

ความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกของลำไส้เล็กหมูชั้นสับมิวโคซา
และเนื้อกระดูกที่ผ่านการลดปริมาณเกลือแร่



นางสาวปิยนุช บำรุงพณิชถาวร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

OSTEOINDUCTIVE POTENTIAL OF PORCINE SMALL INTESTINAL SUBMUCOSA
AND DEMINERALIZED BONE MATRIX

Ms. Piyanuch Bumrunghanichthaworn

สถาบันวิทยบริการ

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Biochemistry

Department of Biochemistry

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2008

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกของ
ลำไส้เล็กหนูชั้นสืบมิวโคซาและเนื้อกระดูกที่ผ่านการลด
ปริมาณเกลือแร่

โดย

นางสาวปิยนุช บำรุงพณิชถาวร

สาขาวิชา

ชีวเคมีทางการแพทย์

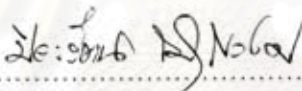
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

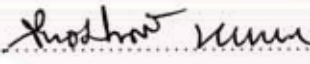
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ สิทธิศักดิ์ ธรรมชาติ

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต


..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ อดิศร ภัทราตุลย์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ปิยะรัตน์ ไตสุโขวงศ์)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ สิทธิศักดิ์ ธรรมชาติ)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. พูลลภ ชีพสุนทร)


..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. กอบธัม สติรกุล)

ปริญญ บำรุงพนิชดาวร : ความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกของลำไส้เล็ก
 หมูชั้นลำไส้มิวโคซาและเนื้อกระดูกที่ผ่านการลดปริมาณเกลือแร่ (Osteoinductive
 Potential of Porcine Small Intestinal Submucosa and Demineralized Bone Matrix)
 อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ.นพ. สิทธิศักดิ์ นรธาเวก, 100 หน้า.

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงความสามารถของลำไส้เล็กหมูชั้นลำไส้มิวโคซา
 (small intestinal submucosa; SIS) และเนื้อกระดูกที่ผ่านการลดปริมาณเกลือแร่
 (demineralized bone matrix; DBM) ในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูก โดยทำการแยกเซลล์
 ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก 7 วัน หลังจากทำการเพาะเลี้ยงขึ้นเยื่อหุ้มกระดูกพบเซลล์ลักษณะ
 คล้าย fibroblasts เรียงตัวอยู่โดยรอบ จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ทำการวิเคราะห์ความสามารถของ
 กระดูกที่ผ่านการลดปริมาณเกลือแร่ และลำไส้เล็กของหมูชั้นลำไส้มิวโคซาต่อการเจริญเพิ่มจำนวน
 เซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกด้วย trypan blue staining assay พบว่าหลังจากกระตุ้นด้วย
 SIS มีการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์เพิ่มขึ้นที่ปริมาณ 5 และ 10 มิลลิกรัม และในกลุ่มที่กระตุ้น
 ด้วย DBM หรือ SIS ผสมกับ DBM พบว่ามีการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ
 ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้น (กลุ่มควบคุม) จากนั้นทำการวิเคราะห์การ
 แสดงออกของยีนที่บ่งชี้ถึงการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก เช่น ยีน Runx2-related
 transcription factor 2 (RUNX2) ยีน alkaline phosphates (ALP) และยีน collagen type I
 (COL I) เป็นต้น ด้วยวิธี RT-PCR พบว่ามีการแสดงออกของยีน RUNX2 COL I และ ALP ในกลุ่ม
 ที่กระตุ้นด้วย DBM และ DBM ผสมกับ SIS ในการศึกษาความสามารถการพัฒนาเปลี่ยนแปลง
 ของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกไปเป็นเซลล์กระดูกด้วยวิธี alkaline phosphatase assay
 พบว่าในกลุ่มที่กระตุ้นด้วย DBM ผสมกับ SIS มีระดับการทำงานของเอนไซม์ ALP เพิ่มสูงขึ้นกว่า
 กลุ่มอื่น การวิเคราะห์ความสามารถของ DBM, SIS และ DBM ผสมกับ SIS ในการกระตุ้นให้เกิด
 การสร้างกระดูกใหม่ในสัตว์ทดลอง (Wistar rat) พบว่า DBM และ DBM ผสมกับ SIS
 มีความสามารถในการกระตุ้นให้มีการสร้างกระดูกใหม่เกิดขึ้น ส่วนในกลุ่มที่กระตุ้นด้วย
 SIS พบว่าไม่มีการสร้างกระดูก

ภาควิชา.....ชีวเคมี..... ลายมือชื่อนิสิต.....ปริญญ บำรุงพนิชดาวร.....
 สาขาวิชา.....ชีวเคมีทางการแพทย์..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....*Artho Kan*
 ปีการศึกษา.....2551

507 4799430 : MAJOR MEDICAL BIOCHEMISTRY

KEYWORDS : Demineralized bone matrix / Small intestinal submucosa / Bone formation / Osteoblast differentiation / Mesenchymal stem cell

Piyanuch Bumrungrpanichthaworn: Osteoinductive Potential of Porcine Small Intestinal Submucosa and Demineralized Bone Matrix.

ADVISOR : Asst.Prof. Sittisak Honsawek, Ph.D, M.D., 100 pp.

The objective of this research was to study osteoinductive potential of porcine small intestinal submucosa and demineralized bone matrix. We analyzed the effects of demineralized bone matrix (DBM) and porcine small intestinal submucosa (SIS) on proliferation of periosteal derived stem cells using Tryphan blue staining assay. The results showed that SIS exhibited highest proliferation at 5 and 10 mg. The cells treated with DBM or mixture (DBM + SIS) were significantly increased compared with controls ($p < 0.05$). Furthermore we analyzed gene expression of osteoblastic markers for osteoblast differentiation including runt-related transcription factor 2 (RUNX 2), collagen type I (COL I) and alkaline phosphatase (ALP) by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The results showed that the cells stimulated with DBM and mixture (DBM+SIS) highly expressed RUNX2 COL I and ALP. Then we studied osteoblast differentiation of periosteal derived stem cells treated with DBM, SIS and mixture (DBM + SIS) using alkaline phosphatase assay. The result showed that the cells stimulated with mixture (DBM+ SIS) had high ALP activity. Then we analyzed osteoinductive potentials of DBM, SIS and mixture (DBM + SIS) using in vivo animal (Wistar rat) bioassay. The result showed that DBM and mixture (DBM+SIS) had capability to induce new bone formation whereas SIS did not exhibit such capability.

Department : Biochemistry

Student's Signature *Piyanuch Bumrungrpanichthaworn*

Field of Study : Medical Biochemistry

Advisor's Signature *Sittisak Honsawek*

Academic Year : 2008

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สามารถเสร็จลุล่วงไปได้อย่างสมบูรณ์ ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากหลายฝ่าย

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ช่วยเหลือในทุกขั้นตอนของการทำวิทยานิพนธ์ ทั้งให้คำแนะนำ ให้คำสั่งสอน ตั้งแต่การรวบรวมข้อมูล การทดลอง การทำรูปเล่ม และการนำเสนอ

ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ปิยะรัตน์ ไตสุโขวงศ์ ที่ยินดีเป็นประธานสอบ

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. พูลลภ ชีพสุนทร และ รองศาสตราจารย์ ดร. กอบธัม สติรกุล ที่ยินดีเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ท่านอื่น ๆ ทั้งในและนอกภาควิชาชีวเคมีที่ช่วยประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ต่าง ๆ เพื่อเตรียมความพร้อมในการทำวิทยานิพนธ์อย่างมีคุณภาพ

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายธุรการทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือรอบด้าน เช่น การออกจดหมาย การจัดงาน การเตรียมสถานที่ การเบิกใช้สิ่งของต่าง ๆ เป็นต้น

ขอขอบพระคุณทุนการศึกษาระหว่างเรียนจากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้แก่ ทุนผู้ช่วยสอนและทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในศูนย์วิจัยคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ ความรู้ ตลอดจนคำแนะนำในการใช้อุปกรณ์วิจัยภายในศูนย์วิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอกราบขอบพระคุณสมาชิกทุกคนในครอบครัวที่ให้โอกาส และสนับสนุนในการศึกษาต่อในระดับปริญญาโท

ท้ายสุดนี้ขอบขอบคุณเพื่อน ๆ ทุกคนในระดับปริญญาโท และเพื่อน ๆ ในห้องทดลองทุกคน ที่คอยให้กำลังใจเสมอมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	4
ขอบเขตของการวิจัย.....	5
ข้อตกลงเบื้องต้น.....	6
ข้อจำกัดของการวิจัย.....	6
คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	6
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	6
วิธีดำเนินการวิจัย.....	7
ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย.....	8
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	9
แนวคิดและทฤษฎี.....	9
สเต็มเซลล์.....	9
กระดูกและองค์ประกอบของกระดูก.....	12
กระบวนการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูก.....	16
Alkaline phosphatase.....	17
Runt-related transcription factor 2.....	17
Transforming growth factor- β	17
Bone morphogenetic proteins.....	18

	หน้า
Polymerase Chain Reaction.....	19
Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction.....	20
การตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR.....	21
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	21
การศึกษาเกี่ยวกับ DBM ทั้งใน in vitro และ in vivo	21
การศึกษาเกี่ยวกับ SIS ทั้งใน in vitro และ in vivo	25
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	29
ประชากร.....	29
เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	29
วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	30
สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	31
การเก็บรวบรวมข้อมูล.....	33
การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ.....	33
การวิเคราะห์ข้อมูล.....	46
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	47
ผลการวิเคราะห์.....	47
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	67
สรุปผลการวิจัย.....	67
อภิปรายผลการวิจัย.....	68
ข้อเสนอแนะ.....	74
รายการอ้างอิง.....	75
ภาคผนวก.....	79
ภาคผนวก ก.....	80
ภาคผนวก ข.....	86
ภาคผนวก ค.....	88
ภาคผนวก ง.....	91
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	100

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	องค์ประกอบของ SIS และ DBM.....	2
2	ลำดับเบสของไฟรีเมอร์.....	39
3	องค์ประกอบ RT-PCR.....	40
4	สถานะในปฏิกิริยา RT-PCR.....	40
5	การหาค่า extinction coefficient ของ p-NP.....	42
6	การเตรียมสารละลายมาตรฐาน BSA (ในช่วงความเข้มข้น 5 - 250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร).....	43
7	ตารางที่ 7 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน BSA (ในช่วงความเข้มข้น 20 - 2,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร).....	44



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ความสามารถในการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงของสเต็มเซลล์ ชนิด totipotent stem cells และ ชนิด pluripotent stem cells.....	10
2	ความสามารถในการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงของสเต็มเซลล์ ชนิด multipotent stem cells.....	11
3	การเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดเนื้อประสานไปเป็น เซลล์กระดูก.....	11
4	โครงสร้างของกระดูก.....	12
5	ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยงกับการแสดงออกของ ยีนในการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก.....	16
6	hemocytometer ที่ใช้ในการนับจำนวนเซลล์.....	37
7	ลักษณะของ hemocytometer.....	37
8	ตำแหน่งที่ทำการฝังในสัตว์ทดลอง.....	45
9	ลักษณะของ (a) ลำไส้หนู (b) ลำไส้หนูชั้น muscularis externa (c) ลำไส้หนู ชั้น submucosa.....	47
10	ลักษณะของ SIS.....	48
11	ลักษณะของ DBM.....	48
12	เซลล์เจริญเพิ่มจำนวนเรียงตัวล้อมรอบเยื่อหุ้มกระดูก.....	49
13	ลักษณะเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก.....	49
14	ผลของ DBM ต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์.....	50
15	ผลของ SIS ต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์.....	51
16	ผลของ DBM ผสม SIS ต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์.....	52
17	การเปรียบเทียบการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก หลังจากกระตุ้นด้วย DBM, SIS และ DBM ผสมกับ SIS.....	53
18	การแสดงออกของยีน RUNX2 จากการทดสอบด้วยวิธี RT-PCR.....	54
19	ระดับการแสดงออกของยีน RUNX 2.....	55
20	การแสดงออกของยีน ALP จากการทดสอบด้วยวิธี RT-PCR	56

ภาพที่		หน้า
21	ระดับการแสดงออกของยีน ALP.....	56
22	การแสดงออกของยีน COL I จากการทดสอบด้วยวิธี RT-PCR	57
23	ระดับการแสดงออกของยีน COL I.....	58
24	ผลการกระตุ้นของ DBM ต่อการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็น เซลล์สร้างกระดูก.....	59
25	ผลการกระตุ้นของ SIS ต่อการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็น เซลล์สร้างกระดูก.....	60
26	ผลการกระตุ้นของ DBM ผสมกับ SIS ต่อการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็น เซลล์สร้างกระดูก.....	61
27	การเปรียบเทียบระดับแอกติวิตี้เอนไซม์ ALP หลังจากกระตุ้นด้วย DBM, SIS และ DBM ผสมกับ SIS.....	62
28	ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์หลังจากทำการฝังด้วย SIS เป็นเวลา 6 สัปดาห์...	64
29	ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์หลังจากทำการฝังด้วย DBM เป็นเวลา 6 สัปดาห์.	65
30	ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์หลังจากทำการฝังด้วย DBM ผสมกับ SIS เป็นเวลา 6 สัปดาห์.....	66

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันโรคหรือกลุ่มอาการต่าง ๆ ของกระดูกรวมทั้งความบกพร่องของกระดูกที่เกิดจากอุบัติเหตุมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นทุกปี เช่น กระดูกหัก กระดูกแห้วง เนื่องอกในกระดูกกระดูกติดเชื้อจากแบคทีเรีย เชื้อรา และวัณโรค เป็นต้น ทำให้เกิดความผิดปกติต่อร่างกายของผู้ป่วย ทั้งยังส่งผลเสียต่อการดำรงชีวิตในหลายด้านอีกด้วย ความบกพร่องของกระดูกที่เกิดขึ้นบางกรณีต้องใช้เวลาในการรักษาและซ่อมแซมกระดูกเป็นเวลานาน เซลล์สร้างกระดูกในผู้ป่วยสามารถสร้างได้จำกัด ทำให้กระดูกใหม่ที่เกิดขึ้นอาจไม่สมบูรณ์เหมือนกับกระดูกเดิม และกระดูกอาจไม่เชื่อมติดกัน กระดูกมีความสามารถในการซ่อมแซมอย่างจำกัด รวมถึงสภาวะของผู้ป่วยไม่ว่าจะเป็น เพศ อายุ การหมดประจำเดือน การขาดฮอร์โมน ทำให้ความสามารถในการสร้างกระดูกของผู้ป่วยแต่ละคนมากน้อยต่างกัน ในปัจจุบันได้มีการศึกษาค้นคว้าวิธีการรักษาความบกพร่องของกระดูก อาทิเช่น การใช้เทคโนโลยีทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก หรือแม้แต่การรักษาโดยการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อกระดูกมาใส่ทดแทนบริเวณที่มีการแห้วงหรือบกพร่องของกระดูก

ในปัจจุบันมีการศึกษาค้นคว้าวัสดุต่าง ๆ ได้แก่ วัสดุจากธรรมชาติ วัสดุที่ได้จากโพลิเมอร์สังเคราะห์เพื่อใช้ผลิตวัสดุทดแทน วัสดุที่ทำให้เกิดการกระตุ้นการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์สร้างกระดูก วัสดุที่มีความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก ทำให้มีการสร้างกระดูกใหม่ในบริเวณที่เกิดความภาวะผิดปกติต่าง ๆ ของกระดูก วัสดุที่ได้จากโพลิเมอร์สังเคราะห์ เช่น polyglycolic acid (PGA), polylactic acid (PLA), poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) เป็นต้น สำหรับวัสดุจากธรรมชาติ เช่น collagen, alginate, chitosan ได้มีการศึกษาถึงความสามารถในการนำมาใช้กระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดไปเป็นเซลล์ปลายทางของกระดูก โดยมีสารกระตุ้นการเจริญเปลี่ยนแปลงด้วยโปรตีน growth factors และ cytokines เช่น insulin-like growth factor (IGF), fibroblast growth factor (FGF), platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor- β (TGF- β), bone morphogenetic proteins (BMPs) เป็นต้น [1,2] ก่อนหน้านี้ได้มีการศึกษาถึงวัสดุทดแทนกระดูก demineralized bone matrix (DBM) หรือที่รู้จักกันดีว่าเป็นเนื้อเยื่อกระดูกที่ได้ผ่านกระบวนการลดปริมาณเกลือแร่ ซึ่งเป็นวัสดุที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นให้เกิดการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิด กระตุ้นให้เกิดการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลง

แปลงจากเซลล์ต้นกำเนิดไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก และมีการสร้างกระดูกใหม่ ส่วนวัสดุที่ได้จากธรรมชาติที่หาได้ง่าย และสะดวกในการนำมาประยุกต์ใช้ ได้แก่ porcine small intestinal submucosa (SIS) ซึ่งได้จากชั้นใต้เยื่อผิวของลำไส้เล็กหมู มีองค์ประกอบเป็น คอลลาเจน ชนิดที่ 1 และชนิดที่ 3 มากกว่า 90% และมี growth factors เช่น FGF, TGF- β , epidermal growth factor (EGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), IGF-1 และ glycosaminoglycans, fibronectin, chondroitin sulfates, hyaluronic acid, heparins, heparin sulfates เป็นต้น สารดังกล่าวมีผลในการกระตุ้นให้เกิดการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิด และกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันต่ำ นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการยึดเกาะของเซลล์ และมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดไปเป็นเซลล์ปลายทางได้ [1,2] และด้วยเหตุที่ว่า SIS เป็นวัสดุธรรมชาติที่สะดวกในการนำมาศึกษาทดลองและสามารถเตรียมได้ในปริมาณมากพอต่อการนำไปใช้ในการรักษาทางคลินิกได้ และจากการศึกษาก่อนหน้านี้ถึงคุณสมบัติของ DBM ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อกระดูกที่ได้รับการผ่านกระบวนการลดปริมาณเกลือแร่ที่อยู่ในกระดูก เช่น แคลเซียม ฟอสฟอรัส เป็นต้น แต่ยังคงมีองค์ประกอบของคอลลาเจน และโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจน (noncollagenous proteins) รวมทั้งโปรตีนต่างๆ เช่น growth factors และ bone morphogenetic proteins ซึ่งมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการเจริญเพิ่มจำนวน และชักนำการเจริญเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์สร้างกระดูก และเกิดการสร้างกระดูกใหม่

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของ SIS [1,2] และ DBM [3,4]

SIS	DBM
สารอินทรีย์ (Organic substance) Protein : Collgen type I, III, V Glycoprotein : Fibronectin	สารอนินทรีย์ (Inorganic substance) Calcium phosphate Magnesium Hydroxide Fluoride Sulfate

SIS	DBM
<p>Glycoaminoglycan :</p> <p>Heparin sulfate</p> <p>Hyaluronic acid</p> <p>Chondroitin sulfate A</p> <p>Dermatan sulfate</p> <p>Heparin</p> <p>Growth factor :</p> <p>Fibroblast growth factor-2 (FGF-2)</p> <p>Transforming growth factor-β (TGF-β)</p> <p>Vascular endothelial growth factor (VEGF)</p> <p>Insulin-like growth factor-1 (IGF-1)</p> <p>Epidermal growth factor (EGF)</p>	<p>สารอินทรีย์ (Organic substance)</p> <p>Protein :</p> <p>Collagen type I</p> <p>Phosphorylated glycoprotein :</p> <p>Osteopontin (bone sialoprotein 1)</p> <p>Bone sialoprotein 2</p> <p>Osteonectin</p> <p>Tetranectin</p> <p>Thrombospondin</p> <p>γ -Carboxyglutamic Acid :</p> <p>Osteocalcin</p> <p>Matrix Gla protein</p> <p>Glycosaminoglycan :</p> <p>Aggrecan</p> <p>Versican</p> <p>Decorin</p> <p>Biglycan</p> <p>Heparan sulfate</p> <p>Osteoglycan</p> <p>Fibromodolin</p> <p>Thrombomodulin</p> <p>Lumican</p> <p>Glycoprotein other :</p> <p>Fibrillin</p> <p>Vitronectin</p> <p>Tenascin</p> <p>Fibronectin</p> <p>Growth factor :</p> <p>Transforming growth factor-α, -β</p> <p>(TGF-α, -β)</p> <p>Platelet-derived growth factor (PDGF)</p>

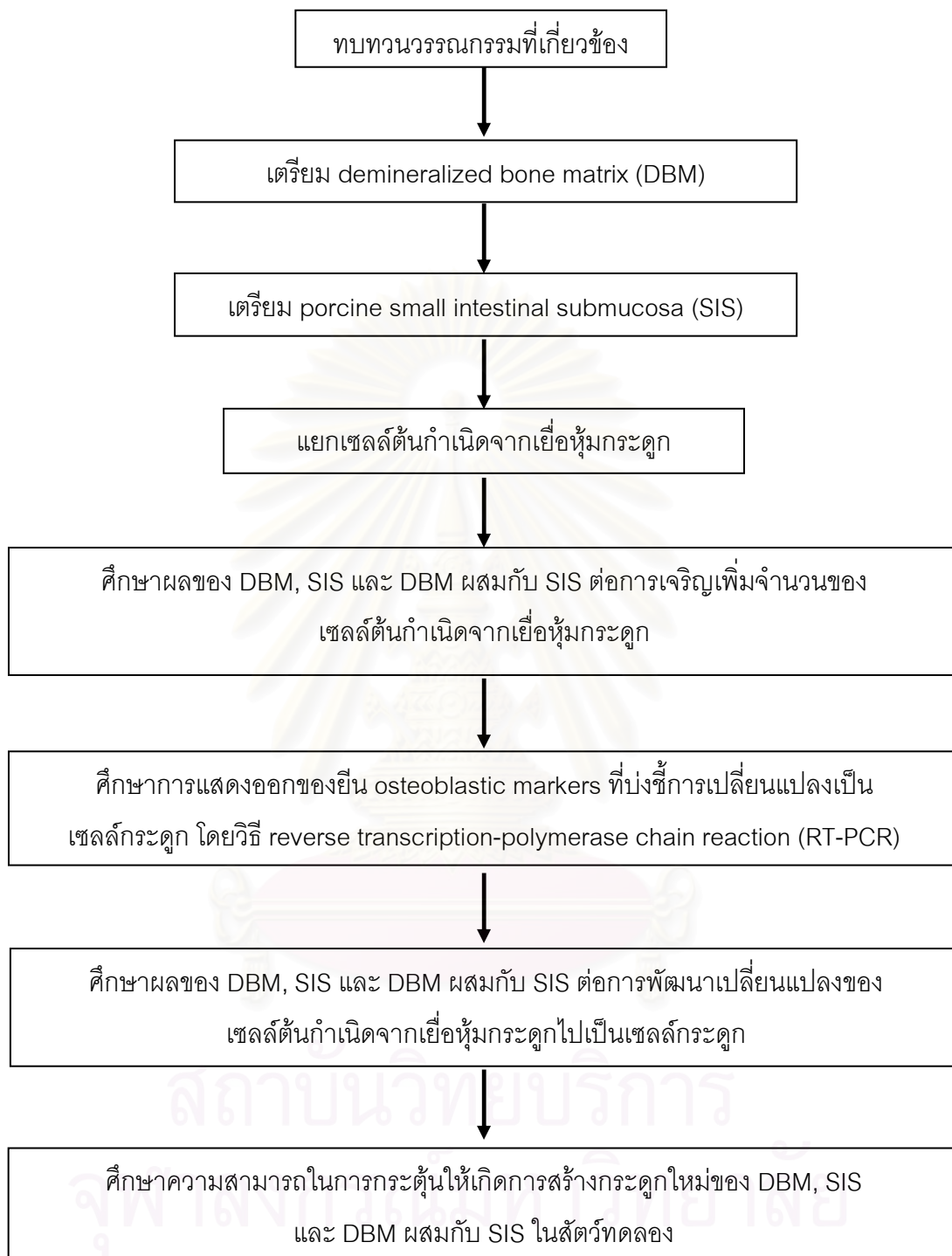
SIS	DBM
	Fibroblast growth factor (FGF) Epidermal growth factor (EGF) Bone morphogenetic protein-2, -7 (BMP-2, -7) Insulin-like growth factor-I, -II (IGF-I, -II)

จากการศึกษาที่ผ่านมาถึงความสามารถของ DBM ต่อการเจริญเพิ่มจำนวนและความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกมีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย สำหรับการศึกษาศักยภาพของ SIS และ SIS ผสมกับ DBM ต่อการกระตุ้นให้เซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกมีการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกยังพบอยู่น้อยมาก สำหรับการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก และความสามารถของ SIS ผสมกับ DBM ในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ในสัตว์ทดลองที่ผ่านมาข้อมูลน้อยมาก ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ผู้ทำวิจัยมีความสนใจถึงความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกของ SIS ผสมกับ DBM

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของ SIS และ DBM ต่อการกระตุ้นการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก
2. เพื่อศึกษาผลของ SIS และ DBM ต่อการกระตุ้นการพัฒนาเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกไปเป็นเซลล์กระดูก
3. เพื่อศึกษาการแสดงออกในระดับยีนที่ควบคุมการเจริญพัฒนาของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกไปเป็นเซลล์กระดูก โดยการกระตุ้นด้วย SIS และ DBM
4. เพื่อศึกษาความสามารถของ SIS และ DBM ในการชักนำกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ในสัตว์ทดลอง

ขอบเขตของการวิจัย



ข้อตกลงเบื้องต้น

1. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลองเป็นเครื่องมือที่ผ่านการทดสอบความเที่ยงตรงและความแม่นยำตามมาตรฐานของเครื่องมือชนิดนั้น ๆ
2. ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยให้ความร่วมมือด้วยความเต็มใจตลอดการศึกษาวิจัยโดยมีการลงลายมือชื่อในเอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยด้วยความเต็มใจและรับทราบคำชี้แจงในทุกเรื่องก่อนเข้าร่วมโครงการ

ข้อจำกัดของการวิจัย

ไม่มี

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

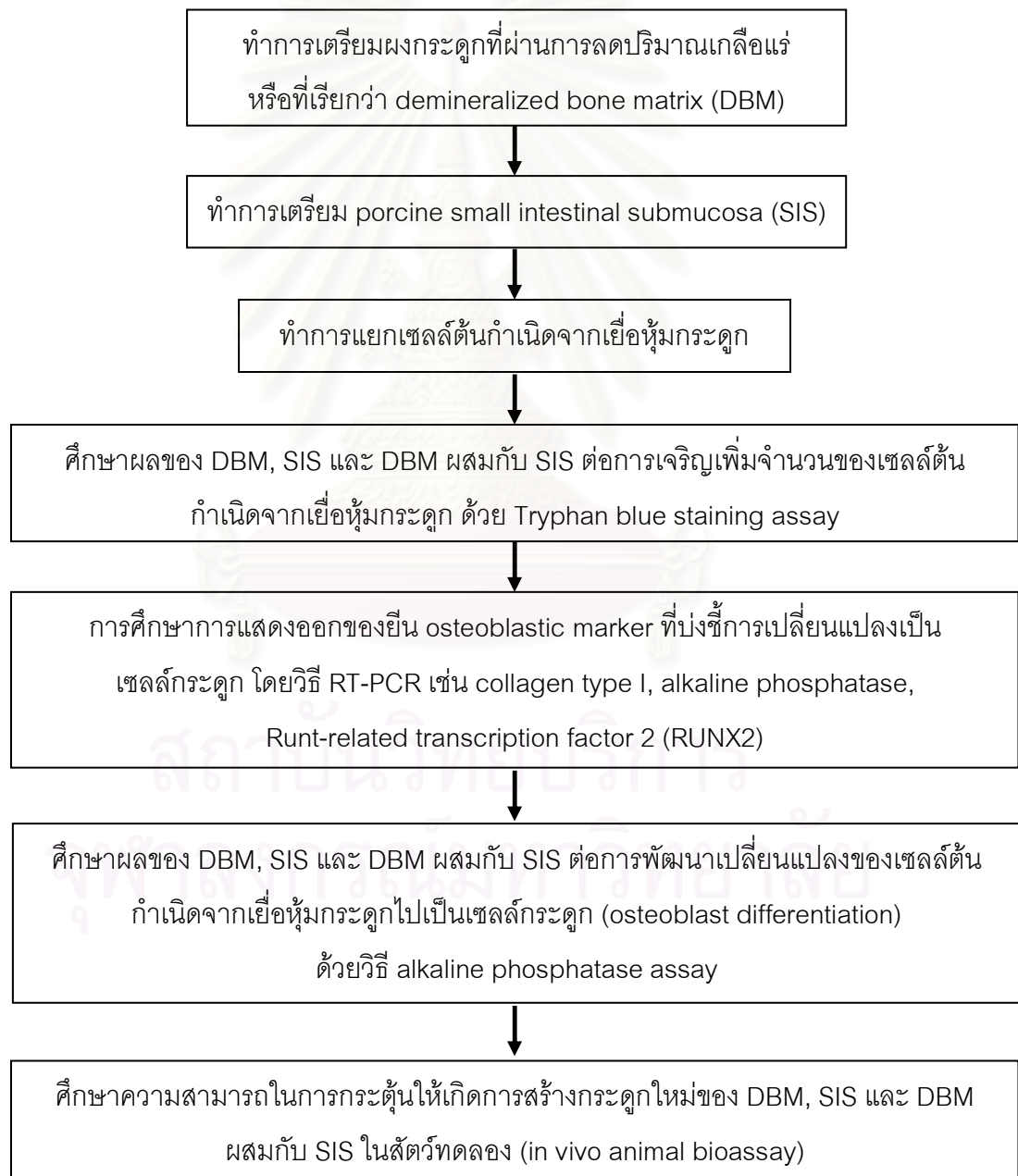
1. Demineralized bone matrix คือ เนื้อกระดูกที่ผ่านการลดปริมาณเกลือแร่
2. Porcine small intestinal submucosa คือ ลำไส้หมูชั้นใต้เยื่อบุผิวลำไส้ ที่ได้ทำการลอกชั้น เยื่อบุผิว ชั้นกล้ามเนื้อ และชั้นผิวหนังของลำไส้ ออก
3. Periosteal derived cells คือ เซลล์ที่แยกได้จากเยื่อหุ้มกระดูก ด้วยวิธี primary culture
4. RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) เป็นวิธีการสังเคราะห์และเพิ่มปริมาณของ DNA ที่ได้จากต้นแบบที่เป็น mRNA ในหลอดทดลอง โดยการสังเคราะห์ cDNA จาก mRNA ด้วยเอนไซม์ reverse transcriptase แล้วจึงเพิ่มปริมาณ cDNA ที่ได้ด้วยปฏิกิริยา PCR
5. Osteoblastic differentiation หมายถึง กระบวนการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก (osteoblastic phenotype)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ทราบถึงความสามารถของ DBM และ SIS ต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก และการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกไปเป็นเซลล์กระดูก

2. ทำให้ทราบถึงการแสดงออกของยีน osteoblastic markers ที่บ่งชี้การเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูก
3. ทำให้ทราบถึงความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ในสัตว์ทดลอง
4. สามารถนำความรู้ที่ได้จากงานวิจัยไปพัฒนาวัสดุทดแทน เพื่อใช้กระตุ้นการสร้างกระดูกใหม่ในการรักษาความบกพร่องของกระดูก

วิธีดำเนินการวิจัย



ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

1. ยื่นเสนอโครงร่างวิทยานิพนธ์ต่อคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ และคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในสัตว์ทดลอง
2. แสดงเอกสารข้อมูลโครงการวิจัยและเอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยให้แก่อาสาสมัครโครงการวิจัยทำการเก็บเยื่อหุ้มกระดูกจากอาสาสมัครโครงการวิจัย
3. เก็บตัวอย่างเยื่อหุ้มกระดูกจากอาสาสมัครโครงการวิจัยที่ลงชื่อยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย
4. เตรียม demineralized bone matrix และ porcine small intestinal submucosa
5. แยกเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกที่ได้รับจากอาสาสมัครเข้าร่วมโครงการวิจัย
6. ศึกษาผลของ DBM, SIS และ DBM ผสมกับ SIS ต่อการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิด ผลต่อการพัฒนาเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูก และผลต่อการแสดงออก osteoblastic markers ที่บ่งชี้การเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูก
7. ศึกษาผลของ DBM, SIS และ DBM ผสมกับ SIS ในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ในสัตว์ทดลอง
8. สรุปผลการวิจัย เขียนรายงานผลการวิจัย และนำเสนอผลงานวิจัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แนวคิดและทฤษฎี

สเต็มเซลล์ (Stem cells)

สเต็มเซลล์ หรือ เซลล์ต้นกำเนิดเป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติพิเศษในการแบ่งตัวให้เป็นเซลล์ของเนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ ในร่างกายได้ โดยยังคงมีความสามารถในการแบ่งตัวเองให้เป็นเซลล์ต้นกำเนิดเหมือนเดิมด้วย พบได้จากตัวอ่อนระยะ blastocyst และในเนื้อเยื่อที่โตเต็มวัย เช่น เลือด ไขกระดูก ฟันน้ำนม ผิวหนัง เป็นต้น สเต็มเซลล์สามารถจำแนกได้ 3 ชนิด คือ ชนิดที่ 1 totipotent stem cell คือ สเต็มเซลล์ที่มีศักยภาพสูงในการสร้างเซลล์ชนิดต่าง ๆ ทั้งร่างกายพบได้ในระยะ zygote ชนิดที่ 2 pluripotent stem cell คือ สเต็มเซลล์ที่มีศักยภาพในการสร้างเซลล์ชนิดต่าง ๆ ได้น้อยกว่าระยะ totipotent แต่ก็ยังสามารถสร้างเซลล์ต่าง ๆ ในร่างกายได้มากมาย พบได้ในระยะ blastocyst หรือสามารถเรียกอีกอย่างว่า embryonic stem cell และชนิดที่ 3 multipotent stem cell คือ สเต็มเซลล์ที่มีศักยภาพในการสร้างเซลล์ลดลงน้อยกว่า pluripotent โดยมากมักแบ่งตัวเป็นเซลล์จำเพาะ พบได้ในเซลล์ชนิดต่าง ๆ หรืออาจเรียกว่า adult stem cell

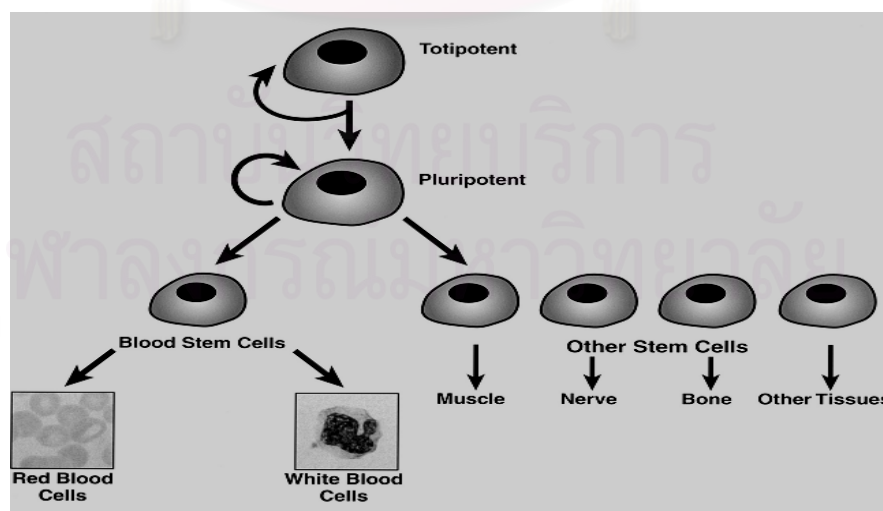
สเต็มเซลล์แบ่งตามแหล่งที่ได้เป็น 2 ชนิด คือ

1. Embryonic stem cell (สเต็มเซลล์จากตัวอ่อนมนุษย์) คือ สเต็มเซลล์ที่เก็บส่วนของ inner cell mass จากตัวอ่อนของมนุษย์หรือสัตว์ที่ยังอยู่ในครรภ์ในระยะ blastocyst ซึ่งมีลักษณะพิเศษ คือ เซลล์สามารถแบ่งตัวเองออกมาได้โดยที่ยังไม่ได้เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ชนิดอื่น ๆ (self renewal) เมื่อนำเอา embryonic stem cell ไปเพาะเลี้ยง จะสามารถแบ่งตัวได้ทั้ง 3 ชั้นของ embryonic germ layer (pluripotency) และได้มาจากช่วงก่อนหรือระหว่างการฝังตัวของ embryos

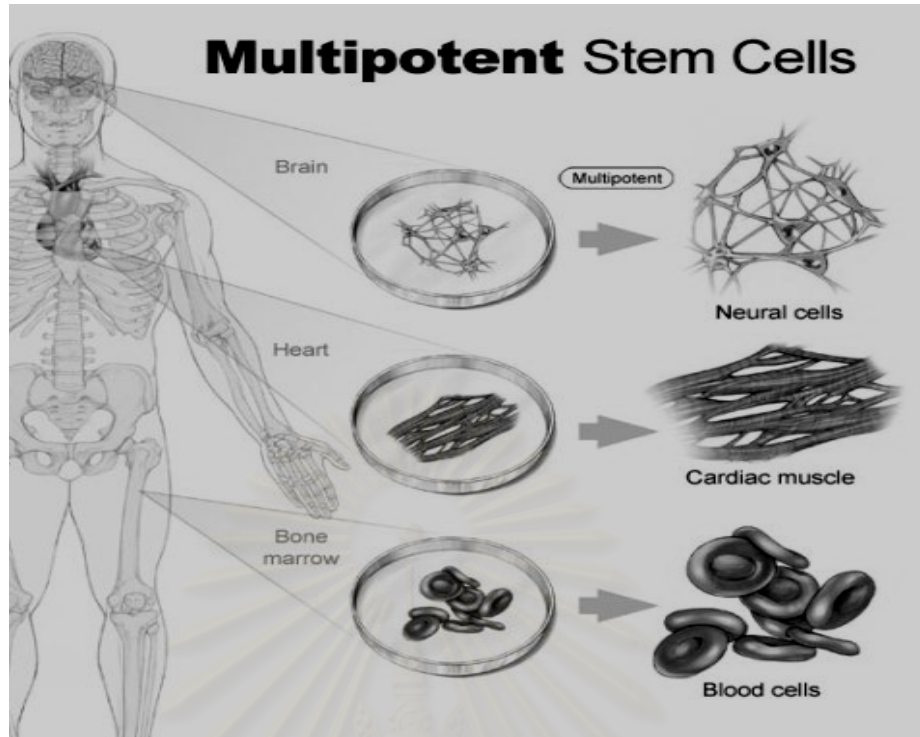
2. Adult stem cell (สเต็มเซลล์จากเนื้อเยื่อที่โตเต็มวัย) คือ สเต็มเซลล์ที่เก็บจากเนื้อเยื่อที่โตเต็มวัย เช่น จากไขกระดูก เลือด ผิวหนัง เยื่อหุ้มกระดูก เป็นต้น ซึ่งมีลักษณะพิเศษ คือ เซลล์สามารถแบ่งตัวเองได้อย่างต่อเนื่อง โดยที่ยังไม่ได้เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ชนิดอื่น ๆ (self renewal) สเต็มเซลล์นี้ ไม่ว่าจะแบ่งตัวอย่างไรสเต็มเซลล์จะต้องมีส่วนที่เป็นสเต็มเซลล์คงเหลือไว้อยู่เช่นเดิม ยังเป็นเซลล์ที่ไม่ได้กลายเป็นเซลล์จำเพาะ (remaining in the undifferentiated state) และมีความสามารถใน

การกลายเป็นเซลล์จำเพาะชนิดต่าง ๆ ได้ เช่น เซลล์ต้นกำเนิดเนื้อเยื่อประสาน เซลล์ต้นกำเนิดระบบโลหิตเป็นต้น (differentiation potential to be a specialized cell) [5]

เซลล์ต้นกำเนิดเนื้อเยื่อประสาน (mesenchymal stem cells; MSCs) เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ได้มาก และเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์เนื้อเยื่อประสานต่าง ๆ หลังจากที่ได้รับสิ่งกระตุ้น แหล่งที่สำคัญของ MSCs คือ ไขกระดูก นอกจากนี้ยังได้จากเนื้อเยื่อไขมัน เยื่อหุ้มกระดูก (periosteum) กล้ามเนื้อ กระดูกอ่อน เป็นต้น MSCs เป็นเซลล์ที่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนได้ง่าย ได้มีการศึกษาโดย Frieden Stein ในปี ค.ศ. 1966 พบว่า MSCs เป็นเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์ fibroblasts ซึ่งมีความสามารถในการยึดเกาะกับพื้นวัสดุเพาะเลี้ยง และสามารถเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ปลายทางได้ เช่น กระดูก กระดูกอ่อน ไขมัน กล้ามเนื้อ เอ็น เป็นต้น โดยการกระตุ้นจากสิ่งกระตุ้นโปรตีนที่หลังจากเซลล์ต่าง ๆ หรือที่เรียกว่า growth factor และรวมถึงไซโตไคน์ (cytokines) ซึ่งเป็นโปรตีนที่หลั่งออกมาจากเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันด้วย เช่น TGF- β (transforming growth factor- β เป็น growth factor ชนิดหนึ่งที่สามารถกระตุ้นการเจริญเพิ่มจำนวน mesenchymal cells ของกระดูก สามารถกระตุ้นให้เซลล์ preosteoblasts แบ่งตัวเพิ่มจำนวน สร้างคอลลาเจนในกระดูก และยับยั้งการสลายตัวของกระดูก bone morphogenetic proteins (BMPs) เป็นโปรตีนที่จัดอยู่ในกลุ่ม TGF- β มีหน้าที่ควบคุมการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ปลายทางได้ สามารถชักนำให้เกิดการเจริญเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ต้นกำเนิดไปเป็นเซลล์ในสายเซลล์กระดูก และสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกได้ [3]

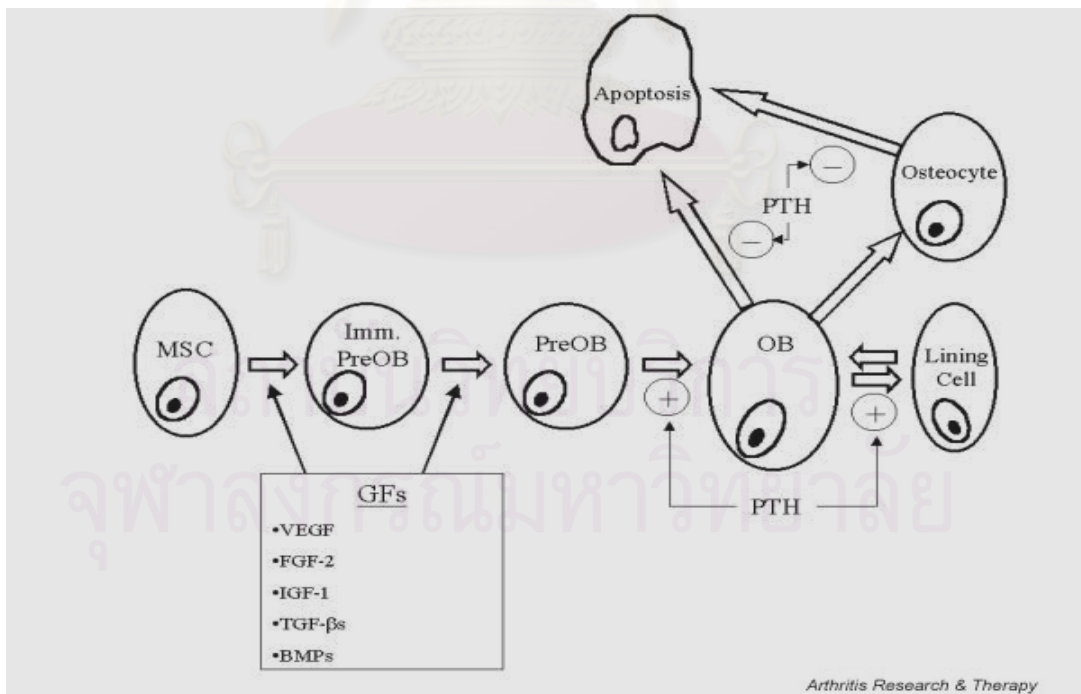


รูปที่ 1 ความสามารถในการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงของสเต็มเซลล์ชนิด totipotent stem cells และ ชนิด pluripotent stem cells [6]



รูปที่ 2 ความสามารถในการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงของสเต็มเซลล์

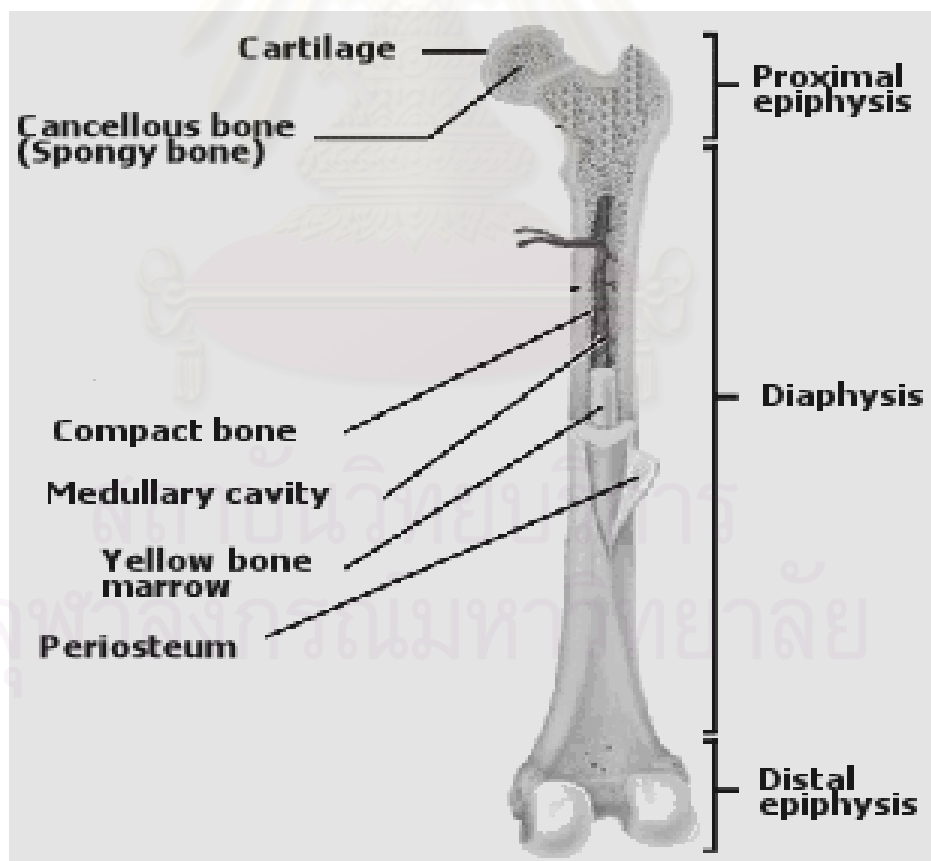
ชนิด multipotent stem cells [7]



รูปที่ 3 การเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดเนื้อกระดูกไปเป็นเซลล์กระดูก [8]

กระดูกและองค์ประกอบของกระดูก

กระดูกเป็นอวัยวะที่ประกอบขึ้นเป็นโครงร่างแข็งภายใน (endoskeleton) ของสัตว์มีกระดูกสันหลัง หน้าที่หลักของกระดูก คือ การค้ำจุนโครงสร้างของร่างกาย การเคลื่อนไหว การสะสมเกลือแร่ และการสร้างเซลล์เม็ดเลือด กระดูกเป็นอวัยวะที่ประกอบด้วยเนื้อเยื่อกระดูก (osseous tissue) ที่มีความแข็งแรงแต่น้ำหนักเบา การเจริญพัฒนาของเนื้อเยื่อกระดูกในรูปแบบที่แตกต่างกันทำให้กระดูกเป็นอวัยวะที่มีหลายรูปร่างลักษณะ เพื่อให้สอดคล้องกันกับการทำงานของกระดูกในแต่ละส่วน โครงสร้างของกระดูกชนิดยาวส่วนบริเวณด้านนอกของกระดูกมีเนื้อกระดูกแข็ง ซึ่งเรียกว่ากระดูกเนื้อแน่น (compact bone) โดยมีช่องว่างของเนื้อกระดูกน้อยมาก ส่วนบริเวณด้านในของกระดูกจะมีลักษณะที่โปร่งคล้ายเส้นใยสานกัน เรียกว่า กระดูกเนื้อพรุน (spongy /cancellous bone) ซึ่งทำให้กระดูกมีความเบาและเป็นที่อยู่ของหลอดเลือด และไขกระดูก (marrow) นอกจากนี้กระดูกแข็งมีเยื่อหุ้มกระดูก (periosteum) หุ้มอยู่โดยรอบ และมีหลอดเลือดและเส้นประสาทมาเลี้ยงเนื้อกระดูก [3]



รูปที่ 4 โครงสร้างของกระดูก [9]

เนื้อเยื่อกระดูกประกอบด้วยเซลล์กระดูกที่มีส่วนสำคัญในการสร้างและการก่อรูปของกระดูกขึ้น เซลล์กระดูกแบ่งออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่ เซลล์ชนิดที่ 1 เซลล์ osteoblasts เป็นเซลล์สร้างเนื้อกระดูกที่เจริญพัฒนามาจากเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์กระดูก (osteoprogenitor cells) ซึ่งเซลล์นี้จะอยู่ตามขอบของเนื้อกระดูก และสร้างสารประเภท extracellular matrix เรียกว่า osteoid จากนั้นเกิดการสะสมของผลึกแร่ธาตุทำให้เกิดเป็นกระดูกได้ เซลล์กระดูกมีลักษณะเป็นรูปทรงสี่เหลี่ยมคล้ายลูกเต๋ามีการเรียงตัวชิดกันเป็นแถวเซลล์ osteoblasts จะมีการสร้างเส้นใยคอลลาเจน ชนิดที่ 1 สังเคราะห์ osteocalcin และโปรตีนที่พบในเนื้อพื้นกระดูกที่เรียกว่า bone sialoprotein และยังพบ osteopontin กับ osteonectin ซึ่งมีส่วนช่วยในการจับกันของผลึกแร่ธาตุกับ collagen matrix ในการเจริญพัฒนาของเซลล์ต้นกำเนิดไปเป็นเซลล์ osteoblasts สามารถตรวจสอบได้จากเอนไซม์ alkaline phosphatase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เซลล์ osteoblasts สร้างออกมาในช่วงที่ยังไม่มีการแข็งแร่ธาตุ เซลล์ชนิดที่ 2 เซลล์ osteocytes เป็นเซลล์ที่เจริญต่อมาจาก osteoblasts ที่ได้สร้างเนื้อกระดูกจนล้อมรอบตัวเซลล์ และเป็นเซลล์กระดูกที่เจริญเต็มที่แล้วโดยรอบเซลล์จะเป็นช่องที่เรียกว่า ลาคูนา (lacuna) แต่ละลาคูนาจะติดต่อกันด้วยช่องทางผ่านเล็ก ๆ ที่เรียกว่า คานาลิคูล (canaliculi) ซึ่งทำให้แต่ละเซลล์ osteocytes มีการติดต่อสื่อสารกันได้ ออกซิเจนและสารอาหารก็จะถูกส่งจากหลอดเลือดภายในช่องฮาวเวอร์เซียนเข้ามาตั้งแต่เซลล์ผ่านทางช่องนี้ ถึงแม้ว่า osteocytes จะเป็นเซลล์กระดูกที่โตเต็มที่แต่ยังมีหน้าที่ในการควบคุมระดับแคลเซียม และสารนอกเซลล์อื่น ๆ และเซลล์ชนิดที่ 3 เซลล์ osteoclasts เป็นเซลล์ขนาดใหญ่ที่มีหลายนิวเคลียส และเจริญมาจาก monocyte stem cells เป็นเซลล์ซึ่งมีหน้าที่สำคัญในกระบวนการปรับแต่งกระดูก (bone remodeling) โดยอาศัยการผลิตเอนไซม์ acid phosphatase ในการสลายเนื้อกระดูก และทำให้กระดูกมีลักษณะที่เหมาะสม และยังทำให้มีการนำแคลเซียมออกสู่กระแสเลือดอีกด้วย [3]

เนื้อกระดูกประกอบด้วยสารอินทรีย์และน้ำรวมกัน 35% และสารอนินทรีย์ 65% สารอินทรีย์ส่วนใหญ่ประกอบด้วยคอลลาเจนประมาณ 90% รวมอยู่กับ ground substance ซึ่งเป็นสารประเภท glycoaminoglycans สำหรับสารอนินทรีย์ประกอบด้วยเกลือแร่ต่าง ๆ ที่สำคัญคือ แคลเซียม และฟอสเฟต รวมกันเป็นผลึกแคลเซียมไฮดรอกซีเอปาทาไทต์ (crystalline calcium hydroxyapatite) มีสูตรทางเคมี คือ $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ สารอินทรีย์ที่กล่าวถึง เช่น คอลลาเจน ชนิดที่ 1 เป็นโปรตีนเส้นใยที่พบมากที่สุดในร่างกาย พบเป็นองค์ประกอบหลักของกระดูก และพื้นแล้วยังสามารถพบได้ที่เนื้อเยื่อแผลเป็น ซึ่งสามารถสร้างเพื่อซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่เกิดแผล เส้นเอ็น ผิวหนัง ผนังหลอดเลือด เยื่อหุ้มเส้นใยกล้ามเนื้อ (endomysium ของ myofibrils) เป็นต้น

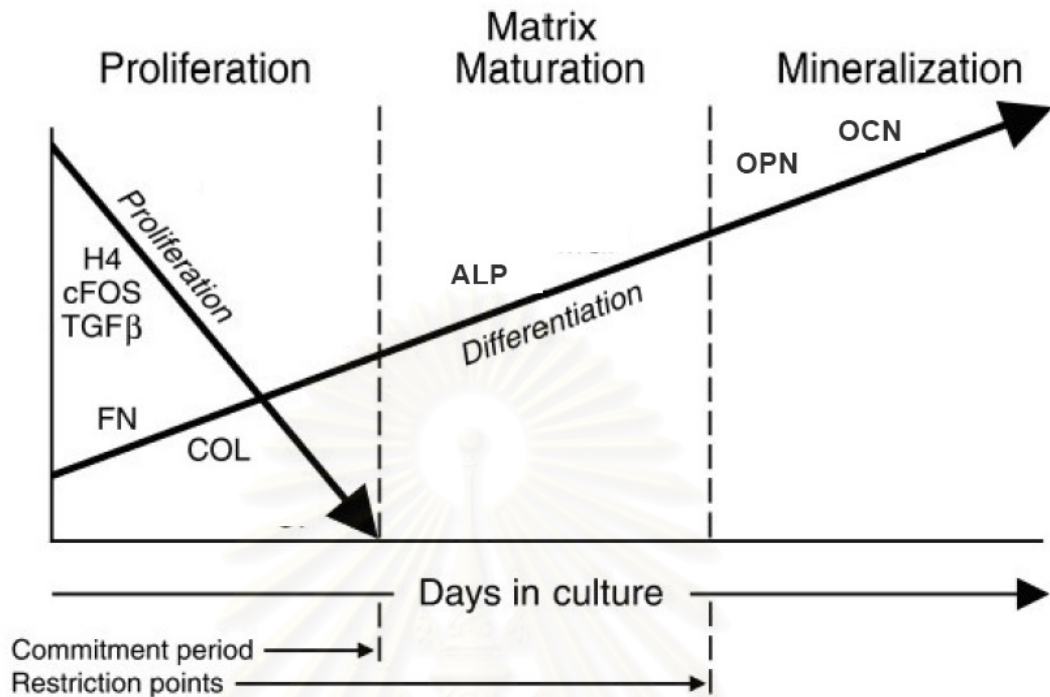
คอลลาเจน ชนิดที่ 1 นี้ถูกสร้างขึ้นจากเส้นใย 3 สาย ซึ่งประกอบด้วย สาย $\alpha 1$ สองสาย รวมกับสาย $\alpha 2$ หนึ่งสาย ในการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ 1 มีการแสดงออกของ ยีนคอลลาเจน ชนิดที่ 1 แอลฟา 1 (collagen type I alpha 1; COL1A1) เป็นยีนองค์ประกอบหลักในการแสดงรหัสของคอลลาเจน ชนิดที่ 1 ที่เรียกว่า pro-alpha 1 chain โดยสายที่เกิดขึ้นนี้จะรวมตัวกับ pro-alpha 1 สายอื่น และรวมตัวกับ pro-alpha 2 chain ทำให้เกิดเป็น โมเลกุลของคอลลาเจน ชนิดที่ 1 สารอินทรีย์ที่เป็นโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจน เช่น bone sialoprotein เป็นไกลโคโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของ bone extracellular matrix และมีสัดส่วนประมาณ 8% ของโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจน ที่พบในกระดูก โปรตีนชนิดนี้มีความเป็นกรดสูง (pKa 3.9) bone sialoprotein พบได้ทั้งใน กระดูกและฟัน มีหน้าที่ในการเป็นจุดเริ่มต้นของการสะสมแร่ธาตุ osteocalcin เป็นโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจนพบในกระดูกและเนื้อเยื่อฟัน เซลล์สร้างกระดูก (osteoblasts) ทำหน้าที่ หลั่งสารดังกล่าวออกมา มีบทบาทในการสะสมแร่ธาตุ และช่วยในการควบคุมภาวะ สมดุลของแคลเซียมไอออน โปรตีนชนิดนี้สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวเคมีของ การสร้างกระดูก เนื่องจากเป็นโปรตีนที่สร้างจากเซลล์สร้างกระดูก ทางชีวเคมีนิยม นำมาใช้ในการตรวจวัดระดับ osteocalcin ในซีรัม โดยมีความสัมพันธ์กับความหนาแน่น มวลในกระดูก (bone mineral density; BMD) ทำให้ทราบถึงการสร้างกระดูกได้ นอกจากนี้ โปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจนที่มีชื่อว่า osteopontin เป็นไกลโคโปรตีนที่สังเคราะห์ได้ จากเนื้อเยื่อหลายชนิด เช่น preosteoblasts, osteoblasts, osteocytes, extraosseous cells และพบได้ในเซลล์ไขกระดูก osteopontin เป็นโปรตีนที่มีสภาพเป็นกรด (acidic protein) โดยมีลำดับกรดอะมิโน RGD (Arginine - Glycine - Aspartic acid) เป็นตำแหน่งที่ทำให้ เซลล์สามารถยึดเกาะกับ extracellular matrix ได้ [3]

กระบวนการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกมีการแสดงออกของ ยีนตามลำดับ โดยในช่วงแรกจะมีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต เช่น c-myc และ c-fos ช่วงต่อมาเซลล์มีการสร้าง osteoid matrix, collagen type I, fibronectin และ growth factors บางชนิดที่เกี่ยวข้อง ซึ่งในขณะนั้นเซลล์สร้างกระดูกเจริญไปเป็นเซลล์สร้าง กระดูกที่เติบโตเต็มที่ที่มีการสังเคราะห์โปรตีนของเซลล์เปลี่ยนแปลงไปซึ่งจะสังเคราะห์ collagen type I, alkaline phosphatase, bone sialoprotein และ osteocalcin เป็นต้น [10] กระบวนการสร้างกระดูกแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ ประเภทแรก endochondral ossification เป็นกระบวนการสร้างกระดูกที่เริ่มจากเซลล์กระดูกอ่อน (chondrocytes) มีการเจริญ เพิ่มจำนวน แล้วมีการแข็งแร่ธาตุใน matrix หลังจากนั้นเซลล์ตายแบบ apoptosis ต่อมา มีการเจริญของหลอดเลือดมาเลี้ยง ซึ่งกระบวนการสร้างกระดูกประเภทนี้

เกิดกับกระดูกแขน ขา ตามยาว และการสร้างกระดูกใหม่บริเวณที่เกิดกระดูกหัก ประเภทที่สอง intramembranous ossification กระบวนการนี้เกิดโดย osteoblasts สร้างเนื้อกระดูกโดยไม่ต้องอาศัยกระดูกอ่อนเป็นต้นแบบในการเชื่อมแคลเซียม ซึ่งกระบวนการสร้างกระดูกประเภทนี้เกิดกับกระดูกยาวที่เจริญตามแนวกว้าง กระบวนการเชื่อมแร่ธาตุในกระดูก (mineralization) แบ่งออกเป็น 2 ระยะ คือ ระยะที่ 1 มีการเชื่อมแร่ธาตุสะสมกระจายตามที่ต่าง ๆ ต่อมาระยะที่ 2 มีการเจริญเพิ่มจำนวนของผลึกแร่ธาตุตรงตำแหน่งที่มีการก่อตัวขึ้นของแร่ธาตุในกระดูกที่เกิดขึ้นนี้ เรียกว่า hydroxyapatite ซึ่งมีองค์ประกอบเป็น $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ หลังจากที่มีการสะสมผลึกแคลเซียมฟอสเฟต ภายในคอลลาเจนของเนื้อกระดูกใหม่ (osteoid) ผลึกจะเกิดการรวมตัวกันทำให้กระดูกมีความแข็ง จากการศึกษาได้มีการสังเคราะห์ hydroxyapatite เพื่อใช้เป็นวัสดุอินทรีย์ใช้ในการซ่อมแซมช่องว่างของกระดูกที่เกิดขึ้น โดยเป็นส่วนประกอบของเนื้อเยื่อที่มีการสะสมแร่ธาตุในช่วงของการเชื่อมแร่ธาตุเป็นโครงร่างสำหรับการเจริญของกระดูก (osteoconduction) และทำให้เกิดกระดูกใหม่ขึ้นมาแทนกระดูกเดิมที่ผิดปกติบริเวณช่องว่างที่เกิดขึ้นได้ การสร้างกระดูกใหม่โดยอาศัย hydroxyapatite ได้มีการศึกษาทั้งในสัตว์ทดลองและมนุษย์ ในครั้งแรกได้มีการปลูกฝังลงในสัตว์ทดลอง โดยทำการฝังบริเวณกระดูกขาของสุนัข พบว่ามีการรวมตัวกันของเนื้อเยื่อที่ทำการปลูกฝัง และสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่สูงขึ้นอีกด้วย [11]

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กระบวนการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast differentiation)



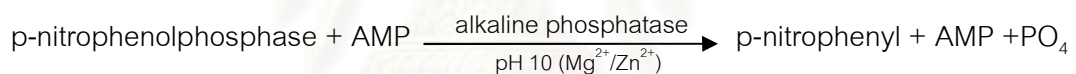
รูปที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยงกับการแสดงออกของยีนในการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก [12]

จากรูปที่ 5 ลูกศรแทนการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ และยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์สร้างกระดูก เช่น การพัฒนา extracellular matrix และสะสมเกลือแร่ในเซลล์เพาะเลี้ยง โดยแบ่งเป็น 3 ช่วงของการพัฒนาไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก ดังนี้ ช่วงแรกมีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนของเซลล์ (proliferation) ช่วงต่อมาจะมีการพัฒนา extracellular matrix development และช่วงสุดท้ายเป็นกระบวนการสะสมแร่ธาตุ (mineralization) โดยช่วงที่มีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนของเซลล์เพาะเลี้ยง พบว่ามีการแสดงออกของยีน histone 4 (H4), c-fos และ TGF- β และเริ่มมีการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก พบว่ามีการแสดงออกตั้งแต่ช่วงที่มีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนของเซลล์เพาะเลี้ยง จากนั้นมีการแสดงออกของ fibronectin (FN) และคอลลาเจน (COL) แสดงให้เห็นถึงการสร้าง matrix และในช่วงต่อมา matrix maturation จะมีการแสดงออกของ ALP จากนั้นในช่วงระยะสุดท้ายกระบวนการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกและมีการสะสมแร่ธาตุ พบว่ามีการแสดงออกของ osteopontin (OPN) และ osteocalcin (OCN) [12]

Alkaline phosphates (ALP)

Alkaline phosphatase เป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่มไฮโดรเลส พบมากในเซลล์ที่ทำหน้าที่สร้างกระดูก (osteoblast) นอกจากนี้ยังสร้างจากแหล่งอื่น ๆ อีก เช่น ตับ รก และเซลล์ท่อน้ำดี พบว่าเอนไซม์ ALP ที่มีแหล่งสร้างกระดูกจะเสื่อมสภาพด้วยความร้อนได้ง่ายที่อุณหภูมิ 60°C รองลงมาคือ ALP จากตับทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิ 80°C ส่วนเอนไซม์ ALP จากรกนั้นทนความร้อนได้ดีที่สุด ในทางชีวเคมี ALP เป็นตัวที่ใช้บ่งชี้ osteoblastic phenotype ซึ่งโปรตีนนี้พบอยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ osteoblasts และเกาะกับ phosphatidyl inositol (PI) phospholipid complex ด้วยพันธะโควาเลนต์ สามารถปล่อยออกจากเซลล์โดยใช้เอนไซม์ PI-specific phospholipase C การทำงานของ ALP จะ catalyze ปฏิกิริยา transphosphorylation ของ p-nitrophenylphosphate (p-NPP) ไปเป็น p-nitrophenol (p-NP) โดยมี transphosphorylating buffer คือ 2-amino-2-methyl-1-propanol (AMP) โดยมี Mg^{2+} หรือ Zn^{2+} ช่วยในการเร่งปฏิกิริยา สามารถตรวจสอบได้ด้วยค่าการดูดกลืนแสง อันเนื่องมาจากการเกิด p-NP (สีเหลือง) นั้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับการทำงานของเอนไซม์ ALP [13,14]

ปฏิกิริยาเกิด ดังนี้



Runx-related transcription factor 2 (RUNX2)

RUNX2 เป็นโปรตีนในตระกูล RUNX ซึ่งเป็น osteoblast-specific transcription factor มีบทบาทในการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast differentiation) การเจริญเติบโตเต็มที่ของเซลล์กระดูกอ่อน (chondrocyte maturation) การสร้างกระดูก (bone formation) และกระบวนการ remodeling แล้วยังเป็นปัจจัยสำคัญสำหรับกลไกการส่งสัญญาณ (signaling) ที่มีผลทางชีวภาพของกระดูก [15]

Transforming growth factor- β (TGF- β)

TGF- β เป็นไซโตไคน์มีหน้าที่หลายอย่างเกี่ยวข้องกับหน้าที่การทำงานทางชีวภาพของเซลล์ประกอบด้วย การเจริญเติบโตเพิ่มจำนวน (proliferation) และการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลง (differentiation) ของเซลล์หลายชนิด TGF- β เป็นโปรตีนที่มี 4 รูปแบบ TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 และ TGF- β 4 โปรตีนในกลุ่มนี้ประกอบด้วย inhibins, activin, anti-müllerian hormone, bone morphogenetic protein, decapentaplegic และ Vg-1 โปรตีน TGF- β นี้มีหน้าที่เป็นโปรตีนส่งสัญญาณทำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis

(death signals) มีบทบาทสำคัญในการควบคุมวัฏจักรของเซลล์ และมีบทบาทในการควบคุมระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์ (immune system) TGF- β 1 มีขนาด 25 กิโลดาลตัน เป็นไซโตไคน์ที่พบมากที่สุด ใน bone matrix และมีผลต่อเซลล์สลายกระดูก (osteoclast) [16] โดยทั่วไปแล้วมีการนำ TGF- β มาใช้ในการกระตุ้นเซลล์ต้นกำเนิดเนื้อเยื่อประสาน (MSCs) และในการรักษาทางศัลยกรรมกระดูกโดยมีผลในการกระตุ้นให้เกิด callus เพิ่มมากขึ้น มีการศึกษาในระดับสัตว์ทดลอง (in vivo) โดยใช้ recombinant human TGF- β 1 (rh TGF- β 1) เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการซ่อมแซมกระดูก [15] TGF- β มีการศึกษาถึงความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกได้ แต่มีผลในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกได้น้อยกว่าการกระตุ้นของ BMP [17]

Bone morphogenetic proteins (BMP)

ในปี 1965 Marshall Urist ค้นพบความสามารถของ DBM ในการชักนำให้เกิดการสร้างกระดูกหลังจากทำการฝัง DBM ลงในบริเวณที่ตำแหน่ง (ectopic) ได้ผิวหนัง ซึ่งพบว่าเกิดจากโปรตีน Bone morphogenetic proteins หรือที่เรียกว่า BMP เป็นโปรตีน growth factor ที่สามารถกระตุ้นการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงของ MSCs ไปเป็นเซลล์กระดูกอ่อน (chondroblast) เซลล์สร้างกระดูก (osteoblast) ได้โดยตรง ที่สำคัญได้แก่ BMP-2, BMP-7 และ BMP-9 พบว่ามีความสามารถในการชักนำให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่แบบ endochondral ossification ส่วน BMP-2, BMP-6 และ BMP-9 มีความสำคัญในช่วงแรกของการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลง pluripotential progenitor cells ไปเป็น preosteoblasts สำหรับ BMP-4 และ BMP-7 มีความสามารถในการนำเสนอลำดับให้เกิดการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงจาก preosteoblast ไปเป็น osteoblast [17] ปัจจุบันการศึกษาเกี่ยวกับ BMP พบว่า BMP แสดงออกในช่วงแรกของการซ่อมแซมกระดูกหัก ในการศึกษาในนิมใช้สารโปรตีนสังเคราะห์ recombinant human BMP (rh BMP) ซึ่งมีความสามารถในการชักนำกระดูกได้เช่นเดียวกัน แต่ต้องอาศัยตัวนำพาเช่น collagen matrix, DBM และ polysaccharide matrices เป็นต้นหน้าทีของตัวนำพา BMP ในการชักนำการสร้างกระดูกขึ้นอยู่กับตำแหน่งที่จำเพาะและเวลาที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดการสร้างกระดูก [15]

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction หรือ (PCR) เป็นเทคนิคสำหรับเพิ่มปริมาณ DNA โดยอาศัยหลักการ DNA replication ซึ่งเป็นการสังเคราะห์สาย DNA สายใหม่จาก DNA ต้นแบบในหลอดทดลองภายในระยะเวลาอันสั้น และได้ DNA สายใหม่เกิดขึ้นเป็นล้านเท่า เทคนิคนี้พัฒนาขึ้นในปี 1983 โดย Kary Mullis และคณะ จุดเด่นของเทคนิค PCR คือ สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้อย่างเฉพาะเจาะจง โดยมีขั้นตอนการทำงานน้อยและใช้เวลาน้อย [18] จนถึงปัจจุบันนี้เทคนิค PCR ได้รับการปรับปรุงและพัฒนาในหลาย ๆ ด้านจนกระทั่งได้รับการยอมรับว่าเป็นเทคโนโลยีที่สำคัญมากต่องานด้านอณูชีวโมเลกุล สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทั้งกับงานวิจัยทางชีวโมเลกุลและพันธุวิศวกรรม เช่น การเพิ่มปริมาณยีน (gene cloning) การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน (gene sequencing) การสร้าง DNA ติดตาม (DNA probe) และการวิจัยประยุกต์ เช่น การศึกษาการแสดงออกของยีนจาก mRNA การสร้างยีนกลายพันธุ์ (in vitro mutagenesis) การบ่งชี้ตำแหน่งกลายพันธุ์บนยีน (point mutations and deletions) เป็นต้น หลักการของ PCR นั้นใช้หลักการพื้นฐานในการสังเคราะห์ DNA สายใหม่จากสาย DNA ที่เป็นต้นแบบหนึ่งสายด้วยเอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งใช้กันอยู่ทั่วไปในการติดฉลาก DNA และการศึกษาวิเคราะห์ลำดับเบส แต่ PCR สามารถสังเคราะห์ DNA ได้คราวละ 2 สาย พร้อมกันโดยใช้ primer 1 คู่ ปฏิกิริยา PCR มี 3 ขั้นตอน และหมุนเวียนต่อเนื่องกันไปภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน ดังนี้ ขั้นที่ 1 denaturation เป็นการแยกสาย DNA ที่เป็นต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ให้เป็นเส้นเดี่ยว โดยใช้อุณหภูมิสูง 92-95°C ขั้นที่ 2 annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงเพื่อให้ primer ซึ่งเป็น DNA สายสั้น ๆ ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับ DNA ที่เป็นต้นแบบจับคู่กันนิยมใช้ อุณหภูมิในช่วง 45-60°C ขั้นสุดท้าย extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ DNA สายใหม่โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลาย 5' ของ primer ตามข้อมูลบน DNA ที่เป็นต้นแบบแต่ละสายโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72-75°C

ส่วนประกอบในปฏิกิริยาของ PCR ได้แก่

1. DNA ต้นแบบ (template PCR) เป็น DNA เป้าหมาย (DNA target) สามารถใช้ในปฏิกิริยาของ PCR ในลักษณะ DNA สายเดี่ยวหรือ DNA สายคู่ก็ได้
2. Primer การออกแบบ primer จะต้องเลือกให้เหมาะสมกับแต่ละงาน โดยอาศัยหลักการจับคู่แบบจำเพาะของที่ต้องการตรวจหา กับ primer โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer เป็นตัวกำหนดความจำเพาะในการสังเคราะห์ DNA ดังนั้นจึงต้องทราบลำดับเบสที่นำมาสังเคราะห์ primer ในการเลือกและออกแบบ primer ควรมีความยาวของ primer ประมาณ 18-30 นิวคลีโอไทด์ ขึ้นอยู่กับงานที่ใช้ ควรเลือก primer

ที่มี G+C content อยู่ระหว่าง 50-60% ไม่ควรเลือก primer ที่มีปริมาณ G+C content ที่สูงเกินไป มีปริมาณ G+C ที่ใกล้เคียงกับชิ้น DNA เป้าหมาย primer ที่ใช้ต้องมีความจำเพาะกับลำดับเบสเป้าหมายใน DNA ต้นแบบ คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ต้องมีความจำเพาะเพียงแห่งเดียวในสาย DNA ต้นแบบ หลีกเลี่ยงลำดับเบสที่จับกับลำดับเบสของตัวเอง ค่า Tm (melting temperature) ของแต่ละ primer ควรใกล้เคียงกัน โดยทั่วไปควรอยู่ในช่วง 55-80°C และ primer ควรมีลำดับคู่สมกับปลายด้าน 3' ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละสายของ DNA ต้นแบบ

3. เอนไซม์ DNA polymerase ที่นิยมใช้กันมากที่สุด คือ Taq DNA polymerase ซึ่งแยกได้จากเชื้อแบคทีเรียที่เจริญได้ในน้ำพุร้อนที่มีชื่อ *Thermus aquaticus* (Taq) ซึ่งมีคุณสมบัติทนความร้อนได้สูงถึง 95°C ทำให้ไม่เสียคุณสมบัติของเอนไซม์ ในขั้นตอน denature อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ คือ 72°C Taq DNA polymerase ต้องการ Mg^{2+} เพื่อช่วยส่งเสริมให้ปฏิกิริยาการสังเคราะห์สายใหม่ดำเนินต่อไปได้ โดย Mg^{2+} จะทำหน้าที่เป็น co-factor นอกจากนั้น Mg^{2+} ยังมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ด้วย และมีผลต่อการ anneal ของ primer ความเข้มข้นของ Mg^{2+} ต้องปรับเปลี่ยนให้พอเหมาะกับความเข้มข้นของ dNTPs ซึ่งถ้าความเข้มข้นของ Mg^{2+} มากเกินไปทำให้เกิดผลผลิต DNA ที่ไม่จำเพาะ

