

รายงานการวิจัย

โครงการวิจัยย่อยที่ 2

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การทดสอบความปลอดภัยของกระดูกเทียมที่ทำจากไหมไทยและไคโตซาน ตามมาตรฐาน

(ภาษาอังกฤษ) Standard safety testing of Thai silk fibroin- and chitosan-based bone substitutes

ชื่อแผนงานวิจัย (ภาษาไทย) โครงการวิจัยบูรณาการด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อเพื่อการพัฒนากระดูกเทียมระยะที่ 2

(ภาษาอังกฤษ) Multidisciplinary Researches in Tissue Engineering for Development of Bone Substitutes: Phase II

รายนามคณะผู้วิจัย พร้อมทั้งหน่วยงานที่สังกัดและหมายเลขโทรศัพท์

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ศิริพร คำรงค์ศักดิ์กุล

ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทร. 02-218-6862 โทรสาร 02-218-6877 มือถือ 081-832-3019

อีเมล : siriporn.d@chula.ac.th

ผู้ร่วมงานวิจัย

ชื่อและอีเมล	ภาควิชาลัคณะที่สังกัด
1.1 ผศ.ดร. โสรดา กนกพานนท์ sorada.k@chula.ac.th	ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ โทร. 0-2218-6867 โทรสาร 0-2218-6877
1.2 รศ.ดร. ธวัชชัย ชรินพานิชกุล cthawat@chula.ac.th	ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ โทร. 0-2218-6899 โทรสาร 0-2218-6899
1.3. ผศ.ดร.รัฐ พิษณุางกูร rath725@hotmail.com	ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ โทร.0-2 218-5437 โทรสาร 0-2218-5561
1.4. นพ. ประวิทย์ กิตติดำรงสุข fmedpkd@md.chula.ac.th	ภาควิชาออร์โทปิดิกส์ คณะแพทยศาสตร์ โทร.0-2256-4230 โทรสาร 0-2256-4625
1.5. นพ. ถนอม บรรณประเสริฐ drtanom@yahoo.com	ภาควิชาโสต ศอ นาสิกวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โทร.0-2256-3562 โทรสาร 02-256-3562

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี
งบประมาณ 2552

บทคัดย่อ

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การทดสอบความปลอดภัยของกระดูกเทียมที่ทำจากไหมไทยและไคโตซาน ตามมาตรฐาน

(ภาษาอังกฤษ) Standard safety testing of Thai silk fibroin- and chitosan-based bone substitutes

ชื่อแผนงานวิจัย (ภาษาไทย) โครงการวิจัยบูรณาการด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อเพื่อการพัฒนากระดูกเทียมระยะที่ 2

(ภาษาอังกฤษ) Multidisciplinary Researches in Tissue Engineering for

Development of Bone Substitutes: Phase II

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปี _____ 2552 _____ จำนวนเงิน _____ 981,150 _____ บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย _____ 1 _____ ปี ตั้งแต่ _____ 28 ตุลาคม 2552 _____ ถึง _____ 27 ตุลาคม 2553 _____

ชื่อผู้วิจัย 1. รศ.ดร.ศิริพร คำรงค์ ☐ ศักดิ์กุล (siriporn.d@chula.ac.th)

ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทร. 02-218-6862 โทรสาร 02-218-6877 มือถือ 081-832-3019

อีเมล : siriporn.d@chula.ac.th

2. ผศ.ดร.โสรัดา กนกพานนท์

ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทร. 0-2218-6867 โทรสาร 0-2218-6877

อีเมล : sorada.k@chula.ac.th

3. รศ.ดร. ธวัชชัย ชรินพานิชกุล

ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทร 0-2218-6899 โทรสาร 0-2218-6899

อีเมล : cthawat@chula.ac.th

4. ผศ.ดร.รัฐ พิษณุางกูร

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทร.0-2 218-5437 โทรสาร 0-2218-5561

อีเมล : rath725@hotmail.com

5. นพ. ประวิทย์ กิตติดำรงสุข

ภาควิชาออร์โทปิดิกส์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทร.0-2256-4230 โทรสาร 0-2256-4625

อีเมล : fmedpkd@md.chula.ac.th

6. นพ. ถนอม บรรณประเสริฐ

ภาควิชาโสต ศอ นาสิกวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทร.0-2256-3562 โทรสาร 02-256-3562

อีเมล : drtanom@yahoo.com

บทคัดย่อ (Abstract)

ภาษาไทย

จากผลการวิจัยพัฒนากระดูกเทียมในแผนงานวิจัยโครงการวิจัยบูรณาการด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อเพื่อการพัฒนากระดูกเทียม ระยะที่ 1 ทำให้ได้ต้นแบบโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมที่ผลิตจากไฟโบรอินไหมไทย และไคโตซานเป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งมีสมบัติต่างๆ เหมาะสม ทั้งทางกายภาพ ทางกล และทางชีวภาพ (ในระดับห้องปฏิบัติการ) ต้นแบบกระดูกเทียมนี้อาจเป็นผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ซึ่งมีเป้าหมายในการนำไปใช้ในการรักษาปัญหาการสูญเสียกระดูกของประชากรในประเทศ เพื่อให้ประชากรในประเทศมีโอกาสในการรักษาที่มากขึ้น และมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น และลดการนำเข้าผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ ดังนั้น จึงต้องได้รับการพัฒนาต่อไปโดยการทดสอบมาตรฐานความปลอดภัยผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ที่มีต่อสิ่งมีชีวิตในงานวิจัยนี้จึงได้ผลิตและทดสอบกระดูกเทียมดังกล่าวโดยแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ การส่งตรวจมาตรฐานเพื่อรับรองความปลอดภัยสำหรับผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ของหน่วยงานในประเทศ ได้แก่ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) และ การตรวจสอบความปลอดภัยโดยคณะผู้วิจัยเองตามมาตรฐาน ISO 10993 ผลการทดสอบความปลอดภัยของโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมไหมไทย/เจลาติน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ หรือ TSF-bone substitute โดย วว. ทั้ง 3 ประเภท ได้แก่ Safety test (Systemic injection tests), Acute dermal irritation test และ Skin sensitization test สรุปได้ว่าโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมนี้อาจไม่เป็นพิษต่อสัตว์ทดลอง ไม่พบอาการระคายเคืองอย่างเฉียบพลัน รวมถึงไม่ก่อให้เกิดผื่นแดงและการบวมที่ผิวหนังของสัตว์ทดลอง ผลการทดสอบความเป็นพิษและการทดสอบปฏิกิริยาเฉพาะที่ของโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมภายหลังการฝังในสัตว์ทดลองโดยคณะผู้วิจัยเอง แสดงให้เห็นว่ากระดูกเทียมดังกล่าวไม่มีพิษต่อเซลล์ และมีระดับความระคายเคืองในสัตว์ทดลองอยู่ในระดับ “ไม่ระคายเคือง” ถึง “ระคายเคืองเล็กน้อย” ทั้งนี้กระบวนการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ในปัจจุบันมีความสะอาดอยู่ในระดับหนึ่ง แต่ยังไม่เทียบเท่ามาตรฐานการผลิตอุปกรณ์/วัสดุทางการแพทย์ ซึ่งคณะผู้วิจัยไม่มีสถานที่และครุภัณฑ์ที่จะดำเนินการผลิตได้ ต้องมีการลงทุนในการดำเนินการดังกล่าวต่อไปในขั้นตอนการผลิตเพื่อใช้ในการทดสอบในมนุษย์ หรือการใช้จริงต่อไป

โดยสรุปจากผลการทดสอบความปลอดภัยโดยหน่วยงานรับรองมาตรฐานภายนอก และการทดสอบภายในห้องปฏิบัติการชี้ให้เห็นว่า โครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมไหมไทย/เจลาติน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ หรือ TSF-bone substitute มีความปลอดภัยเบื้องต้นในการทดสอบในร่างกายสิ่งมีชีวิต แสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการประยุกต์ทดสอบใช้งานในมนุษย์ต่อไป เพื่อพัฒนาให้ถึงเป้าหมายการใช้กระดูกเทียมที่ผลิตขึ้นในประเทศไทยเพื่อการรักษาโรคสูญเสียเนื้อกระดูก

ภาษาอังกฤษ

From the research output of Multidisciplinary Researches in Tissue Engineering for Development of Bone Substitutes: Phase I, Thai silk fibroin-based and chitosan-based bone substitutes having suitable physical and biological properties were obtained. The goal of the developed bone substitutes is to use in bone defect healing for Thai people. This could enhance the quality of life of Thai people and reduce the imported medical products. To achieve the goal, the safety certification of the developed bone substitutes is required. In this work, the developed bone substitutes were produced and tested. Two parts of safety tests were performed including the certified safety test by Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR) and in-house test according to ISO 10993. The results on the safety test of Thai silk/gelatin/hydroxyapatite bone substitute or TSF-bone substitute by TISTR, including safety test (systemic injection tests), acute dermal irritation test and skin sensitization test, can be concluded that TSF-bone substitute is not toxic to animals. There are no dermal irritation, skin erythema and swelling. The in-house testing results on cytotoxicity and *in vivo* tissue response (local effect after implantation) indicates that TSF-bone substitute is not toxic to cells. The “non-irritant” and “slight irritant” levels of TSF-bone substitute are found. It is noted that the TSF-bone substitute is not produced in the standard of clean environment due to the lack of clean room. This might cause some contamination during the production. The standard of production is required for further clinical test.

In conclusion, the results on safety tests by both parties suggest that TSF-bone substitute is preliminarily safe to be used *in vivo*. This implies the high potential of TSF-bone substitute for clinical test and further used to heal bone defect.

คำสำคัญ: ไฟโบรอินไหมไทย, กระดูกเทียม, วิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก, การทดสอบความปลอดภัยของวัสดุทางการแพทย์ (Thai silk fibroin, bone substitute, bone tissue engineering, safety test of medical product)

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
บทคัดย่อ ภาษาไทย.....	2/5
บทคัดย่อ ภาษาอังกฤษ.....	2/6
คำสำคัญ.....	2/6
สารบัญเรื่อง.....	2/7
1. บทนำ.....	2/8
2. การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	2/8
3. ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย (เดิมที่เสนอในข้อเสนอโครงการ และส่วนที่ดำเนินการจริง)	2/10
ส่วนการผลิตและทดสอบความปลอดภัยของโครงเลี้ยงเซลล์	
3. ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย.....	2/11
4. ผลการวิจัย.....	2/18
5. อภิปรายและวิจารณ์ผล.....	2/40
6. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	2/42
ส่วนการพัฒนาโครงเลี้ยงเซลล์แบบใหม่	
3. ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย.....	2/44
4. ผลการวิจัย และสรุปผลการวิจัย.....	2/47
7. บรรณานุกรม (Bibliography)	2/52
8. ภาคผนวก (Appendix)	2/54
ก. บทความนำเสนอในที่ประชุมวิชาการ เรื่องผลของโครงเลี้ยงเซลล์โคโคซานและไฮดรอกซีอะพาไทต์ในการรักษาการสูญเสียกระดูกในกระต่าย.....	2/54
ข. รายละเอียดและผลการทดสอบมาตรฐานเพื่อรองรับความปลอดภัยของโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียม โดย วว.	2/57
- Safety test (Systemic injection test)	
- Acute dermal irritation test	
- Skin sensitization test	

1. บทนำ

เทคโนโลยีการรักษาการสูญเสียกระดูกโดยใช้กระดูกเทียมที่มีความสามารถในการเสริมสร้าง การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อกระดูกได้รับการพัฒนาเพื่อใช้ในการทางการแพทย์อย่างต่อเนื่องในต่างประเทศ กระดูกเทียมเหล่านี้เป็นวัสดุทางการแพทย์ที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศซึ่งมีราคาแพง ทำให้การรักษาการ สูญเสียกระดูกในประชากรไทยเป็นไปอย่างจำกัด การวิจัยเพื่อพัฒนาต้นแบบกระดูกเทียมที่ผลิตขึ้นจากชีว วัสดุที่ย่อยสลายได้ในร่างกาย และเป็นวัสดุที่ผลิตได้ภายในประเทศจึงมีความจำเป็นและสำคัญสำหรับการ ใช้งานทางการแพทย์ในประเทศ เพื่อให้ประชากรในประเทศมีโอกาสในการรักษาที่มากขึ้น และมีคุณภาพ ชีวิตที่ดีขึ้น การพัฒนาต้นแบบกระดูกเทียมนี้ได้เริ่มดำเนินการในแผนงานวิจัยโครงการวิจัยบูรณาการด้าน วิศวกรรมเนื้อเยื่อเพื่อการพัฒนากระดูกเทียม ระยะที่ 1 โดยเริ่มพัฒนาจากขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียม จากชีววัสดุที่มีศักยภาพในประเทศ 2 ประเภทได้แก่ ไฟโบรอินไหมไทย และไลโดซาน จากนั้นได้ทำการ ทดสอบสมบัติต่าง ๆ ได้แก่สมบัติทางกายภาพ ทางกล ตลอดจนสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ กระดูกและเซลล์ต้นกำเนิดในระดับห้องปฏิบัติการ จนได้ผลิตภัณฑ์ต้นแบบกระดูกเทียมที่มีสมบัติข้างต้น เหมาะสมในระดับห้องปฏิบัติการจากแผนงานวิจัยระยะที่ 1 ซึ่งเสร็จสิ้นไปแล้ว กระดูกเทียมดังกล่าวนี้ถือเป็น ผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ซึ่งมีเป้าหมายในการนำไปใช้ในการรักษาปัญหาการสูญเสียกระดูกของ ประชากรไทย จึงจำเป็นต้องได้รับการทดสอบความปลอดภัยตามมาตรฐานการทดสอบวัสดุทางการแพทย์ ก่อนการนำไปทดลองใช้ในร่างกายมนุษย์ ทั้งนี้มาตรฐานการทดสอบนี้ยังไม่มีระบุชัดในประเทศไทย มีเพียง มาตรฐานสากลที่ใช้กันคือ ISO 10993 (US FDA 1993) ซึ่งเป็นมาตรฐานทดสอบสำหรับวัสดุทางการแพทย์ ประกอบด้วย การทดสอบหลายชนิด อาทิ ISO10993- 5 การตรวจความเป็นพิษต่อเซลล์ (indirect cytotoxicity method) แบบ elution titration test และ ISO10993-6 การทดสอบปฏิกิริยาเฉพาะที่ของ ผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ที่ฝังในสัตว์ทดลอง ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการดำเนินการทดสอบความ ปลอดภัยของกระดูกเทียมที่ผลิตมาจากไฟโบรอินไหมไทย และไลโดซานเป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งต้นแบบ กระดูกเทียมที่ผ่านการทดสอบมาตรฐานความปลอดภัยแล้วจะถูกนำไปทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพ และความสามารถในการใช้รักษาปัญหาการสูญเสียมวลกระดูกในมนุษย์ต่อไปในอนาคต เพื่อพัฒนาไปสู่ เป้าหมายผลผลิตสุดท้ายคือ กระดูกเทียมที่ผลิตจากชีววัสดุในประเทศเพื่อใช้ในการรักษาทางการแพทย์ โดย การเสริมสร้างเนื้อกระดูกทดแทนส่วนที่เสียหายได้ ด้วยต้นทุนที่ต่ำกว่ากระดูกเทียมจากต่างประเทศ อันจะ ช่วยเป็นการยกระดับคุณภาพชีวิตประชากรไทยที่ป่วยให้ดีขึ้น

2. การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

การทดสอบความเป็นพิษของโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูก และเซลล์ ต้นกำเนิด สำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก ที่ทำจากไฟโบรอินในสิ่งมีชีวิต มีรายงานการเข้ากันได้ทาง ชีวภาพตาม ISO10993-6 ของเส้นใยไหมที่ได้จากอุ้งไข่ของแมงมุม, เส้นใยไหมที่ได้จากอุ้งไข่แมงมุมที่มี

การปรับปรุงด้วยเอนไซม์ทริปซิน, เส้นใยไหมที่ได้จากถุงไข่แมงมุมที่มีการปรับปรุงด้วยเอนไซม์ทริปซิน และเอนไซม์โปรติเนส เพื่อเปรียบเทียบกับวัสดุทางการค้า คือ Vicryl® โดยนำวัสดุดังกล่าวฝังที่ชั้นใต้ผิวหนังของหนูวิสตาเป็นระยะเวลา 1, 4 และ 7 สัปดาห์ พบว่า เส้นใยไหมที่มีการปรับปรุงด้วยเอนไซม์มีความเข้ากันได้มากกว่าเส้นใยที่ไม่ได้มีการปรับปรุงด้วยเอนไซม์ [1] Meinel และคณะ [2] ได้ทำการศึกษาฟิล์มที่ทำจากไหมมีการอักเสบน้อยกว่าฟิล์มที่ทำจากคอลลาเจนและจานเลี้ยงเซลล์ (วัสดุควบคุม) เมื่อทดสอบในระดับห้องปฏิบัติการจากการวัดการแสดงออกของยีน Interleukin1 beta (IL-1 β) และ cyclooxygenase 2 (COX-2) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ เมื่อทดสอบในหนูทดลอง พบว่าฟิล์มไหมมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพใกล้เคียงกับฟิล์มคอลลาเจน และยังก่อให้เกิดการอักเสบน้อยกว่าฟิล์ม PLA Fimi และคณะ [3] ได้ทดสอบความเป็นพิษของแผ่นไฮโดรเจลที่ผลิตจากไฟโบรอินในระดับห้องปฏิบัติการโดยใช้เซลล์ osteoblast MG-63 หลังจากระยะเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ทำการวัดการหลั่งของเอนไซม์ lactate dehydrogenase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เซลล์หลั่งออกมาเมื่อเซลล์เมมเบรน ถูกทำลาย และตรวจการหลั่งของ alkaline phosphatase, osteocalcin, TGF- β 1, IL-6 เปรียบเทียบกับวัสดุควบคุมเชิงบวก (สารละลายฟีนอล 0.5%) และวัสดุควบคุมเชิงลบ (0.9% โซเดียมคลอไรด์) พบว่า มีการตรวจพบ TGF- β 1 ในปริมาณไม่มาก เมื่อเทียบกับวัสดุควบคุมเชิงลบ แสดงให้เห็นว่า ไหมที่ขึ้นรูปแบบไฮโดรเจลมีความเข้ากันได้กับเซลล์ จากนั้นจึงได้นำแผ่นไฮโดรเจลที่ผลิตจากไฟโบรอินไปทดสอบโดยการฝังลงบริเวณกระดูกโคนขาของกระต่ายเพื่อศึกษาความสามารถในการสร้างเนื้อกระดูกด้วย ซึ่งพบว่าเมื่อระยะเวลาผ่านไป 12 สัปดาห์ ไหมที่ขึ้นรูปแบบไฮโดรเจล ช่วยให้เกิดกระดูกใหม่คล้ายกับกระดูกปกติมากกว่า poly(D,L lactide-glycolide) ซึ่งเป็นวัสดุควบคุม Panilaitis และคณะ [4] ได้ทำการทดสอบการตอบสนองของเซลล์แมคโครฟาจต่อไหมโดยทำการทดสอบในระดับห้องปฏิบัติการ โดยนำเส้นใยไหมมาทำการเพาะเลี้ยงกับเซลล์แมคโครฟาจ Raw 264.7 เป็นระยะเวลา 1 และ 7 วัน จากนั้นทำการวัดระดับของไซโตไคน์ Tumor necrosis factor (TNF) พบว่าเส้นใยไหมไม่ได้กระตุ้นให้เกิดการหลั่งของ TNF จากเซลล์ Raw 264.7

สำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกที่ทำจากไคโตซาน Cai และคณะ [5] ได้รายงานการเข้ากันได้ของโครงเลี้ยงเซลล์พอลิดีแอลแลกติกแอซิดที่ปรับปรุงพื้นผิวด้วยไคโตซาน โดยนำชิ้นงานฝังที่กระดูกแขน (radius) ของกระต่ายเป็นระยะเวลา 2, 4, 8 และ 12 สัปดาห์ จากนั้นนำมาย้อมสี H&E พบว่า หลังผ่านไป 2 สัปดาห์มีการอักเสบเล็กน้อย ซึ่งมีเซลล์ลิมโฟไซต์และแมคโครฟาจเข้ามาในโครงเลี้ยงเซลล์ หลังจากผ่านไป 4 และ 8 สัปดาห์มีการอักเสบปานกลาง ซึ่งมีเซลล์ลิมโฟไซต์, แมคโครฟาจและพลาสมา แต่หลังจากผ่านไป 12 สัปดาห์ ปฏิกริยาการอักเสบลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับ 8 สัปดาห์ ส่วนโครงเลี้ยงเซลล์พอลิดีแอลแลกติกแอซิดที่ไม่ได้มีการปรับปรุงพื้นผิวด้วยไคโตซานพบว่าปฏิกริยาการอักเสบจะรุนแรงเมื่อระยะเวลาผ่านไป 8

สัปดาห์ แสดงให้เห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์พอลิดีแอลแลคติกแอซิดที่ปรับปรุงพื้นผิวด้วยไคโตซานมีความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อได้มากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์พอลิดีแอลแลคติกแอซิด Hua และคณะ [6] ได้ทำการทดสอบคอมพอสิตไฮดรอกซีอะพาไทต์/ไคโตซาน เพื่อเป็นวัสดุทดแทนกระดูก โดยนำชิ้นงานฝังที่กระดูกหน้าแข้งของกระต่ายเป็นระยะเวลา 2, 4, 8, 12 และ 16 สัปดาห์ จากนั้นนำมาย้อมสี H&E พบว่า หลังผ่านไป 2 สัปดาห์ เกิดการอักเสบอยู่ในชั้นปกติ หลังจากผ่านไป 4 สัปดาห์ เกิดกระดูกใหม่ และเมื่อระยะเวลาผ่านไป 12 และ 16 สัปดาห์ ไม่มีแมคโคฟาจอยู่รอบๆ ชิ้นงานและเกิดกระดูกใหม่ แสดงให้เห็นว่า วัสดุคอมพอสิตไฮดรอกซีอะพาไทต์/ไคโตซาน มีความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อเป็นอย่างดี

3. ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

วิธีดำเนินการวิจัยเดิมที่เสนอไว้ในข้อเสนอโครงการ แบ่งเป็น 2 ส่วนหลัก คือ

(1) การผลิตชิ้นงานโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมที่มีไหมไทยและไคโตซานเป็นองค์ประกอบหลัก 2 สูตร เพื่อใช้ในการทดสอบในโครงการย่อยที่ 1 และ 2 โดยใช้สูตรที่มีสมบัติทางกายภาพ ทางชีวภาพดี ผ่านการคัดเลือกมาจากโครงการฯ ระยะที่ 1 คือ

สูตร 1. โครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมไหมไทย/เจลาติน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์

สูตร 2. โครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์

(2) การทดสอบความปลอดภัยของโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมที่มีไหมไทยและไคโตซานเป็นองค์ประกอบหลักทั้งสองสูตรในข้อ (1) โดยแบ่งเป็น 1. การส่งตรวจมาตรฐานเพื่อรับรองความปลอดภัยสำหรับผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ของหน่วยงานในประเทศ ได้แก่ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) โดยทำการทดสอบ 4 ประเภท คือ Cytotoxicity, Sensitization, Intracutaneous และ Systemic injection tests 2. การตรวจสอบความปลอดภัยโดยคณะผู้วิจัยเอง (in house testing) ซึ่งดำเนินการทดสอบความเป็นพิษ (cytotoxicity) และการทดสอบปฏิกิริยาเฉพาะที่ของโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมภายหลังจากการฝังในสัตว์ทดลอง

ทั้งนี้เมื่อได้ดำเนินการผลิตในข้อ (1) และส่งทดสอบความสามารถในการสร้างกระดูกในสัตว์ทดลอง (in vivo test) ในโครงการย่อยที่ 1 ผลการทดสอบความสามารถในการสร้างกระดูกในสัตว์ทดลอง (สุนัข) โดยใช้โครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์นี้ก่อให้เกิดภาวะอักเสบค่อนข้างรุนแรงในสุนัขทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับการทดสอบโครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ในอีกโครงการร่วมกับทีมวิจัยคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยใช้กระต่ายเป็นสัตว์ทดลอง (รายละเอียดในภาคผนวกท้ายโครงการ) แสดงให้เห็นว่า โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีไคโตซานเป็นองค์ประกอบนี้ก่อให้เกิดการต่อต้านจากระบบภูมิคุ้มกันในสิ่งมีชีวิต ดังนั้นทีมนักวิจัยจึงลงความเห็นว่า ไม่ควรส่งโครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์นี้ไป

ทดสอบความปลอดภัยที่ วว. เนื่องจากการทดสอบดังกล่าวต้องใช้ค่าใช้มาก จึงขอปรับเปลี่ยนเนื้อหาในโครงการโดยได้เพิ่มเนื้อหาในส่วนการทดสอบความปลอดภัยโดยคณะผู้วิจัยเอง โดยใช้โครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมที่มีไหมไทยเป็นองค์ประกอบหลักจาก 1 สูตรเป็น 4 สูตร เพื่อนำผลการทดสอบที่ได้มายืนยันและเปรียบเทียบผลจากขั้นตอนการผลิตแต่ละขั้นอย่างเป็นระบบ และได้เพิ่มงานการพัฒนาโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมแบบใหม่จากชีววัสดุในกลุ่มคอลลาเจน/ไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ โดยทำการทดสอบสมบัติทางกายภาพ และชีวภาพระดับห้องปฏิบัติการ ดังนั้นวิธีดำเนินการวิจัยที่ได้ดำเนินการจริงในโครงการย่อยนี้จะแบ่งเป็น 3 ส่วนหลัก ในหัวข้อ (3.1) – (3.3) ดังนี้

(3.1) การผลิตชิ้นงานโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมที่มีไหมไทยและไคโตซานเป็นองค์ประกอบหลัก 5 สูตร เพื่อใช้ในการทดสอบในโครงการย่อยที่ 1 และ 2 โดยใช้สูตรที่มีสมบัติทางกายภาพ ทางชีวภาพดี ผ่านการคัดเลือกมาจากโครงการฯ ระยะที่ 1 คือ

สูตร 1. โครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมไหมไทย

สูตร 2. โครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมไหมไทย/เจลาติน

สูตร 3. โครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมไหมไทย/ไฮดรอกซีอะพาไทต์

สูตร 4. โครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมไหมไทย/เจลาติน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์

สูตร 5. โครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์

(3.2) การทดสอบความปลอดภัยของโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมที่มีไหมไทยเป็นองค์ประกอบหลักสูตร 1-4 ในข้อ (3.1)

(3.3) การพัฒนาโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมแบบใหม่จากชีววัสดุในกลุ่มไหมไทย/คอลลาเจน/ไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์

ทั้งนี้ เพื่อความต่อเนื่องของเนื้อหา จะแยกการรายงานออกเป็น 2 ส่วนคือ ส่วนการผลิตและทดสอบความปลอดภัยของโครงเลี้ยงเซลล์ (หัวข้อ 3.1 และ 3.2) และส่วนการพัฒนาโครงเลี้ยงเซลล์แบบใหม่ (หัวข้อ 3.3)

3. ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย (ส่วนการผลิตและทดสอบความปลอดภัยของโครงเลี้ยงเซลล์)

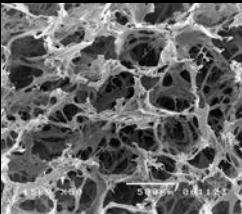
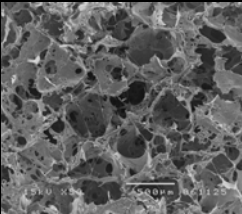
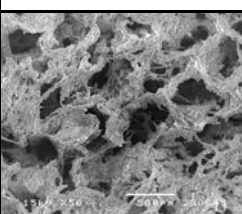
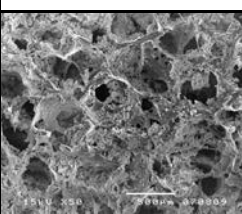
(3.1) การผลิตชิ้นงานโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมที่มีไหมไทยและไคโตซานเป็นองค์ประกอบหลัก 5 สูตร เพื่อใช้ในการทดสอบในโครงการย่อยที่ 1 และ 2

การผลิตโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมที่มีไหมไทยเป็นองค์ประกอบหลักดำเนินการตามขั้นตอนการผลิตที่รายงานไว้ในรายงานฉบับสมบูรณ์ของโครงการฯ ระยะที่ 1 โดยมีการควบคุมมาตรฐานการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมด้วยการควบคุมสถานะในการผลิตทุกขั้นตอน ดังนี้

- เตรียมสารละลายไฟโบรอินโดยนำรังไหมไทยมาต้มด้วย Na_2CO_3 เพื่อละลายเซรีซินหรือกาวไหมออก แล้วนำเส้นใยไฟโบรอินที่ทิ้งไว้ให้แห้งไปละลายด้วย 9.3M LiBr
- นำสารละลายไฟโบรอินที่ได้ไปไดอะไลซ์ด้วยน้ำ DI เป็นเวลา 2-3 วัน เพื่อกำจัด LiBr ออก จะได้สารละลายไฟโบรอินในน้ำ
- นำสารละลายไฟโบรอินมาขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติด้วยเทคนิค salt-leaching โดยใช้เกลือที่คัขนาดแล้ว (600-710 ไมโครเมตร) เป็นตัวทำให้เกิดรูพรุน (porogen)
- ล้างโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่ได้ด้วยน้ำ DI และทิ้งไว้ให้แห้งในตู้สะอาด จะได้โครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมไหมไทย (สูตร 1)
- นำโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้มาปรับปรุงพื้นผิวด้วยเจลาติน ด้วยการเชื่อมโยงพันธะด้วย EDC แช่ในสารละลายเจลาตินความเข้มข้น 0.5% เป็นเวลา 2 ชั่วโมงภายใต้สภาวะสุญญากาศ แล้วนำไปทำแห้งด้วยกระบวนการ freeze-drying หลังจากนั้นทำการเชื่อมขวาง (crosslink) ด้วยวิธี Dehydrothermal (DHT) ที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส ตามด้วยการเชื่อมขวางโดยใช้ EDC ร่วมกับ NHS (14mM 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) และ 5.5mM N-hydroxy-succinimide (NHS)) จะได้โครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมไหมไทย/เจลาติน (สูตร 2)
- นำโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอิน และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่ปรับปรุงพื้นผิวด้านเจลาตินมาสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ด้วยเทคนิคการแช่ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์และสารละลายโซเดียมไฮดรเจนฟอสเฟตสลับกัน โดยแช่โครงเลี้ยงเซลล์ใน 0.2M CaCl_2 เป็นเวลา 30 นาทีภายใต้สภาวะสุญญากาศ หลังจากนั้นนำโครงเลี้ยงเซลล์ไปแช่ใน 0.12M Na_2HPO_4 เป็นเวลา 30 นาทีภายใต้สภาวะสุญญากาศ (นับเป็น 1 รอบของการแช่ใน CaCl_2 และ Na_2HPO_4 สลับกันเพื่อสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์) ทำการแช่ใน CaCl_2 และ Na_2HPO_4 สลับกันซ้ำเป็นจำนวน 4 รอบ จะได้ โครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมไหมไทย/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (สูตร 3) และโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมไหมไทย/เจลาติน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (สูตร 4)

- กลุ่มตรวจสอบโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมที่ผลิตได้ในแต่ละครั้ง (batch) ให้มีความสม่ำเสมอ โดยจะตรวจสอบสัดส่วนน้ำหนักขององค์ประกอบแต่ละชนิดในโครงเลี้ยงเซลล์ให้มีความแตกต่างไม่เกิน 5% ด้วยเทคนิค Thermalgravimetric analysis (TGA) และ Electron dispersive X-ray spectroscopy (EDX) และควบคุมโครงสร้างพื้นฐานความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ให้คงที่ด้วยการส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 2.1 คุณลักษณะของโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมที่เตรียมจากไหมไทย/เจลาติน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์

ชนิดของโครงเลี้ยงเซลล์	อินทรีย์:อนินทรีย์	โครงสร้างพื้นฐาน	สมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์
โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย (สูตร 1) รหัสย่อ : SF	100 : 0		ขนาดรูพรุน: 561 ± 44 ไมโครเมตร ความหนาแน่น: 0.081 ± 0.005 มก/มม ³ ความพรุน: 91.9 ± 0.5 %
โครงเลี้ยงเซลล์คอนจูเกตเจลาติน/ ไฟโบรอินไหมไทย (สูตร 2) รหัสย่อ : CGSF	100 : 0		ขนาดรูพรุน: 485 ± 42 ไมโครเมตร ความหนาแน่น: 0.093 ± 0.006 มก/มม ³ ความพรุน: 90.7 ± 0.6 %
โครงเลี้ยงเซลล์ไฮดรอกซีอะพาไทต์/ ไฟโบรอินไหมไทย (สูตร 3) รหัสย่อ : SF4	51 ± 0.81 : 49 ± 0.81		ขนาดรูพรุน: 300 ± 58 ไมโครเมตร ความหนาแน่น: 0.130 ± 0.009 มก/มม ³ ความพรุน: 87.0 ± 0.9 %
โครงเลี้ยงเซลล์ไฮดรอกซีอะพาไทต์/ คอนจูเกตเจลาติน/ไฟโบรอิน ไหมไทย (สูตร 4) รหัสย่อ : CGSF4	55 ± 1 : 45 ± 1		ขนาดรูพรุน: 286 ± 82 ไมโครเมตร ความหนาแน่น: 0.146 ± 0.009 มก/มม ³ ความพรุน: 85.4 ± 0.9 %

ส่วนการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ จะทำการเตรียมจากไคติน และควบคุม %degree of deacetylation ของไคโตซานที่ผลิตขึ้นให้คงที่ แล้วนำไปขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ โดยควบคุมสถานะในการผลิต ดังรายละเอียดดังนี้

- นำไคตินจากแกนปลาหมึกมาแช่กรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ เป็นเวลา 1 วัน เพื่อกำจัดคราบหินปูนบนไคติน จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นจนเป็นกลาง

- นำไคตินที่ผ่านขั้นตอนด้านบนมาแล้ว มาแช่ใน 1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ เป็นเวลา 1 วัน เพื่อกำจัดโปรตีนที่ไม่ต้องการ จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นจนเป็นกลาง

- เปลี่ยนไคตินให้เป็นไคโตซาน โดยนำไคตินที่ผ่านขั้นตอนการล้างด้วยไฮโดรคลอริก และโซเดียมไฮดรอกไซด์แล้ว มาแช่ใน 50 % สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เป็นเวลา 2 วัน เพื่อกำจัดหมู่ acetyl ออก (deacetylation) จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นจนเป็นกลาง ทำให้แห้งก่อนนำไปเก็บ

- ตรวจวัด % deacetylation ของไคโตซาน โดยนำสารละลายไคโตซาน 0.01 กรัม ไคโตซานใน 100 มิลลิลิตร ของ 0.01 โมลาร์ กรดอะซิติก มาวัดค่า absorbance (A) ด้วยเครื่อง Spectroscope และนำไปคำนวณความเข้มข้นของ N-acetyl-D-glucosamine และ % deacetylation ของไคโตซาน

- ขึ้นรูปไคโตซานร่วมกับ HA ให้เป็นโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติ โดยนำสารละลาย 1% ไคโตซาน 20 มิลลิลิตร มากวนด้วยเครื่อง magnetic stirrer หยดสารละลาย 5 โมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ ปริมาณ 0.925 มิลลิลิตร ด้วยไมโครปิเปต จากนั้นตามด้วย 85 % กรดฟอสฟอริก ปริมาตร 0.19 มิลลิลิตร แล้วค่อยๆเติม 1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ ปริมาณ 9.78 มิลลิลิตรโดยใช้บิวเรตที่อัตราเร็วประมาณ 2.1 มิลลิลิตรต่อนาที ทำซ้ำจำนวน 50 ครั้ง ใช้สารตั้งต้น (1% ไคโตซาน) รวม 1000 มิลลิลิตร

- ปั่นกวนที่ 1200 รอบ/นาที เมื่อตั้งทิ้งไว้จะได้ตะกอนเป็น slurry สีขาวขุ่น แยก slurry ออกมาล้างด้วยน้ำกลั่นจนเป็นกลาง

- นำ slurry บรรจุลง PPT Test tube ทำการปั่นเหวี่ยงที่ 2,500 รอบ เป็นเวลา 30 นาที และนำไปแช่แข็งที่ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปไลโอไฟไลซ์

- ทำการตัดแบ่งวัสดุให้ได้ลักษณะทรงหริษญู และท่อนเพื่อเตรียมนำไปทำการปลดเชื้อเพื่อใช้ทดสอบต่อไป

(3.2) การทดสอบความปลอดภัยของเครื่องเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมที่มีไหมไทยเป็นองค์ประกอบหลัก

สูตร 1-4 ในข้อ (3.1)

การทดสอบความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ที่ต้องนำไปใช้ในร่างกายมนุษย์ตามมาตรฐานนี้จะดำเนินการทดสอบ 2 ทางที่อ้างอิงตามมาตรฐาน ISO/EN 10993 ซึ่งสามารถทำได้ในประเทศไทย คือ การส่งตรวจมาตรฐานเพื่อรับรองความปลอดภัยสำหรับผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ของหน่วยงานในประเทศ ได้แก่ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) โดยได้วางแผนที่จะทำการทดสอบ 4 ประเภท คือ Cytotoxicity, Skin sensitization, Acute dermal irritation และ Systemic injection tests สำหรับเครื่องเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมไหมไทย/เจลาติน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (สูตร 4) โดยอ้างอิงตามวิธีการทดสอบของ วว. และทางที่ 2 เป็นการตรวจสอบโดยคณะผู้วิจัยเอง (in house testing) ซึ่งได้ดำเนินการทดสอบ 1) ความเป็นพิษ(cytotoxicity) และ 2) การทดสอบปฏิกิริยาเฉพาะที่ ของเครื่องเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมภายหลังการฝังในสัตว์ทดลอง (local effects after implantation) โดยใช้เครื่องเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมที่มีไหมไทยเป็นองค์ประกอบหลักทั้ง 4 สูตร

3.2.1. การทดสอบความเป็นพิษ (cytotoxicity) ตามมาตรฐาน ISO 10993-5 (1999)

การตรวจสอบความเป็นพิษของเครื่องเลี้ยงเซลล์ใช้วิธี indirect method แบบ elution titration test ซึ่งเป็นการสกัดตัวอย่างที่ต้องการทดสอบโดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์เป็นสารสกัด จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาทำการเจือจางในอัตราส่วนต่างๆ และทดสอบกับเซลล์ที่เลี้ยงเป็นแบบ monolayer ตามมาตรฐาน ISO 10993-5 (1999) เพื่อเปรียบเทียบความเป็นพิษของตัวอย่างที่ต้องการทดสอบกับวัสดุควบคุมเชิงบวก และเชิงลบ

ขั้นตอนการทดลอง

- นำเครื่องเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมที่ผลิตจากไฟโบรอินไหมไทย (SF), เครื่องเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่ผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์จำนวน 4 รอบ (SF4), เครื่องเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่ปรับปรุงพื้นผิวด้วยเจลาติน (CGSF) และเครื่องเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่ปรับปรุงพื้นผิวด้วยเจลาตินและผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์จำนวน 4 รอบ (CGSF4) ไปแช่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (Dulbecco's modified eagle's liquid medium without serum, DMEM without serum) ในอัตราส่วน 2 มิลลิลิตรต่อเครื่องเลี้ยง ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อสกัดสารออกจากเครื่องเลี้ยงเซลล์ (เรียกสารละลายนี้ว่า ตัวอย่างสารสกัด)

- เพาะเลี้ยงเซลล์ L929 mouse fibroblast ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 24 หลุม (50,000 เซลล์ต่อหลุม) โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ทำการเพาะเลี้ยงในตู้เพาะเชื้อ (incubator) ซึ่งมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ

5 ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์โตและกระจายตัวแบบ monolayer จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก

- เติมตัวอย่างสารสกัด (100%), ตัวอย่างสารสกัดที่ได้เจือจาง (50%, 25%, 12.5%), ตัวอย่างควบคุมเชิงลบ(สารละลาย Zinc acetate ที่ความเข้มข้น 20 ppm) และ ตัวอย่างควบคุมเชิงบวก (อาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ไม่มีซีรัม) ปริมาณ 350 ไมโครลิตร

- นำไปบ่มในตู้เพาะเชื้อ (incubator) ซึ่งมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

- ตรวจสอบจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตด้วยเทคนิค MTT assay

- เซลล์ในแต่ละหลุมจะถูกนำมาตรวจสอบด้วย inverse microscope เพื่อดูลักษณะของเซลล์ และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต แล้วนำไปประเมินเปรียบเทียบว่า ตัวอย่างสารสกัดที่ได้จากโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมมีความเป็นพิษต่อเซลล์มากหรือน้อยเพียงใด เทียบกับตัวควบคุมเชิงลบ และตัวควบคุมเชิงบวก ตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2.2 การประเมินระดับความเป็นพิษ (ระดับความระคายเคือง) ต่อเซลล์

ระดับ	ปฏิกิริยา	สภาพของเซลล์
0	ไม่เป็นพิษ/ไม่ระคายเคือง	ไม่มีเซลล์ตาย
1	เป็นพิษน้อยมาก/ระคายเคืองเล็กน้อย	เซลล์ตายไม่เกินร้อยละ 20 ของเซลล์ทั้งหมด
2	เป็นพิษน้อย/ระคายเคืองน้อย	เซลล์ตายไม่เกินร้อยละ 50 ของเซลล์ทั้งหมด
3	เป็นพิษปานกลาง/ระคายเคืองปานกลาง	เซลล์ตายไม่เกินร้อยละ 70 ของเซลล์ทั้งหมด
4	เป็นพิษรุนแรง/ระคายเคืองอย่างรุนแรง	เซลล์ตายเกือบทั้งหมด

ที่มา : United States Pharmacopoeia 24, Chapter 87; Biological Reactivity Test, In vitro

3.2.2. การทดสอบปฏิกิริยาเฉพาะที่ (local effect) ของโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมภายหลังจากการฝังในสัตว์ทดลองตามมาตรฐาน ISO 10993-6 (2007)

ขั้นตอนการทดลอง

- นำโครงเลี้ยงเซลล์ใหม่ไทยทั้ง 4 ชนิด มาทำการให้ปลอดเชื้อ (sterilization) ด้วยก๊าซเอธิลีนออกไซด์
- ใช้หนู Wistar จำนวน 36 ตัว เพศเมีย อายุ 7-9 สัปดาห์ โดยจะทำการฝัง 2 และ 4 สัปดาห์ ซึ่งในการทดสอบจะทำการเปรียบเทียบกับวัสดุควบคุม คือ Gelfoam® ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ ที่ผลิตจากเจลาตินเป็นหลัก สำหรับใช้ในการห้ามเลือด
- ทำการสลบหนูโดยใช้ยาสลบ Thiopental Sodium ความเข้มข้น 60 มก./มล. ในปริมาณ 10% ของน้ำหนักหนู (กรัม) ฉีดเข้าทางเยื่อช่องท้อง
- ฝังชิ้นงานใต้ผิวหนังตามขั้นตอนแสดงในรูปที่ 1 โดยมีรายละเอียดดังนี้
 - โคนขนบริเวณด้านหลังที่เราจะทำการฝังชิ้นงาน จากนั้นใช้น้ำยาเบตาดีนและแอลกอฮอล์เช็ดทำความสะอาด
 - ใช้มีดเบอร์ 10 กรีดชั้นผิวหนังโดยแนวกรีดให้ตั้งฉากกับกระดูกสันหลัง ความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร
 - ใช้กรรไกรแหวกชั้นใต้ผิวหนังให้เป็นโพรงที่จะสามารถใส่วัสดุที่จะฝังได้ โดยในหนู 1 ตัว จะทำการฝัง 2 ชิ้นงาน คือ ด้านขวาจะทำการฝังวัสดุตัวอย่าง ส่วนทางด้านซ้ายจะทำการฝังวัสดุควบคุม
 - หลังจากสอดชิ้นงาน เย็บปิดชั้นผิวหนังด้วยไหมเย็บแผล จากนั้นทำความสะอาดแผลด้วยเบตาดีน
- ทำการสังเกตการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพหลังจากการฝังชิ้นงาน เมื่อถึงระยะเวลาการเก็บชิ้นงาน หนูจะถูกทำให้ตายโดยการให้ยาสลบ overdose Thiopental Sodium ฉีดเข้าทางเยื่อช่องท้อง

- ทำการถ่ายรูปและประเมินลักษณะของชิ้นงานด้วยตาเปล่า เช่น การบวม แดง และเป็นหนอง เป็นต้น
- เก็บชิ้นงานและเนื้อเยื่อบริเวณรอบชิ้นงาน นำไป fixed ด้วย 10% formalin เพื่อนำไปย้อม H&E (Hemotoxylin & Eosin) ต่อไป
- ประเมินลักษณะทางพยาธิวิทยาด้วยการให้คะแนนชิ้นเนื้อเยื่อรอบๆ โครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมที่ย้อมด้วยวิธี H&E โดยแพทย์สาขาพยาธิวิทยา โดยให้คะแนนทั้งชนิดของเซลล์อักเสบและการตอบสนอง

4. ผลการวิจัย (ส่วนการผลิตและทดสอบความปลอดภัยของโครงเลี้ยงเซลล์)

4.1 ผลการตรวจมาตรฐานเพื่อรับรองความปลอดภัยสำหรับโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมใหม่ไทย/เจลาติน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (สูตร 4) โดย สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

ชื่อตัวอย่าง : TSF-bone substitute

จำนวนชิ้นตัวอย่างที่ส่งทดสอบ : 115 ชิ้น

ประเภท และผลการทดสอบความปลอดภัย 4 ประเภท สรุปไว้ดังแสดงในตารางที่ 2.1 และรายละเอียดการทดสอบมาตรฐานเพื่อรองรับความปลอดภัยและผลการทดสอบแต่ละประเภทแสดงไว้ในภาคผนวก

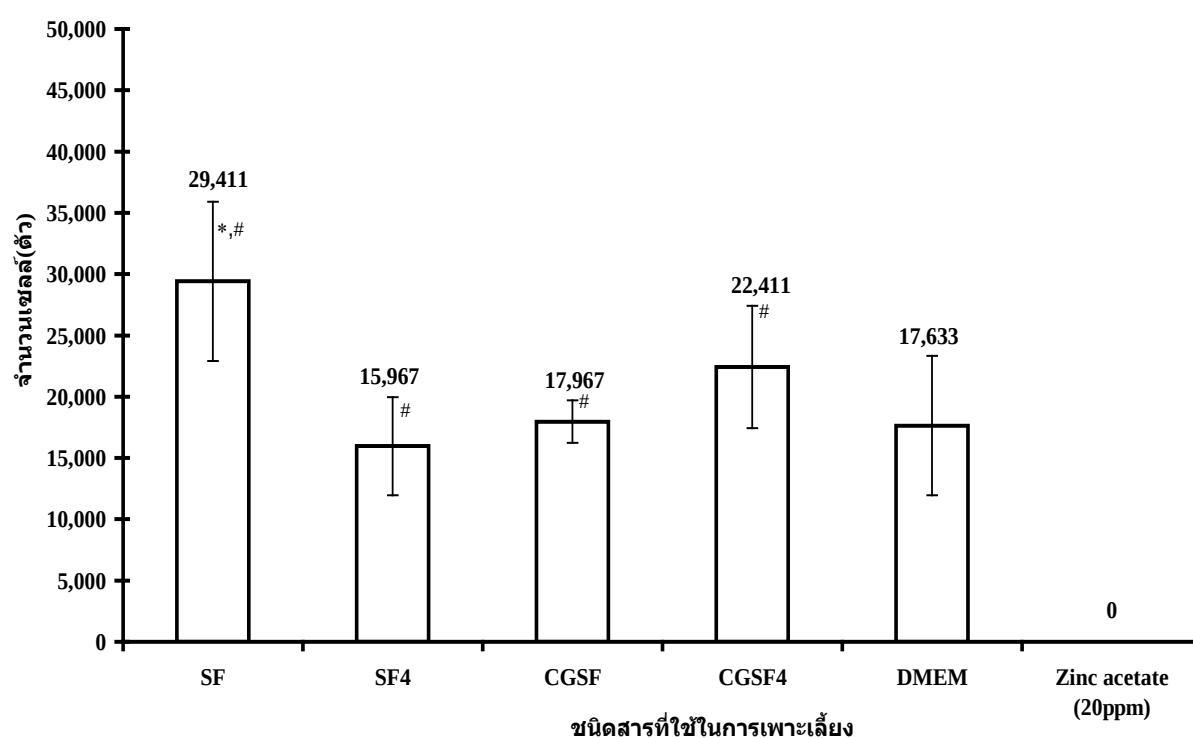
ตารางที่ 2.3 ประเภท มาตรฐานวิธีการทดสอบและผลการทดสอบความปลอดภัยจาก วว.

ประเภทการทดสอบ	มาตรฐานวิธีการทดสอบ	ผลการทดสอบ
Safety test (Systemic injection tests)	US Pharmacopeias: Safety Tests-Biological, Biological Reactivity Test, <i>In Vivo</i> (88), USP NF (2000) and ISO(2002)-10993-12	All treated mice showed normal signs and no mortality occurred throughout a 14 day observation period. The mean of body weight gain of mice was not significant difference in both groups. Necropsy of all survival mice at the termination also did not show any pathological changes.
Acute dermal irritation test	Test Guideline No.404 of the OECD Guidelines for Testing of Chemicals (2002) and ISO(2002)-10993-12	All three treated rabbit did not exhibit the dermal irritation.
Skin sensitization test	Maximization Test for Delayed Hypersensitivity for the ISI(2002)-10993-10	There was no skin erythema and swelling of the treatment group. TSF-bone substitute was not considered to be skin sensitizing to the guinea pigs.
Cytotoxicity test	อยู่ระหว่างดำเนินการทดสอบ	ยังไม่ได้รับผล

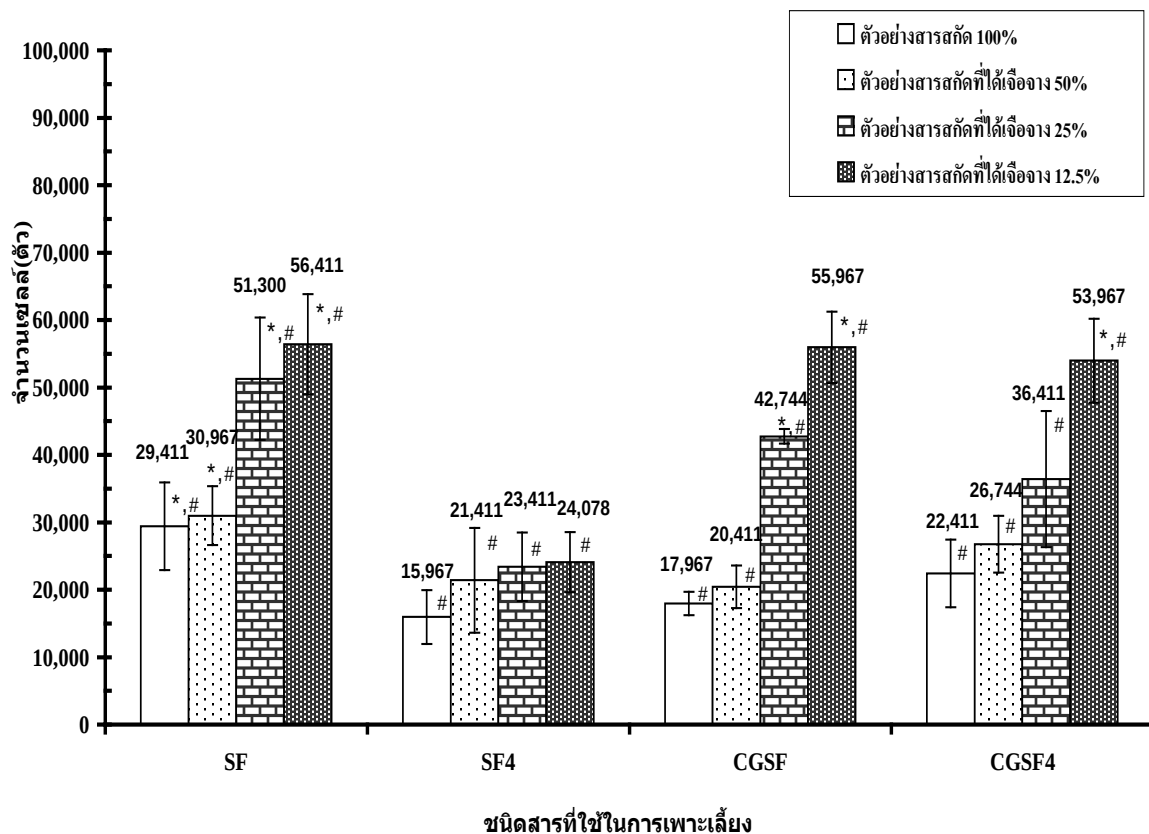
4.2 ผลการตรวจสอบความปลอดภัยโดยคณะผู้วิจัยเอง (in house testing)

4.2.1. การทดสอบความเป็นพิษ (cytotoxicity) ตามมาตรฐาน ISO 10993-5 (1999)

ผลการทดลองในรูปที่ 2.1 แสดงผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมด้วยการตรวจจำนวนเซลล์ L929 ที่มีชีวิตอยู่ เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงด้วยสารสกัดของโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมทั้ง 4 ชนิด เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ในสารสกัดของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอิน (SF), โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่สะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์จำนวน 4 รอบ (SF4), โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่ปรับปรุงพื้นผิวด้วยเจลาติน (CGSF), โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่ปรับปรุงพื้นผิวด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์จำนวน 4 รอบ (CGSF4) มีจำนวนเซลล์ L929 ที่ยังมีชีวิตอยู่ 29,411, 15,967, 17,967, 22,411 เซลล์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมเชิงบวก (DMEM without serum) ซึ่งมีจำนวนเซลล์ 17,633 เซลล์ และ Zinc acetate 20 ppm ที่ใช้เป็นตัวอย่างควบคุมเชิงลบ ซึ่งไม่พบจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเลย



รูปที่ 2.1 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยสารสกัดของโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมทั้ง 4 ชนิด, ตัวอย่างควบคุมเชิงบวก (อาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ไม่มีซีรัม) และตัวอย่างควบคุมเชิงลบ (สารละลาย Zinc acetate 20 ppm) * และ # แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ P-Value < 0.05 เทียบกับตัวอย่างควบคุมเชิงบวก (DMEM) และตัวอย่างควบคุมเชิงลบ (Zinc acetate 20 ppm) ตามลำดับ



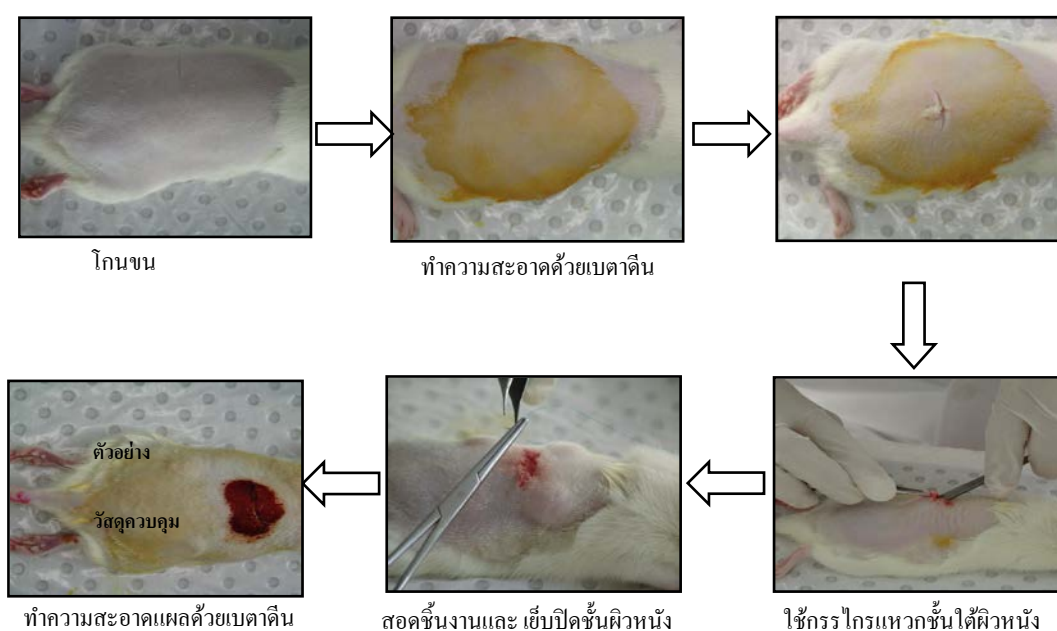
รูปที่ 2.2 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยสารสกัดและสารสกัดเจือจางของโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 4 ชนิด (50%, 25%, 12.5%) * และ # แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ P-Value < 0.05 เทียบกับตัวอย่างควบคุมเชิงบวก (DMEM) และ ตัวอย่างควบคุมเชิงลบ (Zince acetate 20 ppm) ตามลำดับ

เมื่อพิจารณารูปที่ 2.2 ซึ่งแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ของโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 4 ชนิด โดยเปรียบเทียบตัวอย่างของสารสกัด 100% และตัวอย่างของสารสกัดที่ได้เจือจางความเข้มข้นลงเป็นลำดับคือ 50%, 25%, 12.5% พบว่า เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดที่ได้จากโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 4 ชนิดลดลง จำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่เพิ่มขึ้นตามลำดับ และมีจำนวนมากกว่าจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตที่เลี้ยงด้วยตัวควบคุมเชิงบวก (DMEM without serum)

