

Abstract

Development of Bone Scaffolds for Applications in Dentistry and Animal Care

Prof.Pitt Supaphol, Prof.Pavasant, Prof.Mongkol Techakumphu,
Assist.Prof.Kumpanart Soontornvipart, Dr.Keskanya Subbalekha,
Assist.Prof.Theerawat Tharasanit

Keywords: Tissue engineering, Scaffold, Polycaprolactone, Hydroxyapatite, Mesenchymal stem cells

Recently, organ and tissue loss or failures resulting from an injury or other types of damage become a major human health problem. Tissue engineering has emerged as a promising alternative approach to treat the loss or malfunction of a tissue or organ without the limitations of current therapies. Tissue engineering is an interdisciplinary technology that combines materials engineering, cellular biology and genetic engineering into developing biological substitutes for defected or damaged tissues. One popular approach in bone tissue engineering to the development of viable substitutes that restore and maintain the function of human bone tissues involves seeding highly porous biodegradable scaffolds, in the shape of the desired bone, with cells and signaling molecules then culturing and implanting the scaffolds into the defect to induce and direct the growth of new bone. In this research work, not only the dentistry care is the main application of the scaffolds but also the animal care is the other application of them. Therefore the isolation techniques and differentiation potentials of canine mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue the specific markers for bone marrow derived MSCs have been compared. The cellular interaction of canine mesenchymal stem cells and polycaprolactone/hydroxyapatite composite scaffold and the effect of canine mesenchymal stem cells combined with polycaprolactone/hydroxyapatite(PCL/HA) composite scaffold on the healing of ulnar defects in dogs have been examined for *in vitro* and *in vivo* study, respectively. Mesenchymal stem cells (MSCs) have increasingly become an attractive aspect for tissue engineering. However, limitation of cell numbers at isolation and culture has restricted the clinical exploitations. Bone marrow contents were collected from 7 dogs and then submitted to 3 different MSC isolation techniques (direct plating, red blood cell lysis treatment and gradient density). The number of cells, expression of MSC markers and *in vitro* differentiation obtained

from each technique were examined. In conclusion, this study revealed that MSCs can be derived from bone marrow. The *in vitro* demonstrated a good biocompatibility between canine MSCs and PCL/HA scaffolds. Despite a promising result from an *in vitro* study, neither bone nor callus formation was observed in canine ulnar defects that implanted with PCL/HA and PCL/HA scaffolds. Defects in these two groups were healed with fibrovascular tissue which infiltrated through the pore of the scaffold.

บทคัดย่อ

ชื่อโครงการ : การพัฒนาวัสดุโครงร่างกระดูกเทียมสำหรับงานด้านทันตกรรมและสัตวภิบาล

ผู้ทำงานในโครงการ : ศ.ดร.พิชญ์ ศุภผล, ศ.ดร.ประสิทธิ์ ภาวสันต์, ศ.ดร.มงคล เตชะกำพ,

ผศ.ดร.กัมปนาท สุนทรวิภาต, ดร.เกศกัญญา สัพพะเลข, ผศ.ดร.ธีรวัฒน์ ธาราษานิต

คำสำคัญ : วิศวกรรมเนื้อเยื่อ, โครงร่างเนื้อเยื่อเทียม, พอลิคาโพรแลกโตน, เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคมอล

ในปัจจุบัน ปัญหาที่สำคัญอย่างหนึ่งของมนุษย์คือ การสูญเสียอวัยวะหรือเนื้อเยื่อของร่างกายของมนุษย์ จากอุบัติเหตุ วิศวกรรมเนื้อเยื่อ คือ เทคโนโลยีแบบสหวิทยาการที่มีการบูรณาการความรู้ด้านวิศวกรรม วิศวกรรมวัสดุ และชีววิทยา เพื่อพัฒนาทดแทน ซ่อมแซม หรือปรับปรุงการทำงานของเนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่สูญเสียหรือบาดเจ็บ ซึ่งเป็นหนึ่งในวิธีการแก้ปัญหาที่เกิดขึ้น หนึ่งในกระบวนการที่สำคัญของวิศวกรรมเนื้อเยื่อ คือการพัฒนาวัสดุโครงร่างเนื้อเยื่อเทียมที่มีศักยภาพในการกระตุ้นการเกาะ การเพิ่มจำนวน และการสร้างเนื้อเยื่อกระดูก ในการทดลองที่เหมาะสม ถึงแม้ว่าเป้าหมายหลักของงานวิจัยนี้ คือการพัฒนาวัสดุโครงร่างกระดูกเทียมเพื่อสามารถนำไปใช้งานในด้านทันตกรรม อย่างไรก็ตาม การนำวัสดุโครงร่างกระดูกเทียมไปทดสอบในสัตว์ทดลอง(สุนัข) เพื่อใช้ในการรักษาสุนัขที่ต้องการการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อกระดูกสามารถเป็นเป้าหมายรองในงานวิจัยนี้ได้อีกทางหนึ่งด้วย ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้มีการศึกษาการพัฒนาเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากไขกระดูกและเนื้อเยื่อไขมัน และนำความรู้มาผสมผสาน เพื่อนำมาทดลองเพาะเลี้ยงกับวัสดุโครงร่างกระดูกเทียมที่ได้มีการพัฒนาขึ้นมาในสภาวะที่เหมาะสม และ ศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้วัสดุโครงร่างเทียมร่วมกับเซลล์ต้นกำเนิดจากการทดสอบในงานทดลองและทดลองกับสัตว์ทดลอง(สุนัข) จากการทดลองปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคมอลที่แยกได้จากไขกระดูกลงบนวัสดุโครงร่างเซลล์ซึ่งใส่อยู่ในตำแหน่งวิธีการของกระดูกอัลนา เพื่อศึกษาผลของการรักษาภาวะกระดูกคอไม่ติดในสุนัข โดยทำการเก็บไขกระดูกในสุนัขจำนวน 7 ตัว ไขกระดูกของสุนัขแต่ละตัวนำมาแบ่งเพื่อคัดแยกเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคมอลเป็น 3 วิธี ได้แก่ density gradient, RBC lysis buffer และ direct plating ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ควบคุมเดียวกันและ subculture ในวันที่ 7 เพื่อหาจำนวนเซลล์ทั้งหมดและเปอร์เซ็นต์เซลล์

ที่มีชีวิตที่ได้จากแต่ละวิธี การพิสูจน์คุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคมอลทำได้โดยอาศัยการเกาะบนจานเพาะเลี้ยงพลาสติก การแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์และคุณสมบัติในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ชนิดอื่น พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคมอลที่คัดแยกได้มีคุณสมบัติในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก ปริมาณมีเซนไคมอลเสกัมเซลล์ที่รอดชีวิตภายในโครงร่างเซลล์พอลิคาโพรเลคโตนไฮดรอกซีอะพาไทต์มีความสำคัญเนื่องจากเซลล์ที่รอดชีวิตจะสามารถเพิ่มจำนวนและเปลี่ยนแปลงตัวเองไปเป็นเซลล์ที่มีความสามารถในการสร้างกระดูก ตัวอย่างโครงร่างเซลล์หลังการฉีดเซลล์ต้นกำเนิดไม่พบการเปลี่ยนแปลงใดๆที่รอยต่อของกระดูกอัลนา กับวัสดุปลูกถ่ายทั้งทางด้านบนและด้านล่าง รวมทั้งไม่พบการสร้างแคลสที่บริเวณผิวการของกระดูก เมื่อเปรียบเทียบผลการเอกซเรย์หลอดเลือดของขาหน้าบริเวณที่มีโครงร่างเซลล์ก่อนและหลังการฉีดเซลล์ต้นกำเนิดเข้าสู่โครงร่างเซลล์ พบแขนงของเส้นเลือดในบริเวณที่ตรงกับตำแหน่งที่ทำการใส่โครงร่างเซลล์และพบการแตกแขนงของเส้นเลือดในบริเวณที่ตรงกับตำแหน่งที่ทำการใส่โครงร่างเซลล์เพิ่มมากขึ้น