4. Deoxynucleotide triphosphate (dNTPs) คือ เบสที่ใช้ในการต่อสายจาก primer ในระหว่างการสังเคราะห์สาย DNA ทำให้ได้ DNA สายใหม่ dNTPs ประกอบด้วย dATP, dCTP, dGTP และ dTTP

5. PCR buffer เป็นสารละลายที่ควบคุมสภาวะของการทำปฏิกิริยาให้เหมาะสม เช่น pH และเกลือต่าง ๆ ส่วนประกอบของบัฟเฟอร์ประกอบด้วย Tris-HCl, KCl และ $MgCl_2$ [19]

Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณยีนที่น่าสนใจจาก RNA ต้นแบบ โดยหลักการคือ ทำการสกัด RNA ให้มีความบริสุทธิ์ จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอนการสังเคราะห์ cDNA โดยกระบวนการ reverse transcription โดยอาศัยเอนไซม์ reverse transcriptase เอนไซม์นี้ทำงานโดยสร้างสายได้ทั้งจากแม่พิมพ์ที่เป็น DNA และ RNA โดยใช้ primer ที่เป็น gene specific primer ซึ่งเป็น primer ที่สามารถใช้ในการสร้างสาย cDNA ที่จำเพาะที่สุด หรือใช้ oligo (dt) primer ซึ่งการใช้ primer ประเภทนี้จะมี RNA จำเพาะที่เป็น Poly (A)⁺ RNA เท่านั้นที่ถูกนำมาใช้เป็นแม่แบบในการสร้างสาย cDNA หรือการใช้ random primer เป็น primer ที่ไม่มีความจำเพาะ จึงสามารถเข้าจับกับ RNA ทุกชนิด ดังนั้น cDNA ที่เกิดขึ้นจึงมีความหลากหลายมากที่สุด จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอนสุดท้ายในการทำ PCR โดยอาศัยแม่แบบจาก cDNA ที่ถูกสร้างขึ้นมา โดยสร้างสาย DNA ขึ้นมา

ใหม่มีลักษณะรูปแบบการทำเหมือน PCR ธรรมดา ในท้ายที่สุดจะได้สาย DNA ที่เพิ่มจำนวนมากมายจากสาย RNA ตั้งต้น [18,19]

การตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR (PCR Product)

การตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี gel electrophoresis โดยนำผลผลิต PCR ที่สร้างได้มาแยกตามขนาดของ DNA โดยใช้กระแสไฟฟ้าแยก DNA บน agarose gel หรือ polyacrylamide gel เปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐานที่ทราบขนาดที่แน่นอน จากนั้นย้อมด้วย ethidium bromide แล้วนำไปส่องดูด้วยแสงอุลตราไวโอเล็ต ผลผลิต PCR ที่ตีควรรู้ได้ขึ้น DNA ที่ชัดเจน และตรงตามขนาดความต้องการ แต่ถ้ามีขนาดเล็กและแถบ DNA ไม่ชัดเจนอาจเป็นดีเอ็นเอที่เป็น primer-dimer [18,19]

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาเกี่ยวกับ DBM ทั้งใน in vitro และ in vivo

จากการศึกษาของ Alper และคณะ ในปี 1989 ความสามารถของ hydroxyapatite และ DBM ในการเป็นตัวชักนำการสร้างกระดูกในกระดูกที่ไม่เชื่อมติดกัน โดยทำการฝัง hydroxyapatite และ DBM ในหนูตัวผู้ โดยแบ่งเป็น 4 กลุ่ม คือ ฝัง hydroxyapatite ชนิดเดียว หรือ DBM ชนิดเดียว หรือ hydroxyapatite กับ DBM ผสมกัน และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ฝังทั้ง hydroxyapatite และ DBM หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ลักษณะทางกายวิภาคของเนื้อเยื่อ พบว่าในกลุ่ม hydroxyapatite ชนิดเดียวมีการลดลงของการสร้างกระดูก ซึ่งมีความสัมพันธ์กับกลุ่มควบคุม จากนั้นทำการวิเคราะห์แคลเซียม alkaline phosphatase และ bone gla protein พบว่าในกลุ่มที่ฝังด้วย DBM มีการสร้างกระดูกเพิ่มขึ้น 16% ส่วนในกลุ่ม hydroxyapatite ชนิดเดียว และกลุ่มผสม hydroxyapatite กับ DBM ผสมกัน พบว่ามีการลดลงถึง 80% ทำให้ทราบว่ากระบวนการสร้างกระดูกในกระดูกที่ติดปกติที่ไม่เชื่อมติดกันจะมีการสร้างมากขึ้นโดยการกระตุ้นของ DBM [21] เช่นเดียวกับในการศึกษาของ Oztürk A และคณะ ในปี ค.ศ. 2006 ได้ศึกษาความสามารถของ hydroxyapatite/tri-calcium phosphate และ DBM ในการรักษาแผลกระดูกของหนู (Wistar rat) โดยการฝัง hydroxyapatite/tri-calcium phosphate หรือ DBM ชนิดเดียวและทั้งสองชนิดผสมกัน พบว่า DBM ชนิดเดียวมีความสามารถในการรักษาดีที่สุดในเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่น ๆ และกลุ่มควบคุม ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันในระหว่าง 2 กลุ่มที่เหลือและกลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่าในกลุ่มที่ปลูกฝังด้วย hydroxyapatite/tri-calcium phosphate ร่วมกับ DBM ไม่ได้กระตุ้นให้เกิดการชักนำให้มีการสร้างกระดูก [20] จากที่กล่าวมาข้างต้นถึงกระดูกที่ผ่านกระบวนการลดปริมาณเกลือแร่ หรือ DBM สามารถเตรียมขึ้นจากการนำลำกระดูกยาว

ท่อนกลาง (diaphysis) มาบดให้ได้ขนาดระหว่าง 125 - 850 ไมครอน แล้วจึงนำมาผ่านกระบวนการลดปริมาณแคลเซียมและแร่ธาตุ ซึ่งนิยมใช้กรดไฮโดรคลอริกเจือจางในการละลายสารแร่ธาตุออกจากกระดูก ทำให้เนื้อกระดูกคงเหลือแต่คอลลาเจน และ bone morphogenetic protein ช่วยในการกระตุ้นให้มีการสร้างกระดูกได้ จากนั้นนำมาล้างให้สะอาดจนได้วัสดุที่มีลักษณะเป็นผงสีขาวขุ่น ที่เรียกว่า demineralized bone matrix หรือ DBM [21] DBM มีคุณสมบัติเป็น osteoinductive agent ซึ่ง DBM ชักนำ osteogenesis ในกระบวนการสร้างกระดูกใหม่แบบ endochondral ossification [22] ได้มีการนำ DBM มาใช้กันอย่างกว้างขวางในการรักษาความผิดปกติของกระดูกและโรคที่เกี่ยวข้องกับฟัน ในการศึกษาของ Zhang และคณะ ในปี ค.ศ. 1997 ทำการศึกษาใน in vivo (หนูทดลอง athymic mice) และใน in vitro (human periosteal cells) เพื่อวิเคราะห์ปริมาณความสามารถในการชักนำการสร้างกระดูกของ DBM จากนั้นทำการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงปริมาณแคลเซียม โดยการวิเคราะห์ด้วยน้ำหนักของวัสดุที่นำออกมาหลังจากการฝังเทียบกับน้ำหนักของวัสดุก่อนฝัง ซึ่งทำการฝัง DBM ในชั้นกล้ามเนื้อของหนู พบว่ามีการกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูก (osteoinductive) มากกว่าการฝังที่ได้ผิวหนัง และการสร้างกระดูกใหม่ในกลุ่มที่ฝังในชั้นกล้ามเนื้อมีการสร้างกระดูกใหม่ในระหว่างสัปดาห์ที่ 1-4 และไม่มี ความแตกต่างทางสถิติของน้ำหนัก ในสัปดาห์ที่ 5 พบว่า เริ่มมีการเพิ่มขึ้นของวัสดุที่เอาออกมา แสดงให้เห็นว่าในช่วงนี้มีการสะสมแคลเซียมเพิ่มขึ้น จากนั้นทำการฝังวัสดุในปริมาณที่แตกต่างกัน เพื่อศึกษาถึงผลการตอบสนองของ ความเข้มข้นของวัสดุที่ใช้แตกต่างกัน พบว่าใน in vivo ที่ 20 มิลลิกรัมของ DBM มีการตอบสนองที่ดีที่สุด ส่วนการศึกษาใน in vitro วิเคราะห์ด้วย alkaline phosphatase activity ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ของ osteoblasts พบว่าในวันที่ 5 หลังเติม DBM มีระดับการทำงานของเอนไซม์สูงสุด และในการศึกษาปริมาณของ DBM ที่แตกต่างกัน พบว่าปริมาณ 5 และ 10 มิลลิกรัม ของ DBM มีระดับ alkaline phosphatase activity มากที่สุด ซึ่งความสัมพันธ์ระหว่างการศึกษาใน in vivo กับ ใน in vitro พบว่าใน in vitro ปริมาณ DBM ที่ใช้มีผลต่อความสามารถในการเป็นสารกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูก (osteoinductivity) ของ DBM [24]

ในการศึกษาความสามารถ osteoinductivity ของกระดูกที่ผ่านกระบวนการลดปริมาณเกลือแร่ พบว่าในการใช้กระดูกที่มีความใหม่จะให้ผลดีแต่ยังมีข้อเสียและความเสี่ยงอยู่ ซึ่งเป็นเหตุผลในการพิจารณาเพื่อเลือกวัสดุที่ใช้ทดลอง เพราะมีผลต่อความสามารถในการสร้างกระดูก และมีผลต่อการแสดงออกของ BMPs ซึ่งในการศึกษาของ Torricelli ในปี ค.ศ. 1998 เพื่อวิเคราะห์ความสามารถ osteoinductivity ของ xenogenic demineralized bone matrix โดยการทดสอบ DBM powder ของกระต่าย

กับเซลล์เพาะเลี้ยงของ murine fibroblasts อย่างเดียว หรือร่วมกับ electromagnetic field (มีผลต่อการแสดงผลทางชีวภาพกับเซลล์โดยเฉพาะในทางสัลยกรรมกระดูกในการแก้ไข การสร้างกระดูก) ด้วย alkaline phosphatase activity ระดับแคลเซียม การเพิ่มจำนวนของเซลล์ และลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาค พบว่ามีการกระตุ้นให้สร้างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าการทดสอบร่วมกับ electromagnetic field มีผลต่อเซลล์ต่างกัน แต่มีความสัมพันธ์ในการเสริมการชักนำของกระดูกให้เชื่อมติดกัน [25]

ในปี ค.ศ. 2002 Iwata และคณะ ได้มีการศึกษาถึงคุณสมบัติของ DBM จากกระดูกที่ผ่านกระบวนการลดปริมาณเกลือแร่ในกระดูก เช่น แคลเซียม และ ฟอสฟอรัส แต่ยังมีองค์ประกอบ bone morphogenetic proteins และ noncollagenous proteins ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญต่อการชักนำให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ได้ [26] การศึกษาของ Hosny และคณะ ในปี ค.ศ. 1985 คุณสมบัติของ DBM ต่อการชักนำการสร้างกระดูก โดยการปลูกถ่าย DBM ใน rhesus monkey แล้วทำการตัดชิ้นเนื้อหลังจากทำการปลูกถ่ายครบ 20 40 และ 72 วัน พบว่าในวันที่ 20 มี mesenchymal cells และ fibroblast-like cells ล้อมรอบบริเวณ DBM particles แต่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ ในวันที่ 40 มีการสร้างกระดูกอ่อน และ chondroid bone ในวันที่ 72 พบว่ามีทั้ง mature bone และ immature bone จากการศึกษา นี้ทำให้ทราบถึงคุณสมบัติของ DBM ในการชักนำให้เกิดการสร้างกระดูกในสัตว์ทดลองได้ [27] มีรายงานก่อนหน้านี้นี้เกี่ยวกับ DBM โดย Gao J และคณะ ในปี ค.ศ. 2004 ซึ่งได้ ทำการศึกษาความสามารถของ allogeneic demineralized bone matrix ต่อ resurface osteochondral defect ในกระต่าย โดยจากการสันนิษฐานถึง intrinsic cytokines ใน DBM จะชักนำให้เซลล์เจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์สายพันธุ์ osteochondrogenic จาก bone marrow และทำหน้าที่ซ่อมแซม osteochondral defect ได้ ซึ่งทดสอบโดยการ เลี้ยง bone marrow-derived mesenchymal stem cells ลงบนโครงร่างวัสดุ demineralized trabecular bone matrix แล้วเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน พบว่าเซลล์เกาะกับโครงร่างวัสดุ และเจริญอยู่ใน demineralized trabecular bone matrix จากนั้นจึงนำไปฝังลงในบริเวณ osteochondral defect ของกระต่ายเป็นเวลา 6-12 สัปดาห์ พบว่ามีการซ่อมแซมบริเวณ ที่กระดูกบกร่องมากถึง 95% ส่วนการใช้ demineralized cortical bone matrix พบว่า มี subchondrol bone และชั้นบนสุดพบมีกระดูกอ่อน (cartilage) เรียงและแทรกอยู่ แต่ส่วนมากจากการซ่อมแซมโดยใช้ demineralized trabecular bone matrix จะพบ fibril ที่พื้นผิวและไม่มีการแทรกตัวของกระดูกอ่อน ซึ่งจากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า

demineralized cortical bone matrix อาจจะมีคุณสมบัติในการซ่อมแซม osteochondral defect ได้ [28]

จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าชนิดของ DBM มีผลต่อการสร้างกระดูก ในปี ค.ศ. 2005 Schouten และคณะ ได้ทำการศึกษาความสามารถของ DBM ในการชักนำ การสร้างกระดูกในหนูทดลอง (rat) โดยทำการฝัง DBM และ morselied DBM (MDBM) ต่อการสร้างกระดูกที่ intramuscular ของหนูทดลองเป็นเวลา 6 สัปดาห์ แล้วทำการศึกษา ผลที่เกิดขึ้นด้วย histology และ histomorphometry พบว่าในบริเวณที่ฝัง DBM มีกระดูก ใหม่เกิดขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเช่นเดียวกับการฝัง MDBM โดยบริเวณที่ทำการฝังด้วย DBM พบมีการสร้างกระดูกใหม่เกิดขึ้น 2.6% ส่วน MDBM มีการสร้างกระดูกใหม่เกิดขึ้น 1.9% จากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า DBM มีคุณสมบัติเป็น osteoinductive agent ซึ่ง DBM ชักนำ osteogenesis ใน endochondral ossification การฝังด้วย MDBM ไม่มีผลสำคัญ ต่อการสร้างกระดูกเพิ่มขึ้น และพบว่าการฝังที่ชั้นกล้ามเนื้อมีผลต่อการสร้างกระดูก (ectopic bone) ได้ดีกว่าการฝังที่ได้ผิวหนัง [23,29]

การศึกษาของ Boyan และคณะ ในปี ค.ศ. 2006 เกี่ยวกับความสามารถ ของ DBM ในการชักนำให้เกิดการสร้างกระดูก (osteoinductivity) ได้ทำการฝัง DBM, hyaluronic acid cancellous และ cortical bone ด้วยส่วนผสมที่แตกต่างกัน ในชั้นกล้ามเนื้อของหนูทดลอง พบว่า DBM ในปริมาณคงที่มีความสามารถในการชักนำ ให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ได้ และเมื่อผสมกับ hyaluronic acid พบว่าผลการทดลองที่ได้ ไม่มีการเปลี่ยนแปลง เมื่อทำการลดปริมาณของ DBM พบว่าความสามารถในการชักนำ ให้เกิดการสร้างกระดูก (osteoconduction) ลดลง ossicle area ลดลง และการสร้างกระดูก ใหม่ลดลง ส่วนผสมของ demineralized bone matrix-cortical-cancellous bone chip เมื่อผสมกับ hyaluronic acid พบว่าทำให้ปริมาณ residual bone particle ลดลง ทำให้ ทราบถึงความสำคัญของปริมาณ DBM ต่อการชักนำกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ [30] การศึกษาถึงความสามารถของ demineralized bone powder (DBP) ในการชักนำ กระบวนการเจริญของกระดูกอ่อน (chondrogenesis) หรือกระบวนการเจริญของกระดูก (osteogenesis) ของ human marrow stromal cells (hMSCs) ที่ทำการเพาะเลี้ยงใน 3-D collagen sponges ขึ้นอยู่กับสถานะในการเพาะเลี้ยง พบว่า hMSCs มี chondrogenic potential เมื่อมีการเติม TGF- β พบว่า DBP มีความสามารถในการกระตุ้นกระบวนการ chondrogenesis ของ hMSCs ที่เพาะเลี้ยงใน 3-D collagen sponges เพิ่มขึ้น และ ความสามารถของ DBP ในการชักนำ hMSCs ให้มีการแสดงออกของฟีโนไทป์ของ osteoblast

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงใน osteogenic supplement แสดงให้เห็นว่าในการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่แตกต่างกันมีผลต่อ differentiation pathway ของ hMSCs เมื่อกระตุ้นด้วย DBP [31] Ma X และคณะ ในปี ค.ศ. 2006 ได้ทำการศึกษาความสามารถในการซ่อมแซมกระดูกที่บกพร่องของกระต่ายด้วยการใช้ hydroxyapatite-tricalcium phosphate และ small intestinal submucosa ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน คือ 1, 0.5 และ 0.25 น้ำหนัก/น้ำหนัก พบว่าส่วนผสมของวัสดุสองชนิดสามารถชักนำให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ได้ และในอัตราส่วน 0.5 มีผลต่อการซ่อมแซมกระดูกได้ดีที่สุด [32]

ในปี ค.ศ. 2009 Moxham และคณะ ได้ทำการศึกษาการตอบสนองของ TGF- β 1 ต่อการชักนำการสร้างกระดูกในกระดูกแขนของกระต่ายที่ผิดปกติ โดยใช้ inactive guanidine-extracted demineralized bone matrix (Gu-DBM) (คือ DBM ที่มีการนำโปรตีนและไซโตไคน์ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ออกด้วย guanidine แล้วทำการกรองแยก DBM ออกมา) เป็นตัวนำพา TGF- β 1 ในการชักนำให้เกิดการสร้างกระดูกด้วยความเข้มข้นของ TGF- β 1 ดังนี้ 10, 100 และ 500 ไมโครกรัม ทำการฝังเป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้วทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี histomorphometric analysis พบว่า TGF- β 1 ที่ความเข้มข้นมากมีผลต่อการชักนำให้เกิดการสร้างกระดูกมากขึ้น แสดงให้เห็นว่า TGF- β 1 มีคุณสมบัติในการชักนำให้เกิดการสร้างกระดูก และการตอบสนองต่อการสร้างกระดูกแปรผันตรงกับความเข้มข้นของ TGF- β 1 [33]

การศึกษาเกี่ยวกับ SIS ทั้งใน in vitro และ in vivo

Small intestinal submucosa (SIS) ซึ่งได้มาจากลำไส้เล็กของหนูชั้น submucosa โดยการลอกเอาชั้น tunica serosa และ tunica muscularis ออก SIS มีองค์ประกอบเป็นคอลลาเจน ชนิดที่ 1 และชนิดที่ 3 มากกว่า 90% และยังพบคอลลาเจน ชนิดที่ 5 จำนวนเล็กน้อย [34] นอกจากนี้ใน SIS ยังมีโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ กระตุ้นการเจริญเปลี่ยนแปลงของเซลล์ได้ ซึ่งโปรตีนดังกล่าวเป็นสารประเภทไซโตไคน์ (cytokines) เช่น FGF, TGF- β , epidermal growth factor (EGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) และ IGF-1 เป็นต้น ซึ่งมีผลทำให้มีการกระตุ้นการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดได้ รวมทั้ง SIS กระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันได้น้อย มีคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการยึดเกาะของเซลล์ และมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการเจริญเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดได้ [1,2]

Ahn Hee Hyun และคณะ ในปี 2007 ได้ทำการศึกษาผลของ native SIS และ acid treat SIS ต่อ human bone marrow stem cells พบว่า ผิวของ native SIS มีลักษณะของเส้นใยคอลลาเจนยาวสานกันเป็นร่างแห มีความสามารถในการอุ้มน้ำได้ 500% น้อยกว่า acid treat SIS ที่สามารถอุ้มน้ำได้ 1,300% และลักษณะของผิว acid treat SIS ไม่พบเส้นใยไฟเบอร์และไฟบริวเนื่องจากถูกทำลายด้วยกรด เมื่อนำมาทำการเพาะเลี้ยงร่วมกับ human bone marrow stem cells พบว่าทั้ง native SIS และ acid treat SIS มีความสามารถในการกระตุ้นการเจริญเพิ่มจำนวนของ human bone marrow stem cells ได้เช่นเดียวกัน แต่มีความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการเจริญเพิ่มจำนวนได้มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงเซลล์ใน polyglycolic acid (PGA) [1]

จากการศึกษาของ Kim Suk Moon และคณะ ในปี ค.ศ. 2005 ได้ศึกษาการใช้ SIS sponge มีความสามารถในการช่วยรักษาแผลได้เช่นเดียวกับ Tegaderm™ (ผลิตภัณฑ์ที่ใช้สำหรับการรักษาแผล) ซึ่งพบว่า SIS sponge มีรูพรุนขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 100-200 μm มีความสามารถในการดูดซึมน้ำได้มากกว่า 8,000% ความสามารถในการดูดซึมน้ำจะลดลงถ้าความเข้มข้นของ SIS ที่ใช้เตรียม SIS sponge มากขึ้น SIS sponge สามารถดูดซึมของเหลวที่ไหลออกมาจากแผลได้แล้วยังกระตุ้นให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อขึ้นมา ทำให้เกิดการรักษาแผลได้เร็วกว่าการใช้ Tegaderm™ ทำให้เห็นถึงความสามารถในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้ [2]

การศึกษาศักยภาพในการกระตุ้น cryopreserved human bone marrow mesenchymal stem cells ให้เกิดการเจริญเพิ่มจำนวนและการเจริญเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกด้วย DBM ของ Liu Guangpeng และคณะ ในปี ค.ศ. 2008 ซึ่งได้ทำการวิจัยโดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ใน partially demineralized bone matrix scaffolds และเพาะเลี้ยงใน osteogenic media ตัวควบคุมเป็น non-cryopreserved MSCs ทำการศึกษา DNA content assay ตรวจวัด alkaline phosphatase activity และ osteocalcin content เพื่อศึกษาศักยภาพในการเจริญเพิ่มจำนวน และความสามารถในการเจริญเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ปลายทางสร้างกระดูกในเซลล์ทดลอง (in vitro) พบว่าการทำ cryopreservation ไม่ได้ทำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงคุณสมบัติแตกต่างไปจากเดิม หลังจากนั้นทำการฝังในหนูทดลอง (in vivo) พบว่า cryopreserved human bone marrow mesenchymal stem cells มีความสามารถในการเจริญเพิ่มจำนวนและเจริญเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ปลายทางในการสร้างกระดูกได้ [35] Zhao Lin และคณะ ได้ทำการศึกษา tissue-engineer membrane เลียนแบบเยื่อหุ้มกระดูก (periosteum) ที่เตรียมใน in vitro เพื่อทดสอบ

ความสามารถในการทำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกขึ้นใหม่ โดยใช้ porcine SIS เป็น scaffold ในการเพาะเลี้ยง MSCs ซึ่งในงานวิจัยนี้ทำให้เกิด bone defect เพื่อตรวจสอบความสามารถในการกระตุ้นการสร้างเนื้อเยื่อกระดูก พบว่า tissue-engineer membrane นี้มีความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกได้ [36]

Suckow และคณะ ในปี 1999 ได้ทำการศึกษาความสามารถของ SIS ต่อการเจริญของกระดูกที่เกิดความบกพร่องของกระดูกยาวใน Sprague-Dawley rat เนื่องจาก SIS เป็นวัสดุที่นำมาใช้ศึกษาทดลองได้ง่าย โดยนำมาใช้ในการทดลองทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ในการศึกษานี้ได้ทำการฝัง SIS, demineralized cortical bone หรือ ovalbumin เข้าไปยังบริเวณกระดูกที่บกพร่อง แล้วดูการเจริญพัฒนาของกระดูกที่บกพร่องในสัปดาห์ที่ 3, 6, 12 และ 24 ผลที่ได้จากการศึกษาพบว่า หลังจากที่ฝัง SIS หรือ demineralized cortical bone นาน 3 สัปดาห์ ลักษณะที่เกิดขึ้นนั้นเกิดจากมีการแทรกตัวของ mononuclear cells และยัง พบว่ามีเนื้อเยื่อเกิดขึ้นใหม่ใน 3 สัปดาห์แรกพบมีกระดูกอ่อนเกิดขึ้น และ 6 สัปดาห์ พบมีการสร้างกระดูกในหนูที่ถูกฝังด้วย SIS แสดงว่า SIS เป็นวัสดุที่มีความสามารถในการชักนำการเจริญพัฒนาของกระดูกใหม่ในกระดูกที่เกิดความบกพร่องได้ จึงเป็นประโยชน์ในการนำ SIS มาใช้เป็นวัสดุในการซ่อมแซมกระดูก [37]

ในกระบวนการสร้างกระดูกนั้นสามารถตรวจสอบได้หลายวิธีโดยตรวจการแสดงออกของตัวบ่งชี้ต่าง ๆ ของเซลล์สร้างกระดูก (osteoblasts) เช่น alkaline phosphatase activity assay และ osteogenesis specific gene expression เช่น collagen type I, osteopontin, ALP, RUNX2, bone sialoprotein และ osteocalcin เป็นต้น หรือด้วยวิธีการย้อมสีเพื่อวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ เช่น การทำ von Kossa staining เป็นการย้อมสีเนื้อเยื่อเพื่อดูการสะสมแคลเซียมที่เกิดขึ้น alizarin red staining เป็นการย้อมสีเนื้อเยื่อเพื่อวิเคราะห์แคลเซียมในเนื้อเยื่อ ในปี ค.ศ. 1992 Gutkin และคณะ ได้ศึกษากลไกของกระบวนการสร้างกระดูกที่เกิดขึ้นผิดที่ (ectopic site) โดยการชักนำให้เกิดการสร้างกระดูกด้วย DBM ซึ่งในการวิเคราะห์ถึงการสร้างกระดูกใหม่โดยการวิเคราะห์จากการแสดงออกของตัวบ่งชี้ของ osteoblasts คือ alkaline phosphatase activity พบว่า ในสัปดาห์ที่ 1 ของกระบวนการสร้างกระดูกมีการแสดงออกของ alkaline phosphatase activity ในระดับต่ำ ในสัปดาห์ที่ 2-3 มีระดับ alkaline phosphatase activity สูงขึ้น และในสัปดาห์ที่ 4-6 ระดับของ alkaline phosphatase activity คงที่ [39] ซึ่ง alkaline phosphatase ที่กล่าวถึงนั้นเป็น hydrolase enzyme ชนิดหนึ่งที่พบอยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ของ osteoblasts ซึ่งมีความสำคัญต่อกระบวนการสร้างกระดูก (bone formation) และกระบวนการสะสมแร่ธาตุ (mineralization)

ซึ่ง alkaline phosphatase สามารถเป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญของการเจริญพัฒนาของเซลล์สร้างกระดูก
ได้ [38] ในการศึกษาเกี่ยวกับการสร้างกระดูกสามารถใช้ alkaline phosphatase เป็นตัวบ่งชี้
ได้ ซึ่งพบระดับสูงในเซลล์ preosteoblasts และ osteoblasts รวมทั้งการเจริญการเปลี่ยนแปลง
ของเซลล์เพาะเลี้ยงไปเป็นเซลล์ osteoblasts สามารถตรวจพบได้ด้วย
วิธี immunohistochemistry [40]



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ประชากร

ประชากร (Target population) ผู้เข้ารับการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อมด้วยการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม

ประชากรกลุ่มตัวอย่าง (Sample population) ผู้เข้ารับการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อมด้วยการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย

เกณฑ์การคัดเลือกเข้าศึกษา (Inclusion criteria) ผู้เข้ารับการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อมด้วยการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียมที่ไม่มีการอักเสบที่เกิดจากการติดเชื้อ และยินยอมที่จะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้

เกณฑ์การคัดออก (Exclusion criteria) ผู้เข้ารับการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อมด้วยการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียมที่มีการอักเสบที่เกิดจากการติดเชื้อ และไม่ยินยอมที่จะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. Autoclave (Hydroclave Harvey, USA)
2. Automatic adjustable micropipette (Eppendorf, Germany)
3. Balance (Sartorius)
4. Beaker (Pyrex, USA)
5. Centrifuge, microcentrifuge high speed (Eppendorf, USA)
6. Centrifuge, refrigerated centrifuge (Beckman, USA)
7. CO₂ cell culture incubator (Forma Scientific, England)
8. Combs (BIO-RAD, USA)
9. Cuvette 80-100 µl

10. Cylinder (Pyrex, USA)
11. Digital timer
12. Electrophoresis chamber set (BIO-RAD, USA)
13. Flask (Pyrex, USA)
14. Forceps, operation blade
15. Freezer -80°C (Forma Scientific, USA)
16. Laminar flow hood (Newlab, USA)
17. Multiskan EX (Thermo)
18. Pulverisetto (Fritsch, Germany)
19. Ultrasonic

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. 6-well plate, 24-well plate, 96-well plate (Corning, USA)
2. Pierce[®] BCA[™] protein assay kit
3. Cell culture flask: T25, T75 (Falcon, USA)
4. Cell scraper (Corning, USA)
5. Centrifuge tube, sterile (Eckart, USA)
6. Clorox
7. Cryovial tube (Corning, USA)
8. Disposable gloves
9. Gel foam[®]

10. Glass pipette (Witeg, Germany)
11. Micro tube 1.5 ml (BIO-RAD, USA)
12. Microscope glass cover slips (Chance, England)
13. Needle, sterile (Nipro)
14. PCR marker (Bio-Rad, USA)
15. Pipette tip (AxyGen, USA)
16. RNA isolation RNeasy Mini kit (Qiagen)
17. SuperScript™ III Platinum® One-Step quantitative RT-PCR system (Invitrogen)
18. Syringe disposable (Nipro, Japan)

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. 2-amino-2-methyl-1-propanol (Sigma, USA)
2. Absolute ethanol (Merck, USA)
3. Acetic acid glacial (Merck, USA)
4. Agarose molecular biology grade (Sigma, USA)
5. Ascorbic acid
6. Betadine
7. Bovine serum albumin (Sigma, USA)
8. Brij 35
9. Bromophenol blue (Sigma, USA)
10. Calcium reagent Arsenazo III

11. Dimethyl sulfoxide (DMSO)
12. Ethanol
13. Ethidium bromide (Sigma, USA)
14. Fetal bovine serum (Hyclone, USA)
15. Formaldehyde (Sigma, USA)
16. Hydrochloric acid (Merck, USA)
17. Hydrogen peroxide (Siribuncha, Thailand)
18. Isopropyl alcohol
19. Oligonucleotide primers (BSU, Thailand)
20. Para-nitrophenol (pNP) (Sigma, USA)
21. Para-nitrophenyl phosphate (pNPP) (Sigma, USA)
22. Penicillin/Streptomycin (Sigma, USA)
23. Pepsin
24. Phosphate buffer saline (PBS)
25. Potassium chloride (Sigma, USA)
26. Potassium dihydrogen phosphate (Sigma, USA)
27. Sodium chloride (Sigma, USA)
28. Sodium citrate (Mallinckrodt)
29. Sodium hydroxide
30. Sodium phosphate (Sigma, USA)

31. Thiopental sodium
32. Tryphan blue (Sigma, USA)
33. Trypsin (Sigma, USA)
34. α -Minimum Essential Medium with L-Glutamine (Hyclone, USA)
35. β -Mercaptomethanol (Sigma, USA)

การเก็บรวบรวมข้อมูล

1. จำนวนของเซลล์
2. ระดับ alkaline phosphatase activity
3. ปริมาณโปรตีน
4. ภาพถ่ายจากการทำ agarose gel electrophoresis
5. ค่าความเข้มของแถบ DNA/RNA บน agarose gel electrophoresis
6. ภาพถ่ายชิ้นเนื้อตรวจวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์

ข้อมูลทั้งหมดที่ได้ทำการเก็บโดยการจัดเก็บและบันทึกลงคอมพิวเตอร์

การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

การเก็บตัวอย่างเยื่อหุ้มกระดูก

ทำการเก็บส่วนชิ้นเยื่อหุ้มกระดูกจากกระดูกที่ตัดออกในการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่า โดยทำการคัดเลือกผู้เข้าร่วมโครงการจากผู้เข้ารับการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อม ด้วยการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม ที่ไม่มีการอักเสบที่เกิดจากการติดเชื้อ และยินยอมที่จะเข้าร่วมในโครงการวิจัย

การแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก

นำเยื่อหุ้มกระดูก (periosteum) จากอาสาสมัครที่ลงชื่อยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย ทำความสะอาดโดยล้างเลือดที่ติดเยื่อหุ้มกระดูกออกด้วย α -MEM (α -minimum essential medium) ที่มีความเข้มข้น penicillin/streptomycin 200 หน่วย/มิลลิลิตร จากนั้นทำการตัดเยื่อหุ้มกระดูกให้มีชิ้นขนาด 1x1 มิลลิเมตร แล้วนำชิ้นเนื้อเยื่อที่ได้วางลงใน T25 flask และเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด α -MEM ที่มี 10% fetal bovine serum (FBS) และ penicillin/streptomycin 200 หน่วย/มิลลิลิตร ทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C 5% CO₂ จากนั้นเมื่อเซลล์มีการเจริญโดยรอบ ๆ ชิ้นเนื้อเยื่อ แล้วทำการเพิ่มจำนวนเซลล์ด้วยการลอกเซลล์ออกจาก flask ด้วย 0.25% trypsin/EDTA แล้วทำการเลี้ยงเซลล์ที่ได้ใน T75 flask ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด α -MEM ที่มี 10% fetal bovine serum และ penicillin/streptomycin 100 หน่วย/มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37°C 5% CO₂

การเตรียม demineralized bone matrix

กระบวนการทำความสะอาดกระดูก

นำกระดูกที่ได้มาตัดให้มีชิ้นขนาดประมาณ 1 นิ้ว ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 4 ลิตร ที่มี 0.01X Allowash solution (Brij 35) แล้วนำไปล้างพร้อมเขย่าล้างหรือใช้เครื่องสั่นสะเทือนความเร็วสูง (sonicator) เป็นเวลาประมาณ 15 นาที ทำซ้ำจำนวน 3 ครั้ง หลังจากนั้นนำกระดูกมาล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วทำการเติม 3% H₂O₂ พร้อมกับนำไปเขย่าล้าง (หรือ sonicate) เป็นเวลาประมาณ 15 นาที ทำซ้ำจำนวน 3 ครั้ง แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น จากนั้นทำการเติม 70% isopropyl alcohol พร้อมกับนำไปเขย่าล้าง (หรือ sonicate) เป็นเวลาประมาณ 15 นาที ทำซ้ำจำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติมน้ำกลั่นแล้วนำไปเขย่าล้าง (หรือ sonicate) เป็นเวลาประมาณ 15 นาที ทำซ้ำจำนวน 2-3 ครั้ง ทำการย้ายชิ้นกระดูกที่ได้ใส่ลง centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วนำไป prefreeze ให้น้ำที่ตกค้างอยู่แข็งตัว ทำให้แห้งด้วยความเย็น (lyophilization) โดยนำเข้าเครื่อง freeze drier เพื่อทำให้แห้งประมาณ 2-3 วัน นำกระดูกที่ได้ไปบดเป็นผงแล้วทำการคัดกรองขนาดด้วย seive นำผงกระดูกที่ได้เก็บที่ -80°C

การลดปริมาณเกลือแร่ของเนื้อเยื่อกระดูก

นำผงกระดูกที่ได้ใส่ลงในภาชนะที่มีขนาดใหญ่ แล้วทำการเติม 0.1 N HCl ปริมาตร 10 เท่าของปริมาณผงกระดูกที่ใส่ลงไป จากนั้นนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 45 – 60 นาที แล้วนำออกมาจากเครื่องเขย่ารอให้ผงกระดูก

ตกตะกอน แล้วทำการเท HCl ออกให้เหลือแต่ผงกระดูก จากนั้นทำการเติม 0.1 N HCl ใหม่ โดยทำการเปลี่ยน 0.1 N HCl ทุก ๆ ชั่วโมง จนครบ 8 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการล้างผงกระดูก ด้วยน้ำกลั่นพร้อมกับเขย่าเป็นเวลา 5 – 10 นาที จำนวน 3 – 4 ครั้ง จากนั้นนำ DBM ที่ได้ใส่ลงใน centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร ทำการ prefreeze เพื่อให้ น้ำที่ตกค้างอยู่แข็งตัว แล้วทำ lyophilization โดยนำเข้าเครื่อง freeze drier เพื่อทำให้แห้งประมาณ 1-2 วัน นำ DBM ที่ได้เก็บที่อุณหภูมิ -80 °C ก่อนที่จะนำไปใช้ได้ผ่านกระบวนการปราศจากเชื้อ (sterilization) โดยการอบ ethylene oxide gas

การศึกษาเพื่อหาปริมาณแคลเซียม (calcium assay)

นำ DBM ปริมาตร 20 กรัม ใส่ลงในหลอดแก้วที่มี 1 N HCl แล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลาข้ามคืนเพื่อให้ DBM ละลายหมด จากนั้นนำสารละลายที่ได้ตรวจวัดปริมาณแคลเซียมที่เหลืออยู่ด้วย calcium reagent Arsenazo III โดยใช้ reagent Arsenazo ปริมาตร 1,250 ไมโครลิตร และสารละลายตัวอย่างปริมาตร 25 ไมโครลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 60 วินาที แล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร นำค่าที่ได้คำนวณหาปริมาณแคลเซียมที่เหลืออยู่ (DBM ที่นำมาใช้ในการวิจัย ต้องมีปริมาณแคลเซียมที่เหลืออยู่ไม่เกิน 3% ของปริมาณแคลเซียมทั้งหมดที่มี)

