาทำเป็นโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์แล้วทดสอบในแผลกะโหลกหนูวิสต้าร์ เพื่อนำมาทำการวิจัยต่อเนื่องในกระดูกเบ้าฟันในสัตว์ใหญ่และทำการทดลองใช้ในมนุษย์ต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้องกับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Relevant Theory for Tissue Engineering)

การออกแบบโครงเลี้ยงเซลล์สำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อและอวัยวะสังเคราะห์ มีความท้าทายอย่างยิ่งเนื่องจากเป็นการกระตุ้นการดำเนินไปของธรรมชาติ โดยแนวทางที่จะไปสู่เป้าหมายดังกล่าวได้นั้นอาศัยการศึกษาเกี่ยวกับการพัฒนาของเซลล์ต้นกำเนิดตั้งแต่ในระยะเอมบริโอ และการศึกษาถึงกระบวนการซ่อมแซมเนื้อเยื่อและอวัยวะตามธรรมชาติ รวมไปถึงความรู้ว่าเนื้อเยื่อและอวัยวะต่าง ๆ นั้นมีลักษณะทางสรีระวิทยาอย่างไร (Robert Lanza, 2007) โดยสิ่งที่เราต้องคำนึงถึงในการออกแบบโครงเลี้ยงเซลล์ คือ

2.1.1 การต่อต้านจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Immune response)

เราต้องคำนึงถึงการต่อต้านจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ที่จะเป็นสาเหตุของการอักเสบและอาจจะทำให้ร่างกาย ปฏิเสธโครงเลี้ยงเซลล์สำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อและอวัยวะสังเคราะห์ ดังกล่าวได้ อย่างไรก็ดีมีรายงานการวิจัยว่า การเกิดการต่อต้านจากระบบภูมคุ้มกันในสภาวะ และขนาดที่เหมาะสมจะกระตุ้นให้บริเวณดังกล่าว ซึ่งปกติจะไม่มีปฏิสัมพันธ์กับ progenitor cell สามารถที่จะมีการตอบสนองจาก progenitor cell ทั้งทางตรงจากการที่ progenitor cell จะเข้ามาลดระดับ การตอบสนองของภูมิคุ้มกันของร่างกาย รักษาระดับความสามารถในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ต่าง ๆ ของ mesenchymal stem cell (Barry and Murphy, 2004; Robert Lanza, 2007) และจากทางอ้อมโดยการไปลดระดับการแสดงออกของ MHC (Major Histocompatibility Complex) ซึ่งเป็นกลุ่มของยีนบนโครโมโซม ประกอบด้วยหมู่ยีนหลายชนิดที่กำหนดให้มีการสร้างHistocompatibility antigens ชนิด glycoprotein ที่อยู่ที่ผิวของเซลล์ชนิดต่างๆ มีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยนำเสนอแอนติเจนให้แก่ T cells ทำ ให้ T cells สามารถแยกแยะ ระหว่าง self และ non-self ดังนั้น Histocompatibility antigens จึงมีบทบาทสำคัญในขบวนการทำ Implantation ของโครงเลี้ยงเซลล์ มีผลให้มีการรับหรือปฏิเสธโครงเลี้ยงเซลล์ (graft rejection) ได้(Barry and Murphy, 2004; Robert Lanza, 2007)

2.1.2 องค์ประกอบของสารนอกเซลล์ (Extracellular matrix composition)

การออกแบบโครงเลี้ยงเซลล์ให้มีองค์ประกอบที่คล้ายคลึงกับสารนอกเซลล์ของเนื้อเยื่อนั้นๆ ถือเป็นอีกเป้าหมายหนึ่งในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เนื่องจากจะทำให้เกิดการเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อ และ

ส่งผลต่อความอยู่รอดและการเจริญไปเป็นเซลล์ชนิดต่างๆ ของเซลล์ต้นกำเนิดอีกด้วย การเตรียมสภาพแวดล้อมให้คล้ายคลึงกับธรรมชาติมากที่สุดนั้น จะทำให้เกิดสมดุลระหว่างเซลล์กับสารนอกเซลล์ และมีรายงานว่าสารนอกเซลล์มีอิทธิพลทำให้ระดับ ฮอร์โมน cytokinesและ Growth factor เหมาะสมต่อการทำงานของเซลล์ และนอกจากนั้นการที่ออกแบบโครงเลี้ยงเซลล์ให้มีองค์ประกอบที่คล้ายคลึงกับสารนอกเซลล์ของเนื้อเยื่อนั้นๆ จะเป็นการเตรียมรูปร่าง ปริมาตร ความพรุนและระยะการสลายไปอย่างเหมาะสมต่อการเกิดเนื้อเยื่อใหม่อีกด้วย(Robert Lanza, 2007)

2.1.3 ปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์และสารนอกเซลล์ (Cell-Extracellular matrix interactions)

ปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์และสารนอกเซลล์เป็นสิ่งที่ถูกคำนึงถึงอย่างมากในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ โดยสารนอกเซลล์จะประกอบด้วย fibrous protein ที่แข็งแรงแทรกตัวอยู่ใน polysaccharide ที่มีลักษณะคล้ายเจล และประกอบด้วย adhesion protein ซึ่งเชื่อมส่วนต่างๆ ของ matrix เข้าด้วยกันและเชื่อมกับเซลล์ใกล้เคียง โดยจะมีการเชื่อมต่อกับ collagen และ proteoglycan และเป็นตัวเชื่อมหลักกับ integrin

fibronectin เป็น adhesion protein หลักของ connective tissue เป็น glycoprotein dimer ที่ประกอบด้วย polypeptide 2 สาย fibronectin มักจับตัวกันเป็น fibril และมีบริเวณที่จับกับ collagen, GAG และ receptor ที่ผิวเซลล์ เช่น integrin

Inregrin เป็น cell receptor หลักที่ยึดเซลล์ให้ติดกับ extracellular matrix เป็น transmembrane protein ประกอบด้วย 2 sub unit จับกับลำดับกรดอะมิโนสั้นๆ ของ extracellular matrix เช่น collagen, fibronectin และ laminin ปัจจุบันพบว่า "RGD" ซึ่งเป็น sequence สำหรับ integrin binding เป็นส่วนสายpeptideซึ่งประกอบไปด้วยกรดอะมิโน Arginine-Glycine-Aspartic acid ทำหน้าที่ในการยึดกับโปรตีนต่าง ๆ ในสารนอกเซลล์

นอกจากยึดเซลล์กับ extracellular matrix แล้ว integrin ยังยึดติดกับ cytoskeleton ทำให้ cell-matrix junction มีความแข็งแรงยิ่งขึ้น ซึ่งพบได้ใน cell-matrix junction 2 แบบ คือ focal adhesion และ hemidesmosome

focal adhesion ยึดเซลล์หลายชนิดรวมทั้ง fibroblast กับ extracellular matrix โดยส่วน cytoplasmic domain ของ β subunit ของ integrin ยึดติดกับ actin cytoskeletonโดย focal adhesion อาจทำให้เนื้อเยื่อยึดติดกันอย่างถาวรหรือเกิดการติดกันแล้วหลุดออกไปเมื่อเซลล์เคลื่อนที่ ส่วน hemidesmosome ยึด epithelial cell โดยใช้ integrin ยึดกับ intermediate filament (แทนที่จะเป็น actin)

2.2 **สรีระวิทยาของกระดูก** (Bone Physiology)

2.2.1 เมทริกซ์นอกเซลล์ของกระดูก (Bone Extracellular Matrix)

กระดูกเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดพิเศษ (Connective tissue proper) ซึ่งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันทุกๆชนิดต่างก็มีเซลล์และเมทริกซ์นอกเซลล์เป็นองค์ประกอบ ในส่วนเมทริกซ์นอกเซลล์ของกระดูกนั้น ถือว่ามีความซับซ้อนมาก ประกอบด้วย สารจำพวก คาร์โบไฮเดรต และโปรตีน เป็นหลัก อาทิเช่น คอลลาเจน ซึ่งเป็นโปรตีนเส้นใยที่พบมากที่สุดในร่างกายคนเรา คือประมาณร้อยละ 30 ของน้ำหนักของโปรตีนทั้งหมดในร่างกายและก็พบมากในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ในสายพอลิเปปไทด์ของคอลลาเจน จะมีกรดอะมิโน ไกลซีนอยู่มากที่สุด กล่าวคือมีอยู่ถึง 33.3 % ทุกๆการมาต่อกันของกรดอะมิโนสามตัวจะมี ไกลซีน หนึ่งตัวเสมอ ดังนั้นคอลลาเจน จึงมีสูตรโครงสร้างง่ายๆ เป็น Gly-X-Y มาต่อกันเป็นเกลียววนซ้ายที่มีกรดอะมิโน 3 ตัวต่อการวน หนึ่งรอบ สาย polypeptide ดังกล่าว 3 เส้น มาขดเกลียววนขวา (Right-handed triple helix) ด้วยกันจึงจะเกิดเป็นโทรโปคอลลาเจน โทรโปคอลลาเจนนี้ก็จะมาเรียงต่อกันอีกทีอย่างเป็นระเบียบแต่จะมีเหลื่อมๆกันอยู่หนึ่งในสี่ส่วนจึงเห็นลักษณะของสายคอลลาเจน มีความทึบจางสลับกัน ที่เราเรียกกัน hole zone กับ overlap zone ซึ่ง การตกผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทต์ จะเกิดใน hole zone เท่านั้น ในร่างกายคนเรามี เส้นใยคอลลาเจนมากกว่า 12 ชนิด ส่วนในกระดูกจะเป็น คอลลาเจนชนิดที่ 1 เป็นหลัก นอกจากคอลลาเจนแล้วในเมทริกซ์นอกเซลล์ ยังมี สารประกอบเชิงซ้อนอื่นๆ ได้แก่ พวกไกลโคโปรตีนซึ่งเป็นโมเลกุลของคาร์โบไฮเดรตมาเกาะกับโปรตีน โดยที่มีสัดส่วนของโปรตีนมากกว่า เช่น ไฟโบรเนคติน (Fibronectin) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งของเมทริกซ์นอกเซลล์ มีหน้าที่ในการยึดเกาะกับโปรตีนที่อยู่บนผิวเยื่อหุ้มเซลล์ทำหน้าที่เป็นตัวกลางระหว่างเซลล์และเมทริกซ์นอกเซลล์ นอกจากนั้นแล้วโปรติโอไกลแคน (Proteoglycan) ก็เป็นอีกหนึ่งองค์ประกอบสำคัญของเมทริกซ์นอกเซลล์ เป็นสารประกอบระหว่าง คาร์โบไฮเดรตกับโปรตีนเช่นกัน เพียงแต่ว่า ในโปรติโอไกลแคนมีสัดส่วนของคาร์โบไฮเดรต อยู่มากถึง 95% ด้วยกัน เนื่องจากสายคาร์โบไฮเดรต ที่มาเกาะกับสายแกนโปรตีนนั้นเป็นโมเลกุลเชิงซ้อนที่มีขนาดใหญ่ ที่เรียกว่า ไกลโคอะมิโนไกลแคน โดยมายึดจับกับสายโปรตีนหลักที่ตำแหน่งของ กรดอะมิโน serine ไกลโคอะมิโนไกลแคน ที่มีสายยาวที่สุดคือ กรดไฮยาลูรอนิค หรือ hyaluronan การมาเกาะกันในลักษณะดังกล่าวทำให้ proteoglycan complex นี้มีลักษณะเหมือนแปรงขัดขวดน้ำ โดยมีแกนแปรงเป็นสายโปรตีน และขนแปรงเป็น ไกลโคอะมิโนไกลแคน มีหน้าที่ในการรักษาปริมาตรของเนื้อเยื่อไว้ สำหรับการตกผลึกของแร่ธาตุในเมทริกซ์นอกเซลล์ ไฮดรอกซีอะพาไทต์จะตกผลึกที่บริเวณช่องว่างในสายคอลลาเจน โดยแร่ธาตุในเมทริกซ์นอกเซลล์ประกอบไปด้วย calcium phosphate 85% , calcium carbonate 10% และ อีก 5% ประกอบไปด้วย calcium fluoride และ magnesium fluoride เนื้อ

กระดูกเป็นวัสดุประกอบที่มีเส้นใยคอลลาเจนเป็นเนื้อหลักให้ไฮดรอกซี่อะพาไทต์มาตกผลึกกับคอลลาเจน กลายเป็นของแข็งที่สามารถรับน้ำหนักและมีความยืดหยุ่นในตัวเอง ในปัจจุบันมีงานวิจัยที่พัฒนาวัสดุสำหรับทดแทนกระดูกด้วยวิธีการสังเคราะห์เลียนแบบธรรมชาติโดยการเติมแคลเซียมฟอสเฟสในเนื้อหลักพอลิเมอร์ให้ได้เป็นวัสดุที่สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์กระดูกเมื่อนำไปฝังในเพื่อทดแทนความวิการของกระดูก รวมไปจนถึงเพิ่มปริมาณของเนื้อเยื่อกระดูก

2.2.2 เซลล์กระดูกและเมตาบอลิซึมของกระดูก (Bone Cell and Bone Metabolism)

สำหรับเนื้อเยื่อกระดูกเป็นอวัยวะที่มีการซ่อมแซมตัวเองได้ โดยปกติแล้วจะมีการสร้างและทำลายกระดูกอยู่ตลอดเวลา (Bone remodeling) ในอัตราที่สูง ซึ่งจะถูกควบคุมโดย mechanical factor ต่างๆ เช่น แรงจากการบดเคี้ยว แรงจากเครื่องมือจัดฟัน เป็นต้น โดยกระบวนการสร้างกระดูกจะเกิดขึ้นด้านตรงข้ามกับแนวแรงนั้น โดยการควบคุมของ growth factor อย่างไรก็ตามหากบริเวณกระดูกเบ้าฟันเกิดการเสียสมดุลของแรง mechanical load เช่นเกิดการสูญเสียฟัน ก็จะทำให้การละลายตัวของกระดูกเป็นไปอย่างรวดเร็ว (Irinakis, 2006; Marx *et al.*, 2002)
เซลล์ที่มีบทบาท ได้แก่

- Osteoprogenitor cells เป็นเซลล์รูปกระสวย มีนิวเคลียสรูปไข่ มีการเปลี่ยนแปลงมาจากเซลล์ต้นกำเนิดที่เป็น Messenchymal stem cell พบอยู่ในเยื่อหุ้มกระดูก
- Osteoblasts เป็นเหมือนหัวใจในการสร้างกระดูก เซลล์นี้มีการเปลี่ยนแปลงมาจาก Osteoprogenitor cells จะเปลี่ยนไปเป็น osteocyte เข้าไปฝังตัวใน lacunae ล้อมรอบ central canal เป็น harversian system ซึ่งเป็นหน่วยที่เล็กที่สุด ของกระดูก osteoblast มีหน้าที่ในการ สร้าง osteoid ซึ่งส่วนใหญ่เป็น protein โมเลกุลใหญ่ cell product ที่หลั่งออกมานอก cell ทำหน้าที่เป็นโครงสร้าง ให้เกิด การตกผลึกของ แร่ธาตุใน เมทริกซ์นอกเซลล์
- Osteoclasts มีหน้าที่ในการสลายกระดูก เซลล์มีขนาดใหญ่และมีหลายนิวเคลียส (polar multinucleated giant cells) มีการเปลี่ยนแปลงมาจาก haematopoietic precursor cell พบ osteoclasts ได้ในบริเวณที่มีการสลายกระดูกเป็นแอ่งเว้าที่เรียกว่า Howship's lacunae cell osteoclasts ตอบสนองต่อ parathyroid hormone โดยเพิ่มการ resorption ทำให้มีปริมาณ แคลเซียมในเลือดเพิ่มมากขึ้นด้วย (Charles A. Babbush 2010; Garg, 2004)

2.2.3 โครงสร้างของกระดูก (Bone structure)

2.2.3.1 โครงสร้างของกระดูกที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (macroscopic structure) กระดูกจะไม่ได้มีโครงสร้างเป็นลักษณะแข็งทึบเพียงอย่างเดียว หากแต่มีรูพรุนอยู่ระหว่างความแข็งทึบนั้นด้วย โดยที่บริเวณที่มีความแข้งทึบสูงจะมีโครงสร้างที่เป็นระเบียบเราเรียกส่วนนี้ว่า กระดูกเนื้อแน่น (Compact Bone) ซึ่งจะมีช่องว่างหรือรูพรุนของกระดูกน้อยมากและคิดเป็นปริมาณ 80% โดยน้ำหนักของกระดูกทั้งหมดในผู้ใหญ่ ส่วนโครงสร้างของกระดูกที่มีลักษณะโปร่งมีความเป็นรูพรุนมากเราเรียกว่า กระดูกเนื้อโปร่ง (spongy / Cancellous Bone) ซึ่งเป็นที่อยู่ของหลอดเลือดและไขกระดูก ซึ่งจะมีเซลล์ชนิดต่าง ๆอยู่เป็นจำนวนมาก นอกสุดของกระดูก จะมีเยื่อหุ้มกระดูก (Periosteum) หุ้มอยู่โดยรอบ

2.2.3.2 โครงสร้างของกระดูกจากกล้องจุลทรรศน์ (microscopic structure) จะพบว่าเนื้อเยื่อกระดูกจะมีลักษณะเป็นวงซ้อน ๆกัน โดยที่มีศูนย์กลางเป็นช่องขนาดใหญ่ที่เรียกว่าช่องฮาเวอร์เชี่ยน (Harversian canal) ซึ่งเป็นที่อยู่ของหลอดเลือดที่จะมาเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกและวงรอบ ๆจะเป็นที่อยู่ของ osteocyte (Marieb, 1998)

2.2.4 กระบวนการสร้างกระดูก (Bone Formation)

2.2.4.1 Intramembranous ossification เป็นการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกจากการรวมกลุ่มของเซลล์มีเซนไคม์ (mesenchymal cells) ซึ่งเป็นเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดต่างๆ การรวมตัวกันของเซลล์ทำให้เกิด primary ossification center จากนั้นก็จะเกิดการสะสมของไอดรอกซี่อะพาไทต์ การสร้างกระดูกแบบนี้มักพบในกระดูกทีมีรูปร่างแบบเช่นกะโหลกศรีษะ

2.2.4.2 Endochondral ossification เป็นการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกโดยที่ผ่านการเป็นกระดูกอ่อนมาก่อนเรียกว่า cartilage model ซึ่งในตอนที่อยู่ในครรภ์ใจกลางของ cartilage model ก็จะมีเส้นเลือดมาเลี้ยงและเกิด primary ossification center เช่นกัน เมื่อคลอดออกมาแล้วกระดูกอ่อนมีการขยายตัวใหญ่ขึ้นและเริ่มมีการสร้างกระดูก ร่วมไปกับการสลายตัวลงของ chrondrocyte ที่ secondary ossification center จนอายุประมาณ 21 กระดูกอ่อนตรง epiphysial plate ก็จะถูกแทนที่โดยกระดูกจนหมด จะเห็นเป็น epiphysial line ซึ่งเป็นรอยต่อของกระดูกที่สร้างจาก primary ossification center และ secondary ossification center(Netter, 1987; Tortora, 1989)

2.2.4.3 กระบวนการสร้างกระดูกทดแทน (New Bone Formation)

กระดูกจะมีการสร้างขึ้นทดแทนบริเวณที่เกิดการสูญเสียขึ้น โดยที่มีข้อจำกัดในเรื่องของขนาดของความสูญเสียและเวลาที่เกิดการละลายตัวของกระดูก เช่นการสูญเสียของกระดูกเบ้าฟันภายหลังถอนฟันและระยะเวลาการหายของกระดูกนับจากวันที่มีการถอนฟันจนกระทั่งถึงวันที่มี

การผ่าตัดฝังรากฟันเทียมลงในกระดูกขากรรไกร(Charles A. Babbush 2010; Garg, 2004) การใส่วัสดุแทนกระดูกลงไปเมื่อเกิดความสูญเสียขึ้นนั้นสามารถป้องกันหรือทำให้การละลายตัวของกระดูกช้าลง โดยที่การสร้างเนื้อเยื่อกระดูกใหม่ภายหลังจากมีการทดแทนกระดูกที่ละลายตัวลงไปด้วยวัสดุแทนกระดูกที่ใช้ในงานทันตกรรม ผิวของวัสดุจะถูกล้อมรอบด้วย fibrin จาก blood clotting ตั้งแต่ชั่วโมงแรก และมีการหลั่ง PDGF (platelet derived growth factor) พบว่ามีการเพิ่มปริมาณออกซิเจนขึ้นสูง เริ่มมีกระบวนการสร้างเส้นเลือด (angiogenesis) ต่อจากหลอดเลือดฝอย (capillary) ที่อยู่รอบ ๆ เพื่อให้มีการขนส่งเซลล์เข้ามายังบริเวณ graft ประมาณวันที่3 ก็จะเริ่มเห็นเป็นหน่อเส้นเลือดอยู่รอบๆ graft มีการสร้างและขยายตัวไปต่อกับ cancellous bone network ที่อยู่ข้างเคียงจนกระทั่งวันที่ 10-14 ก็จะเห็นเป็นเส้นเลือดฝอย หลังจากนั้น MDAF (macrophage derived angiogenesis factor) ก็จะถูกหลั่งออกมาเพื่อลดปริมาณออกซิเจนป้องกันไม่ให้เกิดการสร้างเส้นเลือดมากเกินไป ในช่วงวันที่3-7 PDGF จะเริ่มถูกแทนที่ด้วย MDGF (macrophage derived growth factor) และ TGF-β (Transforming Growth factor-β) ทำให้เกิดกระตุ้นพวก mesenchymal stem cell นอกจากนั้นแล้วยังพบว่า มีการหลั่ง osteoid ปริมาณไม่มากจาก endosteal osteoblast จนกระทั่งเริ่มมีการสร้างระบบหลอดเลือดขึ้นแล้วจึงมีการนำอาหารและออกซิเจนเข้ามาและมีการหลั่ง osteoid เพิ่มมากขึ้น จนกระทั่งเข้าสัปดาห์ที่ 3-4 ก็จะเข้าสู่ phase I bone regeneration ซึ่งเป็นระยะที่มีความหนาแน่นของ cell สูงแต่ยังเรียงตัวไม่เป็นระบบ เรียกกระดูกในระยะนี้ว่าwoven bone ซึ่งมีลักษณะคล้าย callus ชิ้นเล็กๆมาต่อกันในระยะนี้ก็มี growth factor ที่เข้ามามีความสำคัญไม่ว่าจะเป็น BMP (bone morphogenic protein), PDGF, TGF-β, IGF (Insulin like growth factor) ในระยะนี้ จะพบ fibrin network ของ graft ทำหน้าที่เป็นเหมือนโครงที่มีเซลล์เกาะและสร้างรูปร่างของกระดูกขึ้นมา หลังจากนี้ไปจะถูกแทนที่ด้วย phase II bone regeneration เริ่มจากการที่ Osteoclast เข้ามา มีการละลายตัวลงของ woven bone และแทนที่ด้วยกระดูกที่มีโครงสร้างเป็นระเบียบมีปริมาณเซลล์ลดลงแต่มีการตกผลึกของ ไฮดรอกซีอะพาไทต์ ใน เมทริกซ์นอกเซลล์ และมีการเรียงตัวเป็น Harversian system เรียกกระดูกในระยะนี้ว่า lamellar bone โดยที่กว่าจะเกิดการ remodeling สมบูรณ์ก็ใช้เวลา 3-4 เดือน ในระยะนี้สามารถที่จะทำการผ่าตัดฝังรากฟันเทียมลงในกระดูกขากรรไกร โดยมีความคาดหวังว่าวัสดุแทนกระดูกที่ใส่ลงไปใน bony defect นั้นจะถูกแทนที่ด้วยเนื้อเยื่อกระดูกที่สร้างขึ้นใหม่ทั้งหมด

สำหรับวัสดุแทนกระดูกที่ถูกนึกถึงเป็นอย่างแรก ในการนำมาทดแทนบริเวณที่ต้องการปริมาณและคุณภาพของกระดูกกลับคืนมาคือกระดูกของผู้ป่วยเอง (Autograft) (Laurencin, Khan and El-Amin, 2006) แต่ด้วยข้อจำกัดในเรื่องของปริมาณ, ความเจ็บปวดในการผ่าตัด และความกระทบกระเทือนต่ออวัยวะข้างเคียง ทำให้ไม่สามารถที่จะใช้ Autograft ในผู้ป่วยทุกรายได้

Allograft และ Xenograft ก็เป็นอีกทางเลือกที่ดี แต่อย่างไรก็ตามยังมีข้อถกเถียงในเรื่องของการเกิดการต่อต้านของระบบภูมิคุ้มกัน รวมไปถึงอาจจะมีการนำเอาโรคต่างๆ ถ่ายทอดมายังผู้รับด้วย (Charles A. Babbush 2010; Garg, 2004)

2.3 Biomaterials

2.3.1 Regenerative Biomaterials

เกือบ 20 ปีที่นักวิจัยได้พยายามหาวัสดุธรรมชาติ ที่มีคุณสมบัติที่ย่อยสลายไปได้ภายหลังถูกแทนที่ด้วยการเกิดเนื้อเยื่อใหม่ และสามารถที่จะเพิ่มความสามารถในการหายของแผลได้ ในท้องตลาด INTEGRA® ได้ถูกใช้อย่างแพร่หลายในการเป็น dermal regeneration template สำหรับการเกิด skin replacement ในส่วนของงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก ผลิตภัณฑ์หนึ่งของ INTEGRA® คือ CollaPlug® ซึ่งถือเป็น Integra's absorbable collagen ได้ถูกนำมาใช้ในแผลถอนฟัน เพื่อเตรียมให้เกิดเนื้อเยื่อกระดูกขึ้นใหม่ในแผลถอนฟัน นอกจากนั้นยังมีส่วนช่วยในการห้ามเลือดอีกด้วย โดยในงานวิจัยนี้ก็ได้นำเอา CollaPlug® เป็นตัวแทนของวัสดุธรรมชาติที่มีขายในท้องตลาดมาเป็นส่วนหนึ่งของงานวิจัยด้วย (Robert Lanza, 2007)

2.3.2 วัสดุแทนกระดูก (Bone grafting materials)

2.3.2.1 Autogenous Bone

กระดูกจากตัวผู้ป่วยเองยังถือว่าเป็นมาตรฐานสำหรับการทำการปลูกกระดูก และนับว่ามีความสำเร็จสูงกว่าการใช้วัสดุแทนกระดูกชนิดอื่น แต่การทำการปลูกกระดูกด้วยเนื้อเยื่อกระดูกของผู้ป่วยเองนั้น ต้องมีการผ่าตัดบริเวณ Donor site ด้วย และอาจจะต้องมีการผ่าตัดหลายบริเวณ เพื่อให้ได้ปริมาณของกระดูกของผู้ป่วยเพียงพอที่จะนำมาปลูกในบริเวณที่มีการสูญเสีย ซึ่งสร้างความเจ็บปวดทรมานให้กับผู้ป่วยเป็นอย่างยิ่ง นอกจากนั้นอาจจะเกิดผลข้างเคียงมากมายตามมา ไม่ว่าจะเป็น การอักเสบจากการติดเชื้อ หรือการกระทบกระเทือนอวัยวะข้างเคียงเช่น เส้นประสาทเส้นเลือด ต่างๆ ทำให้เกิดอาการชาและเลือดออกมาก

2.3.2.2 Allografts

คือเนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่ได้รับมาจากสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันแต่คนละคนคนกันเช่น FDBA หรือ DFDBA ซึ่ง Allografts จะมีข้อดีในแง่ที่ว่าองค์ประกอบของสารนอกเซลล์เป็นชนิดเดียวกันและมีสัดส่วนใกล้เคียงกันในคนแต่ละคน นอกจากนั้นยังคาดหวังว่าจะมีคุณสมบัติที่เหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดได้ เช่นมี BMP หรือGrowth Factor ต่าง ๆ หลงเหลืออยู่ แต่ยังมีข้อถกเถียงในเรื่องของการเกิดโรคติดต่อเช่น HIV และการต่อต่านจากร่างกายอันเกิดจากความแตกต่างทาง

พันธุกรรม นอกจากนั้นยังมีข้อจำกัดในแง่ของจริยธรรมอีกด้วย Allografts ที่มีขายอยู่ในท้องตลาดเช่น MTF ของบริษัท Dentsply หรือ Puros ของบริษัท Zimmer

2.3.2.3 Xenografts

คือเนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่ได้รับมาจากสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกัน เช่นการทำการปลูกกระดูกในคนโดยใช้ กระดูกวัวเป็นต้น อย่างไรก็ตาม การใช้ Xenografts มาทดแทนการสูญเสียของกระดูกถือว่าได้ผลดี ราคาไม่แพง และไม่มีข้อถกเถียงทางจริยธรรมมาก ทำงานวิจัยเพื่อพัฒนาได้ง่าย อย่างไรก็ตาม Xenografts ยังมีจุดบกพร่องในแง่ของการเกิดโรคติดต่อ และไม่ยอมรับ Xenografts ของร่างกายโดยมีการต่อต้านทางระบบภูมิคุ้มกัน Xenografts ที่มีขายอยู่ในท้องตลาดเช่น Pepgen P-15 ของ Dentsply และ Bio-oss ของ Osteohealth ซึ่งต่างก็มีองค์ประกอบเป็นไฮดรอกซี่อะพาไทต์ ที่พัฒนามาจาก Bovine Bone

2.3.2.4 Alloplasts

คือวัสดุสังเคราะห์ที่นำมาใช้ทดแทนเนื้อเยื่อและอวัยวะ เช่น ceramics , tricalcium phosphate , โพลีเมอร์ต่าง ๆ โดยข้อดีของ Alloplasts คือมีปริมาณมาก ราคาไม่แพง ไม่มีปัญหาในแง่ของการติดเชื้อ โรคติดต่อจากคน และสัตว์ นอกจากนั้นยังมีระยะเวลาในการสลายตัวไปที่นานกว่า ทำให้มีเวลาเพียงพอในการรักษา รูปร่างของความวิการของกระดูกหรือรักษาปริมาตรสามมิติไว้ได้ จนเกิดการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกขึ้นมาใหม่ แต่ Alloplasts ยังมีข้อด้อยในแง่ของการที่ไม่ได้เป็นวัสดุธรรมชาติ ไม่มีคุณสมบัติในการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิด Alloplasts ที่มีขายอยู่ตามท้องตลาดได้แก่ Osteogen ของ Impladent เป็น synthetic bioactive resorbable graft , Cerasorb ของ Curasan ซึ่งเป็น เบต้า ไตรแคลเซี่ยมฟอสเฟต มีลักษณะคล้าย ไฮดรอกซี่อะพาไทต์ แต่ไม่ได้มาจากธรรมชาติ และBiogran ของ 3i เป็น bioactive glass granules ซึ่งมีระยะเวลาในการ degradation ยาว

2.4 **ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง** (Review of related literatures)

วิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกเป็นทางเลือกใหม่สำหรับวัสดุแทนกระดูก แบ่งออกเป็นสามกลุ่มใหญ่ ๆ (1) cell-based strategies; (2) growth factor-based strategies; และ (3) matrix-based strategies (Mauney, Kaplan and Volloch, 2004; Meijer *et al.*, 2008) โดยที่วัสดุแทนกระดูกที่จะนำมาใช้ทดแทนความสูญเสียนั้นควรที่จะต้องมีคุณสมบัติสามประการดังต่อไปนี้

1. Osteogenic property คือคุณสมบัติในการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกใหม่

2. Osteoinductive property คือคุณสมบัติในการเหนี่ยวนำ เซลล์กระดูก เข้ามาใน bony defect รวมไปถึงคุณสมบัติในการเหนี่ยวนำให้เกิด การเพิ่มจำนวน และ differentiation ของ osteoblast precursor cell

3. Osteoconductive property คือคุณสมบัติของโครงเนื้อเยื่อในการเตรียมพื้นที่สำหรับเป็นที่อยู่ของเซลล์กระดูก และรักษาปริมาตรไว้ได้ในช่วงเวลาที่เหมาะสมกับการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกใหม่โดยที่ในปัจจุบันวัสดุแทนกระดูกส่วนใหญ่มีคุณสมบัติ osteoconductive และบางชนิดที่คาดว่าจะมีคุณสมบัติ osteoinductive มีเพียง Autogenous Bone Grafting เท่านั้นที่มีคุณสมบัติต่างๆครบทั้ง สามประการ (Garg, 2004)

จากงานวิจัยของ Yasuhiro Takeuchi และคณะ พบว่า ในกระบวนการซ่อมแซมกระดูกที่ได้รับความเสียหาย osteoblastic cells ที่เคลื่อนที่เข้าจะทำการสร้าง คอลลาเจนชนิดที่ 1 ซึ่งคอลลาเจน ที่ถูกสร้างขึ้นนี้จะกระตุ้น cell ที่เข้ามาให้เกิด Osteogenic differentiation โดย Osteogenic differentiation ของเซลล์ osteoblastic MC3T3-E1สามารถถูกยับยั้งได้ถ้าเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมสารยับยังการสังเคราะห์ คอลลาเจน จากการที่ผิวหนังในชั้นหนังแท้มีองค์ประกอบเป็น คอลลาเจนชนิดที่ 1 มากที่สุด นอกจากนั้นยังมี GAGs ที่มี กรดไฮยาลูรอนิค ซึ่งเป็น GAGs ซึ่งพบมากในเมทริกซ์นอกเซลล์ของกระดูกเป็นส่วนใหญ่ ทำให้น่าเชื่อได้ว่า สารสกัดจากผิวหนังจะมีคุณสมบัติที่ดีในการเป็นวัสดุทดแทนกระดูก โดยที่มีการนำสารสกัดจากผิวหนังมาใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อผิวหนัง และพบว่ามีคุณสมบัติหลายประการที่เหมาะสมกับการนำมาใช้เป็นวัสดุแทนกระดูก กล่าวคือ

1. มีองค์ประกอบหลักเป็น คอลลาเจนชนิดที่ 1 ซึ่งพบมากในเนื้อเยื่อกระดูก
2. ไม่พบว่ามีการต่อต้านจากระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วย (ทดสอบในสัตว์ทดลอง)
3. เมื่อทำการ cross-linking แล้ว จะทำให้มีความแข็งแรง คงทนต่อสภาพแวดล้อมที่เป็นแผลได้ยาวนานและมีการสลายตัวไปในระยะเวลาที่เหมาะสมเพื่อถูกแทนที่ด้วยเนื้อเยื่อใหม่
4. ไม่ขัดขวางกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่
5. สามารถขึ้นรูปได้อย่างเหมาะสมต่อการนำเอาไปใช้งานเป็นวัสดุแทนกระดูก

จากรายงานความก้าวหน้างานวิจัย โครงการวิจัยเพื่อพัฒนาโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเบ้าฟันในงานทันตกรรมรากเทียม พบว่าสารสกัดจากผิวหนังสูตร DE-2 ซึ่งนำมาใช้ในงานวิจัยนี้ มีคุณสมบัติที่ดีในการเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ โดยเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกสามารถเจริญเติบโตภายในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากสารสกัดจากผิวหนังสูตร DE-2 ได้ดีที่สุด และโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากสารสกัดจากผิวหนังทุกสูตรมีกิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase สูงกว่า

ในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากคอลลาเจนชนิดที่ 1 (Sigma) โดยโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากสารสกัดจากผิวหนังสูตร DE-2 สูงสุด ณ วันที่ 14 ซึ่งเป็นวันที่เซลล์มีการแสดงออกของเอนไซม์ Alkaline phosphatase ในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์แต่ละสูตรสูงที่สุดและในวันที่ 21 วันซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการทดลอง ตามลำดับ จากผลการทดลองผู้วิจัยวิเคราะห์ว่าสารสกัดจากผิวหนังในสูตร DE-2 มีความเหมาะสมในการนำมาใช้ทำโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์มากที่สุด เพราะหากพิจารณาจากปริมาณของเอนไซน์ Alkaline phosphatase ซึ่งเป็นสัญญาณเริ่มต้นของการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดพบว่า DE-2 สามารถชักนำให้สเต็มเซลล์ไขกระดูกเปลี่ยนเป็นเซลล์กระดูกบนโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ได้ดีที่สุด และเซลล์ต้นกำเนิดสามารถเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนได้บนโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์DE-2 ได้ดีที่สุด

ปัจจุบันมีวัสดุต่าง ๆ เพื่อการบูรณะกระดูกให้เลือกอยู่พอสมควรตามที่กล่าวมาแล้วด้านบน ซึ่งการเลือกที่จะใช้วัสดุแทนกระดูกชนิดใด ก็มีปัจจัยต่าง ๆ เข้ามามีผล ไม่ว่าจะเป็น ขนาดของความวิการของกระดูก สภาพของเนื้อเยื่อกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อนโดยรอบ ประมาณของ blood circulation โดยส่วนใหญ่มีการนำวัสดุแทนกระดูกที่จะนำมาใช้ปลูกในบริเวณที่เกิดความวิการของกระดูกขากรรไกรที่แตกต่างกัน ซึ่งอาจจะเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้ผลที่ได้จากการทำการปลูกกระดูกแตกต่างกันด้วย แบ่งออกเป็นกลุ่ม ๆ ดังนี้ (Robert Lanza, 2007)

1. ใช้เนื้อเยื่ออ่อน (soft – tissue pedicled flaps)
2. การปลูกกระดูกภายใต้ภาวะที่ไม่มีการไหลเวียนของระบบเลือด (nonvascularized soft and hard tissue graft) ซึ่งเป็นการทำการปลูกกระดูกภายหลังจากมีการสูญเสียฟันมาเป็นเวลานานทำให้ เกิดกระบวนการหาย และมีการละลายตัวของกระดูกขากรรไกร โดยที่ความสำเร็จในการทำการปลูกประดูกโดยใช้ non vascularized graft นั้นขึ้นอยู่กับ vascularization ของ tissue bed ซึ่งก็คือ เนื้อเยื่อกระดูก และเนื้อเยื่ออ่อนที่อยู่โดยรอบ ว่าเพียงพอหรือไม่
3. การปลูกกระดูกภายใต้ภาวะที่มีการไหลเวียนของระบบเลือด (soft and hard tissue vacularized graft) ซึ่งเป็นการทำการปลูกกระดูกทันทีภายหลังสูญเสียฟัน หรือเป็นการปลูกกระดูกโดยใช้ vascularized graft ซึ่งถูกจำกัดด้วยเรื่องของปริมาณของกระดูก บริเวณที่เราไป เก็บเนื้อเยื่อกระดูกมา (doner site) และขนาดของความวิการของกระดูกเบ้าฟัน
4. การปลูกเนื้อเยื่อกระดูกร่วมกับการใช้วัสดุโพลีเมอร์ประดิษฐ์ปิดบาดแผล (Alloplastic reconstructions with prosthetic appliances)

แม้ว่าวัสดุที่อยู่ในกลุ่ม vascularized graft คือ autogenous bone graft ซึ่งยอมรับว่าทำให้เกิดความสำเร็จสูงในการทำ bone reconstruction แต่ก็มีข้อจำกัดในเรื่องต่าง ๆ นอกจากในเรื่องของปริมาณที่กล่าวมาแล้ว ยังมีผลข้างเคียงในเรื่องความเจ็บปวด บวม อักเสบติดเชื้อ อาการชานาน หรือเลือดออกมาก จากแผลบริเวณที่เก็บเนื้อเยื่อกระดูกมา งานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกจึงเข้ามามีบทบาทเป็นทางเลือกใหม่ และเป็นความหวังในการที่จะเพิ่มประสิทธิภาพในการให้การรักษาได้ โดยที่จะมุ่งเป้าหมายไปที่การพัฒนาโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ให้มีคุณสมบัติทางชีววิทยาและคุณสมบัติเชิงกลที่เหมาะสมต่อปฏิสัมพันธ์ระหว่างชีวโมเลกุลและเซลล์ โดยที่โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ในอุดมคติในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกตามที่ได้รวบรวมมาจากงานวิจัยก่อนหน้านี้มีดังนี้(Tangsadthakun *et al.*, 2007)

1. มีการสลายตัวไปได้เองตามธรรมชาติในระยะเวลาที่เหมาะสมกับการเกิดเนื้อเยื่อกระดูก (biodegradable)
2. มีความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อของร่างกาย (biocompatibility)
3. มีคุณสมบัติในการเหนี่ยวนำให้เกิดเนื้อเยื่อกระดูกใหม่ (osteoinductive potential) ได้เหมือนกับการทำการปลูกกระดูกจากเนื้อเยื่อกระดูกของผู้ป่วยเอง
4. มีลักษณะทางโครงสร้างและความพรุน (porosity) ที่เหมาะสมกับเซลล์กระดูก
5. มีลักษณะของรูพรุนที่มีความเชื่อมต่อกันระหว่างรูพรุน (interconnectivity)
6. มีความสามารถในการรักษาโครงสร้างสามมิติ
7. มีการตอบสนองที่ดีต่อการยึดติดเชิงกลในขณะที่มีการทำการปลูกกระดูก
8. ลักษณะพื้นผิวของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์มีความสามารถในการให้เซลล์กระดูกเข้ามายึดติด

