

รายงานการวิจัย

โครงการวิจัยย่อยที่ 1

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพและการประเมินความสามารถในการสร้างกระดูกของกระดูกเทียมที่ทำจากไหมไทยและไคโตซานในสัตว์ทดลอง

(ภาษาอังกฤษ) In vivo test of biocompatibility and bone formation of Thai silk fibroin- and chitosan-based bone substitutes

ชื่อแผนงานวิจัย (ภาษาไทย) โครงการวิจัยบูรณาการด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อเพื่อการพัฒนากระดูกเทียม ระยะที่ 2

(ภาษาอังกฤษ) Multidisciplinary Researches in Tissue Engineering for Development of Bone Substitutes: Phase II

รายนามคณะผู้วิจัย พร้อมทั้งหน่วยงานที่สังกัดและหมายเลขโทรศัพท์

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.กัมปนาท สุนทรวิภาต

ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทร 02-218-9639 โทรสาร 02-218-9638 มือถือ 081-482-8488

อีเมล : skumpana@hotmail.com, Kumpanart.S@chula.ac.th

ผู้ร่วมงานวิจัย

ชื่อและอีเมล	ภาควิชาลัคณะที่สังกัด
1.1 รศ.ดร.ศิริพร คำรงค์ศักดิ์กุล siriporn.d@chula.ac.th	ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ โทร 0-2218-6862 โทรสาร 0-2218-6877
1.2 ผศ.ดร.โสธรา กนกพานนท์ sorada.k@chula.ac.th	ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ โทร. 0-2218-6867 โทรสาร 0-2218-6877
1.3. ผศ.ดร.รัฐ พิษณุวงกูร rath725@hotmail.com	ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ โทร.0-2 218-5437 โทรสาร 0-2218-5561
1.4 อ.สพ.ญ. ชาลิศา หวังดี chalika_vet@hotmail.com	ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ โทร 0-2218-9639 โทรสาร 0-2218-9638
1.5.รศ.น.สพ.ดร. วิจิตร บรรณูรา wijit.b@hotmail.com	ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ โทร 02-218-9629

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี
งบประมาณ 2552

บทคัดย่อ

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย)

การทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพและการประเมินความสามารถในการสร้างกระดูกของกระดูกเทียมที่ทำจากไหมไทยและไคโตซานในสัตว์ทดลอง

(ภาษาอังกฤษ)

In vivo test of biocompatibility and bone formation of Thai silk fibroin- and chitosan-based bone substitutes

ชื่อแผนงานวิจัย (ภาษาไทย)

โครงการวิจัยบูรณาการด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อเพื่อการพัฒนากระดูกเทียม ระยะที่ 2

(ภาษาอังกฤษ)

Multidisciplinary Researches in Tissue Engineering for Development of Bone Substitutes: Phase II

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปี _____ 2552 _____ จำนวนเงิน _____ 866,800 _____ บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย _____ 1 _____ ปี ตั้งแต่ _____ 28 ตุลาคม 2552 _____ ถึง _____ 27 ตุลาคม 2553 _____

ชื่อผู้วิจัย

1. ผศ. น.สพ.ดร.กัมปนาท สุนทรวิภาต
ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทร 02-218-9639 โทรสาร 02-218-9638 มือถือ 081-482-8488
อีเมล : skumpana@hotmail.com, Kumpanart.S@chula.ac.th
2. รศ.ดร.ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล (siriporn.d@chula.ac.th)
ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทร. 02-218-6862 โทรสาร 02-218-6877 มือถือ 081-832-3019
อีเมล : siriporn.d@chula.ac.th
3. ผศ.ดร.โสธรา กนกพานนท์
ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทร. 0-2218-6867 โทรสาร 0-2218-6877
อีเมล : sorada.k@chula.ac.th
4. ผศ.ดร.รัฐ พิษณุางกูร
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทร.0-2 218-5437 โทรสาร 0-2218-5561
อีเมล : rath725@hotmail.com

5. อ.สพ.ญ. ชาลิกา หวังดี
ภาควิชาสัตสยศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทร 0-2218-9639 โทรสาร 0-2218-9638
อีเมล : chalika_vet@hotmail.com
6. รศ.น.สพ.ดร.วิจิตร บรรณารา
ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทร 02-218-9629
อีเมล : wijit.b@hotmail.com

บทคัดย่อ (Abstract)

ภาษาไทย

การศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียม 2 ชนิด ได้แก่ โครงเลี้ยงเซลล์ชนิดที่มีไหมไทยเป็นส่วนประกอบหลัก และชนิดที่มีไคโตซานเป็นส่วนประกอบหลัก การศึกษาทำโดยการตัดกระดูก fibula เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการขยายตัวของกระดูกจำนวน 20 แห่ง ในสุนัข 10 ตัว แบ่งตำแหน่งการออกเป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม ไม่มีการใส่โครงเลี้ยงเซลล์ลงไป กลุ่มที่ 2 ใส่โครงเลี้ยงเซลล์ชนิดที่มีไหมไทยเป็นส่วนประกอบหลักเพียงอย่างเดียว กลุ่มที่ 3 ใส่โครงเลี้ยงเซลล์ชนิดที่มีไหมไทยเป็นส่วนประกอบหลัก ร่วมกับปลูกถ่ายเซลล์กระดูกชนิด autogenous cancellous bone graft กลุ่มที่ 4 ใส่โครงเลี้ยงเซลล์ชนิดที่มีไคโตซานเป็นส่วนประกอบหลัก และ กลุ่มที่ 5 ใส่โครงเลี้ยงเซลล์ชนิดที่มีไคโตซานเป็นส่วนประกอบหลักร่วมกับปลูกถ่ายเซลล์กระดูกชนิด autogenous cancellous bone graft จากนั้นประเมินผลทางภาพถ่ายทางรังสีในสัปดาห์ที่ 2, 4, 6, 8, 12, และ 16 และเก็บตัวอย่างทุกเดือนเพื่อส่งตรวจทางจุลพยาธิวิทยา ผลการศึกษาพบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ชนิดที่มีไคโตซานเป็นส่วนประกอบหลักก่อให้เกิดปฏิกิริยาอักเสบที่รุนแรง และยังคงพบโครงเลี้ยงเซลล์ตลอดการศึกษา ในขณะที่โครงเลี้ยงเซลล์ชนิดที่มีไหมไทยเป็นส่วนประกอบหลัก ก่อให้เกิดการอักเสบที่น้อยมาก และมีการแทรกของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเข้าไปในโครงเลี้ยงเซลล์ และพบกระดูกงอกใหม่ได้เร็วกว่าการใช้โครงเลี้ยงเซลล์ชนิดที่มีไคโตซานเป็นส่วนประกอบหลัก รวมทั้งมีการสลายตัว โดยตรวจไม่พบด้วยตาเปล่าภายหลังการปลูกถ่าย 2 เดือน ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า โครงเลี้ยงเซลล์ชนิดที่มีไหมไทยเป็นส่วนประกอบหลัก มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ และป็นโครงเลี้ยงเซลล์ที่ควรพัฒนาต่อไปเพื่อนำมาใช้งานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก เพื่อทดแทนการสูญเสียกระดูกในอนาคต

ภาษาอังกฤษ

The objective of this study was to investigate the biocompatibility of two types of biodegradable scaffolds including Thai silk fibroin based scaffolds and the chitosan based scaffolds with the bone implanted site lesion and to provide an ideal tissue engineered scaffold for the repair of bone defects. Two types of scaffolds were implanted into the induced bone defect at the fibular bone in 10 dogs. The total 20 fibular bone defects were divided into 5 groups (n=4); group I as the control group (bone defects), group II: bone defects were implanted with Thai silk fibroin based scaffold only, group III: bone defects were implanted with Thai silk fibroin based scaffolds and autogenous cancellous bone graft, group IV : bone defects were implanted with the chitosan based scaffolds and group V: the bone defects were implanted with the chitosan based scaffold and autogenous cancellous bone graft. The radiographic evaluations were performed every two weeks after implantation and the histopathological examinations were performed every month after implantation. The results revealed that the chitosan based scaffold could profound the higher inflammatory responses to the surgical implanted site and the chitosan based scaffolds still remained after 4 months of implantation. Thai silk fibroin based scaffold showed the lower grade of inflammation and the penetration of fibrous tissue into the scaffold. The scaffold could not be grossly detected after 2 months of implantation. The differences of the radiographic scores among groups and durations were not statistically significant. Results on *in vivo* test suggest that Thai silk fibroin based scaffold has good biocompatibility and may be a promising tissue engineered scaffold for the repair of bony defects in the future.

คำสำคัญ: ความเข้ากันได้ทางชีวภาพ, ไพล์โพรอินไหมไทย, ไคโตซาน, วิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก

(Biocompatibility, Thai silk fibroin, chitosan, bone tissue engineering)

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
บทคัดย่อ ภาษาไทย.....	1/5
บทคัดย่อ ภาษาอังกฤษ.....	1/6
คำสำคัญ.....	1/6
สารบัญเรื่อง.....	1/7
1. บทนำ.....	1/8
2. การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	1/8
3. ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย.....	1/10
4. ผลการวิจัย.....	1/13
5. อภิปรายและวิจารณ์ผล.....	1/22
6. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	1/23
7. บรรณานุกรม (Bibliography)	1/23
8. ภาคผนวก (Appendix)	1/25
ตารางผลการประเมินทางรังสี Radiographic scoring โดยพยาธิแพทย์ 3 ท่าน.....	1/25

1. บทนำ

ปัญหาเรื่องการสูญเสียกระดูก (bone defects) เป็นปัญหาสุขภาพที่พบบ่อยในประชากรทุกเพศ ทุกวัย เกิดจากหลายสาเหตุ เช่น อุบัติเหตุ การตัดเนื้อกระดูกออก หรือการติดเชื้อ เป็นต้น ซึ่งรูปแบบการรักษาโดยหลักการวิศวกรรมเนื้อเยื่อ หรือการใช้กระดูกเทียม หรือกระดูกสังเคราะห์ที่ผลิตได้จากชีววัสดุธรรมชาติที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ และมีความสามารถในการส่งเสริมให้เกิดการงอกใหม่ของเนื้อเยื่อกระดูกที่จะเจริญเป็นกระดูกจริงต่อไป ถือเป็นการรักษาที่ที่ใช้อย่างแพร่หลายในต่างประเทศ แต่ไม่เป็นที่แพร่หลายในประเทศไทย เนื่องจากข้อจำกัดด้านราคาผลิตภัณฑ์ที่สูง

ขั้นตอนในการพัฒนาผลิตภัณฑ์กระดูกเทียม ภายหลังจากที่ได้ต้นแบบกระดูกเทียมที่ผลิตขึ้นจากชีววัสดุที่ย่อยสลายได้ในร่างกาย และผลิตได้ภายในประเทศ 2 ประเภทได้แก่ ประเภทที่ผลิตขึ้นโดยใช้ไฟโบรอินไหมไทยเป็นองค์ประกอบหลัก และโคโตซานเป็นองค์ประกอบ และได้รับการทดสอบแล้วว่า มีสมบัติทางกายภาพ ทางกล รวมถึงมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์กระดูก และเซลล์ต้นกำเนิดในระดับห้องปฏิบัติการ (จากโครงการวิจัยบูรณาการด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อเพื่อพัฒนากระดูกเทียม ระยะที่ 1) คือ ทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพและความสามารถในการเสริมสร้างเนื้อกระดูกในสัตว์ทดลอง เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ต้นแบบที่มีความสมบูรณ์ก่อนที่นำไปทดสอบในมนุษย์ต่อไป ดังนั้นในโครงการย่อยนี้จึงมุ่งเน้นการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพและความสามารถในการเสริมสร้างเนื้อกระดูกในสัตว์ทดลอง โดยเลือกใช้สุนัขในการทดลอง เนื่องจากกายวิภาคของสุนัขมีความใกล้เคียงกับของมนุษย์มากกว่าหนูและกระต่าย อีกทั้งยังเป็นการพัฒนากระดูกเทียมเพื่อใช้ในการรักษาโรคสูญเสียกระดูกของสุนัขได้อีกด้วย

2. การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

การทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพและการประเมินความสามารถในการสร้างกระดูกของกระดูกเทียมที่ทำจากไฟโบรอินจากไหมบ้านสายพันธุ์ญี่ปุ่นในสิ่งมีชีวิต (in vivo test) มีรายงานว่า Fini และคณะ [1] ได้รายงานการใช้แผ่นไฮโดรเจลที่ผลิตจากไฟโบรอินในการฝังลงบริเวณกระดูกโคนขาของกระต่าย พบว่าในสัปดาห์ที่ 12 แผ่นที่มีการใช้แผ่นไฮโดรเจลไฟโบรอินมีการสร้างสารจำเพาะของกระบวนการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกที่ใกล้เคียงกับกระดูกธรรมชาติ ดีกว่าแผ่นที่รักษาด้วย PLGA คณะผู้วิจัยระบุว่าไฟโบรอินสามารถเร่งกระบวนการซ่อมแซมกระดูกได้ (remodeling process) Meinel และคณะ [2] ได้รายงานการใช้กระดูกเทียมที่ผลิตขึ้นจากไฟโบรอินโดยกระบวนการ salt leaching ในการรักษาแผลขนาด 4 มิลลิเมตรที่กะโหลกศีรษะของหนู โดยแบ่งเป็น 1.กลุ่มที่มีการเพาะเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกของมนุษย์และเลี้ยงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีการปั่นกววนอาหารเลี้ยง 5 สัปดาห์ก่อนนำไปฝัง 2. กลุ่มที่มีการเพาะเซลล์ต้นกำเนิดแต่ไม่เลี้ยงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ 3. กลุ่มที่ไม่มีการเพาะเซลล์ต้นกำเนิด 4. กลุ่มที่ไม่มีการฝังกระดูกเทียม ผลปรากฏว่าภายหลังการฝังตัวอย่างในหนูเป็นเวลา 5 สัปดาห์ กลุ่มที่มีการใช้กระดูกเทียมที่ผลิตขึ้นจากไฟโบรอินและมีการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ มีระดับของแร่ธาตุ

สูงที่สุด ส่วนโครงเลี้ยงเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดมีแร่ธาตุเล็กน้อย แต่ไม่มีแร่ธาตุเลยในบาดแผลที่ใส่โครงเลี้ยงเซลล์เพียงอย่างเดียว และ บริเวณบาดแผลที่ไม่มีการใช้โครงเลี้ยงเซลล์ Kim และคณะ [3] ได้รายงานการใช้แผ่นเส้นใยไหมโดยใช้เทคนิคกระบวนการปั่นแบบไฟฟ้าสถิต (electrospinning) ฝังลงในบาดแผลขนาด 8 มิลลิเมตรของกระต่ายบริเวณกะโหลกศีรษะ พบว่าหลังจาก 4 สัปดาห์เริ่มมีกระดูกใหม่เกิดขึ้น เมื่อระยะเวลาผ่านไป 12 สัปดาห์พบว่าการเกิดกระดูกใหม่อย่างสมบูรณ์ แต่ในทางตรงกันข้ามเมื่อไม่ได้ใส่วัสดุใดๆเลยในบริเวณบาดแผลจะไม่มีสมานกระดูก

Karageorgiou และคณะ [4] ได้รายงานการใช้โครงเลี้ยงเซลล์ไหมสามมิติที่มีการเติม bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) และเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดในขวด spinner flask ที่เคลื่อนที่ตลอดเวลา จากนั้นนำมาฝังบริเวณกะโหลกศีรษะของหนูโมซ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ไหมที่มีการเติม BMP-2 และเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิด จะมีกระดูกใหม่เกิดขึ้น ในปี 2007 Head และคณะ [5] ได้รายงานการใช้โครงเลี้ยงเซลล์ไหมเพื่อใช้ในการสมานกระดูกโคนขาของหนูชนิด โดยแบ่งชิ้นงานออกเป็น 4 กลุ่ม คือ 1. โครงเลี้ยงเซลล์ไหมที่มีการเติม bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) และเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดในขวด spinner flask ที่เคลื่อนที่ตลอดเวลา(dynamic) ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ osteogenic เป็นเวลา 4 สัปดาห์ก่อนที่จะนำไปฝังในสัตว์ทดลอง 2. โครงเลี้ยงเซลล์ไหมที่มีการเติม BMP-2 และเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลง ก่อนทำการฝัง 3. โครงเลี้ยงเซลล์ไหมที่มีการเติม BMP-2 และ 4. ไม่มีการฝังชิ้นงาน หลังจากระยะเวลาผ่านไป 2, 4, 6 และ 8 สัปดาห์ พบว่า บาดแผลที่ฝังชิ้นงานด้วยกลุ่มที่ 1-3 จะมีปริมาณแร่ธาตุมากกว่ากลุ่ม 4 อย่างมีนัยสำคัญหลังจากผ่านไป 8 สัปดาห์ และจากการวิเคราะห์ด้วย μ CT ให้ผลในทำนองเดียวกัน คือ กลุ่ม 1-3 จะมีลักษณะกระดูกแข็งบริเวณรอบๆของบาดแผล แต่กระดูกพรุนจะมีมากบริเวณกลางของบาดแผล เมื่อวิเคราะห์สมบัติทางกล แสดงให้เห็นว่าบาดแผลที่ฝังด้วยชิ้นงานกลุ่ม 1 สามารถรับน้ำหนักได้มากกว่ากลุ่ม 2 และ 3 ส่วนการขยี้มสี พบว่า บาดแผลที่ฝังด้วยกลุ่ม 1 และ 3 จะมีการเกิดกระดูกใหม่หลังจาก 8 สัปดาห์ จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการเติม BMP-2 หรือมีการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดในโครงเลี้ยงเซลล์ไหม ช่วยในการเกิดกระดูกใหม่

สำหรับการซ่อมสร้างเนื้อกระดูกในสัตว์ทดลองโดยใช้โคโตซาน ได้มีรายงานโดย Jung และคณะ [6] ในปี ค.ศ. 2007 โดยได้ทำการศึกษาผลของสารละลายโอลิโกโคโตซานและโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจนในการเกิดกระดูกบริเวณกะโหลกศีรษะของหนูแรทสายพันธุ์ Sprague-Dawley โดยฝังชิ้นงาน 4 กลุ่ม คือ 1. คอลลาเจน/โคโตซาน (นำคอลลาเจน (Collatape®) มาจุ่มในสารละลายโอลิโกโคโตซาน) 2. คอลลาเจน 3. โคโตซาน 4. ไม่มีการฝังชิ้นงาน หลังจากระยะเวลาผ่านไป 2 และ 8 สัปดาห์ พบว่า บาดแผลที่ฝังด้วยคอลลาเจนมีการย่อยสลายอย่างสมบูรณ์และมีเกิดกระดูกใหม่อย่างจำกัด สำหรับบาดแผลที่ฝังด้วยโคโตซานมีการเกิดกระดูกขึ้นใหม่มากกว่าบาดแผลที่ไม่ได้ฝังชิ้นงาน ส่วนบาดแผลที่ทำการฝังด้วยคอลลาเจน/โคโตซาน มีการเกิดกระดูกใหม่หลังจาก 2 สัปดาห์ และเมื่อระยะเวลาผ่านไป 8 สัปดาห์ไม่พบชิ้นส่วนของคอลลา

เจน จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าไคโตซานสามารถชักนำการเกิดกระดูกใหม่และคอลลาเจนเป็นตัวนำที่ดีในการนำส่งไคโตซานไปยังบริเวณบาดแผล

3. ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

3.1) การทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพในสัตว์ทดลองของโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมที่มีไหมไทยและไคโตซานเป็นองค์ประกอบหลัก

-นำโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมทั้ง 2 สูตร มาล้างและแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 7.4 เป็นเวลา 4 วัน และทำการปลอดเชื้อ (sterilization) ด้วยก๊าซเอธิลีนออกไซด์ ก่อนนำไปทดสอบในสัตว์ทดลอง

-ในการทดสอบโครงเลี้ยงเซลล์แต่ละสูตรจะมีกลุ่มการทดสอบเป็น 5 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1) กลุ่มควบคุมเชิงบวก โดยการใช้ cortical bone graft ซึ่งเป็นรูปแบบการรักษาในปัจจุบัน, กลุ่มที่ 2) มีการใช้โครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมที่ทำจากไหมไทยเป็นหลักอย่างเดียว, กลุ่มที่ 3) มีการใช้โครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมที่ทำจากไหมไทยเป็นหลักร่วมกับการใช้ cancellous bone graft, กลุ่มที่ 4) มีการใช้โครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมที่ทำจากไคโตซานเป็นหลักอย่างเดียว และ กลุ่มที่ 5) มีการใช้โครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมที่ทำจากไคโตซานเป็นหลักร่วมกับการใช้ cancellous bone graft

- ใช้สุนัขเพศผู้โตเต็มวัย สุขภาพแข็งแรง น้ำหนักตัวระหว่าง 10-15 กก. จำนวน 10 ตัว

- ทำการ Preoperative antibiotics prophylaxis โดยการใช้ยาปฏิชีวนะชนิด Cefazolin (first generation cephalosporin) ขนาด 25 mg/kg ก่อนการผ่าตัด และให้ต่อเนื่องหลังการผ่าตัด 7 วัน

- ทำการวางยาสลบโดยการนำสลบ (premedication) ด้วย Zoletil ขนาด 7 mg/kg ร่วมกับ Morphine SO4 ขนาด 0.5 mg/kg เข้ากล้ามเนื้อ (intramuscular) และการชักนำสลบ (induction) ด้วย Propofol ขนาด 1-4 mg/kg เข้าทางหลอดเลือดดำ (intravenous) และรักษาภาวะสลบ (maintain) ด้วยแก๊สสลบ Isoflurane และ Oxygen

- แช่โครงเลี้ยงเซลล์ในสารละลาย Normal Saline Solution (NSS) เพื่อให้เกิดความเหนียว (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 แสดงการนำเอาโครงเลี้ยงเซลล์แช่ในสารละลาย NSS

- หลังจากทำสลับข้อแล้ว ทำการตัดกระดูกขาหลังส่วนล่างในส่วนของกระดูก fibula (เนื่องจากกระดูกชิ้นนี้ไม่เกี่ยวข้องในการรับน้ำหนักตัวของสุนัข) ทั้งสองด้านออก ขนาด 1 เซนติเมตร ที่บริเวณกึ่งกลางของกระดูกในส่วน diaphysis โดยจะใส่โครงเลี้ยงเซลล์ที่ขาข้างหนึ่ง และใส่โครงเลี้ยงเซลล์ร่วมกับ cancellous bone graft ที่ได้จากกระดูกขาหลังส่วนล่าง(tibia) ของตัวเอง ที่ขาอีกข้างหนึ่ง (รูปที่ 2 -5)



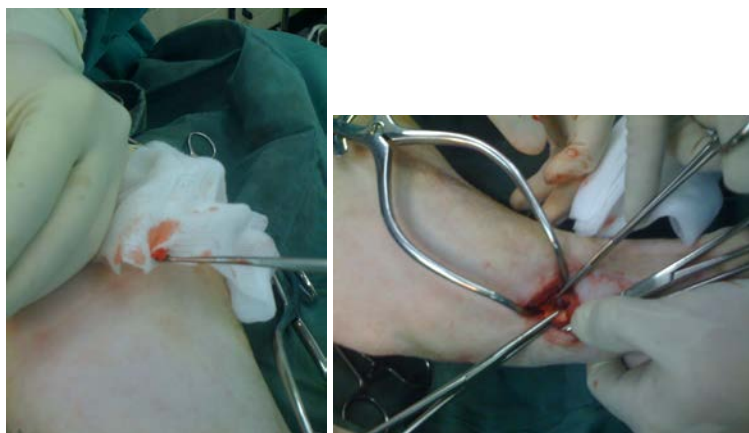
รูปที่ 2 แสดงการผ่าตัดเพื่อเปิดเข้าสู่กระดูก fibula ทางด้านข้าง (lateral approach to the midshaft of the fibula)



รูปที่ 3 ใช้คีมตัดกระดูกตัดกระดูก fibula ออก ขนาด 1 เซนติเมตร



รูปที่ 4 วางโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมลงบริเวณที่ตัดกระดูกออก



รูปที่ 5 นำเอาส่วนของกระดูก cancellous bone graft ใส่งในโครงเลี้ยงเซลล์

- ทำการระงับความเจ็บปวดหลังการผ่าตัดด้วยยา non steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) ชนิด Carprofen ขนาด 2.2 mg/kg เป็นเวลา 7 วัน หลังการผ่าตัด
- ทำการสังเกตการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพหลังจากปลูกถ่าย ด้วยการถ่ายรูปของบริเวณที่ทำการปลูกถ่าย และตรวจดูสุขภาพของสุนัข และทำการประเมินผลความเข้ากันได้ทางชีวภาพและการสร้างกระดูก โดยการประเมินผลทางภาพถ่ายทางรังสีวิทยา และการประเมินทางจุลพยาธิวิทยา
- การประเมินผลทางรังสีวิทยา โดยทำการประเมินโดยนายสัตวแพทย์ จำนวน 3 คนโดยมีหลักในการประเมินโดยการแบ่งเกรด (Radiographic scoring) ดังตารางที่ 1 และมีการวัดการงอกของกระดูกเพิ่มจากปลายของกระดูกที่ตัดออก เป็น เซนติเมตร โดยนำค่าเฉลี่ยของคะแนนที่ได้มาคำนวณทางสถิติ
- ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยอาศัยหลักในการประเมินในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงหลักในการประเมินการให้คะแนนจากภาพถ่ายทางรังสี

คะแนน	การเปลี่ยนแปลงของภาพถ่ายทางรังสี
0	ไม่พบการงอกของกระดูกจากปลายกระดูกที่ตัด
1	พบการงอกของกระดูกเพิ่มเติม ขนาดน้อยกว่า 0.1 เซนติเมตร
2	พบการงอกของกระดูกเพิ่มเติม ขนาดน้อยกว่า 0.2 เซนติเมตร
3	พบการงอกของกระดูกเพิ่มเติม ขนาดน้อยกว่า 0.3 เซนติเมตร
4	พบการงอกของกระดูกเพิ่มเติม ขนาดน้อยกว่า 0.4 เซนติเมตร

4. ผลการวิจัย

การประเมินผลทางภาพถ่ายทางรังสีวิทยา ในช่วงระยะเวลา 4 เดือน

จากการประเมินภาพถ่ายทางรังสีวิทยาในระยะเวลา 4 เดือนพบว่า เกิดความเปลี่ยนแปลงทางรังสีวิทยาในสุนัขทุกกลุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 2 ชนิด โดยพบว่า มีผลแตกต่างกัน คือ บริเวณที่ได้รับการปลูกถ่ายโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดไคโตซาน (กลุ่ม 4 และกลุ่ม 5) เกิดลักษณะโปร่งรังสี (radiolucent) บริเวณรอบโครงสร้างเลี้ยงเซลล์ชนิดนี้ ตลอดระยะเวลา 4 เดือน (รูปที่ 6 และ รูปที่ 7) และเกิดการบวมและการอักเสบแบบเฉพาะที่บริเวณแผลผ่าตัด ภายหลังการปลูกถ่าย 8 สัปดาห์ สามารถคลำพบโครงเลี้ยงเซลล์ตลอดระยะเวลา 4 เดือน ซึ่งแสดงถึงภาวะอักเสบ และปฏิกิริยาต่อต้านต่อโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดนี้



รูปที่ 6



รูปที่ 7

รูปที่ 6 และ 7 แสดงลักษณะโปร่งรังสี (radiolucent) บริเวณรอบโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดไคโตซานและได้ผิวหนังที่มีการปลูกถ่ายโครงเลี้ยงเซลล์ทั้งในกลุ่ม 4 ที่มีการใช้โครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำจากไคโตซานเป็นหลักอย่างเดียว และ ในกลุ่มที่ 5 ที่มีการใช้โครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำจากไคโตซานเป็นหลักร่วมกับการใช้ cancellous bone graft

ในขณะที่กลุ่มที่ 2 ที่ได้รับการปลูกถ่ายโครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำจากไหมไทยเป็นหลักอย่างเดียว และกลุ่มที่ 3 ที่มีการใช้โครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมที่ทำจากไหมไทยเป็นหลักร่วมกับการใช้ cancellous bone graft ไม่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาต่อต้านใดๆ ในช่วงระยะเวลา 4 เดือน และพบว่า เกิดลักษณะการเกิดกระดูกงอกใหม่บริเวณปลายของกระดูกที่ตัดออก ในช่วงเวลา 6 สัปดาห์ภายหลังการปลูกถ่ายโครงเลี้ยงเซลล์กระดูก

เทียมที่ทำจากไหมไทยเป็นหลักร่วมกับการใช้ cancellous bone graft แต่การเชื่อมของกระดูกหยุดลงในช่วง 8-16 สัปดาห์ (รูป 8 และ 9)

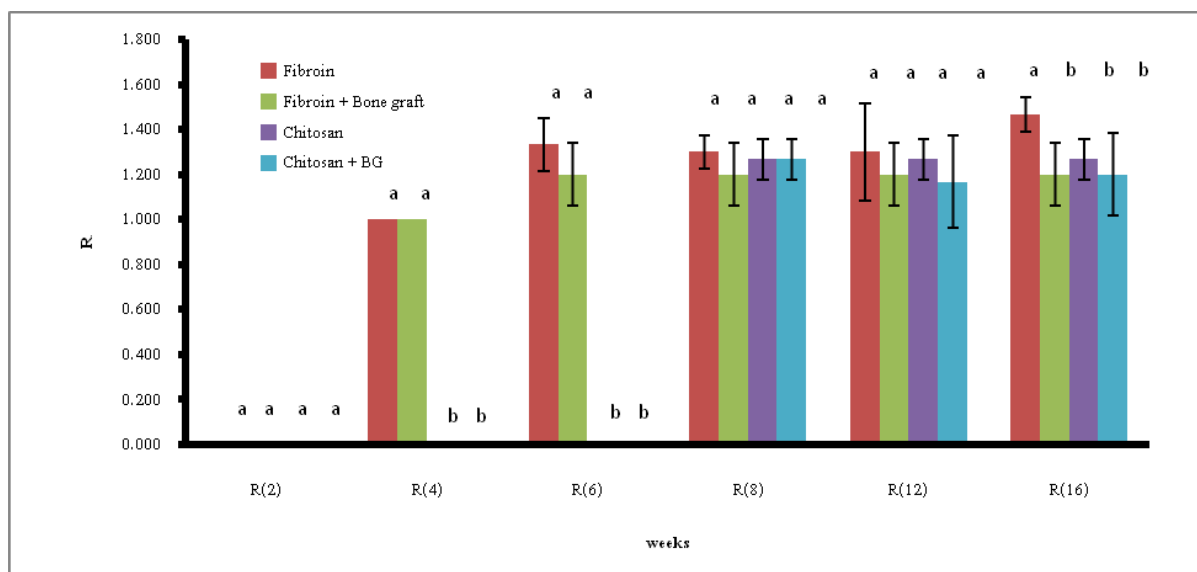


รูปที่ 8

รูปที่ 9

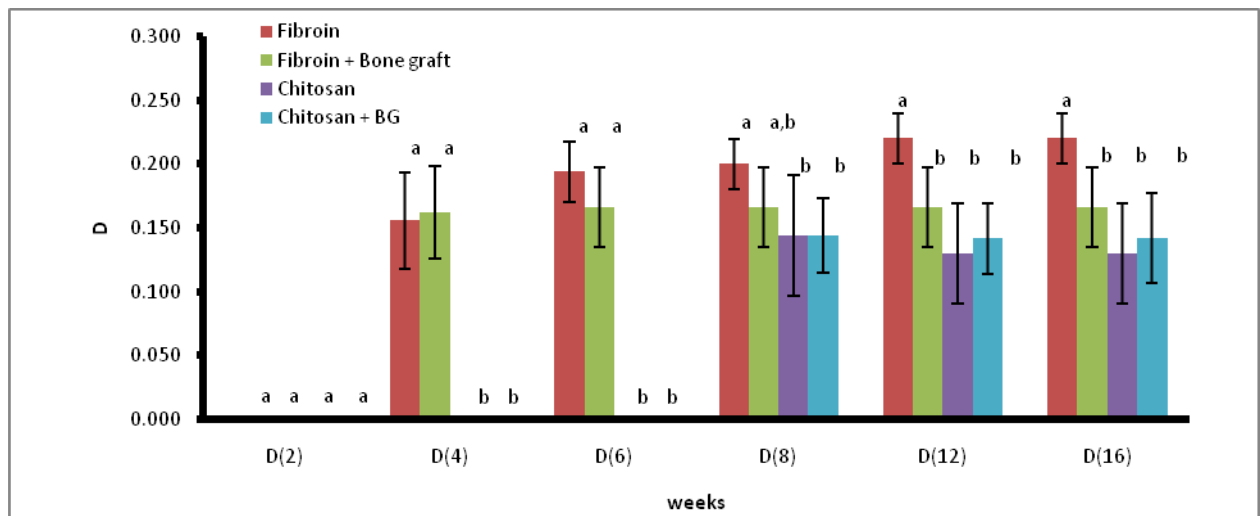
รูปที่ 8 และ 9 แสดงภาพถ่ายทางรังสีของสุนัขที่ได้รับการปลูกถ่ายโครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำจากไหมไทยเป็นหลัก (รูปที่ 8) และที่มีการใช้โครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำจากไหมไทยเป็นหลักร่วมกับการใช้ cancellous bone graft (รูปที่ 9) โดยพบว่าเกิดการสร้างกระดูกเพิ่มขึ้นบริเวณปลายกระดูก

จากการประเมินภาพถ่ายทางรังสีโดยการให้คะแนน พบว่าในช่วงสัปดาห์ที่ 2 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่สัปดาห์ที่ 4 และ 6 พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ระหว่างกลุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายด้วยโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรังไหมเป็นหลัก (กลุ่ม 2 และ 3) กับกลุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายด้วยโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีโคไต้หวันเป็นหลัก และไม่พบความแตกต่างในแต่ละกลุ่มในช่วงสัปดาห์ที่ 8 และ 12 ส่วนในสัปดาห์ที่ 16 เกิดความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายด้วยโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีไหมไทยเป็นหลัก กับกลุ่มอื่นๆ ดังแสดงได้ตามรูปที่ 10



รูปที่ 10 แสดงคะแนนที่ได้รับการประเมินภาพถ่ายทางรังสีในสุนัขแต่ละกลุ่ม

จากการประเมินและให้คะแนนการเปลี่ยนแปลงของภาพถ่ายทางรังสีในสุนัขแต่ละกลุ่ม (ดูตารางในภาคผนวก) จะพบได้ว่า อัตราการงอกเพิ่มของกระดูกในสุนัขในกลุ่มที่มีการปลูกถ่ายด้วยโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดมีไหมไทยเป็นหลัก (กลุ่ม 2 และ 3) เกิดลักษณะกระดูกงอกตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4 ในขณะที่กลุ่มที่มีการปลูกถ่ายด้วยโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดไคโตซาน (กลุ่มที่ 4 และ 5) มีลักษณะกระดูกงอกเริ่มที่สัปดาห์ที่ 8 และพบว่าในกลุ่มที่มีการปลูกถ่ายด้วยโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดมีไหมไทยเป็นหลัก มีความแตกต่างจากกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 8 ดังแสดงได้จากรูป ที่ 11



รูปที่ 11 แสดงลักษณะกระดูกงอกเพิ่มในสุนัขแต่ละกลุ่ม

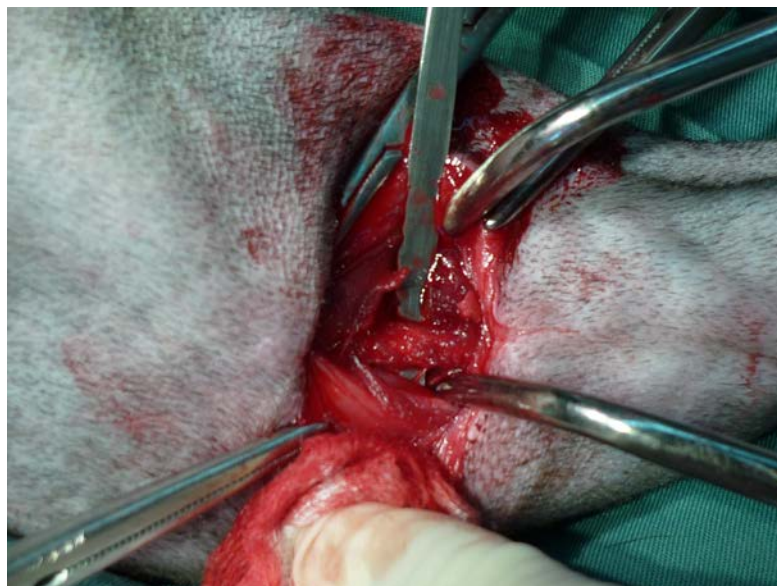
นอกจากนี้ ในขณะที่ทำการเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อเพื่อนำมาศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา ยังพบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ชนิดโคไตซานไม่มีการย่อยสลาย (รูปที่ 12 และ 13) เมื่อปลูกถ่ายไปนาน 4 เดือน ในขณะที่โครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมที่ทำจากไหมไทยเป็นหลักมีการย่อยสลายไป (รูปที่ 14) โดยตรวจไม่พบด้วยตาเปล่า ภายหลังการปลูกถ่าย 8 สัปดาห์ และเกิดการอักเสบน้อยกว่าการปลูกถ่ายโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดโคไตซาน อีกด้วย



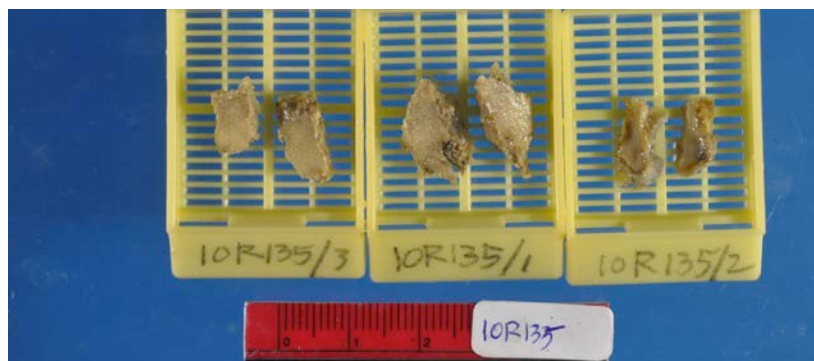
รูปที่ 12 โครงเลี้ยงเซลล์โคไตซานภายหลังการปลูกถ่ายในสุนัขเป็นเวลา 4 เดือน



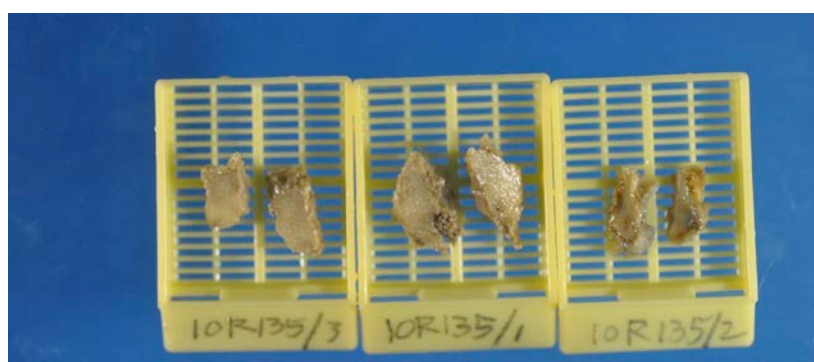
รูปที่ 13 โครงเลี้ยงเซลล์โคโคซานที่พบหลังทำการปลูกถ่ายในสุนัขเป็นเวลา 4 เดือน



รูปที่ 14 โครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำจากไหมไทยเป็นหลักถูกย่อยสลายและไม่พบบริเวณวิจารณ์
เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า



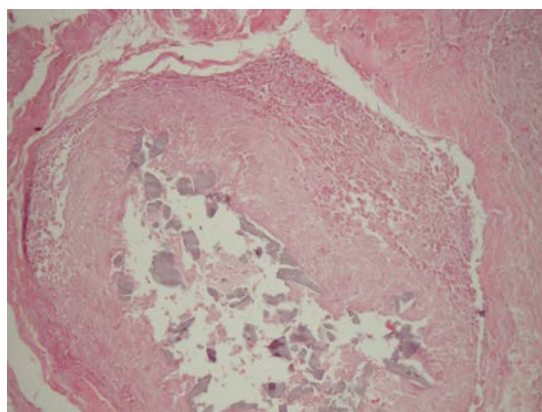
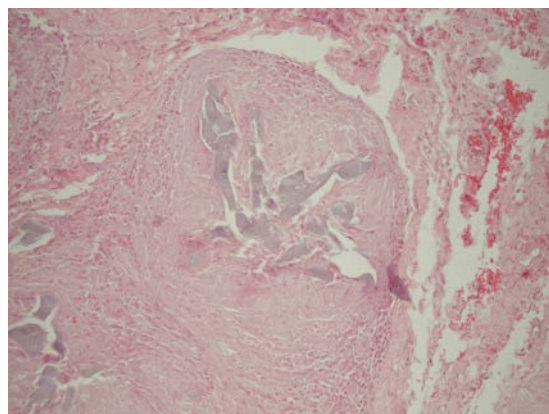
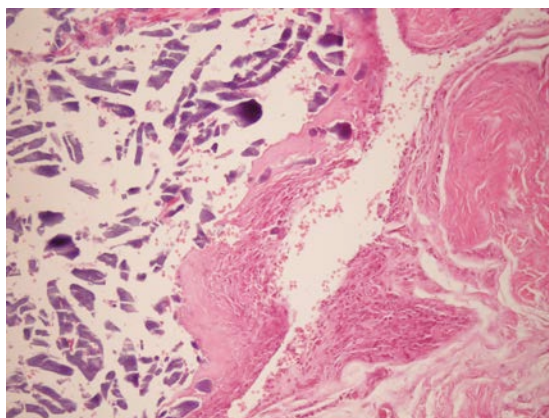
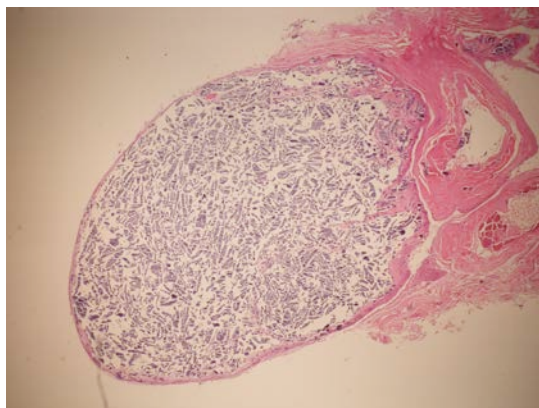
รูปที่ 15 รูปลักษณะชิ้นเนื้อที่นำมาส่งตรวจทางจุลพยาธิวิทยา ในสุนัขกลุ่ม 2 และ 3 ที่ได้รับการปลูกถ่ายโครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำจากไหมไทยเป็นหลัก

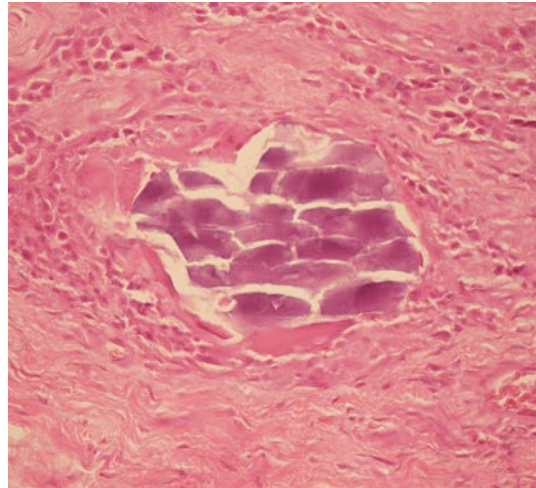


รูปที่ 16 รูปลักษณะชิ้นเนื้อที่นำมาส่งตรวจทางจุลพยาธิวิทยา ในสุนัขกลุ่ม 4 และ 5 ที่ได้รับการปลูกถ่ายโครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำจากไคโตซานเป็นหลัก

ผลการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา

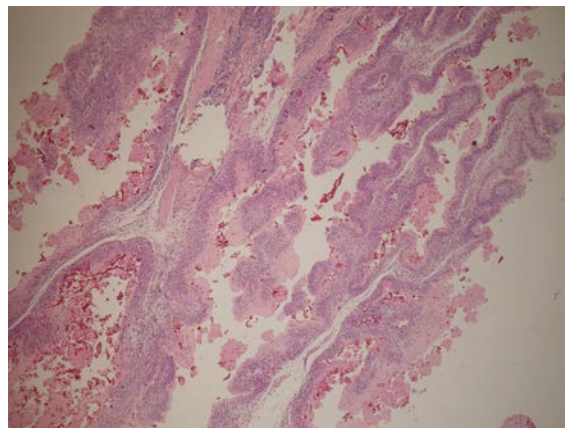
จากผลการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาในสุนัขที่ได้รับการปลูกถ่ายโครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำจากไหมไทยเป็นหลัก (กลุ่ม 2 และ กลุ่ม 3) พบกล้ามเนื้อแทรกเข้ามายังบริเวณโดยรอบวัสดุร่วมกับมี Fibrous tissue แทรกเข้ามาแต่อย่างไรก็ตาม ไม่พบการแทรกตัวของเนื้อเยื่อกระดูกในวัสดุ แต่พบว่ามีกองของกระดูกใน Fibrous tissue ที่อยู่โดยรอบวัสดุเล็กน้อย (2-3 ชั้นกลมๆ) และพบ Fibroin เป็นแท่งคดสีฟ้าอ่อน มีการฟอร์มตัวเป็นก้อนมีและพบเนื้อเยื่อเกี่ยวพันล้อมรอบ พบการเกิดปฏิกิริยาอักเสบน้อยมาก นอกจากนั้นพบว่าชิ้นไฟโบรอินบางส่วนเล็กๆที่ถูกล้อมรอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันสามารถทำตัวเป็นโครงให้เซลล์แทรกได้ ดังรูปที่ 17

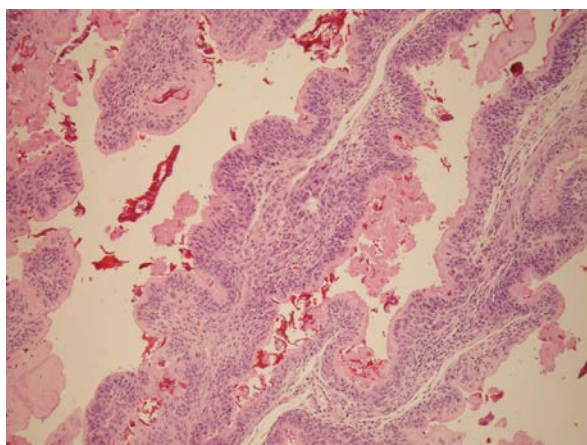
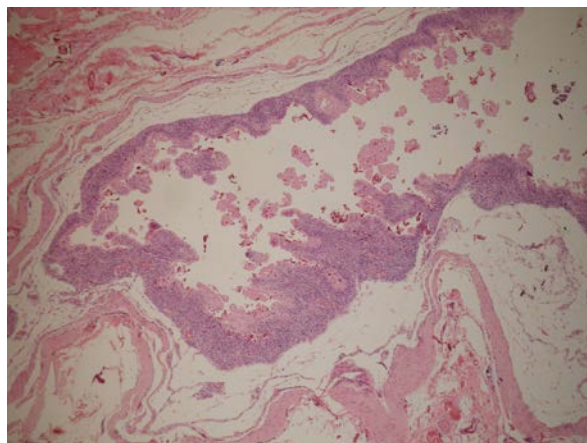
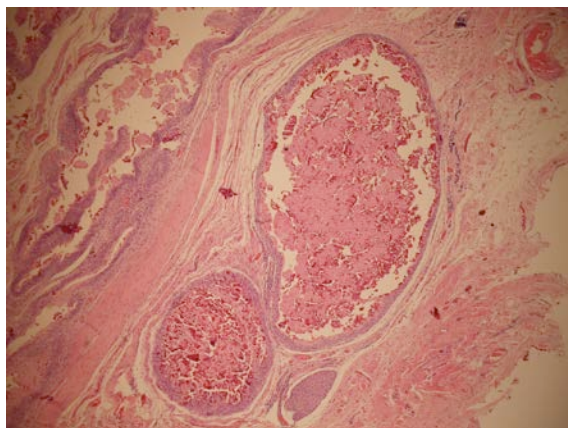


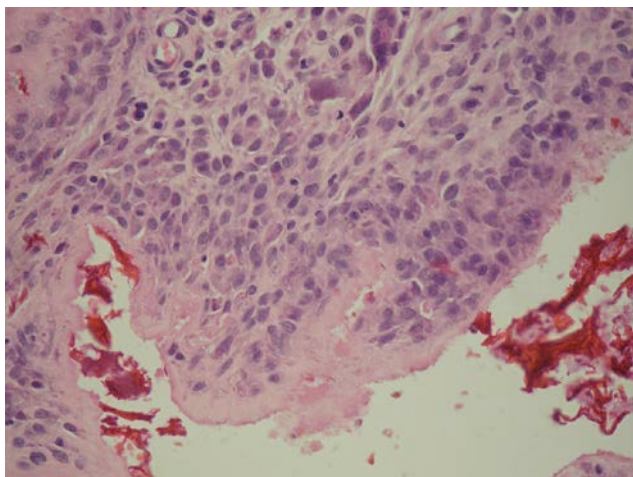


รูปที่ 17 ภาพของชิ้นเนื้อจากการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาในสุนัขกลุ่ม 2 และ 3 ที่ได้รับการปลูกถ่ายโครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำจากไหมไทยเป็นหลัก

ส่วนในสุนัขกลุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายด้วยโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดไคโตซานเป็นหลัก จะพบการเรียงตัวอยู่ในรูป multiple granuloma โดยมี macrophage ล้อมรอบชิ้นโครงเลี้ยงเซลล์อยู่ตรงกลางและพบ Lymphocyte ล้อมอีก macrophage อีกทีหนึ่ง และมีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันแทรกอยู่โดยรอบการ ดังรูปที่18







รูปที่ 18 ภาพของชิ้นเนื้อจากการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาในสุนัขกลุ่ม 2 และ 3 ที่ได้รับการปลูกถ่ายโครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำจากไคโตซานเป็นหลัก

5. อภิปรายและวิจารณ์ผล

การศึกษาวิจัยด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อเกี่ยวกับระบบโครงร่าง กระดูก และกระดูกอ่อนเป็นที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบัน ดังนั้นจึงมีการศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดต่างๆ ที่ผลิตจากชีววัสดุทั้งในด้านคุณสมบัติในการย่อยสลายได้ (biodegradable) หรือถูกดูดซึมได้ (bioresorbable) และการออกแบบลักษณะของโครงเลี้ยงเซลล์ โดยโครงเลี้ยงเซลล์ควรมีคุณสมบัติดังนี้ [10,11] 1. เป็นโครงร่างสามมิติ (three dimension) และมีความพรุนสูง (porosity) เพื่อให้มีเซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ และมีการส่งผ่านของสารอาหาร และของเสียจากการเมตาบอลิซึม 2. มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatible) และสามารถควบคุมการสลายตัวหรือถูกดูดซึมได้เหมาะสม ขณะมีการเจริญของเซลล์ 3. มีพื้นผิวที่เหมาะสมในการเกาะตัวของเซลล์ การเพิ่มจำนวนของเซลล์ รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ 4. มีคุณสมบัติเชิงกลที่เหมาะสมกับเนื้อเยื่อที่จะทดแทน ดังนั้น โครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำจากวัสดุทั้งที่ได้จากธรรมชาติหรือสังเคราะห์ขึ้น ที่นำมาใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อเกี่ยวกับการทดแทนกระดูก จึงมีหลายชนิด ได้แก่ เนื้อกระดูกที่ย่อยสลายเซลล์แล้ว (demineralized allograft bone matrix) วัสดุที่ทำจากเซรามิก[11] วัสดุที่มีส่วนของคอลลาเจน [12] แก้วชนิดไบโอแอคทีฟ [13] พอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ เป็นต้น

โครงเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ทำจากไหมไทยเป็นหลักได้รับความยอมรับและมีการศึกษาเป็นอย่างมาก ในการทำวิศวกรรมเนื้อเยื่อเพื่อทดแทนอวัยวะหลายชนิดได้แก่ ระบบประสาท ระบบหลอดเลือด กระดูก [7,8] และจากการศึกษานี้พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ทำจากไหมไทยเป็นหลัก มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพได้ดีกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำจากไคโตซานเป็นหลัก โดยการประเมินทั้งจากภาพถ่ายทางรังสี และจุลพยาธิวิทยา แม้จะมีรายงานสนับสนุนการใช้โครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำจากไคโตซานเป็นหลักว่ามีความเข้ากันได้ทาง

ชีวภาพสูง และมีความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างเนื้อกระดูกได้ดีกว่าโครงเลี้ยงเซลล์อื่นๆ [9] และยังมีการย่อยสลายหรือถูกดูดซึมได้เร็ว แต่จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำจากไคโตซานเป็นหลัก กระตุ้นให้เกิดการอักเสบที่รุนแรง และไม่มีการสลายตัวแม้ระยะเวลาผ่านไป 4 เดือนก็ตาม นอกจากนี้อัตราการงอกเพิ่มของกระดูกยังมีอัตราที่ต่ำและช้ากว่ากลุ่มอื่นๆ โดยจากการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา ยังพบลักษณะการอักเสบและการเกิดปฏิกิริยาต่อต้านจากร่างกายที่มากกว่าปกติอีกด้วย ในขณะที่โครงเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ทำจากไหมไทยเป็นหลักมีการสลายตัวที่ดี และก่อให้เกิดการสร้างของกระดูกใหม่ได้ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4 และไม่ก่อให้เกิดการอักเสบมากนัก โดยพบการแทรกตัวของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเข้าไปในโครงเลี้ยงเซลล์ได้

จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าการปลูกถ่ายกระดูก (cancellous bone graft) ลงในโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมทั้งสองชนิดให้ผลไม่แตกต่างกับกลุ่มที่ไม่ได้มีการปลูกถ่ายเลย อาจเกิดได้จากภาวะที่ไม่เหมาะสมในการเก็บเซลล์กระดูก หรือ ปริมาณของเซลล์กระดูกไม่เพียงพอ หรือ เซลล์กระดูกที่ปลูกถ่ายไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในโครงเลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิด จึงควรมีการศึกษาต่อไปในอนาคต ถึงผลการเลี้ยงเซลล์ที่เก็บได้บนโครงเลี้ยงเซลล์ต่างๆ ก่อนจะนำไปพัฒนาใช้จริงทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อ

6. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษานี้พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ทำจากไหมไทยเป็นหลักมีความเข้ากันทางชีวภาพได้ดีกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำจากไคโตซานเป็นหลัก โดยการประเมินทั้งจากภาพถ่ายทางรังสี และจุลพยาธิวิทยา ซึ่งมีการสลายตัวได้เองและการแทรกของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเข้ามาในโครงเลี้ยงเซลล์ได้ดี แม้ในการศึกษาครั้งนี้ ยังมิได้นำเอาเซลล์กระดูกหรือเซลล์ต้นกำเนิดมาปลูกถ่ายร่วมด้วย ก็ให้ผลการศึกษาเป็นที่น่าพอใจ และควรได้มีศึกษาเพิ่มเติมทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อ โดยใช้โครงเลี้ยงเซลล์ชนิดที่มีไหมไทยเป็นหลักเพื่อประโยชน์ในการทดแทนการสูญเสียกระดูกในอนาคต

7. บรรณานุกรม

1. Fini, M., Motta, A., Torricelli, P., Giavaresi, G., Nicoli Aldini, N., Tschon, M., Giardinia, R., Migliaresi, C., Biomaterials 26, 3527–3536 (2005).
2. Meinel, L., Fajardod, R., Hofmann, S., Langer, R., Chene, J., Snyderd, B., Vunjak-Novakovic, G., Kaplan, D, Bone 37, 688–698(2005).
3. Kim KH, Jeong L, Park HN, Shin SY, Park WH, Lee SC, Kim TI, Park YJ, Yang YJ, Lee YM, Ku Y, Rhyu IC, Han SB, Chung CP. Journal of Biotechnology 120, 327–339(2005).

4. Karageorgiou V, Tomkins M, Fajardo R, Meinel L, Snyder B, Wade K, Chen J, Novakovic GV, Kaplan DL. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 324-334(2006).
5. Head CK, Karageorgiou V, Hofmann S, Fajardo R, Betz O, Merkle HP, Hilbe M, Rechenberg VB, McCool J, Abrahamsen L, Nazarian A, Cory E, Curtis M, Kaplan DL, Meinel L. Bone 41, 247-255(2007).
6. Jung WU, Kim KS, Kim SC, Cho SK, Kim KC, Choi HS. Effect of chitosan with absorbable collagen sponge carrier on bone regeneration in rat calvarial defect model. Current Applied Physics 7S1, e68–e70 (2007).
7. S. Tritanipakul, S. Kanokpanont, D. L. Kaplan and S. Damrongsakkul. Morphology and *In Vitro* Biocompatibility of Hydroxyapatite-Conjugated Gelatin/Thai Silk Fibroin Scaffolds. 13th International Conference on Biomedical Engineering IFMBE Proceedings, 2009, Volume 23, Track 4, 1377-1380, DOI: 10.1007/978-3-540-92841-6_340
8. Brigitte von Rechenberg, Lorenz Uebersax, Tanja Apfel, Roland Schubotz, Monika Hilbe, Lorenz Meinel, Hyeon Joo Kim, David L. Kaplan, Hans P. Merkle, Jörg A. Auer. Silk fibroin as an adaptable 3-D scaffold for defect repair in subchondral bone. European Cells and Materials Vol. 13. Suppl. 2, 2007 (page 15)
9. Zhensheng Li, Hassna R. Ramay, Kip D. Hauch, Demin Xiao, and Miqin Zhang. Chitosan–alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. Biomaterials. 2004.09.062
10. Bronner F, Farach-Cason MC, Mikos AG. Engineering of Functional skeletal tissues. London, Springer. C2007
11. Zaffe D. Some Considerations on biomaterials and bone. Micron. 36(7-8): 583-92, 2005.
12. Hottori K, Yoshikawa T, Takakura Y, Aoki H, Sonobe M and Tomita N. Bioartificial periosteum for severe open fracture-An experimental study of osteogenic cell/collagen sponge composite as a bio-artificial periosteum. Bio-Medical materials and engineering, 2005, 15:127-136.
13. Mishra S. and Knothe Tate ML, Effect of lacunocanalicular architecture on hydraulic conductance in bone tissue: implications for bone health and evolution. The Anatomical record. 2003: 273A: 752-762.

8. ภาคผนวก

ตารางผลการประเมินทางรังสี Radiographic scoring โดยพยาธิแพทย์ 3 ท่าน (สัปดาห์ที่ 2, 4, 6)															
ระยะเวลา/กลุ่มการทดลอง	2 weeks					4 weeks					6 weeks				
	R1	R2	R3	R เฉลี่ย	D (mm)	R1	R2	R3	R เฉลี่ย	D (mm)	R1	R2	R3	R เฉลี่ย	D (mm)
Fibroin 1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.150	1.000	1.500	1.500	1.333	0.200
Fibroin 2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.180	1.500	1.500	1.500	1.500	0.220
Fibroin 3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.200	1.000	1.500	1.500	1.333	0.210
Fibroin 4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.100	1.000	1.500	1.000	1.167	0.180
Fibroin 5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.150	1.000	1.500	1.500	1.333	0.160
avg				0.000	0.000				1.000	0.156				1.333	0.194
SD				0.000	0.000				0.000	0.038				0.118	0.024
Fibroin + Bone graft 1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.180	1.000	1.000	1.000	1.000	0.200
Fibroin + Bone graft 2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.140	1.500	1.500	1.000	1.333	0.180
Fibroin + Bone graft 3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.110	1.500	1.000	1.000	1.167	0.150
Fibroin + Bone graft 4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.200	1.500	1.000	1.500	1.333	0.120
Fibroin + Bone graft 5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.180	1.000	1.000	1.500	1.167	0.180
avg				0.000	0.000				1.000	0.162				1.200	0.166
SD				0.000	0.000				0.000	0.036				0.139	0.031

ตารางผลการประเมินทางรังสี Radiographic scoring โดยพยาธิแพทย์ 3 ท่าน (สัปดาห์ที่ 2, 4, 6)...(ต่อ)															
ระยะเวลา/กลุ่มการทดลอง	2 weeks					4 weeks					6 weeks				
	R1	R2	R3	R เฉลี่ย	D (mm)	R1	R2	R3	R เฉลี่ย	D (mm)	R1	R2	R3	R เฉลี่ย	D (mm)
Chitosan 2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Chitosan 3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Chitosan 4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Chitosan 5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
avg				0.000	0.000				0.000	0.000				0.000	0.000
SD				0.000	0.000				0.000	0.000				0.000	0.000
Chitosan + BG 1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Chitosan + BG 2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Chitosan + BG 3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Chitosan + BG 4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Chitosan + BG 5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
avg				0.000	0.000				0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
SD				0.000	0.000				0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

R คือ Radiographic scoring

D คือ ผลการงอกเพิ่มขึ้นของกระดูกจากปลายกระดูกทางรังสี (mm)

[illegible]

ตารางผลการประเมินทางรังสี Radiographic scoring โดยพยาธิแพทย์ 3 ท่าน (สัปดาห์ที่ 8, 10, 16)...(ต่อ)															
ระยะเวลา/กลุ่มการทดลอง	8 weeks					12 weeks					16 weeks				
	R1	R2	R3	R เฉลี่ย	D (mm)	R1	R2	R3	R เฉลี่ย	D (mm)	R1	R2	R3	R เฉลี่ย	D (mm)
Chitosan 1	1.000	1.500	1.500	1.333	0.110	1.000	1.500	1.500	1.333	0.120	1.000	1.500	1.500	1.333	0.120
Chitosan 2	1.000	1.500	1.000	1.167	0.150	1.000	1.500	1.000	1.167	0.110	1.000	1.500	1.000	1.167	0.110
Chitosan 3	1.000	1.500	1.000	1.167	0.220	1.000	1.500	1.000	1.167	0.200	1.000	1.500	1.000	1.167	0.200
Chitosan 4	1.000	1.500	1.500	1.333	0.100	1.000	1.500	1.500	1.333	0.110	1.000	1.500	1.500	1.333	0.110
Chitosan 5	1.000	1.500	1.500	1.333	0.140	1.000	1.500	1.500	1.333	0.110	1.000	1.500	1.500	1.333	0.110
avg				1.267	0.144				1.267	0.130				1.267	0.130
SD				0.091	0.047				0.091	0.039				0.091	0.039
Chitosan + BG 1	1.000	1.500	1.000	1.167	0.180	1.000	1.000	1.000	1.000	0.180	1.000	1.000	1.500	1.167	0.180
Chitosan + BG 2	1.000	1.500	1.000	1.167	0.160	1.000	1.000	1.000	1.000	0.150	1.000	1.000	1.000	1.000	0.170
Chitosan + BG 3	1.000	1.500	1.500	1.333	0.150	1.000	1.000	1.500	1.167	0.150	1.500	1.000	1.000	1.167	0.150
Chitosan + BG 4	1.000	1.500	1.500	1.333	0.120	1.500	1.000	1.000	1.167	0.110	1.000	1.500	1.000	1.167	0.100
Chitosan + BG 5	1.000	1.500	1.500	1.333	0.110	1.500	1.500	1.500	1.500	0.120	1.500	1.500	1.500	1.500	0.110
avg				1.267	0.144				1.167	0.142				1.200	0.142
SD				0.091	0.029				0.204	0.028				0.183	0.036

R คือ Radiographic scoring

D คือ ผลการงอกเพิ่มขึ้นของกระดูกจากปลายกระดูกทางรังสี (mm)

