บทที่ 5

อภิปรายผลการศึกษา

กระดูกปลูกถ่ายเอกพันธุ์ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้เป็นกระดูกที่ได้มาจากผู้บริจาคร่างกายให้กับศูนย์เนื้อเยื่อชีวภาพ กรุงเทพฯ โดยทางศูนย์เนื้อเยื่อชีวภาพกรุงเทพฯ ได้มีเกณฑ์ในการคัดเลือกผู้บริจาคดังนี้คือเป็นศพที่เสียชีวิตอันเนื่องมาจากอุบัติเหตุหรือถูกทำร้ายมาไม่เกิน 24 ชั่วโมงหรือมาจากผู้ป่วยที่ต้องได้รับการผ่าตัดกระดูกบางส่วนทิ้งที่มีอายุไม่เกิน 50 ปี เนื่องจากหากเป็นผู้ที่มีอายุมากมักจะมีโรคประจำตัว เช่น โรคกระดูกพรุน เป็นต้น ทำให้มีคุณภาพของกระดูกด้อยลง ซึ่งสอดคล้องไปกับหลายการศึกษาที่กล่าวว่าอายุที่เพิ่มขึ้นนั้นยิ่งพบเนื้อกระดูก (bone matrix) ที่มีปริมาณโกรว์ธแฟคเตอร์ชนิดต่างๆ ลดลง เช่น อินซูลินไลค์โกรว์ธแฟคเตอร์ชนิดที่ 1 และ 2 (insulin-like growth factor-I, -II หรือ IGF-I, -II) และทรานส์ฟอร์มิงโกรว์ธแฟคเตอร์ -บีตา (transforming growth factor beta หรือ TGF-β) (Bennett และคณะ *et al,* 1984; Pfeilschifter *et al,* 1998; Seek *et al,* 1998; Seek *et al,* 1999) และรวมไปถึงการมีปริมาณของบีเอ็มพีลดลงตามไปด้วย (Honsawek and Dhitiseith, 2005) ซึ่งจะส่งผลต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่

นอกจากนั้นกระดูกที่ได้รับบริจาคจากผู้ป่วยหรือจากศพนั้นต้องเป็นศพหรือผู้ป่วยที่ไม่เคยมีประวัติได้รับการรักษาด้วยการใช้สารกัมมันตภาพรังสี รวมทั้งไม่เคยเป็นโรคมะเร็ง โรคเลือด โรคติดต่อหรือโรคติดเชื้อใดๆ มาก่อน เช่น โรคไวรัสตับอักเสบ โรคภูมิคุ้มกันเสื่อมหรือภูมิคุ้มกันบกพร่องและโรคพิษสุนัขบ้า เป็นต้น นอกเหนือไปจากนั้นยังได้ทำการตรวจ คัดกรองกระดูกด้วยวิธีการตรวจเลือดทางห้องปฏิบัติการ (blood screening test) ได้แก่ การตรวจหาเชื้อไวรัสตับอักเสบ (HBsAg, HBV, HCV) เชื้อกามโรค (VDRL) และเชื้อเอชไอวี (Anti-HIV) ด้วยวิธีอีไลซาและปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสหรือพีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR) เพื่อลดโอกาสเกิดการถ่ายทอดเชื้อจากกระดูกที่นำมาทำเป็นกระดูกปลูกถ่ายไปยังผู้รับการปลูกถ่ายกระดูกซึ่งเป็นไปตามมาตรฐานของ American Association of Tissue Banks (AATB) ที่ระบุว่ากระดูกที่จะนำมาผลิตเป็นกระดูกปลูกถ่ายเอกพันธุ์นั้นไม่ควรจะเป็นพาหะของการถ่ายทอดเชื้อระหว่างบุคคล (AAP, 2001)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การศึกษาในครั้งนี้ผู้วิจัยได้นำกระดูกปลูกถ่ายเอกพันธุ์ชนิดทริปเปิลเอมาศึกษาเนื่องจากกระดูกชนิดนี้เป็นกระดูกที่ผ่านการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียสและผ่านกระบวนการผลิตทางเคมีตามวิธีการของ Urist ในปี 1975 ที่ใช้คลอโรฟอร์ม เมทานอลสกัดแยกเอาส่วนที่เป็นไขมัน เซลล์เยื่อบุผิวและโปรตีนที่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาต่อต้านจากร่างกายออก จึงทำให้กระดูกปลูกถ่ายเอกพันธุ์ที่ได้มีความเป็นแอนติเจนน้อยหรือแทบไม่มีเลย ดังนั้นเมื่อนำกระดูกชนิดดังกล่าวนี้ไปปลูกในตำแหน่งรับการปลูกถ่ายกระดูกจึงไม่ทำให้เกิดปฏิกิริยาต่อต้านของผู้รับการปลูกกระดูก นอกจากนั้นกระบวนการผลิตกระดูกนี้ยังมีการละลายส่วนที่เป็นแคลเซียมและโปรตีนที่ละลายได้ในกรดออกจากกระดูกด้วยกรดไฮโดรคลอริก ซึ่งมีหลายการศึกษาได้รายงานว่าด้วยกระบวนการสกัดแร่ธาตุออกด้วยกรดชนิดดังกล่าวทำให้สามารถตรวจพบบีเอ็มพีชนิดต่างๆ ได้(Urist, 1965; Urist *et al*., 1975; Oikarinen and Korhonen, 1979; Urist, 1980; Urist, 1983; Sampath and Reddi, 1984) จากเหตุผลที่กล่าวมาจึงทำให้กระดูกปลูกถ่ายเอกพันธุ์ชนิดทริปเปิลเอมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการปลูกกระดูกในร่างกายของมนุษย์ ซึ่งปัจจุบันนี้ทางศูนย์เนื้อเยื่อชีวภาพ กรุงเทพฯ ได้ผลิตกระดูกปลูกถ่ายเอกพันธุ์ชนิดทริปเปิลเอออกมาใช้เพื่อการปลูกกระดูกตั้งแต่ปี พ.ศ. 2529 เป็นต้นมา โดยผลิตปีละประมาณ 50-100 ชิ้นเพื่อนำไปใช้ในทางทันตกรรม โดยเฉพาะกรณีทดแทนส่วนของกระดูกขากรรไกรบนและล่างอันเนื่องมาจากเกิดการสูญเสียเนื้อกระดูกบริเวณกระดูกขากรรไกรและใบหน้าจากการมีถุงน้ำที่ปลายรากฟันหรือมีถุงน้ำ ร่วมกับฟันคุดและในรายที่เป็นเนื้องอกชนิดไม่ร้าย (สุภาและยงยุทธ, 2535) แต่อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีการนำกระดูกปลูกถ่ายเอกพันธุ์ชนิดทริปเปิลเอที่ผลิตได้จากศูนย์เนื้อเยื่อชีวภาพ กรุงเทพฯ มาตรวจพิสูจน์ว่ามีโปรตีนชนิดบีเอ็มพีอยู่หรือไม่ ดังนั้นการศึกษาวิจัยนำร่องนี้จึงได้นำกระดูกปลูกถ่ายเอกพันธุ์ชนิดทริปเปิลเอดังกล่าวมาตรวจวัดระดับของบีเอ็มพีโดยในเบื้องต้นผู้วิจัยได้ทดลองทำการสกัดกระดูกปลูกถ่ายเอกพันธุ์ชนิดทริปเปิลเอจำนวน 4 ตัวอย่างด้วยกัวนิดีน ไฮโดรคลอไรด์และเอนไซม์คอลลาจีเนสเพื่อเปรียบเทียบผลการสกัดระหว่างสารทั้งสองชนิดดังกล่าว (ดูในภาคผนวก ค) ซึ่งจากผลการทดลองในเบื้องต้นพบว่าตัวอย่างกระดูกที่สกัดด้วยกัวนิดีน ไฮโดรคลอไรด์ให้ผลในการวัดระดับของบีเอ็มพี 2 ได้มากกว่าตัวอย่างที่สกัดด้วยเอ็นไซม์คอลลาจีเนสประมาณ 1 เท่า ซึ่งสอดคล้องไปกันกับการศึกษาของ Wildemann และคณะ (2007) ที่ใช้กัวนิดีน ไฮโดรคลอไรด์ในการสกัดซึ่งแตกต่างไปจากวิธีการของ Jortikka และคณะ (1993) ที่ใช้เอนไซม์คอลลาจีเนสในการสกัด โดย Wildemann ได้รายงานว่าการใช้กัวนิดีน ไฮโดรคลอไรด์สามารถให้ผลการสกัดบีเอ็มพี 2 