การเตรียม small intestinal submucosa (SIS)

นำลำไส้เล็กของหนูสดที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์ล้างทำความสะอาดเอากากอาหาร ไขมันออกให้หมด จากนั้นนำมาตัดให้เป็นชิ้นขนาดประมาณ 3 นิ้ว แล้วทำการลอกชั้น muscularis externa และชั้น serosa ออก นำลำไส้ที่ได้มากลับเอาด้านในออก ทำการขูดชั้น mucosa (ชั้นที่มีลักษณะเป็นเมือกชั้นในสุด) ออกเพื่อให้เหลือแต่ชั้น submucosa ของลำไส้หนูเท่านั้น แล้วนำไปแช่ด้วย 70% ethanol นำชิ้นที่ได้แช่ในน้ำ sterile cold deionized water ที่มี antibiotic (penicillin + streptomycin 200 หน่วย/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำลำไส้หนูชั้น submucosa ที่ได้มีลักษณะเยื่อบาง ๆ มาเข้าเครื่องบดปั่น (grinder mill) ให้ละเอียด จากนั้นนำมาแช่ใน 3 % acetic acid ผสมกับ 0.1% pepsin เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้น ทำการล้างกรดออกให้หมดด้วยน้ำกลั่น หรือ phosphate buffer saline แล้วนำส่วนที่ได้ใส่ลงใน centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปแช่แข็งเพื่อทำการ prefreeze ให้ น้ำที่ตกค้างอยู่แข็งตัว แล้วทำ lyophilization โดยนำเข้าเครื่อง freeze drier (ด้วยอุณหภูมิ -55°C เป็นเวลาประมาณ 2 วันจนแห้งสนิท) นำ SIS ที่ได้เก็บที่อุณหภูมิ -80°C ก่อนที่จะนำไปใช้ได้ผ่านกระบวนการปราศจากเชื้อ (sterilization) โดยการอบด้วย ethylene oxide gas

การศึกษาผลของ SIS และ DBM ต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก

ทำการทดสอบผลของ SIS, DBM และ SIS ผสมกับ DBM ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก โดยนำเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกมาเพาะเลี้ยงใน T25 flask ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด α -MEM ผสมกับ 2% FBS และ penicillin/streptomycin 100 หน่วย/มิลลิลิตร ซึ่งใช้เซลล์เริ่มต้น 5×10^4 เซลล์/flask แล้วทำการกระตุ้นด้วยสารกระตุ้นที่แตกต่างกัน ดังนี้

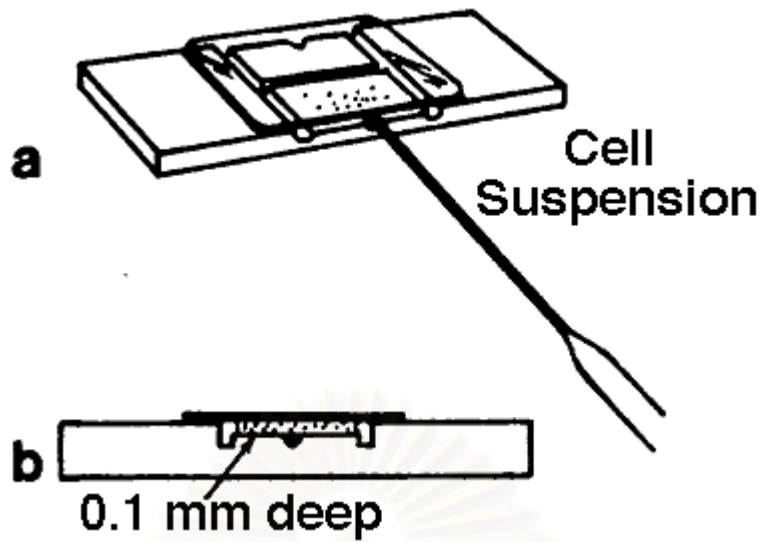
- กระตุ้นด้วย SIS 5, 10, 20 มิลลิกรัม/flask
- กระตุ้นด้วย DBM 5 มิลลิกรัม/flask
- กระตุ้นด้วย DBM 2.5 มิลลิกรัม/flask ผสมกับ SIS 2.5 มิลลิกรัม/flask
- กลุ่มควบคุม (ไม่ได้รับการกระตุ้น)

แล้วทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 0, 3, 5, 7 และ 10 วัน จากนั้นทำการวิเคราะห์การเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก ซึ่งวิเคราะห์จากจำนวนเซลล์ด้วยวิธี trypan blue staining assay เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการกระตุ้น SIS หรือ DBM โดยเมื่อครบเวลาทำการเก็บรวบรวมเซลล์ด้วย 0.25% trypsin/EDTA ลงใน centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร ทำการปั่นเหวี่ยงที่ 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บตะกอนเซลล์ที่ได้ แล้วทำการละลายตะกอนเซลล์ด้วย 1 มิลลิลิตร ของ α -MEM แล้วทำการบีบอัดสารละลายเซลล์ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ผสมกับ 25 ไมโครลิตร ของ trypan blue จากนั้นทำการดูดลง hemocytometer แล้วทำการนับจำนวนเซลล์ที่ไม่ติดสีย้อมผ่านกล้องจุลทรรศน์ (ในการนับจำนวนเซลล์จะทำการนับเฉพาะเซลล์ที่มีชีวิตอยู่จะไม่ติดสีย้อมของ trypan blue ส่วนเซลล์ที่ตายจะติดสีย้อมของ trypan blue เป็นสีน้ำเงิน)

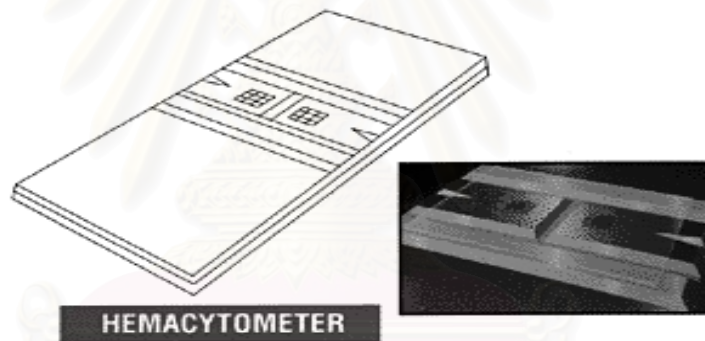
การคำนวณจำนวนเซลล์

จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต = ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ที่ไม่ติดสี $\times 10^4 \times$ dilution factor

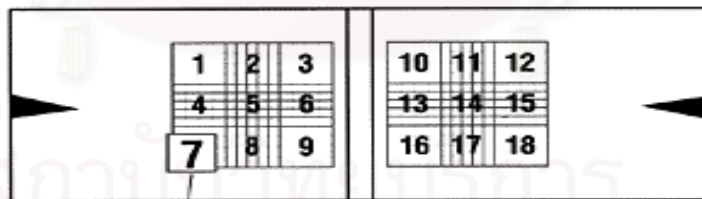
10^4 คือ ปริมาตรต่อหนึ่ง square



รูปที่ 6 hemocytometer ที่ใช้ในการนับจำนวนเซลล์ [41]

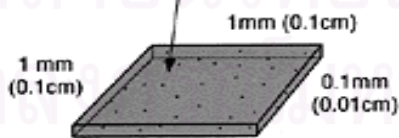


HEMACYTOMETER



COUNTING GRIDS
(9 squares each)

Note: Good counting range is 20-40 cells per square.



ONE SQUARE

$$\begin{aligned}
 L \times W \times H &= 0.1\text{mm}^3 \\
 1\text{mm} \times 1\text{mm} \times 0.1\text{mm} &= 0.0001\text{cm}^3 \\
 0.1\text{cm} \times 0.1\text{cm} \times 0.01\text{cm} &= 10^{-4}\text{cm}^3 \\
 &= 10^{-4}\text{ml} \\
 &= \text{volume of liquid covering square}
 \end{aligned}$$

$$[1\text{cm}^3 = 1\text{ml}]$$

The number of cells per ml are calculated by multiplying the average count per square by 10^4 .

รูปที่ 7 ลักษณะของ hemocytometer [42]

การศึกษาการแสดงออกของยีนที่บ่งชี้ถึงการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก

การสกัด RNA ของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก

นำเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกที่ได้เพาะเลี้ยงใน T25 flask ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด α -MEM ผสมกับ 2% FBS และ penicillin/streptomycin 100 หน่วย/ มิลลิลิตร จากนั้นทำการกระตุ้นด้วย SIS 5 มิลลิกรัม, DBM 5 มิลลิกรัม, SIS ผสมกับ DBM อย่างละ 2.5 มิลลิกรัม และกลุ่มควบคุม (ไม่ได้รับการกระตุ้น) ทำการกระตุ้นเป็นเวลา 0, 3, 5, 7 และ 10 วัน เมื่อครบเวลาทำการสกัด RNA จากเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกด้วย RNA isolation RNeasy Mini kit (Qiagen) โดยทำการเก็บรวบรวมเซลล์เมื่อกระตุ้นครบเวลา 0, 3, 5, 7 และ 10 วัน ด้วย 0.25% trypsin/EDTA นำเซลล์ที่ได้ลงใน centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร แล้วทำการปั่นเหวี่ยงที่ 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บตะกอนเซลล์ที่ได้ ต่อมาทำการกระจายตะกอนเซลล์ด้วย RLT buffer 350 ไมโครลิตร ที่มี β -Mercaptoethanol 3.5 ไมโครลิตร จากนั้นทำการ homogenize โดยผ่านเข็มเบอร์ 20 (เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.9 มิลลิเมตร) ประมาณ 5 ครั้ง แล้วเติม 70% ethanol ปริมาตร 350 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากันด้วยปิเปต ย้าย 700 ไมโครลิตร ของตัวอย่างที่ได้ลงใน RNeasy mini column แล้วทำการปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที จากนั้นเทสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ทิ้ง ทำการเติม RW1 buffer 700 ไมโครลิตร แล้วทำการปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที จากนั้นเทสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ทิ้ง แล้วเติม RPE buffer 500 ไมโครลิตร แล้วทำการปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที จากนั้นเทสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ทิ้ง ย้ายคอลัมน์ลงใน collection tube ใหม่ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ย้ายคอลัมน์ลงใน collection tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม 50 ไมโครลิตร RNase free water ลงในคอลัมน์ จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทำการวิเคราะห์ความเข้มข้น total RNA ที่ได้ด้วย spectrophotometer ที่ค่าการดูดกลืนแสง 260 นาโนเมตร

การสังเคราะห์ cDNA ด้วยวิธี Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

การสังเคราะห์ cDNA ของยีน osteoblastic marker ด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ RNA ที่สกัดได้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ cDNA และใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีนที่ควบคุมการแสดงออกของ alkaline phosphatase (ALP), Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) และ collagen type I (COL I) ดังนี้

ตารางที่ 2 ลำดับเบสของไพรเมอร์

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

การทำ RT-PCR ด้วย SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen) เริ่มจากการเตรียม master mix ซึ่งมีองค์ประกอบ ดังนี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 องค์ประกอบ RT-PCR

Component	Volume/reaction
2X Reaction Mix	25 μ l
Template RNA (0.01 pg - 1 μ g)	X μ l
Sense primer (10 μ M)	1 μ l
Anti-sense primer (10 μ M)	1 μ l
SuperScript™ III RT / Platinum® Taq Mix	2 μ l
Autoclaved distilled water	To 50 μ l

ซึ่งใช้สภาวะในการทำ RT-PCR ดังนี้

ตารางที่ 4 สภาวะในปฏิกิริยา RT-PCR

Step	Temp (°C)	Time (min)
cDNA synthesis	50	45
Denaturation	95	10
PCR amplification		
Denaturation	94	0.30
Annealing	60	0.30
Extension	72	0.40
35 cycles		
Final extension	72	10

จากนั้นทำการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน RUNX2, ALP, COL I และ GADPH (เป็น internal loading control) จากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ RT-PCR ด้วยวิธี electrophoresis โดยใช้ 2% agarose gel และตรวจวิเคราะห์ความเข้มของแถบ DNA ที่พบด้วยเครื่อง Gel Doc 1000 (BIO-RAD, USA) โปรแกรม Quantity One

การศึกษาผลของ DBM, SIS และ DBM ผสมกับ SIS ต่อการพัฒนาเปลี่ยนแปลงของ เซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกไปเป็นเซลล์กระดูก (osteoblast differentiation)

ทำการศึกษาผลของ DBM, SIS และ DBM ผสมกับ SIS ต่อการพัฒนาเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกไปเป็นเซลล์กระดูกด้วยวิธี alkaline phosphatase assay ซึ่งเป็นการศึกษาจากระดับการทำงาน (activity) ของเอนไซม์ alkaline phosphatase ที่อยู่บริเวณผนังเซลล์ โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกใน T25 flask ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด α -MEM ผสมกับ 2% FBS และ penicillin/streptomycin 100 หน่วย/มิลลิลิตร แล้วทำการกระตุ้น ดังนี้

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

เป็นเวลา 0, 3, 5, 7 และ 10 วัน จากนั้นทำการเติม sterile deionized water อุณหภูมิ 4°C ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทำการขูดเซลล์ด้วย scraper รวบรวมเซลล์ที่ได้ลงใน centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร จากนั้นทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องสั่นสะเทือนความเร็วสูง (sonicator) ที่ 30% amplitude เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นปิเปตสารละลายตัวอย่าง 200 ไมโครลิตร ที่ได้ลงใน 96 well-plate ทำการเติม 40 ไมโครลิตร ของ p-nitrophenyl phosphate (p-NPP) จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ที่มีเป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบเวลาทำการเติม 10 N sodium hydroxide ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา แล้วทำการวัดปริมาณความเข้มข้นของ p-nitrophenol (p-NP) ที่เกิดขึ้น (สีเหลือง) ด้วย microplate reader ที่ค่าดูดกลืนแสง 405 นาโนเมตร จากนั้นทำการคำนวณวิเคราะห์ระดับการทำงานของ alkaline phosphatase โดยเปรียบเทียบกับปริมาณโปรตีนทั้งหมดของเซลล์

การคำนวณ extinction coefficient ของ para-nitrophenol

ตารางที่ 5 การหาค่า extinction coefficient ของ p-NP

ปริมาณ 50 μ M p-NP (ไมโครลิตร)	ปริมาณของ deionized water (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นของ p-NP (ไมโครโมลาร์)
0	250	0
50	200	10
125	125	25
200	50	40

นำ p-NP ที่เตรียมลงใน 96 well-plate จากนั้นทำการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร หลังจากนั้นทำการคำนวณหา extinction coefficient ของ p-NP จากค่าดูดกลืนแสงที่ได้กับความเข้มข้นของ p-NP

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนทั้งหมดด้วย Pierce[®] BCA[™] protein assay kit โดยทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานดังตารางที่ 6 และ 7 จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างที่ได้จากการทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องสั่นสะเทือนความเร็วสูง (sonicator) ในการวิเคราะห์ระดับทำงานของ alkaline phosphatase และสารละลายมาตรฐานที่ได้ปิเปต 25 ไมโครลิตร ลงใน 96 well-plate ทำการเตรียมสารละลาย working reagent (reagent A : reagent B) (50:1) แล้วทำการปิเปต 200 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมที่ได้สารละลายตัวอย่าง จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาทำการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร ทำการคำนวณหาปริมาณโปรตีนทั้งหมด

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA) (ความเข้มข้น stock ของ BSA = 2,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

ดังนี้

ตารางที่ 6 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน BSA

(ในช่วงความเข้มข้น 5 - 250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

หลอดที่	ปริมาตร diluents (ไมโครลิตร)	ปริมาตร BSA (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้น BSA (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
1	700	100 ของ stock	250
2	400	400 ของหลอดที่ 1	125
3	450	300 ของหลอดที่ 2	50
4	400	400 ของหลอดที่ 3	25
5	400	100 ของหลอดที่ 4	5
6	400	0	0 (blank)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน BSA

(ในช่วงความเข้มข้น 20 - 2,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

หลอดที่	ปริมาตร diluents (ไมโครลิตร)	ปริมาตร BSA (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้น BSA (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
1	0	300 ของ stock	2,000
2	125	375 ของ stock	1,500
3	325	325 ของ stock	1,000
4	175	175 ของหลอดที่ 2	750
5	325	325 ของหลอดที่ 3	500
6	325	325 ของหลอดที่ 5	250
7	325	325 ของหลอดที่ 6	125
8	400	100 ของหลอดที่ 7	25
9	400	0	0 (blank)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การศึกษาความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ของ DBM, SIS และ DBM ผสมกับ SIS ในสัตว์ทดลอง

ทำการศึกษาความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ในหนูทดลอง (Wistar rat) ตัวผู้ อายุ 10 สัปดาห์ น้ำหนัก 200-250 มิลลิกรัม จำนวน 8 ตัว โดยทำการแบ่งเป็นกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลองที่ทำการฝัง ดังนี้

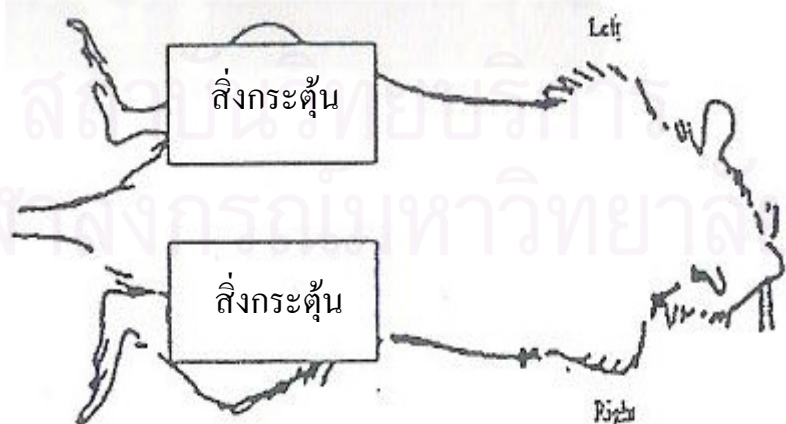
กลุ่มควบคุม - Gel foam[®]

กลุ่มทดลอง - กระตุ้นด้วย SIS 20 มิลลิกรัม

- กระตุ้นด้วย DBM 20 มิลลิกรัม

- กระตุ้นด้วย DBM 10 มิลลิกรัม ผสมกับ SIS 10 มิลลิกรัม

ทำการอดอาหารหนูทดลองอย่างน้อย 4 ชั่วโมง จากนั้นชั่งน้ำหนักหนูแต่ละตัว แล้วทำการสลบหนูโดยใช้ยาสลบ thiopental sodium ความเข้มข้น 60 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ต่อ 10% น้ำหนักตัวหนูทดลอง (กรัม) ทางช่องท้อง ทำการตัดขนบริเวณหลังและต้นขาหลังของหนูทั้งสองข้าง ทำการเช็ดทำความสะอาดด้วย 70% ethanol และนํายาเบตาดีนบริเวณที่จะทำการผ่าตัด จากนั้นทำการกรีดผิวหนังและแยกชั้นกล้ามเนื้อ แล้วทำการฝังสารตัวอย่างลงในชั้นกล้ามเนื้อ ทำการเย็บปิด 2 ชั้น ของชั้นกล้ามเนื้อและชั้นผิวหนัง แล้วทานํายาเบตาดีนบริเวณแผลที่เย็บ ทำการฝังเป็นเวลา 6 สัปดาห์



รูปที่ 8 ตำแหน่งที่ทำการฝังในสัตว์ทดลอง

หลังจากครบกำหนด 6 สัปดาห์ นำหนูทดลองซึ่งน้ำหนักหนูแต่ละตัว แล้วทำการสลบหนู โดยให้ยาสลบ thiopental sodium ความเข้มข้น 60 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ต่อ 10% น้ำหนักตัวหนูทดลอง (กรัม) ทางช่องท้อง จากนั้นทำการตัดชนบริเวณหลังต้นขาหลังของหนูทั้งสองข้าง จากนั้นทำการแช่ทำความสะอาดด้วย 70% ethanol และน้ำยาเบตาดีนบริเวณที่จะทำการผ่าตัด ทำการกรีดชั้นผิวหนังแยกออกให้เห็นชั้นกล้ามเนื้อบริเวณที่ทำการฝังสิ่งกระตุ้น ตัดกล้ามเนื้อรอบ ๆ บริเวณที่ทำการฝังสารตัวอย่าง นำชิ้นเนื้อที่ตัดแช่ลงใน 10% formaldehyde จากนั้นทำการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยทำการย้อม hematoxylin & eosin เพื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณของกระดูกที่สร้างขึ้นใหม่

การวิเคราะห์ข้อมูล

สถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistics) เป็นสถิติที่เกี่ยวข้องกับการเก็บรวบรวมข้อมูล และการนำเสนอข้อมูล โดยจะแสดงเป็น ค่าเฉลี่ย (mean) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ในรูปแบบกราฟและตาราง

สถิติเชิงอนุมาน (inferential statistic) เป็นสถิติที่ใช้สรุปผลของประชากรเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลอง ได้แก่ unpaired t-test สำหรับเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูล 2 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน ANOVA สำหรับเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยมากกว่า 2 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน หรือ Chi-square tests สำหรับทดสอบความสัมพันธ์ของตัวแปรที่จำแนกเป็นกลุ่ม (categorical data) และ correlation สำหรับตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต่อเนื่อง 2 ตัวแปร แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม โดยจะถือว่าความแตกต่างนั้นมีนัยสำคัญทางสถิติก็ต่อเมื่อ $p < 0.05$

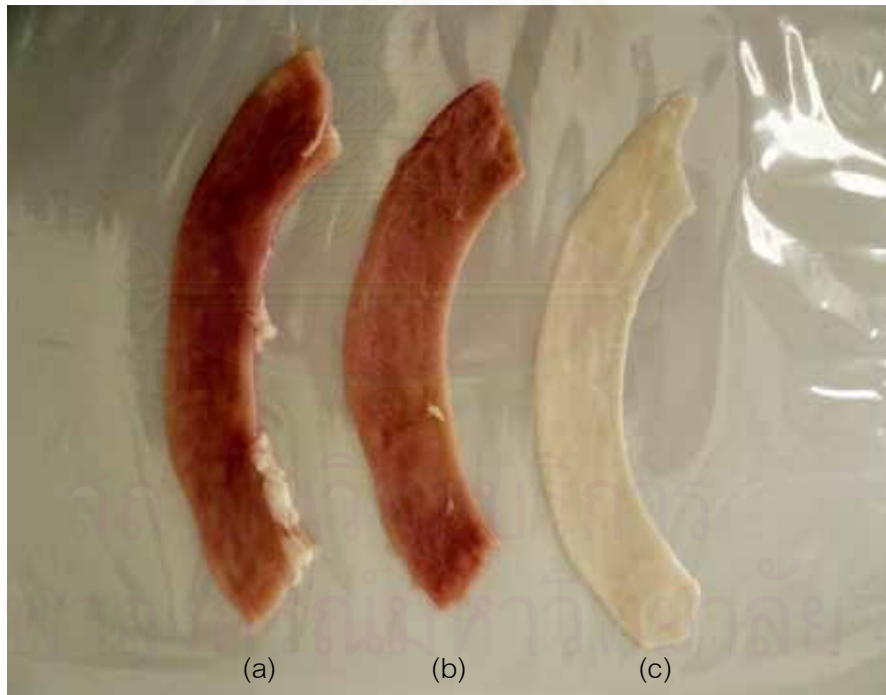
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

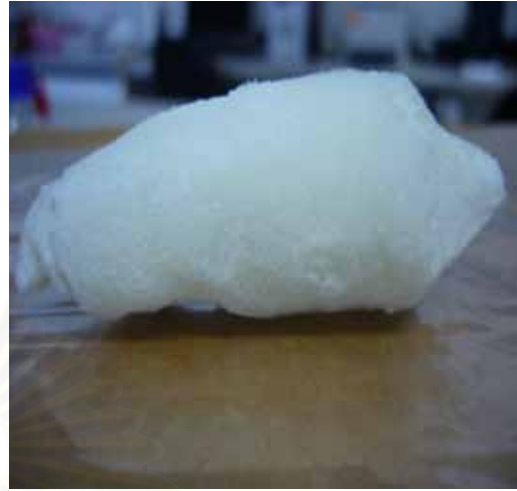
ผลการวิเคราะห์

การศึกษาความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกของลำไส้เล็กหนูชั้นสับมิวโคซาและเนื้อกระดูกที่ผ่านการลดปริมาณเกลือแร่ ในการศึกษานี้ได้ทำการเตรียมลำไส้หนูชั้น submucosa พบว่าหลังจากทำการลอกชั้น muscularis externa และชั้น serosa ออก ลำไส้หนูมีลักษณะเป็นเยื่อสีขาว มีความเหนียว (รูปที่ 9) จากนั้นนำลำไส้หนูส่วนที่ได้บดปั่นให้ละเอียดมากที่สุดแช่ใน 3 % acetic acid ผสมกับ 0.1% pepsin เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วทำให้แห้งด้วยกระบวนการ lyophilization พบว่าลำไส้หนูมีการเกาะตัวกันเป็นก้อนที่มีความเหนียว (รูปที่ 10) และจากการเตรียม DBM พบว่ามีลักษณะเป็นผงขนาดระหว่าง 125 – 850 ไมครอน มีสีขาวขุ่น (รูปที่ 11)



รูปที่ 9 ลักษณะของ (a) ลำไส้หนู (b) ลำไส้หนูชั้น muscularis externa

(c) ลำไส้หนูชั้น submucosa



รูปที่ 10 ลักษณะของ SIS

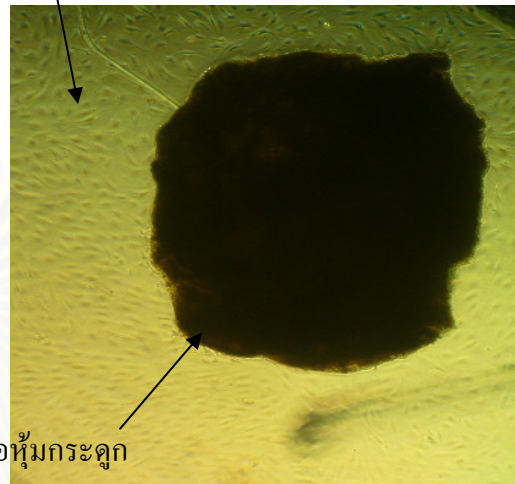
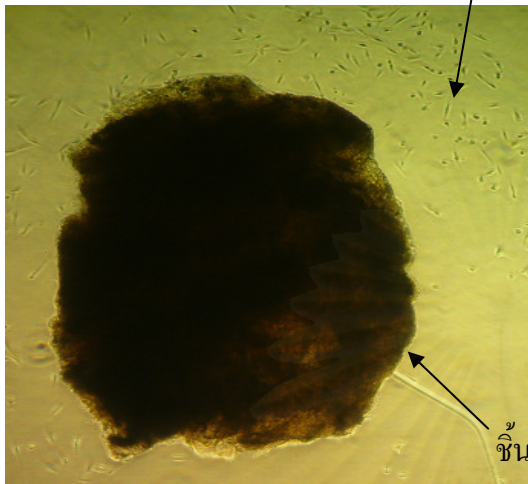


รูปที่ 11 ลักษณะของ DBM

จากนั้นทำการแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก พบว่าหลังจากทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใน T25 flask เพื่อทำการแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกเป็นเวลา 7 วัน พบมีเซลล์เจริญเพิ่มจำนวนเรียงตัวล้อมรอบขึ้นเนื้อเยื่อ (รูปที่ 12) และเมื่อเซลล์มีจำนวนมากขึ้น จึงทำการเพิ่มจำนวนเซลล์โดยการลอกเซลล์ออกจากภาชนะเพาะเลี้ยงด้วย 0.25% trypsin ทำการเพาะเลี้ยงใน T75 flask ที่มี α -MEM, 10% FBS และ penicillin/streptomycin 100 หน่วย/มิลลิลิตร พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกมีลักษณะคล้ายเซลล์ fibroblast (รูปที่ 13) เมื่อเซลล์เจริญเพิ่มจำนวนมากขึ้นจนเต็มภาชนะเพาะเลี้ยง แล้วจึงนำ

เซลล์ที่ได้ไปทำการวิเคราะห์การเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก และการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกเป็นเซลล์สร้างกระดูก

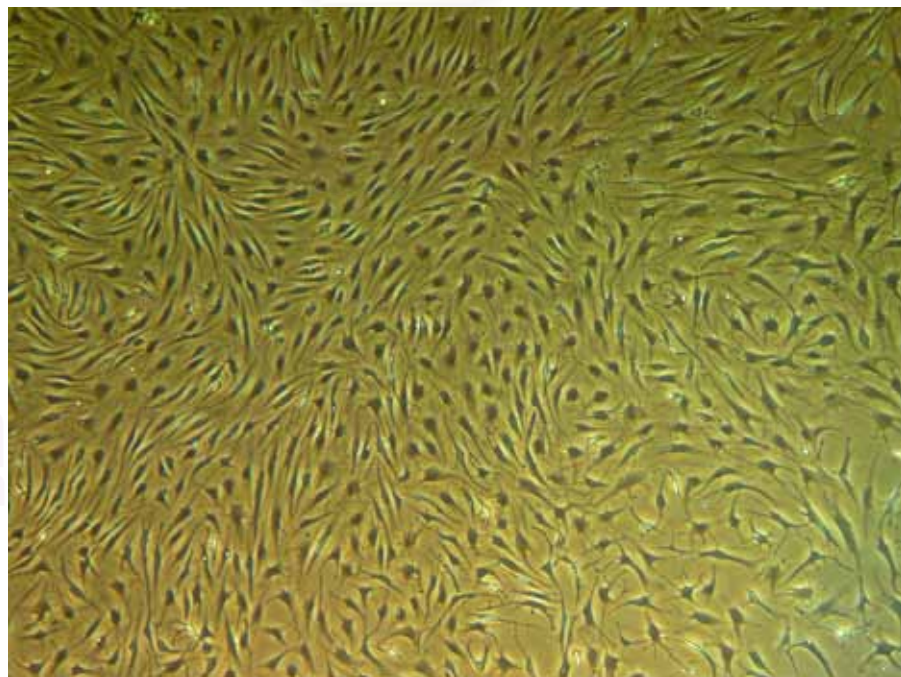
เซลล์เจริญเพิ่มจำนวนโดยรอบเยื่อหุ้ม



(a) เซลล์เจริญเพิ่มจำนวนโดยรอบเยื่อหุ้มกระดูกในวันที่ 7

(b) เซลล์เจริญเพิ่มจำนวนโดยรอบเยื่อหุ้มกระดูกในวันที่ 14

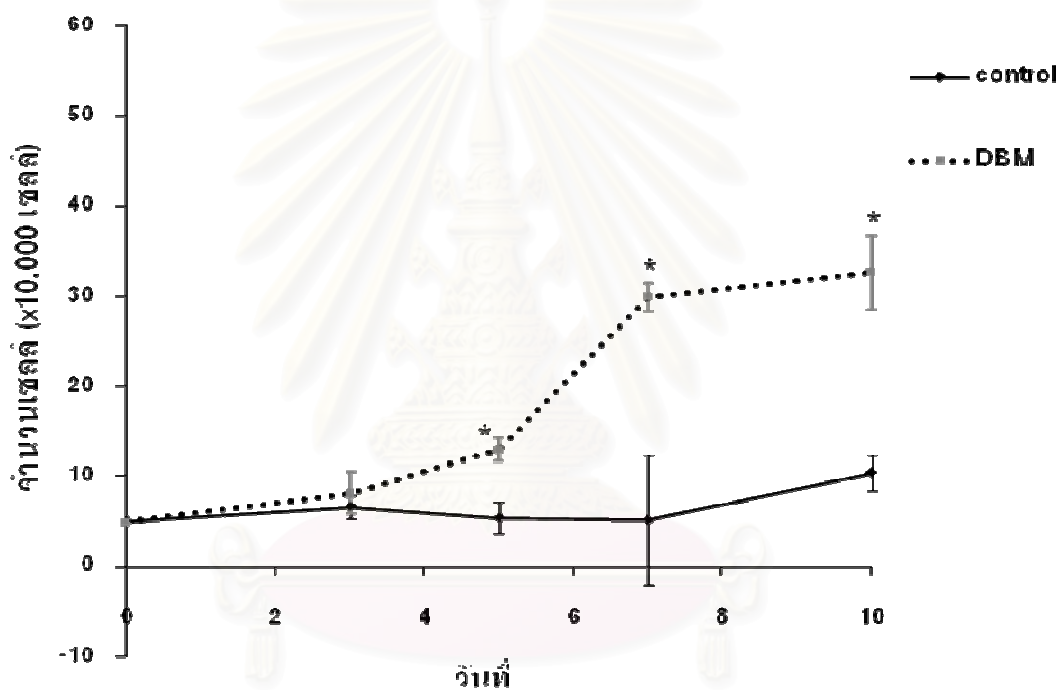
รูปที่ 12 เซลล์เจริญเพิ่มจำนวนเรียงตัวล้อมรอบเยื่อหุ้มกระดูก (กำลังขยาย x10)



รูปที่ 13 ลักษณะเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก (กำลังขยาย x10)

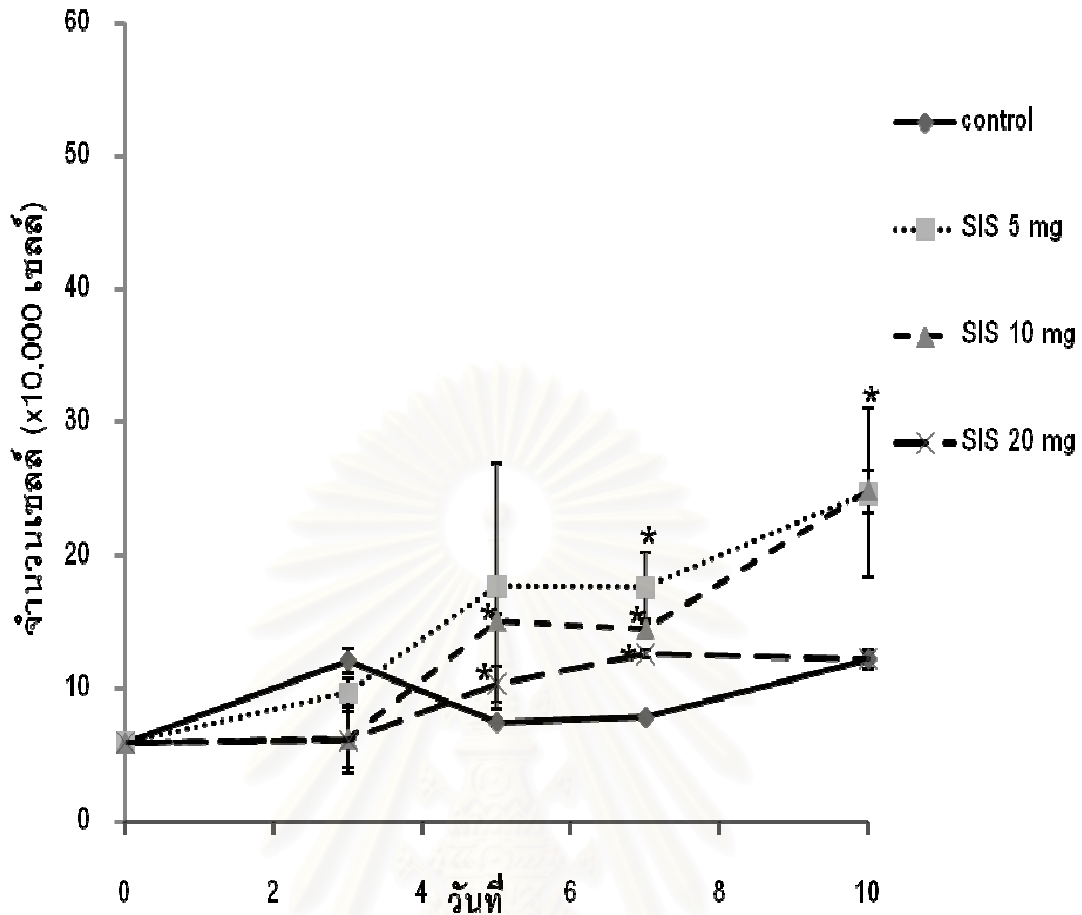
ผลการวิเคราะห์การศึกษาความสามารถของ SIS และ DBM ต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของ เซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก

จากการศึกษาผลของ SIS และ DBM ต่อการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกในการวิจัยนี้ ใช้กระดูกที่ผ่านการลดปริมาณเกลือแร่ที่มีปริมาณแคลเซียมเหลืออยู่น้อยกว่า 3% และใช้จำนวนเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกเริ่มต้น 5×10^4 เซลล์/flask เท่ากันทุกกลุ่มการทดลอง จากนั้นทำการกระตุ้นเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากเยื่อหุ้มกระดูก แล้วทำการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วยวิธี tryphan blue staining assay เมื่อครบ 3, 5, 7 และ 10 วันหลังจากที่กระตุ้น



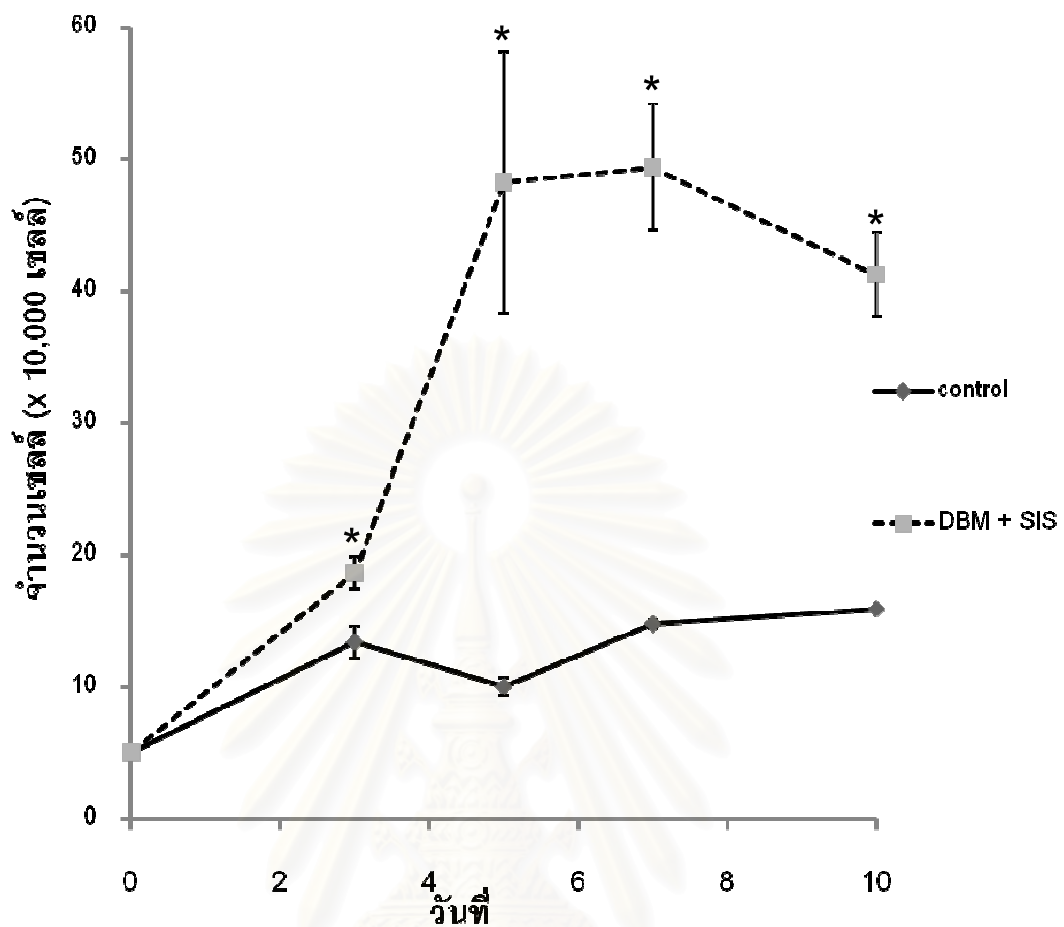
รูปที่ 14 ผลของ DBM ต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ (* p<0.05)

รูปที่ 14 แสดงผลการศึกษาความสามารถของ DBM ต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก พบว่า เซลล์เยื่อหุ้มกระดูกเมื่อถูกกระตุ้นด้วย DBM 5 มิลลิกรัม ในวันที่ 5 เซลล์มีจำนวน 1.3×10^5 เซลล์ วันที่ 7 เซลล์มีจำนวน 2.99×10^5 เซลล์ เซลล์มีการเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการกระตุ้น และเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ซึ่งจะเพิ่มขึ้นสูงที่สุดในวันที่ 10 หลังจากกระตุ้นเซลล์มีจำนวน 3.3×10^5 เซลล์ เซลล์มีการเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการกระตุ้น



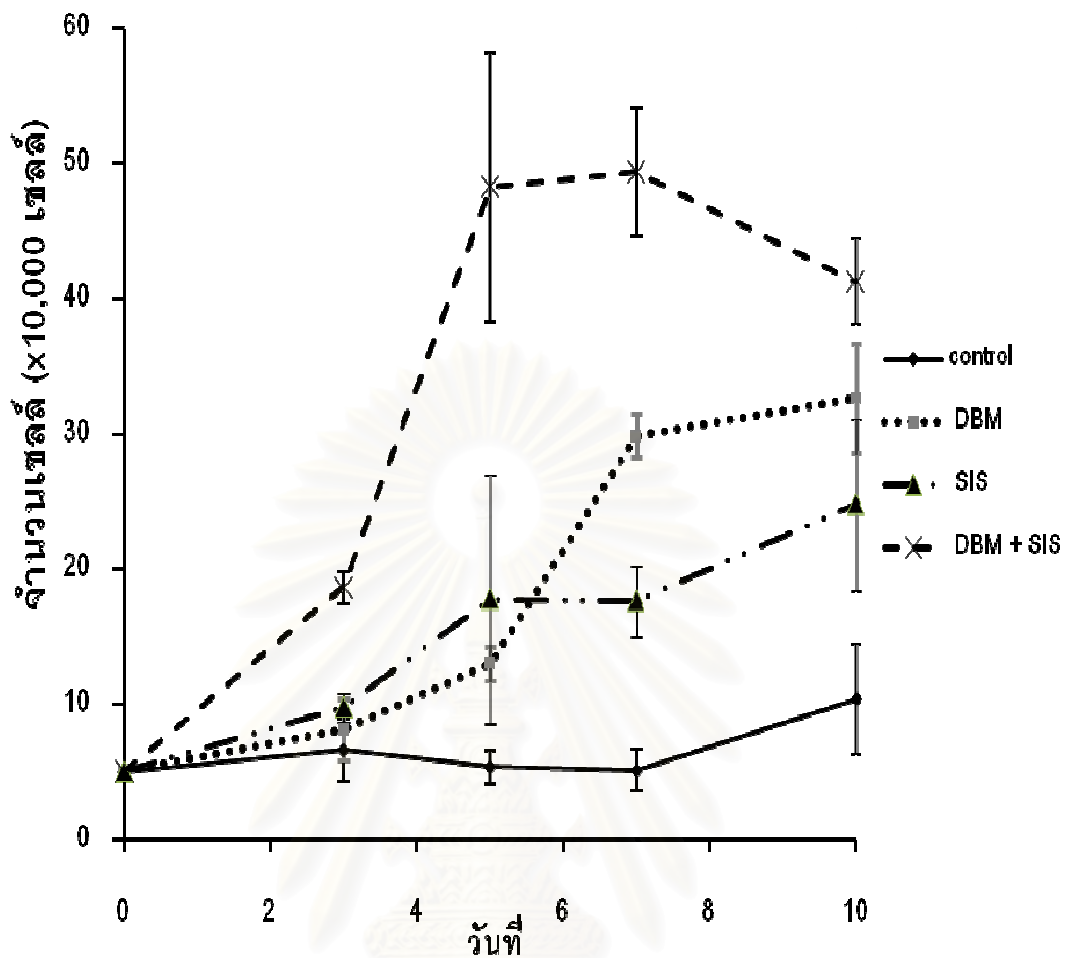
รูปที่ 15 ผลของ SIS ต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ (* $p < 0.05$)

รูปที่ 15 แสดงผลการศึกษาความสามารถของ SIS ต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก โดยกระตุ้นด้วย SIS ในปริมาณแตกต่างกัน พบว่าในการกระตุ้นด้วย SIS ปริมาณ 5 มิลลิกรัม ในวันที่ 7 มีผลต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เซลล์มีจำนวน 1.78×10^5 เซลล์ และในวันที่ 10 เซลล์มีจำนวน 2.48×10^5 เซลล์ เซลล์มีจำนวนเพิ่มขึ้นมากที่สุด สำหรับเซลล์ที่กระตุ้นด้วย SIS ปริมาณ 10 มิลลิกรัม ในวันที่ 5 หลังจากกระตุ้นเซลล์มีจำนวน 1.51×10^5 เซลล์ มีการเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 10 หลังจากกระตุ้น มีเซลล์ประมาณ 2.49×10^5 เซลล์ และในการกระตุ้นด้วย 5 หรือ 10 มิลลิกรัม ในวันที่ 10 ไม่แตกต่างกันในทางสถิติ ส่วนเซลล์ที่กระตุ้นด้วย SIS ปริมาณ 20 มิลลิกรัม พบว่าในวันที่ 5 มีจำนวนเซลล์เท่ากับ 1.04×10^5 เซลล์ เซลล์มีการเจริญเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) แต่มีการเจริญเพิ่มจำนวนน้อยกว่าในกลุ่มที่กระตุ้นด้วย 5 และ 10 มิลลิกรัม แสดงให้เห็นว่า SIS ปริมาณ 5 และ 10 มิลลิกรัม มีผลในการกระตุ้นให้เกิดการเจริญเพิ่มจำนวนได้ดีที่สุด และเป็นปริมาณที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้ในการกระตุ้นให้เกิดการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์



รูปที่ 16 ผลของ DBM ผสม SIS ต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ (* p<0.05)

จากผลการทดลองก่อนหน้าที่ SIS ปริมาณ 5 มิลลิกรัม และ DBM 5 มิลลิกรัม มีความสามารถในการกระตุ้นการเจริญเพิ่มจำนวนได้ดีที่สุด จึงเลือกที่จะใช้ปริมาณของ DBM ผสมกับ SIS รวมเป็น 5 มิลลิกรัม โดยใช้ SIS และ DBM อย่างละ 2.5 มิลลิกรัม ในการกระตุ้น รูปที่ 16 แสดงผลจากการศึกษาความสามารถของ DBM ผสมกับ SIS ต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก พบว่าในวันที่ 3 เซลล์มีจำนวน 1.86×10^5 เซลล์ เซลล์มีการเจริญเพิ่มจำนวนสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) และเซลล์มีการเจริญเพิ่มจำนวนสูงสุดในวันที่ 5 มีเซลล์เท่ากับ 4.83×10^5 เซลล์ เซลล์มีการเจริญเพิ่มจำนวนสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) จากนั้นพบว่าจำนวนเซลล์ไม่มีการเปลี่ยนแปลง และมีการลดลงในวันที่ 10 หลังจากกระตุ้น เซลล์มีจำนวน 4.13×10^5 เซลล์ เซลล์มีการเจริญเพิ่มจำนวนสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$)



รูปที่ 17 การเปรียบเทียบการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก

หลังจากกระตุ้นด้วย DBM, SIS และ DBM ผสมกับ SIS

จากการเปรียบเทียบการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกหลังจากที่ได้รับการกระตุ้นด้วย DBM, SIS และ DBM ผสมกับ SIS พบว่าหลังจากกระตุ้นด้วย DBM ผสมกับ SIS มีการเจริญเพิ่มจำนวนสูงขึ้นกว่ากลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วย DBM และ SIS เพียงชนิดเดียวตั้งแต่วันที่ 3 หลังจากกระตุ้น และพบว่าวันที่ 7 หลังจากกระตุ้นด้วย DBM การเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์สูงกว่าในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วย SIS แสดงว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกมีการเจริญเพิ่มจำนวนได้ดีที่สุดหลังจากกระตุ้นด้วย DBM ผสมกับ SIS

ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่บ่งชี้ถึงการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก

จากการศึกษาการแสดงออกในระดับยีนที่ควบคุมการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก โดยการวิเคราะห์ด้วย RT-PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีนที่มีการแสดงออกของ alkaline phosphatase, RUNX2 และ COL I ในการวิเคราะห์ใช้ RNA ที่สกัดได้จากเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกที่กระตุ้นด้วย DBM, SIS, DBM ผสมกับ SIS และกลุ่มควบคุม (ไม่ได้รับการกระตุ้น) ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด α -MEM ที่มี 1% FBS และ penicillin/streptomycin 100 หน่วย/มิลลิลิตร เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทำการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน RUNX2, ALP, COL I และ GAPDH (เป็น internal loading control) จากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ RT-PCR ด้วย agarose gel electrophoresis เพื่อทำการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ ALP, RUNX2 และ COL I ด้วยเครื่อง Gel Doc 1000 (BIO-RAD, USA) โปรแกรม Quantity One

RUNX 2 270 bp

300 bp →



GAPDH 452 bp

500 bp →



แถวที่ 1 maker

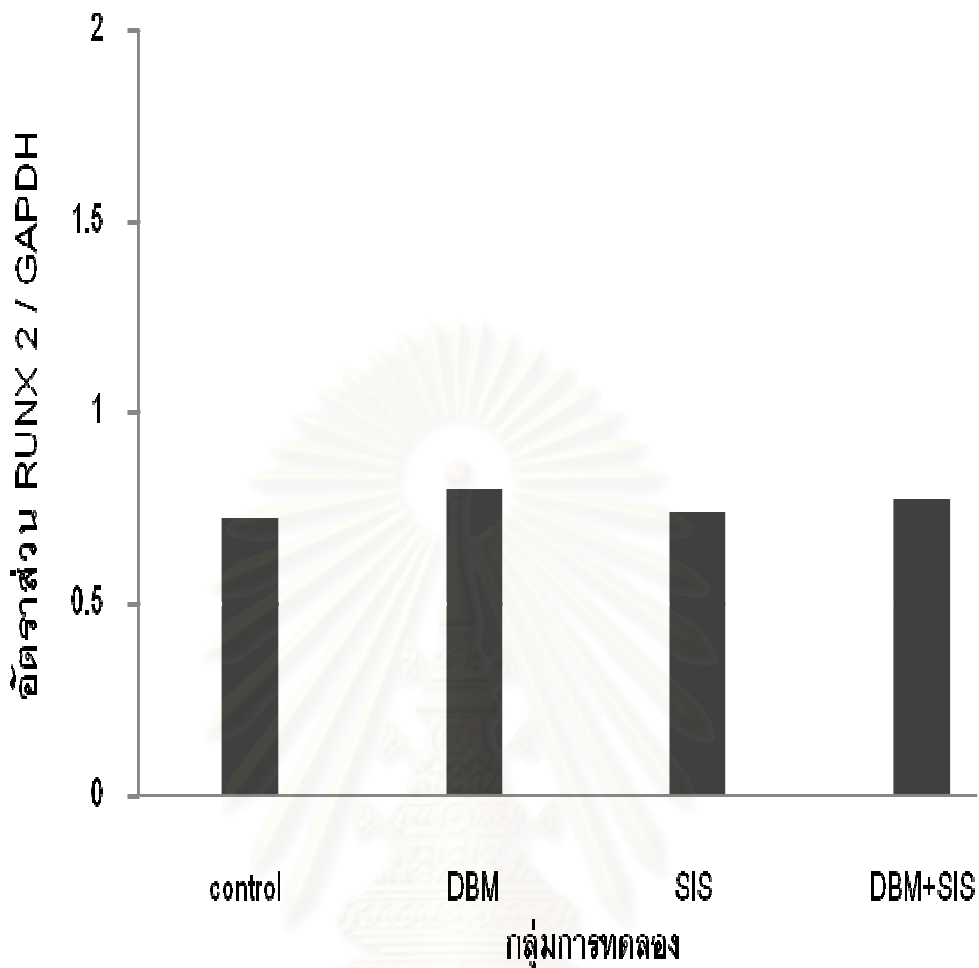
แถวที่ 2 ไม่มีการกระตุ้น

แถวที่ 3 กระตุ้นด้วย DBM เป็นเวลา 7 วัน

แถวที่ 4 กระตุ้นด้วย SIS เป็นเวลา 7 วัน

แถวที่ 5 กระตุ้นด้วย DBM ผสมกับ SIS เป็นเวลา 7 วัน

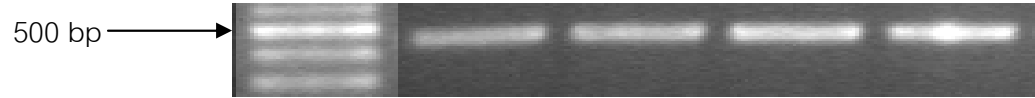
รูปที่ 18 การแสดงออกของยีน RUNX2 จากการทดสอบด้วยวิธี RT-PCR



รูปที่ 19 ระดับการแสดงออกของยีน RUNX 2

รูปที่ 18 แสดงผลจากการวิเคราะห์ด้วย agarose gel electrophoresis ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ RT-PCR ของยีน RUNX2 พบว่า ยีน RUNX2 มีขนาด 270 bp จากนั้นวิเคราะห์ความเข้มของแถบ DNA ที่พบด้วยเครื่อง Gel Doc 1000 (BIO-RAD, USA) โปรแกรม Quantity One พบว่าจากรูปที่ 19 ระดับการแสดงออกของยีน RUNX 2 หลังจากรกระตุ้นด้วย DBM, SIS, DBM ผสมกับ SIS และกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้นมีระดับการแสดงออกในอัตราส่วน RUNX 2/GAPDH เท่ากับ 0.80, 0.74, 0.78 และ 0.72 ตามลำดับ หลังจากการกระตุ้นด้วย DBM, SIS และ DBM ผสมกับ SIS พบว่ามีระดับการแสดงออกสูงขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้น เมื่อเทียบกันระหว่างกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วย DBM, SIS และ DBM ผสมกับ SIS พบว่ากลุ่มที่กระตุ้นด้วย DBM มีระดับการแสดงออกสูงที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่น

ALP 453 bp



GAPDH 452 bp



แถวที่ 1 maker

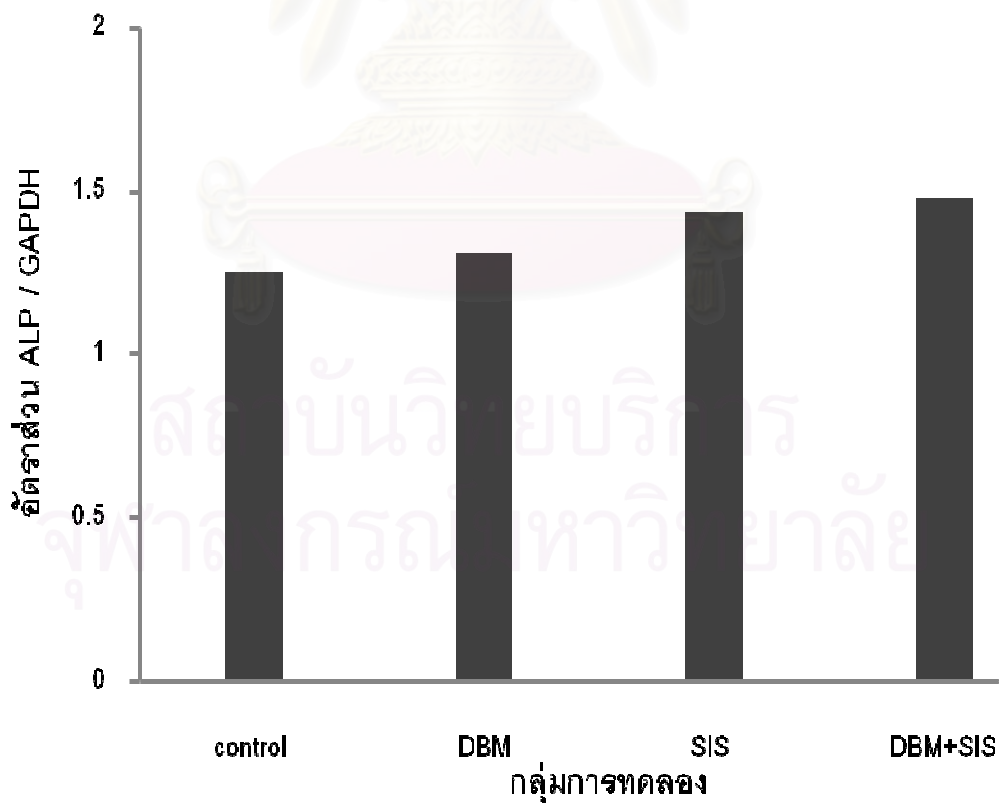
แถวที่ 2 ไม่มีการกระตุ้น

แถวที่ 3 กระตุ้นด้วย DBM เป็นเวลา 7 วัน

แถวที่ 4 กระตุ้นด้วย SIS เป็นเวลา 7 วัน

แถวที่ 5 กระตุ้นด้วย DBM ผสมกับ SIS เป็นเวลา 7 วัน

รูปที่ 20 การแสดงออกของยีน ALP จากการทดสอบด้วยวิธี RT-PCR

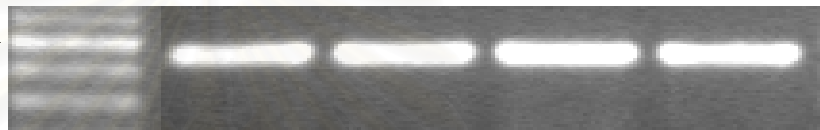


รูปที่ 21 ระดับการแสดงออกของยีน ALP

จากรูปที่ 20 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน ALP ด้วย agarose gel electrophoresis ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ RT-PCR พบแถบของ DNA ที่มีขนาด 453 bp จากนั้นวิเคราะห์ความเข้มของแถบ DNA พบว่าจากรูปที่ 21 หลังจากทีกระตุ้นเป็นเวลา 7 วัน ระดับการแสดงออกของยีน ALP ในเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย DBM, SIS, DBM ผสมกับ SIS และกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้น มีระดับการแสดงออกในอัตราส่วน ALP/GAPDH เท่ากับ 1.31, 1.44, 1.6 และ 1.25 ตามลำดับ พบว่าหลังจากกระตุ้นด้วย DBM, SIS และ DBM ผสมกับ SIS มีการแสดงออกของยีน ALP ในทุกกลุ่มทั้งที่ได้รับการและไม่ได้รับการกระตุ้น

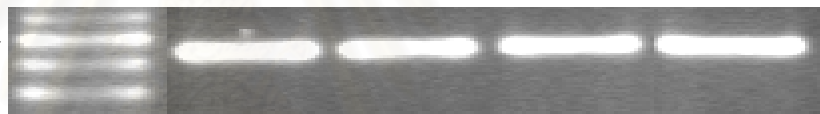
COL I 461 bp

500 bp →



GAPDH 452 bp

500 bp →



แถวที่ 1 marker

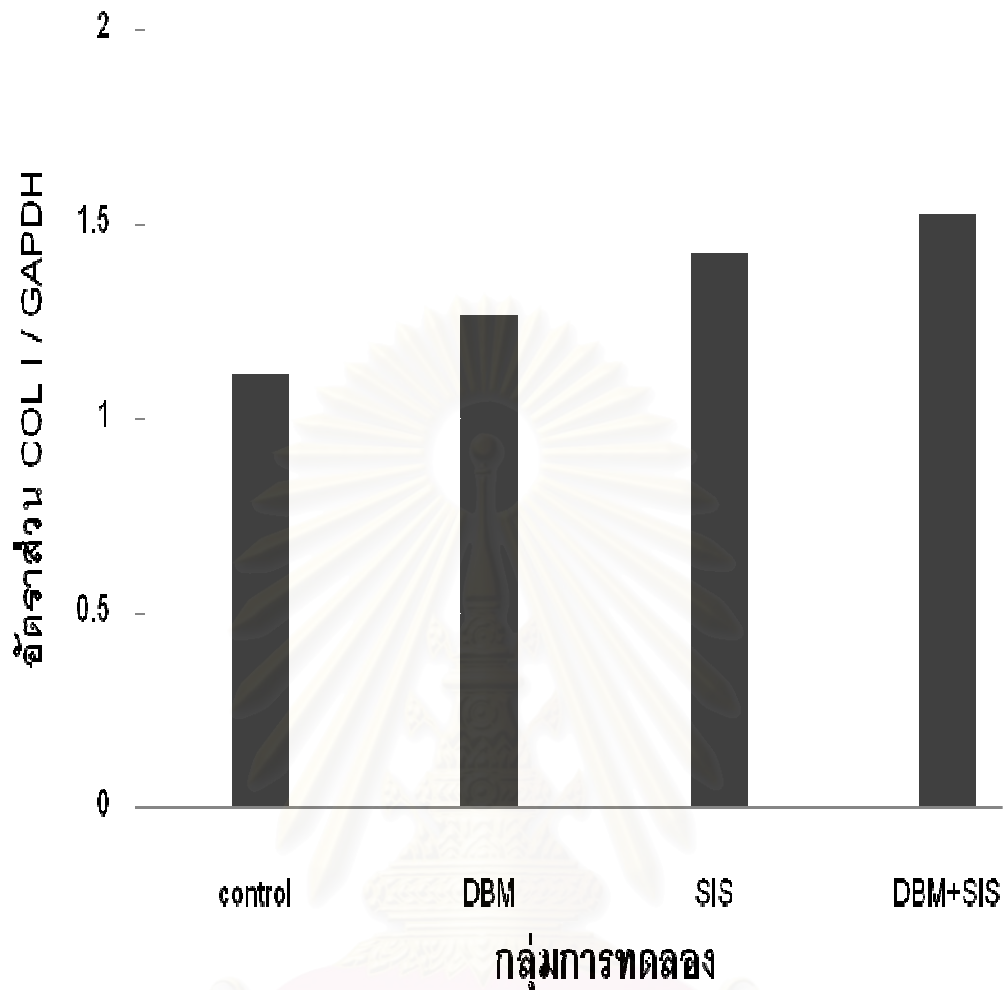
แถวที่ 2 ไม่มีการกระตุ้น

แถวที่ 3 กระตุ้นด้วย DBM เป็นเวลา 7 วัน

แถวที่ 4 กระตุ้นด้วย SIS เป็นเวลา 7 วัน

แถวที่ 5 กระตุ้นด้วย DBM ผสมกับ SIS เป็นเวลา 7 วัน

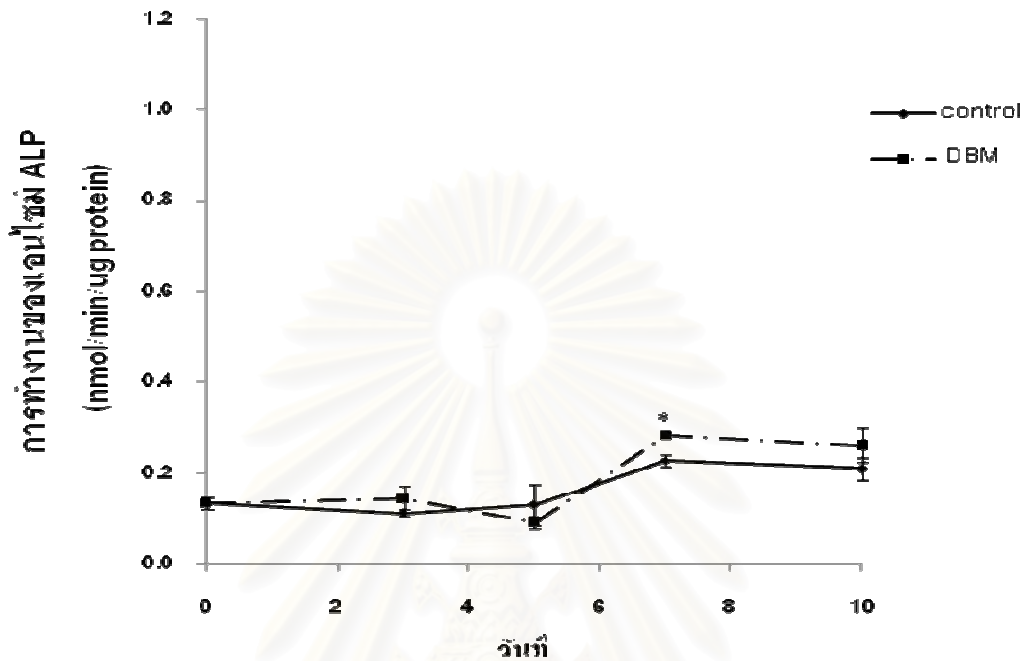
รูปที่ 22 การแสดงออกของยีน COL I จากการทดสอบด้วยวิธี RT-PCR



รูปที่ 23 ระดับการแสดงออกของยีน COL I

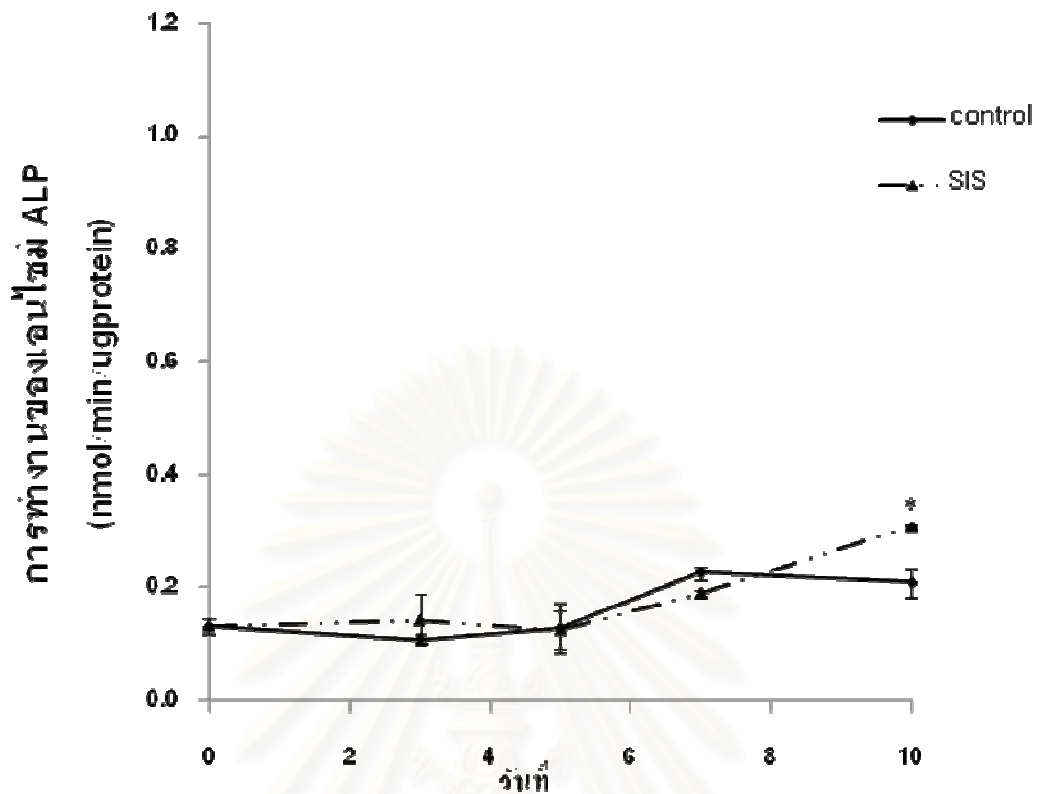
จากรูปที่ 22 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน COL I ด้วย agarose gel electrophoresis ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ RT-PCR พบแถบของ DNA ที่ได้มีขนาด 461 bp จากรูปที่ 23 เป็นผลจากการวิเคราะห์ความเข้มของแถบ DNA พบว่าหลังจากกระตุ้นด้วย DBM, SIS, DBM ผสมกับ SIS และกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้น ยีน COL I ระดับการแสดงออกในอัตราส่วน COL I/GAPDH เท่ากับ 1.23, 1.43, 1.52 และ 1.12 ตามลำดับ หลังจากที่ได้รับการกระตุ้นด้วย DBM, SIS และ DBM ผสมกับ SIS มีระดับการแสดงออกของ COL I สูงขึ้น รวมทั้งกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้นก็มีการแสดงของยีน COL I

ผลการวิเคราะห์การเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก
ไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast differentiation)



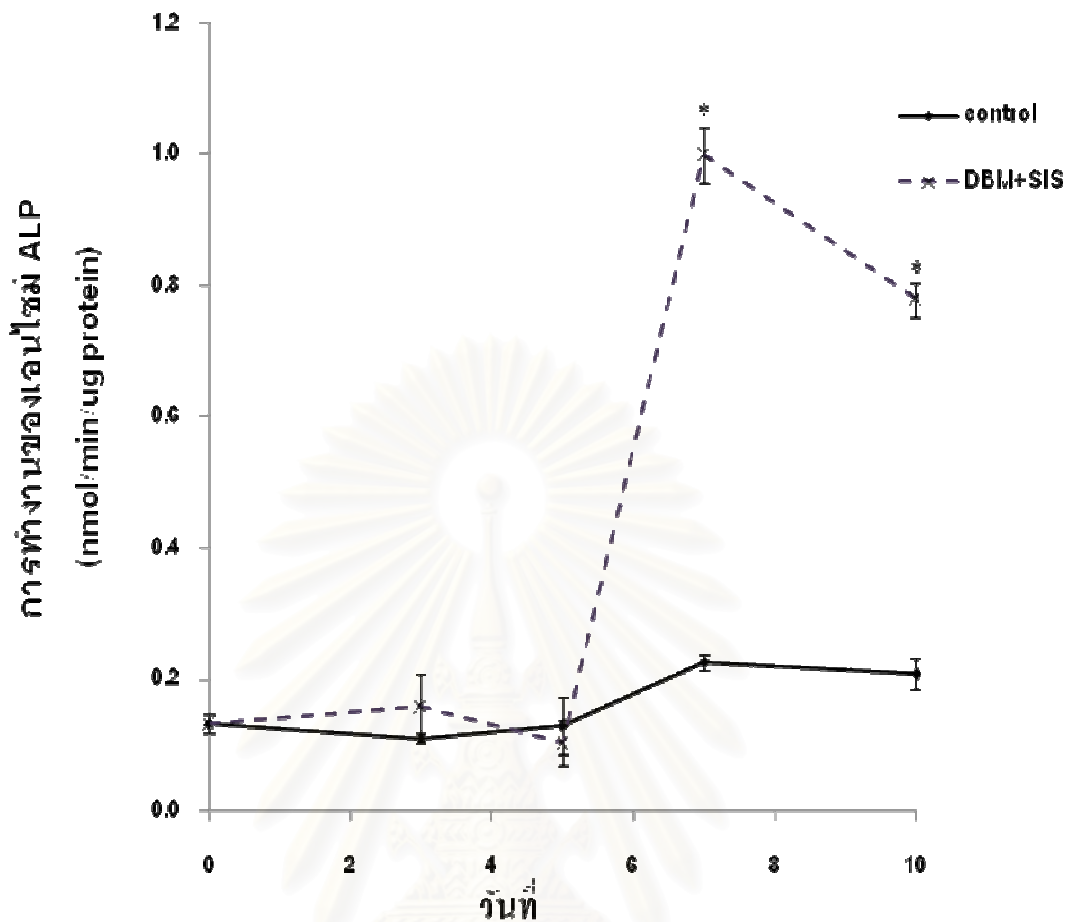
รูปที่ 24 ผลการกระตุ้นของ DBM ต่อการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก
(* $p < 0.05$)

การวิเคราะห์การเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิด
จากเยื่อหุ้มกระดูกไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก โดยวิเคราะห์ระดับการทำงานของ
เอนไซม์ ALP หลังจากรูปที่ 24 กระตุ้นด้วย DBM, SIS และ DBM ผสมกับ SIS เทียบกับ
ปริมาณโปรตีนทั้งหมด เป็นเวลา 3, 5, 7, 10 และไม่ได้รับการกระตุ้น
จากผลการทดลองหลังจากระตุ้นด้วย DBM เป็นเวลา 3, 5, 7, 10 และกลุ่มที่
ไม่ได้รับการกระตุ้น มีระดับการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 0.14, 0.09, 0.28, 0.26
และ 0.13 นาโนโมล/นาที/ปริมาณโปรตีนเป็นไมโครกรัม หลังจากที่ได้รับกระตุ้น
ด้วย DBM พบว่า ในช่วง 5 วันแรกของการกระตุ้นด้วย DBM มีระดับการทำงานของเอนไซม์ ALP
ไม่แตกต่างกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้น ในวันที่ 7 หลังจากระตุ้นด้วย DBM มีระดับการทำงานของ
เอนไซม์ ALP สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้น ($p < 0.05$)
จากนั้นลดลงในวันที่ 10 หลังจากระตุ้น และไม่แตกต่างกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้น



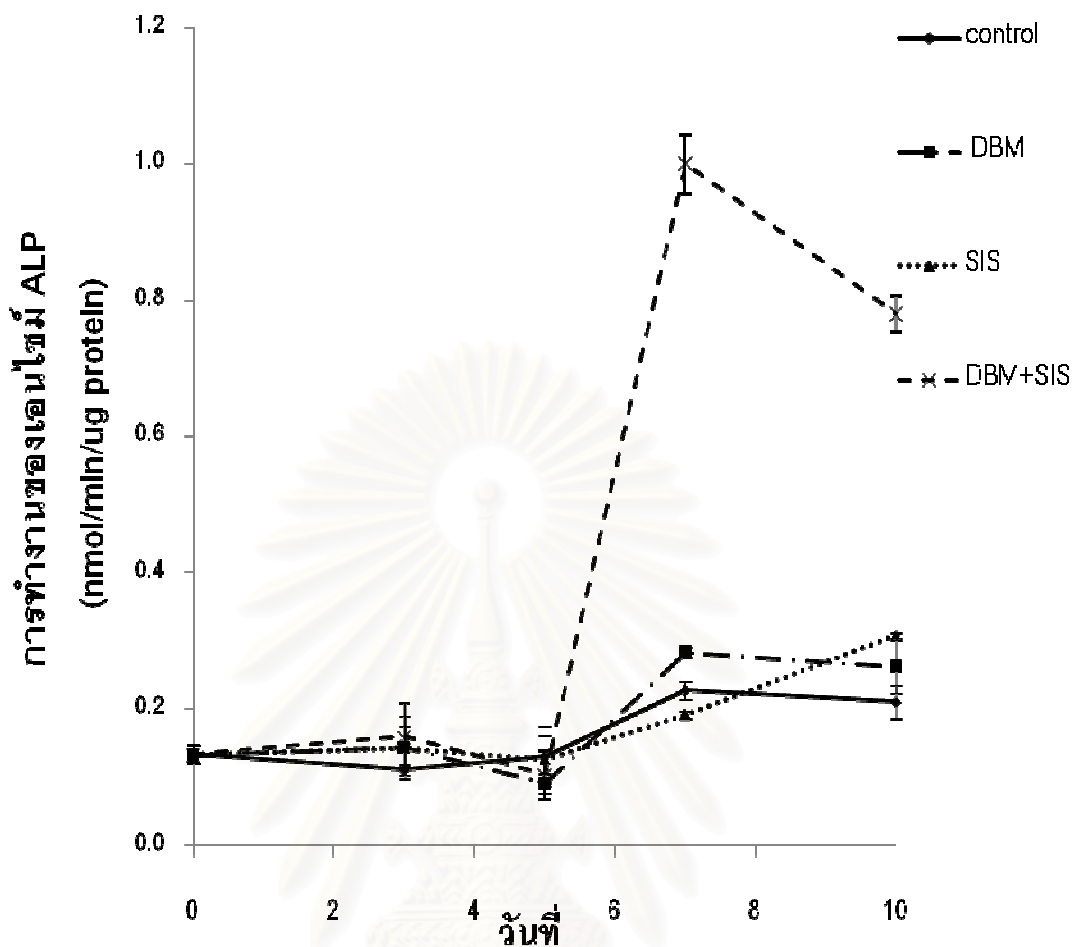
รูปที่ 25 ผลการกระตุ้นของ SIS ต่อการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก (* p<0.05)

จากผลการทดลองหลังจากกระตุ้นด้วย SIS เป็นเวลา 3, 5, 7, 10 และกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้น จากรูปที่ 25 แสดงผลการกระตุ้นของ SIS ต่อการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกมีระดับการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 0.14, 0.13, 0.19, 0.31 และ 0.13 นาโนโมล/นาที/ปริมาณโปรตีนเป็นไมโครกรัม พบว่าในช่วง 7 วันแรกหลังจากกระตุ้นด้วย SIS ระดับการทำงานของเอนไซม์ ALP ไม่มีการเปลี่ยนแปลงและไม่แตกต่างกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้น และวันที่ 10 ของการกระตุ้นมีระดับการทำงานของเอนไซม์ ALP เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้น (p<0.05)



รูปที่ 26 ผลการกระตุ้นของ DBM ผสมกับ SIS ต่อการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็น เซลล์สร้างกระดูก (* p<0.05)

จากผลการทดลองหลังจากกระตุ้นด้วย DBM ผสมกับ SIS เป็นเวลา 3, 5, 7, 10 และกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้น จากรูปที่ 26 ผลการกระตุ้นของ DBM ผสมกับ SIS ต่อการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก มีระดับการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 0.15, 0.10, 0.99, 0.78 และ 0.13 นาโนโมล/นาที/ปริมาณโปรตีนเป็นไมโครกรัม พบว่าในช่วง 5 วันแรกของการกระตุ้นด้วย SIS มีระดับการทำงานของเอนไซม์ ALP ไม่แตกต่างกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้น และหลังจากนั้นในวันที่ 7 ของการกระตุ้น มีระดับการทำงานของเอนไซม์ ALP เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้น (p<0.05) จากนั้นระดับการแสดงออกของเอนไซม์มีการแสดงออกลดลงในวันที่ 10 หลังจากการกระตุ้น DBM ผสมกับ SIS

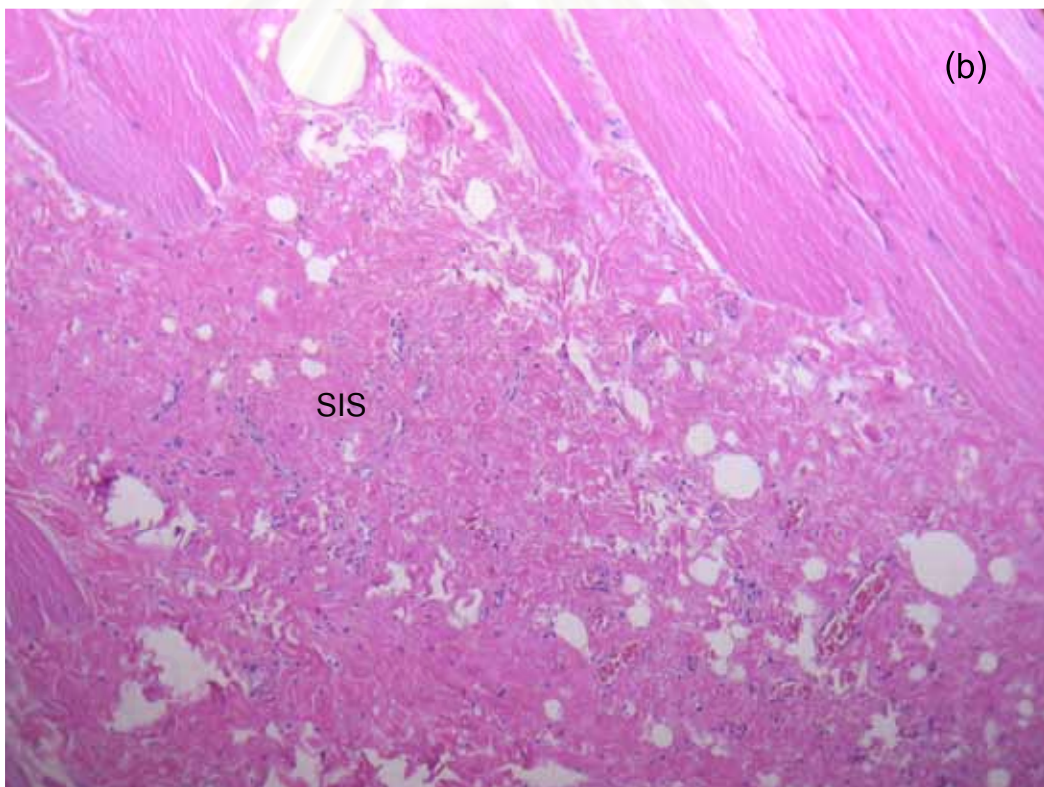
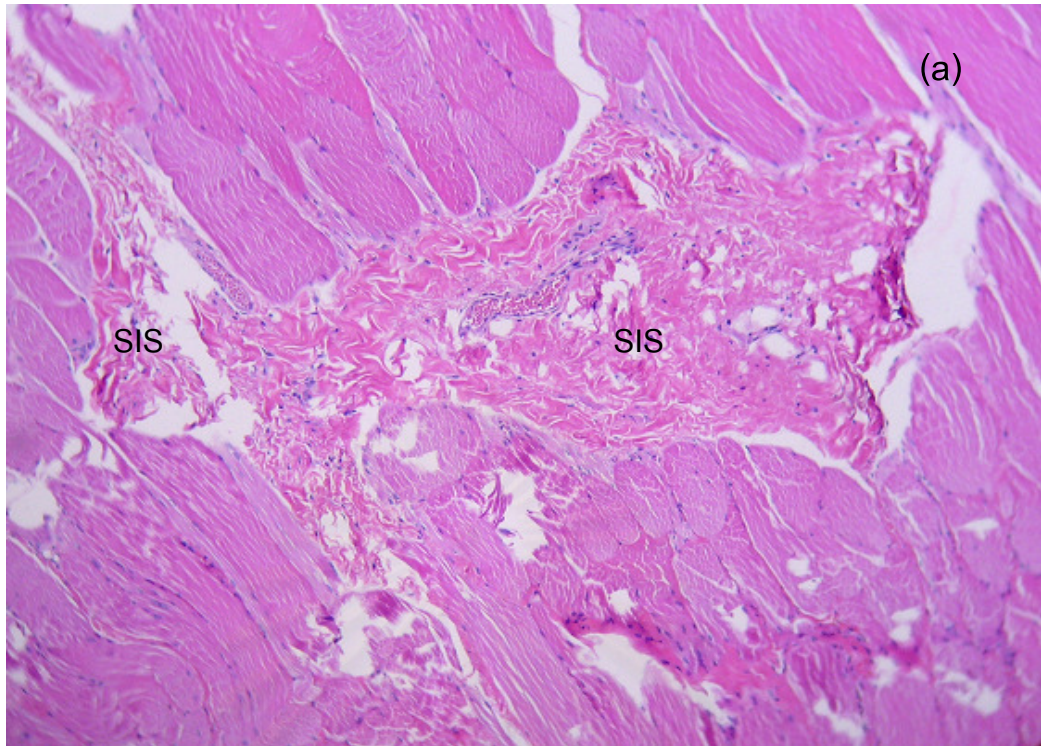


รูปที่ 27 การเปรียบเทียบระดับการทำงานของเอนไซม์ ALP หลังจากกระตุ้นด้วย DBM, SIS และ DBM ผสมกับ SIS

รูปที่ 27 แสดงการเปรียบเทียบระดับการทำงานของเอนไซม์ ALP ที่ได้รับการกระตุ้นที่แตกต่างกัน พบว่า 5 วันแรกของการกระตุ้นด้วย DBM, SIS และ DBM ผสมกับ SIS มีระดับการทำงานของเอนไซม์ ALP ไม่แตกต่างกัน ในวันที่ 7 หลังจากกระตุ้นด้วย DBM ผสมกับ SIS ระดับการทำงานของเอนไซม์ ALP มีระดับการทำงานเพิ่มขึ้นมากกว่าการกระตุ้นด้วย DBM, SIS และกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้น หลังจากนั้นในวันที่ 10 พบว่ามีระดับการทำงานของเอนไซม์ ALP ลดลง ระดับการทำงานของเอนไซม์ ALP ในวันที่ 7 หลังจากกระตุ้นด้วย DBM มีระดับการทำงานของเอนไซม์สูงกว่ากลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วย SIS

ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ของ DBM, SIS และ DBM ผสมกับ SIS ในสัตว์ทดลอง

จากการศึกษาความสามารถของ DBM, SIS และ DBM ผสมกับ SIS ในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ในสัตว์ทดลอง โดยทำการฝังในชั้นกล้ามเนื้อบริเวณต้นขาหลังของหนูเป็นเวลา 6 สัปดาห์ หลังจากนั้นนำออกมาทำการตรวจวิเคราะห์โดยกล้องจุลทรรศน์ ด้วยการย้อม hematoxylin & eosin จากรูปที่ 28 หลังจากการฝังด้วย SIS พบว่า SIS ย้อมติดสีชมพู ภายในและบริเวณโดยรอบ SIS พบมีการเจริญของเซลล์เม็ดเลือดขาว (ย้อมติดสีม่วง) มาเก็บกินสิ่งแปลกปลอม (SIS) และภายใน SIS พบมีการสร้างหลอดเลือดเกิดขึ้น จากการฝังด้วย SIS พบว่าไม่มีการสร้างกระดูกใหม่เกิดขึ้น จากรูปที่ 29 หลังจากการฝังด้วย DBM พบว่ามีการกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ โดยกระดูกใหม่ที่เกิดขึ้นย้อมติดสีชมพูอมม่วงอ่อน (บริเวณกระดูกซี่) DBM ที่ฝังย้อมติดสีชมพูเข้ม บริเวณเนื้อเยื่อรอบ DBM พบมีการสร้างหลอดเลือดเกิดขึ้น และพบเม็ดเลือดขาวชนิด lymphocytes และ macrophages บริเวณโดยรอบ DBM จำนวนมากเข้ามาเก็บกินสิ่งแปลกปลอม (DBM) นอกจากนี้ยังพบว่ามีการเจริญของเซลล์ osteoblasts (ย้อมติดสีม่วง) บริเวณโดยรอบขอบของ DBM เซลล์ osteoblasts ที่พบมีลักษณะค่อนข้างเป็นสี่เหลี่ยมคล้ายลูกเต๋านิวเคลียสมีขนาดใหญ่ พบบริเวณขอบของกระดูกที่สร้างขึ้นใหม่ และบริเวณขอบของ DBM เซลล์ osteoblasts ที่พบมีการเรียงตัวกันเป็นระเบียบบริเวณรอบ DBM จากรูปที่ 30 หลังจากฝังด้วย DBM ผสมกับ SIS พบว่ามีการกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่เกิดขึ้นบริเวณโดยรอบของ DBM แต่ไม่พบกระดูกที่สร้างขึ้นใหม่ในบริเวณที่เป็น SIS นอกจากนี้ยังพบมีการสร้างหลอดเลือดเกิดขึ้นบริเวณ โดยรอบ DBM ซึ่งเป็นการนำพาเซลล์เม็ดเลือดขาวเข้ามาเก็บกินสิ่งแปลกปลอม (DBM และ SIS) และบริเวณขอบ DBM พบมีการเจริญของเซลล์ osteoblasts บริเวณโดยรอบและภายใน DBM

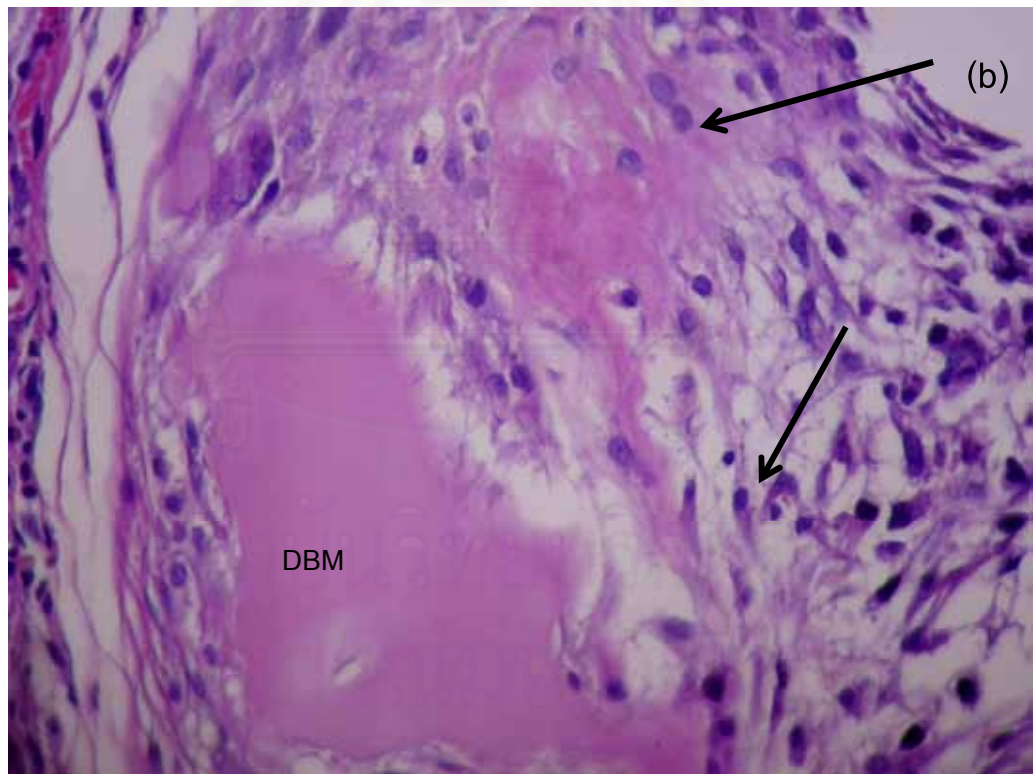
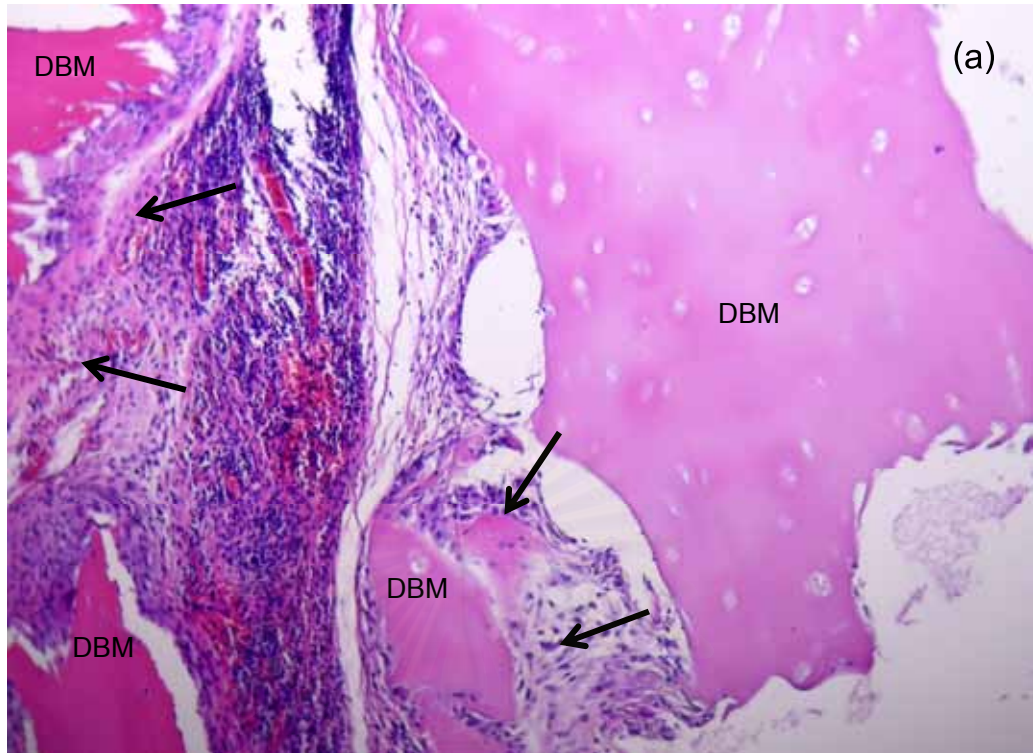


รูปที่ 28 ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์หลังจากทำการฝังด้วย SIS เป็นเวลา 6 สัปดาห์

(a) กำลังขยาย X10

(b) กำลังขยาย X40

(→) ลูกศรชี้บริเวณที่มีการสร้างกระดูก

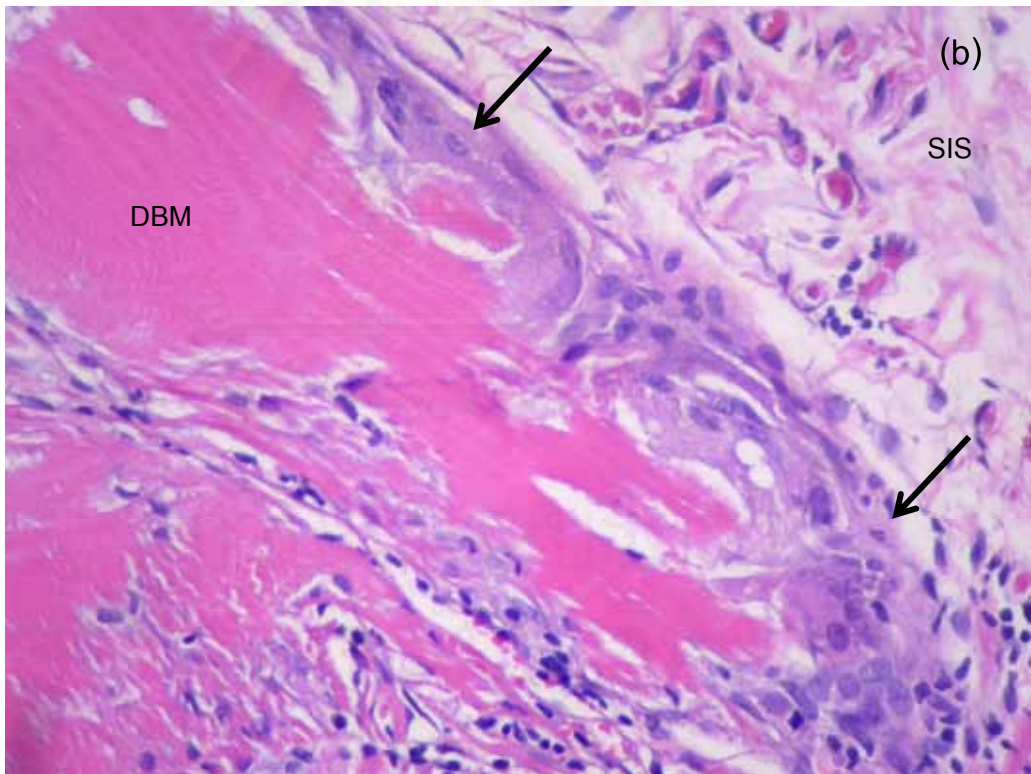
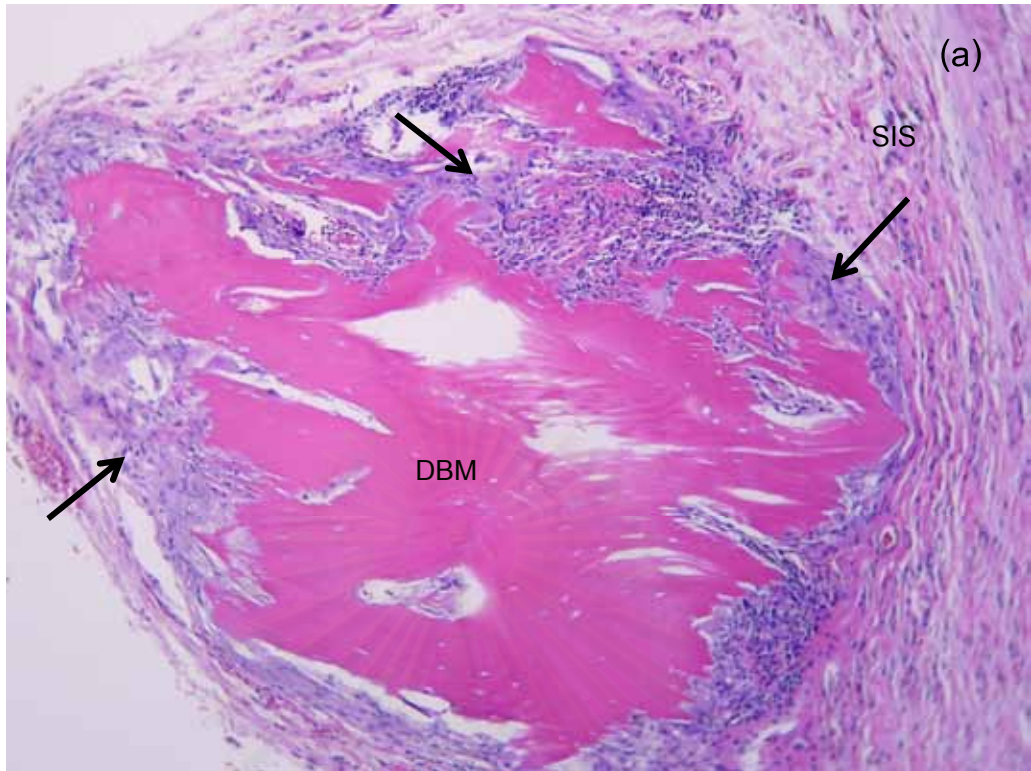


รูปที่ 29 ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์หลังจากทำการฝังด้วย DBM เป็นเวลา 6 สัปดาห์

(a) กำลังขยาย X10

(b) กำลังขยาย X40

(—>) ลูกศรชี้บริเวณที่มีการสร้างกระดูก



รูปที่ 30 ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์หลังจากทำการฝังด้วย DBM ผสมกับ SIS

เป็นเวลา 6 สัปดาห์ (a) กำลังขยาย X10

(b) กำลังขยาย X40

(—> ดูกศรชี้บริเวณที่มีการสร้างกระดูก)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาความสามารถของ SIS และ DBM ในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกในเซลล์ทดลองและในสัตว์ทดลอง การทดสอบในระดับเซลล์ทดลองทำได้โดยใช้เซลล์ต้นกำเนิดที่แยกได้จากเยื่อหุ้มกระดูก แล้วทำการวิเคราะห์ความสามารถของ DBM, SIS และ DBM ผสมกับ SIS ในการกระตุ้นให้เกิดการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกด้วยวิธี Trypan blue staining assay จากนั้นทำการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน osteoblastic markers ที่บ่งชี้การเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกโดยวิธี RT-PCR เช่น ยีนที่ควบคุมการแสดงออกของ COL I, ALP และ RUNX2 หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์การเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast differentiation) ด้วยวิธี alkaline phosphatase assay และทำการศึกษาถึงความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ในหนูทดลอง (Wistar rat) และตรวจวิเคราะห์โดยกล้องจุลทรรศน์ด้วยการย้อม hematoxylin & eosin

การแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก พบว่ามีเซลล์เจริญเพิ่มจำนวนออกมาโดยรอบเยื่อหุ้มกระดูกหลังจากเพาะเลี้ยง 7 วัน และเซลล์มีลักษณะคล้ายเซลล์ fibroblasts จากนั้นวิเคราะห์การเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก พบว่าในการกระตุ้นด้วย DBM, SIS และ DBM ผสมกับ SIS เซลล์มีการเจริญเพิ่มจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้น (กลุ่มควบคุม) และเมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นที่แตกต่างกันพบว่า DBM ผสมกับ SIS กระตุ้นให้เกิดการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้ดีกว่าการกระตุ้นด้วย SIS หรือ DBM เพียงชนิดเดียว

การแสดงออกของยีน osteoblastic markers ที่บ่งชี้การเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก พบว่าระดับการแสดงออกของ RUNX2 สูงขึ้นหลังจากที่กระตุ้นด้วย DBM, SIS และ DBM ผสมกับ SIS เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้น (กลุ่มควบคุม) และพบว่ามีระดับการแสดงออกสูงที่สุดหลังจากกระตุ้นด้วย DBM สำหรับระดับการแสดงออกของยีน ALP พบว่าหลังจากที่กระตุ้นด้วย DBM, SIS และ DBM ผสมกับ SIS มีระดับการแสดงออกของยีน ALP สูงขึ้น รวมทั้งกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้น

สำหรับระดับการแสดงออกของยีน COL I หลังจากที่ได้รับการกระตุ้นด้วย DBM, SIS และ DBM ผสมกับ SIS พบว่ามีระดับการแสดงออกสูงขึ้นในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นและกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้น

การเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก โดยวิเคราะห์จากการทำงานของเอนไซม์ ALP พบว่าในวันที่ 7 หลังจากกระตุ้นด้วย DBM มีระดับการทำงานของเอนไซม์ ALP สูงขึ้น และระดับการทำงานของเอนไซม์ ALP ลดลงในวันที่ 10 เช่นเดียวกับการกระตุ้นด้วย DBM ผสมกับ SIS ส่วนในกลุ่มที่กระตุ้นด้วย SIS อย่างเดียวมีระดับการทำงานของเอนไซม์ ALP เพิ่มสูงขึ้นในวันที่ 10 หลังจากกระตุ้นเมื่อเปรียบเทียบกับระดับการทำงานของเอนไซม์ ALP ระหว่างกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นที่แตกต่างกันพบว่า DBM ผสมกับ SIS กระตุ้นให้เกิดการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกการกระตุ้นด้วย SIS หรือ DBM เพียงชนิดเดียว

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

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อภิปรายผลการวิจัย

การศึกษาความสามารถของ DBM, SIS และ DBM ผสมกับ SIS ต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก โดยใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้น 50,000 เซลล์/flask เท่ากันทุกกลุ่มการทดลอง จากนั้นทำการกระตุ้นเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกเป็นเวลา 3, 5, 7 และ 10 วัน นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วยวิธี Trypan blue staining assay ในการกระตุ้นใช้ DBM 5 มิลลิกรัม เนื่องจากมีรายงานจากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Zhang และคณะในปี 1997 รายงานไว้ว่า DBM ในปริมาณ 5 มิลลิกรัม มีผลต่อการกระตุ้นให้เกิดการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกได้ดีที่สุดในระดับเซลล์เพาะเลี้ยง [24] เนื่องจากยังไม่เคยมีการรายงานก่อนหน้าถึงผลที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย SIS จึงทำการแปรผันปริมาณ SIS สำหรับงานวิจัยครั้งนี้ ปริมาณ SIS ที่ใช้ 5, 10 และ 20 มิลลิกรัม สำหรับการกระตุ้นด้วย DBM ผสมกับ SIS ใช้ปริมาณอย่างละ 2.5 มิลลิกรัม ในการกระตุ้นด้วย DBM 5 มิลลิกรัม เซลล์มีการเจริญเพิ่มจำนวนมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการกระตุ้น แสดงว่า DBM มีความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกได้ ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าถึงความสามารถของ DBM ในการกระตุ้นให้เกิดการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้ [24,25] สำหรับในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วย SIS ปริมาณ 5 และ 10 มิลลิกรัม มีการกระตุ้นให้เกิดการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เช่นเดียวกับในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วย SIS ปริมาณ 20 มิลลิกรัม เซลล์มีการเจริญเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่มีการเจริญเพิ่มจำนวนน้อยกว่าในกลุ่มที่กระตุ้นด้วย 5 และ 10 มิลลิกรัม อาจเนื่องมาจาก SIS มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นคอลลาเจนชนิดที่ 1 และชนิดที่ 3 มากกว่า 90% [1,2] จึงมีความเหนียวจับตัวกันเป็นก้อนไม่แตกออกจากกัน และมีความสามารถในการอุ้มน้ำได้ดี ทำให้ SIS ตกตะกอนอยู่ที่พื้นภาชนะเลี้ยงเซลล์ มีผลให้เซลล์บริเวณนั้นมีการหลุดลอกออกจากภาชนะเพาะเลี้ยงเมื่อสังเกตผ่านกล้องจุลทรรศน์ และอาจจะมีผลให้เซลล์ที่เจริญขึ้นมาใหม่ไม่สามารถยึดติดกับพื้นภาชนะได้จากการศึกษาเกี่ยวกับ SIS พบว่าควรมีการทำให้เกิดการกระจายตัวของ SIS ที่ดีกว่านี้สำหรับในกระบวนการเตรียม SIS อาจส่งผลกระทบต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้เนื่องจากการเตรียม SIS มีการนำลำไส้หมูที่ได้แช่ในสารละลาย acetic acid ผสมกับ เอนไซม์ pepsin จากนั้นทำการล้างกรดออก ซึ่งในการล้างกรดออกอาจมีกรดตกค้างอยู่ ทำให้ SIS ที่ได้มีสภาวะความเป็นกรดเมื่อนำไปกระตุ้นทำให้เซลล์บริเวณโดยรอบของ SIS มีการตาย เพราะไม่สามารถทนต่อสภาวะความเป็นกรดที่ตกค้างอยู่ได้ และอาจเนื่องจาก

โปรตีน growth factors ที่หลั่งออกมาจาก SIS มีปริมาณมาก ซึ่งไปกระตุ้นให้โปรตีนบางชนิด ออกมายับยั้งการทำงานของโปรตีน growth factors ที่มาจาก SIS ส่งผลให้โปรตีน growth factors ไม่สามารถทำงานได้ เช่น การยับยั้งการทำงานของ TGF- β ด้วยสารยับยั้ง ประเภท decorin, fibromodulin, noggin และ chordin ซึ่งจะไปมีผลในการยับยั้งการเข้าจับกัน ของ TGF- β ligand กับโปรตีนตัวรับ (receptor) ทำให้ไม่สามารถส่งสัญญาณต่อไปได้ และ α_2 -microglobulin เป็นไกลโคโปรตีนที่มีเป้าหมายในการจับ TGF- β ที่มีปริมาณ มากเกินในเซลล์เพาะเลี้ยง [43] จากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า SIS ปริมาณ 5 และ 10 มิลลิกรัม มีผลในการกระตุ้นให้เกิดการเจริญเพิ่มจำนวนได้ดีที่สุด และเป็นปริมาณที่เหมาะสมแก่ การนำมาใช้ในการกระตุ้นให้เกิดการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ ในการวิจัยนี้ผู้วิจัย พบว่า SIS ปริมาณ 5 มิลลิกรัม และ DBM 5 มิลลิกรัม มีความสามารถในการกระตุ้น การเจริญเพิ่มจำนวนได้ดีที่สุด จึงเลือกที่จะใช้ DBM ผสมกับ SIS รวมกันเป็น 5 มิลลิกรัม โดยใช้ SIS และ DBM อย่างละ 2.5 มิลลิกรัม ในการกระตุ้นให้เกิดการเจริญเพิ่มจำนวน และการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก ซึ่งก่อนหน้านี้ยังไม่มีการศึกษาถึงความสามารถของ DBM ผสมกับ SIS ต่อการกระตุ้น ให้เกิดการสร้างกระดูก การศึกษาความสามารถของ DBM ผสมกับ SIS ต่อการเจริญ เพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก พบว่าในวันที่ 7 เซลล์มีการเจริญ เพิ่มจำนวนสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) และยังพบว่า มีการกระตุ้นให้เกิดการเจริญเพิ่มจำนวนได้ดีกว่าการกระตุ้นด้วย SIS หรือ DBM เพียงชนิดเดียว โดยจำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากันทุกกลุ่มการทดลอง และหลังจากนั้น พบว่าจำนวนเซลล์มีการลดลง เนื่องจากเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกมีการแบ่งตัว ลดลงร่วมกับมีการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์สร้างกระดูกมากขึ้น ซึ่งในการ กระตุ้นด้วย DBM, SIS และ DBM ผสม SIS ต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้ เนื่องจาก growth factors ที่มีอยู่ใน DBM และ SIS มีการหลั่งออกมากกระตุ้นให้เกิด การเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์มากขึ้นได้ เช่นเดียวกับที่มีการรายงานไว้ก่อนหน้านี้ถึง คุณสมบัติของ growth factors ที่พบเป็นองค์ประกอบของ DBM และ SIS [1,2,4,10]

จากการศึกษาการแสดงออกของยีนที่บ่งชี้ถึงการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลง เซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก เช่น ยีนที่ควบคุม การแสดงออกของ RUNX2 เป็น osteoblast-specific transcription factor มีบทบาทใน การเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast differentiation) ซึ่งมีการแสดงออกในช่วงแรกของการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ osteoblasts [15] ยีนนี้มีขนาด 270 bp หลังจากกระตุ้นด้วย DBM พบว่ามีการแสดงออกของ RUNX2 สูงขึ้น

แสดงให้เห็นว่า DBM มีความสามารถในการชักนำให้เซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกมีการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกได้ เพราะว่า DBM มีองค์ประกอบของ BMP ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นให้เกิดการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก ยีนที่ควบคุมการแสดงออกของ ALP ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม hydrolase พบมากในเซลล์ที่ทำหน้าที่สร้างกระดูก (osteoblasts) โปรตีนนี้พบอยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ osteoblasts ยีนที่ควบคุมการแสดงออกของ ALP มีขนาด 453 bp หลังจากกระตุ้นด้วย DBM, SIS และ DBM ผสมกับ SIS พบว่ามีระดับการแสดงออกของ ALP เพิ่มสูงขึ้น จากผลที่พบแสดงให้เห็นว่า DBM ผสมกับ SIS มีคุณสมบัติในการกระตุ้นให้เซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกมีการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกได้ อาจเนื่องมาจากการกระตุ้นด้วย DBM ผสมกับ SIS กระตุ้นให้เซลล์มีการเจริญเพิ่มจำนวนมากขึ้น และร่วมกับการกระตุ้นของ DBM ในการกระตุ้นให้เกิดการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก จึงทำให้เมื่อเซลล์มีจำนวนมากขึ้นและเจริญไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกมากขึ้นจึงมีระดับการแสดงออกของ ALP สูงขึ้นตามไปด้วย สำหรับยีนที่ควบคุมการแสดงออกของ COL I เป็น osteoblastic markers เนื่องจากคอลลาเจน ชนิดที่ 1 เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเนื้อกระดูก และสร้างโดยเซลล์สร้างกระดูก (osteoblasts) [3] จากที่พบแสดงให้เห็นว่ายีนควบคุมการแสดงออกของ COL I มีขนาด 461 bp พบว่าหลังจากกระตุ้นด้วย DBM, SIS และ DBM ผสมกับ SIS มีระดับการแสดงออกของ COL I สูงขึ้น

การศึกษาการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast differentiation) ด้วยวิธี alkaline phosphatase assay เพื่อศึกษาระดับการทำงานของเอนไซม์ ALP เทียบกับปริมาณโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก หลังจากกระตุ้นด้วย DBM, SIS และ DBM ผสมกับ SIS เป็นเวลา 3, 5, 7, 10 วัน และกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้นเนื่องจาก ALP เป็นตัวที่ใช้บ่งชี้ osteoblastic phenotype ซึ่งโปรตีนนี้พบอยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ osteoblasts กลไกการทำงานของ ALP เกิดขึ้น โดยช่วยเร่งปฏิกิริยา transphosphorylation ของ p-nitrophenylphosphate (p-NPP) ไปเป็น p-nitrophenol (p-NP) ซึ่งเป็นสารละลายที่มีสีเหลือง ความเข้มข้นของ p-NP ที่เกิดขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับระดับการทำงานของเอนไซม์ ALP [13,14] ในการกระตุ้นด้วย DBM พบว่าระดับการทำงานของ ALP มีการเพิ่มขึ้นในวันที่ 7 หลังจากกระตุ้น แสดงว่า DBM มีความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกได้ [24] ส่วนเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกที่ได้รับ

การกระตุ้นด้วย SIS พบว่า ในช่วง 7 วันแรกระดับการทำงานของ เอนไซม์ ALP ไม่มีการเปลี่ยนแปลง และหลังจากนั้นในวันที่ 10 ของการกระตุ้นมีระดับการทำงานของเอนไซม์ ALP เพิ่มขึ้น อาจเนื่องมาจากในเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกที่ไม่ได้รับการกระตุ้นมีการทำงานของเอนไซม์ ALP (basal level) และหลังจากที่ได้รับการกระตุ้นด้วย SIS ทำให้เซลล์มีการเจริญเพิ่มจำนวนมากขึ้น และมีการกระตุ้นให้เกิดการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ปลายทางที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ ALP จึงมีผลให้มีระดับการทำงานของเอนไซม์ ALP เพิ่มขึ้นด้วย ในการกระตุ้นด้วย DBM ผสมกับ SIS ต่อการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก พบว่าระดับการทำงานของเอนไซม์ ALP เพิ่มสูงขึ้นในวันที่ 7 และการกระตุ้นด้วย DBM ผสมกับ SIS มีระดับการทำงานของเอนไซม์ของ ALP เพิ่มสูงขึ้นมากกว่าการกระตุ้นด้วย DBM หรือ SIS เพียงอย่างเดียว แสดงว่า DBM ผสมกับ SIS มีความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกได้ดีกว่าการกระตุ้นด้วย DBM หรือ SIS เพียงชนิดเดียว และจากผลการทดลองระดับการทำงานของเอนไซม์ ALP มีระดับการทำงานสูงที่สุดในวันที่ 7 หลังจากกระตุ้นด้วย DBM หรือ DBM ผสมกับ SIS แสดงให้เห็นว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกมีการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกในวันที่ 7 หลังจากกระตุ้น

