

นิพนธ์ต้นฉบับ

การปลูกถ่ายเซลล์กระดูกอ่อนของตัวเองและเย็บปิดด้วยเยื่อหุ้มกระดูกเพื่อ
รักษาการบาดเจ็บของกระดูกอ่อนผิวข้อในสุนัข

กรกฎ งานวงศ์พาณิชย์¹, ปฐมมา เข้าเชิด¹, ดำเนินสันต์ พุกษากร², กสิลิน กลั่นกลิ่น², กณวีร์ วาฤทธิ³,
พีรพรรณ โปธาเจริญ⁴, ปรัชญา คงทวีเลิศ⁴

¹ห้องปฏิบัติการวิจัยโรคกระดูกและข้อในสัตว์เลี้ยง สาขาวิชาฟิสิกคลินิกทางสัตวแพทย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

²ภาควิชาออร์โธปิดิกส์, คณะแพทยศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

³สาขาวิชาคลินิกสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

⁴ศูนย์วิจัยเพื่อความเป็นเลิศทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อแห่งประเทศไทย ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาผลการรักษาการบาดเจ็บของกระดูกอ่อนผิวข้อโดยการปลูกถ่ายเซลล์กระดูกอ่อนในสุนัข โดยใช้สุนัขทั้งหมด 10 ตัว อายุประมาณ 3-5 ปี แบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว กลุ่มที่ 1 รักษาการบาดเจ็บของกระดูกอ่อนผิวข้อโดยการปลูกถ่ายเซลล์กระดูกอ่อนของตัวเอง (T-group) กลุ่มที่ 2 รักษาโดยการเจาะทะลุกระดูกได้กระดูกอ่อน (D-group) ติดตามผลเป็นระยะเวลา 5 เดือน โดยพิจารณาจาก การประเมินอาการทางคลินิก การเปลี่ยนแปลงระดับสารบ่งชี้ทางชีวภาพ (คอนดรอยตินซัลเฟต อิพิโทป WF6 และ และไฮยาลูโรแนน ในซีรัม และลักษณะทางพยาธิวิทยาประกอบด้วย จุลพยาธิวิทยาและกายภาพของกระดูกอ่อน ผลการทดลองพบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในเรื่องของการประเมินอาการทางคลินิกระหว่างสุนัข 2 กลุ่ม เนื่องจากสุนัขสามารถเดินได้อย่างปกติภายใน ระยะเวลา 1 สัปดาห์ ระดับของสารบ่งชี้ทางชีวภาพทั้ง 2 ชนิดไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มทดลองทั้ง 2 ($p > 0.05$) ลักษณะทางกายภาพและจุลพยาธิวิทยาของกระดูกอ่อนผิวข้อใน T-group มีการซ่อมแซมที่สมบูรณ์กว่า D-group อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า การรักษาการบาดเจ็บของกระดูกอ่อนผิวข้อโดยใช้การปลูกถ่ายเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อของตัวเองและเย็บปิดด้วยเยื่อหุ้มกระดูกเป็นวิธีที่สามารถซ่อมแซมการบาดเจ็บของกระดูกอ่อนผิวข้อได้ดี และนับเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาการบาดเจ็บของกระดูกอ่อนผิวข้อในสุนัขและสามารถนำวิธีการนี้ไปประยุกต์ใช้ได้กับสัตว์ชนิดอื่น และผู้ป่วยมนุษย์เช่นกัน เชียงใหม่สัตวแพทยสาร 2552;7(1):19-30.

คำสำคัญ : การบาดเจ็บของกระดูกอ่อนผิวข้อ, การปลูกถ่ายเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อของตัวเอง, สุนัข

บทนำ

กระดูกอ่อนผิวข้อ เป็นกระดูกอ่อนที่หุ้มปลายกระดูก หลอดเลือด หลอดน้ำเหลือง และเส้นประสาทมาหล่อของข้อที่มีเยื่อหุ้มข้อ เป็นกระดูกอ่อนชนิดไฮยาลิน เลี้ยงประกอบกับการที่มีการจำกัดของกระบวนการ (hyaline cartilage)⁽¹⁾ กระดูกอ่อนไฮยาลินบริเวณผิวข้อไม่มี เมแทบอลิซึมของเซลล์กระดูกอ่อน ทำให้มีประสิทธิภาพ

ติดต่อขอสอบถามความได้ที่ : กรกฎ งานวงศ์พาณิชย์, สาขาวิชาฟิสิกคลินิกทางสัตวแพทย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง จ. เชียงใหม่ 50100; E-mail: korakot@chiangmai.ac.th
ได้รับบทความวันที่ 16 สิงหาคม 2551

ในการซ่อมแซมตัวเองต่ำ กรณีที่ได้รับบาดเจ็บเกิดบาดแผลเพียงเล็กน้อยเท่านั้นเซลล์กระดูกอ่อนจึงจะสามารถสังเคราะห์โปรตีนโอไกลแคนเพื่อซ่อมแซมการบาดเจ็บได้⁽²⁾ หากบาดแผลที่เกิดมีขนาดใหญ่หรือเกิดเป็นระยะเวลานานโดยไม่ได้ทำการรักษา ก็สามารถให้เกิดโรคข้อเสื่อมตามมาได้⁽³⁾

การบาดเจ็บของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนเกิดจากผลของการกระแทกซ้ำ ๆ อุบัติเหตุที่รุนแรง หรือ เกิดร่วมกับความเสื่อมของกระดูกอ่อนผิวข้อ โดยจะสามารถแบ่งความรุนแรงของการบาดเจ็บได้ดังนี้ ประเภทที่ 1 บริเวณที่ได้รับบาดเจ็บจำกัดอยู่เฉพาะที่บริเวณชั้นผิว (superficial zone) และชั้นกลาง (middle zone) เรียกว่า partial thickness defects ซึ่งบริเวณดังกล่าวไม่มีเลือดมาหล่อเลี้ยงและไม่สัมผัสถึงบริเวณไขกระดูก (marrow space) ประเภทที่ 2 บริเวณที่ได้รับบาดเจ็บตลอดความลึกของกระดูกอ่อน จนกระทั่งถึงชั้นใต้กระดูกอ่อน (subchondral bone) เรียก full thickness defects แต่บริเวณบาดแผลไม่ทะลุถึงไขกระดูก และประเภทที่ 3 บริเวณที่ได้รับบาดเจ็บตลอดความลึกของเนื้อกระดูกอ่อนและทะลุจนถึงไขกระดูก⁽²⁾ สำหรับในมนุษย์ การบาดเจ็บของกระดูกอ่อนผิวข้อเป็นเรื่องที่พบได้บ่อยในนักกีฬา⁽³⁾