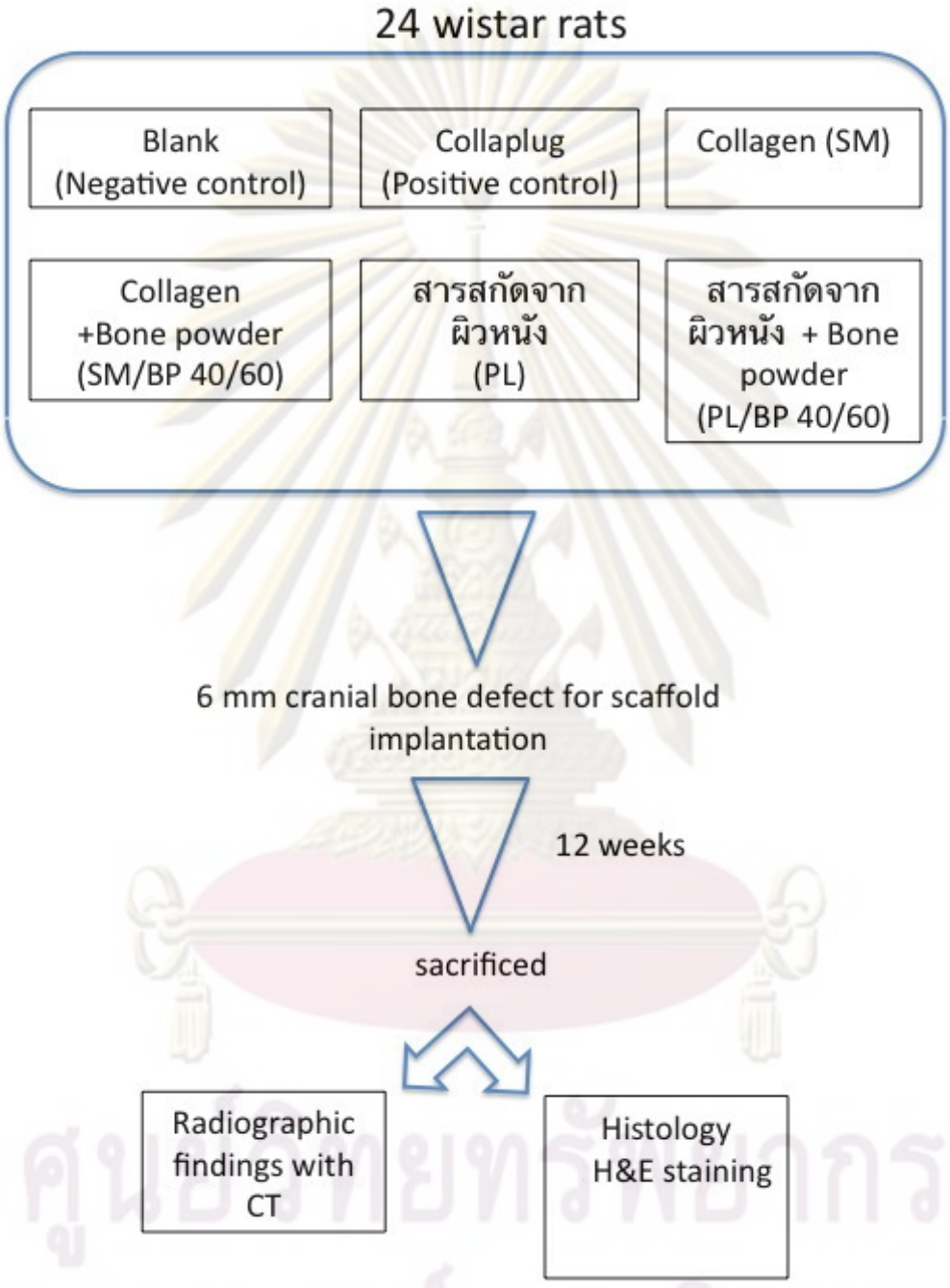
โดยที่โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ดังกล่าวจะต้องผ่านการทดสอบใน craniofacial bone ใน animal model โดยวัสดุที่มีที่มาจากธรรมชาติ วัสดุโพลีเมอร์สังเคราะห์ เช่น Poly lactic acid , Poly glycolic acid ,Poly propalene fumarate ,Poly caprolactone, calcium phosphate ceramics วัสดุต่าง ๆ เหล่านี้ได้ผ่านกระบวนการทำให้เป็นรูปพรุน หรือ hydrogel ซึ่งจะทำให้เกิดการเกิดใหม่ของเนื้อเยื่อกระดูกภายในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ นอกจากนั้นแล้วยังอาจจะถูกพัฒนาให้มีความสามารถการปล่อย Bioactive molecule เช่น growth factor หรือ nucleic acid ซึ่งจะร่วมกับ bioactive molecule ที่ถูกปล่อยออกมาจากบาดแผล ทำให้เกิดการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกใหม่

ทำให้ในการพัฒนาโครงเลี้ยงเซลล์ มีความพยายามในการที่จะเพิ่ม Bioactive molecule ลงไปเป็นส่วนผสมที่จะช่วยทำให้โครงเลี้ยงเซลล์มีคุณสมบัติที่ดีขึ้นในการเหนี่ยวนำให้เซลล์ต้น

กำเนิดเปลี่ยนแปลงไปเป็น เซลล์ปลายทางที่ต้องการ สำหรับในการพัฒนาโครงเลี้ยงเซลล์สำหรับกระดูก การใส่ผงกระดูกลงไปมีความคาดหวังว่าโปรตีนต่าง ๆ ที่อยู่ในผงกระดูกจะทำหน้าที่เป็น Bioactive moleculeในการเหนี่ยวนำให้เซลล์ต้นกำเนิดเปลี่ยนแปลงไปเป็น เซลล์กระดูกได้(Felin *et al.*) โดยจากงานวิจัยของ Kohles และคณะ (Kohles *et al.*, 2000)) ได้ทำการทดลองในกระดูกขากรรไกรลิงเปรียบเทียบการเกิดกระดูกใหม่ขึ้นทดแทนรอยวิการของกระดูก พบว่า คอลลาเจนความเข้มข้น 20 mg/mlต่อกระดูกในสัดส่วน 60:40 โดยมวล ทำให้เกิดการเติมรอยวิการของกระดูกใหม่ได้มากที่สุดเมื่อเทียบกับสัดส่วนคอลลาเจนต่อกระดูก 20:80 , 40:60 และคอลลาเจนปราศจากกระดูก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 เนื้อเยื่อผิวหนัง

ผิวหนังได้รับจากศพที่มีผู้บริจาคร่างกายภายหลังเสียชีวิตแก่ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โดยผู้วิจัยได้ทำหนังสือแจ้งไปยังภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์

มหาวิทยาลัยโดยได้รับการอนุมัติจากหัวหน้าภาควิชาแล้ว

3.1.2 เนื้อเยื่อกระดูก (ได้รับบริจาคจาก ศูนย์เนื้อเยื่อชีวภาพ ศิริราชพยาบาล)

3.1.3 Bovine collagen type I (ของยี่ห้อ Sigma)

3.1.4 70% ethanol

3.1.5 purified deionized (DI) water

3.1.6 0.5 M acetic acid

3.1.7 1 M NaCl

3.1.8 0.05 M glycine solution

3.1.9 0.25% Glutaraldehyde solution

3.1.10 NH_4Cl 160 mM

3.1.11 (Pepsin) 100 $\mu g/ml^{1}$ ใน DI water

3.1.12 NaOH 2N (pH8)

3.1.13 Chloroform

3.1.14 Methanol

3.1.15 Sodium thiopental

3.1.16 1% xylocaine

3.1.17 Vicryl 4-0

3.1.18 Gentamicin solution

3.1.19 Cholram ointment

3.1.20 Normal saline solution

3.1.21 Betadine

3.1.22 Biopsy punch 6 มิลลิเมตร

3.1.23 Blade 10, 15

3.1.24 Zoletil + Xylazine solution zoletil 50 mg/ml

3.1.25 Battalion

3.1.26 Syringe 3 cc

3.1.27 Needle 18, 27

3.1.28 Surgical set

3.1.29 Mould จากเหล็กกล้าไร้สนิม (Stainless steel)

3.1.30 Autoclave (HVE -25/50,Hiclave)

3.1.31 -40c freezer (Heto, Powerdry LL3000, USA)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.32 Refrigerator (PT203,Italy)

3.1.33 Laminar Flow (HWS Series 254473,Australia)

3.1.34 Centrifuge (5810R , Eppendorf)

3.1.35 Forceps

3.1.36 Light Microscope (DS-Fi1,Nikon)

3.1.37 Dental Implant drilling unit (Bio med 3i)

3.1.38 trephine bur outer diameter 6 mm.

3.2 การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์สำหรับกระดูก

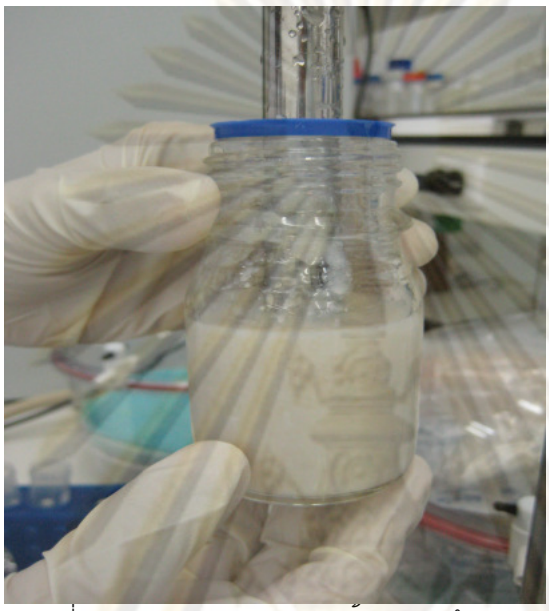
3.2.1 การเตรียมสารสกัดจากผิวหนัง

นำผิวหนังมาแช่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 นอร์มัล ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผิวหนังที่ได้จะมีลักษณะนุ่มบวมน้ำเพิ่มขึ้น สามารถใช้ Forceps ลอกผิวหนังชั้นหนังกำพร้าออกได้ง่าย เมื่อลอกผิวหนังชั้นหนังกำพร้าออกจนหมดรวมทั้งลอกกำจัดเนื้อเยื่อไขมันที่ติดปนมาออกจนหมดเรียบร้อยแล้วจะได้ผิวหนังชั้นหนังแท้ที่มีลักษณะสีขาว ซึ่งพร้อมสำหรับการนำไปเตรียมเป็นสารสกัดจากผิวหนังต่อไป

ภาพที่ 3.1 เนื้อเยื่อผิวหนังเมื่อลอกผิวหนังชั้นหนังกำพร้าออกจนหมด

ผิวหนังชั้นหนังแท้ที่เตรียมได้จะถูกนำมาชั่งน้ำหนังเปียก (Wet weight) หลังจากนั้นจึงเตรียมสารละลายกรดแอซิติกเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ปริมาตรเป็น 15 เท่าของน้ำหนักเปียกที่ชั่งได้ เพื่อใช้สำหรับการเตรียมสารละลายผิวหนังชั้นหนังแท้ ผิวหนังชั้นหนังแท้ถูกนำมาบดด้วยเครื่องบด

เนื้อจนละเอียด จากนั้นจึงนำมาผสมกับสารละลายกรดแอซิติกเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่เตรียมไว้ นำสารผสมที่ได้มาปั่นด้วยเครื่องปั่นเพื่อให้หนังแท้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันในสารละลายกรดแอซิติก สารละลายผิวหนังชั้นหนังแท้ถูกนำมาผสมให้กลมกลืนเป็นเนื้อเดียวกันอีกครั้งด้วยด้วยเครื่อง Homogenizer ซึ่งจะทำให้ได้สารละลายผิวหนังชั้นหนังแท้ที่มีลักษณะหนืดข้น สีขาว



ภาพที่ 3.2 สารละลายผิวหนังชั้นหนังแท้

สารละลายผิวหนังชั้นหนังแท้เมื่อนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1500 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที จะเกิดการแยกชั้นของสารละลาย ของเหลวสีขาวด้านบนที่ได้ คือ สารสกัดจากผิวหนังสูตร PAD HEAVY ตะกอนด้านล่างเป็นตะกอนหยาบของผิวหนัง (Demal remnant) ที่ไม่ละลาย และจะถูกกำจัดทิ้งไป สารสกัดจากผิวหนังสูตร Pad heavy เมื่อนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที จะเกิดการแยกชั้นของสารละลายอีกครั้ง โดยที่ของเหลวใสด้านบน คือ สารสกัดจากผิวหนังสูตร PAD LIGHT (DE-2) และ ตะกอนด้านล่างที่ได้ คือ สารสกัดจากผิวหนังสูตร PAD GAGs ในงานวิจัยนี้เรานำเอาสารสารสกัดจากผิวหนังสูตร PAD LIGHT (DE-2) มาทำการทดลอง

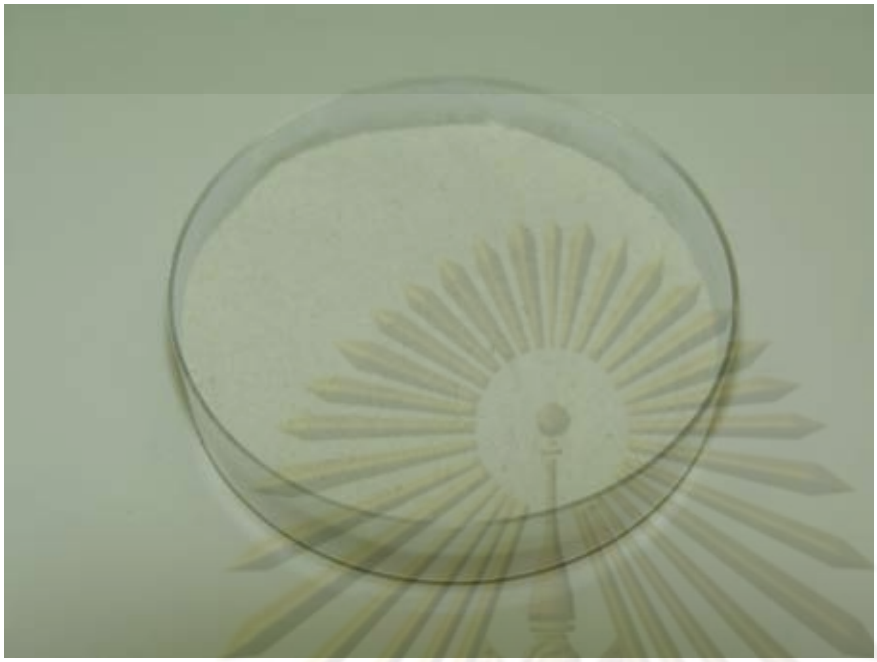
3.2.2 การเตรียมผงกระดูก

กระดูกสดส่วนหัวข้อสะโพกบริเวณส่วนบนของกระดูกต้นขา (Femoral head) จากศูนย์เนื้อเยื่อชีวภาพกรุงเทพฯ ล้างกระดูกด้วยน้ำปลอดเชื้อ(Sterile) เพื่อขจัดสิ่งสกปรกและเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ -70 เซลเซียส เพื่อรอกระบวนการตรวจเลือด แล้วทำการตัดกระดูกด้วยเลื่อยจนมีขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร และเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ -70 เซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ บรรจุ

กระดูกในขวดปลอดเชื้อ เติมน้ำ DI water และนำไปเขย่าในเครื่องล้างความถี่สูง (Ultrasonic Bath)หรือเขย่าด้วยเครื่อง Shaker ที่ 200 rpm เพื่อทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก โดยเปลี่ยนน้ำเรื่อยๆจนกว่าจะใส จากนั้นเติม NH_4Cl 160 mM เพื่อขจัดเซลล์เม็ดเลือดแดงส่วนที่เหลือ ล้าง NH_4Cl ด้วยน้ำ DI water ล้างด้วยเปปซิน (Pepsin) 100 $\mu g/ml^{1}$ ใน DI water ที่อุณหภูมิ 4 เซลเซียส เพื่อไล่น้ำ จากนั้นแช่กระดูกในเปปซิน ที่อุณหภูมิ 4 เซลเซียส 24 ชั่วโมง เพื่อขจัดโปรตีน ล้างกระดูกด้วยน้ำ DI water จากนั้นแช่กระดูกใน NaOH 2N (pH8) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เพื่อยับยั้งการทำงานของเปปซิน เติม Chloroform:Methanol (2:1) นำไปเขย่าด้วยเครื่อง Shaker ที่ 138 rpm 30 นาที เพื่อขจัดไขมัน ล้างกระดูกด้วยน้ำ DI water อีก 2 รอบและเทน้ำทิ้งผ่านตะแกรงปลอดเชื้อ ล้างกระดูกด้วย alcohol 70% ประมาณ 3 รอบ (ใช้ alcohol ประมาณ 250 มิลลิลิตร) เพื่อไล่น้ำที่ติดค้างในกระดูก เทกระดูกจากขวดปากแคบลงในถ้วยปลอดเชื้อ และวางไว้ในตู้ปลอดเชื้อแบบลาร์มินาร์ (Laminar flow hood) และเปิดระบบ flow เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อระเหย Alcohol ออกจากกระดูก แล้วใช้คีม(Forcep)ปลอดเชื้อ คีบกระดูกแต่ละชิ้นบรรจุลงในขวดปากแคบที่ปลอดเชื้อ เพื่อเข้าสู่กระบวนการบดในขั้นถัดไป โดย DI water ที่ใช้ต้องผ่านการฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อโรค (Autoclave) ทุกครั้ง

ภาพที่ 3.3 กระดูกที่ผ่านการตัดด้วยเลื่อยจนมีขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 3.4 ผงกระดูกที่ผ่านการบด

3.2.3 การเตรียมสารละลายคอลลาเจน

เตรียมจากสารละลายคอลลาเจนชนิดที่ 1 (Collagen type I) ความเข้มข้นร้อยละ 0.8 โดยมวล/ปริมาตร (ในสารละลายกรดแอซิติก ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์) โดยใช้คอลลาเจนชนิดที่ 1 จากบริษัท Sigma-Aldrich corporation เนื่องจากเป็นคอลลาเจนที่นิยมใช้ในการเตรียมโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ลักษณะของสารละลายคอลลาเจนชนิดที่ 1 ที่เตรียมได้มีลักษณะเหนียวหนืดเกาะกันเป็นก้อน ใสไม่มีสี ใสกว่าสารสกัดจากผิวหนัง

3.2.4 การขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์

นำสารสกัดจากผิวหนังมาขึ้นรูปโดยทำการขึ้นรูปทั้งแบบ ผสมผงกระดูกและไม่ผสมผงกระดูกเช่นเดียวกับสารละลายคอลลาเจนชนิดที่ 1 ทำให้ได้โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีความแตกต่างกัน 4 สูตร ในส่วนของ sample ทำการผสมผงกระดูกลงในสารสกัดจากผิวหนัง ในอัตราส่วน น้ำหนักแห้งของสารสกัดจากผิวหนัง: ผงกระดูก เท่ากับ 60 : 40 ถูกนำมาเตรียมเป็นโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์โดยการฉีดวัตถุดิบแต่ละชนิดเข้าสู่แม่แบบขึ้นรูป (Mould) จากเหล็กกล้าไร้สนิม (Stainless steel) รูปทรงสี่เหลี่ยม ร่องลึก 2 มม. หลังจากฉีดวัตถุดิบสำหรับทำโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์เข้าสู่แม่แบบขึ้นรูปแล้ว จะนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้น้ำในสารละลายวัตถุดิบเกิดเป็นผลึกน้ำแข็ง จากนั้นจึงเปิดกระจกที่ปิดทับด้านบนออกแล้วจึงนำเข้าสู่เครื่อง Lyophilizer เพื่อทำการระเหิดผลึกน้ำแข็งออกจากวัตถุดิบภายใต้

สภาวะสุญญากาศ โดยกระบวนการ Lyophilization หรือ Freeze drying เมื่อวัตถุดิบแห้งสนิทดีแล้ว (ใช้ประมาณ 2 วันในกระบวนการ Lyophilization) จึงนำออกมาเข้าสู่ตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะสุญญากาศ เป็นเวลาอย่างน้อย 3 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มอุณหภูมิของตัวอย่าง จากนั้นจึงนำตัวอย่างออกมาจากแม่แบบขึ้นรูป แล้วนำตัวอย่างมาอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะสุญญากาศ ในขั้นตอนนี้จะเกิดกระบวนการดึงโมเลกุลของน้ำออกจากโมเลกุลของวัตถุดิบทำให้เกิดการเชื่อมขวางโมเลกุล (Cross linking) เมื่อสิ้นสุดกระบวนการนี้จะทำให้ได้โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่มีความแข็งแรงมากขึ้น
โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากวัตถุดิบแต่ละชนิด จะถูกทำแบบวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ด้วยการเจาะด้วย Biopsy punch 6 มิลลิเมตร

3.3 ขั้นตอนก่อนผ่าตัด

3.3.1 สัตว์ทดลอง : 12-14-week-old female Wistar rats

3.3.2 การแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลอง ใช้สัตว์ทดลอง 24 ตัว แบ่งเป็น 6 กลุ่ม

1. Blank (negative control)
2. ฝัง CollaPlug® (positive control)
3. ฝัง Bovine collagen type I (SM)
4. ฝัง Bovine collagen type I + bone powder (SM/BP 40/60)
5. ฝัง สารสกัดจากผิวหนัง (PL)
6. ฝัง สารสกัดจากผิวหนัง + bone powder (PL/BP 40/60)

Animal random lists

sample	No.lable (No.rat)	No. lable (No.rat)
1. Blank (negative control)	#1 (12)	#13 (19)
2. CollaPlug® (positive control)	#2 (5)	#14 (11)
3. SM	#3 (1)	#15 (15)
4. SM/BP 40/60	#4(2)	#16 (22)
5. PL	#5 (3)	#17 (10)
6. PL/BP 40/60	#6 (7)	#18 (16)

1. Blank (negative control)	#7 (18)	#19 (20)
2. CollaPlug® (positive control)	#8 (9)	#20 (21)
3. SM	#9 (14)	#21 (24)
4. SM/BP 40/60	#10 (17)	#22 (29)
5. PL	#11 (8)	#23 (23)
6. PL/BP 40/60	#12 (13)	#24 (25)

ตารางที่3.1 แสดงการฝังชิ้นงานในสัตว์ทดลองแบบสุ่ม

3.3.3 การเตรียมชิ้นงาน : Sterilize the scaffolds by ethylene oxide

3.3.4 ห้องผ่าตัด

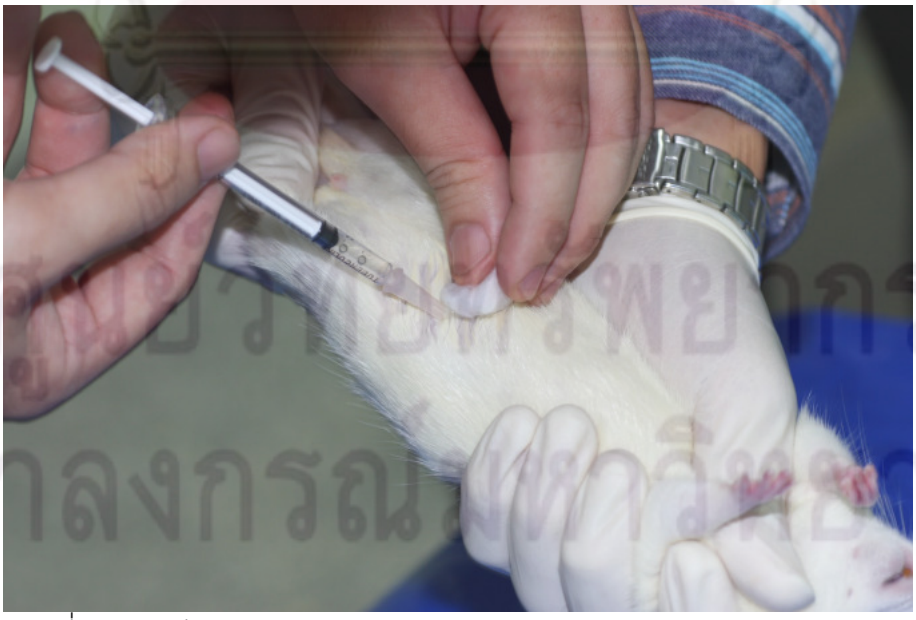
Surgical Training Laboratory ชั้น 4 อาคาร แพทยพัฒน์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬา เตรียม Surgical bed Surgical light Warming pad

3.3.5 แบบบันทึกข้อมูลสัตว์ทดลอง (ภาคผนวก ก)

<u>3.4 ขั้นตอนการผ่าตัด</u>

3.4.1 การดมยาหนู

1. เตรียม Zoletil + Xylazine solution zoletil 50 mg/ml (Virbac animal health, France) 30 mg/kg dose + Seton 2% (Xylazine , Laboratoris Calier, S.A., Barcelona, Spain) 10 mg/kg dose, ฉีดแบบ intra peritoneal

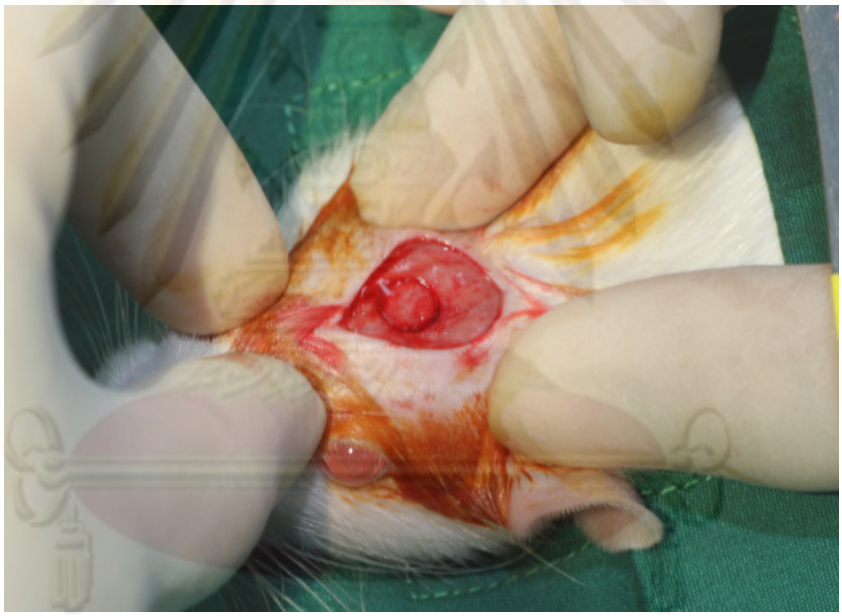


ภาพที่ 3.5 การฉีดยาสลบหนู

2. ฉีด antibiotic (Enrofloxacin (Genflaxcin, General Drugs House Co., Ltd.) 10 mg/kg, SC) and Analgesic drug (Nsaids (Rimadyl®), 5 mg/kg, SC)
3. Label หนูแต่ละตัว
4. โกนขนหัวหนู

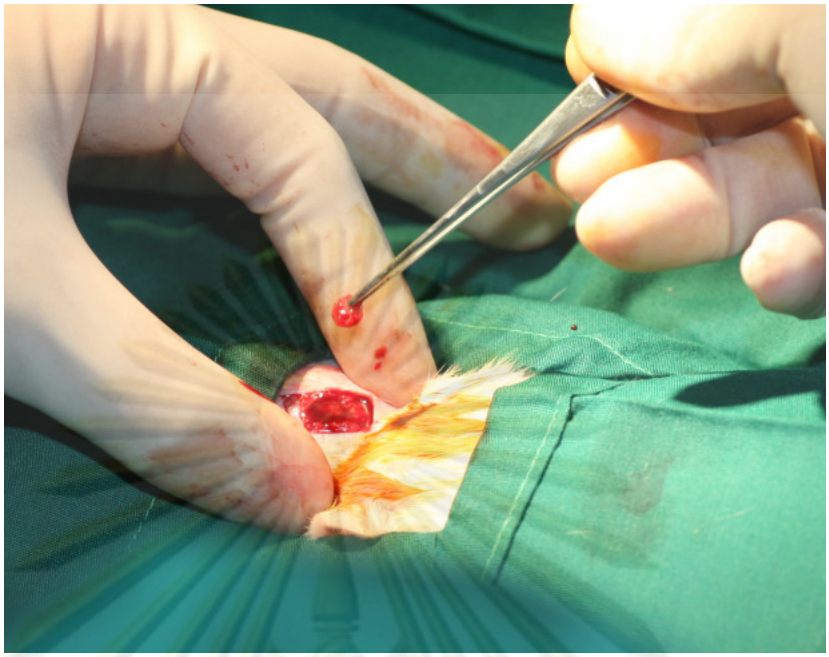
3.4.2 การทำแผลบนกะโหลกศีรษะหนู

1. Sterile บริเวณที่จะทำการผ่าตัด with 70% ethanol and betadine เปิด flap แบบ full thickness แต่เว้นไม่ขูดส่วนที่เป็น เยื่อหุ้มกระดูกออก ออก
2. เจาะกะโหลกหนู บริเวณ mid line with 5 mm Trephine bur (เส้นผ่านศูนย์กลาง รอบนอก 6 มิลลิเมตร) ดังภาพที่ 3.6
3. ใช้คีมหยิบชิ้นกระดูกออก และทำการห้ามเลือดด้วย sterile Gauze ดังภาพที่ 3.7



ภาพที่ 3.6 แสดงการเจาะกะโหลกศีรษะหนู

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. 

5.

ภาพที่ 3.7 แสดงการหยิบชิ้นกระดูกออกจากกะโหลกศีรษะหนู

3.4.3 การฝังชิ้นงาน

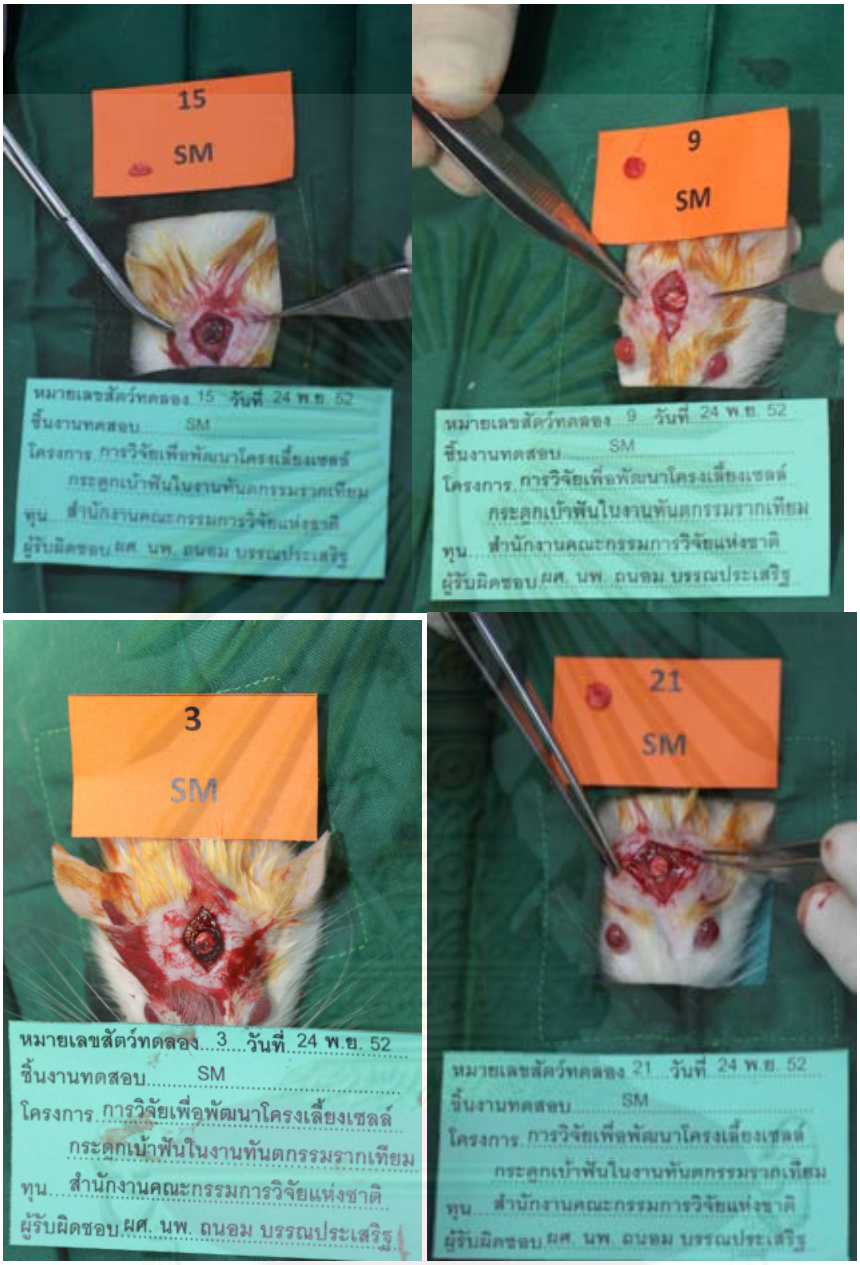
วางชิ้นงาน 6 mm scaffold ลงใน skull defects จากนั้นยึด scaffold กับ เยื่อหุ้มกระดูก ด้วยไหมไนลอน Prolene 6-0 แล้วทำการเย็บปิดแผลด้วย Prolene 6-0 ทา betadine และทำการห้ามเลือดด้วย sterile Gauze

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 3.8 แสดงการวางชิ้น CollaPlug® ลงใน แผลบริเวณกะโหลกหนู

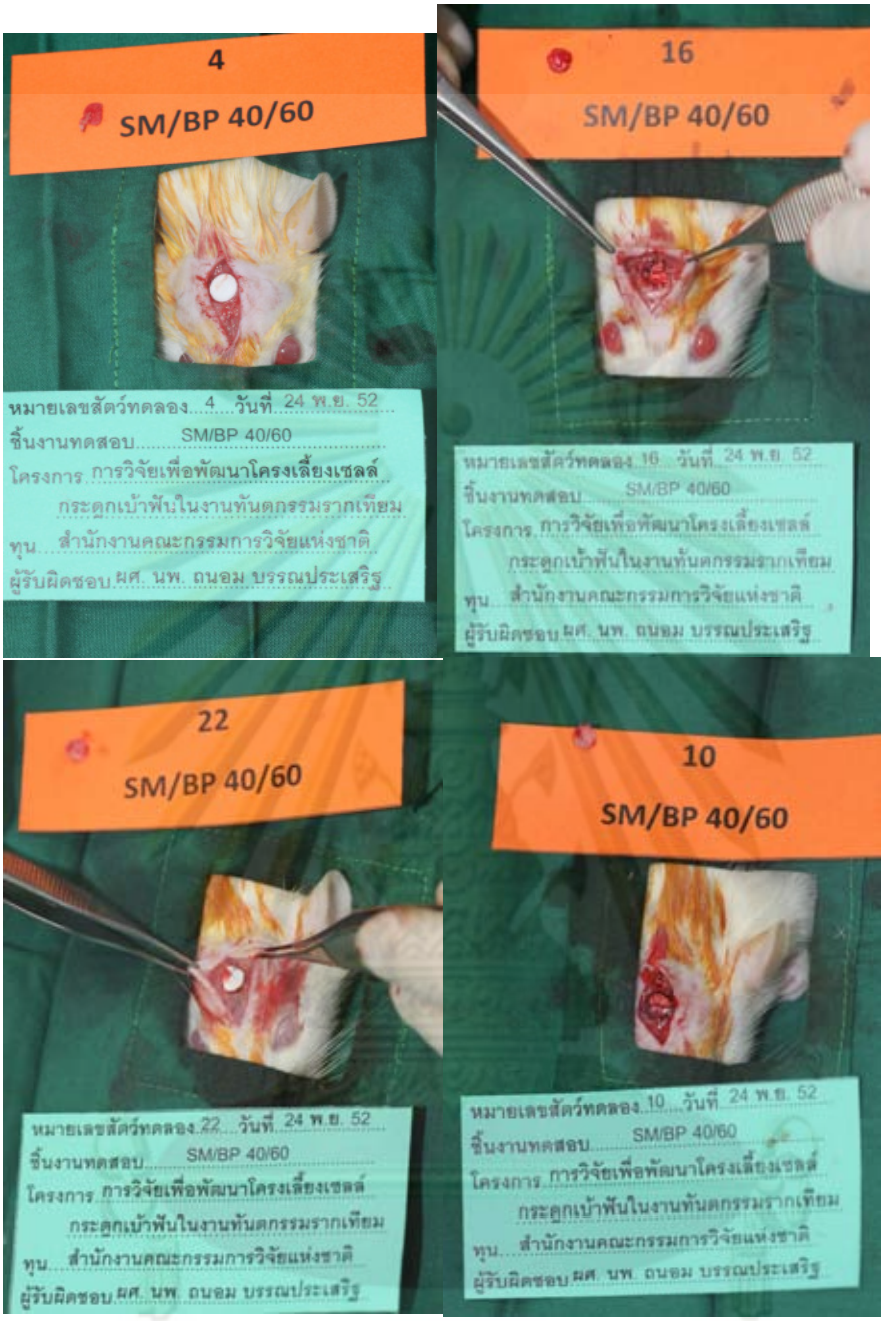
วาง CollaPlug® ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm ลงใน skull defects จากนั้นยึด scaffold กับ เยื่อหุ้มกระดูกด้วยไหมไนลอน Prolene 6-0 แล้วทำการเย็บปิดแผลด้วย Prolene 6-0 ทา betadine และทำการห้ามเลือดด้วย sterile Gauze

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



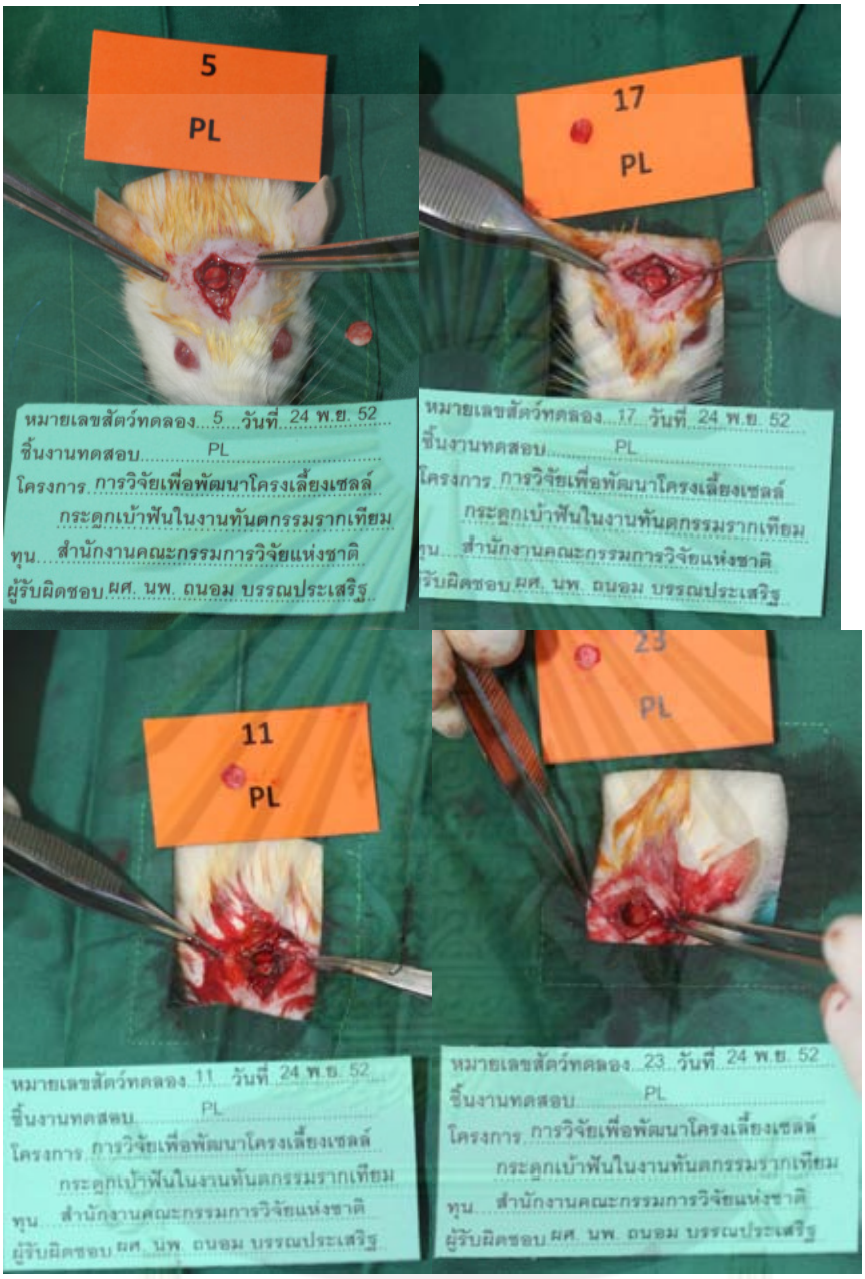
ภาพที่ 3.9 แสดงการวางชิ้น Bovine collagen type I ลงใน แผลบริเวณกะโหลกหนู

วางโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่ทำจาก Bovine collagen type I ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm ลงใน skull defects จากนั้นกด โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ให้อยู่นิ่งในรอยแผลด้วยการเย็บเยื่อหุ้มกระดูกปิดด้วยไหมไนลอน Prolene 6-0 แล้วทำการเย็บปิดแผลด้วย Prolene 6-0 ทา betadine และทำการห้ามเลือดด้วย sterile Gauze



ภาพที่ 3.10 แสดงการวางชิ้น Bovine collagen type I ผสม ผงกระดูกลงในแผลบริเวณกะโหลกหนู

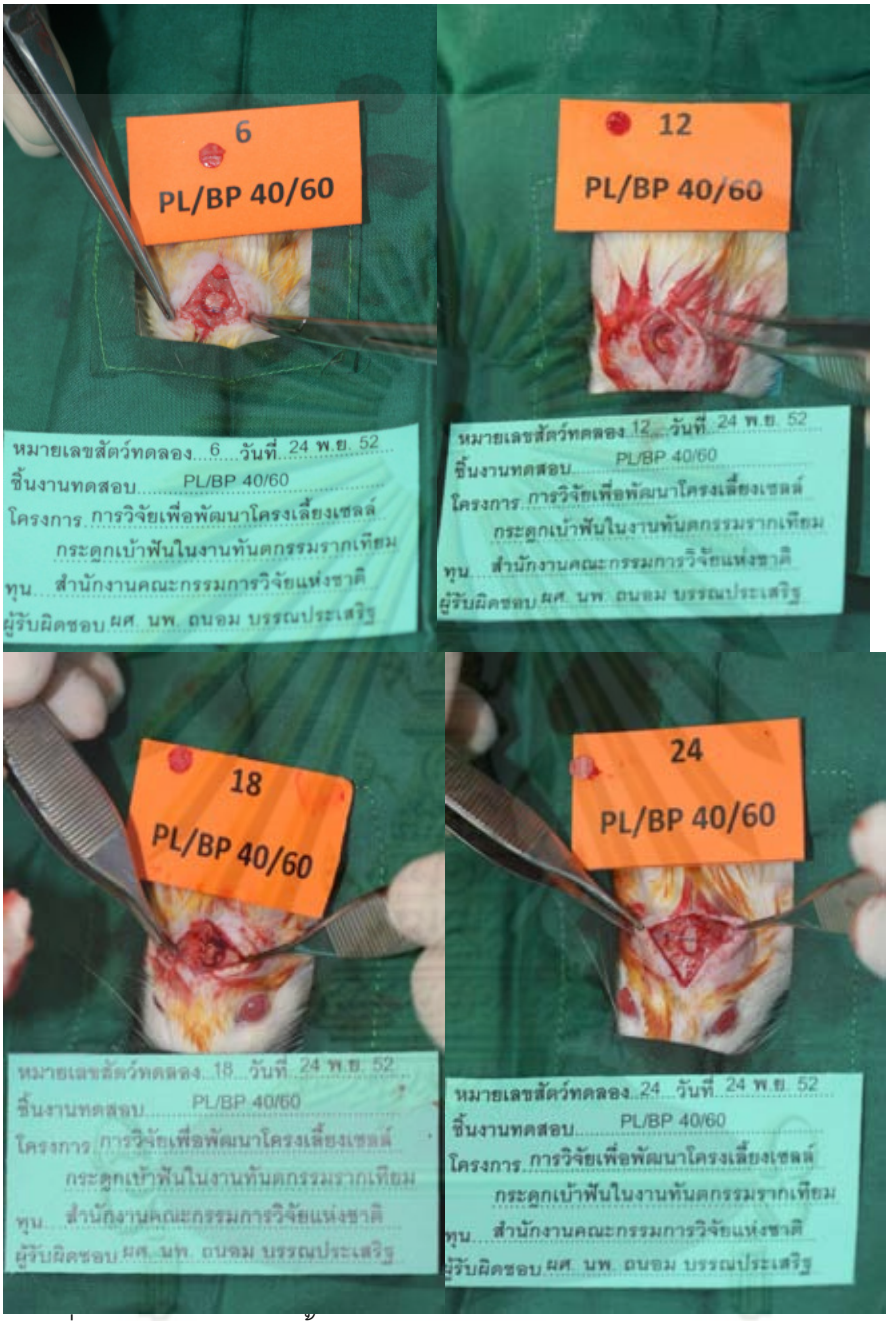
วางโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่ทำจาก Bovine collagen type I ผสมผงกระดูก ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm ลงใน skull defects จากนั้นกด โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ให้อยู่นิ่งในรอยแผลด้วยการเย็บเยื่อหุ้มกระดูกปิดด้วยไหมไนลอน Prolene 6-0 แล้วทำการเย็บปิดแผลด้วย Prolene 6-0 ทา betadine และทำการห้ามเลือดด้วย sterile Gauze



ภาพที่ 3.11 แสดงการวางชิ้นงานจากสารสกัดผิวหนังลงในแผลบริเวณกะโหลกหนู

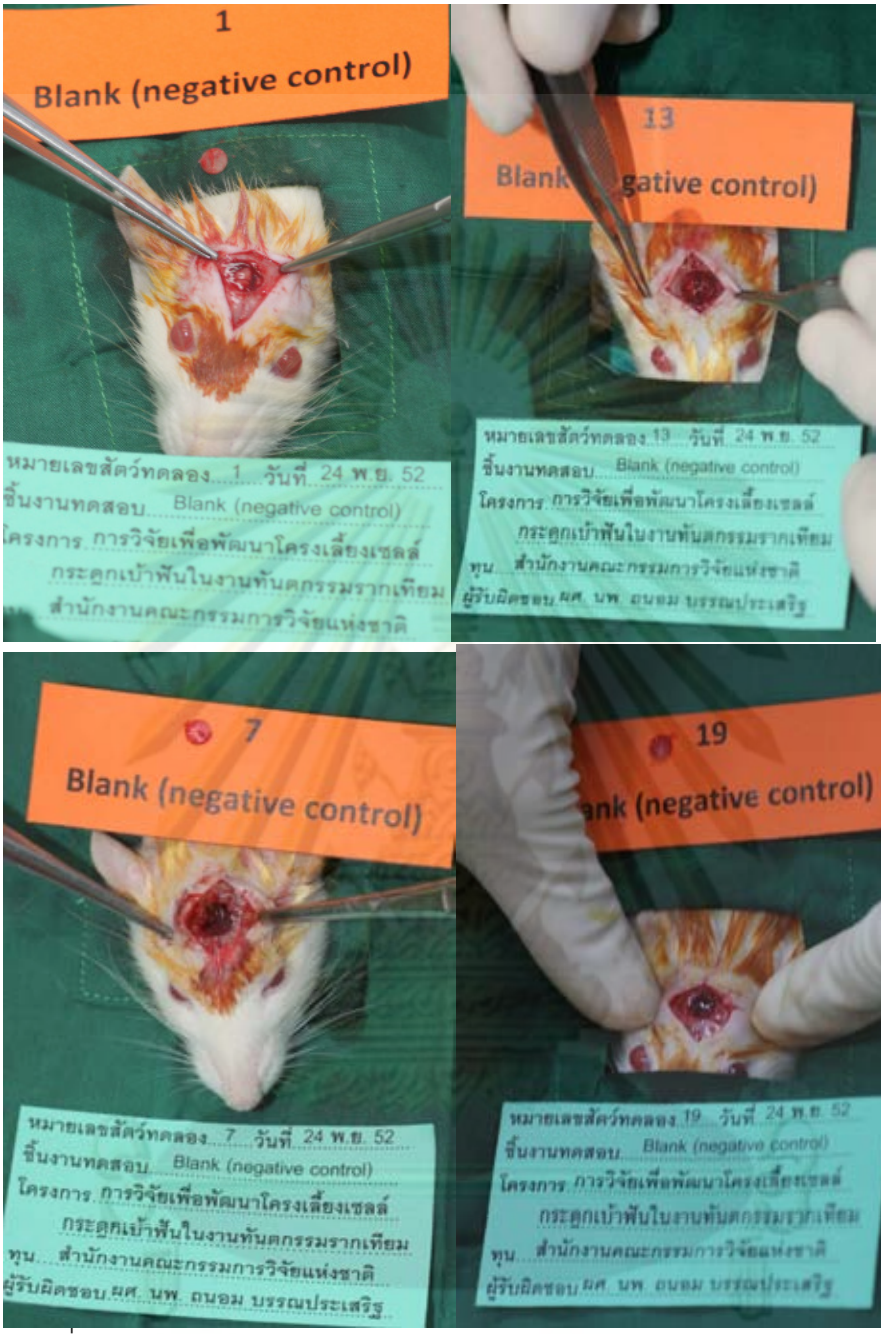
วางโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่ทำจาก สารสกัดผิวหนัง ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm ลงใน skull defects จากนั้นกด โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ให้อยู่นิ่งในรอยแผลด้วยการเย็บเยื่อหุ้มกระดูกปิดด้วยไหมไนลอน Prolene 6-0 แล้วทำการเย็บปิดแผลด้วย Prolene 6-0 ทา betadine และทำการห้ามเลือดด้วย sterile Gauze

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 3.12 แสดงการวางชิ้นงานจากสารสกัดผิวหนังผสมผงกระดูกลงในแผลบริเวณกะโหลกหนู

วางโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่ทำจาก สารสกัดผิวหนังผสมผงกระดูก ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm ลงใน skull defects จากนั้นกด โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ให้อยู่นิ่งในรอยแผลด้วยการเย็บเยื่อหุ้มกระดูกปิดด้วยไหมไนลอน Prolene 6-0 แล้วทำการเย็บปิดแผลด้วย Prolene 6-0 ทา betadine และทำการห้ามเลือดด้วย sterile Gauze



ภาพที่ 3.13 แสดงกลุ่ม negative control

ในส่วนของ negative control ไม่ได้มีการฝังชิ้นงาน เพียงแต่ทำการเจาะแผลบนกะโหลกศีรษะหนูแล้วเย็บปิด

3.5 การจัดการหนูหลังผ่าตัด

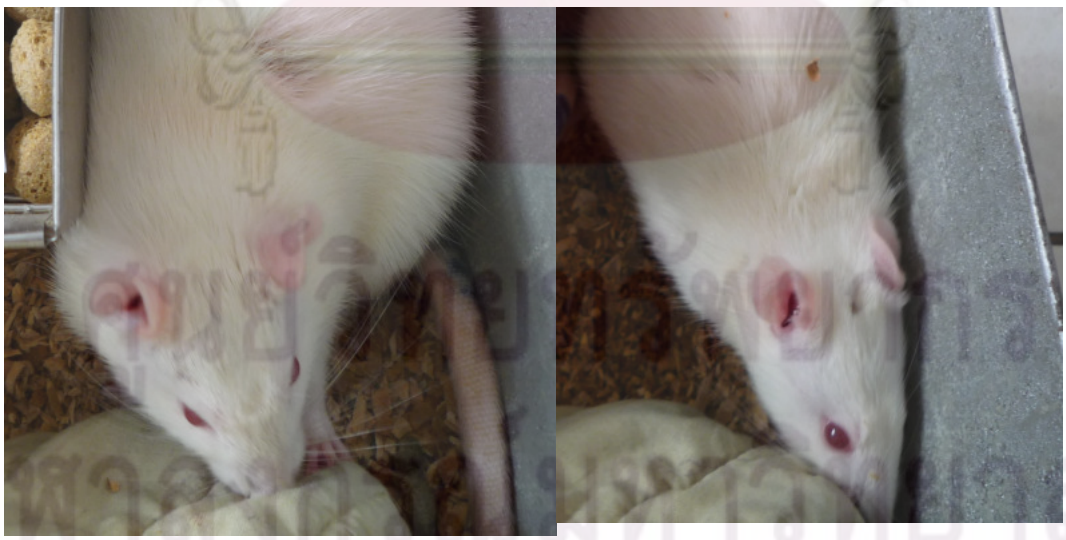
ทา Chloramphenicol ointment ลงบน sutured wound จัดหนูอยู่ใน warming pad จนกระทั่งหนูฟื้นแล้วจึงแยกกรงทำการ ติดป้ายเลขที่กรงแต่ละกรงด้วย ในวันที่ 1 ,2 ,3 หลังการผ่าตัดให้หนูกินน้ำที่ผสม Genfloxacin® (Enrofloxacin) 3mg/day

3.6 การเก็บข้อมูลหลังการผ่าตัด

3.6.1 การบันทึกติดตามอาการของหนูทดลอง

ทำการถ่ายภาพแผล ชั่งน้ำหนัก บันทึกผลอาการของหนูในวันที่ 1,2,3,4,5,6,7, สัปดาห์ที่ 2,3,4,5,6,7,8 ตามลำดับ

ภาพที่3.14 แสดงตัวอย่างแผลที่สัปดาห์ที่สองหลังการผ่าตัด

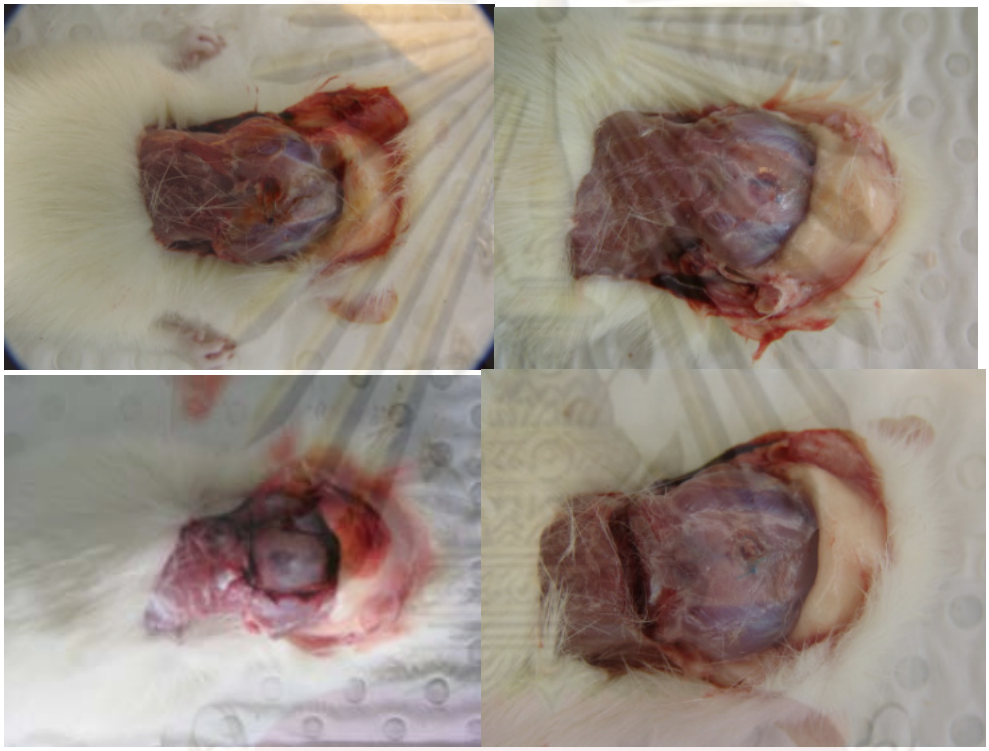


ภาพที่3.15 แสดงตัวอย่างแผลที่สัปดาห์ที่สี่หลังการผ่าตัด

3.6.2 การเก็บตัวอย่างชิ้นงานจากกะโหลกศีรษะหนู

ที่สัปดาห์ที่12 หนูทุกตัวถูกนำมาการุณฆาตด้วยการให้ ยาสลบ Thiopental เกินขนาด ก่อนนำมาเก็บตัวอย่างชิ้นงานและเนื้อเยื่อกระดูกโดยรอบด้วย การเปิด flap แบบรักษา เยื่อหุ้มกระดูกไว้(Cowan *et al.*, 2004) หลังจากนั้นใช้ เครื่อง Micromotor ตัดด้วย diamond disc เพื่อนำชิ้นงานทั้งหมดเก็บข้อมูลทางภาพรังสีและจุลกายวิภาคศาสตร์ โดยชิ้นงานทั้งหมดมี 23 ชิ้น เนื่องจาก หนู no 20

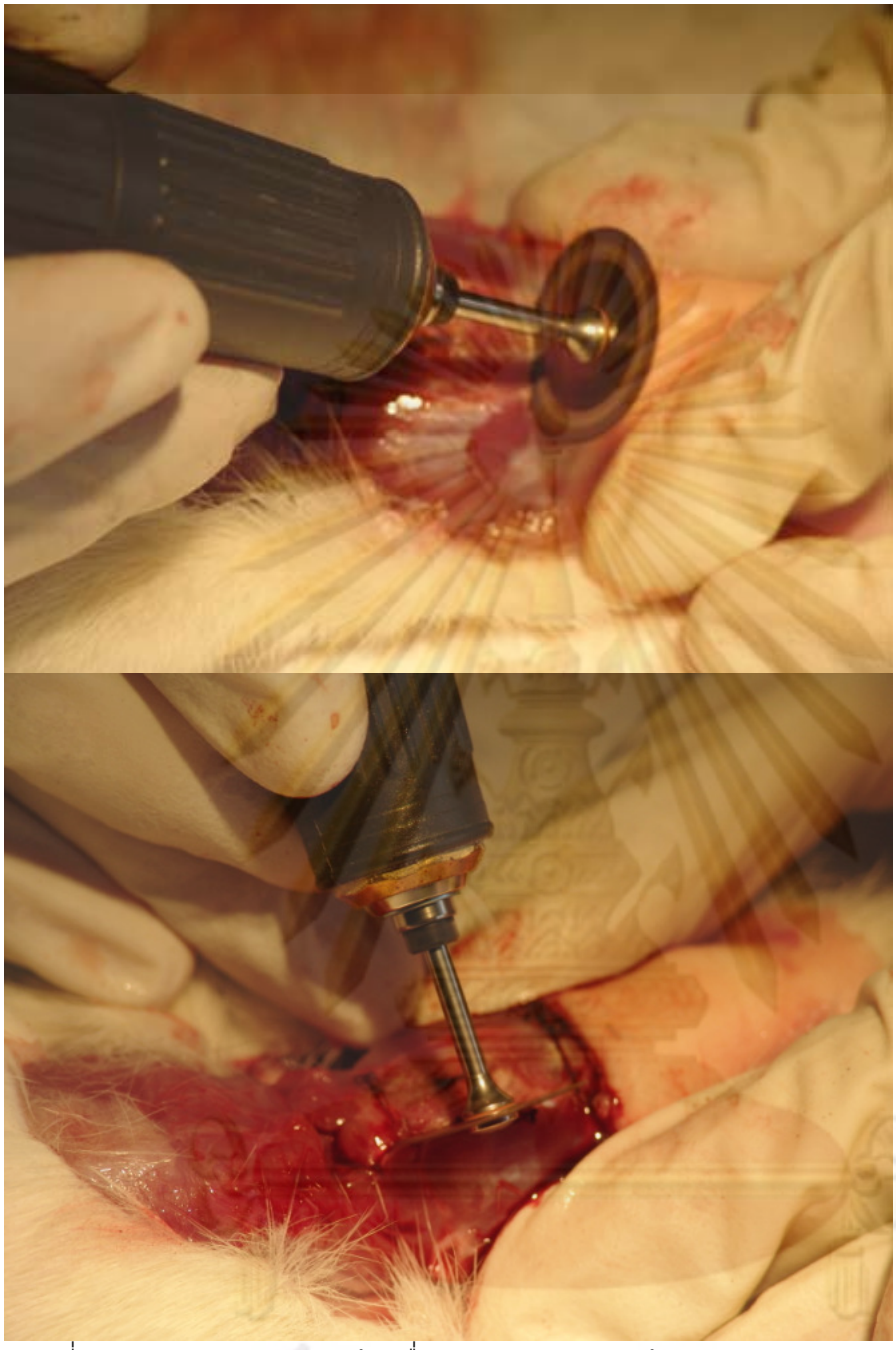
(negative control) ตายไปจากการติดเชื้อหลังผ่าตัด



ภาพที่3.16 แสดงตัวอย่างการเปิด flap

พบว่าโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ยังอยู่ในตำแหน่งของรอยแผลที่ทำการเจาะไว้สังเกตได้จากไหมไนลอนยังคงปิดอยู่กับตำแหน่งที่ถูกต้อง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

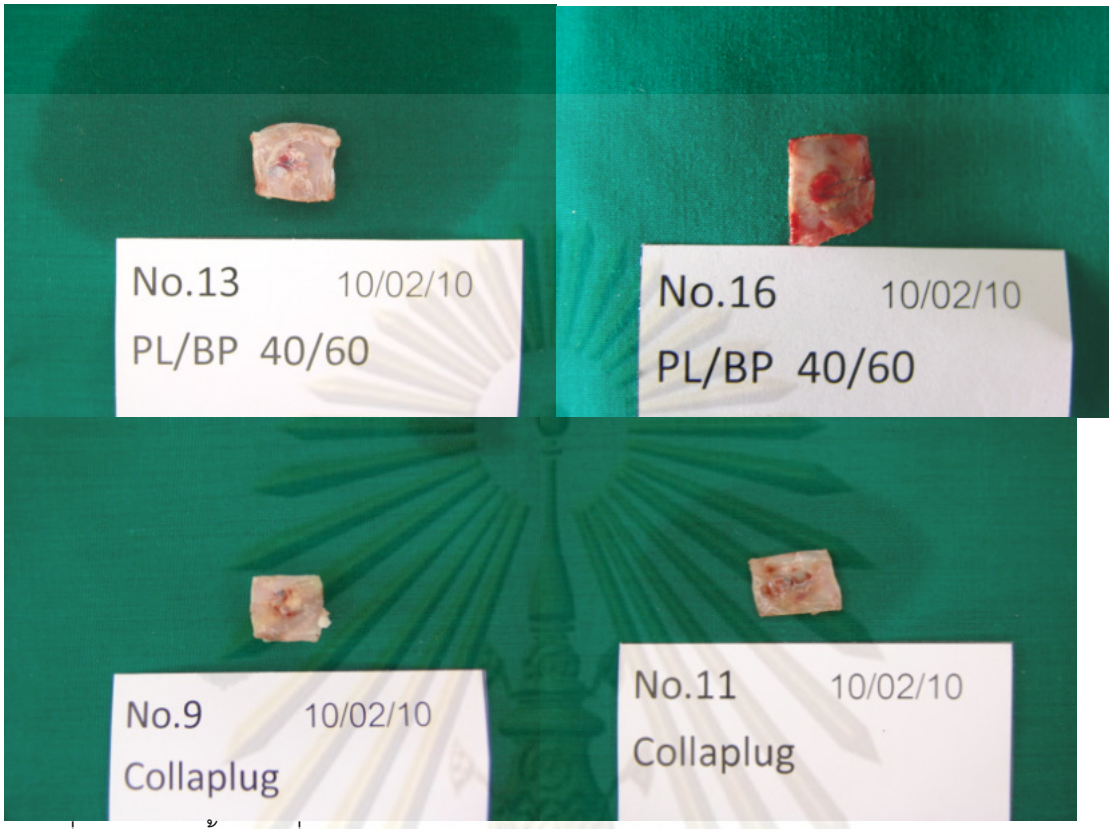


ภาพที่3.17 แสดงตัวอย่างการใช้ เครื่อง Micromotor ตัดด้วย diamond disc

ใช้เครื่อง Micromotor ตัดกะโหลกหนู ด้วย diamond disc โดยพยายามตัดให้มีระยะห่างจากรอยแผลบนกะโหลกประมาณ 1 เซนติเมตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่3.18 แสดงชิ้นงานที่ฝังอยู่ในกะโหลกหนู

แสดงชิ้นงานที่ฝังอยู่ในกะโหลกหนู ที่ถูกตัดออกมาโดย ใช้เครื่อง Micromotor ตัดกะโหลกหนู ด้วย diamond disc

3.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางจุลกายวิภาคศาสตร์

ตัวอย่างชิ้นงานทั้งหมด 23 ชิ้น ถูกนำไปแช่ใน 10% ฟอร์มาลีน 24 ชั่วโมงก่อนทำ decalcification ด้วย EDTA

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่3.19 แสดงการจัดการชิ้นงานภายหลังผ่าแยกจากกะโหลกหนู

ตัวอย่างชิ้นงานทั้งหมด 23 ชิ้น ถูกนำไปแช่ใน 10% ฟอร์มาลีน 24 ชั่วโมงก่อนทำ decalcification ด้วย EDTA จากนั้น Embeded ใน parafinและ ตัด section แล้วย้อม H&E เพื่อนำไปตรวจวิเคราะห์ผล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.8 การวิเคราะห์ข้อมูลทางภาพรังสี(Cacciafesta *et al.*, 2001; Pryor, Polimeni *et al.*, 2005; Pryor, Yang *et al.*, 2005)

ทำการถ่ายภาพรังสีชิ้นงานทั้งหมดด้วยเครื่อง Dental X-ray unit (Exposure 50kV 7 mA 0.4sec) ลงบนแผ่นรับภาพ Digital CCD และ เครื่อง Cone beam CT 3D Accutomo FPD-XYZ Slice View Tomograhy (J.Morita, Kyoto, JAPAN) ภาพรังสีที่ได้จะมีรายละเอียดสูงมาก เนื่องจากตัวรับภาพเป็นแบบ Amorphous Silicon Flat Panel ซึ่งสามารถประมวลผลและสร้างภาพได้ทันที โดยทุกบริเวณจะมีความคมชัดเท่ากันตลอดไม่มีการบิดเบี้ยวของภาพ การวิเคราะห์ข้อมูลทางภาพรังสี ผ่านโปรแกรม One Data Viewer Plus Software

3.9 ค่าสถิติ

ใช้ตาราง Chi-SquareTests อ่านค่าทางสถิติ Fisher's Exact Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

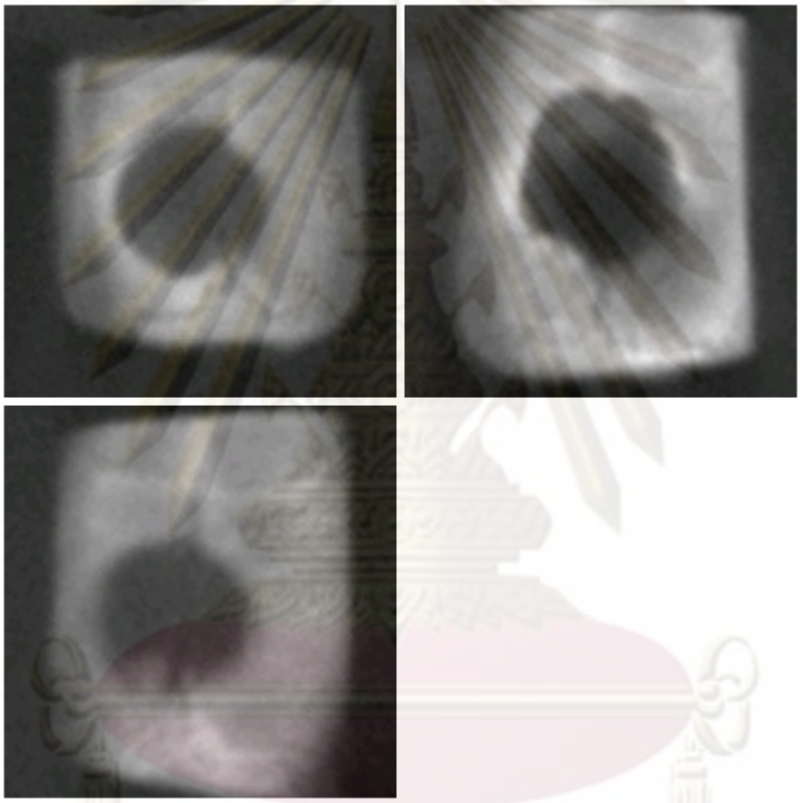
บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 ข้อมูลทางภาพรังสี

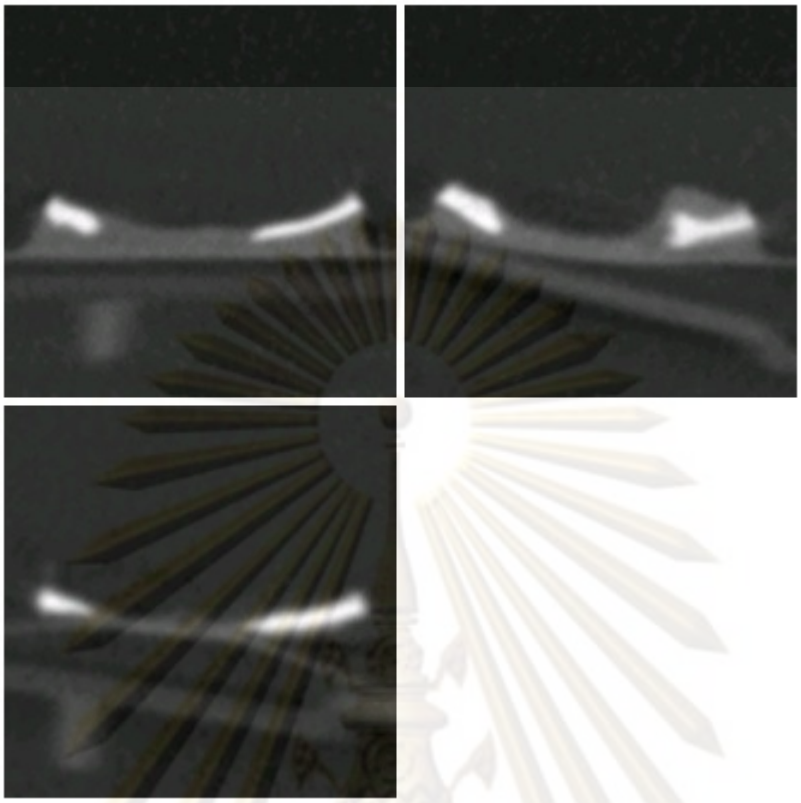
4.1.1 ข้อมูลทางภาพรังสีกลุ่ม negative control

จากข้อมูลทางภาพรังสีของกะโหลกศีรษะหนูในกลุ่ม negative control ไม่พบว่ามีการตกผลึกของแคลเซียมที่บริเวณกลางรอยวิการของกระดูก

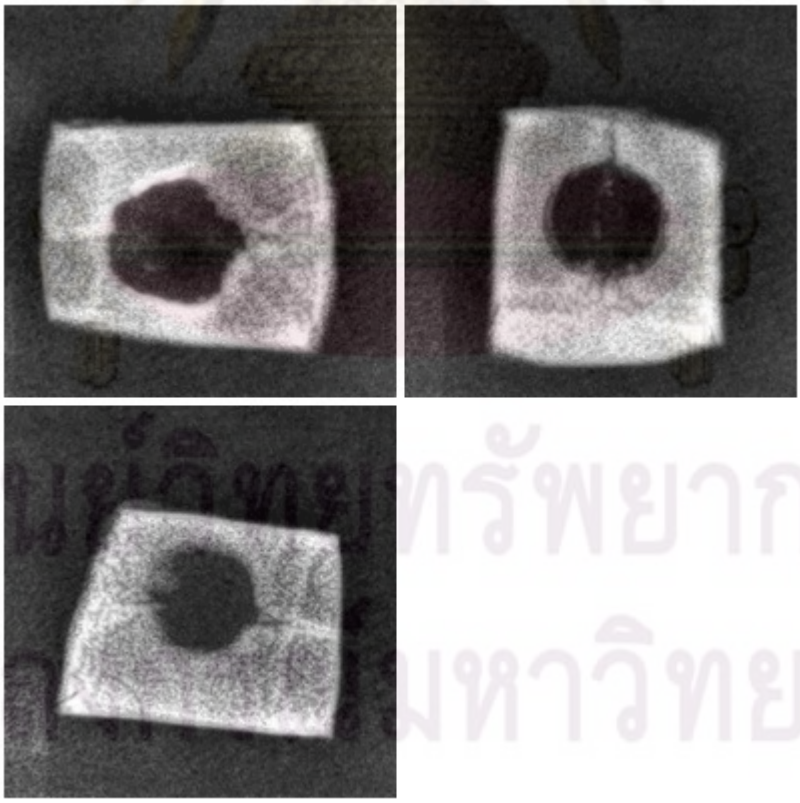


ภาพที่ 4.1 แสดงภาพตัดในแนว Axialจาก CT-Scan ของชิ้นงานกลุ่ม negative

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.2 แสดงภาพตัดในแนว coronal จาก CT-Scan ของชิ้นงานกลุ่ม negative

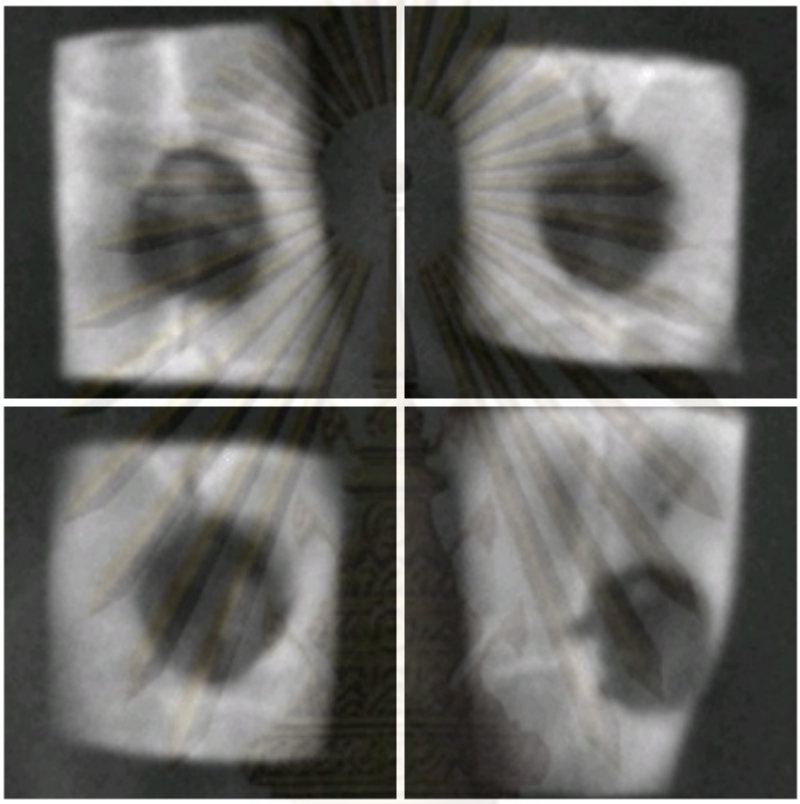


ภาพที่ 4.3 แสดง ภาพจาก X-ray Digital ของชิ้นงานกลุ่ม negative control ไม่พบว่ามีการตกผลึกของแคลเซียมที่บริเวณกลางรอยวิการของกระดูก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

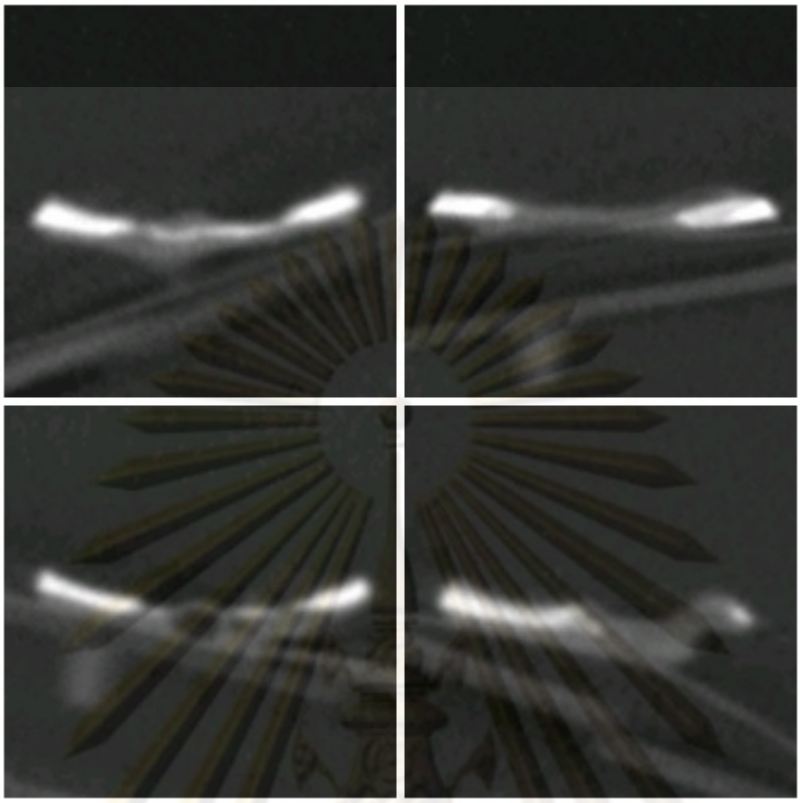
4.1.2 ข้อมูลทางภาพรังสีกลุ่ม CollaPlug®

จากข้อมูลทางภาพรังสีของกะโหลกศีรษะหนูในกลุ่ม CollaPlug® ไม่พบว่ามีการตกผลึกของแคลเซียมที่บริเวณกลางรอยวิการของกระดูก

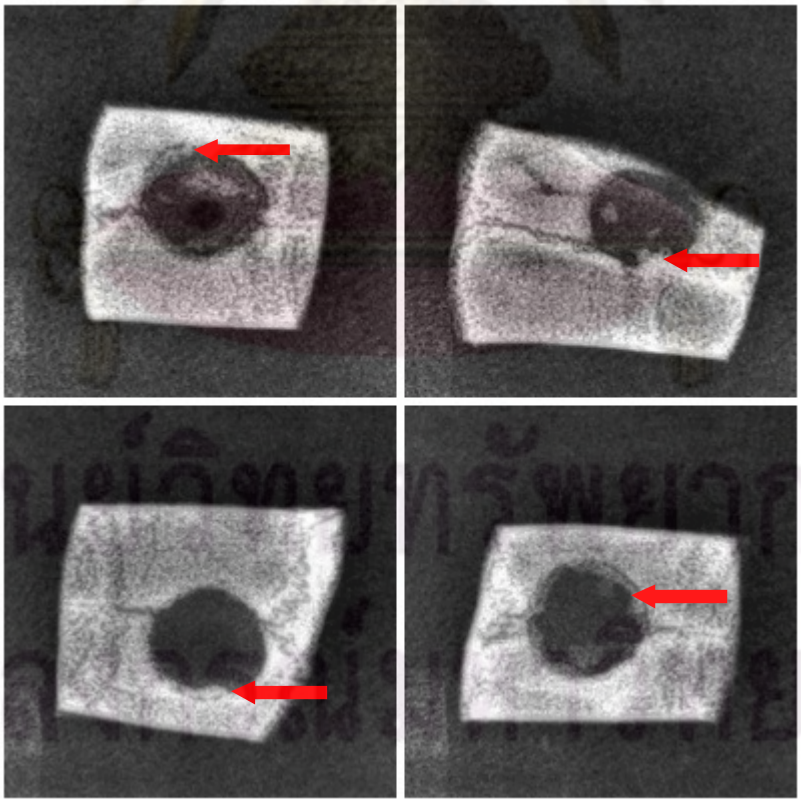


ภาพที่ 4.4 แสดงภาพตัดในแนว Axialจาก CT-Scan ของชิ้นงานกลุ่ม CollaPlug®

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



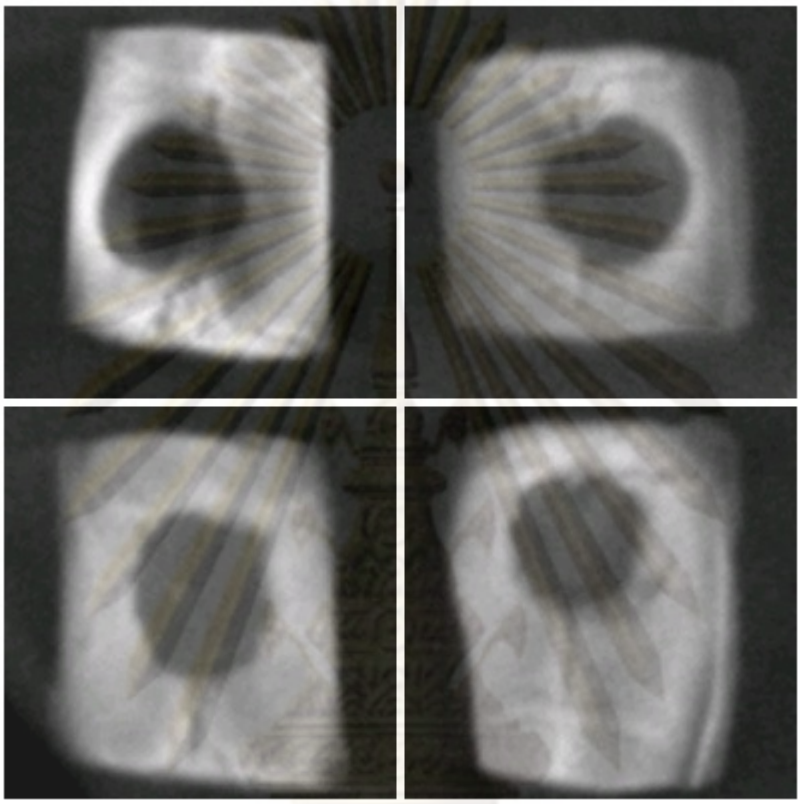
ภาพที่ 4.5 แสดงภาพตัดในแนว coronal จาก CT-Scan CollaPlug®



ภาพที่ 4.6 แสดง ภาพจาก X-ray Digital ของชิ้นงานกลุ่ม CollaPlug® ลูกศรสีแดงแสดงให้เห็นมีการตกผลึกของแร่ธาตุเข้ามาจากบริเวณขอบแผล

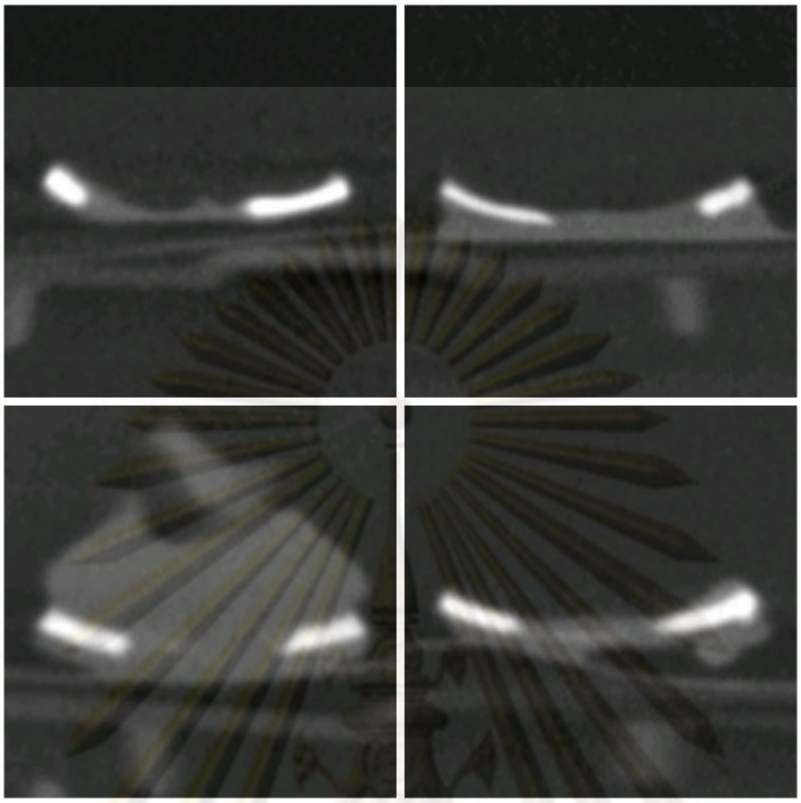
4.1.3 ข้อมูลทางภาพรังสีกลุ่ม Bovine collagen type I (SM)

จากข้อมูลทางภาพรังสีของกะโหลกศีรษะหนูในกลุ่ม Bovine collagen type I (SM)ไม่พบว่ามีการตกผลึกของแคลเซียมที่บริเวณกลางรอยวิการของกระดูก



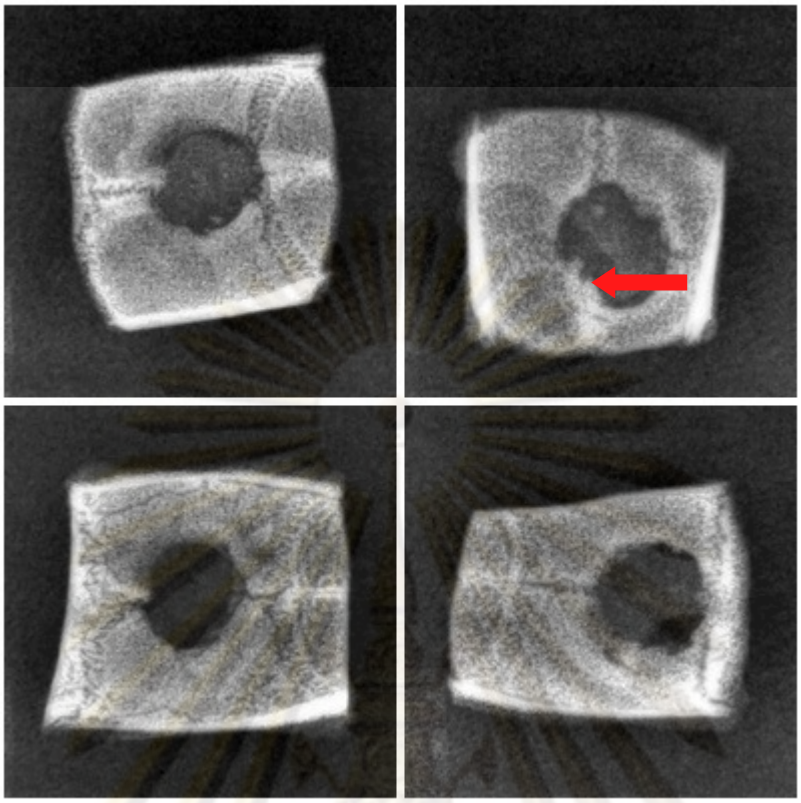
ภาพที่ 4.7 แสดงภาพตัดในแนว Axialจาก CT-Scan ของชิ้นงานกลุ่ม Bovine collagen type I (SM)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.8 แสดงภาพตัดในแนว coronal จาก CT-Scan ของชิ้นงานกลุ่ม Bovine collagen type I (SM)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