ออกมาจากตัวอย่างกระดูกได้มากกว่าการใช้เอนไซม์คอลลาจีเนส รวมทั้งสามารถสกัดโกรว์ธแฟคเตอร์ชนิดต่างๆ เช่น อินซูลินไลท์โกรว์ธแฟคเตอร์ชนิดที่ 1 วาสคิวลาร์เอ็นโดทีเลียลโกรว์ธแฟคเตอร์ (vascular endothelial growth factor หรือVEGF) ไฟโบรบลาสท์โกรว์ธแฟคเตอร์ (fibroblast growth factor หรือ FGF) ทรานส์ฟอร์มิงโกรว์ธ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แฟคเตอร์-บีตาวัน (transforming growth factor beta หรือ TGF-β1) และเพลทเลทดีไรฟ์โกรว์ธ แฟคเตอร์ (platelet derived growth factor หรือ PDGF) (Bennett *et al,* 1984; Pfeilschifter *et al,* 1998; Seek *et al,* 1998; Seek *et al,* 1999) ออกมาได้มากกว่าการใช้เอนไซม์คอลลาจีเนส นอกจากนั้นในการศึกษานี้ยังพบอีกว่าวิธีการสกัดกระดูกด้วยกัวนิดีน ไฮโดรคลอไรด์ร่วมกับการใช้โปรตีเนส อินฮิบิเตอร์ (proteinase inhibitors) นั้นให้ผลการสกัดสารได้หมดภายในครั้งเดียวโดยแทบไม่เหลือปริมาณโปรตีนในการสกัดซ้ำในตัวอย่างเดิมในครั้งที่ 2 ด้วยสารเคมีตัวเดียวกัน (ดูในภาคผนวก ง) ซึ่งแสดงว่าปริมาณโปรตีนทั้งหมดและระดับของบีเอ็มพี 2 ที่ตรวจพบได้นั้นเป็นปริมาณที่มีความน่าเชื่อถือเนื่องจากถูกสกัดออกมาจากกระดูกได้เกือบทั้งหมด ดังนั้นในการศึกษานี้จึงเลือกใช้กัวนิดีน ไฮโดรคลอไรด์เป็นสารเคมีในการสกัดกระดูก

ผลการศึกษาวิจัยนี้สามารถตรวจพบระดับของบีเอ็มพี 2 ได้จากกระดูกปลูกถ่ายเอกพันธุ์ชนิดทริปเปิลเอทุกตัวอย่างที่นำมาศึกษา โดยมีระดับบีเอ็มพี 2 ต่อโปรตีนทั้งหมดในกระดูกแบบก้อนและแบบผงเท่ากับ 612.55 และ 347.38 พิโคกรัมต่อมิลลิกรัมของโปรตีนทั้งหมดตามลำดับ โดยจะเห็นได้ว่าระดับของบีเอ็มพี 2 ต่อโปรตีนทั้งหมดของกระดูกปลูกถ่ายเอกพันธุ์ชนิดทริปเปิลเอแบบก้อนมีค่ามากกว่าแบบผงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อาจเนื่องมาจากการผลิตกระดูกในช่วงของการคัดกรองกระดูกจนกระทั่งถึงขั้นตอนการนำกระดูกที่ผ่านการทำให้แห้งภายใต้อุณหภูมิต่ำด้วยเครื่องไลโอฟิไลเซอร์นั้นไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อนำกระดูกปลูกถ่ายเอกพันธุ์ชนิดทริปเปิลเอ มาผลิตในรูปแบบผงนั้นจะต้องนำกระดูกในรูปแบบก้อนมาบดให้เป็นผงที่มีขนาดเล็กลงก่อนที่จะนำไปบรรจุใส่ขวดสีชาและปิดผนึกด้วยซองสูญญากาศอีกชั้นก่อนนำไปอาบด้วยรังสีแกมมา ดังนั้นกระดูกชนิดผงจึงอาจมีการสูญเสียโปรตีนได้มากกว่ากระดูกชนิดก้อนในขั้นตอนของการ บดกระดูกอีกทั้งพื้นที่ผิวของกระดูกชนิดผงนั้นยังมีโอกาสสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมได้มากกว่ากระดูกชนิดก้อน จึงอาจทำให้มีโอกาสสูญเสียโปรตีนได้ง่ายกว่า

การศึกษานี้สามารถตรวจพบระดับของบีเอ็มพี 2 ได้เช่นเดียวกันกับการศึกษาอื่นๆ โดยพบระดับของบีเอ็มพี 2 มีค่า 30.63 (6.45 - 262.18) นาโนกรัมต่อกรัมของกระดูกทริปเปิลเอแบบก้อน และ 17.37 (9.97 - 64.06) นาโนกรัมต่อกรัมของกระดูกทริปเปิลเอแบบผง ในขณะที่การศึกษาของ Bae และคณะ (2006) พบระดับของบีเอ็มพี 2 มีค่าเท่ากับ 20.2-120.6 นาโนกรัมต่อกรัมของดีบีเอ็ม (DBM; demineralized bone matrix) ส่วนการศึกษาของ Pietrzak และคณะ (2006) พบระดับของบีเอ็มพี 2 มีค่าเท่ากับ 21.4±12.0 นาโนกรัมต่อกรัมของดีบีเอ็มของกระดูกปลูกถ่ายเอกพันธุ์ทางการค้า รวมทั้งการศึกษาของ Wildemann และคณะ (2006) ที่พบระดับของบีเอ็มพี 2 เท่ากับ 3.6±1.2 ไมโครกรัมต่อกรัมของดีบีเอ็ม โดยการศึกษาที่ผ่านมาดังกล่าวใช้กัวนิดีน ไฮโดรคลอไรด์ในการสกัดและตรวจวัดปริมาณของบีเอ็มพี 2 ด้วยวิธีอีไลซา ซึ่งจะพบค่าบีเอ็มพี 2 ได้ในระดับที่แตกต่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กันออกไป ในขณะที่การศึกษาของ Blum และคณะในปี 2004 นั้นพบระดับของบีเอ็มพี 2 มีค่าเพียง 1459±246 พิโคกรัมต่อกรัมของดีบีเอ็ม ซึ่งการศึกษาของ Blum และคณะนั้นใช้เอนไซม์คอลลาจีเนสในการสกัดและใช้วิธีอีไลซาในการตรวจวัดปริมาณของบีเอ็มพี 2 จึงให้ผลการตรวจพบระดับบีเอ็มพี 2 ได้น้อยกว่าการศึกษาที่กล่าวมา ในทางกลับกันการศึกษาของ Li และคณะในปี 2000 กลับตรวจไม่พบระดับของบีเอ็มพีในทุกตัวอย่าง ซึ่งอาจเนื่องมาจากวิธีเวสเทอร์น บลอท (Western blot) ที่ใช้นั้นมีความไวไม่เพียงพอในการตรวจวัดปริมาณของบีเอ็มพีที่มีอยู่น้อย เนื่องจากบีเอ็มพีเป็นโปรตีนที่มีส่วนของแร่ธาตุล้อมรอบอยู่และมีความสัมพันธ์กับโมเลกุลของเนื้อกระดูกอย่างมาก อีกทั้งยังมีปริมาณน้อยมาก ดังนั้นหาก ใช้ขบวนการผลิตกระดูกที่ไม่ได้ละลายเอาแร่ธาตุออกมากเพียงพอและใช้วิธีการสกัดโปรตีนที่ไม่เหมาะสมก็อาจเป็นปัจจัยที่ทำให้ตรวจพบบีเอ็มพีได้น้อยหรือตรวจไม่พบเลย

เป็นที่น่าสังเกตว่าในตัวอย่างที่ 4 ของกระดูกทริปเปิลเอแบบก้อนนั้นพบปริมาณของโปรตีนทั้งหมดและระดับของบีเอ็มพี 2 มีค่าสูงกว่าในตัวอย่างอื่นๆ หลายเท่า ซึ่งเมื่อพิจารณาข้อมูลที่ได้จากการทำอีไลซาซ้ำสองครั้งจะเห็นได้ว่าค่าที่ตรวจวัดได้มีความใกล้เคียงกัน (ดูในภาคผนวก ข) จึงสามารถอธิบายได้ว่าค่าที่สูงนั้นไม่ได้เป็นมาจากความผิดพลาดในการปฏิบัติการ แต่อาจเป็นไปได้ว่ากระดูกในตัวอย่างที่ 4 นั้นถูกนำมาจากเพศชายหรือเพศหญิงที่มีความสมบูรณ์และมีอายุน้อย ไม่มีโรคประจำตัวที่มีผลกระทบต่อการสร้างกระดูกและเป็นชิ้นกระดูกที่มีการสูญเสียโปรตีนน้อยในขั้นตอนการผลิต ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะพบปริมาณของโปรตีนทั้งหมดและระดับของบีเอ็มพี 2 มีค่าสูงกว่าในตัวอย่างอื่นๆ อย่างเห็นได้ชัด

จากรายงานการศึกษาต่างๆ ที่ผ่านมานั้นพบว่าการตรวจวัดระดับของบีเอ็มพี 2 ได้ค่าที่แตกต่างกันออกไป อาจเนื่องมาจากวิธีการหรือสารเคมีที่ใช้ในการผลิตกระดูกปลูกถ่ายเอกพันธุ์ที่มีการดัดแปลงให้เหมาะสมกันไปตามแต่ละบริษัทผู้ผลิตหรือแต่ละธนาคารเนื้อเยื่อและ กระดูก เพื่อลดโอกาสในการติดเชื้อจากกระดูกปลูกถ่ายเอกพันธุ์ไปยังผู้รับการปลูกถ่ายกระดูก รวมทั้งการใช้สารเคมีที่ต่างชนิดกันออกไปในการสกัดโปรตีนจากกระดูกและขั้นตอนการสกัดที่แตกต่างกันออกไป ซึ่งจะส่งผลต่อการสลายตัวหรือการคงอยู่ของโปรตีนและบีเอ็มพีในกระดูก (Ishigeyama *et al*, 1995; Schwartz *et al*, 1996; Schwartz *et al*, 1998; AAP, 2001; Bae *et al*, 2006; Pietrzak *et al*, 2006) นอกจากนั้นปัจจัยในตัวผู้บริจาคในแต่ละศพนั้นยังมีความแตกต่างกัน เช่น อายุ (Jergessen *et al*, 1991; Schwartz *et al*, 1998; Honsawek and Dhitiseith, 2005) เป็นต้น ตลอดจนวิธีการวัดระดับบีเอ็มพีที่แตกต่างกันจึงทำให้ระดับของบีเอ็มพีที่ได้ในแต่ละการศึกษานั้นมีค่าที่แตกต่างกันออกไป

ข้อจำกัดที่สำคัญของการศึกษาในครั้งนี้คือ ผู้วิจัยไม่สามารถจำแนกอายุและเพศของผู้บริจาคกระดูกปลูกถ่ายเอกพันธุ์ชนิดทริปเปิลเอได้ เนื่องจากตัวอย่างทั้ง 48 ตัวอย่างที่นำมาศึกษาใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ครั้งนี้ได้มาจากศูนย์เนื้อเยื่อชีวภาพกรุงเทพฯ ในลักษณะที่เป็นกระดูกสำเร็จรูปที่ไม่ได้มีการจำแนกที่มาของกระดูกไว้ เพราะทางศูนย์เนื้อเยื่อชีวภาพกรุงเทพฯ ได้ดำเนินการผลิตกระดูกชนิดนี้เพียงปีละ 1 ครั้งเท่านั้นเนื่องจากมีจำนวนของผู้บริจาคร่างกายเพื่อการผลิตกระดูกปลูกถ่ายเอกพันธุ์น้อยมาก ดังนั้นทางศูนย์เนื้อเยื่อชีวภาพกรุงเทพฯ จึงต้องทำการรวบรวมกระดูกที่ผ่านการคัดกรองแล้วมารวมกันให้ได้มากเพียงพอก่อนที่จะทำการผลิตเป็นกระดูกปลูกถ่ายเอกพันธุ์ นอกจากนั้นในปีหนึ่งๆ ทางศูนย์เนื้อเยื่อชีวภาพกรุงเทพฯ สามารถผลิตกระดูกปลูกถ่ายเอกพันธุ์ชนิดทริปเปิลเอได้ประมาณ 100 ชิ้นเท่านั้น จึงเป็นการยากที่ทางผู้วิจัยจะเพิ่มจำนวนตัวอย่างที่นำมาศึกษาให้มากขึ้นได้ อย่างไรก็ตามยังควรที่จะมีการศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติของกระดูกปลูกถ่ายเอกพันธุ์ชนิดทริปเปิลเอต่อไป ไม่ว่าจะเป็นการศึกษาโปรตีนบีเอ็มพีหรือปัจจัยเพื่อการเจริญเติบโตชนิดอื่นๆ รวมทั้งศึกษาคุณสมบัติในการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ทั้งในห้องปฏิบัติการและสัตว์ทดลองก่อนที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในการปลูกกระดูกในทางปริทันต์ต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved