ชื่อวิทยานิพนธ์ เกล็ดเลือดเข้มข้นและการเหนี่ยวนำการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลสร้างกระดูกจากไขกระดูกของหนู

ผู้เขียน นางสาวเปรมจิต อาภรณ์แม่กลอง

สาขาวิชา ชีวเวชศาสตร์

ปีการศึกษา 2545

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ การศึกษานี้ (*ตอนที่ 1*) มีความประสงค์ที่จะชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไขกระดูกของหนูที่โตเต็มที่มาเป็นเซลสร้างกระดูก (osteoblasts) และ (*ตอนที่ 2*) ต้องการศึกษาอิทธิพลของเกล็ดเลือดเข้มข้น (Platelet-rich plasma) ต่อการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลสร้างกระดูกของเซลไขกระดูกของหนูที่มีอายุน้อย โดยเปรียบเทียบผลดังกล่าวกับผลการเหนี่ยวนำของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการชักนำให้เกิดการสร้างรูปร่าง-ชนิดที่สอง (Bone morphogenetic protein – 2) (บีเอ็มพี-2)

วิธีทดลอง *ตอนที่ 1* เซลล์ไขกระดูกของหนูที่มีอายุ 10 เดือน สายพันธ์ สปราค ดอลลี (Spraque Dawly rats)ได้ถูกเลี้ยงเป็นเวลา 21 วัน ในน้ำเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีความเหมาะสมต่อการสะสมของแร่ธาตุ (mineralized medium) ที่มีส่วนผสมของเด็กซะเมธาโซน (Dexamethasone) วิตามินดี 3 (1,α25 Dihydroxycholecalciferol) และ บีเอ็มพี-2 ถูกเติมลงในน้ำเลี้ยงเนื้อเยื่อตามกลุ่มที่แบ่งไว้ การแสดงออกของสารพันธุกรรม (mRNA) และการสร้างโปรตีนที่เป็นตัวบ่งชี้เฉพาะของการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลสร้างกระดูก เซลไขมัน (Adipocytes) และเซลสร้างกระดูกอ่อน (Chondroblasts) ได้รับการตรวจวัดเพื่อประเมินภาวะการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลต่างๆดังกล่าวของเซลไขกระดูก สำหรับในสัตว์ทดลอง ไขกระดูกและเซลไขกระดูกที่ได้ผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ถูกนำมาใส่ไว้บนตัวรองรับ (scaffold) ที่ทำมาจากคออลลาเจนของกระดูกวัว (Inert collagenous bovine bone matrix) (ไอซีบีเอ็ม; ICBM) แล้วนำไปฝังไว้ใต้ผิวหนังของหนูที่ไม่มีภูมิต้านทานเป็นเวลา 28 วัน คุณสมบัติการสร้างกระดูกของเซลเหล่านั้นได้รับการตรวจสอบโดยพิจารณาจากภาพถ่ายรังสีและชิ้นเนื้อภายใต้กล้องจุลทัศน์

ตอนที่ 2 เซลไขกระดูกของหนูที่มีอายุ 2-3 เดือนได้ถูกนำมาใส่ไว้บนตัวรองรับ ICBM แล้วทำการเพาะเลี้ยงไว้เป็นเวลา 21 วัน เกล็ดเลือดเข้มข้น (Platelet-rich plasma, PRP) (ที่มีจำนวนเกล็ดเลือดตั้งแต่ $1.6x10^7$-$2.5x10^8$ เกล็ด) เกล็ดเลือดเจือจาง (Platelet-poor plasma หรือ PPP) หรือ บีเอ็มพี-2 (300 ng/ml) ได้ถูกใส่ลงบนตัวรองรับแต่ละตัวตามกลุ่มที่จัดไว้ ตัวรองรับที่ไม่ได้มีการเติมสารใดๆลงไปถูกใช้เป็นตัวควบคุม การเจริญเติบโตของเซล ระดับของอัลคาไลด์ฟอสฟาเตส และปริมาณแคลเซียมที่สะสม ได้รับการตรวจวัดทุก 3 วัน สำหรับในสัตว์ทดลอง ไขกระดูกถูกนำมาผสมกับเกล็ดเลือดเข้มข้น เกล็ดเลือดเจือจาง เลือด หรือ 1 ไมโครกรัม บีเอ็มพี-2 แล้วนำมาฝังลงในกล้ามเนื้อต้นขาของหนูที่ปราศจากภูมิต้านทานเป็นเวลา 28 วัน ผลของการสร้างกระดูกใหม่จากกลุ่มต่างๆดังกล่าว ถูกนำมาเปรียบเทียบกับผลการเนี่ยวนำการสร้างกระดูกใหม่ของ บีเอ็มพี-2 ขนาด 10, 3 และ 1 ไมโครกรัม ที่อยู่บนโครงสร้างของ ตัวรองรับไอซีบีเอ็ม

ผลการทดลอง *ตอนที่ 1* ผลจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เซลไขกระดูกมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลสร้างกระดูกและเซลไขมัน การแสดงออกของสารพันธุกรรม ออสติโอคัลซิน (osteocalcin) ถูกตรวจพบเมื่อเซลไขกระดูกได้สัมผัสกับ บีเอ็มพี-2 หรือ วิตามินดี 3 อย่างต่อเนื่อง บีเอ็มพี-2 หรือ วิตามินดี 3 มีผลส่งเสริมการเกิดการตกตะกอน

ของแร่ธาตุในกลุ่มของเซลได้ (*in vitro* mineralization) ในหนูที่ไม่มีความต้านทาน เซลไขกระดูกที่ฝังลงไปมีการเปลี่ยนแปลงโดยตรงไปเป็นเซลสร้างกระดูก ในเวลา 45 วันหลังการฝังในกล้ามเนื้อ กระดูกที่สร้างขึ้นใหม่มีการจัดโครงสร้างที่เป็นระเบียบ และมีการสร้างไขกระดูกขึ้นในกระดูกที่ถูกสร้างขึ้นใหม่นี้

ตอนที่ 2 ผลจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ระดับของอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในแต่ละกลุ่มจะมีระดับสูงสุดในวันที่ 12 ของการเลี้ยงเนื้อเยื่อ บีเอ็มพี-2 มีระดับอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและปริมาณแคลเซียมสะสมสูงที่สุด ตามมาด้วย กลุ่มของ เกล็ดเลือดเจือจาง กลุ่มควบคุม และ กลุ่มเกล็ดเลือดเข้มข้น (จากกลุ่มที่มีจำนวนเกล็ดเลือดน้อยไปยังกลุ่มที่มีจำนวนเกล็ดเลือดสูง) ตามลำดับ ในหนูที่ไม่มีความต้านทานปริมาณของกระดูกที่สร้างใหม่ของกลุ่มบีเอ็มพี 10 ไมโครกรัม มีปริมาณของกระดูกที่สร้างใหม่มากที่สุด ตามมาด้วย กลุ่ม ของ ไขกระดูกที่มี 1 ไมโครกรัม บีเอ็มพี-2 บีเอ็มพี-2 3 ไมโครกรัม กลุ่มของไขกระดูกและเลือด กลุ่มของไขกระดูกและเกล็ดเลือดเจือจาง และ กลุ่มของไขกระดูกและเกล็ดเลือดเข้มข้น ตามลำดับ

สรุปผลการทดลอง *ตอนที่ 1* เซลไขกระดูกสามารถถูกเหนี่ยวนำให้มีการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลสร้างกระดูกและเซลไขมัน การสัมผัสอย่างต่อเนื่องของเซลไขกระดูกกับ บีเอ็มพี-2 หรือ วิตามินดี3 เป็นปัจจัยสำคัญในการเหนี่ยวนำให้เซลไขกระดูกจากหนูที่โตเต็มที่แล้วมีการเปลี่ยนแปลงไปสู่การเป็นเซลสร้างกระดูกที่โตเต็มที่ (mature osteoblasts) เซลไขกระดูกที่ได้ผ่านการเพาะเลี้ยงสร้างกระดูกภายในกล้ามเนื้อโดยไม่ผ่านการสร้างกระดูกอ่อน (intramembranous bone formation) เซลไขกระดูกที่ได้ผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีความสามารถในการสร้างกระดูกที่สูงกว่าไขกระดูกสดที่ไม่ได้ผ่านการเพาะเลี้ยงมาก่อน

ตอนที่ 2 เกล็ดเลือดเข้มข้น มีผลยับยั้งการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลสร้างกระดูกของเซลไขกระดูกในลักษณะที่มีความสัมพันธ์โดยตรงกับความเข้มข้นของเกล็ดเลือด

Thesis Title	Platelet-rich Plasma and Osteogenic Induction of Rat Bone Marrow
Author	Ms. Premjit Arpornmaeklong
Major Program	Biomedical Sciences
Academic Year	2002

Abstract (Part I)

Aims: The study aimed to induce osteogenic differentiation of bone marrow cells of fully mature rats (Part I) and investigate effects of platelet-rich plasma (PRP) in comparison to the effects of BMP-2, on osteoblastic differentiation of bone marrow cells of young rats (Part II).

Methods: Part I: *In vitro*, bone marrow of 10 month-old male Spraque-Dawley rats were cultivated for 21 days in a mineralized culture medium and 20 nM dexamethasone supplemented with 10 nM 1α,25 dihydrocholecalciferol (VD3) or 50 ng/ml recombinant human bone morphogenetic protein – two (rhBMP-2). Expressions of osteoblastic differentiation markers as well as markers of adipocyte and chondroblast differentiations were monitored. *In vivo*, fresh and differentiated bone marrow cells seeded on 3x5 mm of inert collagenous bovine bone matrix (ICBM) scaffolds were subcutaneously implanted in 12 nude mice. The rate and amount of new bone formation were evaluated from radiographs and histology of decalcified and non-decalcified specimens.

Part II: *In vitro*, differentiated bone marrow cells of 2-3 month-old rats seeded on 3x5 mm ICBM scaffolds were cultivated in a mineralized medium and 20 nM dexamethasone for 21 days. Platelet-rich plasma (PRP) (with numbers of platelets ranging from $2.5x10^8$ – $1.6x10^7$ platelets), platlet-poor plasma (PPP) or rhBMP-2 (300 ng/scaffold) was added on each scaffold. Scaffolds without any supplementation were kept as a control. Cell proliferation, ALP activity and calcium content were monitored every 3 days. *In vivo*, mixtures of fresh bone marrow and PRP ($2.5x10^8$ platelets), PPP, whole blood or 1 μg BMP-2 were seeded on 5x10 mm ICBM scaffolds. The scaffolds were intramuscularly implanted in nude mice for 28 days. The results were compared with the implanted groups of 10, 3 and 1 μg BMP-2 that were lyophilized on ICBM scaffolds.

Results: Part I: *In vitro*, bone marrow cells predominantly differentiated into immature pre-osteoblast and adipocytes. Expression of osteocalcin mRNA was only found when cells were continuously exposed to VD3 or BMP-2. VD3 or BMP-2 enhanced i*n vitro* mineralization. *In vivo*, most of the bone marrow differentiated directly into mature osteoblasts and laid down bone matrix. Differentiated bone marrow cells induced a higher rate and amount of new bone formation than fresh bone marrow cells. Mature woven bone trabeculae and bone marrow were seen at implantation-day 45.

Part II: *In vitro*, BMP-2 had the highest ALP activity and calcium content, followed by PPP, the control and PRP (from groups of small numbers to high numbers of platelets) groups, respectively. In vivo, the highest mineralization area was found in 10 μg BMP-2, followed by mineralization areas of bone marrow with 1 μg BMP-2, 3 μg BMP-2, bonemarrow with whole blood, bone marrow with PPP and bone marrow with PRP groups, respectively.

Conclusion: P art I: B one m arrow c ells c ultivated i n d examethasone d ifferentiated into osteoblasts and adipocytes. A continuous exposure to BMP-2 or VD3 is an essential factor promoting terminal osteoblastic differentiation of bone marrow cells in fully mature rats. Differentiated bone marrow cells induced intramembranous bone formation in the ectopic site and had higher osteogenic potential than fresh bone marrow.

Part II: The study reported effects of PRP during early bone formation stage, where PRP inhibited osteogenic differentiation but promoted proliferation of mesenchymal stem cells and pre-osteoblasts in a dose dependent manner.

Keywords: *bone marrow, osteogenic differentiation, terminal osteoblastic differentiation, osteoblast cell culture, osteogenic induction, platelet-rich plasma*