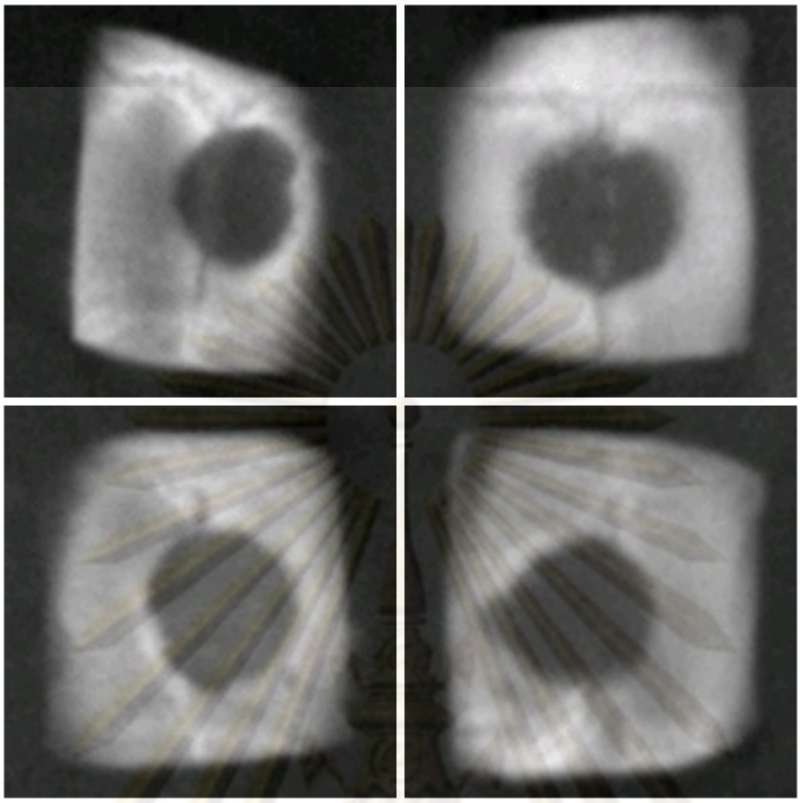


ภาพที่ 4.9 แสดง ภาพจาก X-ray Digital ของชิ้นงานกลุ่ม Bovine collagen type I (SM) ลูกศรสีแดงแสดงให้เห็นการเกิดการสะสมของแร่ธาตุจากขอบแผล

4.1.4 ข้อมูลทางภาพรังสีกลุ่ม Bovine collagen type I + bone powder (SM/BP 40/60)

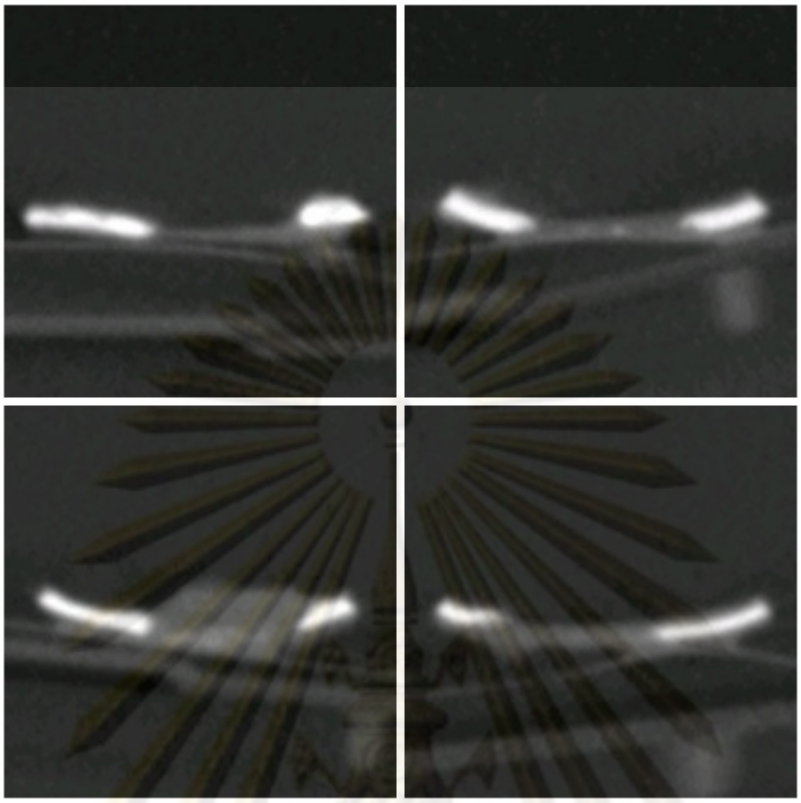
จากข้อมูลทางภาพรังสีของกะโหลกศีรษะหนูในกลุ่ม Bovine collagen type I + bone powder (SM/BP 40/60)ไม่พบว่ามีการตกผลึกของแคลเซียมที่บริเวณกลางรอยวิการของกระดูก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



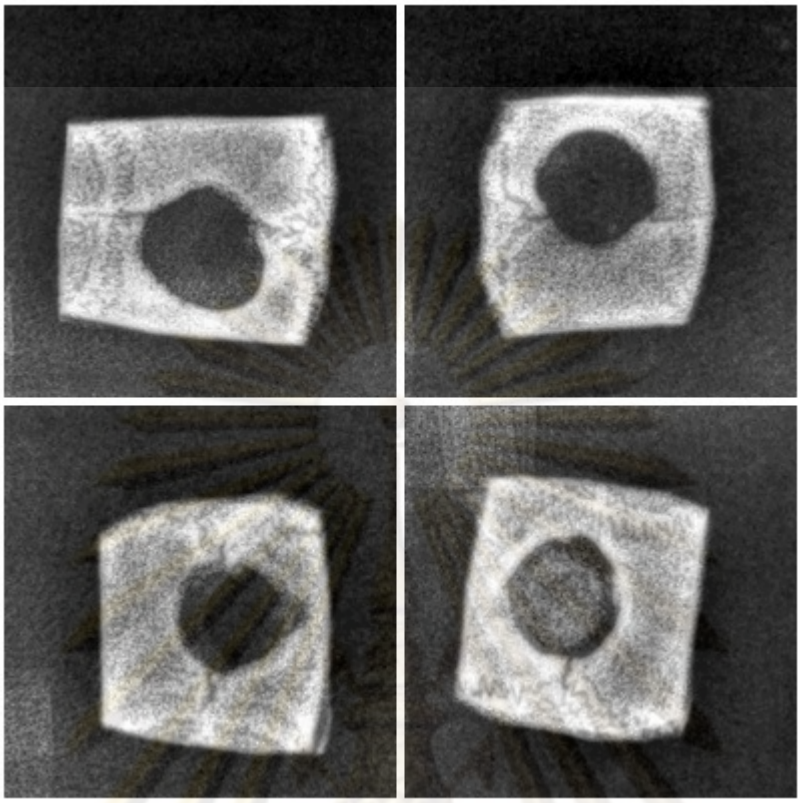
ภาพที่ 4.10 แสดงภาพตัดในแนว Axialจาก CT-Scan ของชิ้นงานกลุ่ม Bovine collagen type I + bone powder (SM/BP 40/60)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.11 แสดงภาพตัดในแนว coronal จาก CT-Scan ของชิ้นงานกลุ่ม Bovine collagen type I + bone powder (SM/BP 40/60)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

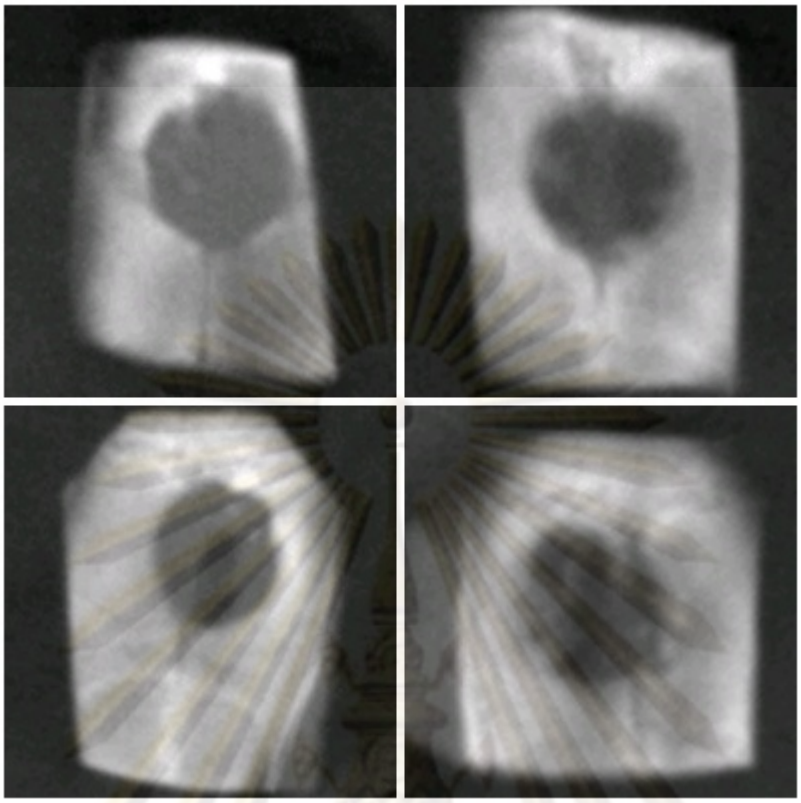


ภาพที่ 4.12 แสดง ภาพจาก X-ray Digital ของชิ้นงานกลุ่ม Bovine collagen type I + bone powder (SM/BP 40/60)

4.1.5 ข้อมูลทางภาพรังสีกลุ่มสารสกัดจากผิวหนัง

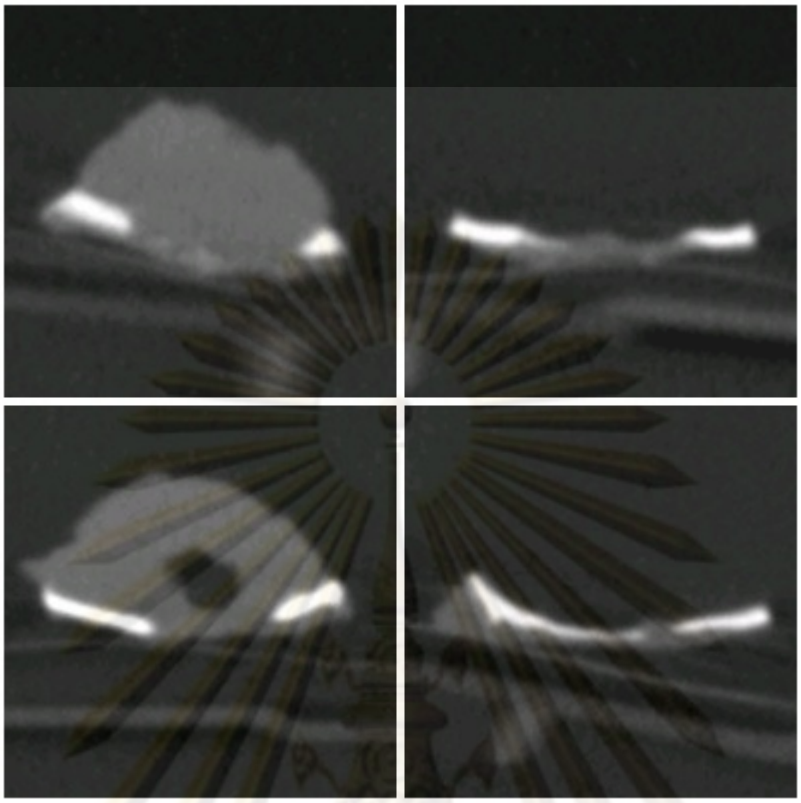
จากข้อมูลทางภาพรังสีของกะโหลกศีรษะหนูในกลุ่มสารสกัดจากผิวหนัง พบว่ามีเงาขาวเกิดขึ้นแสดงให้เห็นว่าการตกผลึกของแคลเซียมทั้งที่บริเวณขอบแผลและกลางรอยวิการของกระดูก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

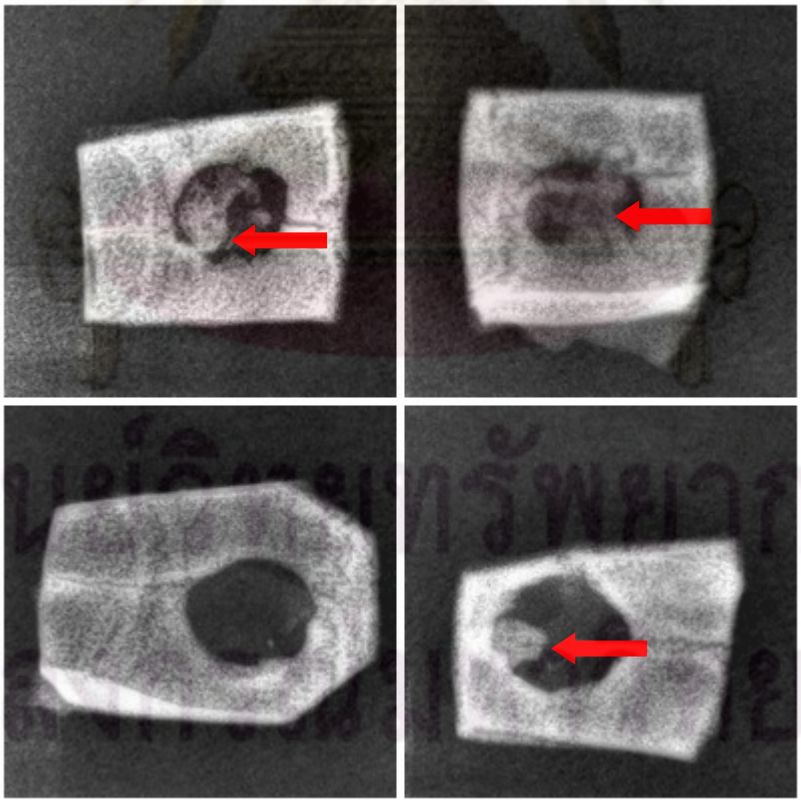


ภาพที่ 4.13 แสดงภาพตัดในแนว Axial จาก CT-Scan ของชิ้นงานกลุ่มสารสกัดจากผิวหนัง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



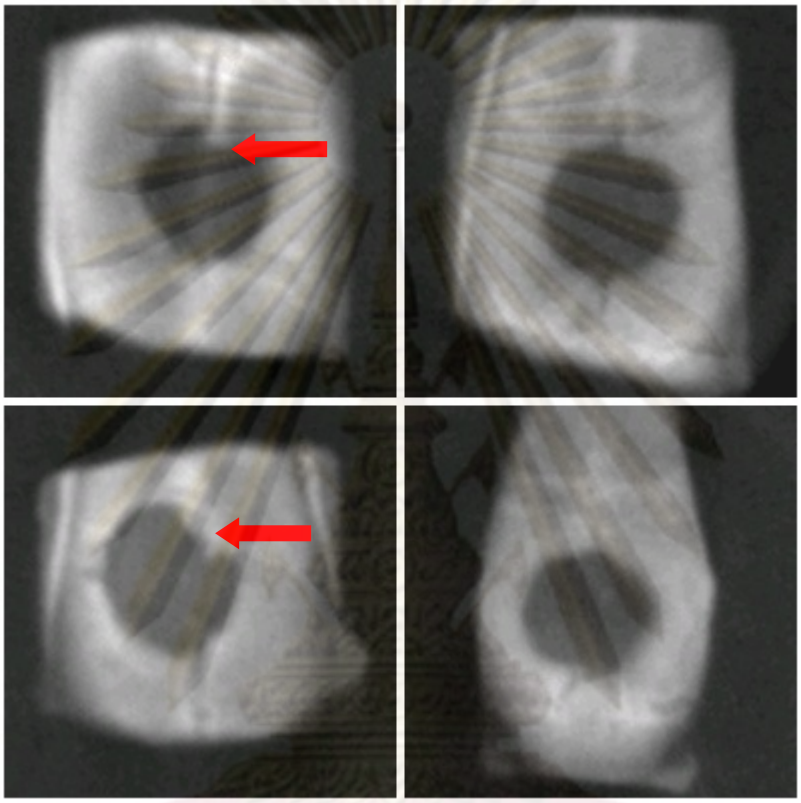
ภาพที่ 4.14 แสดงภาพตัดในแนว coronal จาก CT-Scan ของชิ้นงานกลุ่มสารสกัดจากผิวหนัง



ภาพที่ 4.15 แสดง ภาพจาก X-ray Digital ของชิ้นงานกลุ่ม สารสกัดผิวหนัง ลูกศรสีแดงแสดงให้เห็นการตกผลึกของแร่ธาตุที่บริเวณกลางรอยแผล

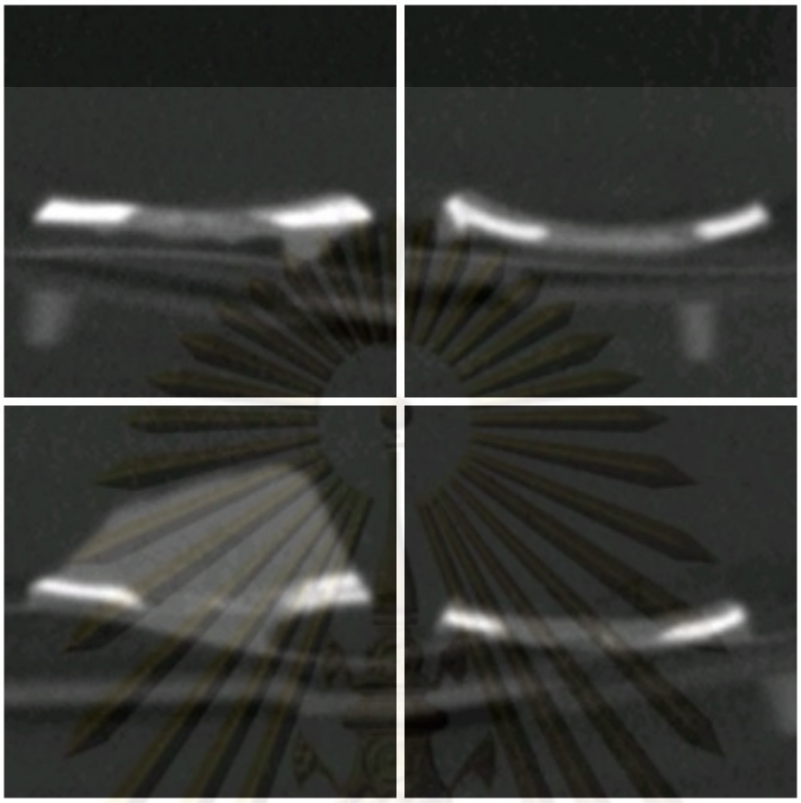
4.1.6 ข้อมูลทางภาพรังสีกลุ่ม สารสกัดผิวหนังผสมผงกระดูก

จากข้อมูลทางภาพรังสีของกะโหลกศีรษะหนูในกลุ่มสารสกัดผิวหนังผสมผงกระดูก พบว่ามีเงาขาวเกิดขึ้นแสดงให้เห็นว่าการตกผลึกของแคลเซียมที่บริเวณขอบแผลสองชิ้นงานและกลางรอยวิการของกระดูกหนึ่งชิ้นงาน



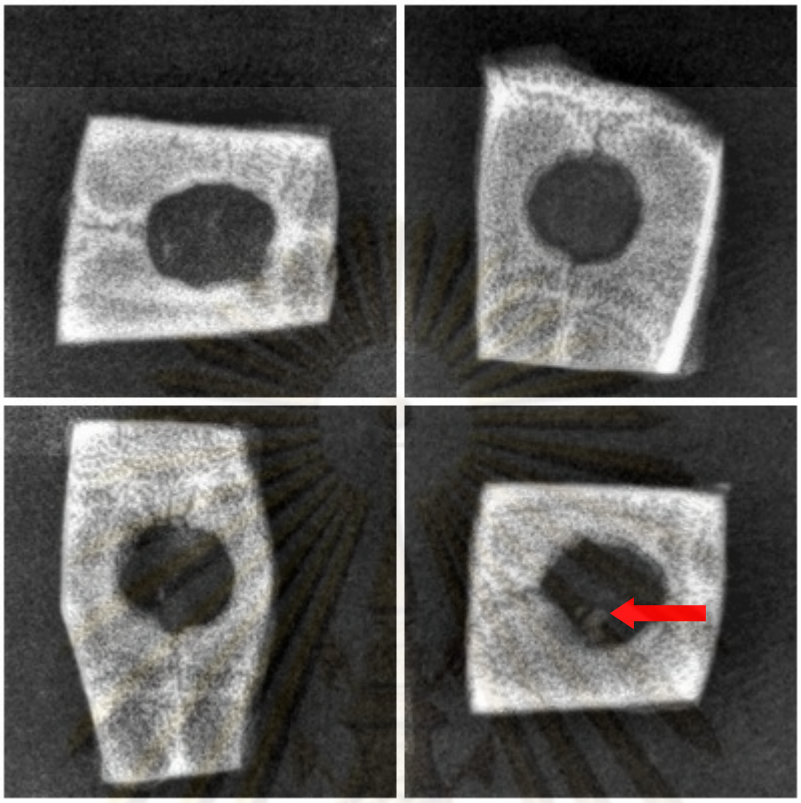
ภาพที่ 4.16 แสดงภาพตัดในแนว Axial จาก CT-Scan ของชิ้นงานกลุ่มสารสกัดจากผิวหนังผสมผงกระดูก ลูกศรสีแดงแสดงให้เห็นการตกผลึกของแร่ธาตุที่บริเวณขอบรอยแผล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.17 แสดงภาพตัดในแนว Axial จาก CT-Scan ของชิ้นงานกลุ่มสารสกัดจากผิวหนังผสมผงกระดูก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.18 แสดง ภาพจาก X-ray Digital ของชิ้นงานกลุ่ม สารสกัดผิวหนังผสมผงกระดูกลูกศรสีแดงแสดงให้เห็นการตกผลึกของแร่ธาตุที่บริเวณกลางรอยแผล

4.2 <u>ผลการวิเคราะห์ข้อมูลเชิงเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มตัวอย่างทางภาพรังสี</u>

จากภาพรังสีแสดงให้เห็น ว่ามีการตกผลึกของแคลเซียมทั้งที่กลางรอยแผลและที่ขอบของแผลที่ได้ทำการใส่ชิ้นงานที่ขึ้นรูปจากสารสกัดผิวหนังไว้ดังตารางที่ 4.1 และ ตารางที่4.2 ในขณะที่สารสกัดจากผิวหนังที่ผสมผงกระดูกกลับพบการสะสมของแคลเซียมทีบริเวณกะโหลกศีรษะหนูที่บริเวณขอบแผลเพียงสองชิ้นงานและการสะสมของแคลเซียมทีบริเวณกะโหลกศีรษะหนูที่บริเวณกลางแผลเพียงหนึ่งชิ้นงาน แต่เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของการเกิดการสะสมของแคลเซียมที่บริเวณกะโหลกศีรษะหนูที่ทั้งที่บริเวณขอบแผล และกลางแผลของกลุ่มสารสกัดจากผิวหนังและกลุ่มสารสกัดจากผิวหนังที่ผสมผงกระดูกพบว่าต่างก็ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%ที่บริเวณขอบแผล(p=0.429) และ ที่บริเวณกลางแผล(p=0.143)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

	จำนวนหนู/ตัว		
ชนิดของชิ้นงานที่ฝังลงกะโหลกหนู	ไม่เกิดการสะสมของแคลเซียม	เกิดการสะสมของแคลเซียม	total
สารสกัดจากผิวหนัง	0	4	4
สารสกัดจากผิวหนัง + bone powder	2	2	4
Bovine collagen type I	3	1	4
Bovine collagen type I + bone powder	4	0	4
CollaPlug®	0	4	4
blank	3	0	3
Total	12	11	23

ตารางที่4.1 แสดงการเกิดการสะสมของแคลเซียมที่บริเวณกะโหลกศีรษะหนูที่บริเวณขอบแผล

	จำนวนหนู/ตัว		
ชนิดของชิ้นงานที่ฝังลงกะโหลกหนู	ไม่เกิด calcification	เกิด calcification	total
สารสกัดจากผิวหนัง	0	4	4
สารสกัดจากผิวหนัง + bone powder	3	1	4
Bovine collagen type I	4	0	4
Bovine collagen type I + bone powder	4	0	4
CollaPlug®	4	0	4
blank	3	0	3
Total	18	5	23

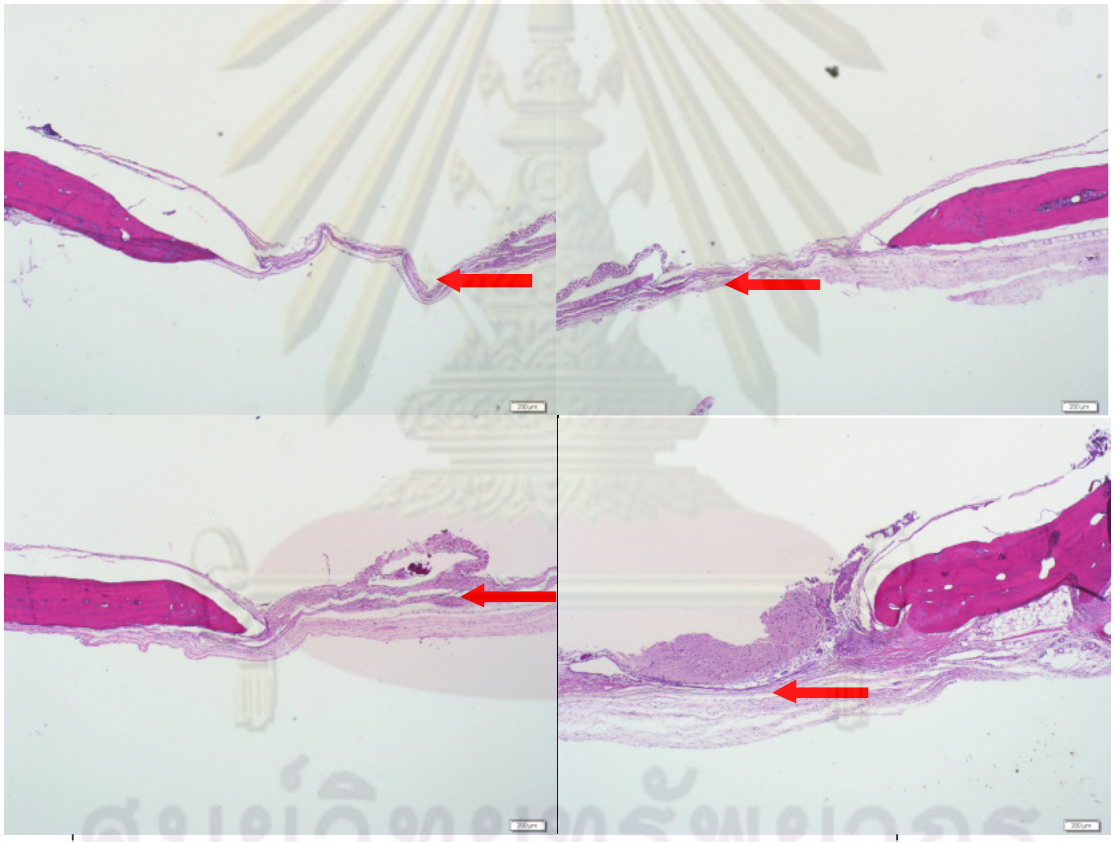
ตารางที่4.2 แสดงการเกิดการสะสมของแคลเซียมที่บริเวณกะโหลกศีรษะหนูที่บริเวณกลางแผล

การสะสมของแคลเซียมที่บริเวณกะโหลกศีรษะหนูที่บริเวณขอบแผลของกลุ่มสารสกัดจากผิวหนังเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม CollaPlug® ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ในขณะที่เปรียบเทียบความแตกต่างของการเกิดการสะสมของแคลเซียมที่บริเวณกะโหลกศีรษะหนูที่ทั้งที่บริเวณขอบแผล และกลางแผลของกลุ่มสารสกัดจากผิวหนังเมื่อเปรียบเทียบ กับกลุ่ม Bovine collagen type I , Bovine collagen type I ผสม bone powder, และ Blank พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น $p<0.05$ ทั้งสิ้นยกเว้นในกลุ่ม Bovine collagen type I ที่เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของการเกิดการสะสมของแคลเซียมที่บริเวณกะโหลกศีรษะหนูที่บริเวณขอบแผล พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p=0.143$)

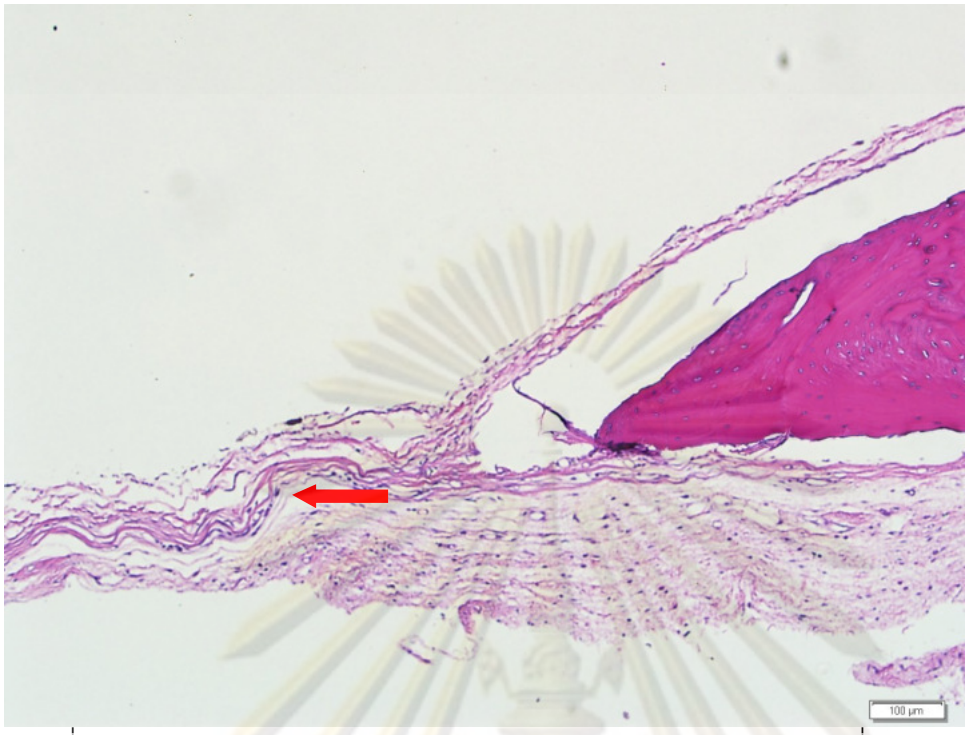
4.3 ข้อมูลทางจุลกายวิภาคศาสตร์

4.3.1 ข้อมูลทางจุลกายวิภาคศาสตร์กลุ่ม negative control



ภาพที่ 4.19 ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกลุ่ม negative control ที่กำลังขยาย 4X (ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกะโหลกศีรษะหนูที่ไม่ได้ทำการฝังโครงเลี้ยงเซลล์เมื่อนำมาย้อมด้วย hematoxylin and eosin stain ลูกศรสีแดงแสดงให้เห็นถึง Cranial Defect

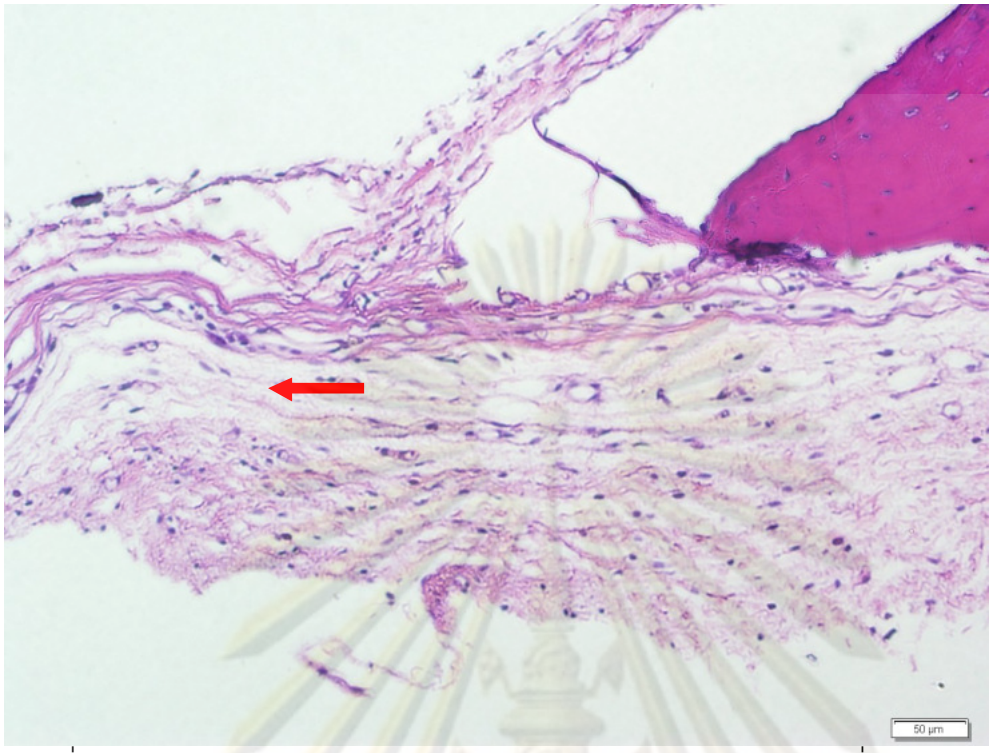
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.20 ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกลุ่ม negative control ที่กำลังขยาย 10X

ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกะโหลกศีรษะหนูที่ไม่ได้ทำการฝังโครงเลี้ยงเซลล์ เมื่อนำมาย้อมด้วย hematoxylin and eosin stain ลูกศรสีแดงแสดงให้เห็นถึงบริเวณCranial Defect ที่ไม่มีการสร้างกระดูก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

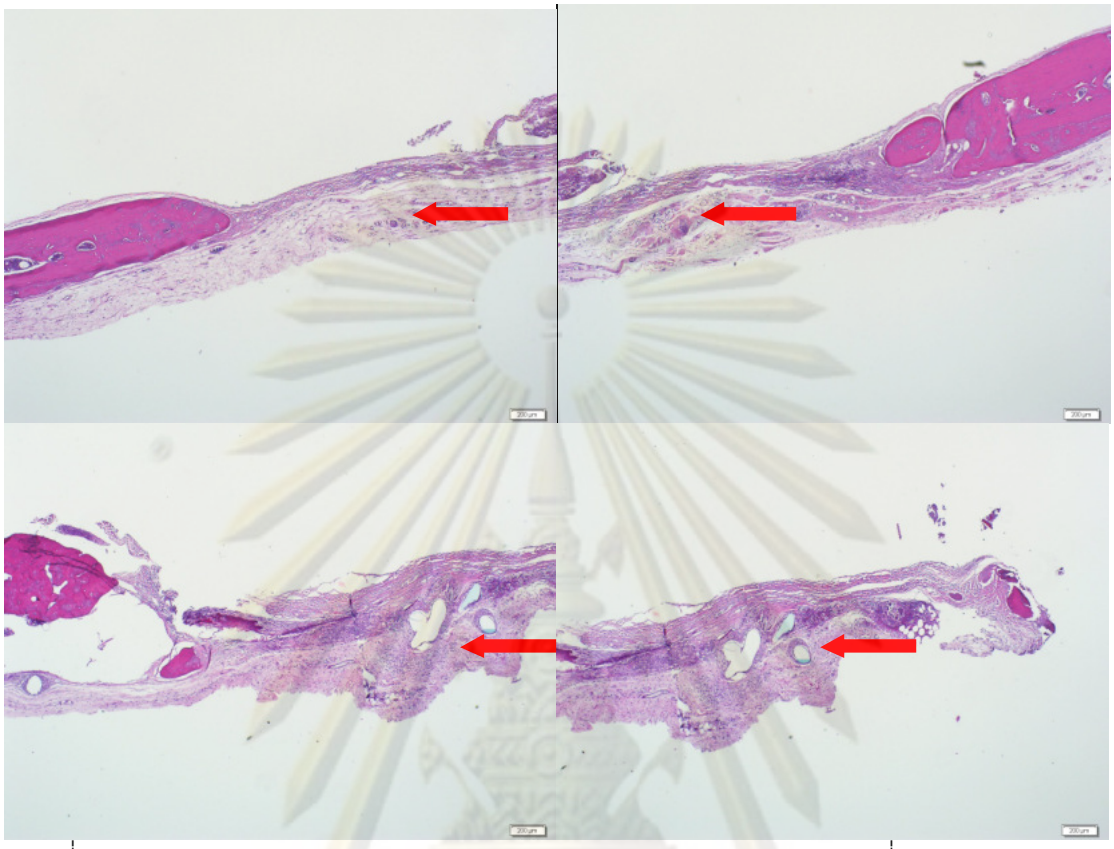


ภาพที่ 4.21 ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกลุ่ม negative control ที่กำลังขยาย 20X

ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกะโหลกศีรษะหนูที่ไม่ได้ทำการฝังโครงเลี้ยงเซลล์ เมื่อนำมาย้อมด้วย hematoxylin and eosin stain ลูกศรสีแดงแสดงให้เห็นถึงบริเวณCranial Defect ที่ไม่มีการสร้างกระดูก

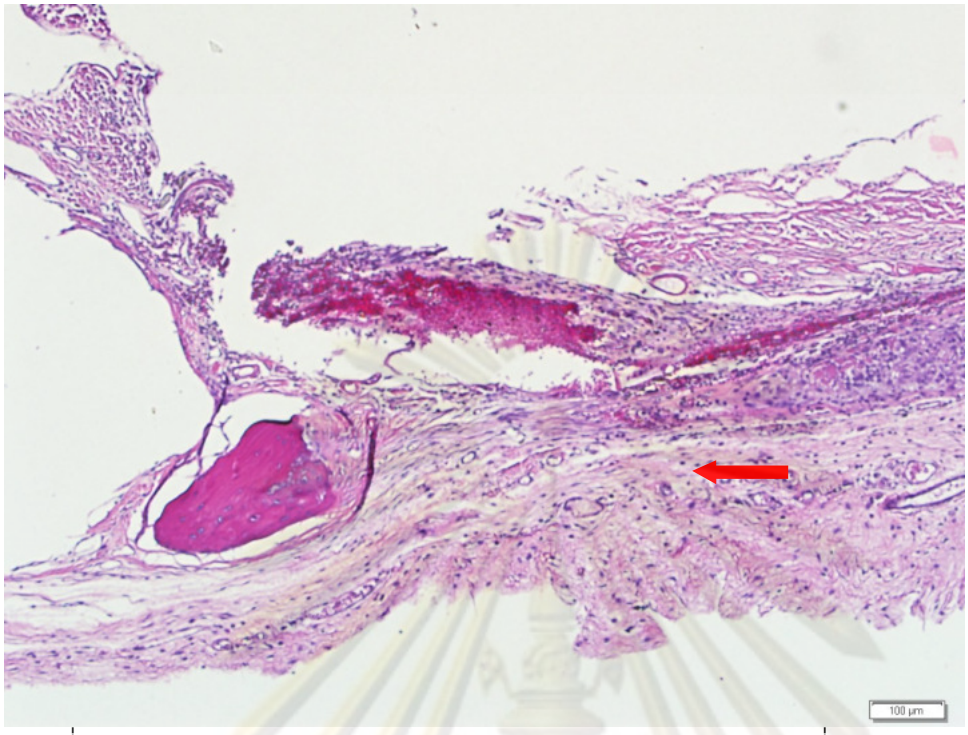
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3.2 ข้อมูลทางจุลกายวิภาคศาสตร์กลุ่ม CollaPlug®



ภาพที่ 4.22 ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกลุ่ม CollaPlug® ที่กำลังขยาย 4X (ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกะโหลกศีรษะหนูที่ทำการฝังด้วย CollaPlug® นำมาย้อมด้วย hematoxylin and eosin stain ลูกศรสีแดงแสดงให้เห็นถึงว่าไม่มีการเกิดเนื้อเยื่อกระดูกใหม่

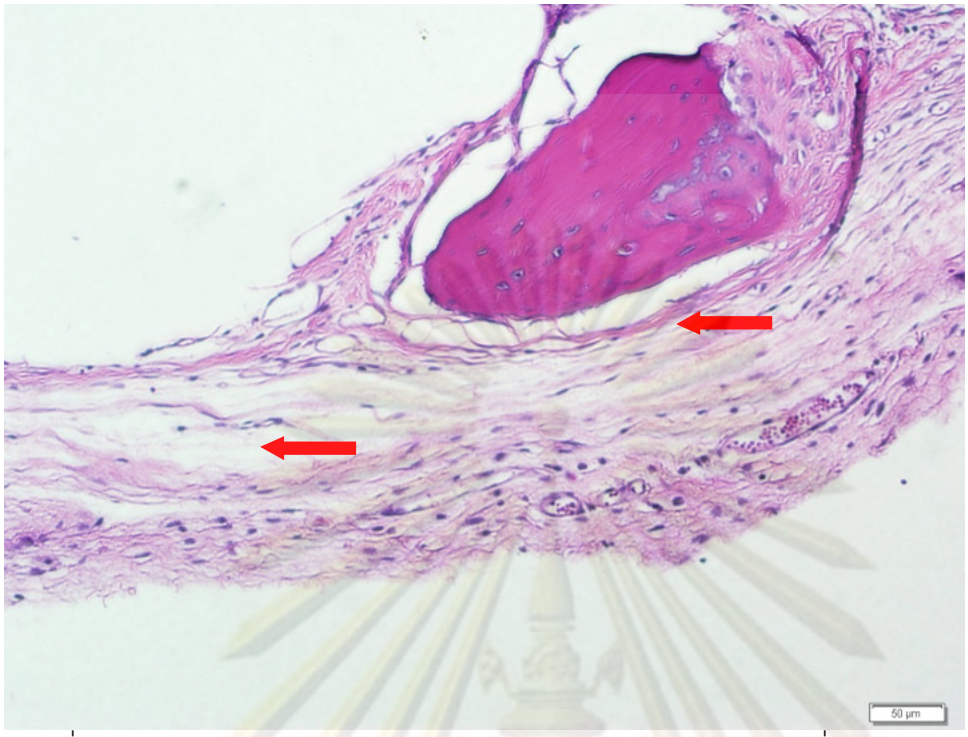
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.23 ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกลุ่ม CollaPlug® ที่กำลังขยาย 10X

ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกะโหลกศีรษะหนูที่ทำการฝังด้วย CollaPlug® นำมาย้อมด้วย hematoxylin and eosin stain ลูกศรสีแดงแสดงให้เห็นถึงว่าไม่มีการเกิดเนื้อเยื่อกระดูกใหม่

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

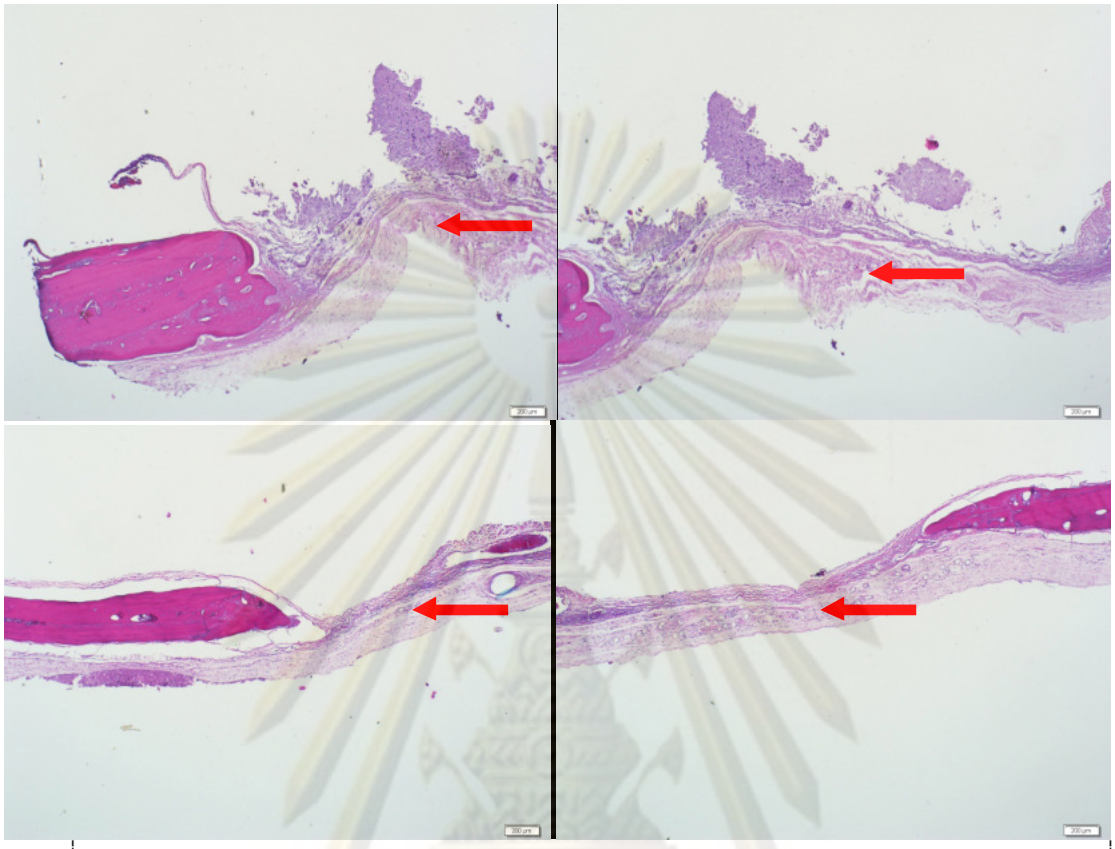


ภาพที่ 4.24 ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกลุ่ม CollaPlug® ที่กำลังขยาย 20X

ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกะโหลกศีรษะหนูที่ทำการฝังด้วย CollaPlug® นำมาย้อมด้วย hematoxylin and eosin stain ลูกศรสีแดงแสดงให้เห็นถึงว่าไม่มีการเกิดเนื้อเยื่อกระดูกใหม่

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3.3 ข้อมูลทางจุลกายวิภาคศาสตร์กลุ่ม Bovine collagen type I (SM)



ภาพที่ 4.25 ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกลุ่ม bovine collagen (sigma) ที่กำลังขยาย 4X

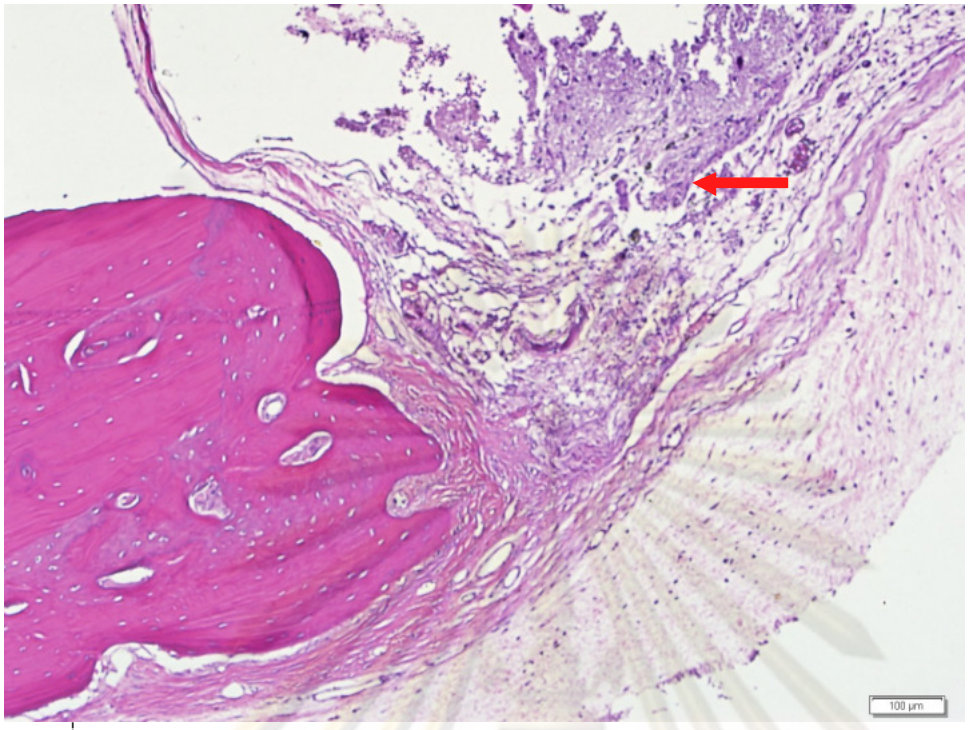
ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกะโหลกศีรษะหนูที่ทำการฝังด้วย bovine collagen (sigma) นำมาย้อมด้วย hematoxylin and eosin stain ลูกศรสีแดงแสดงให้เห็นถึงว่าไม่มีการเกิดเนื้อเยื่อกระดูกใหม่

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 4.26 ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกลุ่ม bovine collagen (sigma) ที่กำลังขยาย 10X

ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกะโหลกศีรษะหนูที่ทำการฝังด้วย bovine collagen (sigma) นำมาย้อมด้วย hematoxylin and eosin stain ลูกศรสีแดงแสดงให้เห็นถึงว่าไม่มีการเกิดเนื้อเยื่อกระดูกใหม่ (woven bone)และ พบ foreign body reaction สังเกตได้จากเม็ดเลือดขาวที่เข้ามาสะสมมาก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

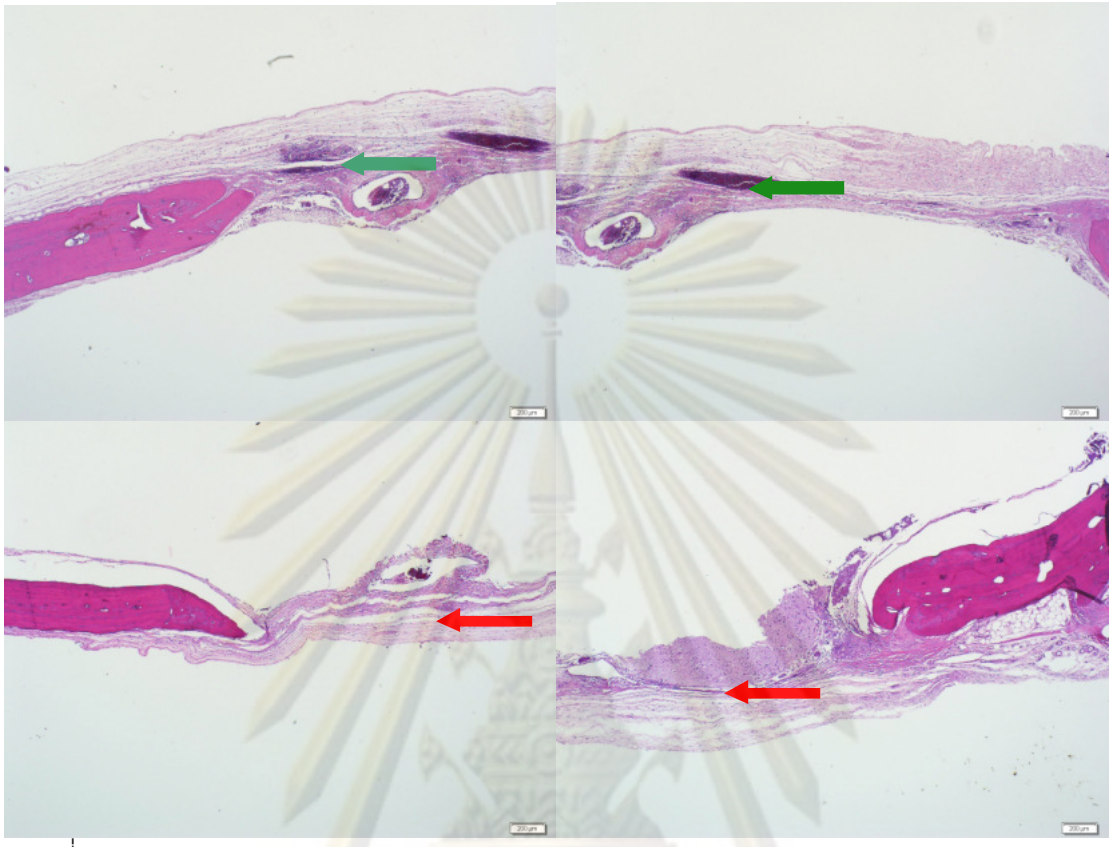


ภาพที่ 4.27 ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกลุ่ม bovine collagen (sigma) ที่กำลังขยาย 20X

ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกะโหลกศีรษะหนูที่ทำการฝังด้วย bovine collagen (sigma) นำมาย้อมด้วย hematoxylin and eosin stain ลูกศรสีแดงแสดง foreign body reaction สังเกตได้จากเม็ดเลือดขาวที่เข้ามาสะสมมาก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

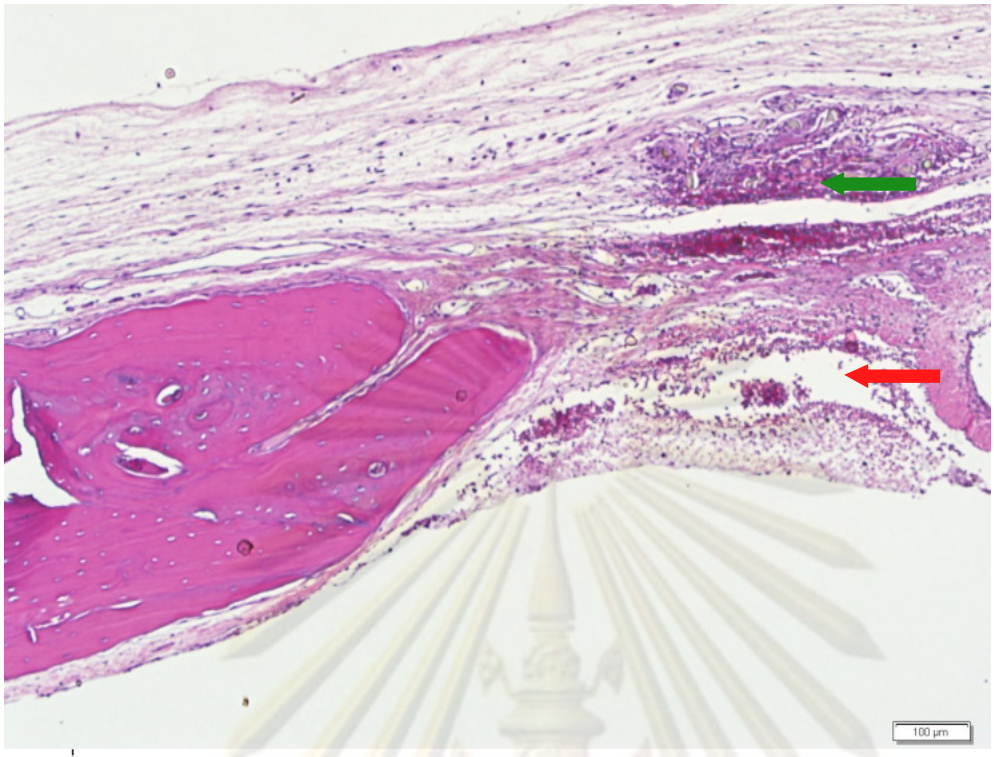
4.3.4 ข้อมูลทางจุลกายวิภาคศาสตร์กลุ่ม Bovine collagen type I + bone powder



ภาพที่ 4.28 ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกลุ่ม bovine collagen (sigma)ผสมผงกระดูก ที่กำลังขยาย 4X

ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกะโหลกศีรษะหนูที่ทำการฝังด้วย bovine collagen (sigma) ผสมผงกระดูก เมื่อนำมาย้อมด้วย hematoxylin and eosin stain)] ลูกศรสีแดงแสดงให้เห็นถึงว่าไม่มีการเกิดเนื้อเยื่อกระดูกใหม่ และ ลูกศรสีเขียวพบ foreign body reaction สังเกตได้จากเม็ดเลือดขาวที่เข้ามาสะสมมาก

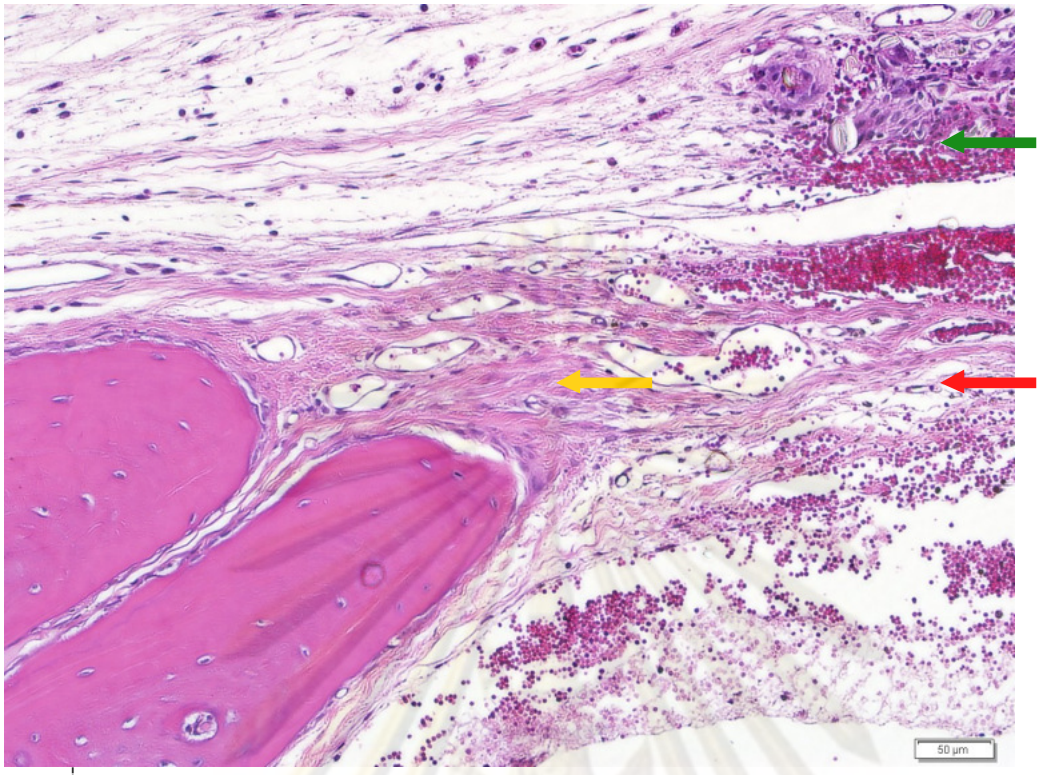
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.29 ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกลุ่ม bovine collagen (sigma) ผสมผงกระดูก ที่กำลังขยาย 10X

ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกะโหลกศีรษะหนูที่ทำการฝังด้วย bovine collagen (sigma) ผสมผงกระดูก เมื่อนำมาย้อมด้วย hematoxylin and eosin stain)] ลูกศรสีแดงแสดงให้เห็นถึงว่าไม่มีการเกิดเนื้อเยื่อกระดูกใหม่ และ ลูกศรสีเขียวพบ foreign body reaction สังเกตได้จากเม็ดเลือดขาวที่เข้ามาสะสมมาก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

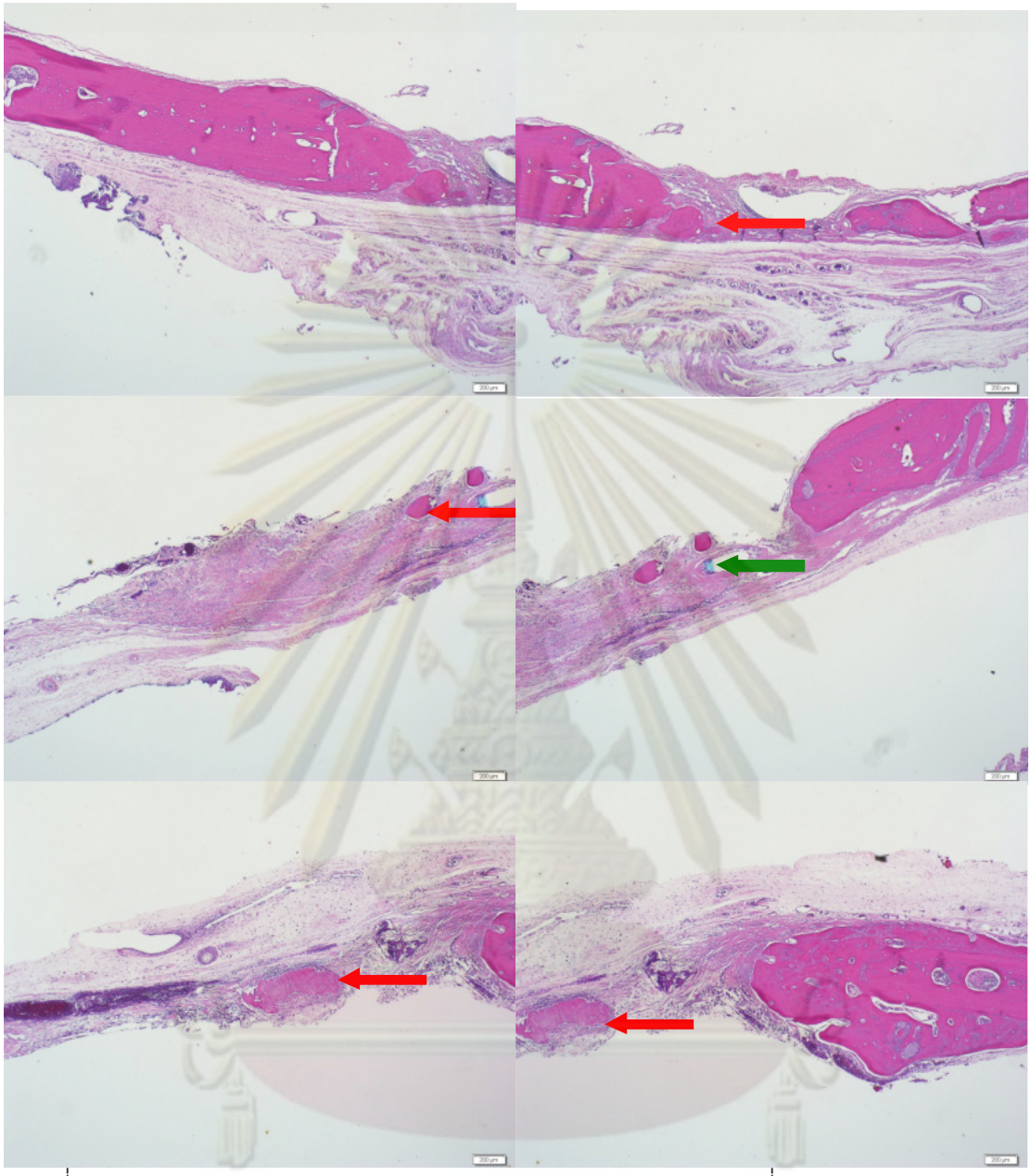


ภาพที่ 4.30 ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกลุ่ม bovine collagen (sigma)ผสมผงกระดูก ที่กำลังขยาย 20X

ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกะโหลกศีรษะหนูที่ทำการฝังด้วย bovine collagen (sigma) ผสมผงกระดูก เมื่อนำมาย้อมด้วย hematoxylin and eosin stain)] ลูกศรสีแดงแสดงให้เห็นถึงว่าไม่มีการเกิดเนื้อเยื่อกระดูกใหม่ ลูกศรสีเหลืองแสดงการเกิดfibrous tissue และลูกศรสีเขียว foreign body reaction สังเกตได้จากเม็ดเลือดขาวที่เข้ามาสะสมมาก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

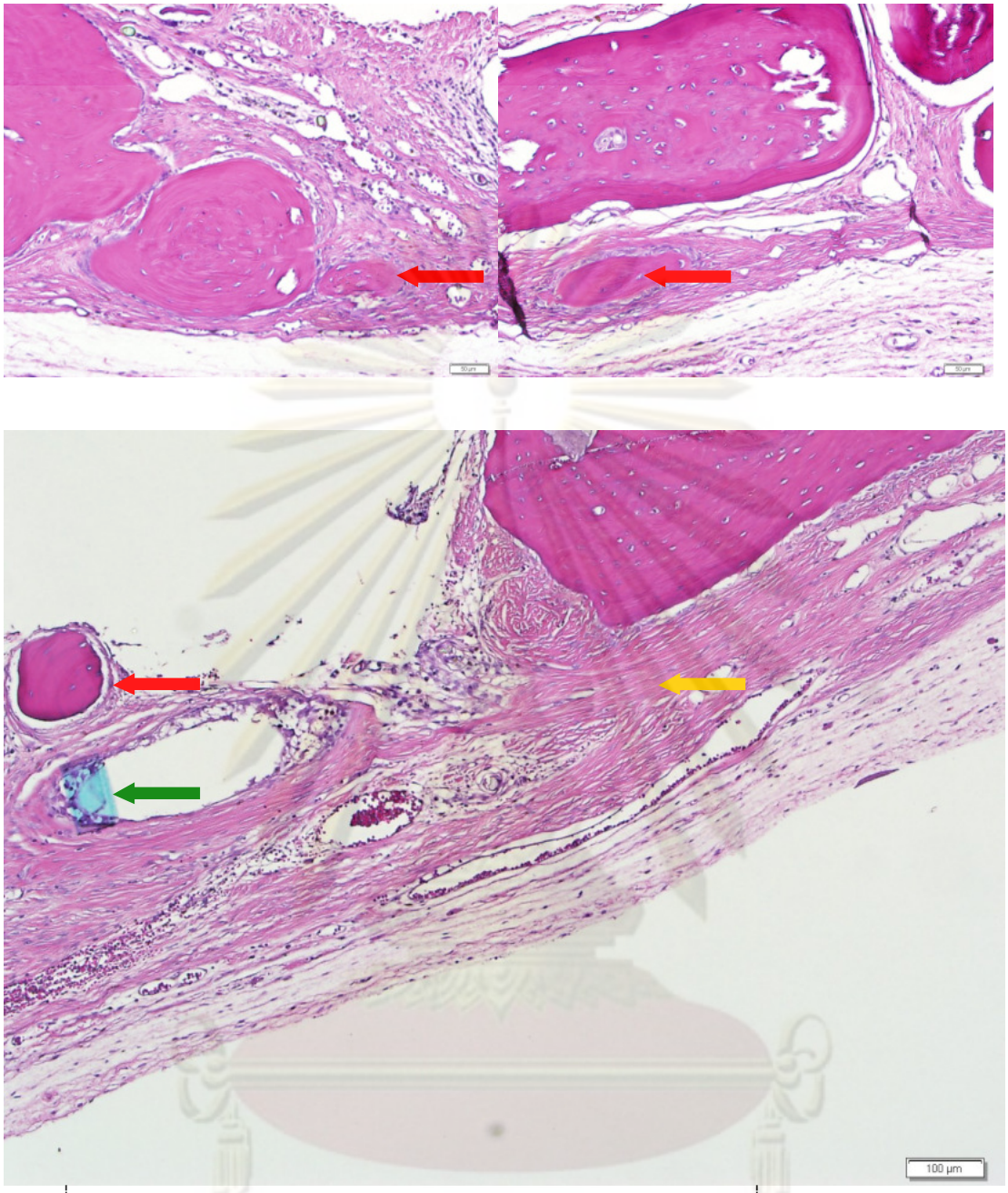
4.3.5 ข้อมูลทางจุลกายวิภาคศาสตร์กลุ่ม สารสกัดผิวหนัง



ภาพที่ 4.31 ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกลุ่มสารสกัดผิวหนัง ที่กำลังขยาย 4X

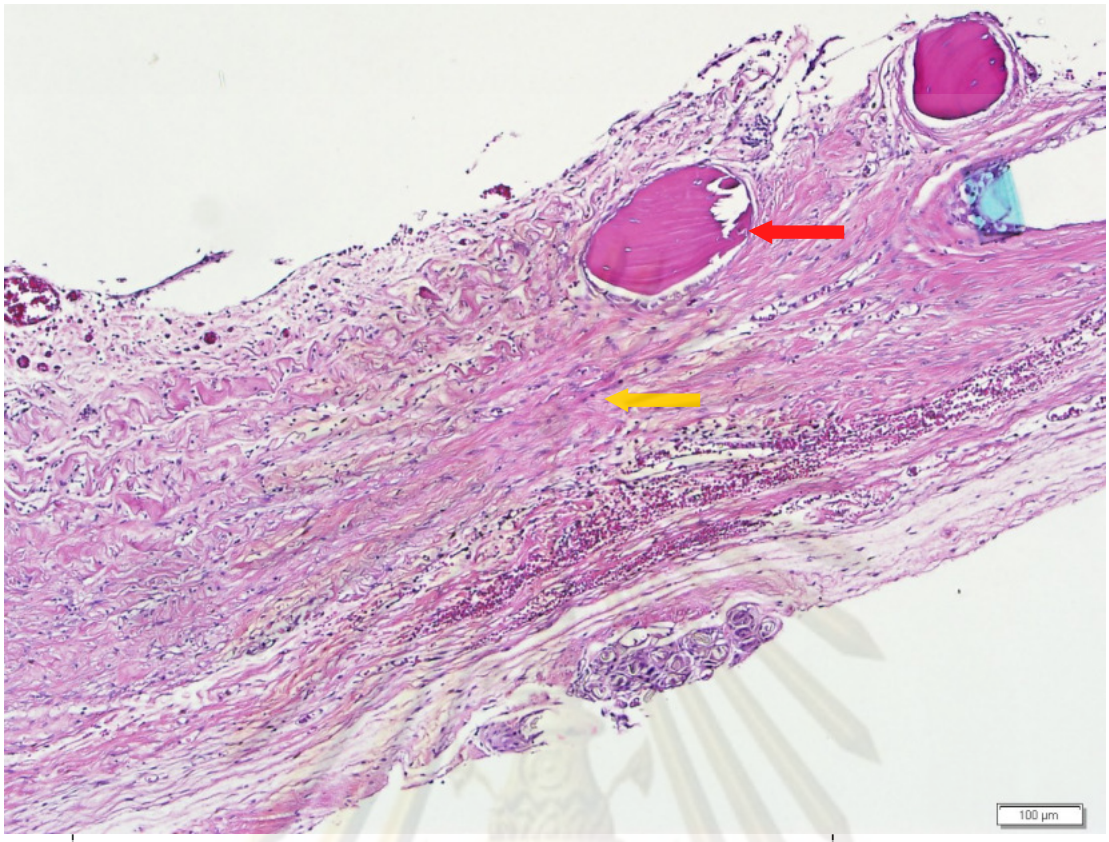
ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกะโหลกศีรษะหนูที่ทำการฝังด้วยโครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำมากจากกลุ่มสารสกัดผิวหนังนำมาย้อมด้วย hematoxylin and eosin stain ลูกศรสีแดงแสดงให้เห็นถึงการเกิดเนื้อเยื่อกระดูกใหม่ และ ลูกศรสีเขียวไหมเย็บไนลอน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.32 ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกลุ่มสารสกัดผิวหนัง ที่กำลังขยาย 10X

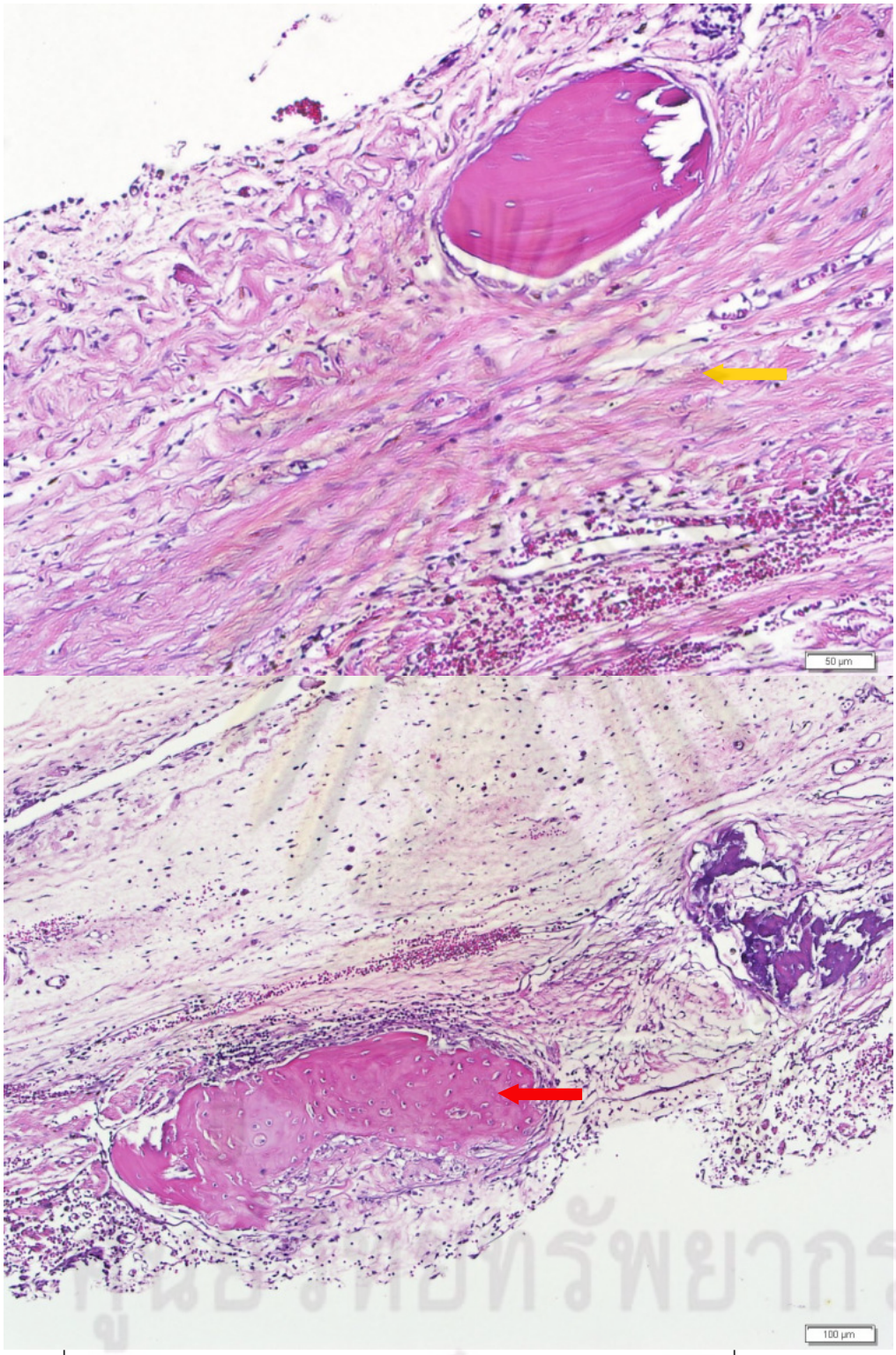
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.32 ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกลุ่มสารสกัดผิวหนัง ที่กำลังขยาย 10X

ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกะโหลกศีรษะหนูที่ทำการฝังด้วยโครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำมากจากกลุ่มสารสกัดผิวหนังนำมาย้อมด้วย hematoxylin and eosin stain ลูกศรสีแดงแสดงให้เห็นถึงการเกิดเนื้อเยื่อกระดูกใหม่ (woven bone) และ ลูกศรสีเหลืองแสดงบริเวณที่เกิด fibrous tissue)

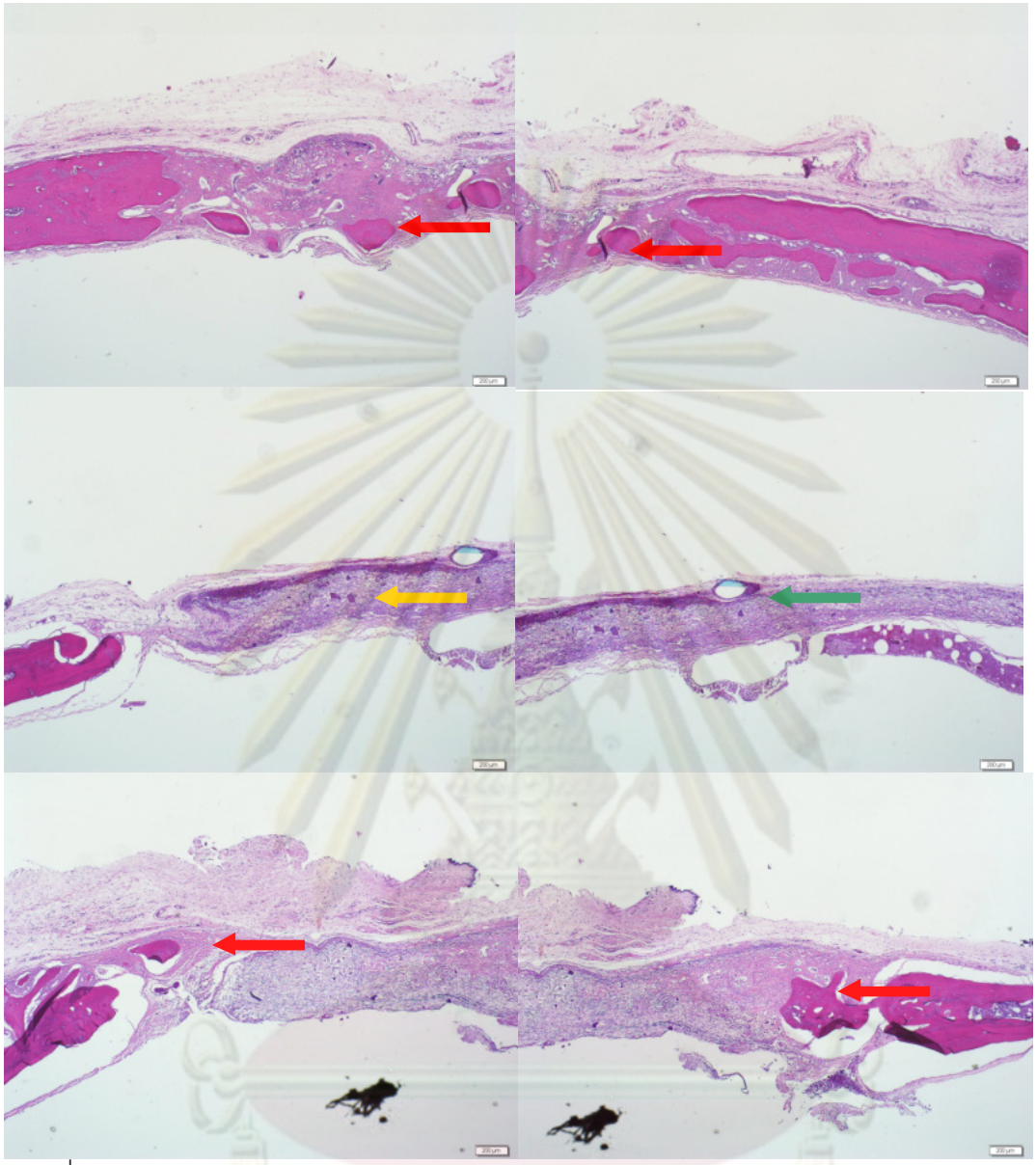
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.33 ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกลุ่มสารสกัดผิวหนัง ที่กำลังขยาย 20X

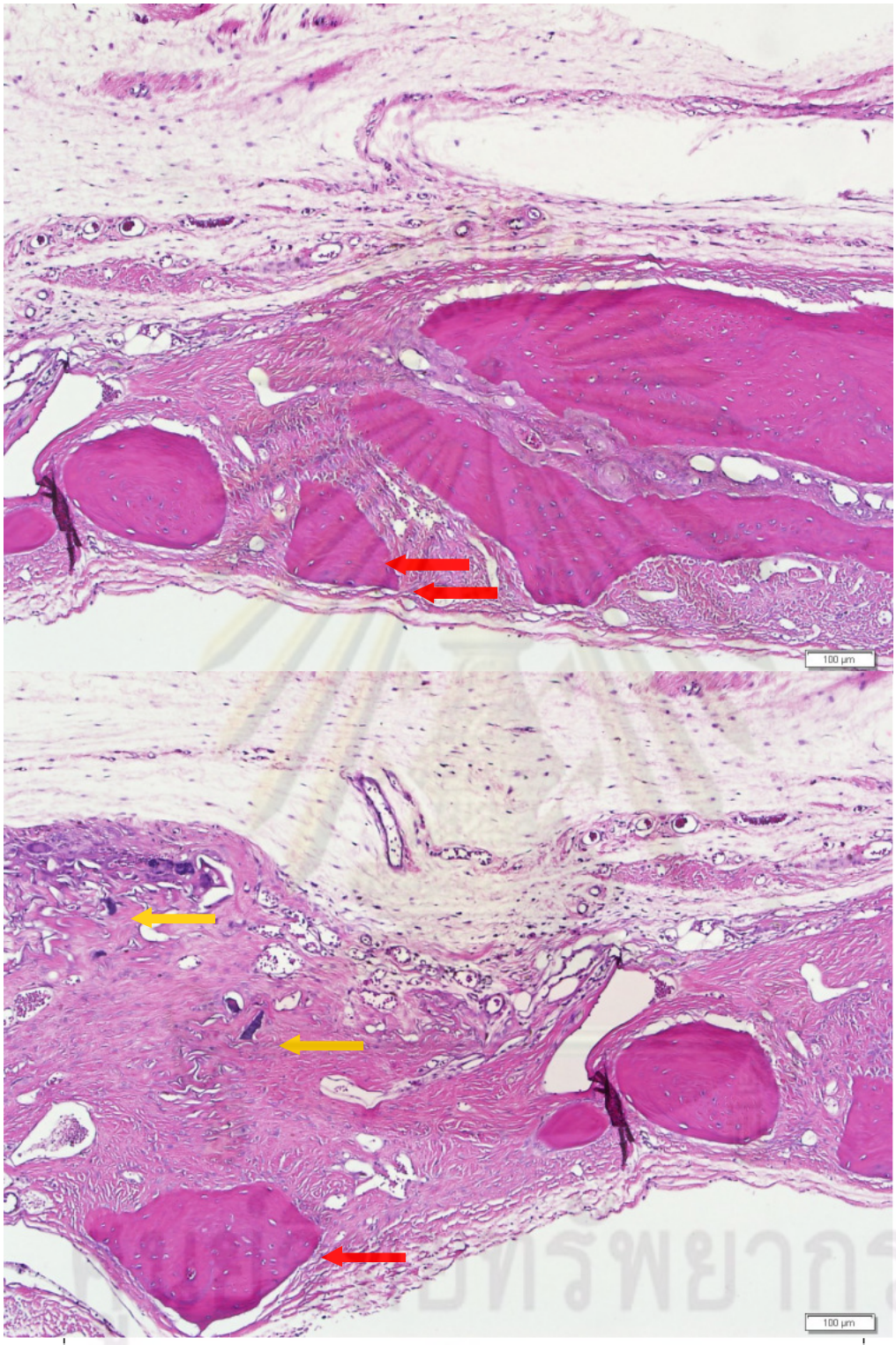
ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกะโหลกศีรษะหนูที่ทำการฝังด้วยโครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำมากจากกลุ่มสารสกัดผิวหนังนำมาย้อมด้วย hematoxylin and eosin stain ลูกศรสีแดงแสดงให้เห็นถึงการเกิดเนื้อเยื่อกระดูกใหม่ (woven bone) และ ลูกศรสีเหลืองแสดงบริเวณที่เกิด fibrous tissue

4.3.6 ข้อมูลทางจุลกายวิภาคศาสตร์กลุ่ม สารสกัดจากผิวหนังผสมผงกระดูก



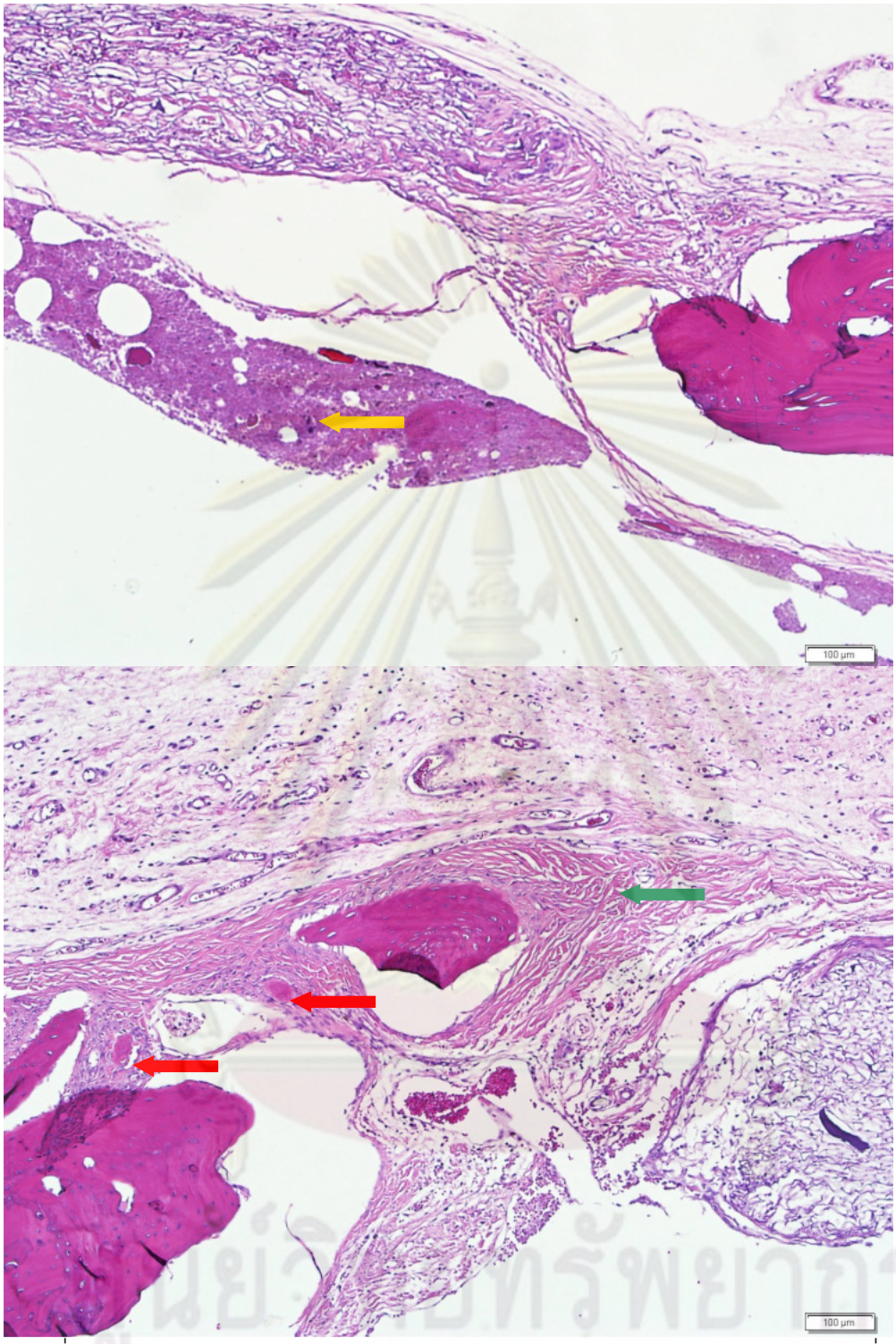
ภาพที่ 4.34 ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกลุ่มสารสกัดผิวหนังผสมผงกระดูก ที่กำลังขยาย 4X

ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกะโหลกศีรษะหนูที่ทำการฝังด้วยโครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำมากจากกลุ่มสารสกัดผิวหนังผสมผงกระดูกนำมาย้อมด้วย hematoxylin and eosin stain ลูกศรสีแดงแสดงให้เห็นถึงการเกิดเนื้อเยื่อกระดูกใหม่ (woven bone) ในบางชิ้นงาน และไม่พบการเกิดเนื้อเยื่อกระดูกใหม่ในบางชิ้นงาน(ลูกศรสีเหลือง)แต่พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ยังสลายตัวไม่หมดและมีเศษผงกระดูกคงค้างอยู่ และ ไหมเย็บไนลอน (ลูกศรสีเขียว)

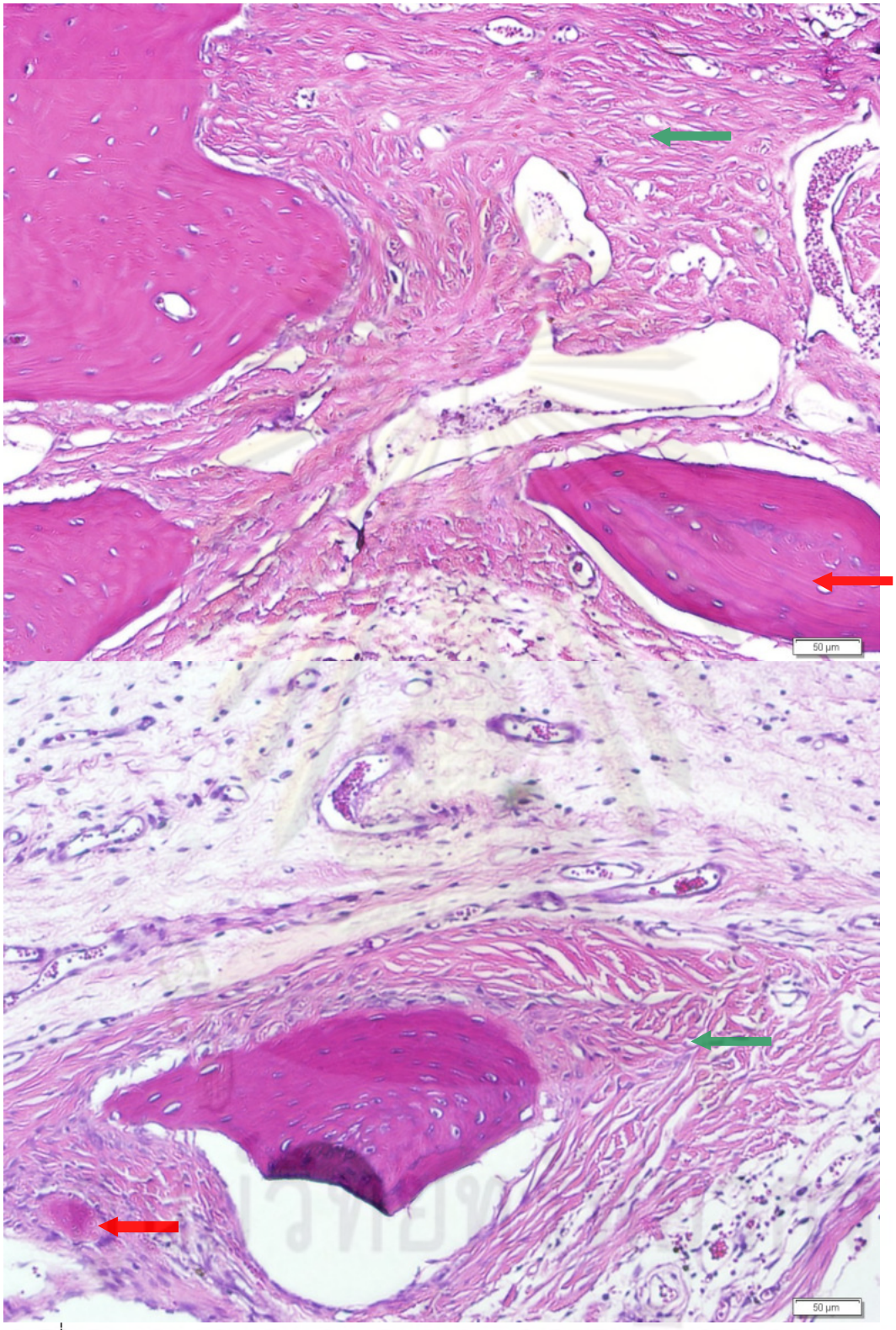


ภาพที่4.35 ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกลุ่มสารสกัดผิวหนังผสมผงกระดูก ที่กำลังขยาย 10X

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่4.35 ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกลุ่มสารสกัดผิวหนังผสมผงกระดูก ที่กำลังขยาย 10X (ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกะโหลกศีรษะหนูที่ทำการฝังด้วยโครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำมาจากกลุ่มสารสกัดผิวหนังผสมผงกระดูกนำมาย้อมด้วย hematoxylin and eosin stain ลูกศรสีแดงแสดงให้เห็นถึงการเกิดเนื้อเยื่อกระดูกใหม่ (woven bone) ในบางชิ้นงาน และไม่พบการเกิดเนื้อเยื่อกระดูกใหม่ในบางชิ้นงานแต่พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ยังสลายตัวไม่หมดและมีเศษผงกระดูกคงค้างอยู่แสดงด้วยลูกศรสีเหลือง และลูกศรสีเขียวแสดง fibrous tissue)



ภาพที่ 4.36 ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกลุ่มสารสกัดผิวหนังผสมผงกระดูก ที่กำลังขยาย 20X (ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกะโหลกศีรษะหนูที่ทำการฝังด้วยโครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำมากจากกลุ่มสารสกัดผิวหนังผสมผงกระดูกนำมาย้อมด้วย hematoxylin and eosin stain ลูกศรสีแดงแสดงให้เห็นถึงการเกิดเนื้อเยื่อกระดูกใหม่ (woven bone) ในบางชิ้นงาน และลูกศรสีเขียวแสดง fibrous tissue)

4.4ผลการวิเคราะห์ข้อมูลเชิงเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มตัวอย่างทางจุลกายวิภาคศาสตร์

จากข้อมูลข้อมูลเชิงเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มตัวอย่างทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกะโหลกศีรษะหนูที่ทำการฝังด้วยโครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำมากจากกลุ่มสารสกัดผิวหนังนำมาเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ทำการฝังชิ้นงานชนิดอื่นๆ (ดังแสดงในตารางที่4.3)

	จำนวนหนู/ตัว		
ชนิดของชิ้นงานที่ฝังลงกะโหลกหนู	ไม่พบการสร้างกระดูกใหม่		total
สารสกัดจากผิวหนัง		0	4
สารสกัดจากผิวหนัง + bone powder		3	4
Bovine collagen type I		4	4
Bovine collagen type I + bone powder		4	4
CollaPlug®		4	4
blank		3	3
Total		18	23

ตารางที่4.3 แสดงผลการเกิดเนื้อเยื่อกระดูกใหม่ที่บริเวณแผลที่กะโหลกศีรษะหนูที่ทำการฝังชิ้นงานชนิดต่างๆ

พบว่าการเกิดเนื้อเยื่อกระดูกใหม่ที่บริเวณแผลกะโหลกหนูของกลุ่มที่ฝังชิ้นงานที่ทำจากสารสกัดจากผิวหนังมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่ม Bovine collagen type I, Bovine collagen type I + bone powder , CollaPlug® และ กลุ่มที่ไม่ได้ใส่ชิ้นงาน (Blank) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p=0-029)

อย่างไรก็ตามเมื่อนำมาเปรียบเทียบ กับกลุ่มสารสกัดผิวหนังผสมผงกระดูก กลับพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p=0.143)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

ผู้ทำการวิจัยได้เลือกที่จะใช้ Cranial Defect ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ของหนูวิสต้าร์เป็นModel เนื่องจากเป็น Craniofacial boneและมีการสร้างกระดูกแบบ intramembranous ossification เช่นเดียวกับกระดูกเบ้าฟันและแม้ว่ากระดูกจะเป็นอวัยวะที่มีกระบวนการสร้างซ่อมแซมได้เอง (self regenerative organ) แต่ Cranial Defect ขนาดเส้นผ่าศูนย์ 5 มิลลิเมตร ถือเป็น critical defect หากรอยแผลใหญ่กว่านี้กระดูกจะไม่สามารถหายเองได้ตามธรรมชาติ(Schmitz and Hollinger, 1986) จะเห็นได้จากผลการศึกษาในกลุ่ม negative control ที่ไม่มีกระบวนการสร้างกระดูกเกิดขึ้นภายในรอยวิการของกะโหลกศีรษะหนูเลย . ผลการศึกษาจาก digital x-ray และ Cone beam CT แสดงให้เห็นว่ามีเงาขาวเกิดขึ้นเนื่องจากมีการสะสมของแคลเซียมทั้งที่กลางรอยแผลและที่ขอบของแผลของกะโหลกศีรษะหนู ที่ได้ทำการใส่ชิ้นงานที่ขึ้นรูปจากสารสกัดผิวหนังอย่างชัดเจนแต่ไม่พบการสะสมของแคลเซียมภายในรอยวิการของกะโหลกศีรษะหนู ในกลุ่ม CollaPlug® , bovine collagen type 1 และ sham group เลย จึงแสดงให้เห็นว่า CollaPlug® , bovine collagen type 1 ต่างก็ไม่มีคุณสมบัติในการที่จะทำให้เกิดการสะสมของแคลเซียมภายในรอยแผลที่ฝังชิ้นงานได้ โดยเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของการเกิดการสะสมของแคลเซียมที่บริเวณกะโหลกศีรษะหนูที่ทั้งที่บริเวณขอบแผล และกลางแผลของกลุ่มสารสกัดจากผิวหนังเมื่อเปรียบเทียบ กับกลุ่ม Bovine collagen type I , Bovine collagen type I ผสม bone powder, และ Blank พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น $p<0.05$ ทั้งสิ้นยกเว้นในกลุ่ม CollaPlug® และBovine collagen type I ที่เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของการเกิดการสะสมของแคลเซียมที่บริเวณกะโหลกศีรษะหนูที่บริเวณขอบแผล พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ในขณะที่สารสกัดจากผิวหนังที่ผสมผงกระดูกกลับพบการสะสมของแคลเซียมที่บริเวณกะโหลกศีรษะหนูที่บริเวณขอบแผลเพียงสองชิ้นงานและการสะสมของแคลเซียมทีบริเวณกะโหลกศีรษะหนูที่บริเวณกลางแผลเพียงหนึ่งชิ้นงาน แต่เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของการเกิดการสะสมของแคลเซียมที่บริเวณกะโหลกศีรษะหนูที่ทั้งที่บริเวณขอบแผล และกลางแผลของกลุ่มสารสกัดจากผิวหนังเทียบกับกลุ่มสารสกัดจากผิวหนังที่ผสมผงกระดูกพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น95%

ที่บริเวณขอบแผล($p=0.429$) และ ที่บริเวณกลางแผล($p=0.143$) จากผลการวิเคราะห์ทางภาพรังสีทำให้สามารถสรุปได้ว่า ชิ้นงานที่ทำจากสารสกัดจากผิวหนังทำให้มีการสะสมของแคลเซียมที่บริเวณกลางรอยวิการได้ดีกว่า CollaPlug® , Bovine collagen type I , Bovine

collagen type I ผสม bone powder แต่ไม่มีความแตกต่างกับ สารสกัดจากผิวหนังที่ผสมผงกระดูกและเมื่อเปรียบเทียบในลักษณะเดียวกันที่บริเวณขอบแผลพบว่า ชิ้นงานที่ทำจากสารสกัดจากผิวหนังทำให้มีการสะสมของแคลเซียมที่บริเวณขอบรอยวิการได้ดีกว่า Bovine collagen type I ผสม bone powder แต่ไม่มีความแตกต่างกับ CollaPlug® , Bovine collagen type I และ สารสกัดจากผิวหนังที่ผสมผงกระดูก

จากการศึกษาทางพยาธิวิทยาพบว่า มีการสร้างกระดูกใหม่ชัดเจนภายในรอยวิการของกะโหลกศีรษะหนู พบว่าการเกิดเนื้อเยื่อกระดูกใหม่ที่บริเวณแผลกะโหลกหนูของกลุ่มที่ฝังชิ้นงานที่ทำจากสารสกัดจากผิวหนังมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่ม Bovine collagen type I, Bovine collagen type I + bone powder , CollaPlug® และ กลุ่มที่ไม่ได้ใส่ชิ้นงาน (Blank) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p=0.029) อย่างไรก็ตามเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับกลุ่มสารสกัดผิวหนังผสมผงกระดูก กลับพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p=0.143) แสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากผิวหนังมนุษย์มีคุณสมบัติในการเหนี่ยวนำการสร้างกระดูกใหม่ที่ชัดเจนในขณะที่ Bovine collagen type 1 ไม่มี นอกจากนั้นผงกระดูกที่เติมลงไป โดยคาดหวังให้มีส่วนช่วยในการเหนียวนำการสร้างกระดูกใหม่กลับไม่มีผลที่ดีกว่า กลุ่มที่ฝังชิ้นงานที่ขึ้นรูปจากสารสกัดจากผิวหนังอย่างเดียว

5.2 อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

จากการวิจัยที่เกิดขึ้นพบว่าการซ่อมแซมรอยวิการของกระดูกด้วย scaffold เพียงอย่างเดียวไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ในช่องว่างโดยสมบูรณ์ได้ สรุปได้จากการที่ไม่มี scaffold ในกลุ่มใดเลยที่สามารถทำให้เกิดการสร้างกระดูกปิดCranial Defect ขนาดเส้นผ่าศูนย์ 5 มิลลิเมตร ซึ่งถือเป็น critical defect ที่กระดูกไม่สามารถหายเองตามธรรมชาติได้ โดยที่โครงเลี้ยงเซลล์ที่ขึ้นรูปจากสารสกัดจากผิวหนัง มีศักยภาพชัดเจนในการเหนี่ยวนำการเกิดกระดูกใหม่ได้ชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่น ๆ แต่ยังไม่มากพอที่จะเหนี่ยวนำการสร้างกระดูกใหม่เพื่อซ่อมแซมรูโหว่โดยสมบูรณ์ จากผลการทดลองทางรังสีพบว่ามีการสะสมของแคลเซียม ที่บริเวณขอบแผลในหลายกลุ่มทดลองซึ่งไม่น่าจะเป็นผลจากการเหนี่ยวนำของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำการฝังลงไปในรอยวิการแต่เป็นผลมาจากการที่กระดูกมีกระบวนการซ่อมแซมบาดแผลตามธรรมชาติ อย่างไรก็ตามจากผลการตรวจทางรังสียังแสดงให้เห็นว่ามีการสะสมของแคลเซียม (Schantz, Hutmacher *et al.*, 2003; Schantz, Teoh *et al.*, 2003) ที่บริเวณกลางรอยวิการในกลุ่มทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำจากสารสกัดจากผิวหนัง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองทางด้านจุลกายวิภาคศาสตร์ซึ่งเห็นการเกิดกระดูกใหม่ที่บริเวณกลางรอยวิการเช่นกัน

อย่างไรก็ตามกระดูกใหม่ที่เกิดขึ้นพบว่ามีลักษณะเป็น bone island เล็ก ๆ ซึ่งยังไม่มีความต่อเนื่องที่จะแสดงให้เห็นชัดเจนว่าสามารถสร้างเป็น bone bridge ขึ้นทดแทนรอยวิการที่สร้างขึ้นกลางกะโหลกศีรษะของหนูได้ จึงยังเป็นความท้าทายของนักวิจัยทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อที่จะต้องพัฒนาโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีคุณสมบัติที่ดียิ่งขึ้น ผลการทดลองที่ไม่เป็นไปตามสมมุติฐานที่ตั้งไว้อีกข้อหนึ่งคือการที่ผลการเกิดกระดูกใหม่ในกลุ่มที่ใส่ผงกระดูกไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้ใส่ผงกระดูกทำให้สามารถวิจารณ์ได้ว่าผงกระดูกไม่ได้มีส่วนช่วยเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่เลย โดยผู้ทำการวิจัยเห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่น่าจะมีความสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างกระดูกที่ดีอีกชนิดหนึ่งในปัจจุบันคือ DBM (Demineralized bone matrix) ซึ่งมี collagen type 1 เป็นองค์ประกอบหลักเช่นกัน แต่คุณสมบัติที่ทำให้มีการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างกระดูกเนื่องจากการที่ DBM มีสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของกระดูกเช่น BMP ,Growth factor หลายชนิด(Kalish *et al.*, 2008) จึงมีข้อเสนอแนะให้มีการวิจัย และทำการศึกษาเพิ่มเติม โดยผสมสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของกระดูก (BMP) กับ h-Dermal matrix และเปรียบเทียบการเกิด ectopic bone formation กับ DBM นอกจากนั้นยังควรมีการเพิ่มคุณสมบัติในการเหนี่ยวนำการเกิดกระดูกโดยใช้เซลล์ โดยแนะนำให้มีการทำการศึกษาการเปรียบเทียบกระบวนการสร้างกระดูก จากสารสกัดจากผิวหนังมนุษย์ที่มีการเพาะเลี้ยง MSC (mesenchymal stem cell)ใน scaffold และเหนี่ยวนำให้เป็นเซลล์กระดูกก่อน แล้วจึงนำไปฝังในสัตว์ทดลอง เทียบกับ กลุ่มที่ทำการฝังชิ้นงานที่เตรียมขึ้นจากสารสกัดจากผิวหนังมนุษย์ไม่มี MSC อย่างไรก็ตามในรอยวิการของกระดูกที่มีขนาดใหญ่ เช่นแผลถอนฟัน จะไม่สามารถเกิดกระบวนการสร้างทดแทนได้เองตามธรรมชาติได้เต็มรอยแผล โดยจะมีการละลายตัวลงหลังการหายของแผล หรือจะเกิดการหายของแผลที่ทดแทนด้วยเนื้อเยื่ออื่นเช่น fibrous tissue(Jung *et al.*, 2007; Shimizu *et al.*, 1998; Shimizu *et al.*, 2000) ต่างก็ต้องการวัสดุทดแทนเป็นโครงที่ใช้เป็น temporary template ให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกใหม่ สารในกลุ่มเส้นใยโปรตีน เช่น สารสกัดจากผิวหนังที่ได้ใช้ในการวิจัยนี้ ยังคงเป็นทางเลือกที่ดี เนื่องจากเป็นโปรตีนหลักชนิดเดียวกับที่มีในกระดูก ไม่มีการต่อต้านจากร่างกาย ขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ได้ง่าย และสลายตัวไปได้เองหลังจากการเกิดเนื้อเยื่อกระดูกใหม่ อย่างไรก็ตามหากจะผลิตขึ้นเพื่อใช้ได้จริงในทางการค้า จะต้องมีการพัฒนาเพิ่มคุณสมบัติที่ดีในการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างกระดูกได้ดีกว่านี้ ซึ่งเป็นความท้าทายที่ต้องใช้ความร่วมมือกันของนักวิจัยในหลาย ๆ สาขา ไม่ว่าจะเป็นทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ , ด้านเซลล์ต้นกำเนิด , ด้านวิศวกรรมเคมี ต่อไป

รายการอ้างอิง

Barry, F. P., Murphy, J. M. (2004). Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* 36(4):568-84.

Bartee, B. K. (2001). Extraction site reconstruction for alveolar ridge preservation. Part 1: rationale and materials selection. *J Oral Implantol* 27(4):187-93.

Cacciafesta, V., Dalstra, M., Bosch, C., Melsen, B., Andreassen, T. T. (2001). Growth hormone treatment promotes guided bone regeneration in rat calvarial defects. *Eur J Orthod* 23(6):733-40.

Cawood, J. I., Howell, R. A. (1988). A classification of the edentulous jaws. *Int J Oral Maxillofac Surg* 17(4):232-6.

Charles A. Babbush , J. A. H., Jack T. Krauser , Joel L. Rosenlicht (2010). Dental Implants The Art and Science: Elsevier Health Sciences.

Cowan, C. M., Shi, Y. Y., Aalami, O. O., Chou, Y. F., Mari, C., Thomas, R., Quarto, N., Contag, C. H., Wu, B., Longaker, M. T. (2004). Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nat Biotechnol* 22(5):560-7.

Felin, J. E., Mayo, J. L., Loos, T. J., Jensen, J. D., Sperry, D. K., Gaufin, S. L., Meinhart, C. A., Moss, J. B., Bridgewater, L. C. Nuclear variants of bone morphogenetic proteins. *BMC Cell Biol* 11(20.

Garg, A. K. (2004). Bone Biology, Harvesting, Grafting for Dental Implants : Rationale and Clinical Applications Portland, OR Quintessence Publishing Company, Incorporated.

Glowacki, J., Mizuno, S. (2008). Collagen scaffolds for tissue engineering. *Biopolymers* 89(5):338-44.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Greenwald, A. S., Boden, S. D., Goldberg, V. M., Khan, Y., Laurencin, C. T., Rosier, R. N. (2001). Bone-graft substitutes: facts, fictions, and applications. *J Bone Joint Surg Am* 83-A Suppl 2 Pt 2(98-103.

Hollinger, J. O., Kleinschmidt, J. C. (1990). The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg* 1(1):60-8.

Irinakis, T. (2006). Rationale for socket preservation after extraction of a single-rooted tooth when planning for future implant placement. *J Can Dent Assoc* 72(10):917-22.

Jung, Y. S., Chung, S. W., Nam, W., Cho, I. H., Cha, I. H., Park, H. S. (2007). Spontaneous bone formation on the maxillary sinus floor in association with an extraction socket. *Int J Oral Maxillofac Surg* 36(7):656-7.

Kalish, B. P., Schuster, G. S., Peacock, M. E., Cuenin, M. F., Swiec, G. D., Potter, B. J., Buxton, T. B., McPherson, J. C., 3rd (2008). Influence of matrix-suspended demineralized bone on osseous repair using a critical-sized defect in the rat (Rattus norvegicus) calvarium. *J Oral Implantol* 34(2):83-9.

Kohles, S. S., Vernino, A. R., Clagett, J. A., Yang, J. C., Severson, S., Holt, R. A. (2000). A morphometric evaluation of allograft matrix combinations in the treatment of osseous defects in a baboon model. *Calcif Tissue Int* 67(2):156-62.

Laurencin, C., Khan, Y., El-Amin, S. F. (2006). Bone graft substitutes. *Expert Rev Med Devices* 3(1):49-57.

Mah, J., Hung, J., Wang, J., Salih, E. (2004). The efficacy of various alloplastic bone grafts on the healing of rat calvarial defects. *Eur J Orthod* 26(5):475-82.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Marieb, E. N. (1998). *Human Anatomy & Physiology*. 4 ed.: Benjamin/Cummings Science Publishing.

Marx, R. E., Shellenberger, T., Wimsatt, J., Correa, P. (2002). Severely resorbed mandible: predictable reconstruction with soft tissue matrix expansion (tent pole) grafts. *J Oral Maxillofac Surg* 60(8):878-88; discussion 888-9.

Mauney, J. R., Kaplan, D. L., Volloch, V. (2004). Matrix-mediated retention of osteogenic differentiation potential by human adult bone marrow stromal cells during ex vivo expansion. *Biomaterials* 25(16):3233-43.

Meijer, G. J., de Bruijn, J. D., Koole, R., van Blitterswijk, C. A. (2008). Cell based bone tissue engineering in jaw defects. *Biomaterials* 29(21):3053-61.

Netter, F. H. (1987). Musculoskeletal system: anatomy, physiology, and metabolic disorders. Summit, New Jersey: Ciba-Geigy Corporation.

Pearce, A. I., Richards, R. G., Milz, S., Schneider, E., Pearce, S. G. (2007). Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater* 13(1-10.

Pryor, M. E., Polimeni, G., Koo, K. T., Hartman, M. J., Gross, H., April, M., Safadi, F. F., Wikesjo, U. M. (2005). Analysis of rat calvaria defects implanted with a platelet-rich plasma preparation: histologic and histometric observations. *J Clin Periodontol* 32(9):966-72.

Pryor, M. E., Yang, J., Polimeni, G., Koo, K. T., Hartman, M. J., Gross, H., Agelan, A., Manns, J. M., Wikesjo, U. M. (2005). Analysis of rat calvaria defects implanted with a platelet-rich plasma preparation: radiographic observations. *J Periodontol* 76(8):1287-92.

Robert Lanza, R. L., Joseph Vacanti (2007). Principles of Tissue Engineering: Elsevier Science.

Schantz, J. T., Hutmacher, D. W., Lam, C. X., Brinkmann, M., Wong, K. M., Lim, T. C., Chou, N., Guldberg, R. E., Teoh, S. H. (2003). Repair of calvarial defects with customised tissue-engineered bone grafts II. Evaluation of cellular efficiency and efficacy in vivo. *Tissue Eng* 9 Suppl 1(S127-39.

Schantz, J. T., Teoh, S. H., Lim, T. C., Endres, M., Lam, C. X., Hutmacher, D. W. (2003). Repair of calvarial defects with customized tissue-engineered bone grafts I. Evaluation of osteogenesis in a three-dimensional culture system. *Tissue Eng* 9 Suppl 1(S113-26.

Schmitz, J. P., Hollinger, J. O. (1986). The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res* 205):299-308.

Shimizu, M., Sasaki, T., Ishihara, A., Furuya, R., Kawawa, T. (1998). Bone wound healing after maxillary molar extraction in ovariectomized aged rats. *J Electron Microsc (Tokyo)* 47(5):517-26.

Shimizu, M., Furuya, R., Kawawa, T., Sasaki, T. (2000). Bone wound healing after maxillary molar extraction in ovariectomized aged rats: quantitative backscattered electron image analysis. *Anat Rec* 259(1):76-85.

Tangsadthakun, C., Kanokpanont, S., Sanchavanakit, N., Pichyangkura, R., Banaprasert, T., Tabata, Y., Damrongsakkul, S. (2007). The influence of molecular weight of chitosan on the physical and biological properties of collagen/chitosan scaffolds. *J Biomater Sci Polym Ed* 18(2):147-63.

Tortora, G. J. (1989). Principles of Human Anatomy. 5 ed. New York: Harper & Row, Publishers.

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>ภาคผนวก ก แบบบันทึกข้อมูลสัตว์ทดลอง</u>

I D (**หมายเลขสัตว์**).....

ชุดที่ 1 บันทึกก่อนการทดลองในสัตว์

วัน/เดือน/ปี……

อายุสัตว์ ……. สัปดาห์

น้ำหนักสัตว์ ……..กรัม

อาการสัตว์ ปกติ ป่วย (สงสัย ปานกลาง มาก)

ลงชื่อ

(……)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I D (หมายเลขสัตว์).....

ชุดที่ 2 การทดลองในสัตว์(ผ่าตัด)

Date operation :	
Surgeon :	
Type of operation :	
Date sacrifice :	
น้ำหนักสัตว์วันที่ผ่าตัด	

Picture 1 Animal (whole body) and labeling

Picture 2 Surgical defect

Picture 3 Scaffold & defect

ลงชื่อ

(.....)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I D (**หมายเลขสัตว์**).....

ชุดที่ 3 หลังการผ่าตัดในสัตว์

สัปดาห์ ที่1 หลังผ่าตัด

วันที่ 1 หลังผ่าตัด (วันที่ เดือน ปี) .....

อาการ แข็งแรงปกติ ป่วย ตาย

การกิน กินปกติ กินน้อย ไม่กิน

ฉีดยา .....

ลงชื่อ

(.....)

วันที่ 2 หลังผ่าตัด (วันที่ เดือน ปี) .....

อาการ แข็งแรงปกติ ป่วย ตาย

การกิน กินปกติ กินน้อย ไม่กิน

ฉีดยา .....

ลงชื่อ

(.....)

วันที่ 3 หลังผ่าตัด (วันที่ เดือน ปี) .....

อาการ แข็งแรงปกติ ป่วย ตาย

การกิน กินปกติ กินน้อย ไม่กิน

ฉีดยา .....

ลงชื่อ

(.....)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I D (**หมายเลขสัตว์**).....

วันที่ 4 หลังผ่าตัด (วันที่ เดือน ปี) .....

อาการ แข็งแรงปกติ ป่วย ตาย

การกิน กินปกติ กินน้อย ไม่กิน

ฉีดยา .....

ลงชื่อ

(.....)

วันที่ 5 หลังผ่าตัด (วันที่ เดือน ปี) .....

อาการ แข็งแรงปกติ ป่วย ตาย

การกิน กินปกติ กินน้อย ไม่กิน

ฉีดยา .....

ลงชื่อ

(.....)

วันที่ 6 หลังผ่าตัด (วันที่ เดือน ปี) .....

อาการ แข็งแรงปกติ ป่วย ตาย

การกิน กินปกติ กินน้อย ไม่กิน

ฉีดยา.....

ลงชื่อ

(.....)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I D (**หมายเลขสัตว์**).....

วันที่ 7 หลังผ่าตัด (วันที่ เดือน ปี) .....

อาการ แข็งแรงปกติ ป่วย ตาย

การกิน กินปกติ กินน้อย ไม่กิน

ฉีดยา .....

ลงชื่อ

(.....)

สัปดาห์ที่ 2 หลังผ่าตัด (วันที่ เดือน ปี) .....

น้ำหนัก ..... กรัม

อาการ แข็งแรงปกติ ป่วย ตาย

การกิน กินปกติ กินน้อย ไม่กิน

ฉีดยา .....

ลงชื่อ

(.....)

สัปดาห์ที่ 3 หลังผ่าตัด (วันที่ เดือน ปี) .....

น้ำหนัก ..... กรัม

อาการ แข็งแรงปกติ ป่วย ตาย

การกิน กินปกติ กินน้อย ไม่กิน

ฉีดยา .....

ลงชื่อ

(.....)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I D (**หมายเลขสัตว์**).....

สัปดาห์ที่ 4 **หลังผ่าตัด** (**วันที่ เดือน ปี**) .....

น้ำหนัก ..... กรัม

อาการ แข็งแรงปกติ ป่วย ตาย

การกิน กินปกติ กินน้อย ไม่กิน

ฉีดยา .....

ลงชื่อ

(.....)

สัปดาห์ที่ 5 **หลังผ่าตัด** (**วันที่ เดือน ปี**) .....

น้ำหนัก ..... กรัม

อาการ แข็งแรงปกติ ป่วย ตาย

การกิน กินปกติ กินน้อย ไม่กิน

ฉีดยา .....

ลงชื่อ

(.....)

สัปดาห์ที่ 6 **หลังผ่าตัด** (**วันที่ เดือน ปี**) .....

น้ำหนัก ..... กรัม

อาการ แข็งแรงปกติ ป่วย ตาย

การกิน กินปกติ กินน้อย ไม่กิน

ฉีดยา .....

ลงชื่อ

(.....)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I D (**หมายเลขสัตว์**).....

สัปดาห์ที่ 7 **หลังผ่าตัด** (**วันที่ เดือน ปี**) .....

น้ำหนัก ..... กรัม

อาการ แข็งแรงปกติ ป่วย ตาย

การกิน กินปกติ กินน้อย ไม่กิน

ฉีดยา .....

ลงชื่อ

(.....)

สัปดาห์ที่ 8 **หลังผ่าตัด** (**วันที่ เดือน ปี**) .....

น้ำหนัก ..... กรัม

อาการ แข็งแรงปกติ ป่วย ตาย

การกิน กินปกติ กินน้อย ไม่กิน

ฉีดยา .....

ลงชื่อ

(.....)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I D (**หมายเลขสัตว์**).....

ชุดที่ 4 **การเก็บข้อมูลหลังการ** Sacrifice

วันที่ เดือน ปี ……..……..……..……..

ผู้รับผิดชอบ ……..……..……..…

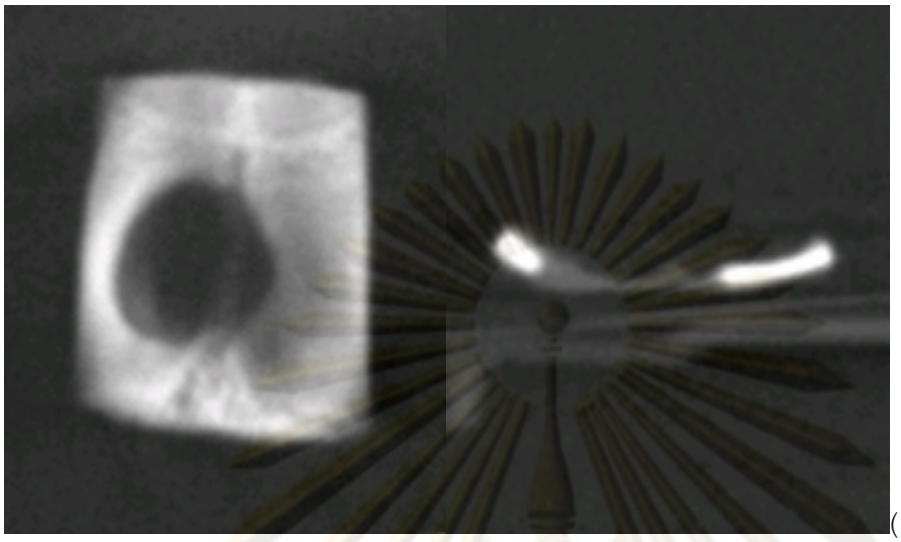
Picture 1 gross specimen + label

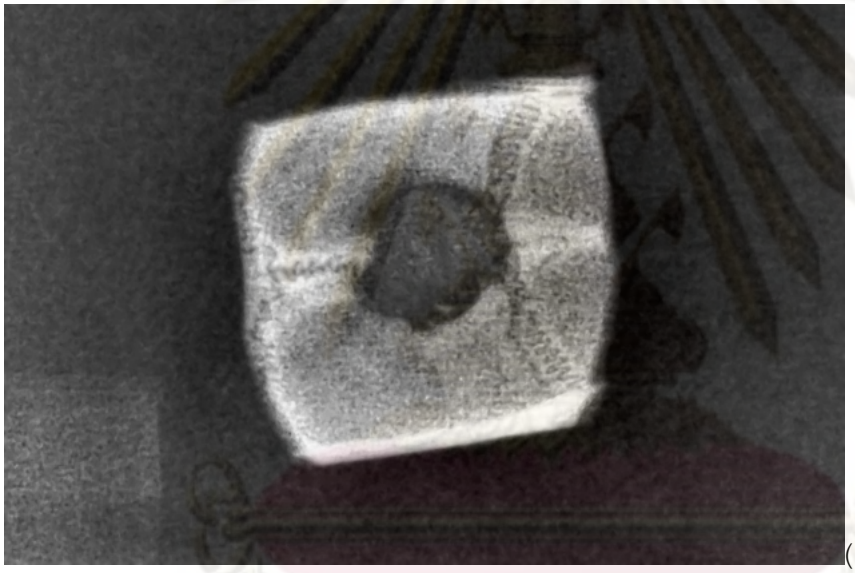
Picture 2 gross specimens (focus)

ลงชื่อ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

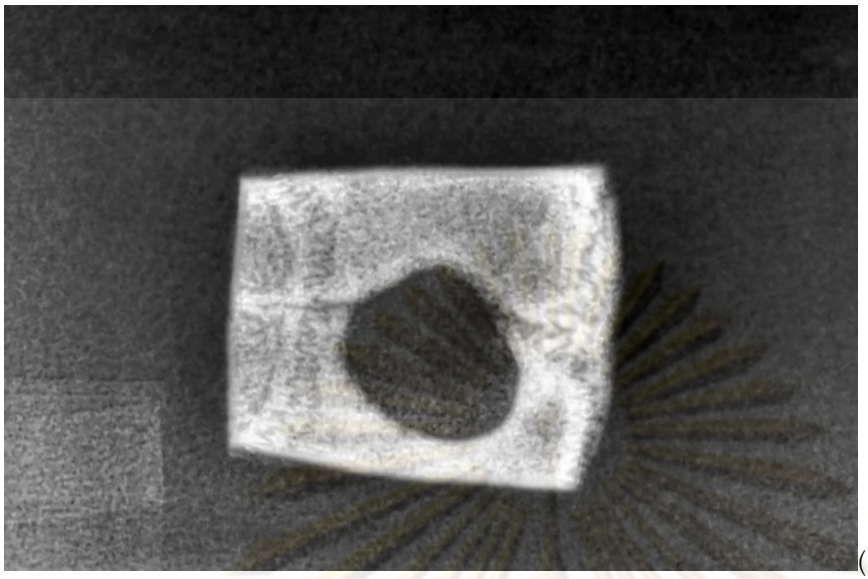
ภาคผนวก ข ภาพรังสี


(CT Rat No.1)


(digital Rat No.1)

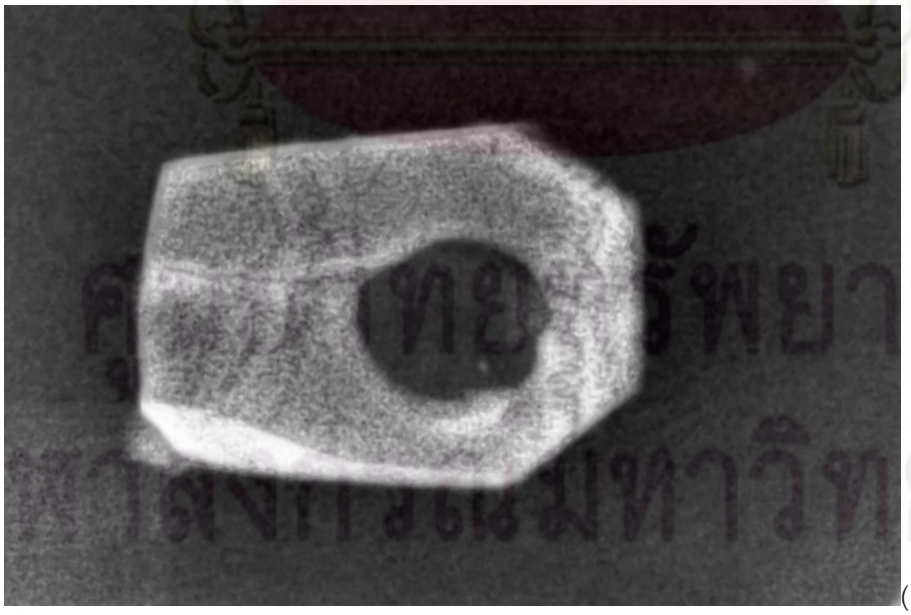
(CT Rat No.2)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



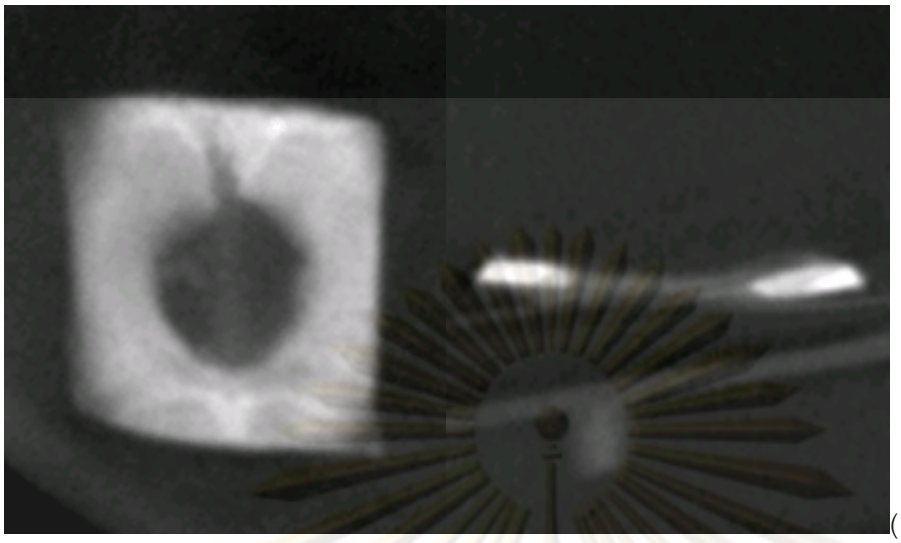
(digital Rat No.2)

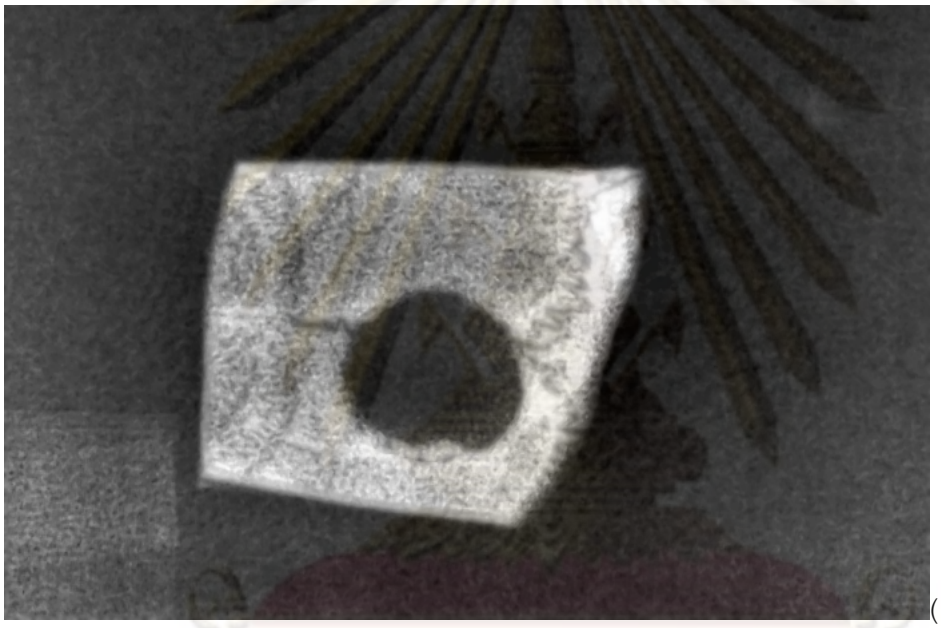
(CT Rat No.3)



(digital Rat No.3)

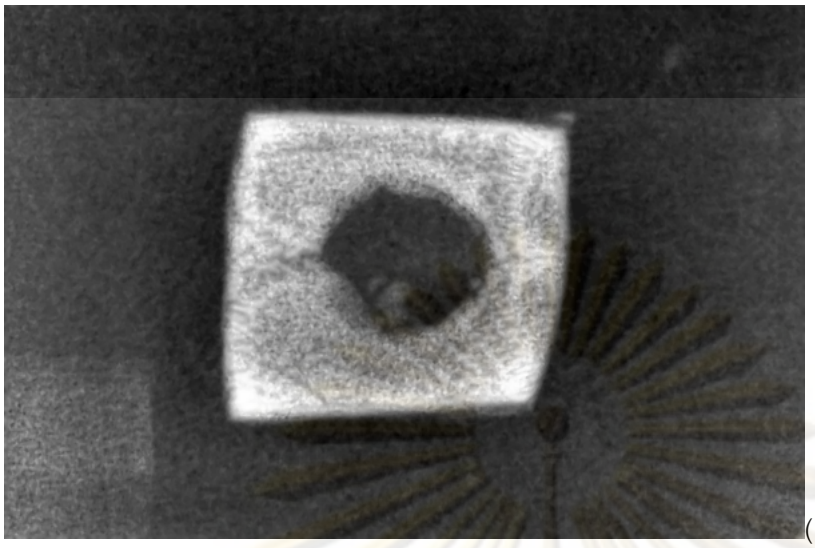
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

 (CTRatNo.5)

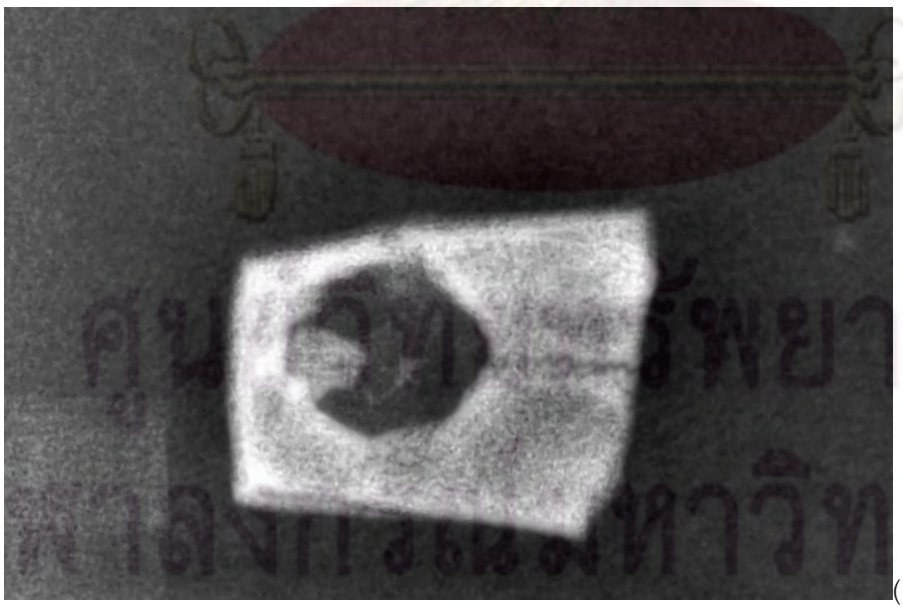
 (digital Rat No.5)

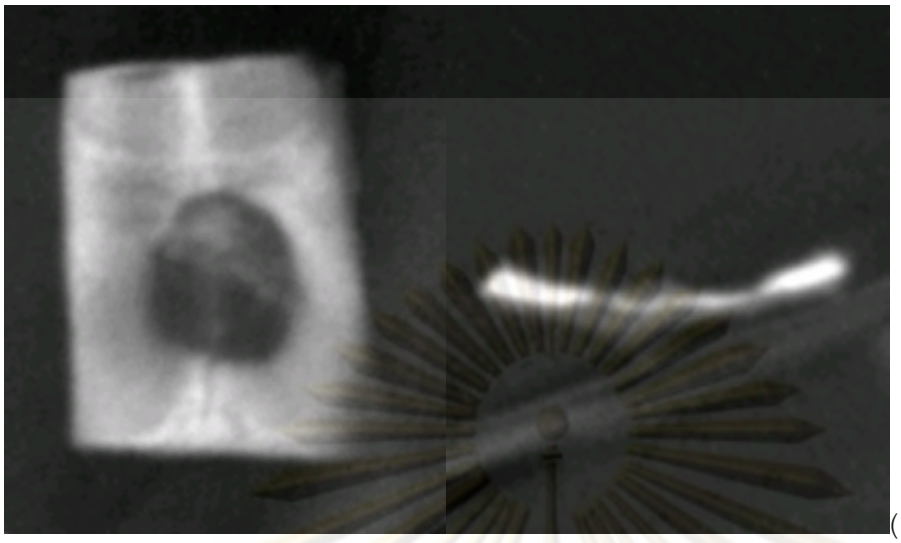
(CT Rat No.7)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

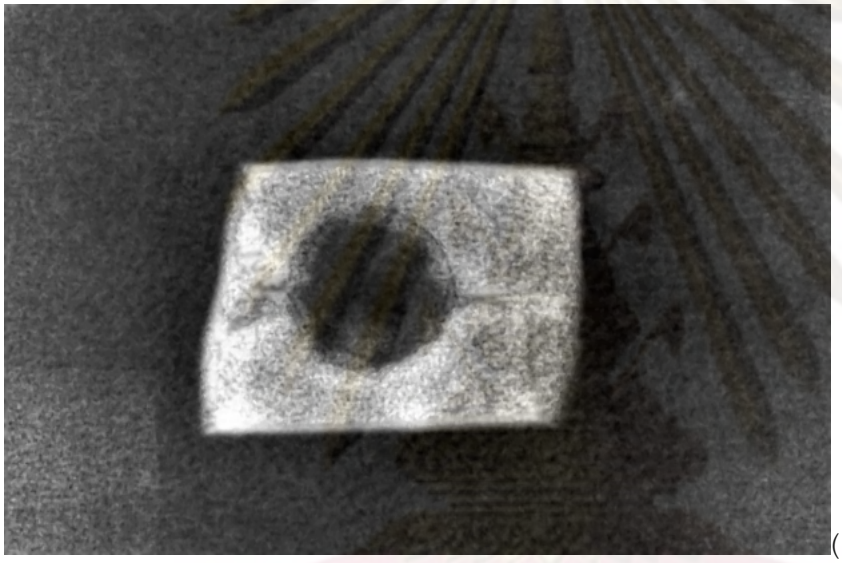

(digital Rat No.7)

(CT Rat No.8)


(digital Rat No.8)



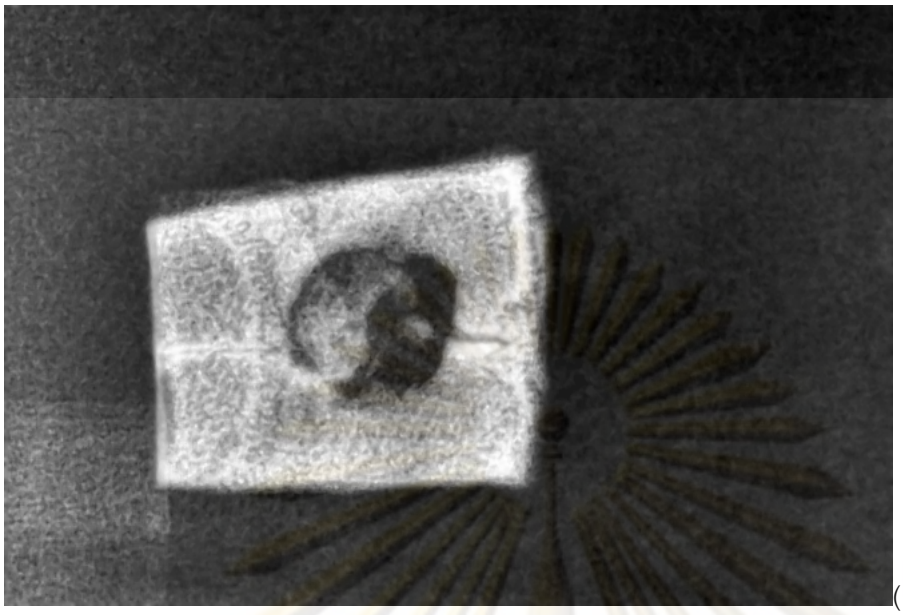
(CTRatNo.9)

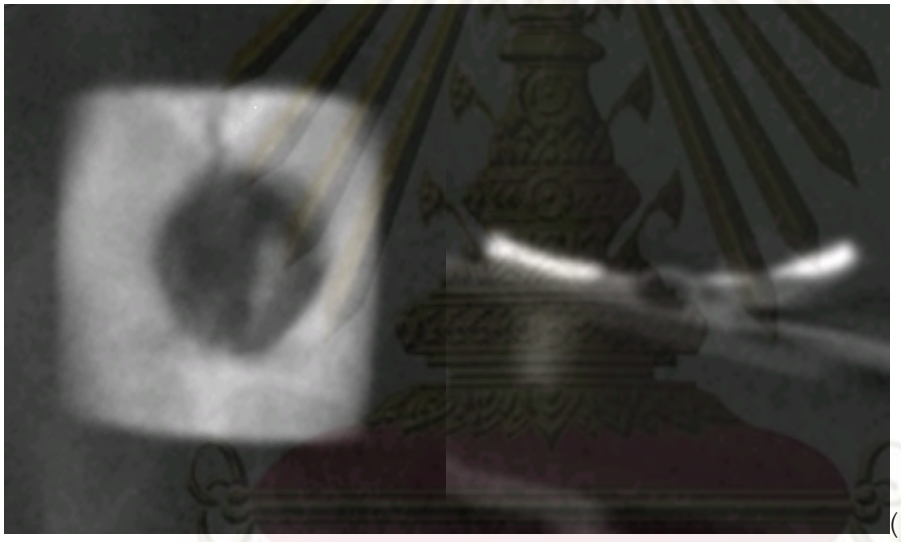


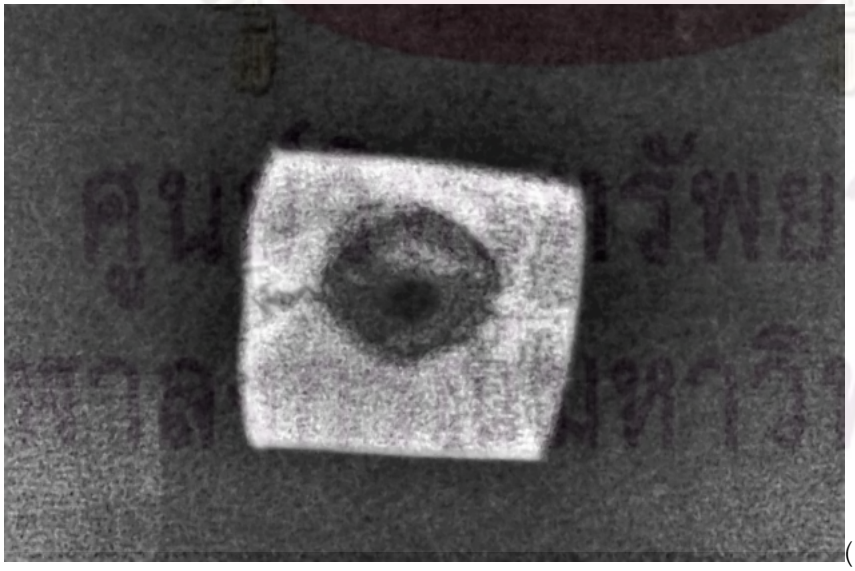
(digital Rat No.9)

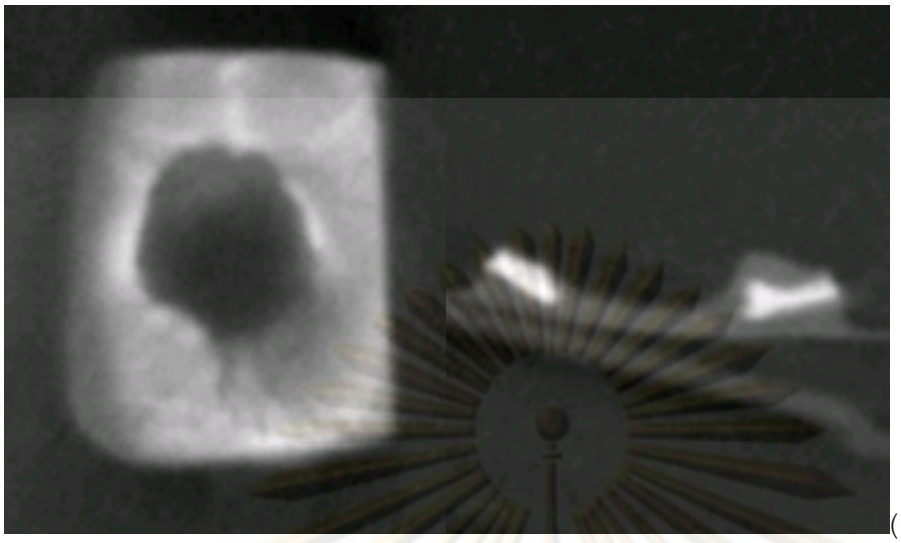
(CT Rat No.10)

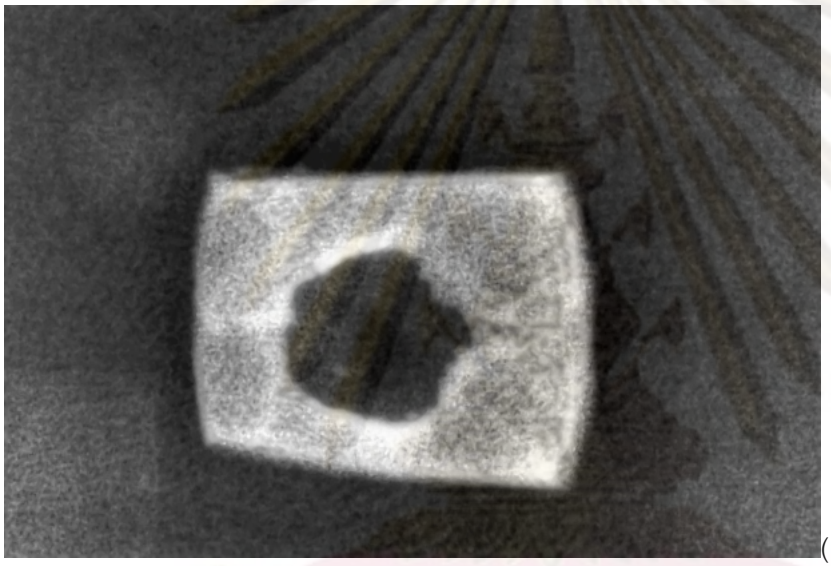
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

 (digital Rat No.10)

 (CTRatNo.11)

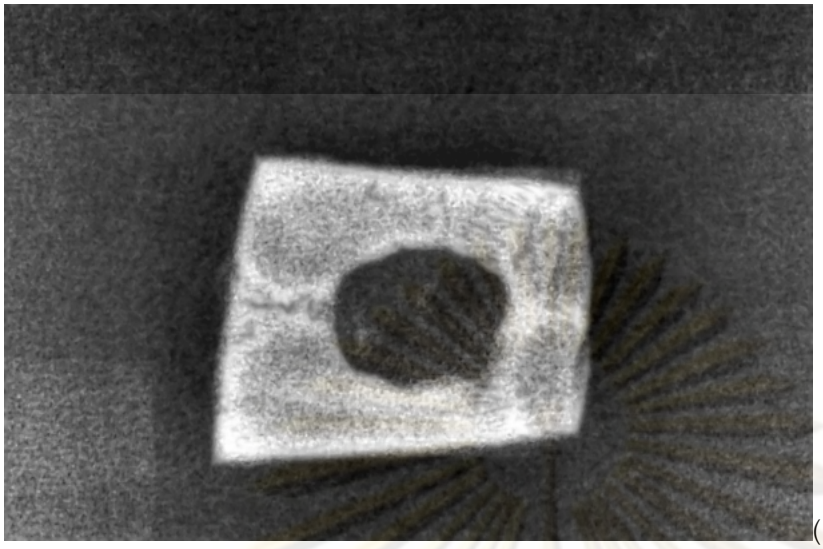
 (digitalRatNo.11)


(CTRatNo.12)


(digitalRat No.12)

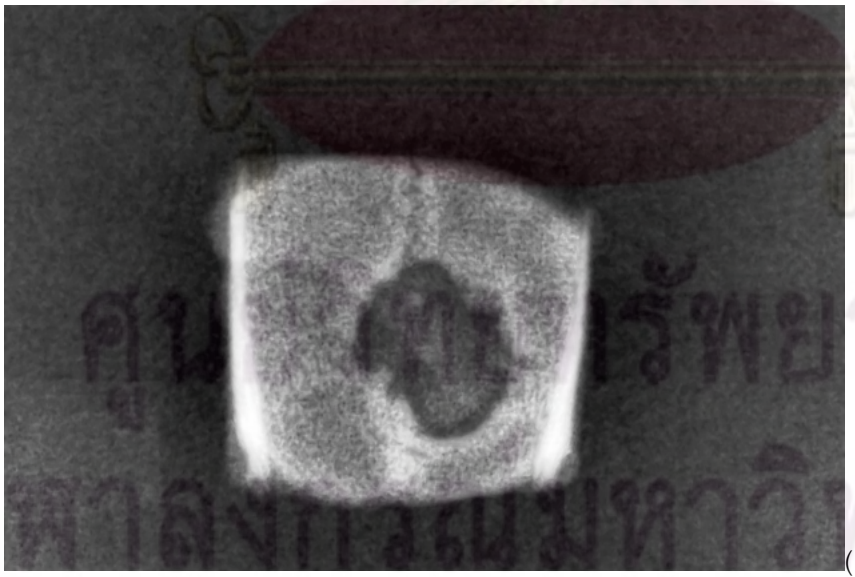
(CTRat No.13)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

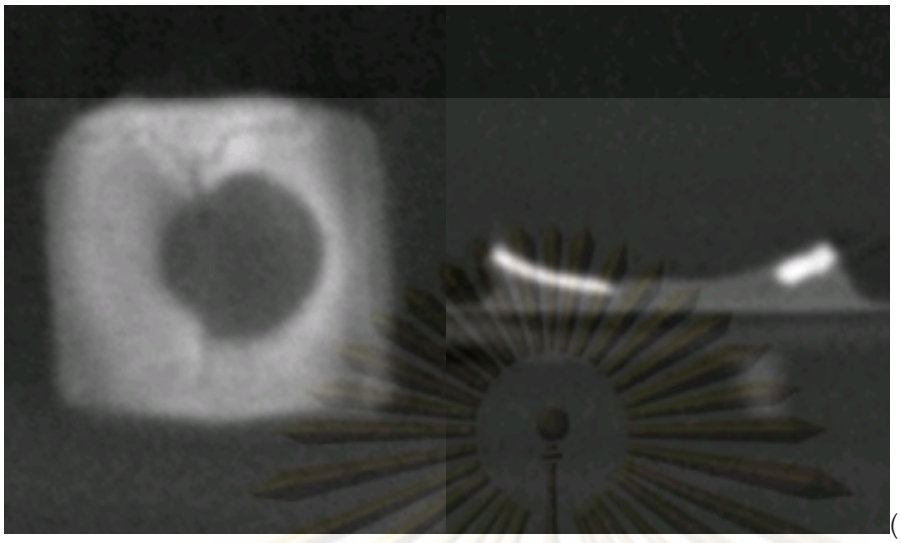


(digitalRat No.13)

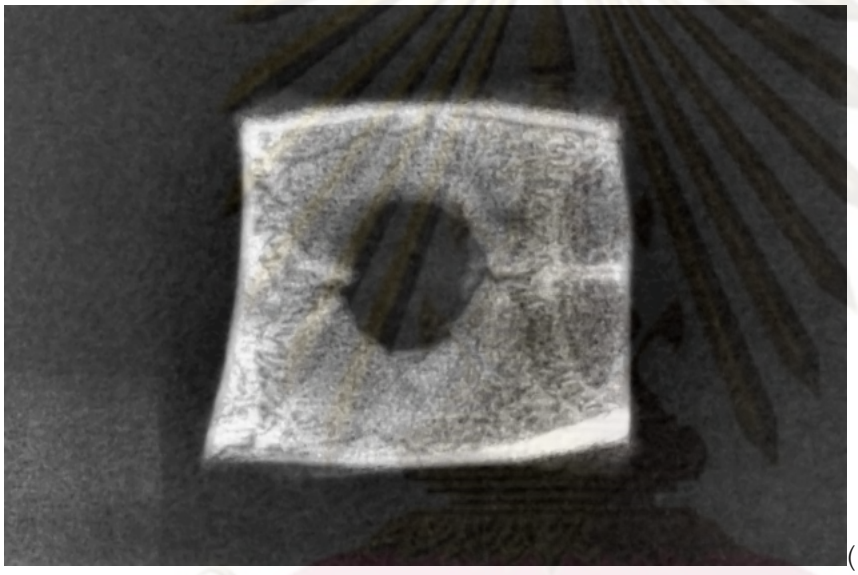
(CTRat No.14)



(digitalRat No.14)



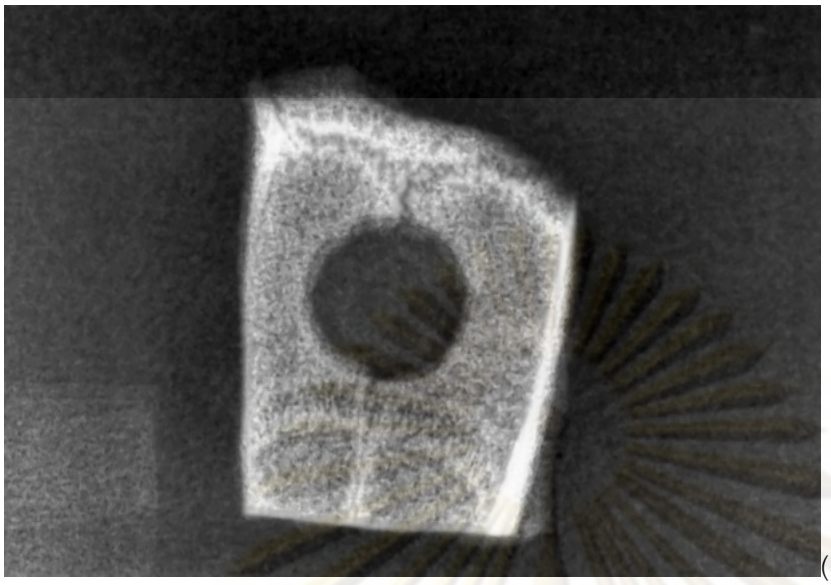
(CTRat No.15)



(digital Rat No.15)

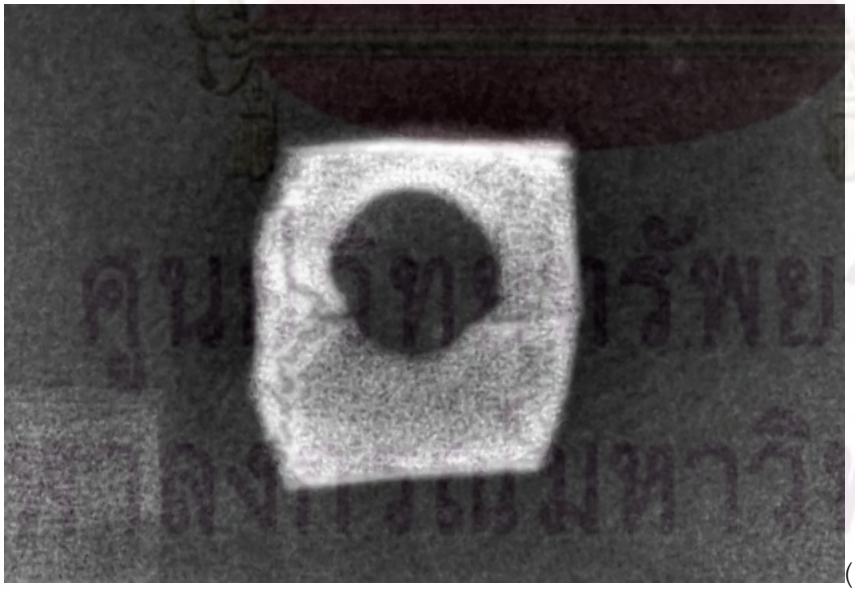
(CTRat No.16)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

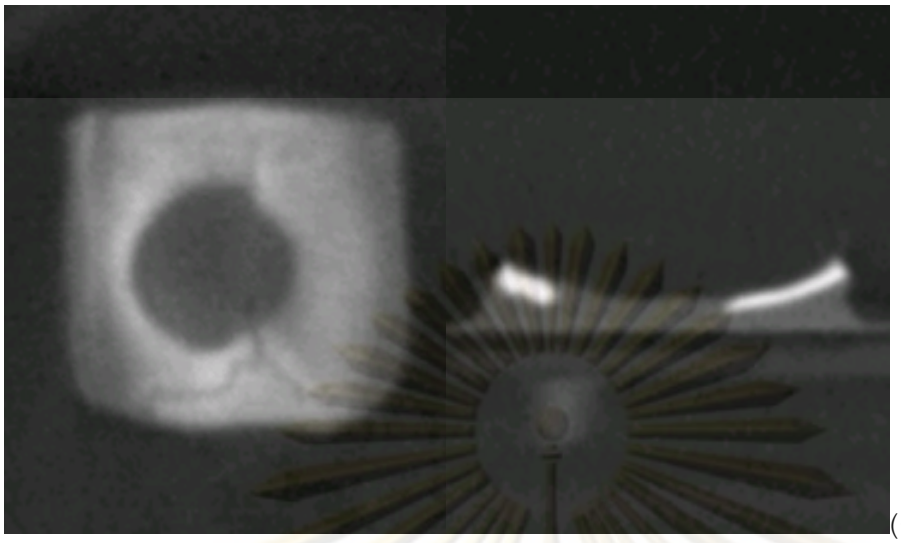


(digitalRat No.16)

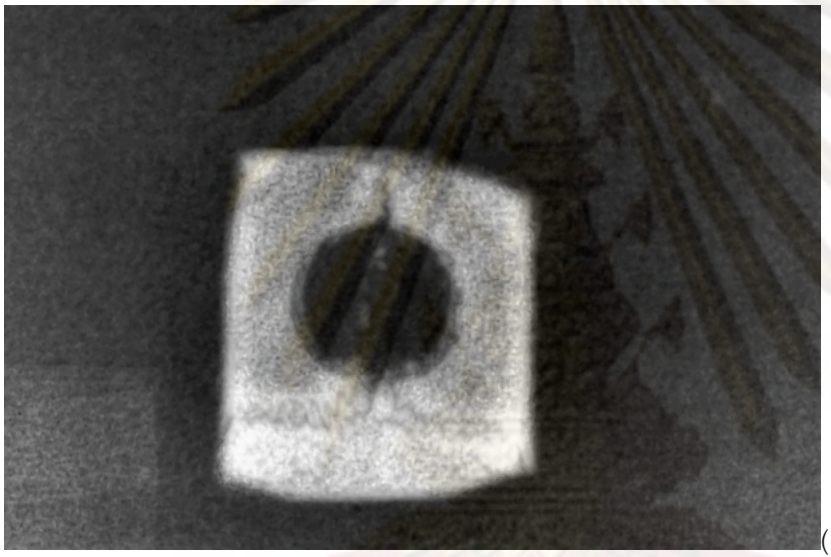
(CTRat No.17)



(digitalRat No.17)

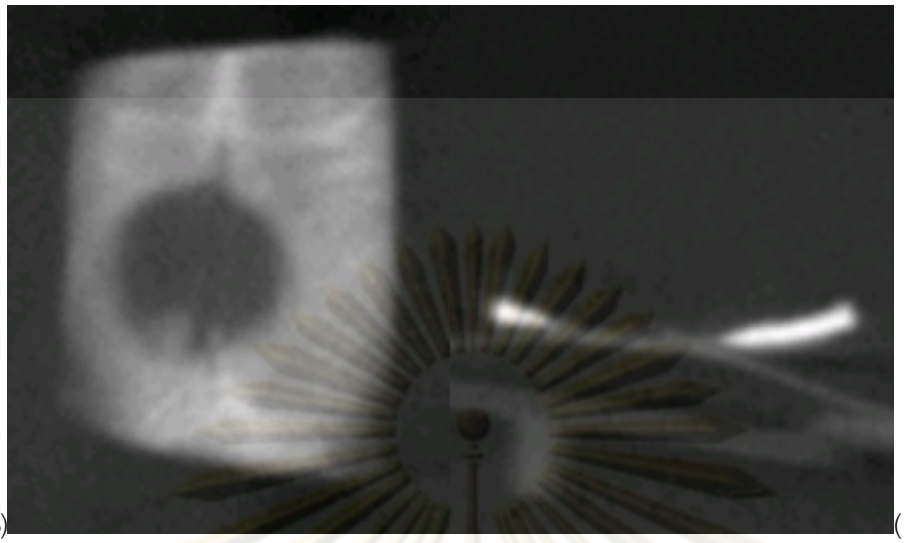


(CTRatNo.18)

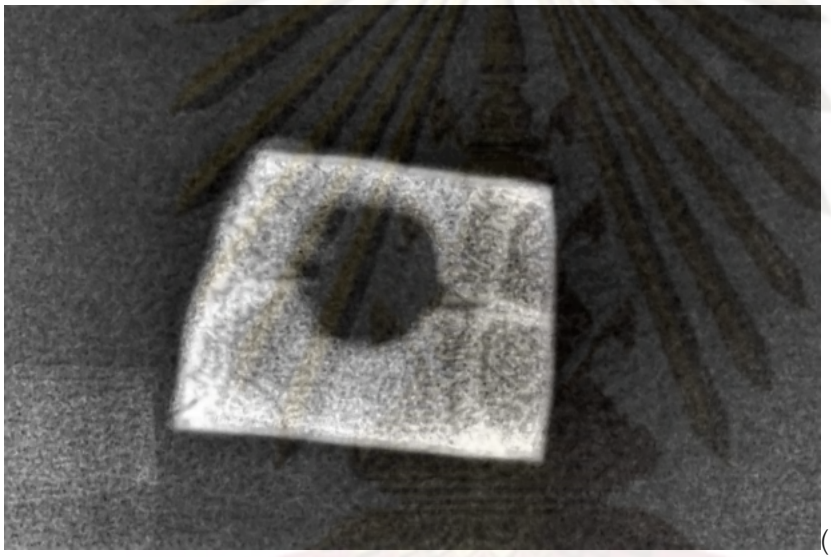


(digitalRat

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

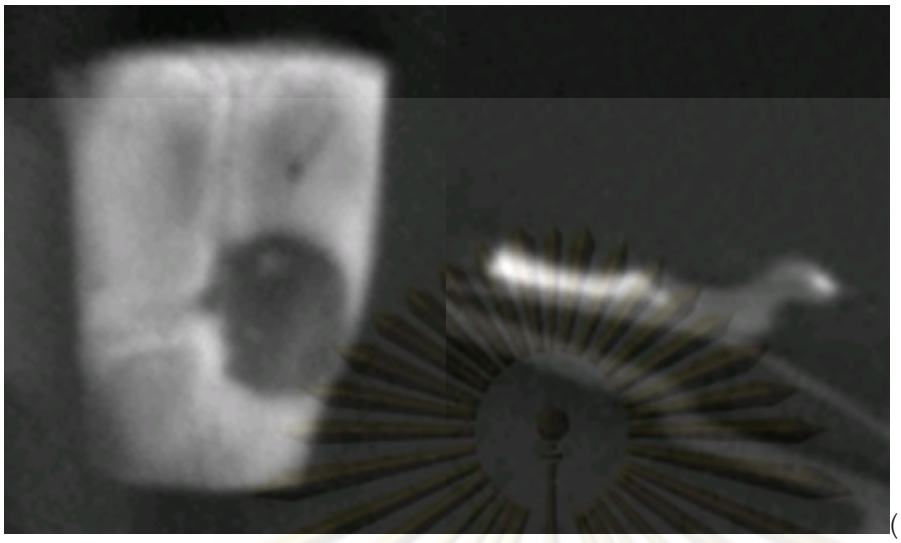


(CTRatNo.18)

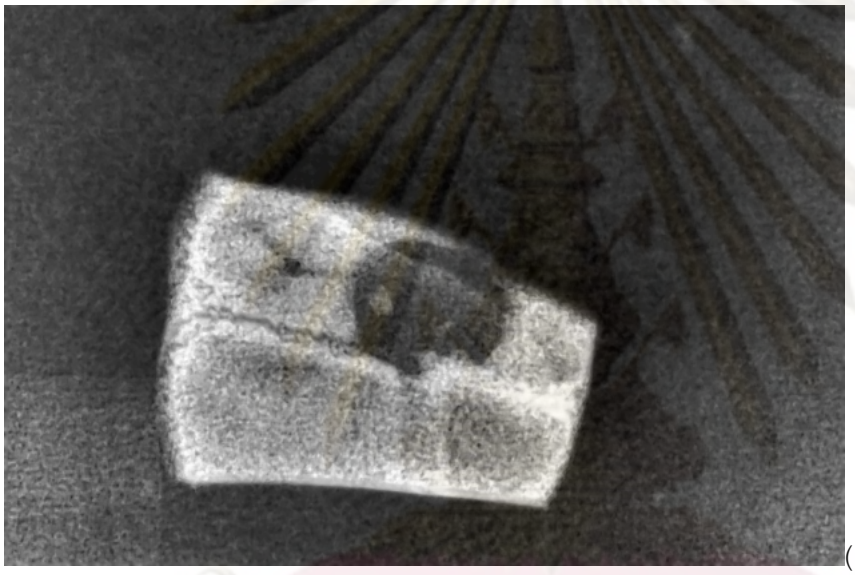


(digital Rat No.19)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



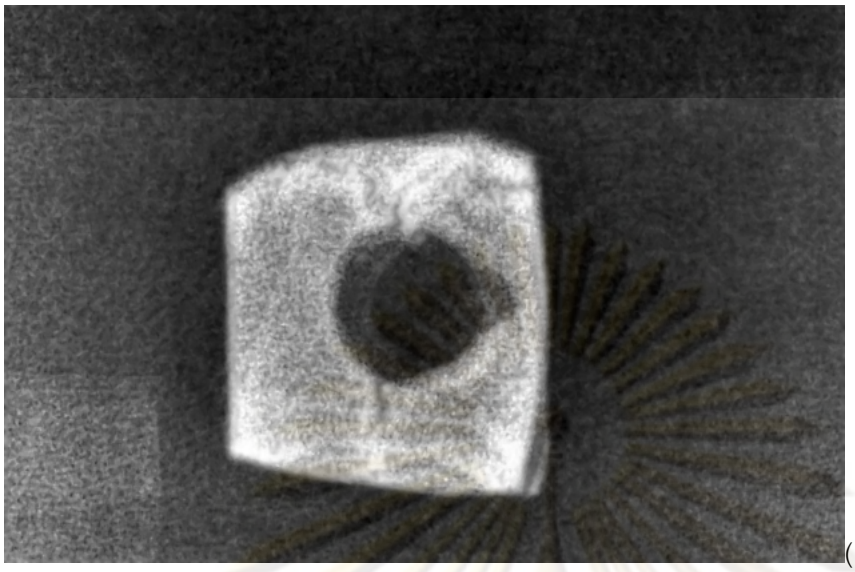
(CTRatNo.21)



(digitalRat No.21)

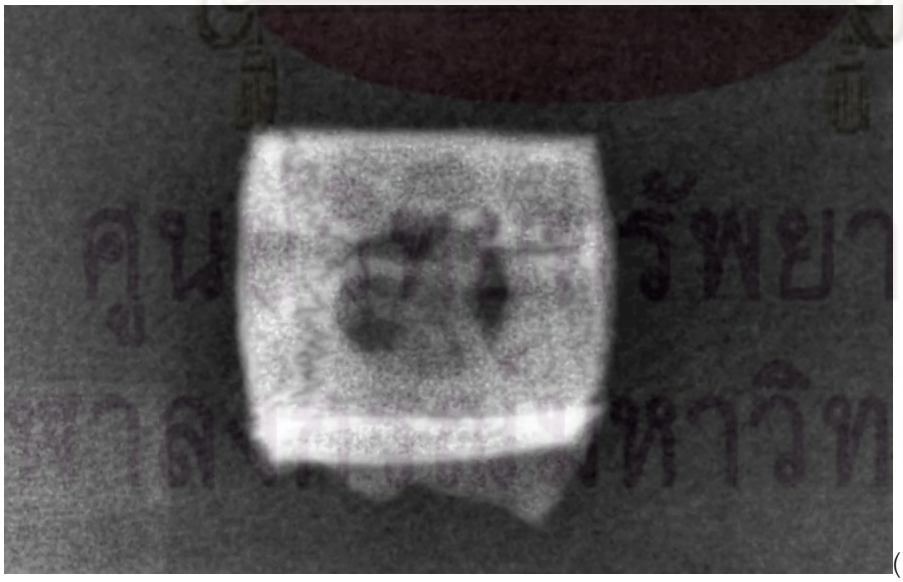
(CTRat No.22)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

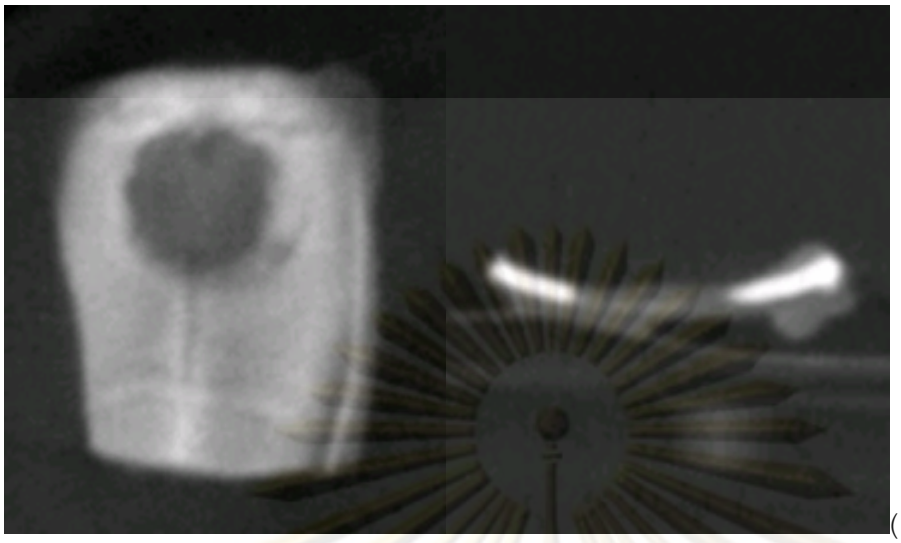


(digital Rat No.22)

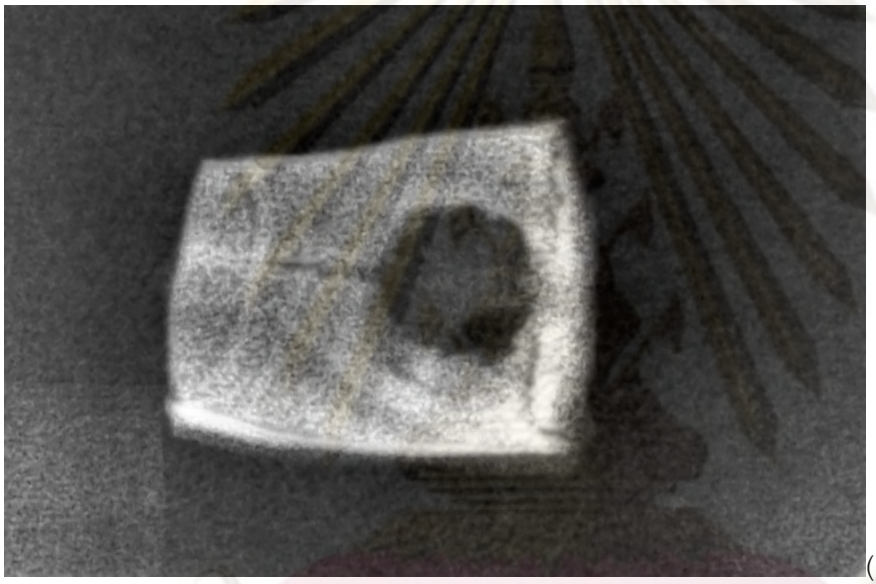
(CTRat No.23)



(digitalRat No.23)



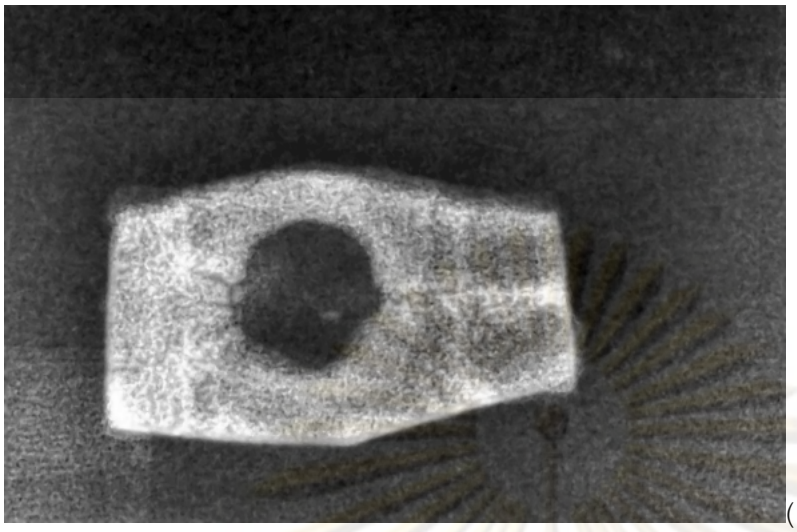
(CTRat No.24)



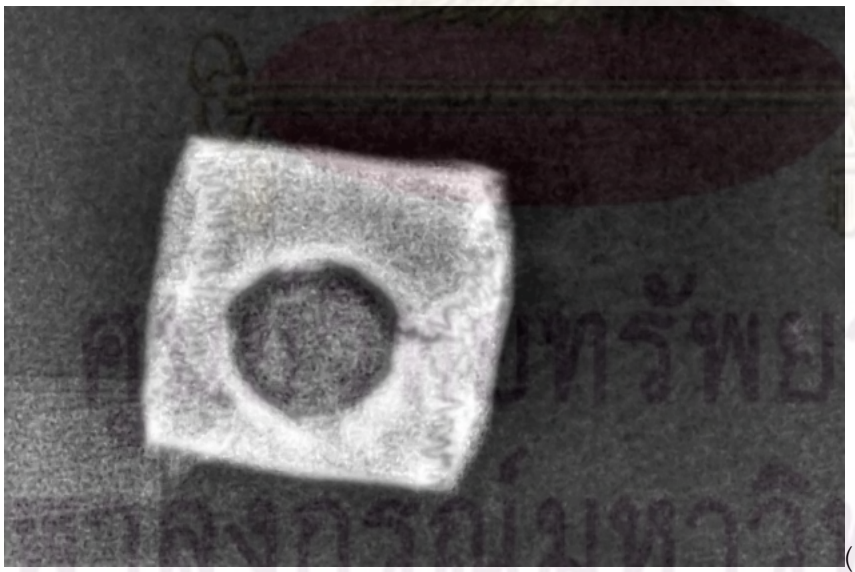
(digitalRat No.24)

(CTRat No.25)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


(digitalRat No.25)

(CT Rat No.29)


(digitalRat No.29)

ภาคผนวก ค ผลวิเคราะห์ทางจุลกายวิภาคศาสตร์

PATHOLOGICAL REPORT
HI-TECH PATH. LAB.