ในปัจจุบัน มีหลายวิธีการที่ใช้ในการรักษาการบาดเจ็บ และบาดแผลของกระดูกอ่อนผิวข้อ เช่น abrasion chondroplasty, subchondral drilling เป็นต้น ซึ่งวิธีการเหล่านี้เป็นการกระตุ้นการหายของรอยบาดเจ็บโดยตัวกระดูกอ่อนเองซึ่งเนื้อเยื่อที่เกิดขึ้นจะเป็นเนื้อเยื่อ fibrocartilage⁽⁴⁾ ซึ่งขาดคุณสมบัติที่ช่วยในการปกป้องกระดูกใต้ชั้นกระดูกอ่อน⁽⁵⁾ โดยวิธีการปลูกถ่ายเซลล์กระดูกอ่อนให้ตัวเอง (autologous chondrocyte transplantation) นับเป็นวิธีที่ผลการรักษาอยู่ในเกณฑ์

ดีกว่าการรักษาด้วยวิธีอื่น ๆ ที่ทำการรักษาได้ในปัจจุบัน และเนื้อเยื่อใหม่ที่ทำการปลูกถ่ายนั้นเชื่อมกันในสภาพที่ดีกับเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนเดิม ความหนาของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่ทำการปลูกถ่ายก็มีความหนาใกล้เคียงเดิม เนื้อเยื่อดังกล่าวได้ทำการตัดเพื่อตรวจทางจุลกายวิภาคพบว่ามีส่วนประกอบของ กระดูกอ่อนไฮยาลินมาก และมีปริมาณของ fibrocartilage น้อย⁽⁶⁾

อย่างไรก็ตาม การศึกษาผลของการปลูกถ่ายเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อที่รายงานส่วนใหญ่เป็นการศึกษาทางคลินิกซึ่งขาดการออกแบบการทดลองที่รัดกุม ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการออกแบบการทดลองให้มีความรัดกุมโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการรักษาการบาดเจ็บของกระดูกอ่อนผิวข้อด้วยวิธีการปลูกถ่ายเซลล์กระดูกอ่อนในสุนัข โดยประเมินผลการรักษาจากอาการทางคลินิก การเปลี่ยนแปลงของสารบ่งชี้ทางชีวภาพ การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางมหกายวิภาคและจุลพยาธิวิทยา

อุปกรณ์และวิธีการ

สัตว์ทดลอง

การทดลองใช้สุนัขจำนวน 10 ตัว อายุ 2-3 ปี แบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว กลุ่มที่ 1 จะได้รับการรักษาบาดแผลด้วยการปลูกถ่ายเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อ (chondrocyte transplantation; T-group) และกลุ่มที่ 2 จะได้รับการรักษาบาดแผลด้วยวิธีการเจาะทะลุกระดูกใต้กระดูกอ่อน (subchondral bone drilling; D-group) **การเก็บเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อ (Articular cartilage harvest)**

วางยาสลบด้วย tiletamine/zolazepam (Zoletil[®]) จากนั้นทำการเปิดเข้าสู่ช่องข้อเข้าข้างขวา แล้วทำการเก็บกระดูกอ่อนผิวข้อขนาด 1 x 1 เซนติเมตร โดยไม่ให้ทะลุถึงชั้นกระดูกใต้กระดูกอ่อน ตรงตำแหน่งขอบของ

lateral trochea ที่เป็นบริเวณที่ไม่มีารรับน้ำหนัก จากนั้นเย็บปิดบาดแผลผ่าตัดทุกชั้น สุนัขจะได้รับยาปฏิชีวนะ(cephalaexine) ขนาด 30 มิลลิกรัม ต่อ กิโลกรัม และยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (vedaprofen, Intervet, Thailand) ขนาด 5 มิลลิกรัม ต่อ กิโลกรัม นานติดต่อกัน 7 วัน

การเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อในห้องปฏิบัติการ (In vitro chondrocyte culture)

ในสัปดาห์ที่ 4 สุนัขทั้ง 10 ตัวเข้ารับการผ่าตัด บริเวณข้อเข่าด้านขวาเพื่อเก็บกระดูกอ่อนผิวข้อบริเวณที่ไม่ได้ลงน้ำหนัก ส่งเข้าห้องปฏิบัติการสำหรับการเพาะเลี้ยงและเพิ่มจำนวนเซลล์กระดูกอ่อนเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกสภาพผิวข้อ

เซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อที่เก็บได้ถูกนำไปเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเพื่อแยกเอาเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อตามวิธีที่เคยปฏิบัติมา^(7,8) อธิบายอย่างย่อคือ ทำการย่อยกระดูกอ่อนผิวข้อด้วย 0.2% type II collagenase เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นจึงเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco, USA) ที่ประกอบด้วยยาปฏิชีวนะ 2 ชนิดคือ penicillin จำนวน 100 units/ml และ streptomycin จำนวน 100 units/ml จากนั้นจึงทำการย้ายเซลล์คอนโดไรต์ไปสู่ tissue culture flasks และเลี้ยงต่อด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F-12 ที่ผสม 10% heat inactivated fetal bovine serum (Gibco, USA) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้คาร์บอนไดออกไซด์ 5% จนได้เซลล์กระดูกอ่อนจำนวน 5×10^3 cells/cm².

การสร้างบาดแผลที่กระดูกอ่อนผิวข้อ (Articular cartilage defect)

ในสัปดาห์ที่ 8 นำสุนัข เข้ารับผ่าตัดอีกครั้งเพื่อสร้างบาดแผลที่กระดูกอ่อนผิวข้อแบบ full thickness defect ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.4 เซนติเมตร บริเวณ

median condyle ตรงตำแหน่งที่ใช้รับน้ำหนัก (weight bearing area) ของกระดูกต้นขาหลัง (femur) โดยบาดแผลที่สร้างไม่ทะลุชั้นกระดูกใต้กระดูกอ่อนในกลุ่มที่ 1 ทำการรักษาโดยวิธีปลูกถ่ายเซลล์กระดูกอ่อนของตัวเองและเย็บปิดด้วยเยื่อหุ้มกระดูก (T-group) ส่วนกลุ่มที่ 2 ทำการรักษาโดยวิธีเจาะเข้ากระดูกใต้ชั้นกระดูกอ่อน (D-group) ปล่อยสุนัขให้อาศัยในกรงเลี้ยง หลังจากผ่าตัดเสร็จ ดูผลหลังการผ่าตัดด้วยวิธีมาตรฐาน

การปลูกถ่ายเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อ (chondrocyte transplantation)

ทำการตัดเยื่อหุ้มกระดูกตรงตำแหน่งของ tibia creast ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร มาเย็บปิดบริเวณบาดแผลที่กระดูกอ่อนผิวข้อด้วยไหมเบอร์ 8-0 (monofilament polyamide, Ethilon[®], Ethicon) และเชื่อมขอบของรอยแผลด้วย fibrin glu (Fibingluraas[®], Shanghai RAAS Blood Products, Shanghai, China) คงเหลือช่องขอบของเยื่อหุ้มกระดูกไว้ สำหรับฉีดเซลล์กระดูกอ่อน หลังจากฉีดของเหลวที่มีส่วนประกอบของเซลล์กระดูกอ่อนแล้วทำการเชื่อมปิดขอบเยื่อหุ้มกระดูกที่เหลือด้วย fibrin glu

การเจาะทะลุกระดูกใต้กระดูกอ่อน (subchondral bone drilling)

ทำการรักษาบาดแผลด้วยวิธี subchondral bone drilling โดยใช้ hand drill เส้นผ่าศูนย์กลาง 1.2 มิลลิเมตร เจาะกระดูกตรงที่เป็นรอยแผลให้ทะลุเข้าไปถึงชั้นไขกระดูก (bone marrow) โดยทำการเจาะจำนวน 3 รู ต่อ บาดแผล 1 ตำแหน่ง

การเก็บข้อมูล

การประเมินอาการทางคลินิก

การประเมินอาการทางคลินิกและการวิเคราะห์ท่าเดินสุนัข⁽⁹⁾ โดยให้สัตวแพทย์ จำนวน 2 คน ทำการประเมิน

เพื่อลดความลำเอียงจากการศึกษาจึงทำการทดลองแบบ blind โดยสัตวแพทย์ที่ทำการประเมินจะไม่ทราบข้อมูลใดๆ ของสุนัขเลย สำหรับการให้คะแนนลักษณะท่าเดินของสุนัข โดยแบ่งเป็นการประเมิน อาการขาเจ็บ (lameness) อาการเจ็บเมื่อคลำตรวจ (pain on palpation) การใช้ขารับน้ำหนักร่างกาย (weight bearing) และการให้คะแนนโดยรวมของอาการทางคลินิก (overall score of clinical condition)

การตรวจระดับสารบ่งชี้ทางชีวภาพ

สุนัขทุกตัวจะได้รับการเจาะเลือดจำนวน 3 มิลลิลิตร เพื่อนำไปตรวจสารบ่งชี้ทางชีวภาพสองชนิดประกอบด้วย คอนดรอยตินซัลเฟต (chondroitin sulfate) อีพีโทป WF-6 (CS-WF6) และไฮยาลูโรแนน (hyaluronan; HA) ตั้งแต่สัปดาห์แรกจนถึงสัปดาห์สุดท้ายของระยะการวิจัย ELISA assay ที่หน่วยวิจัยที่มีความเป็นเลิศด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตามวิธีที่เคยศึกษามาก่อนแล้ว⁽¹⁰⁻¹⁴⁾

การประเมินลักษณะของผิวข้อ

เมื่อสิ้นสุดการศึกษา (5 เดือนหลังจากผ่าตัดเพื่อการรักษา) สุนัขจะเข้ารับการผ่าตัดอีกเพื่อทำการตัดชิ้นเนื้อกระดูกอ่อนบริเวณที่ปลูกถ่ายและบริเวณปกติเพื่อนำไปศึกษาทางจุลกายวิภาคในห้องปฏิบัติการต่อไป โดยทำการบันทึกลักษณะทางกายภาพของสภาพผิวข้อก่อนการตัดเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนไปตรวจทางห้องปฏิบัติการ การประเมินลักษณะของกระดูกอ่อนผิวข้อจะกระทำโดยสัตวแพทย์จำนวน 2 คนอ้างอิงเกณฑ์จาก Brittberg and Winalski, 2003⁽¹⁵⁾ โดยมีหัวข้อการประเมินคือ ปริมาณเนื้อเยื่อที่เติมเต็มบริเวณรอยแผล (degree of defect repair) การเชื่อมกันของเนื้อเยื่อที่ปลูกถ่ายกับเนื้อเยื่อปกติ (Integration of border zone) ลักษณะของเนื้อเยื่อบริเวณที่ปลูกถ่าย

โดยรวม (Macroscopic appearance) และ ระดับความรุนแรงของโรค (Degree)

การตรวจทางจุลกายวิภาคของกระดูกอ่อนผิวข้อ

นำชิ้นเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนบริเวณที่ทำการปลูกถ่ายและบริเวณกระดูกอ่อนปกติมาตรวจด้วยวิธีจุลกายวิภาคโดยแช่กระดูกอ่อนใน 10% buffered formalin 3 วัน ทำการ decalcified ตามด้วยการแช่ใน paraffin จากนั้นตัดด้วยความหนา 4 ไมครอน ย้อมด้วย haematoxylin and eosin และ safranin-O-fast green ประเมินคุณภาพของกระดูกอ่อนผิวข้อด้วยวิธี Modified histological grading scale for repair of articular cartilage defects ตาม Mainil-Varlet et al., 2003⁽¹⁶⁾ โดยใช้นักพยาธิวิทยาจำนวน 2 คนในการประเมิน โดยให้คะแนนตั้งแต่ 0 ถึง 23 ค่าเข้าใกล้ 0 แสดงว่ากระดูกอ่อนมีลักษณะใกล้เคียงกับปกติมาก ส่วนค่าที่เข้าใกล้ 23 มากแสดงว่ากระดูกอ่อนผิวข้อมีความสามารถในการซ่อมแซมน้อยมาก

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการทดลองที่ได้จากสุนัขทั้งสองกลุ่มประกอบด้วย คะแนนอาการทางคลินิก คะแนนของลักษณะทางมพยาธิวิทยาและจุลพยาธิวิทยา ระดับสารบ่งชี้ทางชีวภาพ จะนำมาวิเคราะห์ทางสถิติ ด้วย Kruskal Wallis test และ Wilcoxon Rank-sum test ที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.05$ โดยอาศัยโปรแกรม SPSS for Windows version 15.0

ผลการทดลอง

หลังจากได้รับการผ่าตัดเพื่อทำการปลูกถ่ายเซลล์กระดูกอ่อนเป็นระยะเวลา 5 เดือน จากการประเมินอาการทางคลินิกหลังการผ่าตัดและการวิเคราะห์ทางพยาธิวิทยาพบว่าใน 3 วันแรกหลังจากการผ่าตัดสุนัขทั้ง 2 กลุ่มมีความผิดปกติทางคลินิกอย่างชัดเจน ($p < 0.05$)

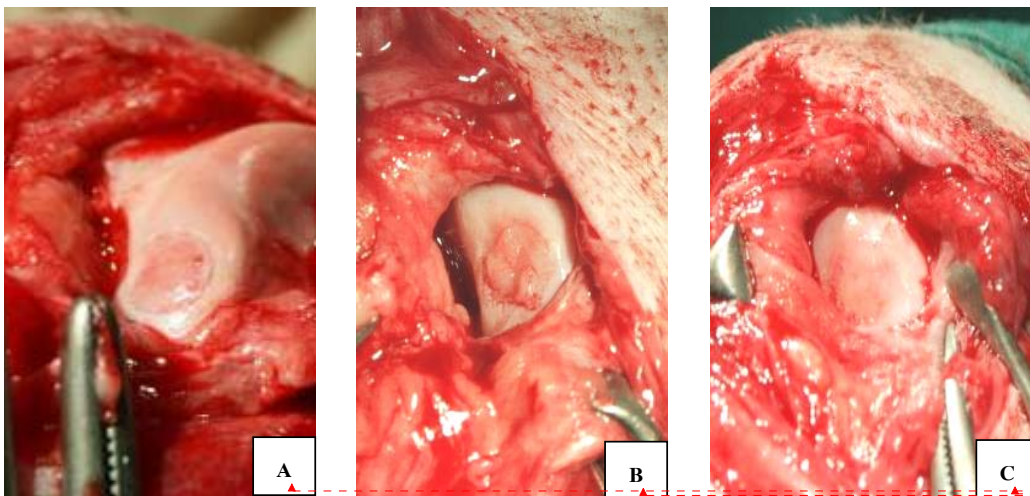
หลังจากนั้นไม่พบความผิดปกติทางคลินิก ดังนั้นจึงไม่นำมาเปรียบเทียบกับระหว่างสุนัข 2 กลุ่ม

ลักษณะทางมหกายวิภาคในกลุ่มที่รักษาโดยการปลูกถ่ายเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อในเรื่องสภาพผิวข้อบริเวณที่ทำการปลูกถ่ายมีการซ่อมแซมของเนื้อเยื่อที่

ดีกว่ากลุ่มที่รักษาโดยการเจาะเข้ากระดูกใต้ชั้นกระดูกอ่อน ดังแสดงในรูปที่ 1 เมื่อให้คะแนนลักษณะของผิวข้อ (ตารางที่ 1) พบว่า 4 ใน 5 หัวข้อ ของ D-group ดีกว่า T-group อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

ตารางที่ 1 คะแนนของลักษณะทางมหกายวิภาคของกระดูกอ่อนผิวข้อ

หัวข้อการประเมิน	T-group	D-group	p -value
ปริมาณเนื้อเยื่อที่เติมเต็มบริเวณรอยแผล	3.00±1.00	1.50±1.12	0.15
การเชื่อมกันของเนื้อเยื่อที่ปลูกถ่ายกับเนื้อเยื่อปกติ	3.00±1.22	0.00±0.00	0.01
ลักษณะของเซลล์กระดูกอ่อน	3.50±0.50	0.25±0.43	0.00
ลักษณะของเนื้อเยื่อบริเวณที่ปลูกถ่ายโดยรวม	3.50±2.29	1.75±0.83	0.01
ระดับความรุนแรงของโรค	2.00±0.71	3.50±0.50	0.05



รูปที่ 1 แสดงลักษณะทางมหกายวิภาคของกระดูกอ่อนผิวข้อในสุนัข ลักษณะของบาดแผลที่กระดูกอ่อนผิวข้อ (A) ผลจากการรักษาโดยการเจาะเข้ากระดูก (B) และผลการรักษาโดยการปลูกถ่ายเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อ (C)

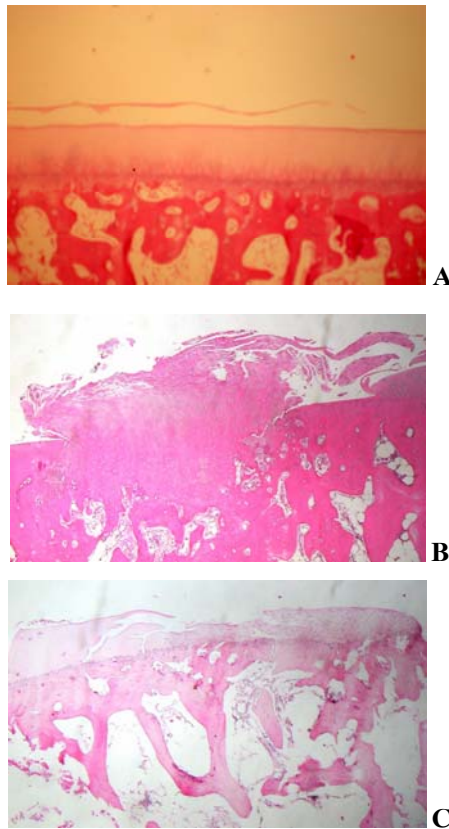
จัดรูปแบบ: แบบอักษร: Angsana New, ตัวหนา, แบบอักษรภาษาไทยและภาษาอื่นๆ: ตัวหนา

จัดรูปแบบ: แบบอักษร: Angsana New, ตัวหนา, แบบอักษรภาษาไทยและภาษาอื่นๆ: ตัวหนา

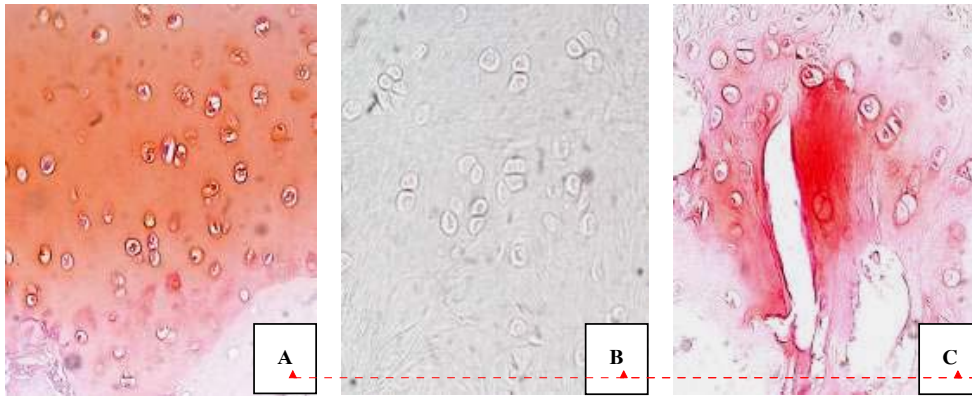
จัดรูปแบบ: แบบอักษร: Angsana New, ตัวหนา, แบบอักษรภาษาไทยและภาษาอื่นๆ: ตัวหนา

ลักษณะทางจุลกายวิภาค (รูปที่ 2) พบว่าใน D-group มีลักษณะของ fibrocartilage เจริญตรงตำแหน่งที่ทำการเจาะทะลุชั้นกระดูกใต้กระดูกอ่อน โดยกระดูกใหม่ที่เจริญขึ้นมาจะไม่เรียบประสานเป็นเนื้อเดียวกับกระดูกอ่อนปกติที่อยู่รอบแผล แต่ใน T-group พบว่ากระดูกอ่อนที่เจริญใหม่เป็นกระดูกอ่อนชนิด hyaline cartilage และพบว่าเนื้อกระดูกใหม่ที่เจริญขึ้นมาประสานกับเนื้อกระดูกเดิมและเรียบเสมอกัน จากผลการย้อมโดย Safranin-O (รูปที่ 3) จะสังเกตได้ว่ามี

การติดสี Safranin-O ในกลุ่มที่ทำการรักษาโดยวิธีปลูกถ่ายเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อ ในขณะที่กลุ่มที่ทำการรักษาโดยวิธีเจาะเข้ากระดูกนั้นไม่มีการติดสี Safranin-O เมื่อพิจารณาผลการให้คะแนน Modified histological grading scale for repair of articular cartilage defects พบว่า T-group มีคะแนนเท่ากับ 6.25 ± 1.26 แตกต่างกับ D-group ซึ่งมีค่าเท่ากับ 13.50 ± 2.38 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$)



รูปที่ 2 แสดงลักษณะทางจุลกายวิภาคของกระดูกอ่อนผิวข้อสุนัขปกติ (A) กระดูกอ่อนผิวข้อที่รักษาโดยการเจาะเข้ากระดูก (B) และกระดูกอ่อนผิวข้อที่รักษาโดยการปลูกถ่ายเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อ (C) (กำลังขยาย 40 เท่า ย้อมด้วยสี hematoxylin and eosin)



รูปที่ 3 แสดงลักษณะทางจุลกายวิภาคของกระดูกอ่อนผิวข้อสุนัขในภาวะปกติ (A) รักษาโดยการเจาะเข้ากระดูก (B) และสุนัขที่รักษาโดยการปลูกถ่ายเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อ (C) (กำลังขยาย 100 เท่า ย้อมด้วยสี safranin-O)

จัดรูปแบบ: แบบอักษร: Angsana New, ตัวหนา, แบบอักษรภาษาไทยและภาษาอื่นๆ: ตัวหนา

จัดรูปแบบ: แบบอักษร: Angsana New, ตัวหนา, แบบอักษรภาษาไทยและภาษาอื่นๆ: ตัวหนา

จัดรูปแบบ: แบบอักษร: Angsana New, ตัวหนา, แบบอักษรภาษาไทยและภาษาอื่นๆ: ตัวหนา

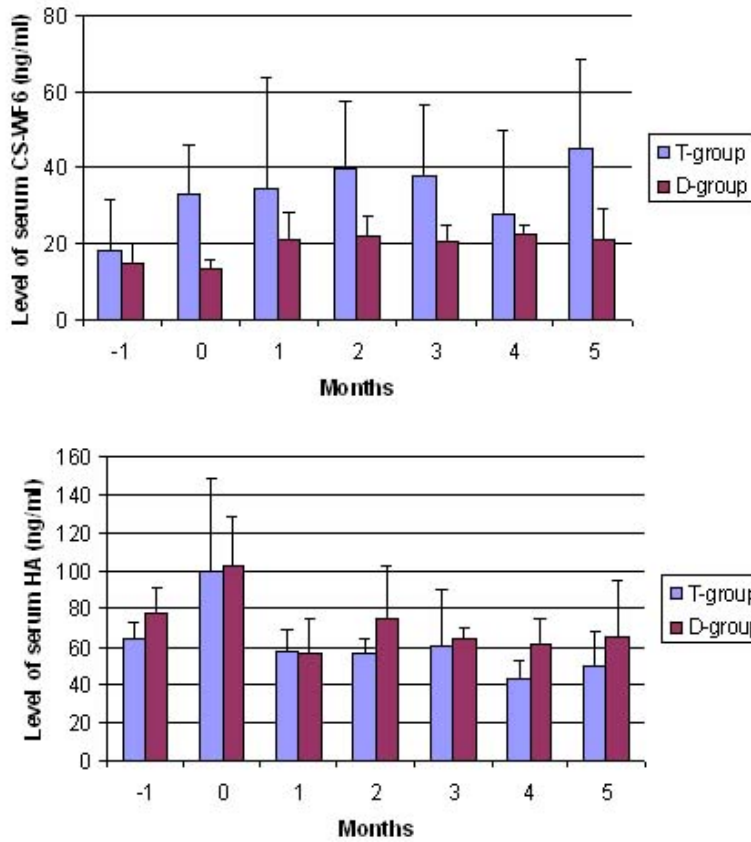
เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของระดับสารบ่งชี้ทางชีวภาพชนิด CS-WF6 และ HA ระหว่างระยะก่อนการเก็บเซลล์มาเพาะเลี้ยง ระยะหลังการเก็บเซลล์มาเพาะเลี้ยง และระยะหลังการผ่าตัดเพื่อรักษา ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) ของระดับสารบ่งชี้ทางชีวภาพทั้ง 2 ชนิดทั้งในกลุ่มเดียวกัน และระหว่าง

กลุ่ม (ตารางที่ 2) สำหรับการเปลี่ยนแปลงของสารบ่งชี้ทางชีวภาพในแต่ละเดือนหลังการผ่าตัดเปรียบเทียบกับช่วงก่อนการผ่าตัดแสดงในรูปที่ 5 โดยไม่พบความแตกต่างทางสถิติของระดับ CS-WF6 และ HA ระหว่างกลุ่มทดลอง ($p > 0.05$)

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของสารบ่งชี้ทางชีวภาพ (ng/ml) ในระยะก่อนการเก็บเซลล์มาเพาะเลี้ยง ระยะหลังการเก็บเซลล์มาเพาะเลี้ยง และระยะหลังการผ่าตัดเพื่อรักษา

กลุ่มทดลอง	สารบ่งชี้	ระยะ		
		1	2	3
CS-WF6	T-group	18.26±13.38	33.24±12.90	36.98±20.94
	D-group	15.08±4.95	13.05±2.48	21.30±5.40
HA	T-group	63.65±9.52	99.93±48.25	54.13±18.66
	D-group	77.65±13.77	103.38±24.95	64.46±19.58

ระยะที่ 1=ก่อนการเก็บเซลล์มาเพาะเลี้ยง ระยะที่ 2=หลังการเก็บเซลล์มาเพาะเลี้ยง ระยะที่ 3=หลังการผ่าตัดเพื่อรักษา



รูปที่ 4 เปรียบเทียบระดับของคอนครอยตินซัลเฟต (CS-WF6) และ ไฮยาลูโรแนน (HA) ก่อนการผ่าตัดเก็บเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อ (-1) ก่อน (0) และหลัง (1-5) การผ่าตัดปลูกเซลล์หรือเจาะไขกระดูก การผ่าตัด เมื่อ T-group และ D-group คือ ศูนย์กลุ่มที่รักษาโดยการปลูกถ่ายเซลล์กระดูกอ่อนและเจาะไขกระดูกได้ขึ้นกระดูกอ่อนตามลำดับ

วิจารณ์

ปัญหาที่สำคัญของการบาดเจ็บที่กระดูกอ่อนผิวข้อ คือ ไม่เกิดกระบวนการหายเหมือนกับเนื้อเยื่ออื่นๆ ในร่างกาย และการคงอยู่ของบาดแผลนี้เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคข้อเสื่อม การศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นว่าการรักษาบาดแผลชนิด full thickness ของกระดูกอ่อนผิวข้อในสุนัขด้วยวิธีการปลูกเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อนั้น ให้ผลดีกว่าวิธีการเจาะทะลุไขกระดูก

เมื่อพิจารณาลักษณะทางกายวิภาคของกระดูกอ่อนผิวข้อที่รักษา พบว่า ศูนย์กลุ่มที่ทำการรักษาโดยวิธีเจาะไขกระดูกนั้นมี การซ่อมแซมของผิวกระดูกอ่อนโดยรวม แย่กว่ากลุ่มที่ทำการรักษาโดยวิธีปลูกเซลล์กระดูกอ่อน พบปริมาณเนื้อเยื่อที่เจริญขึ้นมาใหม่ไม่ครอบคลุมบริเวณบาดแผลทั้งหมด โดยเนื้อเยื่อกระดูกใหม่ที่เจริญขึ้นมาไม่มีการเชื่อมกับขอบของบาดแผล ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับการปลูกเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อนั้น

มีเนื้อกระดูกอ่อนใหม่เจริญเต็มรอยบาดแผล โดยมีการเชื่อมกันระหว่างกระดูกใหม่ที่สร้างขึ้นเข้ากับขอบของแผลเดิม ซึ่งจากการประเมินคะแนนโดยรวมพบว่า ในกลุ่มที่รักษาโดยการเจาะเข้ากระดูก มีคะแนนของกระดูกอ่อนที่ซ่อมแซมได้ เป็น ระดับ 3 และ 4 ในขณะที่กลุ่มที่รักษาด้วยการปลูกเซลล์กระดูกอ่อนนั้นพบว่ากระดูกอ่อนที่ซ่อมแซมได้ เป็น ระดับ 3 (ระดับ 1 หมายถึง ปกติ ระดับ 2 หมายถึง ใกล้เคียงกับปกติ ระดับ 3 หมายถึงไม่ปกติ และระดับ 4 หมายถึง ผิดปกติอย่างรุนแรง)

ผลทางจุลกายวิภาคพบว่า ลักษณะเนื้อเยื่อที่ซ่อมแซมได้จากวิธีการเจาะเข้าไขกระดูกนั้น ลักษณะของผิวหน้าขรุขระ ไม่เรียบ เมื่อตรวจด้วยการย้อม H&E พบว่า ลักษณะเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่ซ่อมแซมได้นั้นเป็นชนิด fibrocartilage ในขณะที่กลุ่มที่รักษาโดยวิธีการปลูกถ่ายเซลล์กระดูกอ่อนนั้นมีการซ่อมแซมโดยลักษณะเนื้อเยื่อที่ซ่อมแซมได้นั้น มีลักษณะเนียนเรียบคล้ายกับผิวกระดูกอ่อนปกติมาก และพบว่าลักษณะเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่ซ่อมแซมได้นั้นเป็นกระดูกอ่อนชนิด hyaline สอดคล้องกับรายงานของ Chang et al., 2005⁽¹⁷⁾ และ Redman et al., 2005⁽¹⁸⁾ และเมื่อตรวจเพื่อเติมโดยการย้อม Safranin-O ซึ่งเป็น special stain ที่มีคุณสมบัติจับกับ polyanions ที่อยู่บน chondroitin 6-sulphate หรือ keratin sulphate ซึ่งเป็นโปรตีนไกลัยแคนที่พบได้ในเนื้อกระดูกอ่อนของกระดูกอ่อนชนิด hyaline โดยลักษณะการติดสีนั้นจะเป็นสีแดงสด โดยผลที่ได้จากการย้อมนั้นพบว่า สุนัขที่ทำการรักษาโดยวิธีเจาะเข้ากระดูกนั้นไม่มีการติดสีแดงของ Safranin-O เลย บ่งบอกถึงว่าไม่มีการสร้างกระดูกอ่อนชนิด hyaline และเมื่อทำการตรวจในสุนัขที่ทำการรักษาโดยวิธีการปลูกถ่ายเซลล์กระดูกอ่อนพบว่า มีการ

ติดสีแดงของ Safranin-O แต่สีจางกว่าและการกระจายของสีไม่สม่ำเสมอเหมือนในกระดูกอ่อนปกติ ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีการสร้างกระดูกอ่อนชนิด hyaline แต่ปริมาณยังอาจไม่มากเท่ากับกระดูกอ่อนปกติ เมื่อพิจารณาจากคะแนนผลการประเมินลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาพบว่า กลุ่มที่ทำการรักษาโดยวิธีเจาะเข้ากระดูกมีคะแนนสูงกว่า กลุ่มปลูกถ่ายเซลล์กระดูกอ่อนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.0134$) โดยคะแนนที่สูงนั้นบ่งบอกถึงการซ่อมแซมกระดูกอ่อนที่ไม่ดี แสดงให้เห็นว่า กลุ่ม ที่ทำการรักษาโดยการปลูกถ่ายเซลล์กระดูกอ่อนมีการซ่อมแซมกระดูกอ่อนที่ดีกว่า อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับการศึกษาของ Brittberg และคณะ (1994)⁽¹⁹⁾ ได้รายงานผลการรักษาบาดแผลที่กระดูกอ่อนชนิด full thickness defect ในมนุษย์ด้วยวิธี autologous chondrocyte transplantation จำนวน 23 คน ในช่วงอายุ 14-48 ปี โดยมีขนาดบาดแผลประมาณ 1.6-6.5 cm² แล้วทำการติดตามผลการรักษาช่วงเวลา 16-66 ปี พบว่าส่วนใหญ่ได้ผลทางคลินิกอยู่ในเกณฑ์ดีมากถึงดี ผู้ป่วยส่วนหนึ่งได้ทำการตรวจซ้ำด้วย arthroscopy และ histomorphometry พบว่าได้เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนเป็นเนื้อเยื่อชนิด hyaline cartilage เหมือนในผิวข้อชนิดปกติ

ในการศึกษานี้ถือได้ว่าเป็นการศึกษาแรกที่น่าเอาการเปลี่ยนแปลงของระดับสารบ่งชี้ทางชีวภาพ 2 ชนิดคือ CS-WF6 และ HA มาใช้ช่วยในการประเมินผลของการปลูกถ่ายเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อ โดยในการศึกษาก่อนหน้านี้ได้แสดงให้เห็นว่า การเปลี่ยนแปลงของ CS-WF6 ในซีรัมเหมาะสมสำหรับใช้เป็นสารบ่งชี้ทางชีวภาพ ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของกระดูกอ่อนผิวข้อในสุนัขได้เป็นอย่างดี^(1, 10-12,14,20) สำหรับ HA ซึ่งปกติแล้วจะพบสูงขึ้นในซีรัมก็ต่อเมื่อมีการสลายของกระดูกอ่อนที่

เพิ่มขึ้น หรือมีการอักเสบของน้ำไขข้อ^(1,13,14,20,21) จากผลการศึกษาพบว่า ระดับ CS-WF6 ช่วงหลังผ่าตัดทั้ง 2 กลุ่มสูงกว่าก่อนผ่าตัด แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ส่วนระดับของ HA ในซีรัมหลังผ่าตัดพบว่า ต่ำกว่าก่อนผ่าตัด ในทั้ง 2 กลุ่ม แม้ว่าไม่แตกต่างทางสถิติ เช่นเดียวกัน เมื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของสารบ่งชี้ทางชีวภาพทั้ง 2 ชนิดระหว่าง 2 กลุ่มทดลองในช่วงเวลาเดียวกัน ก็ไม่พบความแตกต่างทางสถิติของระดับสารบ่งชี้ทางชีวภาพทั้ง 2 ชนิด การที่ไม่พบความแตกต่างของสารบ่งชี้ทางชีวภาพระหว่างกลุ่มที่รักษาด้วยการปลูกถ่ายเซลล์กระดูกอ่อน และรักษาโดยการเจาะเข้ากระดูกนั้นอาจเนื่องมาจากบาดแผลที่เกิดมีขนาดค่อนข้างเล็ก (เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5 มิลลิเมตร) รวมทั้งระยะเวลาที่ใช้ในการศึกษาสั้นเกินไป (5 เดือน) จึงไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของระดับสารบ่งชี้ทางชีวภาพอย่างชัดเจน เชื่อว่าจะสามารถพบความแตกต่างได้หากระยะเวลาในการศึกษานานกว่า 5 เดือน ซึ่งกระดูกอ่อนผิวข้อบริเวณนั้นเกิดการเปลี่ยนแปลง

จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า การรักษาการบาดเจ็บของกระดูกอ่อนผิวข้อโดยใช้การปลูกถ่ายเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อของตนเองและเย็บปิดด้วยเยื่อหุ้มกระดูกเป็นวิธีการรักษาการบาดเจ็บของกระดูกอ่อนผิวข้อได้ดีกว่าวิธีการรักษาแบบเดิมคือการเจาะเข้าไขกระดูก ซึ่งการสร้างกระดูกอ่อนขึ้นมาใหม่จะมีความสมบูรณ์ใกล้เคียงกับภาวะปกติมากกว่า นับได้ว่าเทคนิคนี้เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สำคัญในการใช้รักษาการบาดเจ็บของกระดูกอ่อนผิวข้อในสุนัขและสามารถนำวิธีการนี้ไปประยุกต์ใช้ต่อไปได้ในผู้ป่วยมนุษย์

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ กองทุนพัฒนา คณะแพทยศาสตร์-ส่วนที่ 1 (ส่วนส่งเสริมงานวิจัย) คณะ

แพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, ห้องปฏิบัติการวิจัยโรคกระดูกและข้อในสัตว์เลี้ยง คณะสัตวแพทยศาสตร์ และ ศูนย์วิจัยที่มีความเป็นเลิศด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ คณะแพทยศาสตร์ ที่สนับสนุนอุปกรณ์และงบประมาณในการวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ และนักศึกษาทุกท่านที่มีส่วนช่วยให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี อื่นๆ โครงการวิจัยนี้ได้รับความเห็นชอบจาก คณะกรรมการจริยภาพบรรณสัตว์ทดลอง คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เลขที่ ศบ 0515(26).14/013 ลงวันที่ 21 มีนาคม 2550

เอกสารอ้างอิง

1. กรกฎ งานวงศ์พานิชย์. โรคข้อเสื่อมในสุนัข. กรุงเทพฯ :สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2551
2. Buckwalter JA. Articular cartilage injuries. Clin Orthop Relat Res 2002; 402: 21-37.
3. Curl WW, Krome J, Gordon ES, Rushing J, Smith BP, Poehling GG. Cartilage injuries: a review of 31,516 knee arthroscopies. Arthroscopy 1997; 13(4):456-60.
4. O'Driscoll SW. The healing and regeneration of articular cartilage. J Bone Joint Surg Am 1998; 80: 1795-812.
5. Nehrer S, Spector M, Minas T. Histologic analysis of tissue after failed cartilage repair procedures. Clin Orthop Relat Res 1999; 365: 149-62.
6. Bentley G, Biant LC, Carrington RW, Akmal M, Goldberg A, Williams AM, et al. A prospective, randomised comparison of autologous chondrocyte implantation versus mosaicplasty for osteochondral defects in the knee. J Bone Joint Surg Br 2003; 85(2): 223-30.
7. Tew SR, Li Y, Pothacharoen P, Tweats LM, Hawkins RE, Hardingham TE. Retroviral transduction with SOX9 enhances re-expression of the chondrocyte phenotype in passaged osteoarthritic human articular chondrocytes. Osteoarthritis Cartilage 2005 Jan; 13(1):80-9.

8. Tew SR, Pothacharoen P, Katopodi T, Hardingham TE. SOX9 transduction increases chondroitin sulphate synthesis in cultured human articular chondrocytes without altering glycosyltransferase and sulfotransferase transcription. *Biochem J.* 2008; 414(2):231-6.
9. McCarthy G, O'Donovan J, Jones B, McAllister H, Seed M, Mooney C. Randomised double-blind, positive-controlled trial to assess the efficacy of glucosamine/chondroitin sulfate for the treatment of dogs with osteoarthritis. *Vet J* 2007; 174: 54-61.
10. กรกฎ งานวงศ์พาณิชย์, นิยดา สุวรรณรงค์, สุปรานี จิตรเพียร, ศิริวรรณ องค์ไชย. ผลของโคโตซานพอลิซัลเฟต ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับคอนดรอยตินซัลเฟตในซีรัมสุนัขที่ถูกตัดเอ็นไขว้หน้า. *วารสารสัตวแพทย์ผู้ประกอบการบำบัดโรคสัตว์*. 2548; 17(3):27-39.
11. กรกฎ งานวงศ์พาณิชย์, ศิริวรรณ องค์ไชย. การเปลี่ยนแปลงระดับคอนดรอยตินซัลเฟตในซีรัมสุนัขที่ถูกเหนียวหน้าให้เกิดโรคข้อต่อเสื่อมโดยการตัดเอ็นไขว้หน้า. *วารสารสัตวแพทย์ มข.* 2547; 14(1): 94-103.
12. กรกฎ งานวงศ์พาณิชย์, อัครนิตย์ อธิธิอาภา, ปรัชญา คงทวีเลิศ, ศิริวรรณ องค์ไชย. การศึกษาเปรียบเทียบระดับคอนดรอยตินซัลเฟตชนิด WF6 และ 3B3 ในซีรัมสุนัขที่พบและไม่พบรอยโรคข้อสะโพกเจริญผิดปกติ. *สัตวแพทยสาร.* 2548; 56(3):1-12.
13. กรกฎ งานวงศ์พาณิชย์, อัครนิตย์ อธิธิอาภา, ปรัชญา คงทวีเลิศ, ศิริวรรณ องค์ไชย. การประเมินโรคข้อสะโพกเจริญผิดปกติในสุนัขด้วยระดับไฮยาลูโรแนนในซีรัม. *วารสารสัตวแพทย์ผู้ประกอบการบำบัดโรคสัตว์*. 2548; 17(4):65-76.
14. Nganvongpanit K, Itthiarbha A, Ong-Chai S, Kongtawelert P. Evaluation of serum chondroitin sulfate and hyaluronan: biomarkers for osteoarthritis in canine hip dysplasia. *J Vet Sci* 2008; 9(3): 317-25.
15. Brittberg M, Winalski CS. Evaluation of cartilage injuries and repair. *J Bone Joint Surg Am* 2003; 85:58-69.
16. Mainil-Varlet P, Aigner T, Brittberg M, Bullough P, Hollander A, Hunziker E, et al. International Cartilage Repair Society. Histological assessment of cartilage repair: a report by the Histology Endpoint Committee of the International Cartilage Repair Society (ICRS). *J Bone Joint Surg Am* 2003; 85-A Suppl 2 : 45-57.
17. Chang CH, Lin FH, Kuo TF, Liu HC. Cartilage tissue engineering. *Biomed Eng Appl Basis Comm* 2005; 17(april): 1-11.
18. Redman SN, Oldfield SF, Archer CW. Current strategies for articular cartilage repair. *European Cells and Materials* 2005; 9:23-32.
19. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 1994; 331(14):889-95.
20. กรกฎ งานวงศ์พาณิชย์, ศิริวรรณ องค์ไชย. การวินิจฉัยโรคข้อเสื่อมในสุนัขโดยอาศัยสารบ่งชี้ทางชีวภาพ. *เชียงใหม่สัตวแพทยสาร* 2547; 2(1): 39-49
21. Nishida Y, D'Souza AL, Thonar EJ, Knudson W. Stimulation of hyaluronan metabolism by interleukin-1alpha in human articular cartilage. *Arthritis Rheum* 2000; 13(6) : 1315-26.