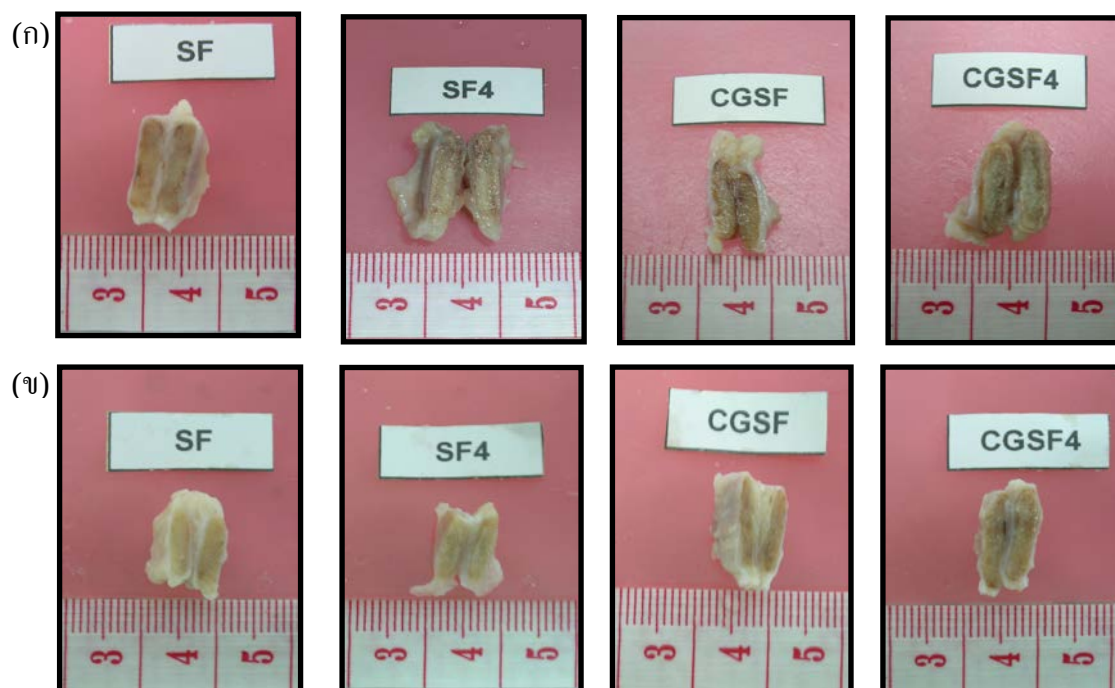
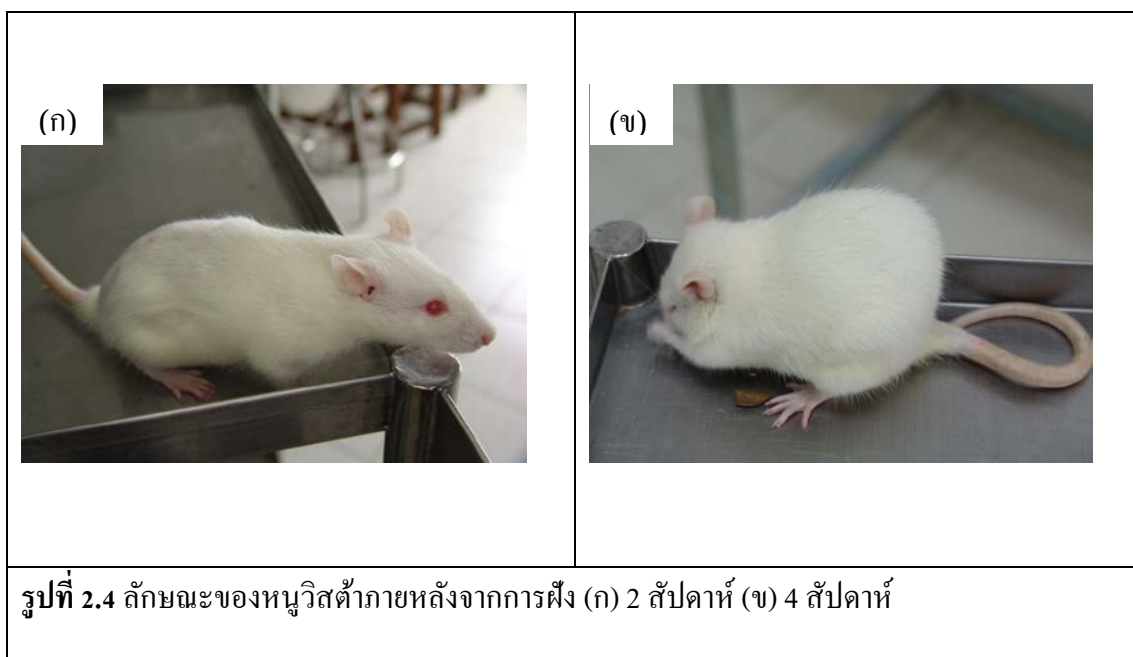
4.2.2. การทดสอบปฏิกิริยาเฉพาะที่ (local effect) ของโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมภายหลังจากการฝังในสัตว์ทดลองตามมาตรฐาน ISO 10993-6 (2007)

ก. การประเมินลักษณะของชิ้นงานโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยตาเปล่า

หลังจากฝังโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 4 ชนิด ในชั้นใต้ผิวหนังของหนูวิสตา (ดังแสดงในรูปที่ 2.3) พบว่า ภายหลังจากการฝัง หนูมีสุขภาพแข็งแรงดี ไม่มีการบวมและแดง ดังแสดงในรูปที่ 2.4 เมื่อครบระยะเวลาการเก็บชิ้นงาน (2 และ 4 สัปดาห์) พบว่าชิ้นงานที่ได้ยังคงสภาพเป็นชิ้นเดียว เมื่อทำการตัดขวางชิ้นงานโครงเลี้ยงเซลล์ดังแสดงในรูปที่ 2.5 จะพบว่าภายในโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอิน (SF) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่ปรับปรุงพื้นผิวด้วยเจลาติน (CGSF) มีสีลักษณะเหลือง ขณะที่โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่สะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์จำนวน 4 รอบ (SF4) และ โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่ปรับปรุงพื้นผิวด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์จำนวน 4 รอบ (CGSF4) มีสีขาวปนเหลืองอ่อน ซึ่งคล้ายกับชิ้นงานก่อนนำไปฝัง



รูปที่ 2.3 การฝังชิ้นงานโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมชั้นใต้ผิวหนังหนูวิสตา (Subcutaneous Implantation)



รูปที่ 2.5 ลักษณะของชิ้นงานโครงเลี้ยงเซลล์ตัดขวางภายหลังจากการฝังใต้ผิวหนังหนูวิสต้าเป็นระยะ

เวลา (ก) 2 สัปดาห์ และ (ข) 4 สัปดาห์

ข. การประเมินลักษณะทางพยาธิวิทยา

ภายหลังจากการฝังชิ้นงานเป็นเวลา 2 และ 4 สัปดาห์ ได้ทำการประเมินปฏิกิริยาการอักเสบบริเวณรอบๆชิ้นงานโครงเลี้ยงเซลล์เทียบกับวัสดุควบคุมคือ Gelfoam® ซึ่งเป็นวัสดุทางการแพทย์ที่มีจำหน่ายเชิงพาณิชย์ โดยใช้ลักษณะการประเมินทางพยาธิวิทยาตามมาตรฐาน ISO10993-6 ซึ่งเป็นการประเมินชนิดของเซลล์อักเสบและการตอบสนองแบบ semi-quantitative รายละเอียดแสดงในตารางที่ 2.4 ทั้งนี้ตัวอย่างทั้งหมดจะได้รับการประเมินโดยแพทย์สาขาพยาธิวิทยา โดยไม่ระบุชนิดตัวอย่างให้ทราบ (blind samples) โดยทำการประเมินสองครั้งที่ระยะเวลาห่างกัน 2 เดือน และให้คะแนนระดับความรุนแรงของโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 4 ชนิด เทียบกับวัสดุควบคุม ภายหลังจากการฝังเป็นระยะเวลา 2 และ 4 สัปดาห์ ดังแสดงในตารางที่ 2.5-2.6 ภาพตัดขวางของตัวอย่างซึ่งย้อมด้วย H&E ภายหลังจากการฝังชิ้นงานเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ แสดงในรูปที่ 2.6-2.9 เปรียบเทียบกับภาพตัดขวางของวัสดุควบคุม(Gelfoam®) ในรูปที่ 2.10 ส่วนภาพตัดขวางของตัวอย่างและวัสดุควบคุมซึ่งย้อมด้วย H&E ภายหลังจากการฝังชิ้นงานเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ แสดงในรูปที่ 2.11-2.14 และ 2.15 ตามลำดับ

ตารางที่ 2.3 : Semi-quantitative evaluation system according to ISO10993-6

ตารางที่ 2.3-1 ประเมินการตอบสนองต่อเนื้อเยื่อของโครงเลี้ยงเซลล์ SF และ SF4 ภายหลังจากการฝัง 2 สัปดาห์ (การประเมินครั้งแรก)

Test sample : SF,SF4	Implantation interval : 2 weeks															
Animal number :	N=1		N=2		N=3		N=4		N=1		N=2		N=3		N=4	
	SF	Gel	SF	Gel	SF	Gel	SF	Gel	SF4	Gel	SF4	Gel	SF4	Gel	SF4	Gel
Polymorphonuclear cell	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lymphocytes	0	0	1	1	0	1	1	2	0	1	0	0	0	0	2	2
Plasma cells	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Macrophages	1	0	1	2	2	0	3	2	2	3	0	2	1	0	2	3
Giant cells	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	2
Necrosis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sub X2	2	0	4	6	4	2	8	8	6	8	0	6	2	0	10	14
Neovascularisation	0	0	1	3	2	0	3	0	2	3	2	3	1	0	2	2
Fibrosis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Fatty infiltrate	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sub-total	0	1	1	3	2	0	3	0	2	3	2	3	1	0	2	3
Total	2	1	5	9	6	2	11	8	8	11	2	9	3	0	12	17
Test-Control	1		-4		4		3		-3		-7		3		-5	
Ranking of irritant	Non-irritant		Non-irritant		Slight-irritant		Slight-irritant		Non-irritant		Non-irritant		Slight-irritant		Non-irritant	

หมายเหตุ

SF - โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอิน

SF4 - โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่ผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์จำนวน 4 รอบ (SF4)

CGSF - โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่ปรับปรุงพื้นผิวด้วยเจลาติน

CGSF4 - โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่ปรับปรุงพื้นผิวด้วยเจลาตินและผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์จำนวน 4 รอบ

Gel - Gelfoam®

X - ไม่พบวัสดุ

ตารางที่ 2.3-2 ประเมินการตอบสนองต่อเนื้อเยื่อของโครงเลี้ยงเซลล์ CGSF และ CGSF4 ภายหลังจากการฝัง 2 สัปดาห์ (การประเมินครั้งแรก)

Test sample : CGSF, CGSF4	Implantation interval : 2 weeks															
Animal number :	N=1		N=2		N=3		N=4		N=1		N=2		N=3		N=4	
	CGSF	Gel	CGSF	Gel	CGSF	Gel	CGSF	Gel	CGSF4	Gel	CGSF4	Gel	CGSF4	Gel	CGSF4	Gel
Polymorphonuclear cell	0	0	0	0	0	0	0	X	0	0	0	0	0	0	0	0
Lymphocytes	0	0	0	0	0	0	0	X	1	2	0	0	1	1	1	1
Plasma cells	0	0	0	0	0	0	0	X	1	0	0	0	0	0	0	0
Macrophages	0	2	0	0	2	0	2	X	2	2	0	2	2	1	3	3
Giant cells	0	1	0	0	0	0	0	X	1	0	0	0	1	1	0	1
Necrosis	0	0	0	0	0	0	0	X	0	0	0	0	0	0	0	0
Sub X2	0	6	0	0	4	0	4	X	10	8	0	4	8	6	8	10
Neovascularisation	0	2	3	1	1	0	1	X	2	1	0	2	2	0	1	0
Fibrosis	0	1	0	0	0	0	0	X	0	1	0	1	1	0	0	0
Fatty infiltrate	0	0	0	0	0	0	0	X	0	0	0	0	0	0	0	0
Sub-total	0	3	3	1	1	0	1	X	2	2	0	3	3	0	1	0
Total	0	9	3	1	5	0	5	X	12	10	0	7	11	6	9	10
Test-Control	-9		2		5		-		2		-7		5		-1	
Ranking of irritant	Non-irritant		Non-irritant		Slight-irritant		-		Non-irritant		Non-irritant		Slight-irritant		Non-irritant	

หมายเหตุ

SF - โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอิน

SF4 - โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่สะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์จำนวน 4 รอบ (SF4)

CGSF - โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่ปรับปรุงพื้นผิวด้วยเจลาติน

CGSF4 - โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่ปรับปรุงพื้นผิวด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์จำนวน 4 รอบ

Gel - Gelfoam®

X - ไม่พบวัสดุ

ตารางที่ 2.3-3 ประเมินการตอบสนองต่อเนื้อเยื่อของโครงเลี้ยงเซลล์ SF และ SF4 ภายหลังจากการฝัง 2 สัปดาห์ (การประเมินครั้งที่สอง)

Test sample : SF,SF4	Implantation interval : 2 weeks															
Animal number :	N=1		N=2		N=3		N=4		N=1		N=2		N=3		N=4	
	SF	Gel	SF	Gel	SF	Gel	SF	Gel	SF4	Gel	SF4	Gel	SF4	Gel	SF4	Gel
Polymorphonuclear cell	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lymphocytes	0	0	0	1	0	2	0	2	0	1	0	0	0	0	0	2
Plasma cells	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Macrophages	1	0	1	2	1	2	2	2	2	2	0	2	1	0	2	2
Giant cells	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Necrosis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sub X2	2	0	2	6	2	8	4	8	4	6	0	6	2	0	4	8
Neovascularisation	0	1	1	3	2	0	2	0	1	3	2	2	2	0	3	2
Fibrosis	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fatty infiltrate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sub-total	0	1	2	5	2	0	2	0	1	3	2	2	2	0	3	2
Total	2	1	4	11	4	8	6	8	5	9	2	8	4	0	7	10
Test-Control	1		-7		-4		-2		-4		-6		4		-3	
Ranking of irritant	Non-irritant		Non-irritant		Non-irritant		Non-irritant		Non-irritant		Non-irritant		Slight irritant		Non-irritant	

หมายเหตุ

SF - โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอิน

SF4 - โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่สะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์จำนวน 4 รอบ (SF4)

CGSF - โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่ปรับปรุงพื้นผิวด้วยเจลาติน

CGSF4 - โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่ปรับปรุงพื้นผิวด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์จำนวน 4 รอบ

Gel - Gelfoam®

X - ไม่พบวัสดุ

ตารางที่ 2.3-4 ประเมินการตอบสนองต่อเนื้อเยื่อของโครงเลี้ยงเซลล์ CGSF และ CGSF4 ภายหลังจากการฝัง 2 สัปดาห์ (การประเมินครั้งที่สอง)

Test sample : CGSF, CGSF4	Implantation interval : 2 weeks															
Animal number :	N=1		N=2		N=3		N=4		N=1		N=2		N=3		N=4	
	CGSF	Gel	CGSF	Gel	CGSF	Gel	CGSF	Gel	CGSF4	Gel	CGSF4	Gel	CGSF4	Gel	CGSF4	Gel
Polymorphonuclear cell	0	0	0	0	0	0	0	X	0	0	0	0	0	0	0	0
Lymphocytes	0	1	0	0	0	0	0	X	0	2	0	2	2	1	0	1
Plasma cells	0	0	0	0	0	0	0	X	0	0	0	0	0	0	0	0
Macrophages	2	2	1	0	1	0	2	X	2	2	0	1	2	1	2	2
Giant cells	0	0	0	0	0	0	0	X	0	0	0	0	0	0	0	0
Necrosis	0	0	0	0	0	0	0	X	0	0	0	0	0	0	0	0
Sub X2	4	6	2	0	2	0	4	X	4	8	0	6	8	4	4	6
Neovascularisation	2	2	2	1	1	0	1	X	1	2	0	2	1	0	0	0
Fibrosis	0	2	0	0	0	0	0	X	0	0	0	0	1	0	0	0
Fatty infiltrate	0	0	0	0	0	0	0	X	0	0	0	0	0	0	0	0
Sub-total	2	4	2	1	1	0	1	X	1	2	0	2	2	0	0	0
Total	6	10	4	1	3	0	5	X	5	10	0	8	10	4	4	6
Test-Control	-4		3		3		-		-5		-8		6		-2	
Ranking of irritant	Non-irritant		Slight irritant		Slight irritant		-		Non-irritant		Non-irritant		Slight irritant		Non-irritant	

หมายเหตุ

SF - โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอิน

SF4 - โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่ผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์จำนวน 4 รอบ (SF4)

CGSF - โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่ปรับปรุงพื้นผิวด้วยเจลาติน

CGSF4 - โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่ปรับปรุงพื้นผิวด้วยเจลาตินและผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์จำนวน 4 รอบ

Gel - Gelfoam®

X - ไม่พบวัสดุ

ตารางที่ 2.3-5 ประเมินการตอบสนองต่อเนื้อเยื่อของโครงเลี้ยงเซลล์ SF และ SF4 ภายหลังจากการฝัง 4 สัปดาห์ (การประเมินครั้งแรก)

Test sample : SF,SF4	Implantation interval : 4 weeks															
Animal number :	N=1		N=2		N=3		N=4		N=1		N=2		N=3		N=4	
	SF	Gel	SF	Gel	SF	Gel	SF	Gel	SF4	Gel	SF4	Gel	SF4	Gel	SF4	Gel
Polymorphonuclear cell	0	0	0	X	0	X	0	X	0	X	0	X	0	0	0	X
Lymphocytes	0	0	0	X	0	X	0	X	0	X	0	X	0	0	0	X
Plasma cells	0	0	0	X	0	X	0	X	0	X	0	X	0	0	0	X
Macrophages	0	1	0	X	0	X	0	X	0	X	1	X	1	0	0	X
Giant cells	0	0	0	X	0	X	0	X	0	X	0	X	0	0	0	X
Necrosis	0	0	0	X	0	X	0	X	0	X	0	X	0	0	0	X
Sub X2	0	2	0	X	0	X	0	X	0	X	2	X	2	0	0	X
Neovascularisation	1	0	1	X	1	X	0	X	2	X	1	X	1	0	0	X
Fibrosis	0	0	0	X	0	X	0	X	0	X	0	X	0	0	0	X
Fatty infiltrate	0	0	0	X	0	X	0	X	0	X	0	X	0	0	0	X
Sub-total	1	0	1	X	1	X	0	X	2	X	1	X	1	0	0	X
Total	1	2	1	X	1	X	0	X	2	X	3	X	3	0	0	X
Test-Control	-1		-		-		-		-		-		3		-	
Ranking of irritation	Non-irritant		-		-		-		-		-		Slight-irritant		-	

หมายเหตุ

SF - โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอิน

SF4 - โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่สะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์จำนวน 4 รอบ (SF4)

CGSF - โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่ปรับปรุงพื้นผิวด้วยเจลาติน

CGSF4 - โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่ปรับปรุงพื้นผิวด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์จำนวน 4 รอบ

Gel - Gelfoam®

X - ไม่พบวัสดุ

ตารางที่ 2.3-6 ประเมินการตอบสนองต่อเนื้อเยื่อของโครงเลี้ยงเซลล์ CGSF และ CGSF4 ภายหลังจากการฝัง 4 สัปดาห์ (การประเมินครั้งแรก)

Test sample : CGSF, CGSF4	Implantation interval : 4 weeks															
Animal number :	1		2		3		4		1		2		3		4	
	CGSF	Gel	CGSF	Gel	CGSF	Gel	CGSF	Gel	CGSF4	Gel	CGSF4	Gel	CGSF4	Gel	CGSF4	Gel
Polymorphonuclear cell	0	X	0	0	0	X	0	X	0	X	0	X	0	X	0	X
Lymphocytes	1	X	0	0	0	X	0	X	0	X	0	X	0	X	0	X
Plasma cells	0	X	0	0	0	X	0	X	0	X	0	X	0	X	0	X
Macrophages	1	X	2	0	2	X	2	X	1	X	1	X	0	X	0	X
Giant cells	0	X	0	0	0	X	0	X	0	X	0	X	0	X	0	X
Necrosis	0	X	0	0	0	X	0	X	0	X	0	X	0	X	0	X
Sub X2	4	X	4	0	4	X	4	X	2	X	2	X	0	X	0	X
Neovascularisation	1	X	0	0	1	X	1	X	1	X	0	X	0	X	0	X
Fibrosis	0	X	0	0	0	X	0	X	0	X	0	X	0	X	0	X
Fatty infiltrate	0	X	0	0	0	X	0	X	0	X	0	X	0	X	0	X
Sub-total	1	X	0	0	1	X	1	X	1	X	0	X	0	X	0	X
Total	5	X	4	0	5	X	5	X	3	X	2	X	0	X	0	X
Test-Control	-		4		-		-		-		-		-		-	
Ranking of irritation	Non-irritant		Slight-irritant		-		-		-		-		-		-	

หมายเหตุ

SF - โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอิน

SF4 - โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่สะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์จำนวน 4 รอบ (SF4)

CGSF - โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่ปรับปรุงพื้นผิวด้วยเจลาติน

CGSF4 - โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่ปรับปรุงพื้นผิวด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์จำนวน 4 รอบ

Gel - Gelfoam®

X - ไม่พบวัสดุ

ตารางที่ 2.3-7 ประเมินการตอบสนองต่อเนื้อเยื่อของโครงเลี้ยงเซลล์ SF และ SF4 ภายหลังจากการฝัง 4 สัปดาห์ (การประเมินครั้งที่สอง)

Test sample : SF,SF4	Implantation interval : 4 weeks															
Animal number :	N=1		N=2		N=3		N=4		N=1		N=2		N=3		N=4	
	SF	Gel	SF	Gel	SF	Gel	SF	Gel	SF4	Gel	SF4	Gel	SF4	Gel	SF4	Gel
Polymorphonuclear cell	0	0	0	X	0	X	0	X	0	X	0	X	0	0	0	X
Lymphocytes	0	0	0	X	0	X	0	X	0	X	0	X	0	0	0	X
Plasma cells	0	0	0	X	0	X	0	X	0	X	0	X	0	0	0	X
Macrophages	0	0	0	X	0	X	1	X	1	X	0	X	1	0	0	X
Giant cells	0	0	0	X	0	X	0	X	0	X	0	X	0	0	0	X
Necrosis	0	0	0	X	0	X	0	X	0	X	0	X	0	0	0	X
Sub X2	0	0	0	X	0	X	2	X	2	X	0	X	2	0	0	X
Neovascularisation	1	0	2	X	1	X	1	X	2	X	1	X	1	0	0	X
Fibrosis	0	0	0	X	0	X	0	X	0	X	0	X	0	0	0	X
Fatty infiltrate	0	0	0	X	0	X	0	X	0	X	0	X	0	0	0	X
Sub-total	1	0	2	X	1	X	1	X	2	X	1	X	1	0	0	X
Total	1	0	2	X	1	X	3	X	4	X	1	X	3	0	0	X
Test-Control	1		-		-		-		-		-		3		-	
Ranking of irritation	Non-irritant		-		-		-		-		-		Slight irritant		-	

หมายเหตุ

SF - โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอิน

SF4 - โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่สะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์จำนวน 4 รอบ (SF4)

CGSF - โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่ปรับปรุงพื้นผิวด้วยเจลาติน

CGSF4 - โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่ปรับปรุงพื้นผิวด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์จำนวน 4 รอบ

Gel - Gelfoam®

X - ไม่พบวัสดุ

ตารางที่ 2.3-8 ประเมินการตอบสนองต่อเนื้อเยื่อของโครงเลี้ยงเซลล์ CGSF และ CGSF4 ภายหลังจากการฝัง 4 สัปดาห์ (การประเมินครั้งที่สอง)

Test sample : CGSF, CGSF4	Implantation interval : 4 weeks															
Animal number :	N=1		N=2		N=3		N=4		N=1		N=2		N=3		N=4	
	CGSF	Gel	CGSF	Gel	CGSF	Gel	CGSF	Gel	CGSF4	Gel	CGSF4	Gel	CGSF4	Gel	CGSF4	Gel
Polymorphonuclear cell	0	X	0	0	0	X	0	X	0	X	0	X	0	X	0	X
Lymphocytes	1	X	0	0	0	X	0	X	0	X	0	X	0	X	0	X
Plasma cells	0	X	0	0	0	X	0	X	0	X	0	X	0	X	0	X
Macrophages	1	X	2	0	2	X	1	X	1	X	1	X	1	X	1	X
Giant cells	0	X	0	0	0	X	0	X	0	X	0	X	0	X	0	X
Necrosis	0	X	0	0	0	X	0	X	0	X	0	X	0	X	0	X
Sub X2	4	X	4	0	4	X	2	X	2	X	2	X	2	X	2	X
Neovascularisation	2	X	1	2	1	X	1	X	1	X	1	X	1	X	1	X
Fibrosis	0	X	0	0	0	X	0	X	0	X	0	X	0	X	0	X
Fatty infiltrate	0	X	0	0	0	X	0	X	0	X	0	X	0	X	0	X
Sub-total	2	X	1	2	1	X	1	X	1	X	1	X	1	X	1	X
Total	6	X	5	2	5	X	3	X	3	X	3	X	3	X	3	X
Test-Control	-		3		-		-		-		-		-		-	
Ranking of irritation	-		Slight irritant		-		-		-		-		-		-	

หมายเหตุ

SF - โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอิน

SF4 - โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่สะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์จำนวน 4 รอบ (SF4)

CGSF - โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่ปรับปรุงพื้นผิวด้วยเจลาติน

CGSF4 - โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่ปรับปรุงพื้นผิวด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์จำนวน 4 รอบ

Gel - Gelfoam®

X - ไม่พบวัสดุ

ตารางที่ 2.4 ระดับความระคายเคืองของโครงเลี้ยงเซลล์ภายหลังจากการฝังได้ผิวหนังหนูเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์

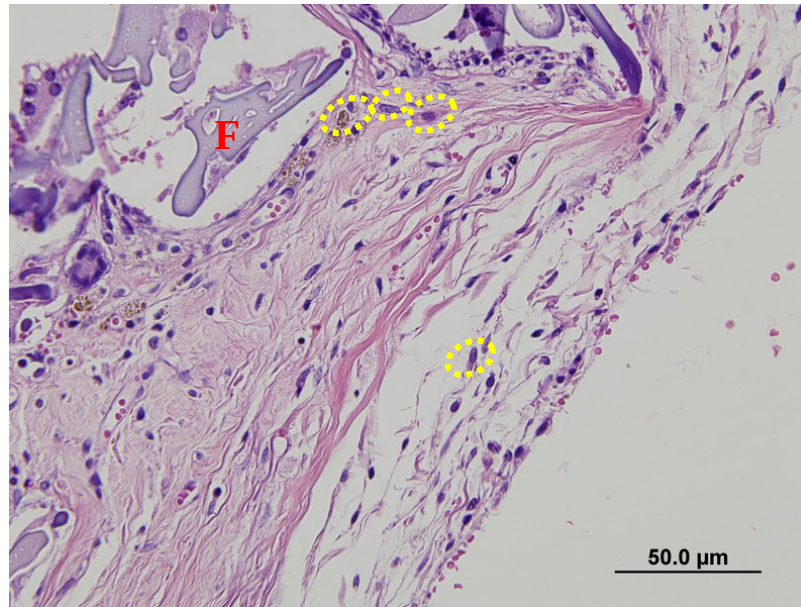
ชนิดของวัสดุ	ระดับความระคายเคือง	
	การประเมินครั้งแรก	การประเมินครั้งที่สอง
SF n=1	ไม่ระคายเคือง	ไม่ระคายเคือง
n=2	ไม่ระคายเคือง	ไม่ระคายเคือง
n=3	ระคายเคืองเล็กน้อย	ไม่ระคายเคือง
n=4	ระคายเคืองเล็กน้อย	ไม่ระคายเคือง
SF4 n=1	ไม่ระคายเคือง	ไม่ระคายเคือง
n=2	ไม่ระคายเคือง	ไม่ระคายเคือง
n=3	ระคายเคืองเล็กน้อย	ระคายเคืองเล็กน้อย
n=4	ไม่ระคายเคือง	ไม่ระคายเคือง
CGSF n=1	ไม่ระคายเคือง	ไม่ระคายเคือง
n=2	ไม่ระคายเคือง	ระคายเคืองเล็กน้อย
n=3	ระคายเคืองเล็กน้อย	ระคายเคืองเล็กน้อย
n=4	N/A	N/A
CGSF4 n=1	ไม่ระคายเคือง	ไม่ระคายเคือง
n=2	ไม่ระคายเคือง	ไม่ระคายเคือง
n=3	ระคายเคืองเล็กน้อย	ระคายเคืองเล็กน้อย
n=4	ไม่ระคายเคือง	ไม่ระคายเคือง

หมายเหตุ : N/A ไม่สามารถทำการประเมินได้เนื่องจากวัสดุควบคุม (Gelfoam[®]) ย่อยสลายหมด

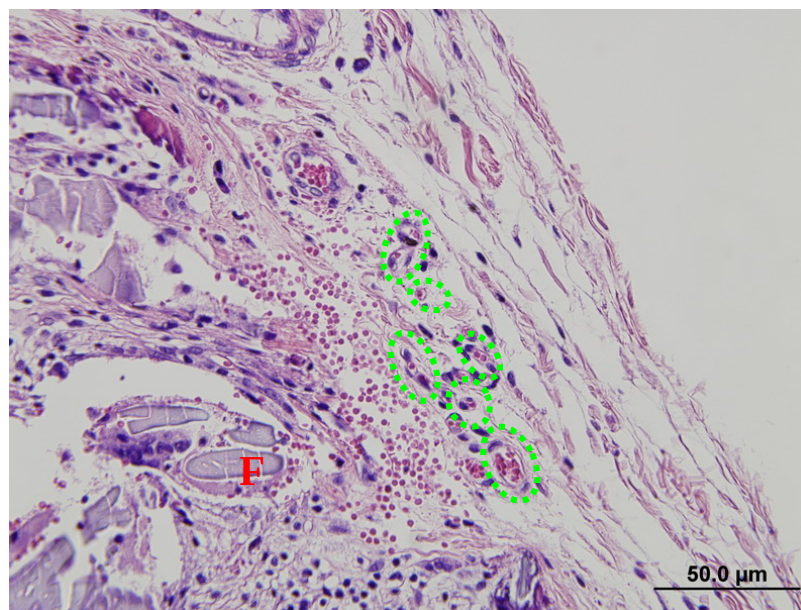
ตารางที่ 2.5 ระดับความระคายเคืองของโครงเลี้ยงเซลล์ภายหลังจากการฝังได้ผิวหนังหนูเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

ชนิดของวัสดุ	ระดับความระคายเคือง	
	การประเมินครั้งแรก	การประเมินครั้งที่สอง
SF	n=1	ไม่ระคายเคือง
	n=2	N/A
	n=3	N/A
	n=4	N/A
SF4	n=1	N/A
	n=2	N/A
	n=3	ระคายเคืองเล็กน้อย
	n=4	N/A
CGSF	n=1	N/A
	n=2	ระคายเคืองเล็กน้อย
	n=3	N/A
	n=4	N/A
CGSF4	n=1	N/A
	n=2	N/A
	n=3	N/A
	n=4	N/A

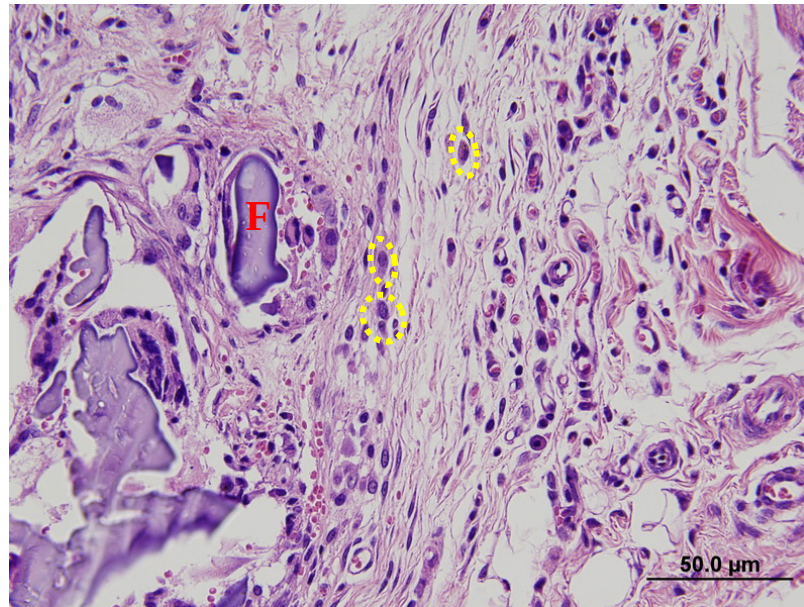
หมายเหตุ : N/A = ไม่สามารถทำการประเมินได้เนื่องจากวัสดุควบคุม (Gelfoam®) ย่อยสลายหมด



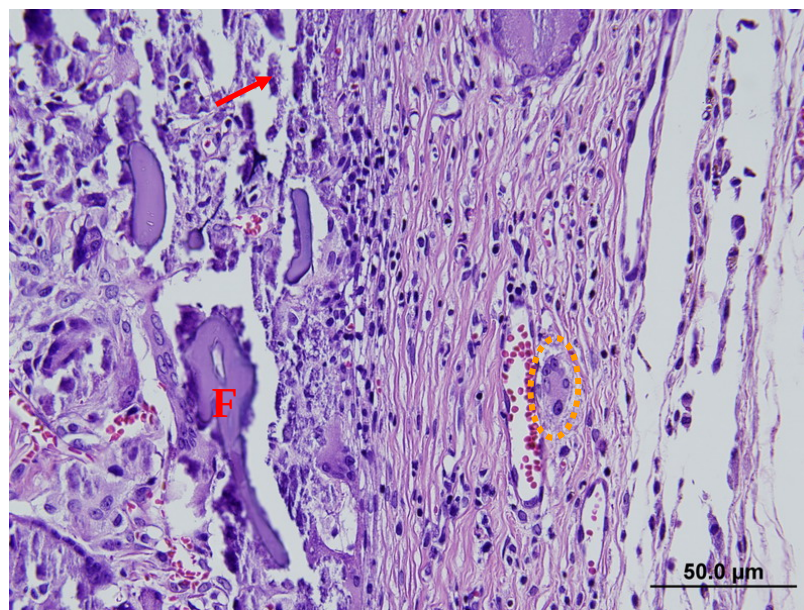
รูปที่ 2.6 ภาพตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอิน (SF) ที่ฝังในหนูวิสตาเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ ซึ่งย้อมสี Hematoxylin และ Eosin : วงกลมสีเหลือง=macrophage, F=โครงเลี้ยงเซลล์ที่ยังคงเหลืออยู่ (กำลังขยาย X400)



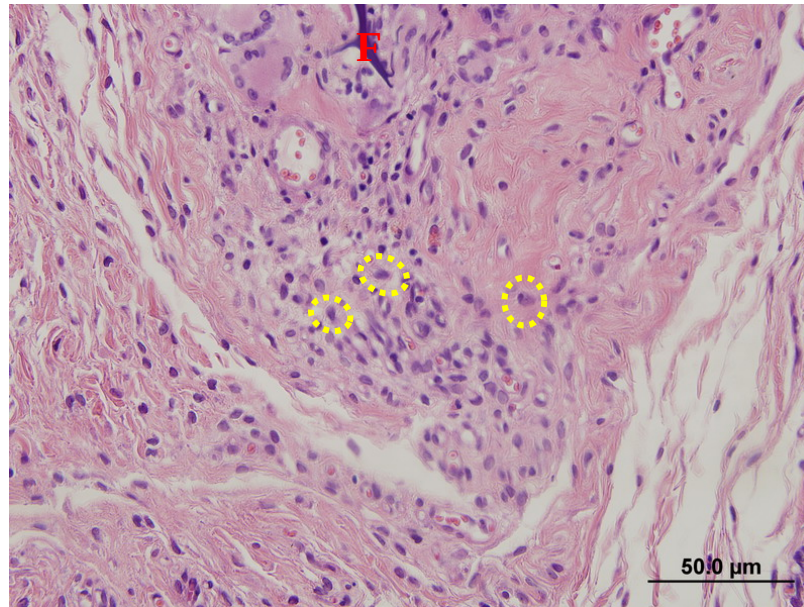
รูปที่ 2.7 ภาพตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่สะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์จำนวน 4 รอบ (SF4) ที่ฝังในหนูวิสตาเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ ซึ่งย้อมสี Hematoxylin และ Eosin : วงกลมสีเขียว=หลอดเลือดใหม่, F=โครงเลี้ยงเซลล์ที่ยังคงเหลืออยู่ (กำลังขยาย X400)



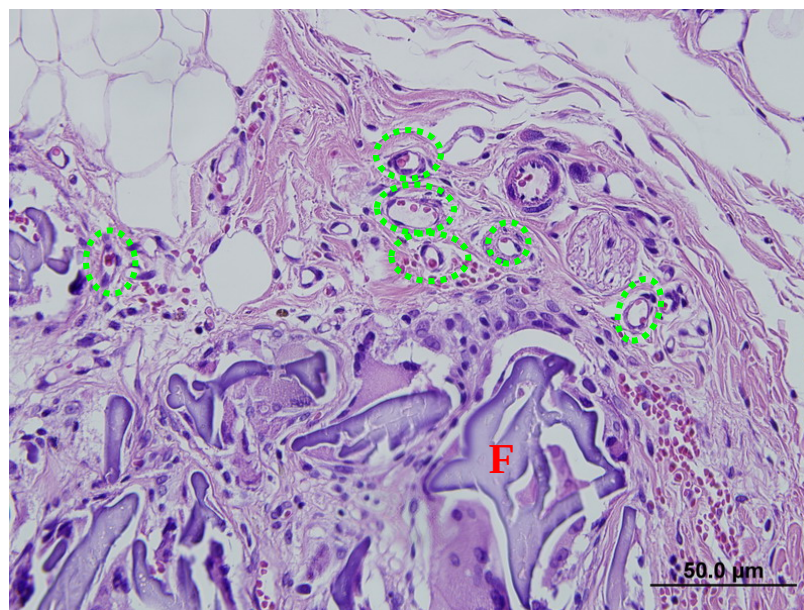
รูปที่ 2.8 ภาพตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่ปรับปรุงพื้นผิวด้วยเจลาติน (CGSF) ที่ฝังในหนูวิสตาเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ ซึ่งย้อมสี Hematoxylin และ Eosin : วงกลมสีเหลือง=macrophage, F=โครงเลี้ยงเซลล์ที่ยังคงเหลืออยู่ (กำลังขยาย X400)



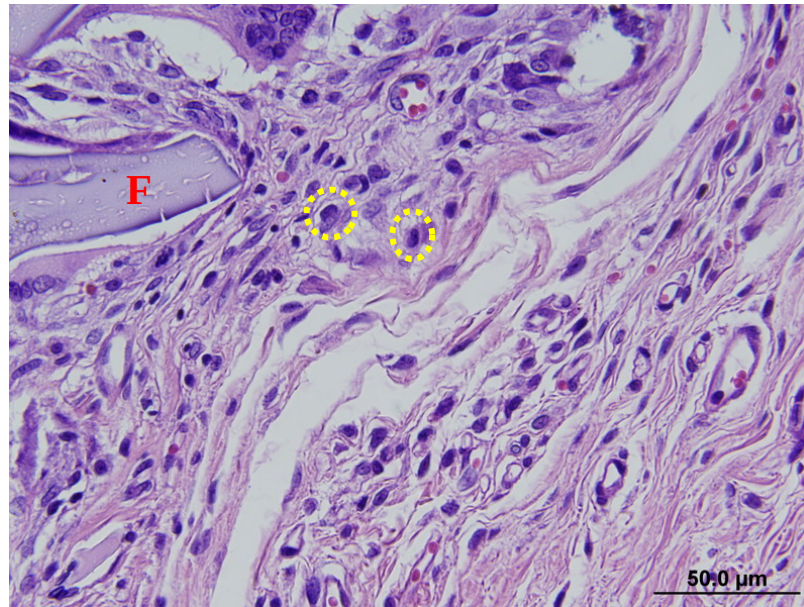
รูปที่ 2.9 ภาพตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่ปรับปรุงพื้นผิวด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์จำนวน 4 รอบ (CGSF4) ที่ฝังในหนูวิสตาเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ ซึ่งย้อมสี Hematoxylin และ Eosin : วงกลมสีส้ม=giant cell, F=โครงเลี้ยงเซลล์ที่ยังคงเหลืออยู่, ลูกศร=ผลึกแคลเซียม (กำลังขยาย X400)



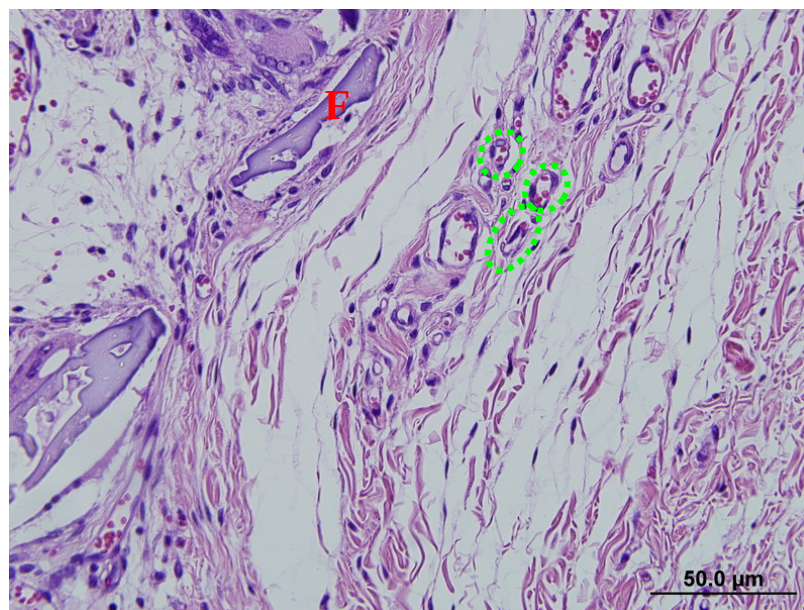
รูปที่ 2.10 ภาพตัดขวางของวัสดุควมคุม (Gelfoam®) ที่ฝังในหนูวิสตาเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ ซึ่งย้อมสี Hematoxylin และ Eosin : วงกลมสีเหลือง=macrophage, F=วัสดุควมคุมที่ยังคงเหลืออยู่, (กำลังขยาย X400)



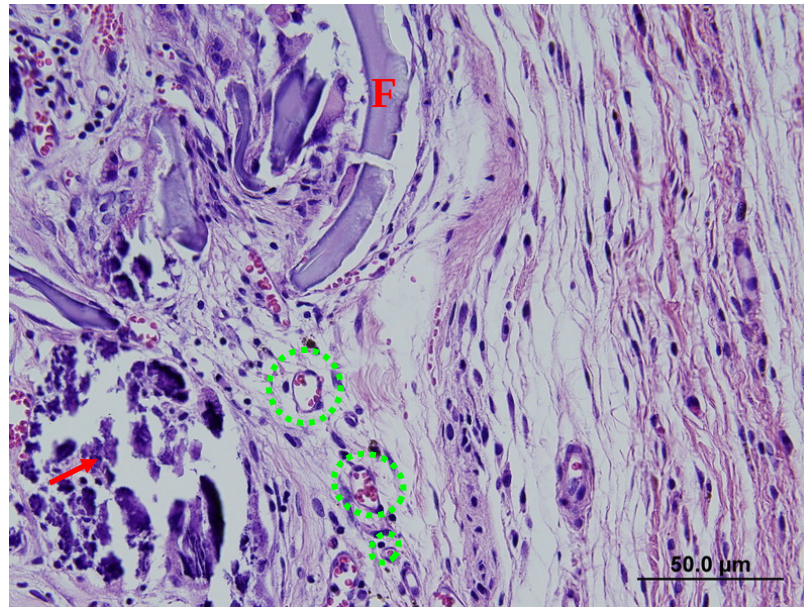
รูปที่ 2.11 ภาพตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอิน (SF) ที่ฝังในหนูวิสตาเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ซึ่งย้อมสี Hematoxylin และ Eosin : วงกลมสีเขียว=หลอดเลือดใหม่, F=โครงเลี้ยงเซลล์ที่ยังคงเหลืออยู่ (กำลังขยาย X400)



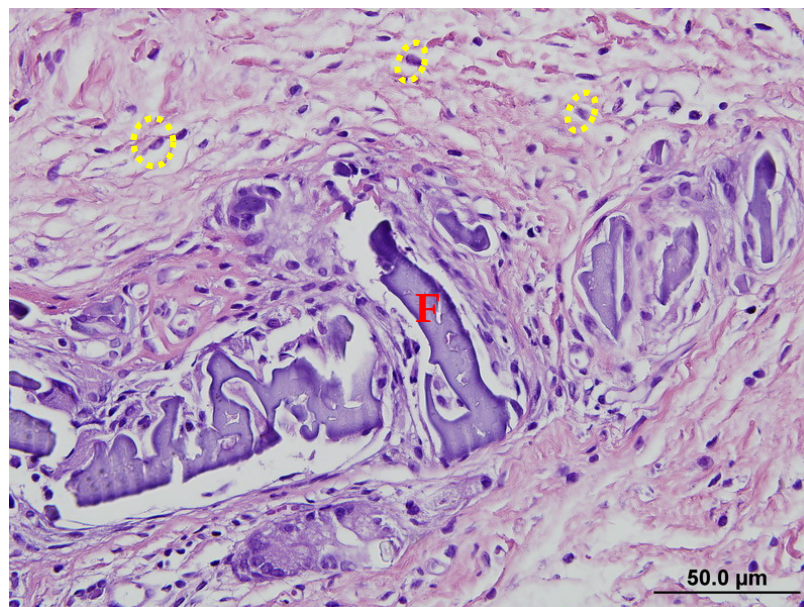
รูปที่ 2.12 ภาพตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่สะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์จำนวน 4 รอบ (SF4) ที่ฝังในหนูวิสตาเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ซึ่งย้อมสี Hematoxylin และ Eosin : วงกลมสีเหลือง=macrophage, F=โครงเลี้ยงเซลล์ที่ยังคงเหลืออยู่ (กำลังขยาย X400)



รูปที่ 2.13 ภาพตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่ปรับปรุงพื้นผิวด้วยเจลาติน (CGSF) ที่ฝังในหนูวิสตาเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ซึ่งย้อมสี Hematoxylin และ Eosin : วงกลมสีเขียว=หลอดเลือดใหม่, F=โครงเลี้ยงเซลล์ที่ยังคงเหลืออยู่ (กำลังขยาย X400)



รูปที่ 2.14 ภาพตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอนที่ปรับปรุงพื้นผิวด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์จำนวน 4 รอบ (CGSF4) ที่ฝังในหนูวิสตาเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ซึ่งย้อมสี Hematoxylin และ Eosin : วงกลมสีเขียว=หลอดเลือดใหม่, F=โครงเลี้ยงเซลล์ที่ยังคงเหลืออยู่, ลูกศร=ผลึกแคลเซียม (กำลังขยาย X400)



รูปที่ 2.15 ภาพตัดขวางของวัสดุควบคุม (Gelfoam®) ที่ฝังในหนูวิสตาเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ซึ่งย้อมสี Hematoxylin และ Eosin : วงกลมสีเหลือง=macrophage, F=วัสดุควบคุมที่ยังคงเหลืออยู่, (กำลังขยาย X400)

5. อภิปรายและวิจารณ์ผล (ส่วนการผลิตและทดสอบความปลอดภัยของโครงเลี้ยงเซลล์)

5.1 การตรวจมาตรฐานเพื่อรับรองความปลอดภัยสำหรับโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมใหม่ไทย/เจลาติน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (สูตร 4) โดย สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

จากรายงานผลการทดสอบความปลอดภัยของโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมใหม่ไทย/เจลาติน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (สูตร 4) หรือ TSF-bone substitute โดย วว. แสดงให้เห็นว่า

+ ผลการทดสอบ Safety test (Systemic injection tests) โดยการฉีดสารสกัดจากตัวอย่างโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมให้แก่หนูกลุ่มที่ 1 เปรียบเทียบกับการฉีดน้ำเกลือให้แก่หนูกลุ่มที่ 2 (กลุ่มควบคุม) ไม่พบอาการแสดงการเป็นพิษในช่วง 48 ชั่วโมงหลังการฉีด และตลอดระยะเวลา 14 วันที่สังเกตการณ์

+ ผลการทดสอบ Acute dermal irritation test โดยการนำผ้ากอซ (gauze patch) ซึ่งดูดซับสารสกัดจากตัวอย่างโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมปิดไว้ที่ผิวหนังของกระต่ายเป็นเวลา 4 ชั่วโมง และประเมินการระคายเคืองอย่างเฉียบพลันที่ผิวหนังบริเวณดังกล่าวเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมงหลังจากนำแผ่นออก เปรียบเทียบกับการใช้แผ่น (gauze patch) ซึ่งดูดซับน้ำเกลือ (กลุ่มควบคุม) ไม่พบอาการระคายเคืองที่ผิวหนังของกระต่ายทั้งสามตัว

+ ผลการทดสอบ Skin sensitization test ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ประเมินความสามารถของสารที่จะก่อให้เกิดภาวะไวต่อการตอบสนองแบบล่าช้า (delayed hypersensitivity) ที่ผิวหนังของหนูตะเภา โดยการฉีดสารสกัดจากตัวอย่างโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมเข้าใต้ผิวหนังของหนูตะเภา (ขั้นตอนการเหนี่ยวนำ) หลังจากนั้น ในวันที่ 8 นำวัสดุปิดแผลหรือผ้ากอซซึ่งดูดซับสารสกัดปิดทับบริเวณดังกล่าว (ขั้นตอนการกระตุ้น) จากนั้นประเมินปฏิกิริยาตอบสนองที่ผิวหนังบริเวณดังกล่าวที่ระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมงหลังจากนำแผ่นปิดทับออก ซึ่งไม่พบการเกิดผื่นแดงและการบวมที่ผิวหนัง

+ การทดสอบ Cytotoxicity test ยังอยู่ในระหว่างดำเนินการ โดย วว.

5.2 การตรวจสอบความปลอดภัยโดยคณะผู้วิจัยเอง (in house testing)

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมด้วยการตรวจจำนวนเซลล์ L929 ที่มีชีวิตอยู่ เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงด้วยสารสกัดของโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมทั้ง 4 ชนิด เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (รูปที่ 2.1 และ 2.2) จะสังเกตเห็นว่าสารสกัดจากโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมไฟโบรอิน (SF) มีจำนวนเซลล์มากกว่าตัวอย่างเชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่ปรับปรุงพื้นผิวด้วยเจลาติน (CGSF) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่ปรับปรุงพื้นผิวด้วยเจลาตินและสะสม ไฮดรอกซีอะพาไทต์จำนวน 4 รอบ (CGSF4) มีจำนวนเซลล์มากกว่าตัวอย่างควบคุมเชิงบวกเช่นเดียวกัน ส่วนจำนวนเซลล์ที่เลี้ยงในสารสกัดจากโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่สะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์จำนวน 4 รอบ (SF4) พบว่า มีจำนวนเซลล์น้อยกว่าจำนวนเซลล์ที่เลี้ยงในตัวอย่างควบคุมเชิงบวกเล็กน้อยโดยไม่มีนัยสำคัญของความแตกต่าง ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ตามมาตรฐาน ISO10993-5 ใช้วิธี indirect method แบบ

elution titration test แสดงให้เห็นว่า โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากไฟโบรอินไหมไทยเป็นหลักทั้ง 4 ชนิด ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ L929 ในระดับที่เทียบเท่ากับอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ไม่มีซีรัม (DEME without serum)

จากผลการทดสอบปฏิกิริยาเฉพาะที่ (local effect) ของโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมภายหลังจากการฝังในสัตว์ทดลองตามมาตรฐาน ISO 10993-6 (2007) จะสังเกตว่า หนูวิสต้าซึ่งใช้เป็นสัตว์ทดลองมีสุขภาพแข็งแรงดีภายหลังการฝังชิ้นงานในระยะเวลาที่ทดสอบ 4 เดือน ทั้งนี้ผลการประเมินชิ้นเนื้อสองครั้งโดยแพทย์สาขาพยาธิวิทยา โดยไม่ระบุชนิดตัวอย่างให้ทราบ (blind samples) ที่ระยะเวลาห่างกัน 2 เดือน แสดงให้เห็นว่า ภาพตัดขวางของตัวอย่างโครงเลี้ยงเซลล์ซึ่งย้อมด้วย H&E ภายหลังจากการฝังชิ้นงานเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ (รูปที่ 2.6-2.9) พบว่า เนื้อเยื่อบริเวณรอบๆ ของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอิน (SF) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่ปรับปรุงพื้นผิวด้วยเจลาติน (CGSF) มีเซลล์ macrophage เล็กน้อย (รูปที่ 2.6 และ 2.8) แสดงถึงการอักเสบเล็กน้อย ส่วนโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่สะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์จำนวน 4 รอบ (SF4) สังเกตพบหลอดเลือดใหม่เกิดขึ้น (รูปที่ 2.7) ในส่วนโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่ปรับปรุงพื้นผิวด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์จำนวน 4 รอบ (CGSF4) สังเกตพบว่ามี giant cell เล็กน้อย (รูปที่ 2.9) โดยภาพรวมจะเห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 4 ชนิด มีการตอบสนองของเนื้อเยื่อเล็กน้อยสังเกตจากชนิดของเซลล์และปริมาณของเซลล์ชนิดต่างๆ ส่วนการตอบสนองของวัสดุควบคุม(Gelfoam®) พบว่า มีเซลล์ macrophage เล็กน้อย ดังแสดงในรูปที่ 2.10 เมื่อทำการเปรียบเทียบการตอบสนองของเนื้อเยื่อรอบๆ ของโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 4 ชนิดกับวัสดุควบคุมภายหลังการฝังเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ พบว่า ไม่มีความแตกต่างจากวัสดุควบคุม

สำหรับการประเมินทางพยาธิวิทยาครั้งแรกภายหลังการฝัง 2 สัปดาห์ (ตารางที่ 2.4) พบว่าหนูวิสต้า 2 ใน 4 ตัว ที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอิน (SF) จัดอยู่ในกลุ่ม“ไม่ระคายเคือง” ส่วนอีกสองตัวที่เหลือจัดอยู่ในกลุ่ม“ระคายเคืองเล็กน้อย”ส่วนหนูวิสต้าที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่สะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์จำนวน 4 รอบ (SF4) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่ปรับปรุงพื้นผิวด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์จำนวน 4 รอบ (CGSF4) พบว่า หนูวิสต้ามากกว่า 50% จัดอยู่ในกลุ่ม“ไม่ระคายเคือง” สำหรับหนูวิสต้าที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่ปรับปรุงพื้นผิวด้วยเจลาติน (CGSF) พบว่า ภายหลังการฝัง 2 สัปดาห์ วัสดุควบคุมที่ฝังในหนูตัวที่ 4 ย่อยสลายหมดทำให้ไม่สามารถประเมินระดับความระคายเคืองของหนูตัวดังกล่าวได้ เมื่อทำการประเมินครั้งที่สอง พบว่าผลของการประเมินระดับของความระคายเคืองเหมือนกับการประเมินครั้งแรก ดังนั้น จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า โครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 4 ชนิด มีระดับความระคายเคืองอยู่ในระดับ “ไม่ระคายเคือง” ถึง “ระคายเคืองเล็กน้อย” ภายหลังการฝังในหนูวิสต้าเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์

เมื่อฝังชิ้นงานเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ผลการศึกษาภาพตัดขวางของตัวอย่างที่ย้อมด้วย H&E ในรูปที่ 2.11-2.14 พบว่า เนื้อเยื่อบริเวณรอบๆ ของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอิน (SF), โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอิน

ที่ปรับปรุงพื้นผิวด้วยเจลาติน (CGSF) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่ปรับปรุงพื้นผิวด้วยเจลาตินและสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์จำนวน 4 รอบ (CGSF4) มีการสร้างหลอดเลือดใหม่เกิดขึ้น ส่วนโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่ปรับปรุงพื้นผิวด้วยเจลาติน (CGSF) พบว่ายังมีเซลล์ macrophage เล็กน้อย เช่นเดียวกับวัสดุควบคุม (รูปที่ 2.15) ซึ่งก็ยังคงพบเซลล์ macrophage อยู่ ภายหลังจากการฝังชิ้นงานเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

ตารางที่ 2.5 แสดงระดับความระคายเคืองของโครงเลี้ยงเซลล์หลังจากการฝังเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ แต่เนื่องจากวัสดุควบคุมมากกว่าถึงหนึ่งถูกย่อยสลายหมด ทำให้ไม่สามารถแบ่งระดับความระคายเคืองของโครงเลี้ยงเซลล์ได้ อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาจากการประเมินคะแนนจากชนิดของเซลล์อักเสบและการตอบสนอง พบว่าปริมาณเซลล์อักเสบรอบๆของโครงเลี้ยงเซลล์ (SF, SF4, CGSF4) ภายหลังจากการฝังเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ (ตารางที่ 2.3-5, 2.3-6, 2.3-7, 2.3-8) ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับภายหลังจากการฝังเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ (ตารางที่ 2.3-1, 2.3-2, 2.3-3, 2.3-4) ขณะที่การตอบสนองของเนื้อเยื่อของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่ปรับปรุงพื้นผิวด้วยเจลาติน (CGSF) ไม่มีความแตกต่างจากการตอบสนองหลังจากการฝังเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ โดยการตอบสนองของเนื้อเยื่อต่อโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 4 ชนิด ไม่มีความแตกต่างจากวัสดุควบคุม ดังนั้นจะเห็นว่า การตอบสนองของเนื้อเยื่อต่อโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมใหม่ไทยทั้ง 4 ชนิด หลังจากการฝังเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์มีการตอบสนองลดลงจากการฝังที่ระยะเวลา 2 สัปดาห์

6. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ (ส่วนการผลิตและทดสอบความปลอดภัยของโครงเลี้ยงเซลล์)

จากผลการทดสอบความปลอดภัยของโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมใหม่ไทย/เจลาติน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (สูตร 4) หรือ TSF-bone substitute โดย วว. ทั้ง 3 ประเภท ได้แก่ Safety test (Systemic injection tests), Acute dermal irritation test และ Skin sensitization test สรุปได้ว่าโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมใหม่ไทย/เจลาติน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์นี้ไม่เป็นพิษต่อสัตว์ทดลอง ไม่พบอาการระคายเคืองอย่างเฉียบพลัน รวมถึงการเกิดผื่นแดงและการบวมที่ผิวหนังของสัตว์ทดลอง

จากการทดสอบความเป็นพิษ (cytotoxicity) และการทดสอบปฏิกิริยาเฉพาะที่ของโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมภายหลังจากการฝังในสัตว์ทดลอง (local effects after implantation) โดยใช้โครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมที่ผลิตจากใหม่ไทยเป็นองค์ประกอบหลักทั้ง 4 สูตร สรุปได้ว่า โครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 4 ชนิดไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ตามมาตรฐาน ISO 10993-5 เซลล์ L929 สามารถเจริญเติบโตได้ในสารสกัดจากโครงเลี้ยงเซลล์เทียบเท่ากับในอาหารเลี้ยงเซลล์ (DMEM without serum) และโครงเลี้ยงเซลล์ใหม่ไทยทั้ง 4 ชนิดยังมีการตอบสนองของเนื้อเยื่อเล็กน้อยในระดับที่ไม่แตกต่างจากการตอบสนองของเนื้อเยื่อต่อวัสดุควบคุม (Gelfoam®) โดยเมื่อประเมินตาม มาตรฐาน ISO 10993-6 พบว่า มีระดับความระคายเคืองอยู่ในระดับ “ไม่ระคายเคือง” ถึง “ระคายเคืองเล็กน้อย” ทั้งนี้กระบวนการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ในปัจจุบันมีความสะอาดอยู่ในระดับหนึ่ง แต่ยังไม่เทียบเท่ามาตรฐานการผลิตอุปกรณ์/วัสดุทางการแพทย์ ซึ่งคณะผู้วิจัยไม่มีสถานที่และ

ครุภัณฑ์ที่จะดำเนินการผลิตได้ ต้องมีการลงทุนในการดำเนินการดังกล่าวต่อไปในขั้นตอนการผลิตเพื่อใช้ในการทดสอบในมนุษย์ หรือการใช้จริงต่อไป

โดยสรุปจากผลการทดสอบความปลอดภัยโดยหน่วยงานรับรองมาตรฐานภายนอก และการทดสอบภายในห้องปฏิบัติการชี้ให้เห็นว่า โครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมไหมไทย/เจลาติน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (สูตร 4) หรือ TSF-bone substitute มีความปลอดภัยเบื้องต้นในการทดสอบในร่างกายสิ่งมีชีวิต แสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการประยุกต์ทดสอบใช้งานในมนุษย์ต่อไป เพื่อพัฒนาให้ถึงเป้าหมายการใช้กระดูกเทียมที่ผลิตขึ้นในประเทศไทยเพื่อการรักษาโรคสูญเสียเนื้อกระดูก