

1-1-2012

The efficacy of dermal extracted – bone powder scaffold on the healing of rat 's calvarial bone defects

A Hanworawong

T. Bunaprasert

Follow this and additional works at: <https://digital.car.chula.ac.th/clmjournal>



Part of the [Medicine and Health Sciences Commons](#)

Recommended Citation

Hanworawong, A and Bunaprasert, T. (2012) "The efficacy of dermal extracted – bone powder scaffold on the healing of rat 's calvarial bone defects," *Chulalongkorn Medical Journal*: Vol. 56: Iss. 1, Article 9. Available at: <https://digital.car.chula.ac.th/clmjournal/vol56/iss1/9>

This Modern Medicine is brought to you for free and open access by the Chulalongkorn Journal Online (CUJO) at Chula Digital Collections. It has been accepted for inclusion in Chulalongkorn Medical Journal by an authorized editor of Chula Digital Collections. For more information, please contact ChulaDC@car.chula.ac.th.

ประสิทธิภาพของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากสารสกัดผิวหนัง ผสมผงกระดูก ในการหายของแผลกะโหลกหนู

อดิศร หาญวรวงศ์*

ณนอม บรรณประเสริฐ**

Hanworawong A, Bunaprasert T. The efficacy of dermal extracted – bone powder scaffold on the healing of rat 's calvarial bone defects. Chula Med J 2012 Jan - Feb; 56(1): 87 - 100

- Background** : *The bone substitute materials are expensive and imported.*
- Objective** : *This study aimed to study the properties of the human dermal-extracted solution mixed with bone powder shaped into scaffold on the healing of rat's calvarial bone defects which are determined by radiopaque area in computed tomography (CT scan) and new bone formation in histological study.*
- Design** : *Experimental study.*
- Materials and Methods** : *Dermal-extracted solution, dermal-extracted solution mixed with bone powder, bovine collagen type I, and bovine collagen type I mixed with bone powder were structured into scaffolds and embedded into 24 female rats, aged between 12 - 14 weeks, Wistar rats' calvarial bone defects. The rats were divided into 6 groups according to the tested material which were dermal-extracted solution, dermal-extracted solution mixed with bone powder, bovine collagen type I, bovine collagen type I mixed with bone powder commercial collagen product (CollaPlug®) and sham group. The rats were sacrificed 12 weeks after embedded. The calvarial bone defects were cut and examined with CT scan and histological study.*

* นิสิตปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

** ภาควิชาสัตวบาล นาสิก ลาริงซ์วิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- Setting** : *Faculty of Medicine, Chulalongkorn University.*
- Results** : *CT scans showed no statistical differences in both periphery and center of bone defects between dermal-extracted solution and dermal-extracted solution with bone powder (peripheral $p = 0.429$, central $p = 0.143$.) However, from histological study, the bone formation of dermal-extracted solution group was significantly more than the other groups except the dermal-extracted solution mixed with bone powder. The bone formation of dermal-extracted solution group was not statistically different from the dermal-extracted solution mixed with bone powder group. No complete bone bridge was found in any defects.*
- Conclusion** : *Scaffolds from dermal-extracted solution and Dermal-extracted solution mixed with bone powder both have osteoinductive property. However, bone powder did not improve the property of scaffolds.*
- Keywords** : *Bone scaffolds, dermal-extracted solution , new bone formation.*

Reprint request: Bunaprasert T. Department of Otolaryngology, Faculty of Medicine,
Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

Received for publication. March 10, 2011.

อดิศร หาญรวงศ์, ถนอม บรรณประเสริฐ. ประสิทธิภาพของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากสารสกัดผิวหนังผสมผงกระดูก ในการหายของแผลกะโหลกหน. *จุฬาลงกรณ์เวชสาร* 2555 ม.ค. -ก.พ.; 56(1): 87 - 100

- เหตุผลของการทำวิจัย** : ในปัจจุบันวัสดุแทนกระดูกส่วนใหญ่มีราคาแพงและไม่สามารถผลิตได้เองในประเทศ
- วัตถุประสงค์** : ศึกษาถึงประสิทธิภาพของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากสารสกัดผิวหนังผสมผงกระดูก ซึ่งเป็นวัสดุโพลิเมอร์ธรรมชาติในการหายของแผลกะโหลกหน โดยประเมินผลประสิทธิภาพของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ด้วยภาพถ่ายเอ็กซเรย์คอมพิวเตอร์โดยดูจากบริเวณที่บวม และการเกิดเนื้อเยื่อกระดูกใหม่จากภาพ ทางจุลกายวิภาคศาสตร์
- รูปแบบการวิจัย** : การศึกษาทดลอง
- วัสดุและวิธีการ** : นำสารสกัดจากผิวหนัง สารสกัดจากผิวหนังผสมผงกระดูก คอลลาเจนชนิดที่ 1 จากวัว คอลลาเจนชนิดที่ 1 จากวัวผสมผงกระดูกมาขึ้นรูปแล้วนำไปฝังในแผลขนาด 5 มิลลิเมตรที่กะโหลกศีรษะของหนูวิสตาร์เพศเมีย อายุ 12 -14 สัปดาห์ จำนวน 24 ตัว โดยแบ่งเป็น 6 กลุ่ม กลุ่มละ 4 ตัว คือ กลุ่มจากสารสกัดจากผิวหนัง สารสกัดจากผิวหนังผสมผงกระดูก คอลลาเจนชนิดที่ 1 จากวัว คอลลาเจนชนิดที่ 1 จากวัวผสมผงกระดูก และผลิตภัณฑ์คอลลาเจนที่ขายในท้องตลาด (CollaPlug[®]) และกลุ่มสุดท้ายปล่อยให้เกิดการหายของแผลตามธรรมชาติ 12 สัปดาห์หลังจากการฝังชิ้นงาน หนูทั้งหมดถูกนำมาทำการุณฆาต แล้วตัดกะโหลกศีรษะมาเปรียบเทียบการหายของแผลกระดูกทางภาพรังสีด้วยเครื่องเอ็กซเรย์คอมพิวเตอร์ และตรวจเนื้อเยื่อทางจุลกายวิภาคศาสตร์ด้วยการย้อม H&E เพื่อตรวจหาการเกิดเนื้อเยื่อกระดูกใหม่
- สถานที่ทำการศึกษา** : อาคาร อปร. คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- ผลการศึกษา** : เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของความทึบแสงที่บริเวณกะโหลกศีรษะหนูกจากภาพรังสีทั้งที่บริเวณขอบแผลและกลางแผลของกลุ่มสารสกัดจากผิวหนังและกลุ่มสารสกัดจากผิวหนังที่ผสมผงกระดูก พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ที่บริเวณขอบแผล ($p = 0.429$) และที่บริเวณกลางแผล ($p = 0.143$) แต่เมื่อเปรียบเทียบการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกใหม่ทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกลุ่มที่ฝังชิ้นงานที่ทำจากสารสกัดจากผิวหนังกับกลุ่มอื่น ๆ ยกเว้นกลุ่มสารสกัดผิวหนังผสมผงกระดูก พบว่ากลุ่มสารสกัดจากผิวหนังมีการสร้างกระดูกใหม่มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) อย่างไรก็ตามเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับกลุ่มสารสกัดผิวหนังผสมผงกระดูกกลับพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.143$) และไม่พบการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกทดแทนเต็มรอยวิการเลย
- สรุป** : โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่ขึ้นรูปจากสารสกัดจากผิวหนังและสารสกัดผิวหนังผสมกระดูกต่างก็มีคุณสมบัติที่ดีในการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกใหม่เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่น ๆ อย่างไรก็ตามกระดูกที่เดิมลงไปไม่ได้มีส่วนช่วยให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกใหม่ที่ดีกว่าการใช้สารสกัดจากผิวหนังแต่เพียงอย่างเดียว
- คำสำคัญ** : โครงเลี้ยงเซลล์กระดูก, สารสกัดจากผิวหนัง, การเกิดเนื้อเยื่อกระดูกใหม่.

กระดูกเป็นอวัยวะที่มีการซ่อมแซมตัวเองได้ โดยปกติแล้วจะมีการสร้างและทำลายอยู่ตลอดเวลา ซึ่งจะถูกควบคุมโดยปัจจัยต่าง ๆ เช่น แรงจากการบาดเจ็บ แรงจากเครื่องมือจัดฟัน เป็นต้น โดยกระบวนการสร้างกระดูกจะเกิดขึ้นด้านตรงข้ามกับแนวแรงนั้น อย่างไรก็ตามบริเวณกระดูกเบาพื้นเกิดการเสียสมดุลของแรง เช่นเกิดการสูญเสียพื้น ก็จะทำให้การละลายตัวของกระดูกเป็นไปอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะกระดูกเบาพื้นมีการละลายตัวอย่างรวดเร็วมากในปีแรก และภายหลังถอนฟันเพียง 3 ปี กระดูกเบาพื้นมีการละลายตัวลงในแนวตั้ง 40 - 60 % และละลายตัวลงต่อเนื่องอีกปีละ 0.25 - 0.5 % นอกจากนี้ในแนวขวางของสันกระดูก ยังมีการละลายตัวลง 50% ในปีแรกโดยที่ 2 ใน 3 ของระยะที่มีการละลายตัวลงเกิดขึ้นใน 3 เดือนแรกหลังการถอนฟัน⁽¹⁾ ดังนั้นการรักษาปริมาตรของกระดูกเบาพื้นไม่ให้เกิดการละลายตัวลงภายหลังถอนฟัน ทั้งความกว้างและความสูงของระดับกระดูกเบาพื้น จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งสำหรับการใส่ฟันด้วยรากฟันเทียม และในกรณีที่มีการละลายตัวลงของกระดูกเบาพื้นแล้วก็จำเป็นที่จะต้องมีการปลูกกระดูกขึ้นทดแทน⁽²⁾

อย่างไรก็ตาม วัสดุแทนกระดูกส่วนใหญ่ยังมีข้อจำกัดและปัญหาในการใช้งานเนื่องจากวัสดุแทนกระดูกส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มเซรามิก ไม่มีคุณสมบัติในการเหนียวนำเอาเซลล์ต้นกำเนิดมายังบริเวณที่ปลูกกระดูก และวัสดุที่อยู่ในกลุ่มอินทรีย์ที่มีขายในท้องตลาด เช่น (CollaPlug®) ยังมีการสลายตัวไปเร็วเกินกว่าการสร้างกระดูกใหม่⁽³⁾ และวัสดุในท้องตลาด ส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นผงทำให้ควบคุมรูปร่างยาก ต้องใช้งานร่วมกับแผ่นไทเทเนียมเมื่อเกิดการสร้างกระดูกแล้วต้องผ่าตัดเอาแผ่นไทเทเนียมออก ทำให้ต้องทำการผ่าตัดหลายครั้ง⁽⁴⁾ นอกจากนี้วัสดุแทนกระดูกที่นำเข้าจากต่างประเทศมีราคาสูงเช่น PepGen P-15 ราคาสูงมากส่วน Bio-Oss, Biogran และ Cerasorb ราคาค่อนข้างสูง⁽⁵⁾ อย่างไรก็ตามผู้ทำการวิจัยได้เลือกที่จะใช้ (CollaPlug®) ในงานวิจัยนี้ เนื่องจากราคาไม่สูงมากและมีองค์ประกอบเป็นคอลลาเจนเช่น

เดียวกับสารสกัดจากผิวหนัง

ผู้ทำการวิจัยจึงต้องการที่จะพัฒนาวัสดุแทนกระดูกที่ใช้ในงานทันตกรรมรากเทียม ให้มีคุณสมบัติที่ดีดังต่อไปนี้^(6,7)

1. มีความเข้ากันได้กับร่างกาย
2. มีความคงตัวสูง ควบคุมรูปร่างได้ ทำให้ใช้งานได้ง่ายในบริเวณกระดูกขากรรไกร
3. มีระยะเวลาในการสลายตัวอย่างเหมาะสม ทำให้รักษาปริมาตรเพื่อรอให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่
4. มีคุณสมบัติที่ดีในการเป็นโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์สำหรับเซลล์กระดูก สามารถส่งสัญญาณให้เกิดการชักนำเซลล์ต้นกำเนิดมายังบริเวณที่มีการทำการปลูกกระดูก รวมไปถึงชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดและเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกได้ ซึ่งก็จะทำให้มีกระบวนการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกใหม่

กระดูกเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดพิเศษ ซึ่งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันทุก ๆ ชนิดต่างก็มีเซลล์และเมทริกซ์นอกเซลล์เป็นองค์ประกอบ ในส่วนเมทริกซ์นอกเซลล์ของกระดูกนั้นถือว่ามีความซับซ้อนมาก ประกอบด้วยสารจำพวกคาร์โบไฮเดรต และโปรตีน เป็นหลัก รวมทั้งคอลลาเจน ซึ่งเป็นโปรตีนเส้นใยที่พบมากที่สุดในร่างกายคนเรา คือประมาณร้อยละ 30 ของน้ำหนักของโปรตีนทั้งหมดในร่างกายและก็พบมากในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ส่วนเมทริกซ์นอกเซลล์ผิวหนังแท้ก็มีองค์ประกอบหลักเป็นคอลลาเจนชนิดที่ 1 เช่นเดียวกับในเนื้อเยื่อกระดูก นอกจากนั้นยังมีองค์ประกอบอื่น ๆ ในเมทริกซ์นอกเซลล์ ที่คล้ายคลึงกับกระดูก จะแตกต่างกันบ้างก็เป็นในเรื่องของสัดส่วน ซึ่งก็จะขึ้นอยู่กับ ตำแหน่งของกระดูก ตำแหน่งของผิวหนังแท้ระดับความลึก เพศ อายุ เป็นต้น

ผู้วิจัยมีแนวความคิดว่าองค์ประกอบอินทรีย์ในเมทริกซ์นอกเซลล์ของผิวหนังมีคอลลาเจน ชนิดที่ 1 เป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งเป็นคอลลาเจนชนิดเดียวกันกับที่พบในเนื้อเยื่อกระดูก⁽⁸⁾ หากนำมาพัฒนาด้วยการผสมกระดูกซึ่งมีองค์ประกอบอินทรีย์หลักคือ แคลเซียมฟอสเฟต อีกทั้งในผงกระดูกยังมีโปรตีนโมเลกุลต่าง ๆ ที่มี

ผลต่อการเหนียวทำให้เกิดเนื้อเยื่อกระดูก เข้าไปในสารสกัดจากผิวหนังและ ขึ้นรูปให้เหมาะสมต่อการนำไปใช้ในบริเวณที่มีความวิการของกระดูกเบาพื้นเช่น บริเวณที่มีการละลายตัวของกระดูกเบาพื้นภายหลังสูญเสียน้ำจะช่วยให้โครงเลี้ยงเซลล์มีคุณสมบัติที่ดีขึ้นในการเหนียวนำไปให้เซลล์ต้นกำเนิดเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ปลายทางที่ต้องการ โดยจากงานวิจัยของ Kohles และคณะ⁽⁹⁾ ได้ทำการทดลองในกระดูกขากรรไกรลิงเปรียบเทียบการเกิดกระดูกใหม่ขึ้นทดแทนรอยวิการของกระดูกพบว่าคอลลาเจนความเข้มข้น 20 mg/ml ต่อกระดูกในสัดส่วน 60:40 โดยมวล ทำให้เกิดการเติมรอยวิการของกระดูกใหม่ได้มากที่สุดเมื่อเทียบกับสัดส่วนคอลลาเจนต่อกระดูก 20:80, 40:60 และคอลลาเจนปราศจากกระดูก โดยโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ จากสารสกัดผิวหนังผสมผงกระดูกจะถูกนำไปปลูกทดแทนบริเวณที่มีความวิการเกิดขึ้นและสลายตัวไปภายหลังจากที่มีการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกขึ้นมาใหม่ในเนื้อเยื่อกระดูก

วิธีการศึกษา

1. การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์สำหรับกระดูก

นำผิวหนังมาแช่ในสารละลายไฮเดียมคลอไรด์ ผิวหนังที่ได้จะมีลักษณะนุ่มบวมน้ำเพิ่มขึ้น สามารถลอกผิวหนังชั้นหนังกำพร้าออกได้ง่าย เมื่อลอกผิวหนังชั้นหนังกำพร้าออกจนหมดรวมทั้งลอกกำจัดเนื้อเยื่อไขมันที่ติดปนมาออกจนหมดเรียบร้อยแล้วจะได้ผิวหนังชั้น

หนังแท้ที่มีลักษณะสีขาว นำมาปั่นด้วยเครื่องปั่นเพื่อให้หนังแท้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันในสารละลายกรดแอสติก สารละลายผิวหนังชั้นหนังแท้ถูกนำมาผสมให้กลมกลืนเป็นเนื้อเดียวกันอีกครั้งด้วยด้วยเครื่อง Homogenizer ซึ่งจะทำให้ได้สารละลายผิวหนังชั้นหนังแท้ที่มีลักษณะหนืด ชัน สีขาว

จากนั้นเตรียมจากสารละลายคอลลาเจนชนิดที่ 1 (Collagen type I) ความเข้มข้นร้อยละ 0.8 โดยมวล/ปริมาตร (ในสารละลายกรดแอสติก ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์) โดยใช้คอลลาเจนชนิดที่ 1 จากบริษัท Sigma-Aldrich corporation เนื่องจากเป็นคอลลาเจนที่นิยมใช้ในการเตรียมโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ลักษณะของสารละลายคอลลาเจนชนิดที่ 1 ที่เตรียมได้มีลักษณะเหนียวหนืดเกาะกันเป็นก้อน สีไม่มีสี ใสกว่าสารสกัดจากผิวหนัง นำสารสกัดจากผิวหนังมาขึ้นรูปโดยทำการขึ้นรูปทั้งแบบ ผสมผงกระดูกและไม่ผสมผงกระดูกเช่นเดียวกับสารละลายคอลลาเจนชนิดที่ 1 ทำให้ได้โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีความแตกต่างกัน 4 สูตร ในส่วนของ sample ทำการผสมผงกระดูกลงในสารสกัดจากผิวหนัง ในอัตราส่วน น้ำหนักแห้งของสารสกัดจากผิวหนัง: ผงกระดูก เท่ากับ 60 : 40 ถูกนำมาเตรียมเป็นโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์โดยการฉีดวัตถุดิบแต่ละชนิดเข้าสู่แม่แบบขึ้นรูป (Mould) จากเหล็กกล้าไร้สนิม (Stainless steel) รูปทรงสี่เหลี่ยม ร่องลึก 2 มม. หลังจากฉีดวัตถุดิบสำหรับทำโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์เข้าสู่แม่แบบขึ้นรูปแล้ว



รูปที่ 1. สารสกัดจากผิวหนัง

จะนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้น้ำในสารละลายวัตถุบเกิดเป็นผลึกน้ำแข็ง จากนั้นจึงเปิดกระจกที่ปิดทับด้านบนออกแล้วจึงนำเข้าสู่เครื่อง Lyophilizer เพื่อทำการระเหิดผลึกน้ำแข็งออกจากวัตถุบภายใต้สภาวะสุญญากาศ โดยกระบวนการ Lyophilization หรือ Freeze drying เมื่อวัตถุบแห้งสนิทดีแล้ว (ใช้ประมาณ 2 วันในกระบวนการ Lyophilization) จึงนำออกมาเข้าสู่ตู้แช่ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะสุญญากาศ เป็นเวลาอย่างน้อย 3 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มอุณหภูมิของตัวอย่าง จากนั้นจึงนำตัวอย่างออกมาจากแม่แบบขึ้นรูป แล้วนำตัวอย่างมาอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะสุญญากาศ ในขั้นตอนนี้จะเกิดกระบวนการดึงโมเลกุลของน้ำออกจากโมเลกุลของวัตถุบทำให้เกิดการเชื่อมขวางโมเลกุล (Cross linking) เมื่อสิ้นสุดกระบวนการนี้จะทำให้ได้โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่มีความแข็งแรงมากขึ้น^(8, 10) โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากวัตถุบแต่ละชนิด จะถูกทำแบบวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ด้วยการเจาะด้วย Biopsy punch 5 มิลลิเมตร

2. ขั้นตอนก่อนผ่าตัด

สัตว์ทดลอง : หนูวิสตาร์เพศเมีย อายุ 12 - 14 สัปดาห์

การแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลอง ใช้สัตว์ทดลอง 24 ตัว แบ่งเป็น 6 กลุ่ม

1. กลุ่มควบคุม ปล่อยให้แผลหายเองตาม

ธรรมชาติ

2. ผัง CollaPlug (วัสดุในท้องตลาด)
3. ผัง คอลลาเจนชนิดที่ 1
4. ผัง คอลลาเจนชนิดที่ 1 + ผงกระดูก
5. ผัง สารสกัดจากผิวหนัง
6. ผัง สารสกัดจากผิวหนัง + ผงกระดูก

3. ขั้นตอนการผ่าตัด

หนูถูกนำมามาตามด้วยการฉีด Zoletil + Xylazine solution zoletil 50 mg/ml (Virbac animal health, France) 30 mg/kg dose + Seton 2% (Xylazine, Laboratoris Calier, S.A., Barcelona, Spain) 10 mg/kg dose, ฉีดแบบ intra peritoneal จากนั้นให้ยาปฏิชีวนะ Enrofloxacin (Genflaxcin, General Drugs House Co., Ltd.) 10 mg/kg, SC) จากนั้นทำความสะอาดบริเวณที่จะทำการผ่าตัดด้วย 70% ethanol และ Betadine เปิดแผลแบบ full thickness แต่เว้นไม่ขูดส่วนที่เป็นเยื่อหุ้มกระดูกออก เจาะกะโหลกหนด้วยหัวกรอกวง (Trephine bur) เส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตรจะทำให้ได้รอยวิการของกระดูกขนาด 5 มิลลิเมตร (เส้นผ่านศูนย์กลางรอบนอก 5 มิลลิเมตร)⁽¹¹⁻¹³⁾ จากนั้นใช้คีมหนีบขึ้นกระดูกออกและทำการห้ามเลือดด้วย ผ้าก๊อช แล้ววางชิ้นงานขนาด 5 มิลลิเมตร ลงในรอยวิการบนกะโหลกศีรษะหนู ยึดชิ้นงานกับเยื่อหุ้มกระดูกด้วยไหมไนลอน (Prolene 6-0) แล้วทำการเย็บปิดแผล



รูปที่ 2. การสร้างรอยวิการบนกะโหลกศีรษะหนู

4. การจัดการหนูหลังผ่าตัด

ทา Chloramphenicol ointment ลงบนแผล แล้วจัดหนูอยู่ใน warming pad จนกระทั่งหนูฟื้นแล้วจึงแยกกรงทำการติดป้ายเลขที่กรงแต่ละกรงด้วย ในวันที่ 1, 2, 3 หลังการผ่าตัดให้หนูกินน้ำที่ผสม Genfloxacin® (Enrofloxacin) 3mg/วัน

5. การเก็บข้อมูลหลังการผ่าตัด

ทำการถ่ายภาพแผล ซึ่งน้ำหนัก บันทึกผลอาการของหนูในวันที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 สัปดาห์ที่ 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ตามลำดับ ที่สัปดาห์ที่ 12 หนูทุกตัวถูกนำมาพิจารณาด้วยการให้ยาสลบ Thiopental เกินขนาด ก่อนนำมาเก็บตัวอย่างชิ้นงานและเนื้อเยื่อกระดูกโดยรอบด้วย โดยใช้เครื่องกรอฟันปลอมตัด เพื่อนำชิ้นงานทั้งหมดเก็บข้อมูลทางภาพรังสีและจุลกายวิภาคศาสตร์

6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางจุลกายวิภาคศาสตร์

ชิ้นงานทั้งหมด 23 ชิ้น (มีหนูในกลุ่มควบคุมตายไประหว่างทดลอง 1 ตัว) ถูกนำไปแช่ใน 10 % ฟอรัมาลิน 24 ชั่วโมงก่อนทำลายแคลเซียม ด้วย EDTA จากนั้นนำไปฝังในพาราฟิน แล้วย้อมสี hematoxylin and eosin stain เพื่อนำไปตรวจวิเคราะห์ผล

7. การวิเคราะห์ข้อมูลทางภาพรังสี

ทำการถ่ายภาพรังสีชิ้นงานทั้งหมดด้วยเครื่อง Dental X-ray unit (Exposure 50kV 7mA 0.4sec) ลงบนแผ่นรับภาพ Digital CCD และ เครื่อง Cone beam CT 3D Accutomo FPD-XYZ Slice View Tomography (J.Morita, Kyoto, JAPAN) ภาพรังสีที่ได้จะมีรายละเอียด

สูงมาก เนื่องจากตัวรับภาพเป็นแบบ Amorphous Silicon Flat Panel ซึ่งสามารถประมวลผลและสร้างภาพได้ทันที โดยทุกบริเวณจะมีความคมชัดเท่ากันตลอดไม่มีการบิดเบี้ยวของภาพ การวิเคราะห์ข้อมูลทางภาพรังสีผ่านโปรแกรม One Data Viewer Plus Software

8. ค่าสถิติ

ใช้ตาราง Chi-Square Tests อ่านค่าทางสถิติ Fisher's Exact Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

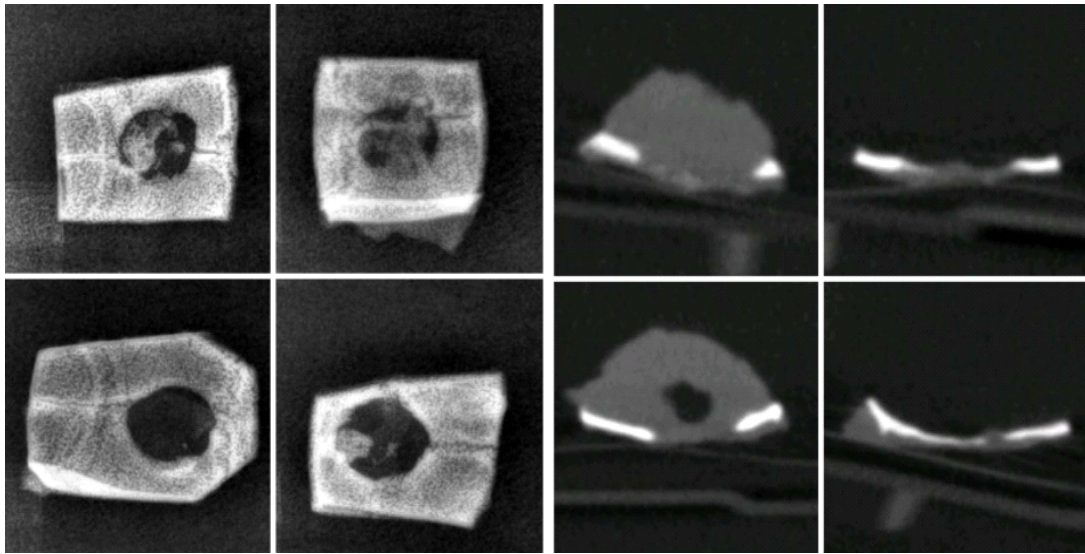
ผลการศึกษา

1. ผลการวิเคราะห์ข้อมูลเชิงเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มตัวอย่างทางภาพรังสี⁽¹⁴⁻¹⁶⁾

จากภาพรังสีแสดงให้เห็น ว่ามีการตกผลึกของแคลเซียมทั้งที่กลางรอยแผลและที่ขอบของแผลที่ได้ทำการใส่ชิ้นงานที่ขึ้นรูปจากสารสกัดผิวหนังไว้มังดารงที่ 1 และ ตารางที่ 2 ในขณะที่สารสกัดจากผิวหนังที่ผสมผงกระดูกกลับพบการสะสมของแคลเซียมที่บริเวณกะโหลกศีรษะหนูที่บริเวณขอบแผลเพียง 2 ชิ้นงาน และการสะสมของแคลเซียมที่บริเวณกะโหลกศีรษะหนูที่บริเวณกลางแผลเพียงหนึ่งชิ้นงาน แต่เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของการเกิดการสะสมของแคลเซียมที่บริเวณกะโหลกศีรษะหนูทั้งที่บริเวณขอบแผล และกลางแผลของกลุ่มสารสกัดจากผิวหนังและกลุ่มสารสกัดจากผิวหนังที่ผสมผงกระดูกพบว่าต่างก็ไม่มีมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ที่บริเวณขอบแผล ($p = 0.429$) และที่บริเวณกลางแผล ($p = 0.143$)



รูปที่ 3. แสดงการเก็บตัวอย่างชิ้นงาน



รูปที่ 4. แสดงการตกผลึกของแคลเซียมในรอยวิการของกะโหลกศีรษะหนู

ตารางที่ 1. แสดงการเกิดการสะสมของแคลเซียมที่บริเวณกะโหลกศีรษะหนูที่บริเวณขอบแผล

ชนิดของชิ้นงานที่ฝังลง กะโหลกหนู	จำนวนหนู/ตัว		รวม
	ไม่เกิดการสะสม ของแคลเซียม	เกิดการสะสม ของแคลเซียม	
สารสกัดจากผิวหนัง	0	4	4
สารสกัดจากผิวหนังผสม ผงกระดูก	2	2	4
คอลลาเจนชนิดที่ 1	3	1	4
คอลลาเจนชนิดที่ 1 ผสมผงกระดูก	4	0	4
CollaPlug®	0	4	4
กลุ่มควบคุม	3	0	3
รวม	12	11	23

ตารางที่ 2. แสดงการเกิดการสะสมของแคลเซียมที่บริเวณกะโหลกศีรษะหนูที่บริเวณกลางแผล

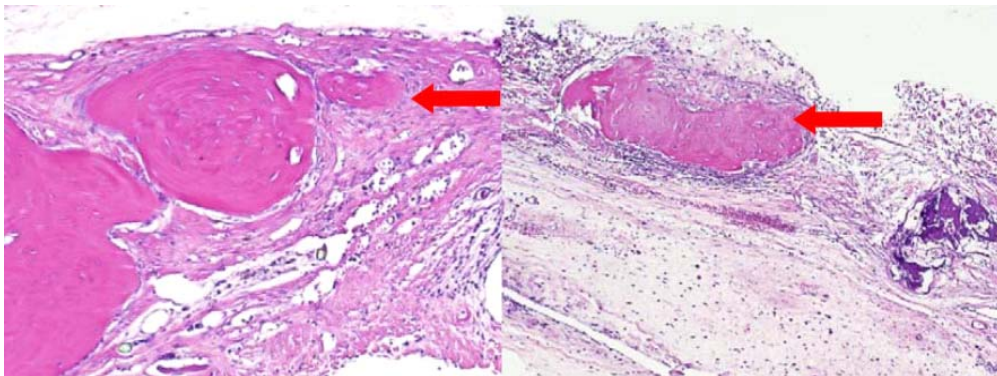
ชนิดของชิ้นงานที่ฝังลง กะโหลกหนู	จำนวนหนู/ตัว		รวม
	ไม่เกิด calcification	เกิด calcification	
สารสกัดจากผิวหนัง	0	4	4
สารสกัดจากผิวหนังผสม ผงกระดูก	3	1	4
คอลลาเจนชนิดที่ 1	4	0	4
คอลลาเจนชนิดที่ 1 ผสมผงกระดูก	4	0	4
CollaPlug®	4	0	4
กลุ่มควบคุม	3	0	3
รวม	18	5	23

การสะสมของแคลเซียมที่บริเวณกะโหลกศีรษะ หนูที่บริเวณขอบแผลของกลุ่มสารสกัดจากผิวหนังเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม CollaPlug® ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่เปรียบเทียบความแตกต่างของการเกิดการสะสมของแคลเซียมที่บริเวณกะโหลกศีรษะหนูที่ทั้งที่บริเวณขอบแผล และกลางแผลของกลุ่มสารสกัดจากผิวหนังเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มคอลลาเจนชนิดที่ 1, คอลลาเจนชนิดที่ 1 ผสมผงกระดูกและกลุ่มควบคุม พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.05$ ทั้งสิ้นยกเว้นในกลุ่ม คอลลาเจนชนิดที่ 1 ที่เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของการเกิดการ

สะสมของแคลเซียมที่บริเวณกะโหลกศีรษะหนูที่บริเวณขอบแผล พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p = 0.143$)

2. ผลการวิเคราะห์ข้อมูลเชิงเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มตัวอย่างทางจุลกายวิภาคศาสตร์⁽¹⁵⁻¹⁷⁾

จากข้อมูลข้อมูลเชิงเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มตัวอย่างทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกะโหลกศีรษะหนูที่ทำการฝังด้วยโครงเลี้ยงเซลล์ ที่ทำมาจากกลุ่มสารสกัดผิวหนังนำมาเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ทำการฝังชิ้นงานชนิดอื่น ๆ (ดังแสดงในตารางที่ 3)



รูปที่ 5. แสดงผลการเกิดเนื้อเยื่อกระดูกใหม่ที่บริเวณแผลที่กะโหลกศีรษะหนู

ตารางที่ 3. แสดงผลการเกิดเนื้อเยื่อกระดูกใหม่ที่บริเวณแผลที่กะโหลกศีรษะหนูที่ทำการฝังชิ้นงานชนิดต่าง ๆ

ชนิดของชิ้นงานที่ฝังลงกะโหลกหนู	จำนวนหนู/ตัว		รวม
	ไม่พบการสร้างกระดูกใหม่	พบการสร้างกระดูกใหม่	
สารสกัดจากผิวหนัง	0	4	4
สารสกัดจากผิวหนังผสม ผงกระดูก	3	1	4
คอลลาเจนชนิดที่ 1	4	0	4
คอลลาเจนชนิดที่ 1 ผสมผงกระดูก	4	0	4
CollaPlug®	4	0	4
กลุ่มควบคุม	3	0	3
รวม	18	5	23

พบว่า การเกิดเนื้อเยื่อกระดูกใหม่ที่บริเวณแผลกะโหลกหนของกลุ่มที่ฝังชิ้นงานที่ทำจากสารสกัดจากผิวหนังมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มคอลลาเจนชนิดที่ 1 คอลลาเจนชนิดที่ 1ผสมผงกระดูก CollaPlug® และกลุ่มควบคุมที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p = 0.029$) อย่างไรก็ตามเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับกลุ่มสารสกัดผิวหนังผสมผงกระดูก กลับพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p = 0.143$)

การอภิปรายและสรุปผลการศึกษา

ผู้ทำการวิจัยได้เลือกที่จะใช้รอยวิการ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ของหนูวิสตัดาร์มาทำการฝังชิ้นงาน เนื่องจากรอยวิการขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ถือเป็นรอยวิการขนาดเล็กที่สุดที่กระดูกจะไม่สามารถหายเองได้ตามธรรมชาติ⁽¹⁸⁻²⁰⁾ จะเห็นได้จากผลการศึกษาในกลุ่มควบคุม ที่ไม่มีกระบวนการสร้างกระดูกเกิดขึ้นภายในรอยวิการของกะโหลกศีรษะหนูเลย ผลการศึกษาทางภาพถ่ายรังสี แสดงให้เห็นว่ามีงาชาวเกิดขึ้นเนื่องจากการสะสมของแคลเซียมทั้งที่กลางรอยแผลและที่ขอบของแผลของกะโหลกศีรษะหนู ที่ได้ทำการใส่ชิ้นงานที่ขึ้นรูปจากสารสกัดผิวหนังอย่างชัดเจนแต่ไม่พบการสะสมของแคลเซียมภายในรอยวิการของกะโหลกศีรษะหนูในกลุ่มคอลลาเจนชนิดที่ 1 และกลุ่มควบคุมเลย จึงแสดงให้เห็นว่าคอลลาเจนชนิดที่ 1 ไม่มีคุณสมบัติในการที่จะทำให้เกิดการสะสมของแคลเซียมภายในรอยแผลที่ฝังชิ้นงานได้ โดยเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของการเกิดการสะสมของแคลเซียมที่บริเวณกะโหลกศีรษะหนูที่ทั้งที่บริเวณขอบแผล และกลางแผลของกลุ่มสารสกัดจากผิวหนังเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มคอลลาเจนชนิดที่ 1 และกลุ่มควบคุมพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.05$ ทั้งสิ้น แต่เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของการเกิดการสะสมของแคลเซียมที่บริเวณกะโหลกศีรษะหนูที่ทั้งที่บริเวณขอบแผล และกลางแผลของกลุ่มสารสกัดจากผิวหนังเทียบกับกลุ่มสารสกัด

จากผิวหนังที่ผสมผงกระดูกพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ที่บริเวณขอบแผล ($p = 0.429$) และที่บริเวณกลางแผล ($p = 0.143$) จากผลการวิเคราะห์ทางภาพรังสีทำให้สามารถสรุปได้ว่าชิ้นงานที่ทำจากสารสกัดจากผิวหนังทำให้มีการสะสมของแคลเซียมที่บริเวณกลางรอยวิการได้ดีกว่าคอลลาเจนชนิดที่ 1 แต่ไม่มีความแตกต่างกับ สารสกัดจากผิวหนังที่ผสมผงกระดูก

จากการศึกษาทางพยาธิวิทยาพบว่า การเกิดเนื้อเยื่อกระดูกใหม่ที่บริเวณแผลกะโหลกหนของกลุ่มที่ฝังชิ้นงานที่ทำจากสารสกัดจากผิวหนังมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มคอลลาเจนชนิดที่ 1 และ กลุ่มควบคุมที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p = 0.029$) อย่างไรก็ตามเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับกลุ่มสารสกัดผิวหนังผสมผงกระดูก กลับพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p = 0.143$) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากผิวหนังมนุษย์มีคุณสมบัติในการเหนี่ยวนำการสร้างกระดูกใหม่ที่ชัดเจนในขณะที่ คอลลาเจนชนิดที่ 1 ไม่มี นอกจากนั้นผงกระดูกที่เติมลงไป โดยคาดหวังให้มีส่วนช่วยในการเหนี่ยวนำการสร้างกระดูกใหม่กลับไม่มีผลที่ดีกว่า กลุ่มที่ฝังชิ้นงานที่ขึ้นรูปจากสารสกัดจากผิวหนังอย่างเดียว

จากการวิจัยที่เกิดขึ้นยังพบว่า การซ่อมแซมรอยวิการของกระดูกด้วย scaffold เพียงอย่างเดียวไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ในช่องว่างโดยสมบูรณ์ได้ สรุปได้จากการที่ไม่มี scaffold ในกลุ่มใดเลยที่สามารถทำให้เกิดการสร้างกระดูกปิดเต็มรอยวิการขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ซึ่งถือเป็น critical defect ที่กระดูกไม่สามารถหายเองตามธรรมชาติได้⁽¹¹⁾ โดยที่โครงเลี้ยงเซลล์ที่ขึ้นรูปจากสารสกัดจากผิวหนัง มีศักยภาพชัดเจนในการเหนี่ยวนำการเกิดกระดูกใหม่ได้ชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่น ๆ แต่ยังไม่มากพอที่จะเหนี่ยวนำการสร้างกระดูกใหม่เพื่อซ่อมแซมรูโหว่โดยสมบูรณ์ จากผลการทดลองทางรังสีพบว่าการสะสมของแคลเซียมที่บริเวณขอบแผลในหลายกลุ่มทดลอง ซึ่งไม่น่าจะเป็นผล

จากการเหนี่ยวนำของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำการฝังลงไป ในรอยวิการแต่เป็นผลมาจากการที่กระดูกมีกระบวนการ ซ่อมแซมบาดแผลตามธรรมชาติ⁽²¹⁾

อย่างไรก็ตามจากผลการตรวจทางรังสียังแสดงให้เห็นว่ามีการสะสมของแคลเซียม ที่บริเวณกลางรอยวิการในกลุ่มทดลองที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ที่มาจากสารสกัดจากผิวหนัง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองทางด้านจุลกายวิภาคศาสตร์ ซึ่งเห็นการเกิดกระดูกใหม่ที่บริเวณกลางรอยวิการเช่นกัน แต่กระดูกใหม่ที่เกิดขึ้นพบว่ามีลักษณะเป็นกระดูกใหม่เล็ก ๆ ซึ่งยังไม่มีความต่อเนื่อง จึงยังเป็นความท้าทายของนักวิจัยทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อที่จะต้องพัฒนาโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีคุณสมบัติที่ดียิ่งขึ้น ผลการทดลองที่ไม่เป็นไปตามสมมุติฐานที่ตั้งไว้ อีกข้อหนึ่งคือการที่ผลการเกิดกระดูกใหม่ในกลุ่มที่ใส่ผงกระดูกไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้ใส่ผงกระดูก ทำให้สามารถวิจารณ์ได้ว่าผงกระดูกไม่ได้มีส่วนช่วยเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่เลย

ในรอยวิการของกระดูกที่มีขนาดใหญ่ เช่น แผลถอนฟัน จะไม่สามารถเกิดกระบวนการสร้างทดแทนตัวเองตามธรรมชาติได้เต็มรอยแผล โดยจะมีการละลายตัวลงหลังการหายของแผล หรือจะเกิดการหายของแผลที่ทดแทนด้วยเนื้อเยื่อชนิดอื่น ๆ ทำให้ต้องการวัสดุทดแทนเป็นโครงสร้างชั่วคราวที่ทำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกใหม่^(1, 22) สารในกลุ่มเส้นใยโปรตีน เช่น สารสกัดจากผิวหนังที่ได้ใช้ในการวิจัยนี้ ยังคงเป็นทางเลือกที่ดี เนื่องจากเป็นโปรตีนหลักชนิดเดียวกับที่มีในกระดูก ไม่มีการต่อต้านจากร่างกาย ขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ได้ง่าย และละลายตัวไปได้เองหลังจากการเกิดเนื้อเยื่อกระดูกใหม่ อย่างไรก็ตามจะต้องมีการพัฒนาเพิ่มคุณสมบัติที่ดีในการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างกระดูกได้ดีกว่านี้ ซึ่งเป็นความท้าทายที่ต้องใช้ความร่วมมือกันของนักวิจัยในหลาย ๆ สาขา ไม่ว่าจะเป็นทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ, ด้านเซลล์ต้นกำเนิด, ด้านวิศวกรรมเคมี ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2551 นอกจากนี้คณะผู้ทำการวิจัยขอขอบพระคุณ อาจารย์ดั่ง วิทยานามต่อไปนี้มีส่วนช่วยให้งานวิจัยดำเนินไปได้เป็นอย่างดี ด้วยการให้ข้อมูลรวมไปจนถึงเสนอข้อคิดเห็นต่าง ๆ รศ.นพ.ทพ.สมชาย เศรษฐศิริสมบัติ, รศ.ทพ.ดร.ประสิทธิ์ ภวสันต์, รศ.พญ.วิไล ชินธเนศ, พอ.ทพ.พิมล บำรุง, ทพ.เพกา จรุงกิจอนันต์, อ.ทพ.จารุมา ศักดิ์ดี ในการอ่านผลทางพยาธิวิทยาได้รับความกรุณาจาก รศ. พญ. วรนุช ธนากิจ และในการประเมินผลทางภาพรังสีได้รับความร่วมมือจากอาจารย์ทันตแพทย์หญิงพสุเพ็ญ โกศลลภภู

อ้างอิง

1. Irinakis T. Rationale for socket preservation after extraction of a single-rooted tooth when planning for future implant placement. J Can Dent Assoc 2006 Dec; 72(10): 917-22
2. Bartee BK. Extraction site reconstruction for alveolar ridge preservation. Part 1: rationale and materials selection. J Oral Implantol 2001; 27(4): 187-93
3. Meijer GJ, de Bruijn JD, Koole R, van Blitterswijk CA. Cell based bone tissue engineering in jaw defects. Biomaterials 2008Jul; 29(21): 3053-61
4. Babbush CA, Hahn JA, Krauser JT, Rosenlicht JL. Dental Implants:the Art and Science. 2nd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2010
5. Garg AK. Bone Biology, Harvesting, Grafting for Dental Implants: Rationale and Clinical Applications. Chicago, IL: Quintessence Publishing, 2004

6. Greenwald AS, Boden SD, Goldberg VM, Khan Y, Laurencin CT, Rosier RN. Bone-graft substitutes: facts, fictions, and applications. *J Bone Joint Surg Am* 2001;83-A Suppl 2 Pt 2: 98-103
7. Mauney JR, Kaplan DL, Volloch V. Matrix-mediated retention of osteogenic differentiation potential by human adult bone marrow stromal cells during ex vivo expansion. *Biomaterials* 2004Jul; 25(16): 3233-43
8. Glowacki J, Mizuno S. Collagen scaffolds for tissue engineering. *Biopolymers* 2008 May; 89(5): 338-44
9. Kohles SS, Vernino AR, Clagett JA, Yang JC, Severson S, Holt RA. A morphometric evaluation of allograft matrix combinations in the treatment of osseous defects in a baboon model. *Calcif Tissue Int* 2000 Aug; 67(2): 156-62
10. Tangsadthakun C, Kanokpanont S, Sanchavanakit N, Pichyangkura R, Banaprasert T, Tabata, Y, Damrongsakkul S. The influence of molecular weight of chitosan on the physical and biological properties of collagen/chitosan scaffolds. *J BiomaterSciPolym Ed* 2007;18(2): 147-63
11. Kalish BP, Schuster GS, Peacock ME, Cuenin MF, Swiec GD, Potter BJ, Buxton TB, McPherson JC 3rd. Influence of matrix-suspended demineralized bone on osseous repair using a critical-sized defect in the rat (*Rattus norvegicus*) calvarium. *J Oral Implantol* 2008;34(2):83-9
12. Mah J, Hung J, Wang J, Salih E. The efficacy of various alloplastic bone grafts on the healing of rat calvarial defects. *Eur J Orthod* 2004 Oct; 26(5): 475-82
13. Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater* 2007 Mar; 13: 1-10
14. Pryor ME, Yang J, Polimeni G, Koo KT, Hartman MJ, Gross H, Agelan A, Manns JM, Wikesjo UM. Analysis of rat calvaria defects implanted with a platelet-rich plasma preparation: radiographic observations. *J Periodontol* 2005 Aug; 76(8): 1287-92
15. Schantz JT, Hutmacher DW, Lam CX, Brinkmann M, Wong KM, Lim TC, Chou N, Guldberg RE, Teoh SH. Repair of calvarial defects with customised tissue-engineered bone grafts II. Evaluation of cellular efficiency and efficacy in vivo. *Tissue Eng* 2003; 9 Suppl 1: S127-39
16. Schantz JT, Teoh SH, Lim TC, Endres M, Lam CX, Hutmacher DW. Repair of calvarial defects with customized tissue-engineered bone grafts I. Evaluation of osteogenesis in a three-dimensional culture system. *Tissue Eng* 2003; 9 Suppl 1: S113-26
17. Pryor ME, Polimeni G, Koo KT, Hartman MJ, Gross H, April M, Safadi FF, Wikesjo UM. Analysis of rat calvaria defects implanted with a platelet-rich plasma preparation: histologic and histometric observations. *J Clin Periodontol* 2005 Sep; 32(9): 966-72
18. Cowan CM, Shi YY, Aalami OO, Chou YF, Mari C, Thomas R, Quarto N, Contag CH, Wu B, Longaker MT. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nat Biotechnol* 2004 May; 22(5): 560-7

19. Hollinger JO, Kleinschmidt JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg* 1990 Jan;1(1): 60-8
20. Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res* 1986 Apr; 205: 299-308
21. Lanza R, Langer R, Vacanti J. *Principles of Tissue Engineering*. 3rd ed. New York: Elsevier/Academic Press, 2007
22. Shimizu M, Sasaki T, Ishihara A, Furuya R, Kawawa T. Bone wound healing after maxillary molar extraction in ovariectomized aged rats. *J Electron Microsc (Tokyo)* 1998; 47(5): 517-26