PATH NO. S-53-15803

Name งานวิจัย อ.ถนอม (No. 8) Age Sex

Clinic/Hospital HI-TECH LAB H.N.

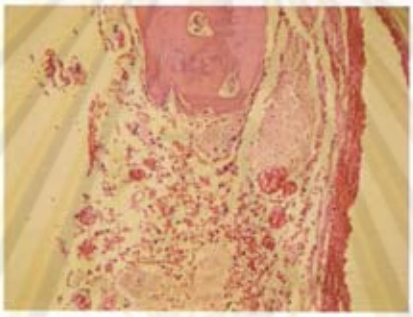
Attending physician น.พ. ถนอม บรรณประเสริฐ Date of operation

Clinical Hx: -

Date of specimen received: 19 February 2010.

Gross Examination: Received the specimen labeled as No.8 –PL.

Microscopic Examination: Section shows central space contain two pieces of lamellar bone embedded in fibrocollagenous stroma. Residual bone debries and thick band of collagen are noted. A piece of woven bone is noted (Figure)



Pathological Dx: ***Bone (No.8-PL):***

- **Presence of woven bone, residual bone debries**

Dr. Voranuch Thanakit
Pathologist

Date of report: 4 March 2010.
Printed by: Chanakant P.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PATHOLOGICAL REPORT
HI-TECH PATH. LAB.

PATH NO. S-53-15805

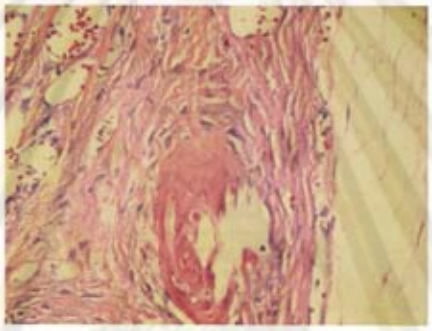
Name	งานวิจัย ธ.ถนอม (No. 10)	Age	Sex
Clinic/Hospital	HI-TECH LAB	H.N.	
Attending physician	น.พ. ถนอม บรรณประเสริฐ	Date of operation	

Clinical Hx: -

Date of specimen received: 19 February 2010.

Gross Examination: Received the specimen labeled as No.10-PL.

Microscopic Examination: Section of bone shows a central space contain foreign material engulfed by foreign type giant cells and underlying woven bone (Figure). Remaining stroma shows scattered lymphocytes infiltrates.



Pathological Dx: ***Bone (No-10- PL):***

- **Presence of woven bone**
- **Foreign material with foreign body reaction**

Dr. Voranuch Thanakit
Pathologist

Date of report: 4 March 2010.
Printed by: Chanakant P.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PATHOLOGICAL REPORT
HI-TECH PATH. LAB.

PATH NO. S-53-17205

Name	งานวิจัย อ.ถนอม (No. 23)	Age	Sex
Clinic/Hospital	HITECH LAB	H.N.	
Attending physician	น.พ. ถนอม บรรณประเสริฐ	Date of operation	

Clinical Hx: -

Date of specimen received: 4 March 2010.

Gross Examination: Received the specimen number 23-PL.

Microscopic Examination: Section shows cavity which contains woven bone and lamellar bone (Figure A, B). There are scattered chronic inflammatory cells infiltrates.

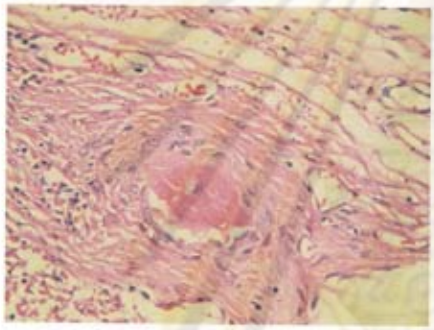


Fig.A

Fig.B

Pathological Dx: ***Specimen number 23-PL:***
- New bone formation

Dr. Voranuch Thanakit
Pathologist

Date of report: 9 March 2010.
Printed by: Chanakant P.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PATHOLOGICAL REPORT
HI-TECH PATH. LAB.

PATH NO. S-53-15800

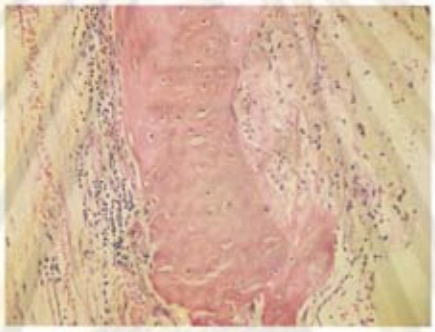
Name	งานวิจัย อ.ถนอม (No. 3)	Age	Sex
Clinic/Hospital	HI-TECH LAB	H.N.	
Attending physician	น.พ. ถนอม บรรณประเสริฐ	Date of operation	

Clinical Hx: -

Date of specimen received: 19 February 2010.

Gross Examination: Received the specimen labeled as No.3 - PL.

Microscopic Examination: Section of bone show cavity contain foreign material engulfed by foreign type giant cells, residual bone debries, and a piece of woven bone surrounded by lymphocytes (Figure).



Pathological Dx: ***Bone (No.3-PL):***

- **Presence of a woven bone, residual of foreign material with foreign body reaction, and residual bone debries**

Dr. Voranuch Thanakit
Pathologist

Date of report: 4 March 2010.
Printed by: Chanakant P.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PATHOLOGICAL REPORT
HI-TECH PATH. LAB.

PATH NO. S-53-17206

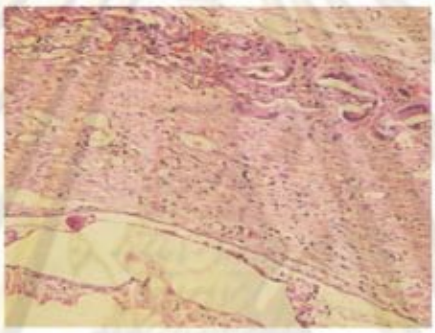
Name	งานวิจัย อ.ถนอม (No. 24)	Age	Sex
Clinic/Hospital	HITECH LAB	H.N.	
Attending physician	น.พ. ถนอม บรรณประเสริฐ	Date of operation	

Clinical Hx: -

Date of specimen received: 4 March 2010.

Gross Examination: Received the specimen number 24- SM

Microscopic Examination: Section shows cavity which contains bone debries, porous material encased by foreign type giant cells (Figure). No evidence of new bone formation is seen.



Pathological Dx: Specimen number 24-SM:

- No evidence of new bone formation

Dr. Voranuch Thanakit
Pathologist

Date of report: 9 March 2010.
Printed by: Chanakant P.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PATHOLOGICAL REPORT
HI-TECH PATH. LAB.

PATH NO. S-53-15798

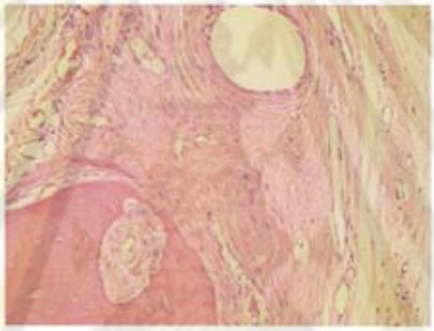
Name	งานวิจัย อ.ถนอม (No. 1)	Age	Sex
Clinic/Hospital	HI-TECH LAB	H.N.	
Attending physician	น.พ. ถนอม บรรณประเสริฐ	Date of operation	19/2/2010

Clinical Hx: -

Date of specimen received: 19 February 2010.

Gross Examination: Received the specimen labeled as No.1 (SM).

Microscopic Examination: Section shows bony trabeculae with cavity contain foreign material encased by histiocytes and foreign type giant cells (Figure). No evidence of new bone formation is seen.



Pathological Dx: Bone (Specimen1- SM):

- **No evidence of new bone formation**

Dr. Voranuch Thanakit
Pathologist

Date of report: 4 March 2010.
Printed by: Chanakant P.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PATHOLOGICAL REPORT
HI-TECH PATH. LAB.

PATH NO. S-53-17198

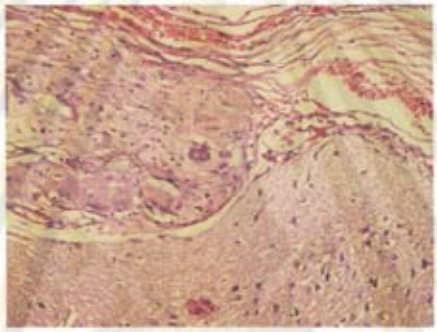
Name	งานวิจัย อ.ถนอม (No. 15)	Age	Sex
Clinic/Hospital	HITECH LAB	H.N.	
Attending physician	น.พ. ถนอม บรรณประเสริฐ	Date of operation	

Clinical Hx: -

Date of specimen received: 4 March 2010.

Gross Examination: Received the specimen number 15- SM.

Microscopic Examination: Section shows cavity contains acellular material, neuronal tissue, and foreign type giant cells (Figure). No evidence of new bone formation is seen.



Pathological Dx: Specimen number 15-SM:

- No evidence of new bone formation

Dr. Voranuch Thanakit
Pathologist

Date of report: 9 March 2010.
Printed by: Chanakant P.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

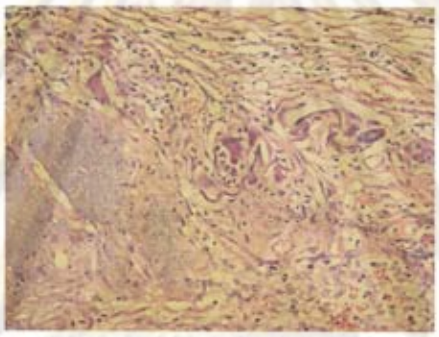
PATHOLOGICAL REPORT
HI-TECH PATH. LAB.

PATH NO. S-53-17197

Name	งานวิจัย อ.ถนอม (No. 14)	Age	Sex
Clinic/Hospital	HITECH LAB	H.N.	
Attending physician	น.พ. ถนอม บรรณประเสริฐ	Date of operation	

Clinical Hx: -

Date of specimen received: 4 March 2010.
Gross Examination: Received the specimen number14-SM.
Microscopic Examination: Section shows cavity contain acellular material engulfed by foreign type multinucleated giant cells (Figure). There are scattered lymphocytes, histiocytes, and plasma cells infiltrates in underlying fibroblastic stroma.



Pathological Dx: ***Specimen number 14-SM:***
- No evidence of new bone formation

Dr. Voranuch Thanakit
Pathologist

Date of report: 8 March 2010.
Printed by: Chanakant P.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PATHOLOGICAL REPORT
HI-TECH PATH. LAB.

PATH NO. S-53-15801

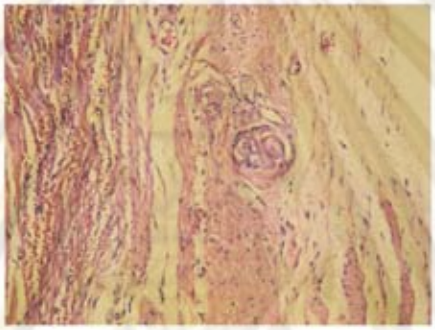
Name	งานวิจัย อ.ถนอม (No. 5)	Age	Sex
Clinic/Hospital	HI-TECH LAB	H.N.	
Attending physician	น.พ. ถนอม บรรณประเสริฐ	Date of operation	

Clinical Hx: -

Date of specimen received: 19 February 2010.

Gross Examination: Received a specimen labeled as No. 5 16/12/09 Collaplug.

Microscopic Examination: Section show residual of foreign material engulf by histiocytes in fibrovascular stroma (Figure). No evidence of new bone formation is noted.



Pathological Dx: ***Bone (No.5-collaplug):***

- **No evidence of new bone formation**
- **Presence of residual foreign material with foreign body reaction**

Dr. Voranuch Thanakit
Pathologist

Date of report: 4 March 2010.
Printed by: Chanakant P.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PATHOLOGICAL REPORT
HI-TECH PATH. LAB.

PATH NO. S-53-17194

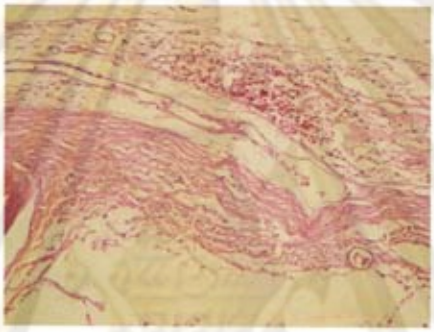
Name	งานวิจัย อ.ถนอม (No. 11)	Age	Sex
Clinic/Hospital	HITECH LAB	H.N.	
Attending physician	น.พ. ถนอม บรรณประเสริฐ	Date of operation	

Clinical Hx: -

Date of specimen received: 4 March 2010.

Gross Examination: Received the specimen labeled as 11- collaplug.

Microscopic Examination: Section shows cavity without evidence of new bone formation (Figure).



Pathological Dx: ***Specimen No.11 (Collaplug):***
- No evidence of new bone formation

Dr. Voranuch Thanakit
Pathologist

Date of report: 8 March 2010.
Printed by: Chanakant P.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PATHOLOGICAL REPORT
HI-TECH PATH. LAB.

PATH NO. S-53-15804

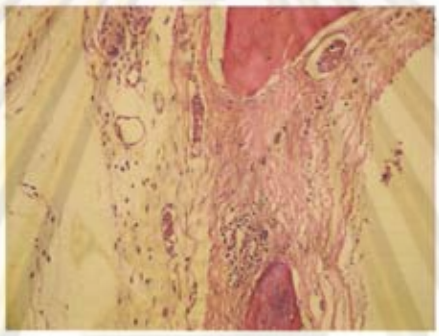
Name	งานวิจัย อ.ถนอม (No. 9)	Age	Sex
Clinic/Hospital	HI-TECH LAB	H.N.	
Attending physician	น.พ. ถนอม บรรณประเสริฐ	Date of operation	

Clinical Hx: -

Date of specimen received: 19 February 2010.

Gross Examination: Received the specimen labeled as No.9- Collaplug.

Microscopic Examination: Section shows no definite cavity. A focal area reveals foreign material engulfed by histiocytes (Figure).



Pathological Dx: ***Bone (No.9- collaplug):***

- **Presence of foreign material with foreign body reaction**

Dr. Voranuch Thanakit
Pathologist

Date of report: 4 March 2010.
Printed by: Chanakant P.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PATHOLOGICAL REPORT
HI-TECH PATH. LAB.

PATH NO. S-53-17203

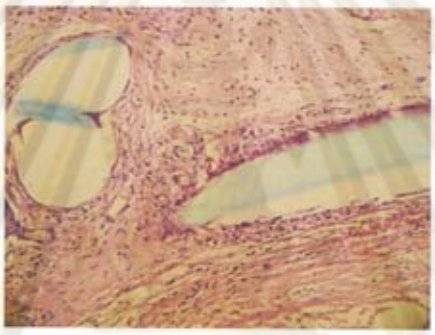
Name	งานวิจัย อ.ถนอม (No. 20)	Age	Sex
Clinic/Hospital	HITECH LAB	H.N.	
Attending physician	น.พ. ถนอม บรรณประเสริฐ	Date of operation	

Clinical Hx: -

Date of specimen received: 4 March 2010.

Gross Examination: Received the specimen number 21-collaplug.

Microscopic Examination: Section shows a cavity which contains foreign materials engulfed by foreign type giant cells (Figure). These are surrounded by mixed chronic inflammatory cells. No evidence of new bone formation is seen.



Pathological Dx: Specimen number 21-collaplug:

- No evidence of new bone formation

Dr. Voranuch Thanakit
Pathologist

Date of report: 9 March 2010.
Printed by: Chanakant P.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PATHOLOGICAL REPORT
HI-TECH PATH. LAB.

PATH NO. S-53-17204

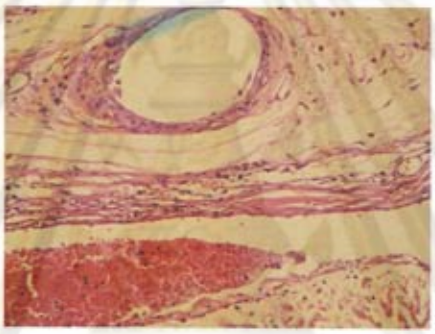
Name	งานวิจัย อ.ถนอม (No. 22)	Age	Sex
Clinic/Hospital	HITECH LAB	H.N.	
Attending physician	น.พ. ถนอม บรรณประเสริฐ	Date of operation	

Clinical Hx: -

Date of specimen received: 4 March 2010.

Gross Examination: Received the specimen number 22- SM/BP.

Microscopic Examination: Section shows cavity which contains foreign material engulfed by foreign body type giant cells (Figure). No evidence of new bone formation is seen.



Pathological Dx: ***Specimen number 22-SM/BP:***

- No evidence of new bone formation

Dr. Voranuch Thanakit
Pathologist

Date of report: 9 March 2010.
Printed by: Chanakant P.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PATHOLOGICAL REPORT
HI-TECH PATH. LAB.

PATH NO. S-53-17208

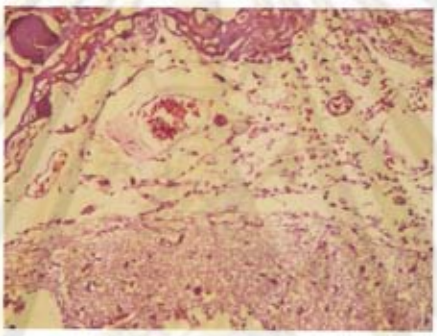
Name	งานวิจัย อ.ถนอม (No. 29)	Age	Sex
Clinic/Hospital	HITECH LAB	H.N.	
Attending physician	น.พ. ถนอม บรรณประเสริฐ	Date of operation	

Clinical Hx: -

Date of specimen received: 4 March 2010.

Gross Examination: Received the specimen number 29-SM/BP.

Microscopic Examination: Section shows cavity which contains neuronal tissue, bone debries with foreign body type giant cells. No evidence of new bone formation is seen.



Pathological Dx: Specimen number 29-SM/BP:

- No evidence of new bone formation

Dr. Voranuch Thanakit
Pathologist

Date of report: 9 March 2010.
Printed by: Chanakant P.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PATHOLOGICAL REPORT
HI-TECH PATH. LAB.

PATH NO. S-53-15799

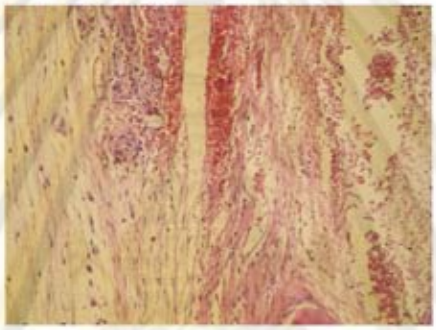
Name	งานวิจัย อ.ถนอม (No. 2)	Age	Sex
Clinic/Hospital	HI-TECH LAB	H.N.	
Attending physician	น.พ. ถนอม บรรณประเสริฐ	Date of operation	

Clinical Hx: -

Date of specimen received: 19 February 2010.

Gross Examination: Received the specimen number 2 labeled as SM/BP 40/60.

Microscopic Examination: Section shows cavity contain foreign material engulfed by histiocytes in fibrogranulation tissue (Figure). Residual bone debries are noted. No evidence of new bone formation is seen.



Pathological Dx: ***Bone (SM/BP 40/60):***

- **Foreign body material with foreign body reaction**
- **No evidence of new bone formation**

Dr. Voranuch Thanakit
Pathologist

Date of report: 4 March 2010.
Printed by: Chanakant P.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PATHOLOGICAL REPORT
HI-TECH PATH. LAB.

PATH NO. S-53-17200

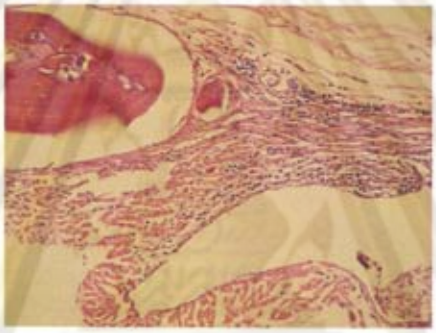
Name	งานวิจัย อ.ถนอม (No. 17)	Age	Sex
Clinic/Hospital	HITECH LAB	H.N.	
Attending physician	น.พ. ถนอม บรรณประเสริฐ	Date of operation	

Clinical Hx: -

Date of specimen received: 4 March 2010.

Gross Examination: Received the specimen number 17-SM/BP

Microscopic Examination: Sections show cavity which contains two fragment of lamellar bone surrounded by chronic inflammatory cells (Figure). No evidence of new bone formation is seen.



Pathological Dx: ***Specimen number 17-SM/BP:***

- No evidence of new bone formation

Dr. Voranuch Thanakit
Pathologist

Date of report: 9 March 2010.
Printed by: Chanakant P.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PATHOLOGICAL REPORT
HI-TECH PATH. LAB.

PATH NO. S-53-15802

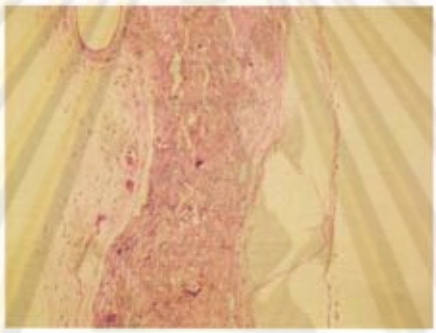
Name	งานวิจัย อ.ถนอม (No. 7)	Age	Sex
Clinic/Hospital	HI-TECH LAB	H.N.	
Attending physician	น.พ. ถนอม บรรณประเสริฐ	Date of operation	

Clinical Hx: -

Date of specimen received: 19 February 2010.

Gross Examination: Received the specimen labeled as No. 7 (PL/BP 40/60).

Microscopic Examination: Section of bone show cavity contain residual bone debries engulfed by foreign type giant cells. Porous is surrounded by thick band of collagen and histiocytes and foreign type giant cells. No evidence of new bone formation is noted (Figure).



Pathological Dx: ***Bone (No.7- PL/BP):***

- **No evidence of new bone formation**
- **Presence of residual bone debreis, foreign material with foreign body reaction**

Dr. Voranuch Thanakit
Pathologist

Date of report: 4 March 2010.
Printed by: Chanakant P.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PATHOLOGICAL REPORT
HI-TECH PATH. LAB.

PATH NO. S-53-17207

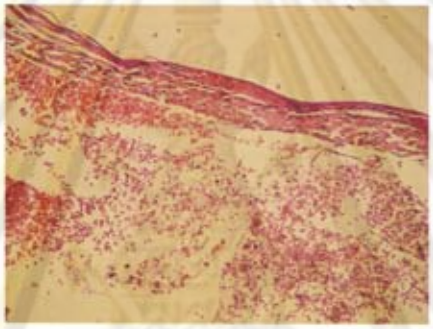
Name	งานวิจัย อ.ถนอม (No. 25)	Age	Sex
Clinic/Hospital	HITECH LAB	H.N.	
Attending physician	น.พ. ถนอม บรรณประเสริฐ	Date of operation	

Clinical Hx: -

Date of specimen received: 4 March 2010.

Gross Examination: Received the specimen number 25-PL/BP.

Microscopic Examination: Section shows cavity which contains fibrous membrane (Figure). No evidence of new bone formation is seen.



Pathological Dx: Specimen number 25-PL/BP:

- No evidence of new bone formation

Dr. Voranuch Thanakit
Pathologist

Date of report: 9 March 2010.
Printed by: Chanakant P.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PATHOLOGICAL REPORT
HI-TECH PATH. LAB.

PATH NO. S-53-17199

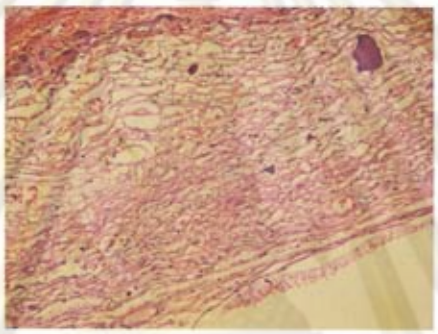
Name	งานวิจัย อ.ถนอม (No. 16)	Age	Sex
Clinic/Hospital	HITECH LAB	H.N.	
Attending physician	น.พ. ถนอม บรรณประเสริฐ	Date of operation	

Clinical Hx: -

Date of specimen received: 4 March 2010.

Gross Examination: Received the specimen number 16-PL/BP.

Microscopic Examination: Section shows cavity which contains porous material, foreign body type giant cells, and bone debries. No evidence of new bone formation is seen.



Pathological Dx: Specimen number 16- PL/BP:

- No evidence of new bone formation

Dr. Voranuch Thanakit
Pathologist

Date of report: 9 March 2010.
Printed by: Chanakant P.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PATHOLOGICAL REPORT
HI-TECH PATH. LAB.

PATH NO. S-53-17196

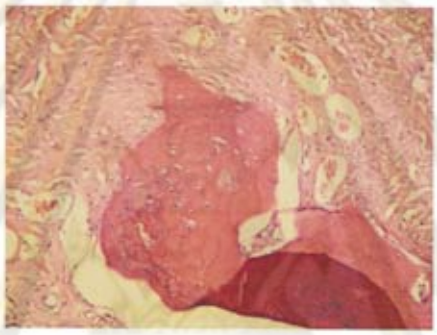
Name	งานวิจัย อ.ถนอม (No. 13)	Age	Sex
Clinic/Hospital	HITECH LAB	H.N.	
Attending physician	น.พ. ถนอม บรรณประเสริฐ	Date of operation	

Clinical Hx: -

Date of specimen received: 4 March 2010.

Gross Examination: Received the specimen number 13-PL/BP.

Microscopic Examination: Section shows cavity contain porous material, bone debreis, new collagen, and woven bone (Figure). There are scattered lymphocytes, histiocytes, and plasma cells infiltrates.



Pathological Dx: ***Specimen number 13-PL/BP***

- **Presence of new bone formation**
- **Porous material, bone debries, and new collagen**

Dr. Voranuch Thanakit
Pathologist

Date of report: 8 March 2010.
Printed by: Chanakant P.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PATHOLOGICAL REPORT
HI-TECH PATH. LAB.

PATH NO. S-53-17201

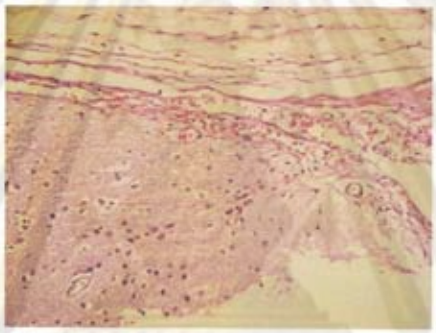
Name	งานวิจัย อ.ถนอม (No. 18)	Age	Sex
Clinic/Hospital	HITECH LAB	H.N.	
Attending physician	น.พ. ถนอม บรรณประเสริฐ	Date of operation	

Clinical Hx: -

Date of specimen received: 4 March 2010.

Gross Examination: Received the specimen number 18-Blank.

Microscopic Examination: Sections shows cavity which contains neuronal tissue, foreign material with engulfed by foreign type giant cells (Figure). No evidence of new bone formation is seen.



Pathological Dx: ***Specimen number 18- Blank:***

- No evidence of new bone formation

Dr. Voranuch Thanakit
Pathologist

Date of report: 9 March 2010.
Printed by: Chanakant P.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PATHOLOGICAL REPORT
HI-TECH PATH. LAB.

PATH NO. S-53-17195

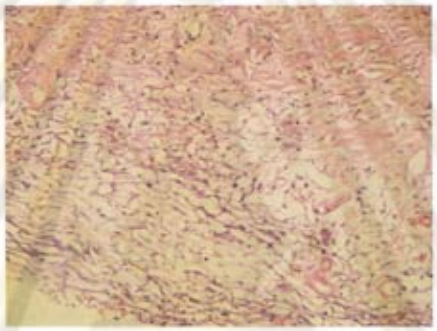
Name	งานวิจัย อ.ถนอม (No. 12)	Age	Sex
Clinic/Hospital	HITECH LAB	H.N.	
Attending physician	น.พ. ถนอม บรรณประเสริฐ	Date of operation	

Clinical Hx: -

Date of specimen received: 4 March 2010.

Gross Examination: Received the specimen number 12-blank.

Microscopic Examination: Section shows cavity contain porous material, bone debries, and new collagen (Figure). No evidence of new bone formation is noted.



Pathological Dx: ***Specimen number 12-blank:***

- **No evidence of new bone formation**
- **Porous material with new collagen**

Dr. Voranuch Thanakit
Pathologist

Date of report: 8 March 2010.
Printed by: Chanakant P.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PATHOLOGICAL REPORT
HI-TECH PATH. LAB.

PATH NO. S-53-17202

Name	งานวิจัย อ.ถนอม (No. 19)	Age	Sex
Clinic/Hospital	HITECH LAB	H.N.	
Attending physician	น.พ. ถนอม บรรณประเสริฐ	Date of operation	

Clinical Hx: -

Date of specimen received: 4 March 2010.

Gross Examination: Received the specimen number 19-Blank.

Microscopic Examination: Section shows a cavity which is lined by fibrous tissue and small blood vessel (Figure). No evidence of new bone formation is seen.

Pathological Dx: ***Specimen number 19-blank:***
- No evidence of new bone formation

Dr. Voranuch Thanakit
Pathologist

Date of report: 9 March 2010.
Printed by: Chanakant P.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง ตารางสถิติ

Crosstabs

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
group * histology	23	63.9%	13	36.1%	36	100.0%

group * histology Crosstabulation

Count

		histology		Total
		no new bone formantion	new bone formation present	
group	PL	0	4	4
	PB-BP	3	1	4
	Sigma	4	0	4
	Sigma-BP	4	0	4
	Colaplug	4	0	4
	blank	3	0	3
Total		18	5	23

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Crosstabs

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
group * radio, peripheral	23	63.9%	13	36.1%	36	100.0%

group * radio, peripheral Crosstabulation

Count

		radio, peripheral		Total
		no calcification	calcification	
group	PL	0	4	4
	PB-BP	2	2	4
	Sigma	3	1	4
	Sigma-BP	4	0	4
	Colaplug	0	4	4
	blank	3	0	3
Total		12	11	23

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Crosstabs

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
group * radio, center	23	63.9%	13	36.1%	36	100.0%

group * radio, center Crosstabulation

Count

		radio, center		Total
		no calcification	calcification	
group	PL	0	4	4
	PB-BP	3	1	4
	Sigma	4	0	4
	Sigma-BP	4	0	4
	Colaplug	4	0	4
	blank	3	0	3
Total		18	5	23

Crosstabs

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
PLandPLBP * histology	8	22.2%	28	77.8%	36	100.0%

PLandPLBP * histology Crosstabulation

Count

		histology		Total
		no new bone formantion	new bone formation present	
PLandPLBP	PL	0	4	4
	PL-BP	3	1	4
Total		3	5	8

Chi-Square Tests

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	4.800(b)	1	.028		
Continuity Correction(a)	2.133	1	.144		
Likelihood Ratio	6.086	1	.014		
Fisher's Exact Test				.143	.071
Linear-by-Linear Association	4.200	1	.040		
N of Valid Cases	8				

a Computed only for a 2x2 table

b 4 cells (100.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1.50.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Crosstabs

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
PLandSigma * histology	8	22.2%	28	77.8%	36	100.0%

PLandSigma * histology Crosstabulation

Count

		histology		Total
		no new bone formantion	new bone formation present	
PLandSigma	1	0	4	4
	2	4	0	4
Total		4	4	8

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	8.000(b)	1	.005		
Continuity Correction(a)	4.500	1	.034		
Likelihood Ratio	11.090	1	.001		
Fisher's Exact Test				.029	.014
Linear-by-Linear Association	7.000	1	.008		
N of Valid Cases	8				

a Computed only for a 2x2 table
b 4 cells (100.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2.00.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Crosstabs

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
PLandSigmaBP * histology	8	22.2%	28	77.8%	36	100.0%

PLandSigmaBP * histology Crosstabulation

Count

		histology		
		no new bone formantion	new bone formation present	Total
PLandSigmaBP	PL	0	4	4
	SigmaBP	4	0	4
Total		4	4	8

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	8.000(b)	1	.005		
Continuity Correction(a)	4.500	1	.034		
Likelihood Ratio	11.090	1	.001		
Fisher's Exact Test				.029	.014
Linear-by-Linear Association	7.000	1	.008		
N of Valid Cases	8				

a Computed only for a 2x2 table
b 4 cells (100.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2.00.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Crosstabs

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
PLColaplug * histology	8	22.2%	28	77.8%	36	100.0%

PLColaplug * histology Crosstabulation

Count

		histology		Total
		no new bone formantion	new bone formation present	
PLColaplug	PL	0	4	4
	Colaplug	4	0	4
Total		4	4	8

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	8.000(b)	1	.005		
Continuity Correction(a)	4.500	1	.034		
Likelihood Ratio	11.090	1	.001		
Fisher's Exact Test				.029	.014
Linear-by-Linear Association	7.000	1	.008		
N of Valid Cases	8				

a Computed only for a 2x2 table

b 4 cells (100.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2.00.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Crosstabs

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
PLBlank * histology	7	19.4%	29	80.6%	36	100.0%

PLBlank * histology Crosstabulation

Count

		histology		Total
		no new bone formantion	new bone formation present	
PLBlank	PL	0	4	4
	Blank	3	0	3
Total		3	4	7

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	7.000(b)	1	.008		
Continuity Correction(a)	3.512	1	.061		
Likelihood Ratio	9.561	1	.002		
Fisher's Exact Test				.029	.029
Linear-by-Linear Association	6.000	1	.014		
N of Valid Cases	7				

a Computed only for a 2x2 table
b 4 cells (100.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1.29.

Crosstabs

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
PLandPLBP * radio, center	8	22.2%	28	77.8%	36	100.0%

PLandPLBP * radio, center Crosstabulation

Count

		radio, center		
		no calcification	1	Total
PLandPLBP	PL	0	4	4
	PL-BP	3	1	4
Total		3	5	8

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	4.800(b)	1	.028		
Continuity Correction(a)	2.133	1	.144		
Likelihood Ratio	6.086	1	.014		
Fisher's Exact Test				.143	.071
Linear-by-Linear Association	4.200	1	.040		
N of Valid Cases	8				

a Computed only for a 2x2 table
b 4 cells (100.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1.50.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Crosstabs

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
PLandSigma * radio, center	8	22.2%	28	77.8%	36	100.0%

PLandSigma * radio, center Crosstabulation

Count

		radio, center		Total
		no calcification	1	
PLandSigma	PL	0	4	4
	Sigma	4	0	4
Total		4	4	8

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	8.000(b)	1	.005		
Continuity Correction(a)	4.500	1	.034		
Likelihood Ratio	11.090	1	.001		
Fisher's Exact Test				.029	.014
Linear-by-Linear Association	7.000	1	.008		
N of Valid Cases	8				

a Computed only for a 2x2 table
b 4 cells (100.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2.00.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Crosstabs

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
PLandSigmaBP * radio, center	8	22.2%	28	77.8%	36	100.0%

PLandSigmaBP * radio, center Crosstabulation

Count

		radio, center		Total
		no calcification	1	
PLandSigmaBP	PL	0	4	4
	SigmaBP	4	0	4
Total		4	4	8

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	8.000(b)	1	.005		
Continuity Correction(a)	4.500	1	.034		
Likelihood Ratio	11.090	1	.001		
Fisher's Exact Test				.029	.014
Linear-by-Linear Association	7.000	1	.008		
N of Valid Cases	8				

a Computed only for a 2x2 table

b 4 cells (100.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2.00.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Crosstabs

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
PLColaplug * radio, center	8	22.2%	28	77.8%	36	100.0%

PLColaplug * radio, center Crosstabulation

Count

		radio, center		Total
		no calcification	1	
PLColaplug	PL	0	4	4
	Colaplug	4	0	4
Total		4	4	8

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	8.000(b)	1	.005		
Continuity Correction(a)	4.500	1	.034		
Likelihood Ratio	11.090	1	.001		
Fisher's Exact Test				.029	.014
Linear-by-Linear Association	7.000	1	.008		
N of Valid Cases	8				

a Computed only for a 2x2 table
b 4 cells (100.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2.00.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Crosstabs

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
PLBlank * radio, center	7	19.4%	29	80.6%	36	100.0%

PLBlank * radio, center Crosstabulation

Count

		radio, center		Total
		no calcification	1	
PLBlank	PL	0	4	4
	Blank	3	0	3
Total		3	4	7

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	7.000(b)	1	.008		
Continuity Correction(a)	3.512	1	.061		
Likelihood Ratio	9.561	1	.002		
Fisher's Exact Test				.029	.029
Linear-by-Linear Association	6.000	1	.014		
N of Valid Cases	7				

a Computed only for a 2x2 table

b 4 cells (100.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1.29.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Crosstabs

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
PL and PL+BP * radio, peripheral	8	22.2%	28	77.8%	36	100.0%

PL and PL+BP * radio, peripheral Crosstabulation

Count

		radio, peripheral		Total
		no calcification	calcification	
PLandPLBP	PL	0	4	4
	PL-BP	2	2	4
Total		2	6	8

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	2.667(b)	1	.102		
Continuity Correction(a)	.667	1	.414		
Likelihood Ratio	3.452	1	.063		
Fisher's Exact Test				.429	.214
Linear-by-Linear Association	2.333	1	.127		
N of Valid Cases	8				

a Computed only for a 2x2 table

b 4 cells (100.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1.00.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Crosstabs

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
PLandSigma * radio, peripheral	8	22.2%	28	77.8%	36	100.0%

PLandSigma * radio, peripheral Crosstabulation

Count

		radio, peripheral		Total
		no calcification	calcification	
PLandSigma	PL	0	4	4
	Sigma	3	1	4
Total		3	5	8

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	4.800(b)	1	.028		
Continuity Correction(a)	2.133	1	.144		
Likelihood Ratio	6.086	1	.014		
Fisher's Exact Test				.143	.071
Linear-by-Linear Association	4.200	1	.040		
N of Valid Cases	8				

a Computed only for a 2x2 table
b 4 cells (100.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1.50.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Crosstabs

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
PLandSigmaBP * radio, peripheral	8	22.2%	28	77.8%	36	100.0%

PLandSigmaBP * radio, peripheral Crosstabulation

Count

		radio, peripheral		Total
		no calcification	calcification	
PLandSigmaBP	PL	0	4	4
	SigmaBP	4	0	4
Total		4	4	8

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	8.000(b)	1	.005		
Continuity Correction(a)	4.500	1	.034		
Likelihood Ratio	11.090	1	.001		
Fisher's Exact Test				.029	.014
Linear-by-Linear Association	7.000	1	.008		
N of Valid Cases	8				

a Computed only for a 2x2 table

b 4 cells (100.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2.00.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Crosstabs

Warnings

No measures of association are computed for the crosstabulation of PLColaplug * radio, peripheral. At least one variable in each 2-way table upon which measures of association are computed is a constant.

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
PLColaplug * radio, peripheral	8	22.2%	28	77.8%	36	100.0%

PLColaplug * radio, peripheral Crosstabulation

Count

		radio, peripheral	Total
		calcification	
PLColaplug	PL	4	4
	Colaplug	4	4
Total		8	8

Chi-Square Tests

	Value
Pearson Chi-Square	.(a)
N of Valid Cases	8

a No statistics are computed because radio, peripheral is a constant.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Crosstabs

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
PLBlank * radio, peripheral	7	19.4%	29	80.6%	36	100.0%

PLBlank * radio, peripheral Crosstabulation

Count

		radio, peripheral		Total
		no calcification	calcification	
PLBlank	PL	0	4	4
	Blank	3	0	3
Total		3	4	7

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	7.000(b)	1	.008		
Continuity Correction(a)	3.512	1	.061		
Likelihood Ratio	9.561	1	.002		
Fisher's Exact Test				.029	.029
Linear-by-Linear Association	6.000	1	.014		
N of Valid Cases	7				

a Computed only for a 2x2 table
b 4 cells (100.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1.29.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ทันตแพทย์ อดิศร หาญวรวงศ์ จบการศึกษาจากคณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2543 ใช้ทุนที่โรงพยาบาลตะกั่วทุ่ง จังหวัดพังงา หลังจากลาออกจากราชการ ได้ไปทำงานเป็นทันตแพทย์ประจำที่ โรงพยาบาลเมืองสมุทร จังหวัดสมุทรปราการ และเปิดคลินิกส่วนตัว

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย