

นิพนธ์ต้นฉบับ

สารโซเดียมฮัยยารูโลเนต เหมาะสมในการเป็นพาหะสำหรับ สารเหนียวนำกระดูก Bone Morphogenetic Protein

จิรเดช ตุงคะเศรณี*, อัญชลี วิศวโกคา**, ธนินทรีย์ โชตนภูติ*** และ ธำรงรัตน์ แก้วกาญจน์***

*แพทย์ประจำบ้าน กองออร์โธปิดิกส์ โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า, **ภาควิชาชีวเคมี วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า, ***กองออร์โธปิดิกส์ โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า

บทคัดย่อ: Bone morphogenetic protein (BMP) จัดเป็นสารเหนียวนำกระดูกที่มีศักยภาพสูงซึ่งนับวันแต่จะมีความสำคัญมากขึ้นในทางออร์โธปิดิกส์ หน้าที่ในการเหนียวนำกระดูกในร่างกายจะเกิดขึ้นได้ดี จำเป็นต้องมีตัวพาหะ (carriers) จากการศึกษาค้นคว้าโดยใช้สาร sodium hyaluronate ทดลองในหนูจำนวน 36 ตัว โดยแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 สาร sodium hyaluronate กลุ่มที่ 2 human BMP กลุ่มที่ 3 สารผสมระหว่าง sodium hyaluronate และ human BMP โดยทำการฝังสารทดลองลงในกล้ามเนื้อต้นขาแล้วนำชิ้นเนื้อบริเวณที่ฝังออกมาในวันที่ 7, 14, 21 จากนั้นศึกษาคุณสมบัติในการเหนียวนำกระดูก โดยใช้ผลทางพยาธิวิทยาและการนับจำนวนปริมาตรของกระดูก ที่เกิดขึ้นจากการศึกษาพบว่า กลุ่มที่ 1 มีลักษณะการอักเสบเล็กน้อย ไม่มีการสร้างกระดูก กลุ่มที่ 2 มีการสร้าง osteoid แต่เพียงเล็กน้อย แต่ในกลุ่มที่ 3 พบว่ามีการสร้างเนื้อกระดูก กระดูกอ่อน และไขกระดูก ผลของการศึกษานี้สามารถกล่าวได้ว่า sodium hyaluronate เหมาะสมสำหรับเป็น carrier สำหรับ human BMP และเนื่องจากเป็นสารอินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์ขึ้นมาได้จึงมีบทบาทในการพัฒนาเป็นสารทดแทนกระดูกที่สำคัญในอนาคต

Key Words: • Bone morphogenetic protein • BMP • Sodium hyaluronate

เวชสารแพทย์ทหารบก 2551;61:81-92.

บทนำ

ถึงแม้ว่าการปลูกกระดูก (bone grafting) จะเป็นวิธีที่ยอมรับกันว่ามีคุณสมบัติที่ดีและเหมาะสมที่สุด สำหรับใช้เพื่อแก้ปัญหาการติดของกระดูก (bone union) หรือเติมลงไปในส่วนที่พร่องของกระดูก (bone defect) ก็ตามแต่ ปัญหาที่เกิดขึ้นมักเกิดจากการที่จำเป็นต้องใช้กระดูกปลูก (bone graft) จำนวนมาก ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาต่อแหล่งกระดูกที่นำมา (donor site) อันได้แก่ปัญหาการติดเชื้อการเกิดกระดูกหักบริเวณแหล่งกระดูก การเจ็บปวด ตลอดจนปริมาณที่จำกัดเช่นในเด็กหรือจำเป็นต้องใช้ในการซ่อมแซมเนื้อออกกระดูก^{1,2} การใช้ allograft แม้ว่าจะช่วยแก้ปัญหาเรื่องปริมาณและขนาด แต่โดยวิธีการเตรียมที่ใช้กันอยู่ ก็ยังไม่สามารถเตรียมให้ได้ allograft ที่ดีและปลอดภัยโดยไม่ทำให้เกิด

ปฏิกิริยาภูมิคุ้มกันจากผู้รับจึงเป็นที่มาของการนำไปสู่การศึกษาและพัฒนาสารซึ่งจะสามารถใช้ทดแทนกระดูก (bone substitutes) ทั้งที่เป็นธรรมชาติและสารสังเคราะห์มากมายหลายชนิด โดยพยายามที่จะให้มีโครงสร้างและคุณสมบัติคล้ายกับกระดูกมากที่สุด จากการศึกษานี้ผ่านมาพบว่าในกระดูกมีโปรตีนชนิดหนึ่งซึ่งอยู่ในเนื้อพื้กระดูกเรียกว่า bone morphogenetic protein หรือ BMP มีคุณสมบัติสามารถเหนียวนำให้มีการแปรเปลี่ยน (differentiation) ของ mesenchymal cell ให้เป็น osteoblast และสร้างเนื้อพื้กระดูก แม้แต่ในเนื้อเยื่อที่ไม่ใช่กระดูก (heterotopic sites) เช่นในกล้ามเนื้อหรือชั้นใต้ผิวหนังของสัตว์ทดลอง⁴ แม้ว่า BMP จะเป็นสารเหนียวนำกระดูกที่มีศักยภาพสูงที่สุด แต่การออกฤทธิ์ของ BMP จำเป็นต้องอาศัยพาหะ (carriers) เป็นที่สำหรับให้ BMP ยึดเกาะ โดยมีให้ BMP สลายไปหรือถูกดูดซึมไปก่อนที่จะออกฤทธิ์ในการเหนียวนำกระดูก^{1,2,5} ในการศึกษาทดลองนี้คณะผู้ศึกษาได้เลือกสาร sodium hyaluronate ใน

ได้รับต้นฉบับเมื่อ 5 มิถุนายน 2551 ได้ให้ตีพิมพ์เมื่อ 10 มิถุนายน 2551
ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ นพ. จิรเดช ตุงคะเศรณี กองออร์โธปิดิกส์
โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า ถนนราชวิถี เขตราชเทวี กทม. 10400

การทดลอง สำหรับเป็น carrier สำหรับ BMP อันเนื่องมาจาก⁶ มีคุณสมบัติดังต่อไปนี้

1. Biocompatibility : เป็นสารพื้นฐาน (ground substance) กระจายอยู่นอกเซลล์ที่มีอยู่ทั่วไปในมนุษย์และสัตว์ และเป็นสารเคมีชนิดเดียวกันแม้จะอยู่ในสิ่งมีชีวิตต่างเผ่าพันธุ์กัน (species nonspecific)

2. Availability : เนื่องจากเป็นสารสังเคราะห์จึงสามารถผลิตได้ สามารถทำให้มากตามต้องการ และมีอายุการใช้งานนานถึง 3 ปี เมื่อเก็บในที่เย็น (อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส)

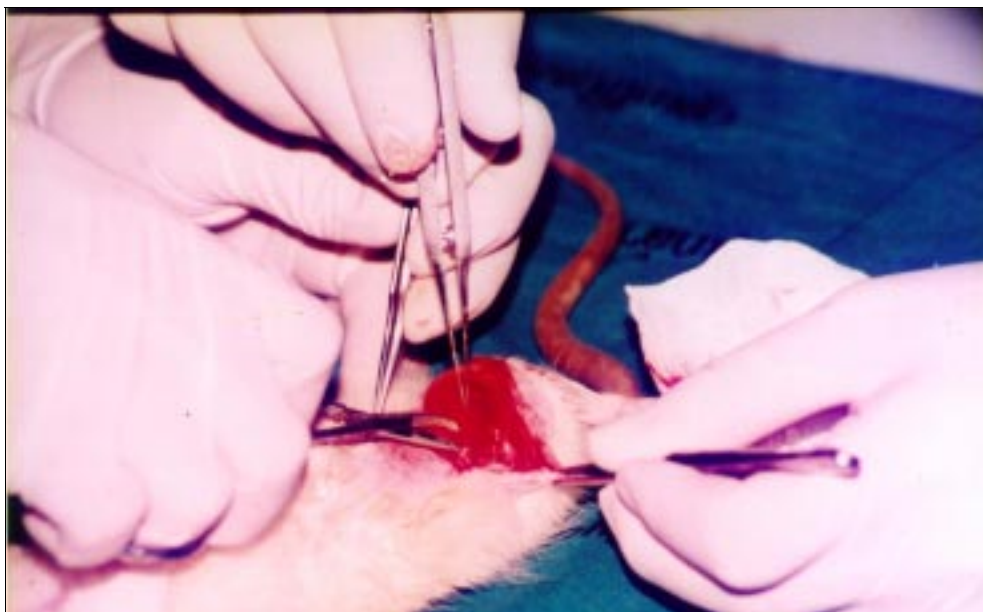
3. Viscosity : เป็นสารที่ข้น หนืด ยืดหยุ่นได้ จึงง่ายที่จะผสมกับ BMP ในรูปลักษณะต่างๆ ไม่ว่าจะเป็น liquid หรือแบบ powder

คณะผู้ศึกษาจึงสนใจสาร sodium hyaluronate ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์ได้ (organic synthetic material) ว่าเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็น carrier สำหรับ BMP ได้หรือไม่

วัสดุและวิธีการ

ทำการศึกษาในหนูสายพันธุ์ Sprague-Dawley จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล เพศผู้ขนาดโตเต็มที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 40 กรัม จำนวนทั้งสิ้น 36 ตัว แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มๆ ละเท่าๆ กัน โดยแต่ละกลุ่มจะถูกฝังสารทดลองที่บริเวณกล้ามเนื้อต้นขาด้านบน (Quadriceps muscle) (รูปที่ 1) กลุ่มที่ 1 (so-

dium hyaluronate) ฝังสาร sodium hyaluronate กลุ่มที่ 2 (h BMP) ฝังสาร human BMP และกลุ่มที่ 3 (composite) สารผสมระหว่าง sodium hyaluronate และ h BMP โดยกลุ่มแรกและกลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มควบคุม ส่วนกลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มศึกษา สารทดลอง sodium hyaluronate ในการศึกษานี้เป็นสารสังเคราะห์อินทรีย์ มีชื่อทางการค้าว่า healon ถูกผลิตโดยขบวนการปราศจากเชื้อปราศจากไพโรเจน เป็นสารที่มีความบริสุทธิ์สูงไม่ทำให้เกิดการอักเสบ ซึ่งใช้ช่วยในการผ่าตัดลูกตา สาร human BMP เป็นโปรตีนที่สกัดได้จากกระดูกต้นขา (Femur) มีน้ำหนักกระดูกประมาณ 10 กิโลกรัม ผ่านขบวนการสกัดโดยวิธีของ WU และ HU^{5,6} ได้ปริมาณสาร BMP ประมาณ 2 มิลลิกรัม สารผสมระหว่าง sodium hyaluronate และ h BMP ได้มาจากการใช้ปริมาณ BMP จำนวน 1 มิลลิกรัม ผสมกับ sodium hyaluronate จำนวน 6 มิลลิตร โดยใช้เครื่องปั่นช่วยผสมทิ้งไว้ 12 ชั่วโมง จึงนำมาใช้หลังจากทำการฝังสารทดลองลงในกล้ามเนื้อต้นขาแล้ว และติดตามผลในสัปดาห์ที่ 1, 2, 3 โดยการ sacrificed หนูแล้วนำกล้ามเนื้อบริเวณที่ฝังสารมาตรวจดูการสร้างกระดูกโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ดูปริมาตรของกระดูกที่สร้างขึ้นต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่ (trabecular bone volume) และลักษณะการสร้างกระดูกตามลักษณะทางพยาธิวิทยา (histology) จากนั้นประเมินผลของการสร้างกระดูกโดยใช้ลักษณะทางพยาธิวิทยาแล้วให้คะแนนตามพยาธิวิทยา (histologic score) ของ modified Lane criteria⁷



รูปที่ 1 แสดงการฝังสารทดลองลงในบริเวณกล้ามเนื้อต้นขาด้านบน ของหนูทดลองสายพันธุ์ Sprague - Dawley.

ตารางที่ 1 แสดงคะแนนของการเกิดการติดของกระดูก⁷

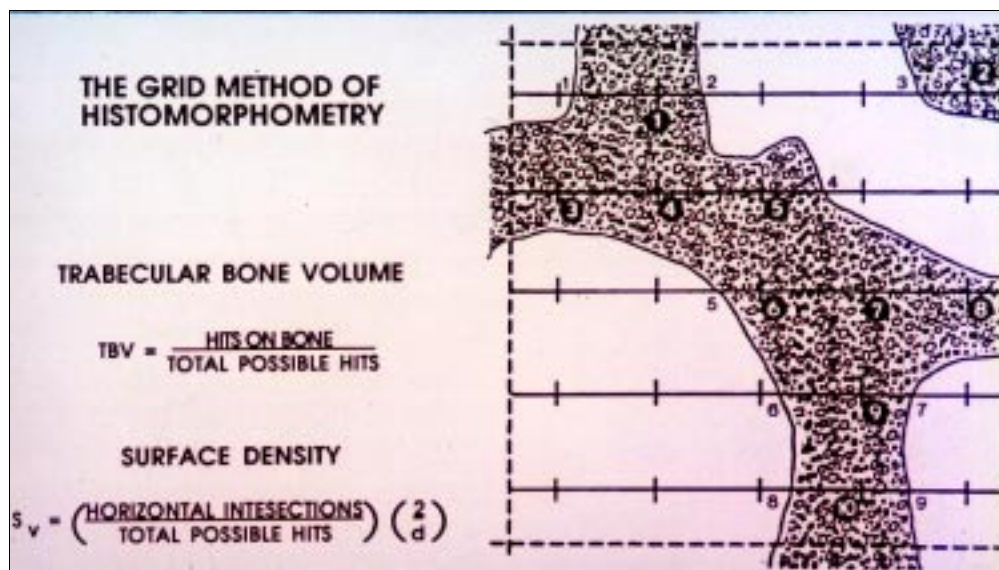
Union	Score
No evidence of union	0
Fibrous union	1
Osteochondral union	2
Bone union	3
Reorganization	4

(ตารางที่ 1) และปริมาตรของกระดูกที่ถูกสร้างขึ้น โดยใช้การวัดทางนับปริมาตรของกระดูก trabecular (trabecular bone count) โดยใช้วิธี grid method หรือนับเป็นช่องตาราง (รูปที่ 2) แล้วแปลผลโดยใช้ SPSS program ความแตกต่างระหว่างกลุ่มใช้ ANOVA test ทดสอบ homogeneity โดย Scheffe's test โดยมีนัยสำคัญเมื่อ P value < 0.05

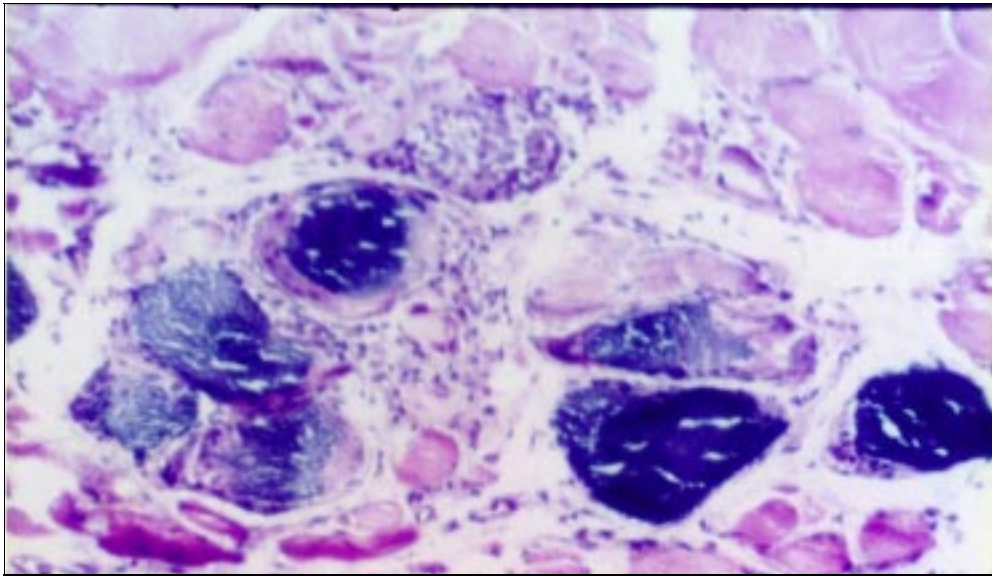
วิธีการผ่าตัด

การผ่าตัดทำภายใต้ภาวะปลอดเชื้อ เทคนิคการผ่าตัดใช้ General anesthesia โดยใช้ Thiopental ขนาด 25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พร้อมกับฉีด Cloxacillin 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมเข้าทางช่องท้องเพื่อป้องกันการติดเชื้อ ทำการผ่าตัดบริเวณครึ่งหนึ่งของความยาวต้นขาขนาดแผลผ่าตัดประมาณ 3

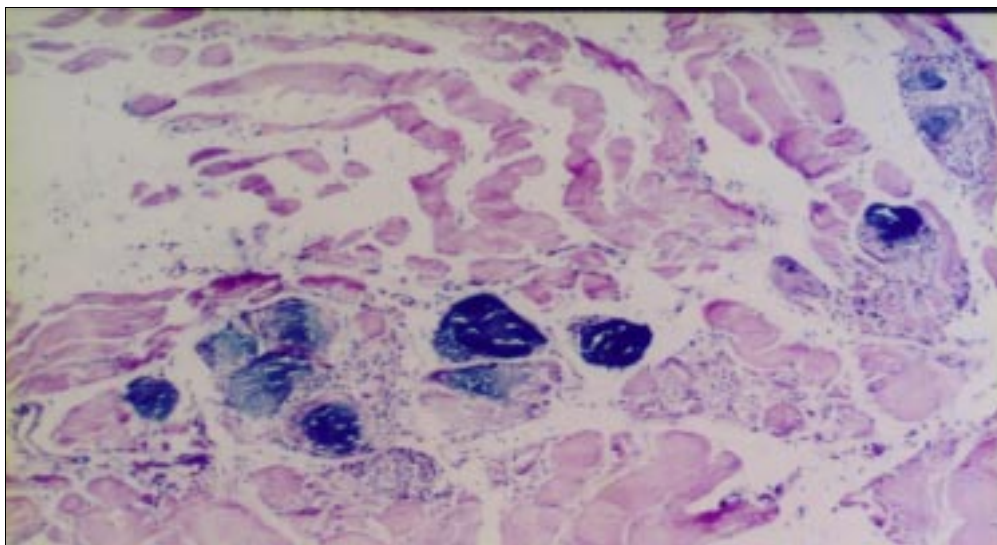
เซนติเมตร ทำการแหวกกล้ามเนื้อต้นขา (Quadriceps muscle) เป็นช่องสำหรับฝังสาร นำสาร sodium hyaluronate ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดฉีด ฉีดเข้าไปบริเวณช่องที่เตรียมแล้วเย็บปิดกล้ามเนื้อด้วย Nylon 3-0 เพื่อใช้เป็นตำแหน่งอ้างอิงในการตัดชิ้นเนื้อเพื่อส่งตรวจทางพยาธิวิทยา ทำการฝังสารจนครบ 6 ตัว ทำการผ่าตัดเช่นเดียวกัน ในหนูทดลองกลุ่มที่ 2 โดยใช้สาร h-BMP ปริมาณ 1 มิลลิกรัม ซึ่งสกัดมาจากกระดูกคนตามวิธีของ WU และ HU⁵⁶ ได้สารซึ่งมีลักษณะเป็นผง ทำละลายด้วยน้ำเกลือความเข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 3 มิลลิลิตร แบ่งใส่หนูตัวละ 0.5 มิลลิลิตร และเช่นเดียวกับกลุ่มที่ 3 โดยใช้สารผสม h-BMP กับ sodium hyaluronate ขึ้นตอนการตรวจวัดสารได้รับการช่วยเหลือจากนักชีวเคมี ในระหว่างการทดลองหากสัตว์ทดลองมีบาดแผลติดเชื้อหรือตาย จะนำสัตว์ทดลองตัวใหม่



รูปที่ 2 แสดงวิธีวัดปริมาตรกระดูกที่สร้างขึ้นโดยใช้การนับช่องตาราง (Grid method) โดยแบ่งเป็น 25 ช่อง นับช่องที่กระดูกที่สร้างขึ้น ทารด้วยจำนวนช่องทั้งหมดค่าที่ได้เป็นปริมาตรกระดูกที่สร้างขึ้น (trabecular bone volume) คิดเป็นเปอร์เซ็นต์



รูปที่ 3 ลักษณะทางพยาธิวิทยาของกล้ามเนื้อต้นขาในกลุ่มแรก สไลด์ที่ 1 แสดงลักษณะของสาร sodium hyaluronate ที่เหลือค้าง และการตอบสนองต่อสารทดลอง โดยมีการอักเสบเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อย



รูปที่ 4 ลักษณะทางพยาธิของกล้ามเนื้อต้นขาในกลุ่มแรก สไลด์ที่ 2 แสดงลักษณะการหายจากการอักเสบของกล้ามเนื้อ

มาทดแทนให้ครบจำนวน

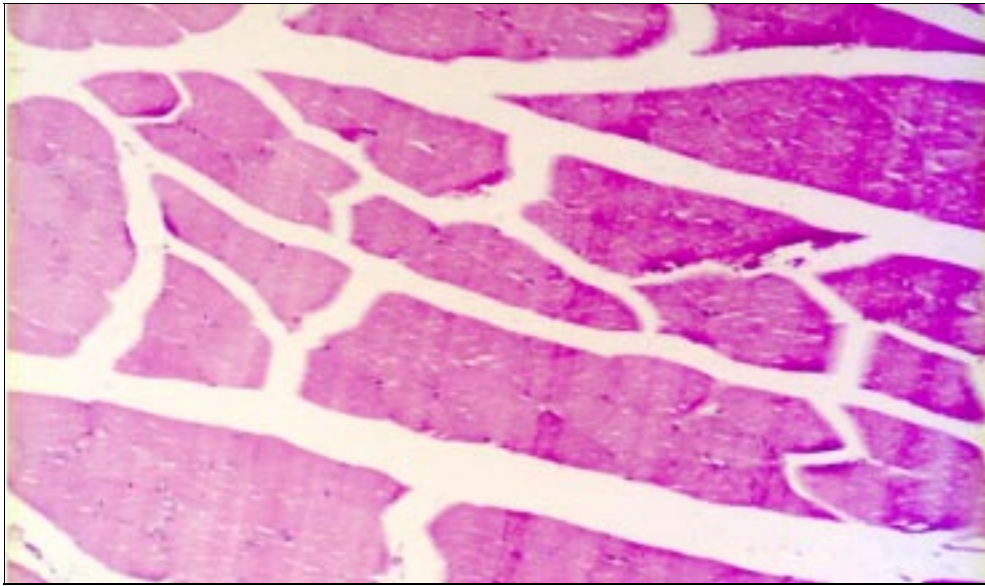
ผลการศึกษา

กลุ่มที่ 1 สไลด์แรกพบลักษณะการอักเสบในบริเวณที่ฝังสารเล็กน้อยมีเซลล์การอักเสบจำพวก Lymphocyte และ Macrophage ยังคงพบสาร sodium hyaluronate เหลือค้างอยู่ (รูปที่ 3) ต่อมาในสไลด์ที่สองมีลักษณะ การหายจากการอักเสบและไม่พบการสร้างกระดูกมีการสูญเสียของสารทดลอง (รูปที่ 4)

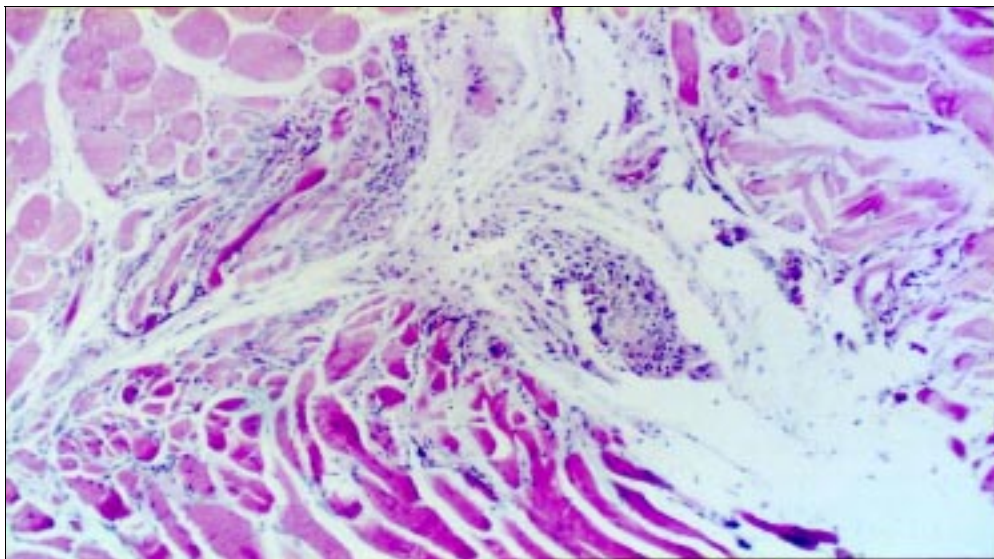
และในสไลด์ที่สามลักษณะเช่นเดียวกับสไลด์ที่สอง (รูปที่ 5)

กลุ่มที่ 2 สไลด์แรกพบลักษณะการอักเสบมีเซลล์จำพวก mesenchymal cell มารวมกลุ่มกันเป็นบริเวณหลายๆ แห่ง และบางบริเวณพบสารพื้นเนื้อกระดูก (รูปที่ 6) ต่อมาในสไลด์ที่สอง และสไลด์ที่ 3 พบลักษณะการอักเสบมากขึ้นกว่าสไลด์แรก มีเซลล์ mesenchymal มารวมกลุ่มหนาตัวมากขึ้น พบสารพื้นเนื้อกระดูก แต่ไม่พบ mature bone (รูปที่ 7, 8)

กลุ่มที่ 3 สไลด์แรกพบลักษณะ osteoid matrix จำนวน



รูปที่ 5 ลักษณะทางพยาธิวิทยาของกล้ามเนื้อต้นขาในกลุ่มแรก สไลด์ที่ 3 แสดงกล้ามเนื้อที่หายเป็นปกติ และการสลายตัวของสาร sodium hyaluronate อย่างสมบูรณ์



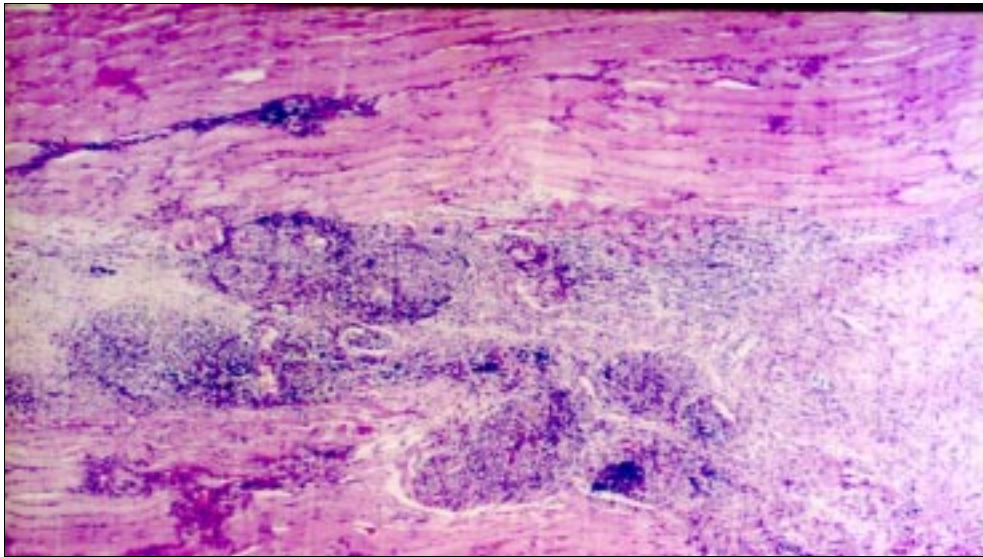
รูปที่ 6 ลักษณะทางพยาธิวิทยาของกล้ามเนื้อต้นขา ในกลุ่มที่สอง สไลด์ที่ 1 แสดงการอักเสบในบริเวณที่ฝังสาร human BMP มีเซลล์จำพวก mesenchyme มารวมตัวกันจากการเหนี่ยวนำของสาร human BMP พบมีการสร้างสารพื้นกระดูกในจำนวนเล็กน้อย

มากเป็นหลายๆ จุด รวมทั้ง mesenchymal cell จำนวน มากกว่ากลุ่มที่สองในเวลาเดียวกัน (รูปที่ 9) ต่อมาในสไลด์ที่สอง พบลักษณะการสร้างกระดูกอ่อน (cartilage) การสร้างกระดูกเป็นจำนวนมาก และมีขนาดใหญ่ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่สองในเวลาเดียวกัน (รูปที่ 10) สไลด์ที่สาม พบลักษณะการสร้างกระดูกในระยะต่างๆ กันตามขบวนการสร้างผ่านทางกระดูกอ่อน (endochondral ossification) คือ ไขกระดูก (bone marrow) และลักษณะกระดูกที่สร้างมีลักษณะใกล้เคียงกับกระดูกที่เจริญเติบโตเต็มที่ (mature bone) (รูปที่ 11)

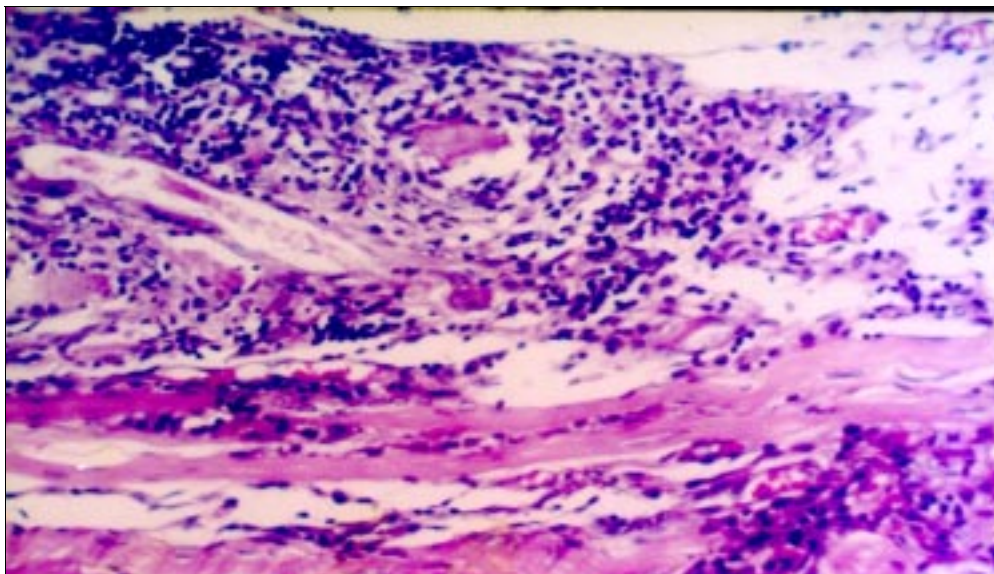
การวิจัย

วิจารณ์

ความก้าวหน้าเกี่ยวกับการพัฒนาสารทดแทนกระดูกเจริญขึ้น



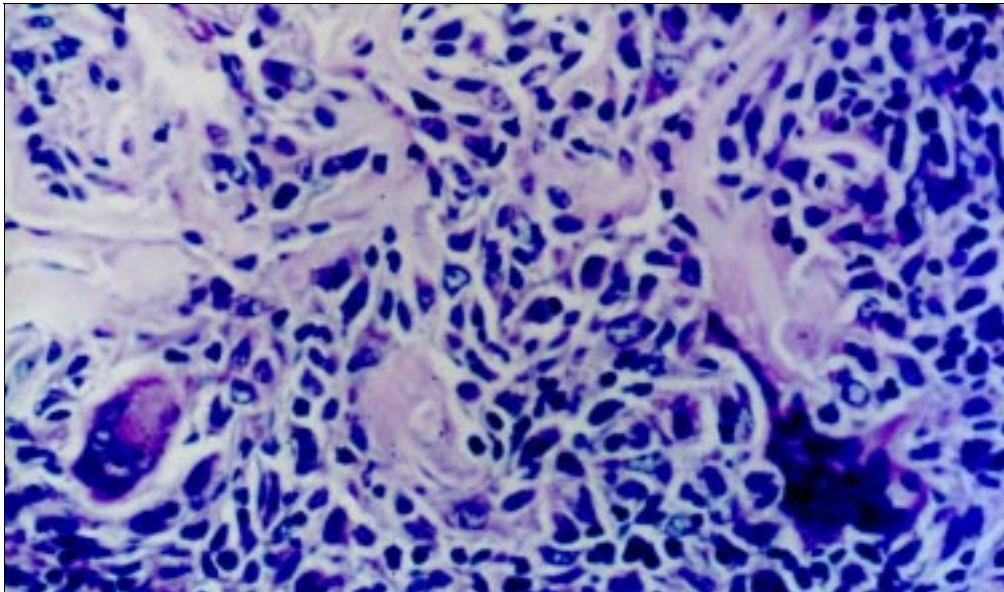
รูปที่ 7 ลักษณะทางพยาธิวิทยาของกล้ามเนื้อต้นขา ในกลุ่มที่สอง สัปดาห์ที่ 2 แสดงถึงบริเวณที่ฝังสาร human BMP มีเซลล์จำพวก mesenchyme มารวมตัวกันมากขึ้น มีการสร้างสารพื้นกระดูกเพียงเล็กน้อย



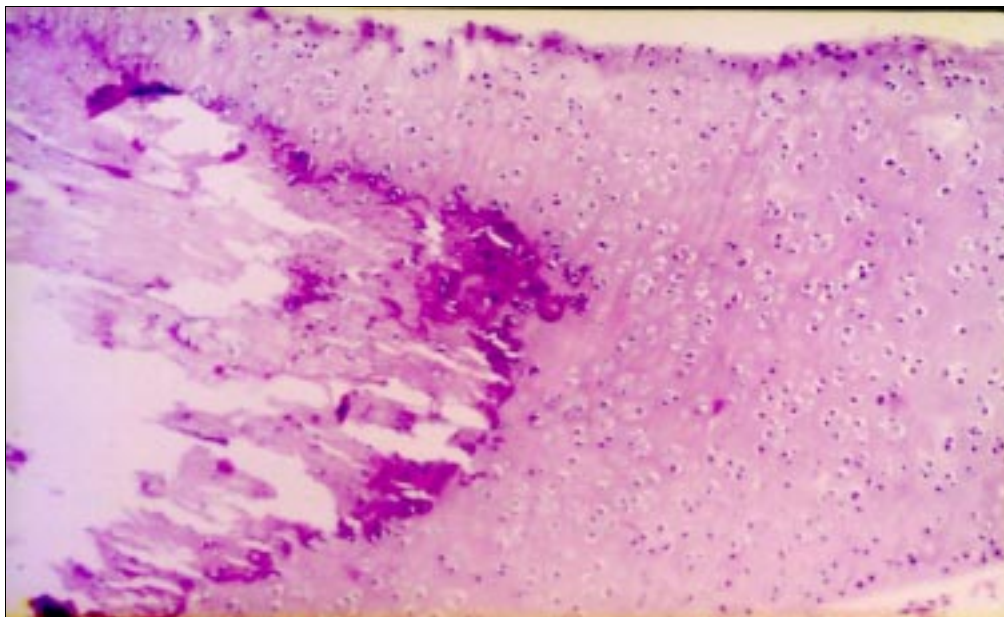
รูปที่ 8 ลักษณะทางพยาธิวิทยาของกล้ามเนื้อต้นขาในกลุ่มที่สอง สัปดาห์ที่ 3 แสดงลักษณะคล้ายคลึงกัน ในสัปดาห์ที่ 2 คือมีเซลล์ mesenchyme มารวมตัวกัน แต่มีการสร้างเนื้อกระดูกแต่เพียงเล็กน้อย

มาก หลังจากที่ใช้ Urist และคณะ สามารถแยกสารที่อยู่ในเนื้อพื้นกระดูกซึ่งสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ mesenchyme ที่อยู่ใกล้เคียง ทำหน้าที่สร้างกระดูกขึ้นได้ แม้แต่ในเนื้อเยื่ออื่นที่ไม่ใช่กระดูก (heterotopic sites) และเรียกสารชนิดนี้ว่า bone morphogenetic protein¹⁴ หรือ BMP ซึ่งเป็น glycoprotein ที่พบมากใน

cortical bone เป็นสารที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการเหนี่ยวนำให้มีการสร้างกระดูกขึ้นได้ในบริเวณที่ใส่ลงไป¹⁴ แต่ทว่าการใช้ BMP เพียงตัวเดียวโดดๆ จะไม่สามารถกระตุ้นการสร้างกระดูกขึ้นมาได้ หรือได้น้อยมาก อันเนื่องมาจากคุณสมบัติเป็น Water Soluble ของสาร BMP ซึ่งจะถูกลดซึมจากบริเวณที่ใส่ลงไปเข้า



รูปที่ 9 ลักษณะทางพยาธิวิทยาของกล้ามเนื้อต้นขา ในกลุ่มที่สาม สัปดาห์ที่ 1 พบลักษณะเซลล์จำพวก mesenchyme จำนวนมาก และมีการสร้างเนื้อกระดูกจำนวนมากหลายๆ ตำแหน่ง

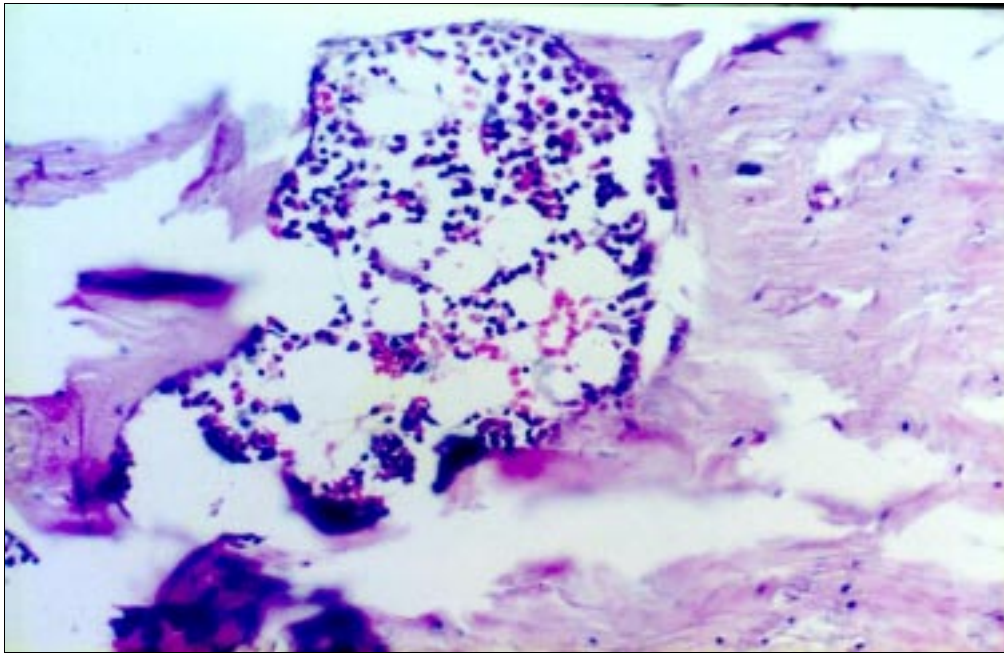


รูปที่ 10 ลักษณะทางพยาธิวิทยาของกล้ามเนื้อต้นขา ในกลุ่มที่ 3 สัปดาห์ที่ 2 พบการสร้างกระดูกอ่อน (cartilage) การสร้างกระดูก (woven bone) จำนวนมาก และขนาดใหญ่อย่างชัดเจน

สู่ร่างกาย ภายในเวลาเพียงไม่กี่ชั่วโมง ก่อนที่จะสามารถออกฤทธิ์ได้ ดังนั้นการที่ BMP จะสามารถออกฤทธิ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ จำเป็นต้องมีสารที่ BMP สามารถจะยึดเหนี่ยวเอาไว้ได้ เพื่อที่ BMP จะได้มีเวลาเพียงพอในการออกฤทธิ์ เรียกสารชนิดนี้ว่า

carriers^{2,7,8} ในปัจจุบันมีการจำแนก carriers สำหรับ BMP ออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ

สารอินทรีย์ ได้แก่ fibrin sealant, polylactic acid polyglycolic acid polymers ส่วนสารอนินทรีย์ ได้แก่ plastics ce-



รูปที่ 11 ลักษณะทางพยาธิวิทยาของกล้ามเนื้อต้นขา ในกลุ่มที่ 3 สัปดาห์ที่ 3 พบลักษณะการสร้างกระดูกจำนวนมากขึ้นและขนาดใหญ่ขึ้น มีลักษณะใกล้เคียงกับกระดูกที่เจริญเติบโตเต็มที่ (mature bone formation) และมีการสร้างไขกระดูก (bone marrow formation) โดยขบวนการสร้างกระดูกผ่านทางกระดูกอ่อน (endochondral ossification)

ramic, B-tricalcium phosphate, porous hydroxyapatite

ส่วนใหญ่มักนิยมใช้พวกสารอินทรีย์ ซึ่งสามารถสร้างได้จากร่างกายทำให้ปราศจากเชื้อได้ และง่ายต่อการเก็บรักษา แต่มีข้อจำกัดในเรื่องปริมาณ (ตัวอย่างเช่น fibrin sealant) และการก่อให้เกิดปฏิกิริยาภูมิคุ้มกันของผู้รับ ส่วนพวกสารอนินทรีย์ส่วนใหญ่มีลักษณะแข็งมักจะย่อยสลายไปไม่สมบูรณ์ ทำให้ขัดขวางการเจริญของกระดูก และดำรงอยู่ในร่างกายเสมือนหนึ่งสิ่งแปลกปลอมเป็นระยะเวลายาวนาน^{2,7,8} ดังนั้นคุณสมบัติของสาร carriers สำหรับ BMP ที่ดีต้องประกอบด้วย

1. Biodegradability หลังจากมีการเจริญของเนื้อเยื่อกระดูกเข้าไปแทนที่แล้ว เมื่อหมดหน้าที่สารทดแทนกระดูกควรจะถูกร่างกายสลายและกำจัดออกไปได้หมด สิ่งที่น่าสนใจคือ อัตราการสลายตัวของสารทดแทนกระดูกที่ดีจะต้องสอดคล้องกับอัตราการเจริญของเนื้อเยื่อกระดูกซึ่งเข้าไปแทนที่ ถ้าหากการสลายตัวเกิดขึ้นเร็วเกินไปจะทำให้บริเวณที่ใส่สารทดแทนกระดูก ขาดความแข็งแรงและเกิดการแตกหักได้ แต่ถ้การสลายตัวเกิดขึ้นช้าหรือไม่มีการสลายตัวสารทดแทนกระดูกนั้น ก็จะเป็นตัวขัดขวางการเจริญของเนื้อเยื่อกระดูก ทำให้เนื้อเยื่อกระดูกไม่สามารถเจริญเข้าไปแทน

ที่ได้^{1,2}

2. Biocompatibility เข้ากับเนื้อเยื่อในร่างกายได้ ทำให้มีการเจริญของเนื้อเยื่อกระดูกผสมผสานเข้าไปภายในสารทดแทนกระดูกจนเป็นเนื้อเดียวกัน โดยไม่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาภูมิคุ้มกัน ในบริเวณที่ใส่เข้าไป ซึ่งจะขัดขวางขบวนการสร้างกระดูก^{1,2}

3. Availability มีขั้นตอนการผลิตหรือเตรียมที่ง่าย สามารถทำได้มากตามต้องการ และสามารถเก็บไว้ใช้ได้นาน

จากผลของการศึกษาเราพบว่าในกลุ่มที่ 1 เมื่อใช้ sodium hyaluronate ผังลงในกล้ามเนื้อของหนูก่อให้เกิดปฏิกิริยาภูมิคุ้มกันที่ไม่รุนแรง แสดงว่าสามารถเข้ากับเนื้อเยื่อของร่างกายได้ และสามารถที่จะค่อยๆ ถูกสลายออกไปจากร่างกายอย่างสมบูรณ์ (ตารางที่ 2) และเมื่อใช้ BMP แต่เพียงอย่างเดียวในกลุ่มที่ 2 สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้าง osteoid ได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น และไม่เกิดการก้าวหน้าในขั้นตอนของการสร้างกระดูก (ตารางที่ 3) และเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งคือในกลุ่มที่ 3 เมื่อรวม sodium hyaluronate เข้ากับ BMP สามารถเหนี่ยวนำให้มีการสร้างสารพื้นเนื้อกระดูกที่มากแม้เพียงในสัปดาห์แรก (ตารางที่ 4) และเมื่อเวลาผ่านไปมากขึ้น จะพบการก้าวหน้าในขั้นตอนของการสร้างกระดูก

สารโซเดียมไฮยาลูโรเนต เหมาะสมในการเป็นพาหะสำหรับสารเหนียวนำกระดูก Bone Morphogenetic Protein 89

ตารางที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา กับเวลาที่ศึกษา (สัปดาห์) ของสารทดลอง Sodium Hyaluronate ในกลุ่มแรก พบว่าในสัปดาห์แรกยังคงมีการย่อยสลายของสารไม่หมด จนย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ในสัปดาห์ที่สาม และเกิดการอักเสบแบบไม่รุนแรง

Week	Histologic findings.
1	remnant of material
2	no material ,healing of muscle
3	complete healing

ตารางที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา กับเวลาที่ศึกษาของสารทดลอง Human Bone Morphogenetic Protein (h BMP) ในกลุ่มที่ 2 พบว่าในทั้งสามสัปดาห์มีการสร้าง Osteoid Matrix พอสมควร แต่ไม่พบการสร้างกระดูกแบบสมบูรณ์

Week	Histologic findings.
1	some osteoid formation
2	some osteoid formation
3	no bone formation

และการสร้างกระดูกที่มีคุณภาพอย่างเห็นได้ชัด เมื่อเทียบกับกลุ่มอื่น โดยตัว sodium hyaluronate จะเป็นตัว stabilized ให้ BMP อยู่เฉพาะที่และช่วยให้มีการ contact ที่ดีระหว่าง BMP กับ เซลล์ที่อยู่ข้างเคียง และมีปฏิกิริยาภูมิคุ้มกันที่ไม่รุนแรง ซึ่งจะทำให้มีการรวมตัวของเซลล์จำพวก macrophage, lymphocyte และ polymorphonuclear ในบริเวณที่ใส่สารลงไป เซลล์เหล่านี้จะหลั่งสาร cytokines เช่น interleukin-I และ prostaglandin-E₂ ซึ่งช่วยเพิ่มศักยภาพในขบวนการเหนียวนำกระดูก^{8,10} นั่นคือ sodium hyaluronate เมื่อใช้ร่วมกับ BMP สามารถเพิ่ม

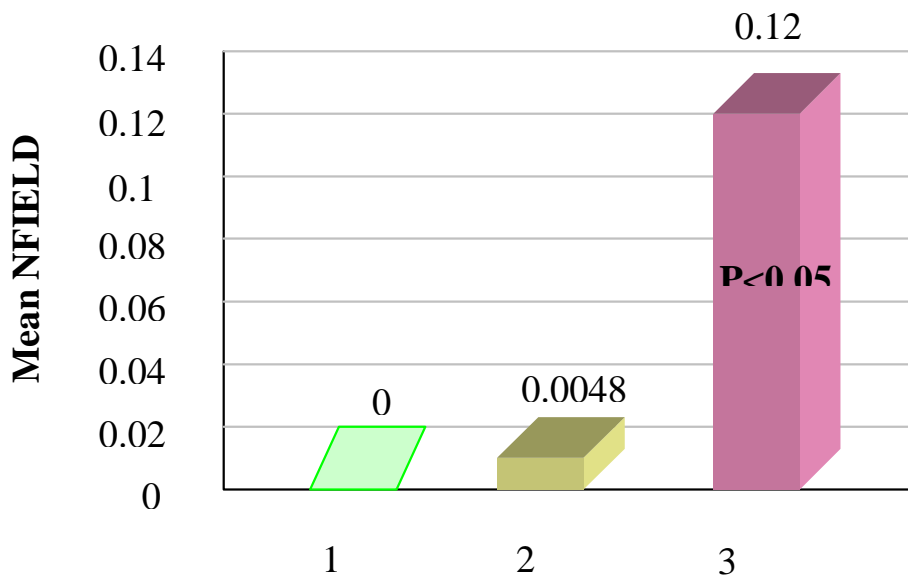
ศักยภาพในการเหนียวนำกระดูกของ BMP ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งแสดงปริมาณของกระดูกที่สร้างขึ้นมากกว่าทุกกลุ่มอย่างชัดเจน (ตารางที่ 5 และรูปที่ 12) และมีคะแนนทางพยาธิวิทยา มากกว่าทุกกลุ่มอย่างชัดเจนอีกเช่นกัน (ตารางที่ 6 และรูปที่ 13) sodium hyaluronate สามารถเตรียมได้โดยปราศจากเชื้อผลิตได้จำนวนมาก เพราะเป็นสารสังเคราะห์ที่ไม่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาที่รุนแรงเข้าได้กับเนื้อเยื่อของร่างกาย และค่อยๆ ถูกสลายออกไปได้อย่างสมบูรณ์ มีความข้นหนืด สามารถผสมได้ง่ายกับรูปแบบต่างๆ ของ BMP เป็น species nonspecific ใช้ได้ในมนุษย์และ

ตารางที่ 4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา กับเวลาที่ศึกษาของสารผสมระหว่าง Sodium Hyaluronate กับ h BMP ในกลุ่มที่ 3 โดยพบว่าแม้เพียงสัปดาห์แรกก็สามารถพบการสร้าง osteoid แล้ว เมื่อเวลาผ่านไปพบว่ามีการพัฒนาการสร้างกระดูกผ่านทางกระดูกอ่อนมาเป็นกระดูกและไขกระดูก โดยขบวนการ Endochondral Ossification

Week	Histologic findings.
1	osteoid formation
2	chondroid formation
3	endochondral ossification bone marrow differentiation

ตารางที่ 5 แสดงปริมาณของ Trabecular Bone ออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์ในแต่ละกลุ่ม

	Group	%
1	Sodum hyaluronate	0
2	h BMP	0.48
3	Composite	12



รูปที่ 12 แสดงปริมาณของ Trabecular bone ในแต่ละกลุ่มในรูปแบบแผนภูมิกราฟแท่ง

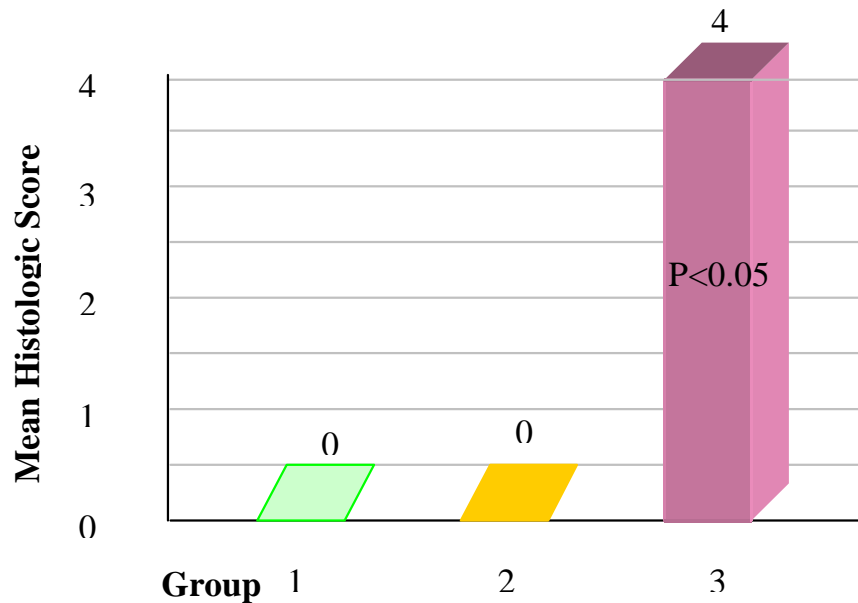
ตารางที่ 6 แสดงคะแนนทางพยาธิวิทยาของแต่ละกลุ่ม พบว่ากลุ่มที่ 3 สารผสมระหว่าง Sodium Hyaluronate และ Human - BMP มีคะแนนสูงสุด

	Group	Score
1	Sodum hyaluronate	0
2	h BMP	0
3	Composite	4

สัตว์ เพราะเป็นสารพื้นฐานในร่างกาย สามารถเก็บไว้ได้นานเป็นเวลาราว 3 ปี ในอุณหภูมิที่เหมาะสม เมื่อนำมาผสมรวมกับ human BMP สามารถทำให้เกิดการสร้างกระดูกได้มากอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ human BMP แต่เพียงอย่างเดียว

สามารถกล่าวได้ว่า sodium hyaluronate เป็นสารอินทรีย์

สังเคราะห์ตัวใหม่ เหมาะที่จะเป็น carrier สำหรับ human BMP ผลของการศึกษานี้จะนำมาซึ่งการศึกษาที่จะมีในอนาคต เพื่อที่จะปรับปรุงคุณสมบัติของสารทดแทนกระดูกที่เหมาะสม โดยการใช้ composite human BMP + sodium hyaluronate และ material ที่ให้ความแข็งแรงชนิดอื่น เพื่อพัฒนาให้มีคุณลักษณะและสมบัติใกล้เคียงกับกระดูกจริงมากที่สุด



รูปที่ 13 แสดง Histologic Score ของแต่ละกลุ่ม ในแผนภูมิกราฟแท่ง โดยพบว่ากลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 มีคะแนนเท่ากับศูนย์ และกลุ่มที่ 3 มีคะแนนสูงสุด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารอ้างอิง

- Habal MB., Reddi AH. Bone Graft & Bone Substitutes 1992; 70-83:243-51.
- Urist MR., Comor BTO, Burwell RG. Constitution of bone-inducing implant by combining bone morphogenetic protein (BMP) with Biomaterial : experimental study in mice. Bone Grafts, Derivatives and Substitutes. 1993;1:377-96.
- Reddi AH., Wientroub S, Muthukumaran N. Biologic principle of bone induction. Orthop Clin North Am 1987;18:207-12.
- Urist MR, Keijisato, Brownell AG, et al. Human bone morphogenetic protein (BMP). Proceedings of the society for experimental biology and medicine 1983;173:194-9.
- Yasuhiro S, Takayuki M, His AI, et al, Effect of high molecular weight sodium hyaluronate on immobilized rabbit knee. Clin Orthop 1994;299:282-92.
- Urist MR, Keiji S. Bone morphogenetic protein-induced cartilage development in tissue culture. Clin Orthop 1994;183:180-8.
- Zu-Yaowu, Xiao-Bo. Separation and purification of porcine bone morphogenetic protein. Clin Orthop 1987;230:229-36.
- Lane JM., Sandhu Hs. Current Approach to experimental bone grafting. Orthop Clin North Am 1987;18(2):213-35.
- Shimpei M, Kunio T, Takao O, et al. Evaluation of polylactic acid homopolymers as carrier for bone morphogenetic protein. Clin Orthop 1992;278:274-85.
- Morio R, Urist MR., Human fibrin is a physiologic delivery system for bone morphogenetic protein. Clin Orthop 1988;235:302-10.
- Edward HR, Joseph M. Lane, Urist MR, Karen L. Jay R. Libuman. Bone morphogenetic protein -2 biology and application. Clin Orthop 1996;324:39-46.

Sodium Hyaluronate as an Optimal Carrier for Bone Morphogenetic Protein

Jiradech Tungasreni*, Unchalee Visawapoka**, Thanainit Chotanaphuti***
and Thamrongrat Keokarn***

*Orthopaedic Resident, Phramongkutklao Hospital, **Biochemistry Department, Phramongkutklao College of Medical.

***Orthopaedic Department, Phramongkutklao Hospital

Study design: The prospective study was designed to evaluate the effect of sodium hyaluronate in experimental bone formation of Bone Morphogenetic Protein (BMP.) **Objective:** To evaluate the effect of sodium hyaluronate for BMP carrier. **Summary of Background data:** Bone Morphogenetic Protein (BMP) is the most powerful osteoinductive substance and led to much progression in orthopaedics. Its action in vivo is promoted by carrier. A number of BMP carrier are organic and inorganic substance to be involved in enhancing bone formation of BMP. sodium hyaluronate is a synthetic organic group substance. **Methods:** Experimental study was induced in 36 Sprague-Dawley rats by implanted in thigh muscle. The first, controled group was composed of sodium hyaluronate only. The second group was human BMP (h-BMP). The h-BMP was purified by WU and HU method. The third group was the combination of sodium hyaluronate and h-BMP. The materials were implanted in thigh muscle, and then explanted. They were also studied by x-rays, bone histology and trabecular count to evaluate the osteoinduction. **Results:** There was slightly inflammatory response and no bone formation in the first group. The implant sites were also completely healed within 2 weeks. Some osteoid formation and inflammatory response in the second group. In the third group, there were bone, cartilage formation and some areas of bone marrow formation. **Conclusion:** Sodium Hyaluronate is a normal substance of tissue. It is biodegradable and biocompatible substance. This study was implied that sodium hyaluronate is one of a good BMP carrier. Since it can be synthesized, it promises to have a great role in the future as bone substitute composition.

Key Words: • Bone morphogenetic protein • BMP • Sodium hyaluronate

RTA Med J 2551;61:81-92.