จากการศึกษาความสามารถของ DBM, SIS และ DBM ผสมกับ SIS ในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ในสัตว์ทดลอง โดยทำการฝังในชั้นกล้ามเนื้อบริเวณต้นขาหลังของหนูเป็นเวลา 6 สัปดาห์ แล้วทำการตรวจวิเคราะห์โดยกล้องจุลทรรศน์ด้วยการย้อม hematoxylin & eosin พบว่าบริเวณที่เป็นกล้ามเนื้อจะย้อมติดสีชมพู และเห็นกล้ามเนื้อมีการเรียงตัวกันเป็นระเบียบส่วนบริเวณที่เป็น DBM จะย้อมติดสีชมพูเข้ม กระดูกที่สร้างขึ้นมาใหม่จะย้อมติดสีชมพูอมม่วงอ่อน ๆ และเซลล์เม็ดเลือดขาว osteoblasts พบมีการย้อมติดสีม่วง จากผลการวิเคราะห์พบว่าในกลุ่มที่ทำการฝังด้วย DBM มีการกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ ซึ่งมีเป็นรวมตัวกันของคอลลาเจนโดยเกิดเป็น matrix ที่ยังไม่มีการสะสมแร่ธาตุ พบบริเวณขอบ DBM และบริเวณที่มีการสลายตัวของ DBM และพบว่าบริเวณโดยรอบของ DBM มีการอักเสบ เนื่องจากการชุมนุมของเซลล์เม็ดเลือดขาวในปริมาณมากเข้ามาเก็บกิน DBM ที่เป็นสิ่งแปลกปลอม เม็ดเลือดขาวที่พบเป็นชนิด lymphocytes และ macrophages สามารถเข้ามาเก็บกินสิ่งแปลกปลอมได้โดยการนำพาของหลอดเลือดที่มีการสร้างใหม่ในบริเวณเนื้อเยื่อรอบ DBM ทำให้ DBM ที่พบมีการสลายไปแต่ก็ยังพบ DBM ที่หลงเหลืออยู่ บริเวณขอบ DBM ที่หลงเหลืออยู่ และบริเวณกระดูกที่สร้างขึ้นมาใหม่พบเซลล์ osteoblasts มีลักษณะคล้ายลูกเต๋ามีการเรียง

ตัวกันเป็นระเบียบบริเวณรอบ DBM การที่พบเซลล์ osteoblasts บริเวณรอบ DBM ได้ เนื่องจาก BMP ที่หลั่งออกมาจาก DBM ไปกระตุ้นให้เซลล์ต้นกำเนิดเนื้อเยื่อประสานที่อยู่บริเวณนั้นได้รับการกระตุ้นจึงเกิดการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก (osteoblasts) และทำให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ สำหรับกลุ่มที่ทำการฝังด้วย DBM ผสมกับ SIS พบว่ามีการกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่บริเวณโดยรอบ DBM มีลักษณะเป็น osteoid เป็นเนื้อพื้กระดูกที่มีการรวมตัวกันของคอลลาเจนและยังไม่มีภาวะผสมของแร่ธาตุ และมีการสร้างหลอดเลือดบริเวณรอบและช่องว่างภายใน DBM เนื่องจาก DBM มีโปรตีน growth factors ที่เป็นองค์ประกอบใน DBM มีการกระตุ้นให้เกิดการสร้างหลอดเลือดได้ [3,4] และมีการนำพาของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด lymphocytes และ macrophages เข้ามาเก็บกินสิ่งแปลกปลอม (DBM และ SIS) ทำให้มีการสลายไปของ DBM และ SIS แล้วจึงส่งผลกระทบต่อให้เกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อบริเวณนั้น นอกจากนี้ยังพบอีกว่ามีการเจริญของ osteoblasts บริเวณโดยรอบขอบของ DBM ที่มีการสลายไป เนื่องจากการกระตุ้นของโปรตีนที่หลั่งออกมาจาก DBM ส่วนในกลุ่มที่ฝังด้วย SIS เพียงชนิดเดียว พบว่าไม่มีการสร้างกระดูกเกิดขึ้น เนื่องจาก SIS ไม่มี BMP ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นให้เกิดการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก ทำให้ไม่มีสิ่งไปกระตุ้นให้เกิดการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก (osteoblasts) ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Suckow ถึงความสามารถของ SIS ในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ในบริเวณที่เกิดความบกพร่องของกระดูก (bone defect) [37] ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยนี้ที่ทำการศึกษาความสามารถของ SIS ในบริเวณที่ผิดตำแหน่งของการสร้างกระดูก (ectopic site) คือในชั้นกล้ามเนื้อของหนูทดลอง นอกจากนี้พบมีการสร้างหลอดเลือดบริเวณภายในและโดยรอบของ SIS เนื่องจากได้รับการกระตุ้นของโปรตีน growth factors ที่เป็นองค์ประกอบของ SIS ซึ่งมีคุณสมบัติในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างหลอดเลือด [1,2] เช่น fibroblast growth factor และ vascular endothelial growth factor เป็นต้น โปรตีนเหล่านี้อาจหลั่งออกมาจาก SIS ไปกระตุ้นให้เกิดการสร้างหลอดเลือดขึ้น นอกจากนี้พบเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด lymphocytes และ macrophages บ้างภายใน SIS และบริเวณโดยรอบแต่พบในปริมาณที่น้อยกว่าบริเวณรอบ DBM ในกลุ่มที่มีการฝังด้วย DBM และกลุ่มที่มีการฝังด้วย DBM ผสมกับ SIS จากผลที่เกิดขึ้นแสดงให้เห็นว่า DBM และ DBM ผสมกับ SIS มีความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ได้ สำหรับ SIS เพียงชนิดเดียวไม่มีความสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ได้

ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาการกระตุ้นด้วย SIS พบว่า SIS ที่ใช้มีการจับตัวเป็นก้อน และมีความสามารถในการอุ้มน้ำที่ดี ทำให้มีผลต่อการยึดเกาะของเซลล์เพาะเลี้ยงกับ ภาชนะเพาะเลี้ยง เนื่องจาก SIS เมื่อมีการอุ้มน้ำทำให้มีน้ำหนักมากขึ้นตกลงสู่พื้นผิวของ ภาชนะเพาะเลี้ยง ทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงไม่สามารถยึดเกาะภาชนะเพาะเลี้ยงบริเวณนั้นได้ จึงควรหาวิธีในการเตรียม SIS ให้มีการจับตัวเป็นก้อนให้น้อยที่สุด

ในการศึกษาระดับเซลล์เพาะเลี้ยงควรอยู่ในภาวะปราศจากเชื้อทุกขั้นตอน รวมทั้งอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการศึกษา เนื่องจากการศึกษาระดับเซลล์เพาะเลี้ยง เกิดการปนเปื้อนได้ง่ายไม่ว่าจะเป็นการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรีย หรือเชื้อรา เป็นต้น

การฝัง DBM และ DBM ผสมกับ SIS ในชั้นกล้ามเนื้อของหนูทดลอง ควรทำให้ DBM ที่ทำการฝังนั้นมีการจับตัวกันในระดับหนึ่ง เนื่องจากเมื่อทำการฝัง ไปแล้วหนูทดลองมีการเคลื่อนไหวตามปกติได้ ทำให้ DBM ที่ฝังลงไปอาจมีการเคลื่อน ตำแหน่งเป็นผลให้เกิดความผิดพลาดในการเก็บตัวอย่างชิ้นได้ อาจจะมี DBM หลงเหลืออยู่ได้ทำให้ผลการทดลองคลาดเคลื่อน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง (References)

- [1] Ahn Hee Hyun, et al. Porcine small intestinal submucosa sheet as a scaffold for human bone marrow stem cell. Biological Macromolecular 41 (2007) : 590-596.
- [2] Kim Suk Moon, et al. Preparation of porcine small intestinal submucosa sponge and their application as a wound dressing in full-thickness skin defect of rat. Biological Macromolecular 36 (2005):54-60.
- [3] สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก และ วินัย พากเพียร. วิทยาศาสตร์การแพทย์ของกระดูกเซลล์ต้นกำเนิด และวิศวกรรมเนื้อเยื่อ. 2550. ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- [4] Marie Brown-Etris, William D and Michael C. PART I: A New Biomaterial Derived from Small Intestine Submucosa and Developed into a Wound Matrix Device. Wounds 14 (2002):1044-7946.
- [5] Ulloa-Montoya F, Verfaillie CM and Hu WS. Culture systems for pluripotent stem cells. J Biosci Bioeng 100 (2005):12-27.
- [6] Ruth Sorelle. 2004. Totipotent stem cell [online] <http://www.bcm.edu>: Baylor College of Medicine. [ค้นหาวันที่ 28 มีนาคม 2552]
- [7] Vladimir Kuznetsov. 2007. Multipotent stem cell [online] <http://www.russiablog.org> [ค้นหาวันที่ 28 มีนาคม 2552]
- [8] Lane E Nancy and Kelman Ariella. A review of anabolic therapies for osteoporosis. Arthritis Research & Therapy 5 (2003):214-222.
- [9] AI. 2007. Diagram of a long bone [online] <http://otapta.blogspot.com> [ค้นหาวันที่ 8 มีนาคม 2552]
- [10] Stein GS. and Lian JB. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. Endocrine Reviews (14)1993:424-442.
- [11] Soccol Thomas Andréa, et al. Defect repair in rat mandible with hydroxyapatite cement compared to small intestine submucosa. Revista Brasileira de Otorrinolaringologia 72 (2006):195-199.

- [12] Lian J.B. and Steim G.S. Development of the osteoblast phenotype: Molecular mechanism mediating osteoblast growth and differentiation. The Iowa Orthopaedic Journal 15 (1995):118-140.
- [13] Bhatti A.R. Purification and properties of the alkaline phosphatase of *Serratia marcescens*. Arch Microbiol 95 (1974):255-266
- [14] Benjamin W. และ Van Voorhees. 2007. Alkaline phosphatase isoenzyme test [online] The University of Chicago: <http://www.nlm.nih.gov>
[ค้นหาวันที่ 17 มกราคม 2552]
- [15] Lind Martin and Bünger Cody. Factor stimulating bone formation. European Spine Journal 10 (2001):102-109.
- [16] Groeneveld E.H.J., et al. Mineralization process in demineralized bone matrix grafts in human maxillary sinus floor elevations. Journal of Biomedical Materials Research 48 (1999):393-402.
- [17] Veillette JH Christian and McKee D Michael. Growth factors — BMPs, DBMs, and buffy coat products: are there any proven differences amongst them? Injury International Journal of The Care of The Injured 38S1 (2007): S38-S48.
- [18] Lawyer FC, et al. High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. PCR Methods Appl 2 (1993): 275–287.
- [19] Shawn Carlson. 2000. PCR at Home [online] Scientific American Magazine: <http://www.sciam.com> [ค้นหาวันที่ 28 มีนาคม 2552]
- [20] Alper G, et al. Osteogenesis in bone defect in rats: the effect of hydroxyapatite and demineralized bone matrix. The American Journal of the Medical Sciences 298 (1989):371-376.
- [21] Oztürk A, et al. Demineralized bone matrix and hydroxyapatite/tri-calcium phosphate mixture for bone healing in rats. International Orthopedics 30 (2006):147-152.

- [22] Altman Jason I., et al. Demineralized bone matrix and fat autograft in a rabbit model of frontal sinus obliteration. Otolaryngology-Head and Neck Surgery 137 (2007):264-268.
- [23] Schouten, et al. DBM induced ectopic bone formation in the rat: The importance of surface area. Journal of materials science: materials in medicine 16 (2005):149-152.
- [24] Zhang M, Powers RM Jr and Wolfinbarger L Jr. A quantitative assessment of osteoinductivity of human demineralized bone matrix. Journal of Periodontology 68 (1997):1076-1084.
- [25] Torricelli P, et al. In vitro osteoinduction of demineralized bone. Artificial Cells, Blood Substitutes, and Immobilization Biotechnology 26 (1998):309-315.
- [26] Iwata H, et al. Demineralized bone matrix and native bone morphogenetic protein in orthopaedic surgery. Clinical Orthopaedics and Related Research 395 (2002):99-109.
- [27] Hosny M and Sharawy M. Osteoinduction in rhesus monkeys using demineralized bone powder allografts. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery 43 (1985):837-844.
- [28] Gao J, et al. Osteochondral defect repair by demineralized cortical bone matrix. Clinical Orthopaedics and Related Research 427 (2004):62-66.
- [29] Albertsson T. and Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. European Spine Journal 10 (2001):96-101.
- [30] Boyan BD, et al. Osteoinductive ability of human allograft formulations. Journal of Periodontology 77 (2006):1555-1563.
- [31] Zhou Shuanhu, et al. Demineralized bone promotes chondrocyte or osteoblast differentiation of human marrow stromal cells cultured in collagen sponges. Cell Tissue Bank 6 (2005):33-44.
- [32] Ma X, Zhang C and Zhang K. Experimental study on repairing rabbit femoral condyle defect by small intestinal submucosa and HA-TCP compositions at different ratios. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi 20 (2006): 1061-1065.

- [33] Moxham Paul J., Wong K Kevin and Kibblewhite J Douglas. Transforming growth factor- β 1 shows an incremental osteoinductive dose-response relationship. Laryngoscope 119 (2009).
- [34] Graham MF, et al. Collagen content and types in the intestinal stricture of Crohn's disease. Gastroenterology 94 (1988):257-265.
- [35] Liu Guangpeng, et al. Tissue-engineered bone formation with cryopreserved human bone marrow mesenchymal stem cells. Cryobiology 56 (2008): 209-215.
- [36] Zhao Lin, Zhao Jun-Li, Wan Lin and Wang Shuan-Ke. The study of the feasibility of segmental bone defect repair with tissue-engineered bone membrane: a qualitative observation. Strat Traum Limb Recon 3(2) (2008):57-64.
- [37] Suckow M.A., et al. Enhanced bone regeneration using porcine small intestinal submucosa. Journal of Investigative Surgery 12 (1999):277-287.
- [38] Gutkin DV, et al. Alkaline and acid phosphatase activity in the dynamics of ectopic osteogenesis. Stomatologiya (Mosk) 2 (1992):18-20.
- [39] Dengshu Miao and Andrew Scutt. Histochemical localization of alkaline phosphatase activity in decalcified bone and cartilage. The Journal of Histochemistry & Cytochemistry 50 (2002):333-340.
- [40] Timothy R. Arnett and Brian Henderson. Method in Bone Biology. London: Chapman & Hall (1998): 1-39.
- [41] Hemocytometer [online] www.ansci.wisc.edu. [ค้นหาววันที่ 28 มีนาคม 2552]
- [42] Use of Hemocytometer [online] 2007. <http://www.51protocol.com>
[ค้นหาววันที่ 28 มีนาคม 2552]
- [43] Zhu Jian Hong and Burgess W Antony. Regulation of transforming growth factor- β signaling. Molecular Cell Biology Research Communication 4 (2001): 321-330.



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

เอกสารข้อมูลสำหรับอาสาสมัครโครงการวิจัย

(Information sheet for research volunteer)

ชื่อโครงการวิจัย	ความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกของลำไส้เล็กหนู ชั้นสับมิวโคซาและเนื้อกระดูกที่ผ่านการลดปริมาณเกลือแร่
ชื่อผู้วิจัย	นางสาวปิยนุช บำรุงพินิจถาวร
ที่อยู่	อาคารปริคณิศา ชั้น 11 ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
เบอร์โทรศัพท์	084-6498477 (มือถือ), 0-2256-4482 (ที่ทำงาน)

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัย	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นพ.สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก
ที่อยู่	อาคารปริคณิศา ชั้น 11 ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
เบอร์โทรศัพท์	0-2256-4482 (ที่ทำงาน)

เรียน ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยทุกท่าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่แสดงข้อมูลเพื่อใช้ประกอบการตัดสินใจของท่านในการเข้าร่วมการศึกษาวิจัย อย่างไรก็ตามก่อนที่ท่านตกลงเข้าร่วมการศึกษาดังกล่าว ขอให้ท่านอ่านเอกสารฉบับนี้อย่างละเอียดเพื่อให้ท่านได้ทราบถึงเหตุผลและรายละเอียดของการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ หากท่านมีข้อสงสัยใด ๆ เพิ่มเติม กรุณาซักถามจากผู้ทำวิจัย หรืออาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัย ซึ่งจะเป็นผู้สามารถให้ความกระจ่างแก่ท่านได้ ท่านสามารถขอคำแนะนำในการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้จากครอบครัว เพื่อน หรือแพทย์ประจำตัวของท่านได้ ถ้าท่านตัดสินใจแล้วว่าจะเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ ขอให้ท่านเซ็นชื่อยินยอมในเอกสารแสดงความยินยอมของโครงการวิจัยนี้

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

วัตถุประสงค์หลักจากการศึกษาในครั้งนี้คือ

1. เพื่อศึกษาผลของลำไส้เล็กของหนูชั้นสับมิวโคซาและกระดูกที่ผ่านการลดปริมาณเกลือแร่ต่อการกระตุ้นการเจริญเพิ่มจำนวน และการพัฒนาเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ต้นกำเนิดไปเป็นเซลล์กระดูก

2. เพื่อศึกษาการแสดงออกในระดับยีนที่ควบคุมการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงไป เป็นเซลล์กระดูก โดยการกระตุ้นด้วย ลำไส้เล็กของหนูชั้นลับมิวโคซา และกระดูกที่ผ่านการลด ปริมาณเกลือแร่

3. เพื่อศึกษาความสามารถของลำไส้เล็กของหนูชั้นลับมิวโคซาและกระดูกที่ผ่านการลดปริมาณเกลือแร่ ในการชักนำกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ในสัตว์ทดลอง

จำนวนผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย (ในประเทศไทย) คือ 10 คน

วิธีการที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย

ทำการเก็บเศษชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มกระดูกจากกระดูกที่ตัดออกในการผ่าตัด เปลี่ยนข้อเข่า โดยทำการคัดเลือกผู้เข้าร่วมโครงการจาก ผู้เข้ารับการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อมด้วยการ ผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม ที่ไม่มีการอักเสบที่เกิดจากการติดเชื้อ และยินยอมที่จะเข้าร่วม ในโครงการวิจัยนี้

ความรับผิดชอบของอาสาสมัครผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย

เพื่อให้งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จ จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องได้รับความ ร่วมมือจากท่าน โดยท่านจะต้องแจ้งอาการผิดปกติต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นกับท่านในระหว่างที่ท่านมาเข้า รับการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อมด้วยการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียมให้ผู้ทำวิจัยได้รับทราบ

ความเสี่ยงที่อาจได้รับ

ในการเข้าร่วมในโครงการวิจัยครั้งนี้ไม่มีความเสี่ยงใด ๆ เนื่องจากเป็นการเก็บชิ้น เนื้อเยื่อหุ้มกระดูกจากกระดูกที่แพทย์ผู้ทำการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อม ด้วยการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่า เทียมทำการตัดทิ้ง

ประโยชน์ที่อาจได้รับ

การเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ท่านไม่ได้รับประโยชน์โดยตรงจากการวิจัย แต่จะมี ประโยชน์ในการนำไปใช้ในการวิจัยและพัฒนาทางวิทยาศาสตร์ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้กับการรักษา ต่อไปในอนาคต

ข้อปฏิบัติของท่านขณะที่ร่วมโครงการวิจัย

สิ่งที่ท่านควรปฏิบัติคือ

- ท่านต้องให้ข้อมูลทางการแพทย์ของท่านทั้งในอดีต และปัจจุบัน แก่ผู้ทำวิจัยด้วย ความสัตย์จริง

- ท่านต้องแจ้งให้ผู้ทำวิจัยทราบความผิดปกติที่เกิดขึ้นระหว่างที่ท่านร่วมในโครงการวิจัย

อันตรายที่อาจเกิดขึ้นในโครงการวิจัย

ในการเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ไม่มีอันตรายใด ๆ ที่อาจเกิดขึ้นในโครงการวิจัยนี้ เนื่องจากเป็นการเก็บชิ้นเนื้อเยื่อกระดูกจากกระดูกที่แพทย์ผู้ทำการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อมด้วยการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียมทำการตัดทิ้ง การเซ็นชื่อในเอกสารฉบับนี้ไม่ได้หมายความว่าท่านได้สละสิทธิ์ทางกฎหมายตามปกติที่ท่านพึงมี

ในกรณีที่ท่านต้องการข้อมูลเพิ่มเติมที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัยท่านสามารถติดต่อกับผู้ทำวิจัย คือ นางสาวปิยนุช บำรุงพินิจถาวร ได้ตลอด 24 ชั่วโมง เบอร์โทรศัพท์ 084-6498477 (มือถือ)

ค่าใช้จ่ายสำหรับอาสาสมัครที่จะเข้าร่วมในการวิจัย

ท่านไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายใด ๆ เพิ่มจากการรักษาปกติของท่าน

การเข้าร่วมและการสิ้นสุดการเข้าร่วมโครงการวิจัย

การเข้าร่วมในโครงการวิจัยครั้งนี้เป็นไปโดยความสมัครใจ หากท่านไม่สมัครใจจะเข้าร่วมการศึกษาแล้ว ท่านสามารถถอนตัวได้ตลอดเวลา การขอถอนตัวจากโครงการวิจัยจะไม่มีผลต่อการดูแลรักษาโรคของท่านแต่อย่างใด

ผู้ทำวิจัยอาจถอนท่านออกจากการเข้าร่วมการวิจัย เพื่อเหตุผลด้านความปลอดภัยของท่าน หรือเมื่อผู้สนับสนุนการวิจัยยุติการดำเนินงานวิจัยนี้

การปกป้องรักษาข้อมูลของอาสาสมัคร

ข้อมูลนี้อาจนำไปสู่การเปิดเผยตัวของท่าน จะได้รับการปกปิดและจะไม่เปิดเผยแก่สาธารณชน ในกรณีที่ผลการวิจัยได้รับการตีพิมพ์ ชื่อและที่อยู่ของท่านจะต้องได้รับการปกปิดอยู่เสมอ โดยจะใช้เฉพาะรหัสประจำโครงการวิจัยของท่าน

จากการลงนามยินยอมของท่านผู้ทำวิจัยมีสิทธิ์สามารถเข้าไปตรวจสอบบันทึกข้อมูลทางการแพทย์ของท่านได้ตลอดเวลาแม้จะสิ้นสุดโครงการวิจัยแล้วก็ตาม หากท่านต้องการยกเลิกการให้สิทธิ์ดังกล่าว ท่านสามารถเขียนบันทึกขอยกเลิกการให้คำยินยอม โดยส่งไปที่ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (หากท่านขอยกเลิกการให้คำยินยอมหลังจากที่ท่านได้เข้าร่วมโครงการวิจัยแล้ว ข้อมูลส่วนตัวของท่านจะไม่ถูกบันทึกเพิ่มเติม อย่างไรก็ตามข้อมูลอื่น ๆ ของท่านอาจถูกนำมาใช้เพื่อประเมินผลการวิจัย และท่านจะไม่สามารถกลับมาเข้าร่วมในโครงการนี้ได้อีก ทั้งนี้เนื่องจากข้อมูลของท่านที่จำเป็นสำหรับใช้เพื่อการวิจัยไม่ได้ถูกบันทึก)

จากการลงนามยินยอมของท่านผู้ทำวิจัยสามารถบอกรายละเอียดของท่านที่เกี่ยวข้องกับการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ให้แก่แพทย์ผู้รักษาท่านได้

สิทธิของผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย

ในฐานะที่ท่านเป็นผู้ร่วมในโครงการวิจัย ท่านจะมีสิทธิดังต่อไปนี้

1. ท่านจะได้รับทราบถึงลักษณะและวัตถุประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้
2. ท่านจะได้รับการอธิบายเกี่ยวกับระเบียบวิธีการของการวิจัยทางการแพทย์ในการวิจัยครั้งนี้
3. ท่านจะได้รับการอธิบายถึงความเสี่ยงและความไม่สบายที่จะได้รับจากการวิจัย
4. ท่านจะได้รับการอธิบายถึงประโยชน์ที่ท่านอาจจะได้รับจากการวิจัย
5. ท่านจะมีโอกาสได้ซักถามเกี่ยวกับงานวิจัยหรือขั้นตอนที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
6. ท่านจะได้รับทราบว่าการยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ท่านสามารถขอถอนตัวจากโครงการเมื่อไรก็ได้ โดยผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยสามารถขอถอนตัวจากโครงการโดยไม่ได้รับผลเสียใด ๆ ทั้งสิ้น
7. ท่านจะได้รับสำเนาเอกสารใบยินยอมที่มีทั้งลายเซ็นและวันที่
8. ท่านจะได้โอกาสในการตัดสินใจว่าจะเข้าร่วมในโครงการวิจัยหรือไม่ก็ได้ โดยปราศจากการใช้สิทธิพลบังคับข่มขู่ หรือการหลอกลวง

หากท่านมีข้อปัญหาทางด้านจริยธรรมการวิจัยสามารถติดต่อได้ที่ คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตึกอำนวยการ ชั้น 3 โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทร 0-2256-4455 ต่อ 14, 15 ในเวลาราชการ

ขอขอบคุณในการร่วมมือของท่านมา ณ ที่นี้

.....

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัย

การวิจัยเรื่อง ความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกของลำไส้เล็กหนู
ชั้นสับมิวโคซา และเนื้อกระดูกที่ผ่านการลดปริมาณเกลือแร่

วันให้คำยินยอม วันที่..... เดือน พ.ศ.....

ข้าพเจ้า นาย/นาง/นางสาว.....

ได้อ่านรายละเอียดจากเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยวิจัยที่แนบมาฉบับวันที่
..... และข้าพเจ้ายินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยโดยสมัครใจ

ข้าพเจ้าได้รับสำเนาเอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยที่ข้าพเจ้า
ได้ลงนาม และ วันที่ พร้อมด้วยเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย ทั้งนี้ก่อนที่จะลงนาม
ในใบยินยอมให้ทำการวิจัยนี้ ข้าพเจ้าได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย
ระยะเวลาของการทำวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย หรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย รวมทั้ง
ประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัย และแนวทางรักษาโดยวิธีอื่นอย่างละเอียด ข้าพเจ้ามีเวลาและ
โอกาสเพียงพอในการซักถามข้อสงสัยจนมีความเข้าใจอย่างดีแล้ว โดยผู้วิจัยได้ตอบคำถามต่าง ๆ
ด้วยความเต็มใจไม่ปิดบังซ่อนเร้นจนข้าพเจ้าพอใจ

ข้าพเจ้ารับทราบจากผู้วิจัยว่าหากเกิดอันตรายใด ๆ จากการวิจัยดังกล่าว
ผู้เข้าร่วมวิจัยจะได้รับการรักษาพยาบาลโดยไม่เสียค่าใช้จ่าย

ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะบอกเลิกเข้าร่วมในโครงการวิจัยเมื่อใดก็ได้ โดยไม่จำเป็นต้อง
แจ้งเหตุผล และการบอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัยนี้จะไม่ผลต่อการรักษาโรคหรือสิทธิอื่น ๆ ที่
ข้าพเจ้าจะพึงได้รับต่อไป ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าเป็นความลับ และจะ
เปิดเผยได้เฉพาะเมื่อได้รับการยินยอมจากข้าพเจ้าเท่านั้น คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการ
วิจัยหรือผู้ได้รับอำนาจมอบหมายให้เข้ามาตรวจและประมวลข้อมูลของผู้เข้าร่วมวิจัย ทั้งนี้จะต้อง
กระทำไปเพื่อวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูลเท่านั้น โดยการตกลงที่จะเข้าร่วม
การศึกษานี้ข้าพเจ้าได้ให้คำยินยอมที่จะให้มีการตรวจสอบข้อมูลประวัติทางการแพทย์ของ
ผู้เข้าร่วมวิจัยได้ ผู้วิจัยรับรองว่าจะไม่มีการเก็บข้อมูลใด ๆ ของผู้เข้าร่วมวิจัย เพิ่มเติม หลังจากที่
ข้าพเจ้าขอยกเลิกการเข้าร่วมโครงการวิจัย และต้องการให้ทำลายเอกสารและ/หรือ ตัวอย่างที่ใช้
ตรวจสอบทั้งหมดที่สามารถสืบค้นถึงตัวข้าพเจ้าได้

ข้าพเจ้าเข้าใจว่า ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะตรวจสอบหรือแก้ไขข้อมูลส่วนตัวของ
ข้าพเจ้าและสามารถเลิกการให้สิทธิในการใช้ข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าได้ โดยต้องแจ้งให้ผู้วิจัย
รับทราบ

ข้าพเจ้าได้ตระหนักว่าข้อมูลในการวิจัยรวมถึงข้อมูลทางการแพทย์ที่ไม่มีการเปิดเผยชื่อ จะผ่านกระบวนการต่าง ๆ เช่น การเก็บข้อมูล การบันทึกข้อมูลในคอมพิวเตอร์ การตรวจสอบ การวิเคราะห์ และการรายงานเพื่อวัตถุประสงค์ทางวิทยาศาสตร์ รวมทั้งการใช้ข้อมูลทางการแพทย์ในอนาคตหรือการวิจัยทางด้านวิทยาศาสตร์ เท่านั้น

ข้าพเจ้ายินดีลงนามในเอกสารยินยอมนี้เพื่อเข้าร่วมการวิจัยด้วยความเต็มใจ

.....ลงนามผู้ยินยอม
(.....) ชื่อผู้ยินยอมตัวบรรจง
วันที่เดือน..... พ.ศ.....

ข้าพเจ้าได้อธิบายถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย หรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด ให้ผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยตามนามข้างต้นได้ทราบและมีความเข้าใจดีแล้ว พร้อมลงนามลงในเอกสารแสดงความยินยอมด้วยความเต็มใจ

.....ลงนามผู้ทำวิจัย
(.....) ชื่อผู้ทำวิจัย ตัวบรรจง
วันที่เดือน..... พ.ศ.....

.....ลงนามพยาน
(.....) ชื่อพยาน ตัวบรรจง
วันที่เดือน..... พ.ศ.....

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมี

1. 2-Amino-2-methyl-1-propanol buffer (pH 10.4) (0.15M)
2-amino-2-methyl-1-propanol (95% purity) 1.41 มิลลิลิตร ผสมกับ dH₂O จากนั้นปรับเป็น pH 10.4 ด้วย 1N HCl แล้วทำการเติม dH₂O จนครบ 100 มิลลิลิตร
2. p-nitrophenol (pNP) (2mM)
ละลาย p-nitrophenol 13.9 มิลลิกรัม ใน 0.15 M 2-amino-2-methyl-1-propanol buffer ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (สารละลายที่ได้ควรแบ่งเก็บในปริมาณน้อยที่อุณหภูมิ -20°C)
3. p-nitrophenol phosphate (pNPP) (100mM)
ละลาย pNPP 0.658 กรัม ใน 0.15 M 2-amino-2-methyl-1-propanol buffer ปริมาตร 25 มิลลิลิตร
4. 10 N NaOH
ละลาย NaOH 40 กรัม ใน dH₂O ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
5. 1X phosphate buffer saline (1X PBS) (pH 7.4) (ปริมาตร 2 ลิตร)

ละลาย NaCl	8	กรัม
Na ₂ HPO ₄	1.16	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.24	กรัม
KCl	0.20	กรัม

ใน dH₂O จากนั้นปรับเป็น pH 7.4 แล้วทำการเติมน้ำให้ครบ 2 ลิตร
6. การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร)
ทำการผสม fetal bovine serum ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และ α -Minimum essential medium (ที่ผสม penicillin/streptomycin 100 หน่วย/มิลลิลิตร) ปริมาตร 90 มิลลิลิตร
7. 50X Tris-acetate-EDTA buffer (50X TAE) (pH 7.6-7.8) (ปริมาตร 1 ลิตร)
ละลาย Tris-HCl 240 กรัม ใน glacial acetic acid 57.1 มิลลิลิตร และ 0.5 M EDTA (pH 8.0) 100 มิลลิลิตร แล้วทำการปรับ pH ให้ได้ 7.6-7.8 ด้วย 1 N HCl แล้วเติม dH₂O ให้ปริมาตรครบ 1 ลิตร
8. 1X Tris acetate EDTA (TAE) buffer (1 ลิตร)
นำ 50X TAE 20 มิลลิลิตร ผสมกับ dH₂O ให้ครบ 1 ลิตร

9. 2% (w/v) agarose gel

ละลาย Agarose powder 2 กรัม ใน 1X TAE 100 มิลลิลิตร ใส่ลงใน flask
ผสมให้เข้ากันทำให้ร้อนด้วยไมโครเวฟจน agarose ละลายหมด

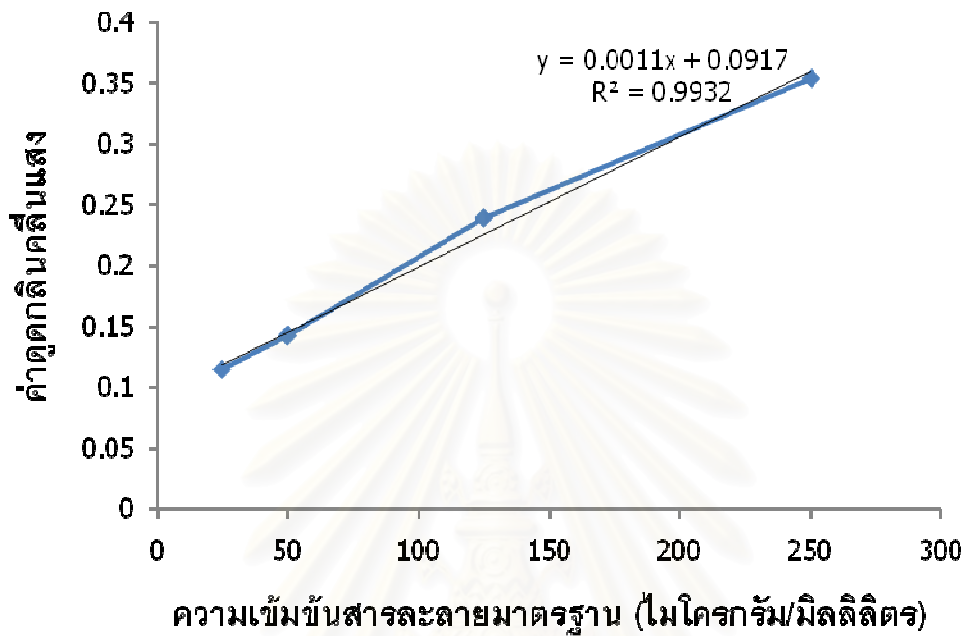
10. 10% Formaldehyde (ปริมาตร 1 ลิตร)

เติม 37% Formaldehyde ปริมาตร 370 มิลลิลิตร แล้วเติม dH₂O
ให้ครบปริมาตร 1 ลิตร



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค



รูปแสดงค่าสารละลายมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA)

การคำนวณหาปริมาณโปรตีนทั้งหมด

ค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนคลีนแสงที่ 570 นาโนเมตร ของสารละลายตัวอย่าง = 0.2257

แทนค่าลงในสมการ $y = 0.0011x + 0.0917$

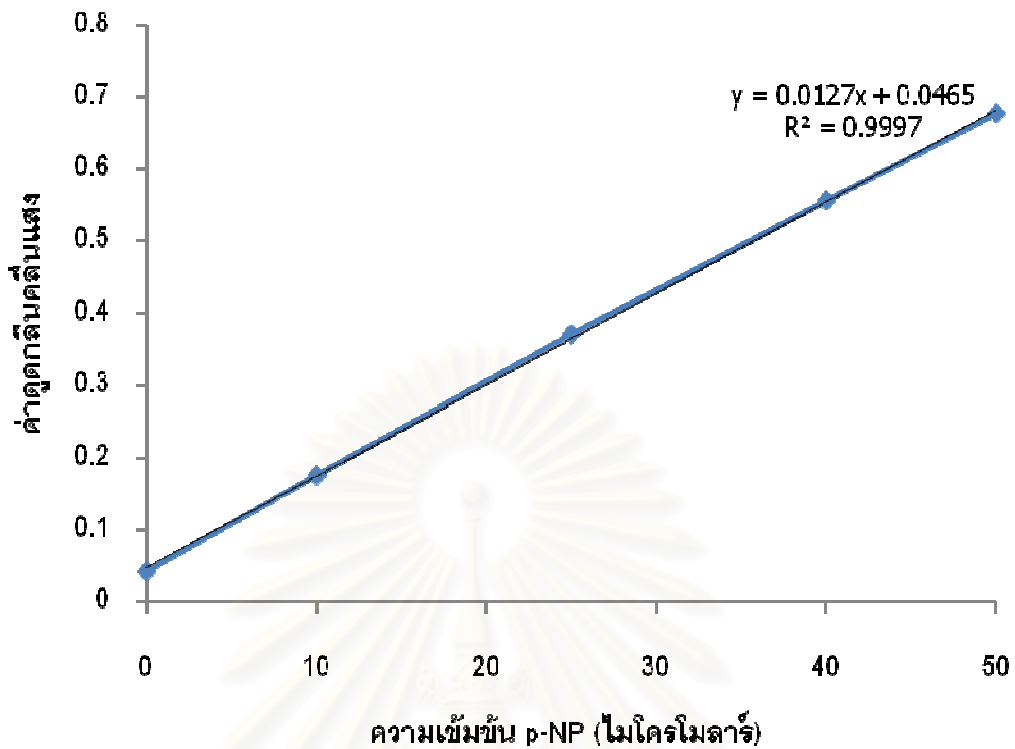
$$0.2257 = 0.0011x + 0.0917$$

$$0.2257 - 0.0917 = 0.0011x$$

$$x = 134.1364$$

ปริมาตรสารละลายตัวอย่าง 25 ไมโครลิตร = 0.025 มิลลิลิตร

ปริมาณโปรตีนทั้งหมด คือ $134.1364 \times 0.025 = 3.3534$ ไมโครกรัม



รูปแสดงค่า Extinction coefficient ของ p-NP ที่ค่าดูดกลืนคลื่นแสง 405 นาโนเมตร

การคำนวณหาค่า Extinction Coefficient ของ p-NP

ที่ค่าดูดกลืนคลื่นแสง 405 นาโนเมตร pH 7.4

จากสมการ Beer's law $A = E \cdot C \cdot L$

A = ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 405 นาโนเมตร

E = Extinction Coefficient

C = ความเข้มข้นของสารละลาย

L = ระยะทางที่แสงผ่านสารละลาย (1 เซนติเมตร)

Extinction Coefficient = $\frac{\text{ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 405 นาโนเมตร}}{\text{ความเข้มข้นของสารละลาย}}$

จากรูป ความชันเส้นกราฟ = $\frac{\text{ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 405 นาโนเมตร}}{\text{ความเข้มข้นของสารละลาย}}$

จากสมการเส้นตรงของเส้นกราฟ คือ $y = 0.0127x + 0.0465$

Extinction Coefficient = 0.0127

การคำนวณหาการทำงานของเอนไซม์ ALP

$$\text{การทำงานของเอนไซม์ ALP} = \frac{(\text{OD}/T) \times 0.25}{E \times P}$$

OD = ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 405 นาโนเมตร

T = เวลาในการทำปฏิกิริยา

0.25 = ปริมาตรสารละลายตัวอย่างทั้งหมดเป็นมิลลิลิตร

E = Extinction coefficient

P = ปริมาณโปรตีนทั้งหมดของสารละลาย

ตัวอย่างการคำนวณ

ค่าเฉลี่ยค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 405 นาโนเมตร ของสารละลายตัวอย่าง = 0.342

เวลาในการทำปฏิกิริยา = 20 นาที

Extinction coefficient = 0.0127

ปริมาณโปรตีนทั้งหมดของสารละลาย = 3.3534 ไมโครกรัม

$$\text{การทำงานของเอนไซม์ ALP} = \frac{(0.342/20) \times 0.25}{0.0127 \times 3.3534}$$

$$= 0.1105 \text{ นาโนโมล/นาที/ไมโครกรัมโปรตีน}$$

$$= 0.1105 \text{ นาโนโมล/นาที/ไมโครกรัมโปรตีน}$$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

แสดงรายงานการตีพิมพ์บางส่วนของวิทยานิพนธ์ในวารสารการประชุม
วิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 12 ณ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
วันที่ 12-13 กุมภาพันธ์ 2552

ชื่อวารสาร The 12th National Graduate Research Conference
หัวข้อเรื่อง ความสามารถของลำไส้เล็กหมูชั้นสับมิวโคซาและเนื้อกระดูกที่ผ่านการลด
ปริมาณเกลือแร่ในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูก
(OSTEOINDUCTIVE POTENTIAL OF PORCINE SMALL INTESTINAL
SUBMUCOSA AND DEMINERALIZED BONE MATRIX)

หน้า 1225 - 1232

รหัสการนำเสนอ MMP14

ชื่อผู้นำเสนอ นางสาวปิยนุช บำรุงพนิชถาวร

เผยแพร่ในสื่ออิเล็กทรอนิกส์

<http://gsbooks.gs.kku.ac.th/52/ngsr12/proceedings.html>

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ความสามารถของลำไส้เล็กหนูชั้นสับมิวโคซาและเนื้อกระดูกที่ผ่านการลดปริมาณเกลือแร่
ในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูก

**OSTEOINDUCTIVE POTENTIAL OF PORCINE SMALL INTESTINAL SUBMUCOSA
AND DEMINERALIZED BONE MATRIX**

ปิยนุช บำรุงพนิชถาวร(Piyanuch Bumrungpanichthaworn)* สิริสิศักดิ์ ธรรมมาเวก (Sittisak Honsawek)**

บทคัดย่อ

ในการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงความสามารถของลำไส้เล็กหนูชั้นสับมิวโคซา (small intestinal submucosa ; SIS) และเนื้อกระดูกที่ผ่านการลดปริมาณเกลือแร่(demineralized bone matrix ; DBM) ในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูก โดยทำการวิเคราะห์การแสดงออกของ CD antigen บนผิวเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก เพื่อการบ่งชี้ว่าเป็นเซลล์ที่จะเจริญเป็นเซลล์เนื้อเยื่อประสาน พบว่าเซลล์ที่ได้จากเยื่อหุ้มกระดูกมีการแสดงออกของ CD29 CD44 CD90 และ CD105 (เป็นโปรตีนบ่งชี้ของเซลล์ที่จะเจริญเป็นเซลล์เนื้อเยื่อประสาน) ในระดับสูง แต่ไม่มีการแสดงออกของ CD34 และ CD45 (เป็นโปรตีนบ่งชี้ของเซลล์เม็ดเลือดแสดงว่าเซลล์ที่ได้จากเยื่อหุ้มกระดูกเป็นเซลล์ที่จะเจริญเป็นเซลล์เนื้อเยื่อประสาน) จากนั้นทำการศึกษาผลของกระดูกที่ผ่านการลดปริมาณเกลือแร่ และลำไส้เล็กของหนูชั้นสับมิวโคซาต่อการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก พบว่าหลังจากกระตุ้นด้วย SIS มีการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์เพิ่มขึ้นที่ปริมาณ 5 และ 10 มิลลิกรัม และในกลุ่มที่กระตุ้นด้วย DBM หรือ SIS ผสมกับ DBM พบว่ามีการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้กระตุ้น

ABSTRACT

The objective of this research was to study osteoinductive potential of porcine small intestinal submucosa and demineralized bone matrix. Our flow cytometry analysis demonstrated that periosteal derived cells expressed cell surface antigen used to define mesenchymal stem cell isolate from periosteal. The results showed that periosteal derived cells expressed high level of CD29, CD44, CD90 and CD105 (mesenchymal stem cells markers; MSC markers) but did not express CD34 and CD45 (hematopoietic stem cell markers; HSC marker). The effects of demineralized bone matrix (DBM) and porcine small intestinal submucosa (SIS) on periosteal derived stem cells to were studied. The results showed that dose response curves with SIS exhibited maximal activity at 5 and 10 mg. The cells treated with DBM and mixture (DBM + SIS) were significantly increased in cell number compared with non treated cells ($p < 0.05$).

คำสำคัญ : กระดูกที่ผ่านการลดปริมาณเกลือแร่, ลำไส้เล็กหนูชั้นสับมิวโคซา, เซลล์ต้นกำเนิดเนื้อประสาน

Key Words : Demineralized bone matrix, Small intestinal submucosa, Mesenchymal stem cell

* มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ภาควิชาชีวเคมีทางการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

ในปัจจุบันโรคหรือกลุ่มอาการต่าง ๆ ของกระดูก รวมทั้งความบกพร่องของกระดูกที่เกิดจากอุบัติเหตุมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นทุกปี เช่น กระดูกหัก กระดูกพรุน เนื่องมาจากกระดูก กระดูกติดเชื้อมากขึ้นเรื่อยๆ เชื้อรา และ วัณโรค เป็นต้น ภาวะดังกล่าวก่อให้เกิดความผิดปกติต่อร่างกายของผู้ป่วยที่ยังส่งผลต่อการดำรงชีวิตในหลายด้านอีกด้วย ซึ่งความบกพร่องของกระดูกที่เกิดขึ้นบางกรณีต้องใช้เวลาในการรักษาและซ่อมแซมกระดูกเป็นเวลานาน เซลล์สร้างกระดูกในผู้ป่วยสามารถสร้างได้จำกัด ทำให้กระดูกใหม่ที่เกิดขึ้นอาจไม่สมบูรณ์ เหมือนกับกระดูกเดิม กระดูกที่เกิดขึ้นอาจไม่เชื่อมติดกัน ในการซ่อมแซมของกระดูกมีความสามารถในวงจำกัดต่อการสร้างกระดูก รวมถึงสภาวะของผู้ป่วย เช่น เพศ อายุ การหมดประจำเดือน การขาดฮอร์โมน มีผลต่อความสามารถในการสร้างกระดูกของผู้ป่วยแต่ละคนมากน้อยต่างกัน ซึ่งในปัจจุบันได้มีการศึกษาค้นคว้าวิธีการรักษาความบกพร่องของกระดูก อาทิเช่น การใช้เทคโนโลยีทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกหรือแม้แต่วิธีการโดยการเปลี่ยนถ่ายเนื้อเยื่อกระดูกมาใส่ทดแทนบริเวณที่มีการแตกหรือร้าวของกระดูก

การศึกษาค้นคว้าวัสดุต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็นวัสดุจากธรรมชาติ วัสดุที่ได้จากโพลิเมอร์สังเคราะห์ เพื่อใช้ผลิตวัสดุทดแทน วัสดุที่ทำให้เกิดการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์สร้างกระดูก กระตุ้นการพัฒนาเซลล์สร้างกระดูกทำให้เกิดกระดูกใหม่ในบริเวณที่เกิดความผิดปกติต่างๆ ของกระดูก วัสดุที่ได้จากโพลิเมอร์สังเคราะห์ เช่น polyglycolic acid (PGA), polylactic acid (PLA), poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) เป็นต้น ส่วนวัสดุที่ได้จากธรรมชาติ เช่น collagen, alginate, chitosan ซึ่งได้มีการศึกษาถึงความสามารถในการนำมาใช้กระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดไปเป็นเซลล์ปลายทางของกระดูกได้ โดยมีสาร

กระตุ้นการเจริญเปลี่ยนแปลงด้วยโปรตีน growth factors และ cytokines เช่น insulin-like growth factor (IGF), fibroblast growth factor (FGF), platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor- β (TGF- β), bone morphogenetic proteins (BMPs) เป็นต้น ก่อนหน้านี้ได้มีการศึกษาถึงวัสดุทดแทนกระดูก demineralized bone matrix (DBM) หรือที่รู้จักกันดีว่าเป็นเนื้อเยื่อกระดูกที่ได้ผ่านกระบวนการลดปริมาณเกลือแร่ที่อยู่ในกระดูก เช่น แคลเซียม ฟอสฟอรัส เป็นต้น ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) (Altman Jason et al., 2007) แต่ยังคงมีองค์ประกอบของคอลลาเจน และ โปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจน (noncollagenous proteins) และรวมทั้งโปรตีนต่างๆ เช่น growth factors และ bone morphogenetic proteins ซึ่งมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการเจริญเพิ่มจำนวน และชักนำการเจริญเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์สร้างกระดูกได้ ทำให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ ซึ่งปริมาณของ DBM ที่ใช้ในการชักนำการเจริญเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์สร้างกระดูก มีผลต่อความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกได้แตกต่างกัน พบว่า DBM ปริมาณ 5 และ 10 มิลลิกรัม มีการกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกได้ดีที่สุดในระดับเซลล์เพาะเลี้ยง (Zhang M et al., 1997)

ในปัจจุบันวัสดุที่ได้จากธรรมชาติอีกชนิดหนึ่งที่มีการศึกษากันอย่างแพร่หลายคือ small intestinal submucosa หรือที่เรียกกันว่า SIS เนื่องจาก SIS เป็นวัสดุธรรมชาติที่หาได้ง่าย สะดวกในการนำมาศึกษาทดลอง และสามารถเตรียมได้ในปริมาณมากพอต่อการนำไปใช้ในการรักษาทางคลินิกได้ SIS ที่กล่าวถึงนี้ได้มาจากลำไส้เล็กของหนูชั้น submucosa โดยการลอกเอาชั้น tunica serosa และ tunica muscularis ออกจาก SIS มีองค์ประกอบเป็นคอลลาเจน ชนิดที่ 1 และชนิดที่ 3 มากกว่า 90% (MF Graham, 1988) และยังมี growth factors เช่น FGF, TGF- β , epidermal growth factor (EGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), IGF-1

และ glycosaminoglycans, fibronectin, chondroitin sulfates, hyaluronic acid, heparins, heparin sulfates เป็นต้น ซึ่งมีผลกระตุ้นให้เกิดการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิด และยังสามารถกระตุ้นการเจริญเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดไปเป็นเซลล์ปลายทางได้ (Ahn Hee Hyun et al., 2007) (Kim Suk Moon et al., 2005) มีการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันต่ำ เหมาะสมต่อการยึดเกาะของเซลล์ จากการศึกษาก่อนหน้านี้ถึงผลของ native SIS และ acid treat SIS ต่อ human bone marrow stem cells (hBMSCs) พบว่าทั้ง native SIS และ acid treat SIS มีความสามารถในการกระตุ้นการเจริญเพิ่มจำนวนของ hBMSCs ได้เช่นเดียวกัน แต่มีความสามารถในการกระตุ้นการเจริญเพิ่มจำนวนได้มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงเซลล์ใน polyglycolic acid (PGA) (Ahn Hee Hyun, 2007) Zhao Lin และคณะ ได้ทำการศึกษา tissue-engineer membrane เลียนแบบเยื่อหุ้มกระดูก (periosteum) ที่เตรียมใน *in vitro* เพื่อทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกขึ้นใหม่ โดยใช้ porcine SIS เป็น scaffold ในการเพาะเลี้ยง MSCs พบว่า tissue-engineer membrane นี้มีความสามารถในการกระตุ้นให้มีการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกได้ (Zhao Lin, 2008)

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ได้มีการศึกษาถึงความสามารถของ DBM ในการชักนำให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ได้ แต่เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาถึงคุณสมบัติของ SIS เหมือนกับ DBM ด้วยเหตุนี้จึงทำให้เกิดคำถามของงานวิจัยนี้ถึงคุณสมบัติของ SIS เหมือนกับ DBM ต่อการเจริญเพิ่มจำนวน และการเจริญพัฒนา เปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดเป็นเซลล์สร้างกระดูกได้หรือไม่

วิธีการวิจัย

การเตรียม demineralized bone matrix

นำกระดูกมาตัดให้ได้ขนาดประมาณ 1 นิ้ว นำไปล้างด้วย 0.01X Allowash solution (Brij 35), 3% H₂O₂

70% isopropyl alcohol พร้อมกับนำไปแช่ล้าง (หรือ sonicate) เป็นเวลา 15 นาที ทั้งสิ้นจำนวน 3 ครั้ง จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไปแช่ล้าง (หรือ sonicate) แล้วนำไปทำให้แห้งด้วยความเย็น (lyophilization) นำกระดูกที่ได้ไปบดเป็นผงให้ได้ขนาด < 1000 ไมครอน และเก็บไว้ที่ -80°C

การลดปริมาณเกลือแร่ของเนื้อเยื่อกระดูก

ทำการประยุกต์ทำการประยุกต์จากวิธีที่รายงานมาก่อนหน้านี้ (Altman Jason et al., 2007) โดยนำผงกระดูกที่ได้ใส่ลงในภาชนะที่มี 0.1 N HCl ปริมาตร 10 เท่าของปริมาณผงกระดูก จากนั้นนำไปทำการแช่ด้วยความเร็ว 250 รอบ/นาที เป็นเวลา 60 นาที แล้วทำการเปลี่ยน 0.1 HCl ใหม่ทุกชั่วโมงจนครบ 8 ชั่วโมง จากนั้นทำการล้างผงกระดูกด้วยน้ำกลั่นหรือเมฆ่าน้ำเป็นเวลา 10 นาที จำนวน 4 ครั้ง แล้วทำให้แห้งด้วยความเย็นนำ DBM ที่ได้เก็บที่ -80 °C

การวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียม

การวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมด้วยวิธี colorimetric โดยนำ DBM ปริมาณ 20 กรัม ใส่ลงในหลอดที่มี 1 N HCl แล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลาข้ามคืนเพื่อทำการละลาย DBM จากนั้นนำสารละลายที่ได้ตรวจวัดปริมาณแคลเซียมที่เหลืออยู่ด้วย calcium reagent Arsenazo III โดยใช้ reagent Arsenazo ปริมาตร 1,250 ไมโครลิตร และสารละลายตัวอย่างปริมาตร 25 ไมโครลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 60 วินาที แล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร นำค่าที่ได้คำนวณปริมาณแคลเซียมที่เหลืออยู่

การเตรียม small intestinal submucosa (SIS)

ทำการประยุกต์จากวิธีที่รายงานมาก่อนหน้านี้ (Kim Suk Moon et al., 2005) นำลำไส้เล็กของหนูสุดล้างทำความสะอาด จากนั้นนำมาตัดให้เป็นท่อน แล้วทำการลอกเอาชั้น muscularis externa และชั้น serosa ออก และชุดเอา

ชั้น mucosa (ชั้นที่มีลักษณะเป็นเมือกชั้นในสุด) นำไปแช่ด้วย 70% ethanol แล้วนำมาเข้าเครื่องบดป่น (grinder mill) แล้วทำการแช่ใน 3% acetic acid ที่มี 0.1% pepsin เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ล้างกรดออกด้วยน้ำกลั่นให้หมด จากนั้นทำให้แห้งด้วยความเย็นแล้วนำไปเก็บที่ -80°C

การแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก

นำเยื่อหุ้มกระดูกมาตัดแยกให้เป็นชิ้นขนาด 1x1 มิลลิเมตร แล้วล้างด้วย phosphate buffer saline และนำชิ้นเนื้อเยื่อที่ได้วางลงใน T25 flask (culture flask) ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด α -minimum essential medium (α -MEM) ซึ่งมี 10% fetal bovine serum (FBS) และ 200 หน่วย/มิลลิกรัม penicillin-streptomycin ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C 5% CO_2 และเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกสัปดาห์ เมื่อเซลล์มีการเจริญเต็มภาชนะทำการลอกเซลล์ออกจาก flask ด้วย 0.25% trypsin แล้วนำเซลล์ที่ได้ลงใน T75 flask ที่มี 10% fetal bovine serum (FBS) และ 100 unit/ml penicillin-streptomycin เพื่อทำการเลี้ยงเพิ่มจำนวนเซลล์

การทดสอบ cell surface markers ของเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก

การทดสอบ cell surface markers ของเซลล์ต้นกำเนิด (mesenchymal stem cell) จากเยื่อหุ้มกระดูกด้วย flow cytometry โดยใช้ fluorescence-activated cell sorter (FACS) (BD Biosciences) และใช้แอนติบอดีที่มีการติดฉลาก ดังนี้ CD29-PE/Cy5, CD44-PE, CD90-FITC และ CD105-PE (Biolegend, USA)(mesenchymal stem cell surface markers) สำหรับ inclusion criteria ส่วน CD34-FITC และ CD45-APC (Biolegend, USA)(hematopoietic stem cell markers) สำหรับ exclusion criteria โดยทำการรวบรวมเซลล์ periosteal derived cells ที่ทำการเพาะเลี้ยง passage ที่ 3 ด้วยวิธี trypsinization ล้างเซลล์ด้วย 1X phosphate buffer saline (PBS) ที่มีส่วนผสมของ sodium azide 1 กรัม และ bovine serum albumin 5 กรัม ใน

สัดส่วนของ PBS 1 ลิตร จำนวน 2 รอบ ปั่นเหวี่ยงรอบละ 350 g เป็นเวลา 5 นาที แบ่งเซลล์ลง 15 มิลลิกรัม centrifuge tube ให้ได้หลอดละประมาณ 500,000 เซลล์ โดยใช้เซลล์หนึ่งหลอดต่อการทดสอบ CD antigen หนึ่งชนิด และมีอีกหนึ่งหลอดที่ไม่ทำการย้อมด้วย antibodies ใดๆ ให้เป็น negative control จากนั้นนำ CD marker antibodies แต่ละตัว (CD29, CD34, CD44, CD45, CD90, CD105) ใส่หลอดละ 20 ไมโครลิตร จากนั้น incubate ในที่มืด แช่ในน้ำแข็งประมาณ 20 นาที นำมาล้างใน 1X PBS จำนวน 2 รอบ ปั่นเหวี่ยงรอบละ 350 g เป็นเวลา 5 นาที จากนั้น fix เซลล์ใน 1X PBS ที่มีส่วนผสมของ 0.5% formaldehyde จำนวน 500 ไมโครลิตร เป็นเวลา 5 นาที ในที่มืด จากนั้นจึงนำเข้าสู่เครื่อง BD FACS Calibur เพื่อวิเคราะห์การแสดงออกของ CD antigen บนผิวเซลล์ แล้วทำการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ด้วยโปรแกรม BD Cell Quest Pro Software

การศึกษามวลของ SIS และ DBM ต่อการเจริญของเซลล์

ทำการทดสอบผลของ DBM 5 มิลลิกรัม, DBM 2.5 มิลลิกรัม ผสมกับ SIS 2.5 มิลลิกรัม และ SIS ที่มีน้ำหนักแตกต่างกัน ดังนี้ 5, 10 และ 20 มิลลิกรัม ต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์เพาะเลี้ยง โดยใช้เซลล์เริ่มต้น 5×10^4 เซลล์ ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด α -MEM ที่มี 2% FBS และ 100 หน่วย/มิลลิกรัม penicillin/streptomycin ที่อุณหภูมิ 37°C 5% CO_2 ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3, 5, 7 และ 10 วัน เมื่อครบเวลาทำการวิเคราะห์ตรวจสอบจำนวนเซลล์ โดยใช้วิธี trypan blue staining assay เปรียบเทียบจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้กระตุ้นด้วย DBM หรือ SIS

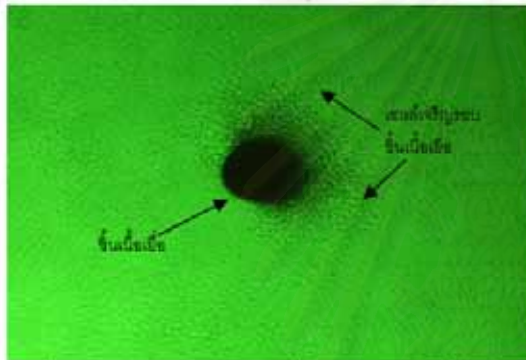
การวิเคราะห์ข้อมูล

สถิติเชิงพรรณนา เป็นสถิติที่เกี่ยวข้องกับการเก็บรวบรวมข้อมูล และการนำเสนอข้อมูล โดยจะแสดงเป็นค่าเฉลี่ย (mean) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ใน

รูปแบบกราฟ และใช้วิธีการวิเคราะห์ข้อมูลด้วย สถิติเชิงอนุมาน ได้แก่ t-test เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลอง โดยจะถือว่าความแตกต่างนั้นมีนัยสำคัญทางสถิติก็ต่อเมื่อ $p < 0.05$

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

จากการแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก พบว่าหลังจากที่ทำการเพาะเลี้ยง เซลล์มีการเจริญขึ้นมาโดยรอบชั้นเนื้อเยื่อที่เกาะติดอยู่บนผิวภาชนะ และเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนรอบชั้นเนื้อเยื่อนั้น (รูปที่ 1) ซึ่งเซลล์ที่พบมีลักษณะของ fibroblast-like cells (รูปที่ 2)

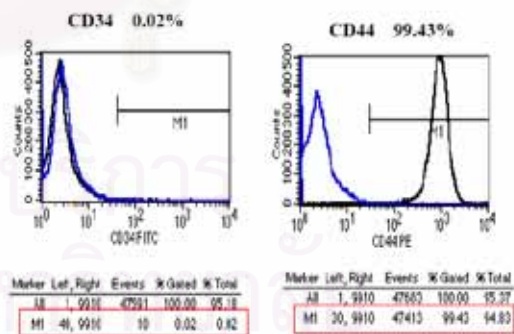


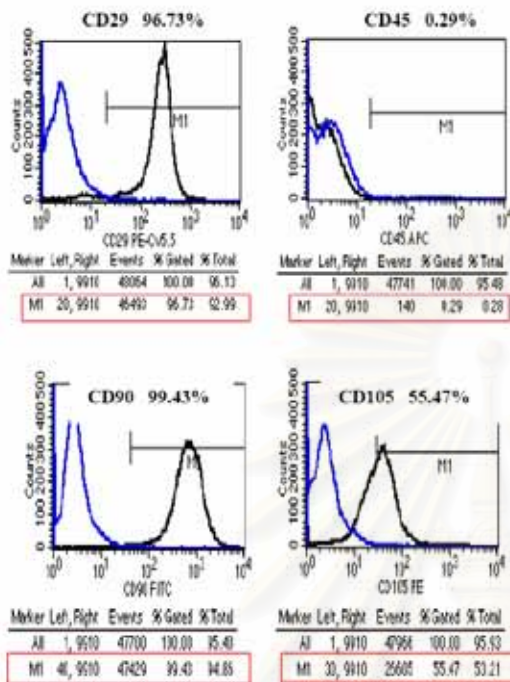
รูปที่ 1 แสดงผลจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีการเคลื่อนที่ออกมาจากชั้นเนื้อเยื่อ และเซลล์มีการเจริญโดยรอบชั้นเนื้อเยื่อ



รูปที่ 2 แสดงลักษณะเซลล์เยื่อหุ้มกระดูก ซึ่งเซลล์มีลักษณะของ fibroblast-like cells

หลังจากที่เซลล์มีการเจริญเติบโตและทำการเพิ่มจำนวนเซลล์แล้วนำเซลล์ที่ได้มาทำการวิเคราะห์การแสดงออกของ CD antigen บนผิวเซลล์เซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูก โดยเลือก CD34 และ CD45 ซึ่งเป็น hematopoietic stem cell surface markers (HSC marker) ใช้เป็น rule out exclusion และเลือก CD29, CD44, CD90 และ CD105 ซึ่งเป็น mesenchymal stem cell surface markers (MSC markers) ใช้เป็น rule in inclusion ปรากฏว่าไม่มีการแสดงออกของ HSC markers (น้อยกว่า 1%) โดยพบว่ามีการแสดงออกของ CD34 < 0.02% และ CD45 < 0.29% ตามลำดับ ในขณะที่มีการแสดงออกของ MSC markers ในระดับสูง ดังนี้ CD29, CD44, CD90 และ CD105 มีการแสดงออกจำนวน 96.73%, 99.43%, 99.43% และ 55.47% ตามลำดับ (รูปที่ 3) จากผลที่ได้มีการแสดงออกของ MSC marker สูงกว่า HSC marker อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงให้เห็นได้ว่าเซลล์ปฐมภูมิ periosteal derived cells มีคุณสมบัติของเซลล์ที่จะเจริญไปเป็นเซลล์เนื้อเยื่อประสาน (mesenchymal stem cells) เนื่องจากเซลล์ periosteal derived cells ให้ผลลบต่อ CD34 และ CD45 ซึ่งเป็น โปรตีนบ่งชี้ผิวเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือด (hematopoietic cell)

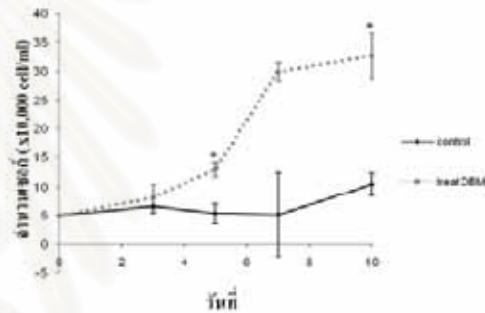




รูปที่ 3 แสดง 2D histogram จากการศึกษาวิเคราะห์ CD antigen ของเซลล์ periosteal derived cells

จากการศึกษาผลของ SIS และ DBM ต่อการเจริญของเซลล์ ในการวิจัยนี้ใช้กระดูกที่ผ่านการลดปริมาณเกลือแร่ที่มีปริมาณแคลเซียมเหลืออยู่ไม่เกิน 3% และใช้จำนวนเซลล์ต้นกำเนิดจากเยื่อหุ้มกระดูกเริ่มต้น 50,000 เซลล์/มิลลิตร เท่ากันทุกกลุ่มการทดลอง หลังจากทำการกระตุ้นเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากเยื่อหุ้มกระดูกแล้วทำการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วยวิธี tryphan blue staining assay เมื่อครบ 3, 5, 7 และ 10 วันหลังจากที่กระตุ้นในการกระตุ้นใช้ DBM 5 มิลลิกรัม เนื่องจากมีรายงานจากการศึกษาก่อนหน้าของ Zhang และคณะในปี 1997 รายงานไว้ว่า DBM ในปริมาณ 5 มิลลิกรัม มีผลต่อการกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกได้ดีที่สุดในระดับเซลล์เพาะเลี้ยง ส่วน SIS มีการแปรผัน

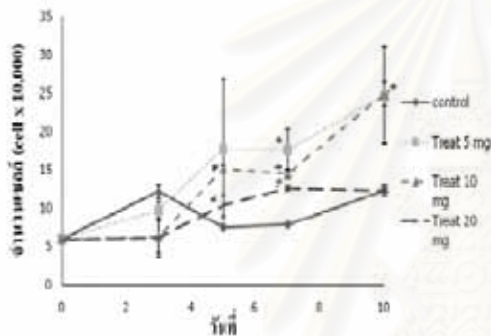
ปริมาณที่ใช้กระตุ้น เนื่องจากยังไม่เคยมีการรายงานก่อนหน้าถึงผลที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย SIS จึงทำการแปรผันปริมาณ SIS ดังนี้ ปริมาณ SIS ที่ใช้ 5, 10, 20 มิลลิกรัม และ DBM สหสัมพันธ์กับ SIS อย่างละ 2.5 มิลลิกรัม จากผลการทดลอง พบว่าเซลล์เยื่อหุ้มกระดูกที่ถูกกระตุ้นด้วย DBM 5 มิลลิกรัม ในวันที่ 5 มีการเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการกระตุ้น และเพิ่มขึ้นสูงที่สุดในวันที่ 10 (รูปที่ 4) แสดงว่า DBM มีความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้ ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ (Toricelli et al., 1998)



รูปที่ 4 แสดงผลของ DBM ต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ (* $p < 0.05$)

สำหรับเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย SIS ในปริมาณแตกต่างกัน พบว่า SIS ปริมาณ 5 มีผลต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในวันที่ 7 ส่วนกลุ่มที่กระตุ้นด้วย SIS 10 มิลลิกรัม ในวันที่ 5 หลังจากกระตุ้น มีการเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และเพิ่มขึ้นสูงที่สุดในวันที่ 10 ในการกระตุ้นด้วย SIS ในปริมาณนั้น ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ ส่วนเซลล์ที่กระตุ้นด้วย SIS ปริมาณ 20 มิลลิกรัม พบว่าการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในวันที่ 5 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) แต่มีการเจริญเพิ่มจำนวนน้อยกว่าในกลุ่มที่กระตุ้นด้วย 5 และ 10 มิลลิกรัม (รูปที่ 5) อาจ

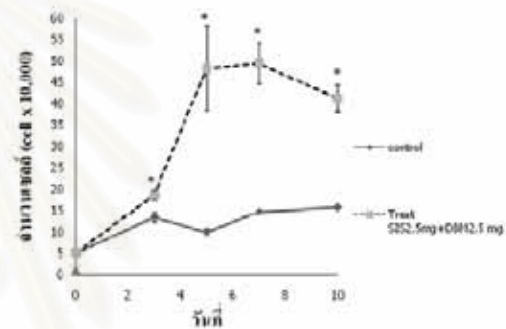
เนื่องมาจาก SIS ที่ให้ไปนั้นมีความเหนียวจับตัวกันเป็นก้อนไม่แตกออกจากกัน และมีความสามารถในการอุ้มน้ำได้ดี ทำให้ SIS ตกงออยู่ที่พื้นภาชนะเลี้ยงเซลล์ มีผลให้เซลล์บริเวณนั้นมีการหลุดลอกออกเมื่อสังเกตผ่านกล้องจุลทรรศน์ และอาจมีผลต่อการเจริญของเซลล์ทำให้เซลล์ที่เจริญใหม่ไม่สามารถยึดติดกับพื้นภาชนะได้ แสดงให้เห็นว่า SIS ปริมาณ 5 และ 10 มิลลิกรัม มีผลในการกระตุ้นให้เกิดการเจริญเพิ่มจำนวนได้ดีที่สุด และเป็นปริมาณที่เหมาะสมแก่การนำมาใช้ในการกระตุ้นให้เกิดการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์



รูปที่ 5 แสดงผลของ SIS ต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ (* p<0.05)

จากผลการทดลองก่อนหน้าที่ SIS ปริมาณ 5 มิลลิกรัม และ DBM 5 มิลลิกรัม มีความสามารถในการกระตุ้นการเจริญเพิ่มจำนวนได้ดีที่สุด จึงเลือกที่จะใช้ปริมาณของ DBM ผสมกับ SIS รวมเป็น 5 มิลลิกรัม โดยใช้ SIS และ DBM อย่างละ 2.5 มิลลิกรัม ในการกระตุ้น พบว่าการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (p<0.05) ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ในวันที่ 3 และมีการเจริญเพิ่มจำนวนสูงสุดในวันที่ 5 แล้วคงที่ในวันที่ 7 (รูปที่ 6) และยังคงพบว่าการกระตุ้นให้เกิดการเจริญเพิ่มจำนวนได้ดีกว่าการกระตุ้นด้วย SIS หรือ DBM เพียงชนิดเดียว โดยใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากัน จากกราฟพบว่าจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นมีจำนวนสูงกว่าใน

กลุ่มที่กระตุ้นเพียงชนิดเดียว และหลังจากนั้นพบว่ามีการลดลงในวันที่ 10 แสดงให้เห็นว่าเซลล์มีการหลุดลอกออกซึ่งอาจเกิดจากปริมาณโปรตีนที่ปล่อยออกมาจาก SIS และ DBM เพื่อกระตุ้นให้เกิดการเจริญเพิ่มจำนวนลดลงและมีการสลายตัว ทำให้มีปริมาณไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตและคงอยู่ของเซลล์ ทำให้เซลล์ลดน้อยลงได้ ซึ่งในการกระตุ้นด้วย DBM, SIS และ DBM ผสม SIS มีการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้เนื่องจาก growth factors ที่มีอยู่ใน DBM และ SIS มีการปล่อยออกมากระตุ้นให้เกิดการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ได้มากขึ้น



รูปที่ 6 แสดงผลของ DBM ผสม SIS ต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ (* p<0.05)

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาวิเคราะห์โปรตีนผิวเซลล์ด้วย Flow cytometric analysis เซลล์นี้ให้ผลลบต่อ CD34 และ CD45 ซึ่งเป็นโปรตีนบ่งชี้ผิวเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือด แสดงว่าเซลล์ดังกล่าวไม่ใช่เซลล์ในระบบเลือด เมื่อตรวจสอบโปรตีนบ่งชี้ผิวเซลล์ CD29, CD44, CD90 และ CD105 พบว่าให้ผลบวก แสดงให้เห็นว่าเซลล์นี้เป็นเซลล์ที่จะเจริญเป็นเซลล์เนื้อเยื่อประสาน

จากการศึกษาผลของ DBM, SIS และ DBM ผสม SIS ต่อการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ แสดงให้เห็นว่า วัสดุทั้งสองชนิดนั้นมีผลในการกระตุ้นให้เกิดการเจริญเพิ่ม

จำนวนของคอลลาเจน และเมื่อผสมกันพบว่ามีการกระตุ้นมากขึ้นกว่าการกระตุ้นด้วยวัสดุเพียงชนิดเดียว

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนวิจัยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยแห่งประเทศไทย (สกว., DBG4980017) คณะผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์วิจัย Chula MRC (Chulalongkorn Medical Research Center) และภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนเครื่องมือและห้องปฏิบัติการในการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Alan Hee Hyun, Kim Sook Kyung, Lee Hwa Jung, Lee Suk

Min, Song Bum In, Cha Hee Mi et al. 2007. Porcine small intestinal submucosa sheet as a scaffold for human bone marrow stem cell. *Biological Macromolecular*, 41, 590-596.

Altman Jason L, Eloy Jean Anderson, Hoch Benjamin L.,

Munoz Carla M., Shohet Michael R. 2007. Demineralized bone matrix and fat autograft in a rabbit model of frontal sinus obliteration. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, 137, 264-268.

Kim Suk Moon, Hong Duck Keum, Shin Won Hye, Kim

Hwa Seon, Kim Hee Soon, Lee Suk Min et al. 2005. Preparation of porcine small intestinal submucosa sponge and their application as a wound dressing in full-thickness skin defect of rat. *Biological Macromolecular*, 36, 54-60.

MF Graham, RF Diegelmann, et al. 1988. Collagen content and types in the intestinal stricture of Crohn's disease. *Gastroenterology*, 94, 257-265.

Toricelli P, Fini M, Giavaresi G, Giardino R. 1998. In vitro osteoinduction of demineralized bone. *Artif Cells Blood Substitute Immobile Biotechnology*, 26, 309-315.

Zhang M, Powers RM Jr, Wolfenbarger L Jr. 1997. A quantitative assessment of osteoinductivity of human demineralized bone matrix. *J Periodontol*, 68, 1076-1084.

Zhao Lin, Zhao Jun-Li, Wan Lin, Wang Shan-Ke. 2008. The study of the feasibility of segmental bone defect repair with tissue-engineered bone membrane: a qualitative observation. *Strat Traum Limb Recon*, 3(2), 57-64.

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อผู้วิจัยหลัก (ภาษาไทย) นางสาวปิยนุช บำรุงพานิชถาวร
ตำแหน่งทางวิชาการ ไม่มี
(ภาษาอังกฤษ) Miss. Piyanuch Bumrungpanichthaworn
ตำแหน่ง นิสิตวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิตหลักสูตร สาขาชีวเคมีทางการแพทย์
ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทรศัพท์ 08-4649-8477
ที่อยู่ปัจจุบัน 106 ถ.รางน้ำ แขวงพญาไท เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400

ประวัติการศึกษา

สถานศึกษา	ปริญญา	สาขา	ปี พ.ศ. ที่สำเร็จการศึกษา
มหาวิทยาลัยบูรพา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.)	ชีวเคมี	2550

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย