

3. ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย (ส่วนการพัฒนาโครงเลี้ยงเซลล์แบบใหม่)

3.1 การเตรียมไลโดซาน

1. นำไคตินจากแกนปลาหมึกมาแช่กรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ เป็นเวลา 1 วัน เพื่อกำจัดคราบหินปูนบนไคติน จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นจนเป็นกลาง
2. นำไคตินที่ผ่านขั้นตอนด้านบนมาแล้ว มาแช่ใน 1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ เป็นเวลา 1 วัน เพื่อกำจัดโปรตีนที่ไม่ต้องการ จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นจนเป็นกลาง
3. เปลี่ยนไคตินให้เป็นไลโดซาน โดยนำไคตินที่ผ่านขั้นตอนการล้างด้วยไฮโดรคลอริก และโซเดียมไฮดรอกไซด์แล้ว มาแช่ใน 50 % สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เป็นเวลา 2 วัน เพื่อดึงหมู่ acetyl ออก (deacetylation) จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นจนเป็นกลาง ทำให้แห้งก่อนนำเก็บ

การวัด % deacetylation

ในการทำการวิจัยนี้ทำการวัด % deacetylation โดย spectrophotometry method ขั้นตอนดังนี้

1. ละลายตัวอย่างไลโดซาน 0.2 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ใน 0.2 โมลาร์ กรดอะซิติก 100 มิลลิลิตร
2. นำสารละลายไลโดซานดังกล่าวมาเจือจางให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายไลโดซานคือ 0.01 กรัม ไลโดซานใน 100 มิลลิลิตร ของ 0.01 โมลาร์ กรดอะซิติก
3. ทำ acetic graph เพื่อหา Zero Crossing Point (ZCP)
4. การทำกราฟมาตรฐาน (standard calibration curve) ของสารละลาย N-acetyl-D-glucosamine
5. นำสารละลายไลโดซานจากข้อ 2 มาวัดค่า absorbance (A) ซึ่งก็คือ ความเข้มข้นของ N-acetyl-D-glucosamine
6. นำค่าที่ได้มาเข้าสู่สูตร

$$\% \text{ degree of deacetylation} = \left(1 - \frac{A}{\frac{((10 \times W) - 204 A) + A}{161}} \right) \times 100$$

โดยที่ A = ความเข้มข้นของ N-acetyl-D-glucosamine ที่วัดได้ (กรัมต่อลิตร) หารด้วย 204
 W = น้ำหนักของตัวอย่างไคโตซาน (กรัม) ใน 100 มิลลิลิตร ของ 0.01 โมลาร์ กรดอะซิติก
 204 = น้ำหนักโมเลกุลของ N-acetyl-D-glucosamine
 161 = น้ำหนักโมเลกุลของ D-glucosamine

การหาน้ำหนักโมเลกุลไคโตซาน

ด้วย Gel Permeation Chromatography, Waters 600E

Test conditions:

Eluent: 0.5M acetic acid and 0.5M sodium acetate (acetate buffer)

Flow rate: 0.6 ml/min

Injection volume: 20 μ l

Temperature: 30°C

Column set: Ultrahydrogel linear 1 column (MW resolving rang = 1,000-20,000,000) 1 column + guard column

Standard: Pullulans (MW 5,900-708,00)

Detector: Refractive Index Detector

3.2 เตรียม silk fibroin จากรังไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ

1. ต้มรังไหมด้วย 0.2M โซเดียมคาร์บอเนต 2 รอบ รอบละ 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วอบให้แห้ง
2. ละลายรังไหมเข้ากับ 9.3M LiBr ที่อุณหภูมิ 60-70 °C
3. ขจัด LiBr ออกจากสารละลายโดยใช้ถุงไดอะไลซิส (MWCO: 12,000-14,000)
4. หาความเข้มข้นของสารละลายไหมเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.3 เตรียมโครงเลี้ยงเซลล์คอมโพสิตทดแทนกระดูก

3.3.1 Chitosan / Silk fibroin / Hydroxyapatite composite (CTS/SB)

โดยมีอัตราส่วนระหว่างไคโตซานและไฟโบรอินไหมไทยให้เป็น 25/75 50/50 และ 75/25 ตามลำดับ
 แต่ยังคงอัตราส่วนระหว่างพอลิเมอร์ (ไคโตซานและไฟโบรอินไหมไทย) ต่อไฮดรอกซีอะพาไทต์ให้เป็น 30 : 70

1. ผสม 2.3 มิลลิลิตร 5M แคลเซียมคลอไรด์ และ 0.48 มิลลิลิตร 98% กรดฟอสฟอริก ลงในส่วนของพอลิเมอร์ (ไคโตซานและไฟโบรอินไหมไทย) 50 มิลลิลิตร ปั่นกวนเป็นเวลา 5 นาที ปรับค่าความเป็นกรดด้วย 1M โซเดียมไฮดรอกไซด์ จนมีค่าความเป็นกรดมากกว่า 8 ปั่นกวนต่อไปอีก 5 นาที
2. ล้างคอมโพสิตจากขั้นตอนที่หนึ่ง ด้วยน้ำกลั่นจนมีค่าอยู่ที่ 6 ถึง 7 แล้วทำการปั่นกวนเพื่อขจัดน้ำบางส่วนออกไป
3. เพิ่ม silk fibroin ลงในไคโตซานไฮดรอกซีอะพาไทต์คอมโพสิต ให้ได้อัตราส่วนไคโตซานต่อไฟโบรอินไหมไทยให้เป็น 25/75 50/50 และ 75/25 ตามลำดับ
4. นำสารละลายคอมโพสิตดังกล่าวมาหาคำหนดน้ำหนักแห้ง

3.3.2 เตรียม Chitosan / collagen / Hydroxyapatite composite (CTS/Col)

โดยมีอัตราส่วนระหว่างไคโตซานและคอลลาเจนให้เป็น 25/75 50/50 และ 75/25 ตามลำดับ แต่ยังคงอัตราส่วนระหว่างพอลิเมอร์ (ไคโตซานและคอลลาเจน) ต่อไฮดรอกซีอะพาไทต์ให้เป็น 30 : 70

5. ผสม 2.3 มิลลิลิตร 5M แคลเซียมคลอไรด์ และ 0.48 มิลลิลิตร 98% กรดฟอสฟอริก ลงในส่วนของพอลิเมอร์ (ไคโตซานและคอลลาเจน) 50 มิลลิลิตร ปั่นกวนเป็นเวลา 5 นาที ปรับค่าความเป็นกรดด้วย 1M โซเดียมไฮดรอกไซด์ จนมีค่าความเป็นกรดมากกว่า 8 ปั่นกวนต่อไปอีก 5 นาที
6. ล้างคอมโพสิตจากขั้นตอนที่หนึ่ง ด้วยน้ำกลั่นจนมีค่าอยู่ที่ 6 ถึง 7 แล้วทำการปั่นกวนเพื่อขจัดน้ำบางส่วนออกไป
7. เพิ่มคอลลาเจนลงในไคโตซานไฮดรอกซีอะพาไทต์คอมโพสิต ให้ได้อัตราส่วนไคโตซานต่อไฟโบรอินไหมไทยให้เป็น 25/75 50/50 และ 75/25 ตามลำดับ
8. นำสารละลายคอมโพสิตดังกล่าวมาหาคำหนดน้ำหนักแห้ง

3.4 ทดสอบลักษณะทางกายภาพ

3.4.1 Surface and Porosity

ด้วยเครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM)

1. ขึ้นรูปคอมโพสิตเป็นโครงร่างสามมิติ ด้วยกันปั่นเหวี่ยงที่ 2500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที
2. ระเหิดแห้งโครงร่างแต่ละสูตรจนแห้งสนิท
3. ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด ยี่ห้อ JEOL รุ่น JSM-5800LV

หมายเหตุ: ขั้นตอน SEM ทำเฉพาะสูตรผสม (CTS/SB)

3.4.2 Swelling property

1. ขึ้นรูปคอมโพสิตเป็นโครงร่างสามมิติ ด้วยกันปั่นเหวี่ยงที่ 2500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที
2. ระเหิดแห้งโครงร่างแต่ละสูตรจนแห้งสนิท
3. ตัดชิ้นงานให้มีความหนาเฉลี่ยที่ประมาณ 2-3 มิลลิเมตร
4. แช่ชิ้นงานลงใน PBS buffer pH.7.4 จากนั้นใช้ vacuum pump เพื่อให้ชิ้นงานจม
5. แช่ชิ้นงานเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นวัดขนาดและชั่งน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น

หมายเหตุ: แต่ละวัสดุทำ 5 ซ้ำ

3.5 ทดสอบลักษณะทางชีวภาพ

3.5.1 Attachment and proliferation

3.5.1.1. เตรียมวัสดุตัวอย่างแบบสองมิติ

โดยหยดคอมโพสิตที่ได้จากข้อ 3.3.1 และ 3.3.2 ลงใน 24-well tissue culture plate ทำแห้งที่อุณหภูมิห้องใน Laminar flow จากนั้นอบฆ่าเชื้อด้วย ethylene oxide

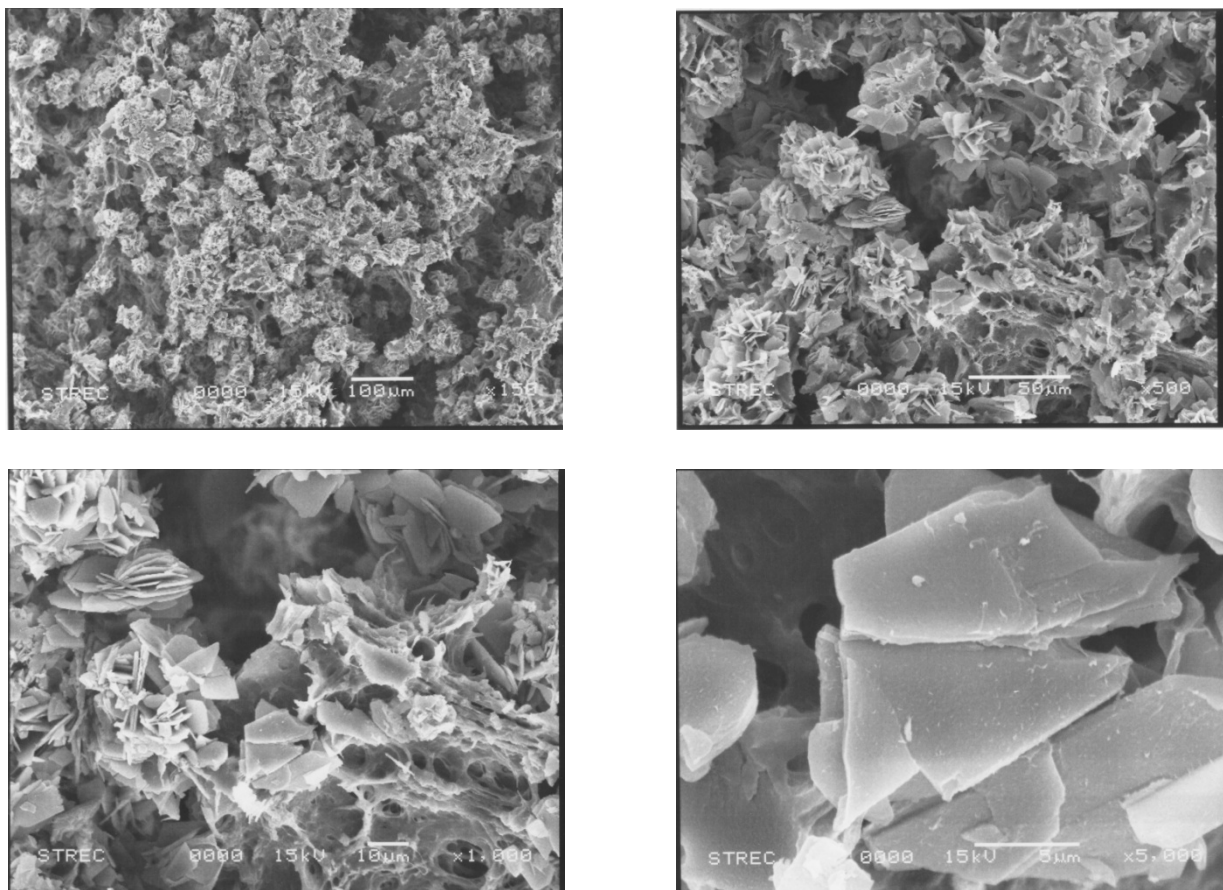
3.5.1.2. เลี้ยงเซลล์บนวัสดุทดสอบ

การทดลองครั้งนี้ใช้ bone marrow-derived stem cells (MSCs) passage ที่ 3 จากหนู wistar เพศเมีย โดยใส่เซลล์จำนวน 1×10^4 ลงในแต่ละช่องของ 24-well tissue culture plate ทำการเลี้ยงเซลล์ต่อไปที่สภาวะ 37°C , 5% CO_2 แล้วทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 6, 24, 72 และ 120 ชั่วโมง เพื่อทำ DNA assay ด้วย spectrophotometry method, Hoechst 33258 solution หาจำนวนเซลล์ในแต่ละช่วงเวลา

4. ผลการวิจัย (ส่วนการพัฒนาโครงเลี้ยงเซลล์แบบใหม่)

4.1 ผลการทดสอบทางกายภาพ

4.1.1 Surface and Porosity



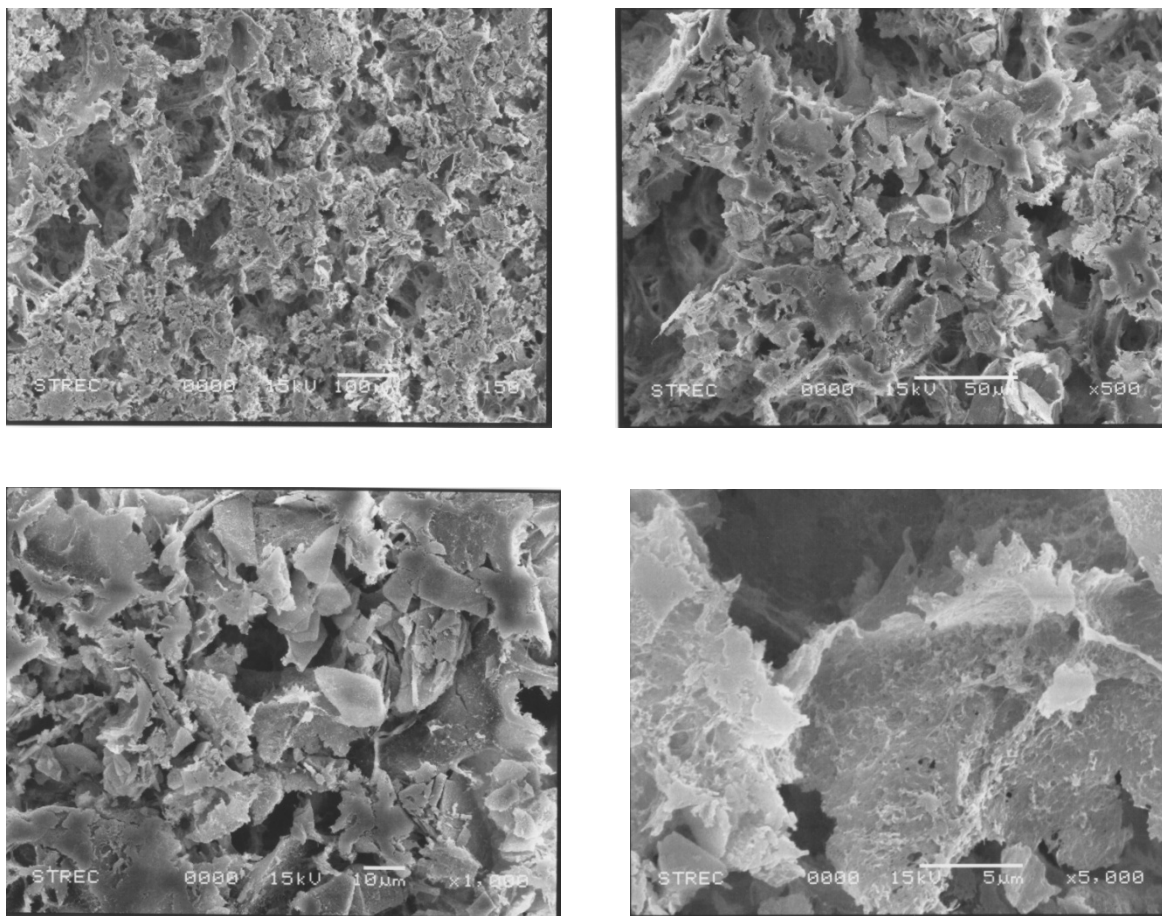
รูปที่ 2.16 ซ้ายบน ภาพถ่าย SEM วัสดุประกอบไคโตซาน/ไฟโบรอินไหมไทย/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ ที่มีอัตราส่วนระหว่างไคโตซาน/ไฟโบรอินไหมไทย 25ต่อ75 (กำลังขยาย x150)

ขวาบน (กำลังขยาย x500)

ซ้ายล่าง (กำลังขยาย x1000)

ขวาล่าง (กำลังขยาย x5000)

จากภาพSEM จะสังเกตเห็นว่าวัสดุมีรูพรุนขนาดประมาณ 100 μm และเมื่อสังเกตที่กำลังขยาย 500, 1000 พบมีวัสดุลักษณะเป็นแผ่น (flake) เชื่อมโยงอยู่กับเส้นใยพอลิเมอร์ โดยพื้นผิวของแผ่นวัสดุ (flake) มีลักษณะเรียบ เมื่อเทียบกับวัสดุประกอบสูตร 50/50 และ 75/25 (รูปที่ 2.17, 2.18)



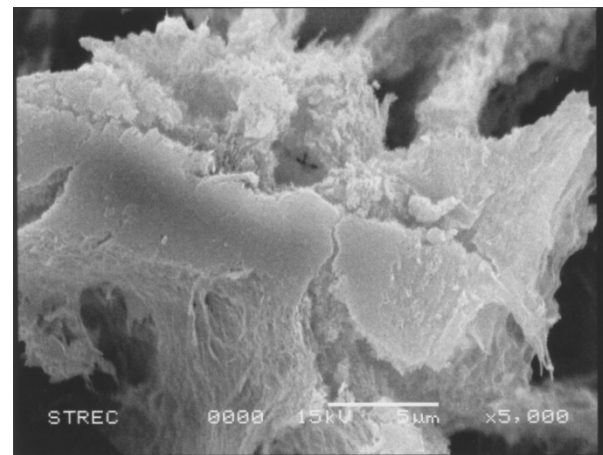
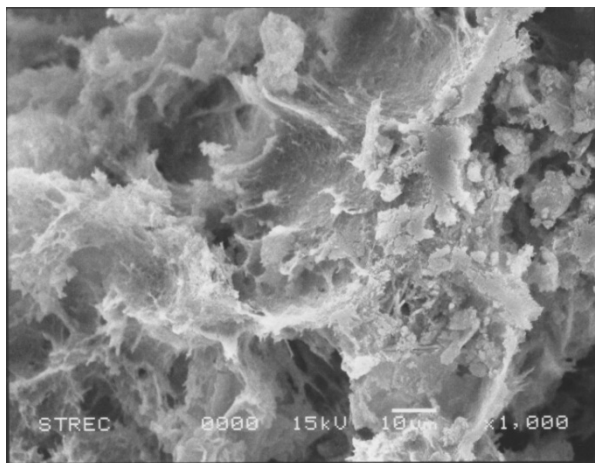
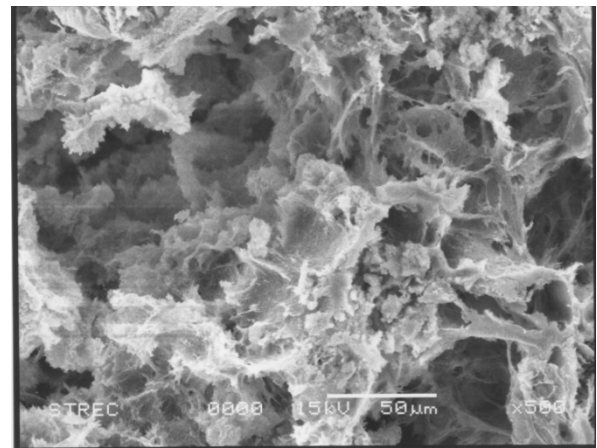
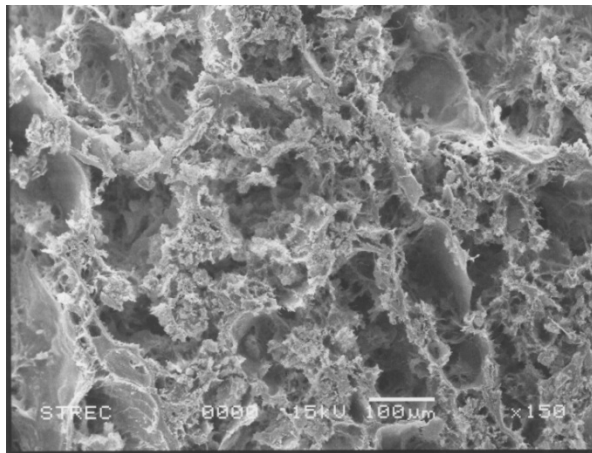
รูปที่ 2.17 ซ้ายบน ภาพถ่าย SEM วัสดุประกอบไคโตซาน/ไฟโบรอินไหมไทย/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ ที่มีอัตราส่วนระหว่างไคโตซาน/ไฟโบรอินไหมไทย 50 ต่อ 50 (กำลังขยาย x150)

ขวาบน (กำลังขยาย x500)

ซ้ายล่าง (กำลังขยาย x1000)

ขวาล่าง (กำลังขยาย x5000)

สังเกตพบว่ารูพรุนมีขนาดเล็กกว่ารูพรุนของวัสดุประกอบไคโตซาน/ไฟโบรอินไหมไทย/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่มีอัตราส่วนระหว่างไคโตซาน/ไฟโบรอินไหมไทย 25 ต่อ 75 แต่คงมีลักษณะที่คล้ายกันตรงที่มีส่วนของวัสดุลักษณะเป็นแผ่น (flake) เชื่อมโยงอยู่กับเส้นใยพอลิเมอร์ กระนั้นวัสดุแผ่น (flake) กลับไม่เรียบเหมือนวัสดุประกอบดังสูตร 25 ต่อ 75



รูปที่ 2.18 ซ้ายบน ภาพถ่าย SEM วัสดุประกอบไคโตซาน/ไฟโบรอินไหมไทย/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ ที่มีอัตราส่วนระหว่างไคโตซาน/ไฟโบรอินไหมไทย 75 ต่อ 25 (กำลังขยาย x150)

ขวบน (กำลังขยาย x500)

ซ้ายล่าง (กำลังขยาย x1000)

ขวาล่าง (กำลังขยาย x5000)

รูพรุนมีขนาดเล็ก แต่มีอยู่มากเมื่อเทียบกับวัสดุสูตร 25/75 และ 50/50 และสังเกตแทบไม่พบวัตถุทรงแผ่น (flake) คาดว่าเพราะไคโตซานที่มีปริมาณมาก(กว่าสูตรอื่น) จับตัวอยู่ร่วมกับส่วนของไฟโบรอินไหมไทย ซึ่งต้องรอการตรวจสอบจากการใช้ Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX) ต่อไป

สรุป จากการตรวจสอบด้วย SEM พบว่า ปริมาณของ silk fibroin มีผลต่อขนาดของรูพรุน โดยพบว่ายิ่งมีปริมาณของ silk fibroin มาก ขนาดรูพรุนจะใหญ่แต่การกระจายตัวกลับน้อยกว่าเมื่อเทียบกับวัสดุที่มีปริมาณไคโตซานมาก ซึ่งขนาดของรูพรุนจะมีผลต่อการเคลื่อนตัวของเซลล์เริ่มต้นกระดูกเพื่อเข้าไปเจริญเติบโตเป็นเซลล์กระดูก เมื่ออยู่ในร่างกาย (in vivo) ดังนั้นจึงต้องทำการทดลองนำวัสดุทดแทนกระดูกแบบสามมิติมาเลี้ยงเซลล์ (in vitro) เพื่อหาขนาดของรูพรุนที่เหมาะสมในเฟสต่อไป

4.1.2 Swelling Properties

สูตรวัสดุประกอบไคโตซาน/ไฟโบรอินไหมไทย/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่มีอัตราส่วนระหว่างไคโตซาน/ไฟโบรอินไหมไทย 25 ต่อ 75 มีเส้นผ่านศูนย์กลางเพิ่มขึ้น 3.5% มีความหนาเพิ่มขึ้น 7.2% น้ำหนักเพิ่มขึ้น 638%

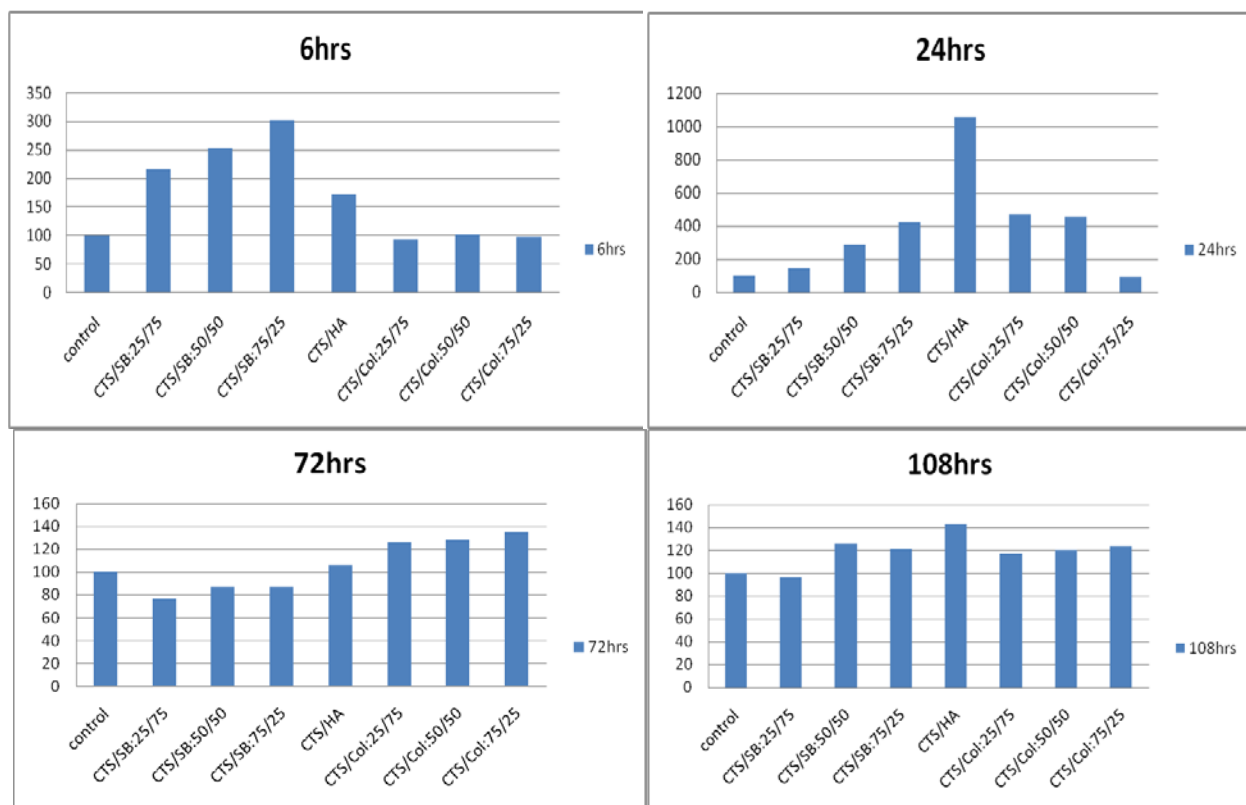
สูตรวัสดุประกอบไคโตซาน/ไฟโบรอินไหมไทย/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่มีอัตราส่วนระหว่างไคโตซาน/ไฟโบรอินไหมไทย 50 ต่อ 50 มีเส้นผ่านศูนย์กลางเพิ่มขึ้น 0.78% มีความหนาเพิ่มขึ้น 9.69% น้ำหนักเพิ่มขึ้น 692%

สูตรวัสดุประกอบไคโตซาน/ไฟโบรอินไหมไทย/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่มีอัตราส่วนระหว่างไคโตซาน/ไฟโบรอินไหมไทย 75 ต่อ 25 มีเส้นผ่านศูนย์กลางเพิ่มขึ้น 3.86% มีความหนาเพิ่มขึ้น 1.42% น้ำหนักเพิ่มขึ้น 961%

สรุป ไคโตซานมีผลทำให้วัสดุมีการดูดซับน้ำ (swelling) ที่ดีขึ้น แต่ไม่มีผลทางสถิติเรื่องขนาดที่เพิ่มขึ้นว่าเกี่ยวข้องกับไคโตซานและไฟโบรอินไหมไทย

4.2 Attachment and proliferation

กราฟที่ได้เกิดจากการเปรียบเทียบจำนวนแท่งของเซลล์ที่เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุม (เซลล์ที่เลี้ยงบนจาน PS สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์) และในแต่ละสูตรของวัสดุทำการทดลองซ้ำ 4 ครั้ง



จากกราฟสามารถอธิบายความโดยย่อได้ว่า โฟโบรอนไหมไทยมีผลช่วยในการเกาะติด (Attachment) ของเซลล์ และคอลลาเจนมีผลช่วยให้เซลล์มีการเติบโต (Proliferation) ที่ดีขึ้น

โดยพบว่าวัสดุสูตร CTS/HA มีการยึดเกาะและเติบโตของเซลล์ที่ดี ซึ่งตรงข้ามกับผลการทดลองในเฟสก่อนหน้า ที่เป็นเช่นนั้นเพราะไคโตซานในการทดลองครั้งนี้มี % deacetylation อยู่ที่ 90 ซึ่งสูงกว่าในการทดลองในเฟสที่ 2 ซึ่งมี % deacetylation อยู่ที่ 80 ทำให้ทราบว่า % deacetylation มีผลต่อการยึดเกาะและเจริญของเซลล์

7. บรรณานุกรม

1. Gellynck, K., Verdonk, P., Forsyth, R., Almqvist Fredrik, K., Nimmen Van, E., Gheysens, T., Mertens, J., Langenhove Van, L., Kiekens, P., Verbruggen G., *J Mater Sci: Mater Med* 19, 2963–2970 (2008).
2. Meinel, L., Hofmann, S., Karageorgiou, V., Kirker-Head, C., McCool, J., Gronowicz, G., Zichner, L., Langer, R., Vunjak-Novakovic, G., Kaplan, D., *Biomaterials* 26, 147–155 (2005).

3. Fini, M., Motta, A., Torricelli, P., Giavaresi, G., Nicoli Aldini, N., Tschon, M., Giardino, R., Migliaresi, C., *Biomaterials* 26, 3527–3536 (2005).
4. Panilaitis, B., H. Altman, G., Chen, J., Hyoun-Joon, J., Karageorgiou, V., Kaplan, D., *Biomaterials* 24, 3079-3085 (2003).
5. Cai K, Yao K, Yang Z, Qu Y, Li X, *J Mater Sci: Mater Med* 18, 2017–2024 (2007).
6. Hua Y, Ning C, Xiaoying L, Buzhong Z, Wei C, Xiaoling S, *Engineering in Medicine and Biology* 27th Annual Conference Shanghai, China 1-4 (2005).
7. Shinn-Jyh Ding, 2007, Biodegradation behavior of chitosan / calcium phosphate composite
8. William F. Ganong. MC Graw Hill, “ Review of medical physiology ”, 2005
9. I.Manjubala, S.Scheler, Jörg Bössert, Klaus D.Jandt, Published, Elsevier Ltd, September 07, 2005
10. ศูนย์วัสดุชีวภาพไคติน-ไคโตซาน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย “ ของเหลือจากทะเล...สู่ไคติน-ไคโตซาน ”, พิมพ์ครั้งที่สอง, ศูนย์วัสดุชีวภาพไคติน-ไคโตซาน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาคารสถาบันวิจัยโลหะและวัสดุ ชั้น 10, 2547
11. Temsiri Wangtaveesab, eds., “ Factors Influencing Pore Formation in Chitosan Temporary Scaffold ”, The Second National Chitin Chitosan Conference, 2004
12. R.Murugan and S.Ramakrishna, 2003, Bioresorbable composite bone paste using polysaccharide based nano hydroxyapatite
13. Corrado Muzzarelli and Riccardo A.A. Muzzarelli, 2002, Natural and artificial chitosan-inorganic composite
14. Riccardo A.A. Muzzarelli, eds., 1998, Osteogenesis promoted by calcium phosphate N,N-dicarboxylation
15. R.A.A. Muzzarelli and M.G. Peter, eds., “ Chitin Handbook ”, European Chitin Society. 1997: 88-86889-01-1

8. ภาคผนวก

ภาคผนวก ก. บทควมนำเสนอในที่ประชุมวิชาการ เรื่องผลของโครงเลี้ยงเซลล์ไคซานและไฮดรอกซีอะพาไทต์ ในการรักษาการสูญเสียกระดูกในกระต่าย

Effects of chitosan/hydroxyapatite composite scaffold on large bone defect healing in rabbits
ผลของการใช้โครงสร้างประกอบไคโตซานและไฮดรอกซีอะพาไทต์ต่อการหายของช่องว่างกระดูกขนาดใหญ่ใน
กระต่าย

Chaiyakorn Thitiyanaporn^{1,2,4}, Rath Pichyangkura³, Jedee Temwichitr⁴, Naris Thengchaisri^{4*}

¹Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaengsean Campus, Thailand

²Centre of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Thailand

³Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Thailand

⁴Department of Companion Animal Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Thailand

* Corresponding author

บทคัดย่อ

กระดูกไม่เชื่อมติดที่มีสาเหตุจากการสูญเสียขึ้นกระดูกเป็นปัญหาที่สำคัญในคลินิก มีรายงานว่าไคโตซานและสารประกอบมีส่วนช่วยในการหายของกระดูกในสัตว์ การทดลองใช้กระต่าย 20 ตัว เพศผู้ น้ำหนัก 2.5-3.0 กิโลกรัม ทำการตัดกระดูกเรเดียสขาหนึ่งข้างแล้วทำการแบ่งเป็นสองกลุ่ม 1) กลุ่มควบคุม ที่เว้นช่องว่างของกระดูกไว้ 2) กลุ่มทดลอง ใช้องค์ประกอบไฮดรอกซีอะพาไทต์และไคโตซานเพื่อทดแทนกระดูก หลังฝังวัสดุ ได้สังเกตอาการทางคลินิก การเปลี่ยนแปลงของภาพถ่ายรังสี เป็นเวลา 3 เดือน กระต่ายถูกเมตตาฆาตเพื่อทำการวินิจฉัยทางภาพ CT scan และพยาธิวิทยาที่ 1 และ 3 เดือน พบว่ามีการบวมเล็กน้อยที่กระดูกเรเดียสในทั้งสองกลุ่ม ผลของภาพถ่ายรังสีและ CT Scan พบว่าส่วนที่หายไปของกระดูกในกลุ่มควบคุมมีการหายสมบูรณ์ 80% ในขณะที่มีการหายแบบสมบูรณ์เพียง 20% ในกลุ่มทดลอง ผลพยาธิวิทยาพบเซลล์ PMN และ MN ในบริเวณฝังวัสดุในกลุ่มทดลอง เมื่อการทดลองเสร็จสิ้นพบว่า กลุ่มทดลองมีกระดูกสร้างใหม่น้อยกว่าในกลุ่มควบคุม คำสำคัญ : ไคโตซาน, ไฮดรอกซีอะพาไทต์, กระดูก, กระต่าย

Introduction

Large bone defect due to non union is a serious problem in clinic include animal and human. The common causes of bony defect include trauma, development deformities, tumor resection and diseases⁽¹⁾. Many researchers have been studied about bone substitute materials for promote bone healing. Hydroxyapatite is a most favorite material studied and become commercial. Chitosan is a polymer that comes from the waste product of fishery industry. Chitosan and its derivatives have been reported to have osteogenic activity and promote bone mineralization on artificially made bone defects in animal models^(4,5,7). Porous chitosan structure can be formed by freezing and lyophilizing chitosan solutions in suitable molds. The mechanical properties of chitosan scaffolds depend largely on the pore size and orientations⁽³⁾.

Materials and Methods

Chitosan hydroxyapatite composite material was prepared by co - precipitation and lyophilizes techniques at Chulalongkorn University. The rabbit 2.5 – 3.5 kg 20 male New Zealand White Rabbits were used in this study. The rabbits were grouped to control (not repair for use as blank defect) and treatment (fill defect with hydroxyapatite/chitosan composite material) group.

The rabbits were anesthetized with diazepam, ketamine and maintenance with isoflurane. enrofloxacin and carprofen were given for infection and pain control. Fifteen millimeter unilateral osteotomy was done at mid shaft of left radius. Periosteal of each fragments of radius was elevated 5 mm. The blank defects were remained in control group while bone defects in treatment group were filled with hydroxyapatite/chitosan composite material. The rabbits were monitored for clinical signs and bone healing by radial circumference, radiographic examination in every week after implant. The rabbits were euthanized at 1 month and 3 months after surgery for CT scan and histopathologic examinations.

Results and Discussion

Physical examination of radial defect area after implant the chitosan hydroxyapatite composite shown mild swelling and pain when compare with control in first month. Nevertheless, pain at the defect was relief after first month to not pain in last month. In radiographic and CT results, some of rabbit's radius had callus develop cross over the defect at 4 – 8 weeks. At the end of experiment (12 weeks) 80% of radial defect healed completely in control group while only 20% of radial defect healed completely in treatment group. In treatment group, mild callus developed at the defect areas that close to ulna bone. In histopathologic result shown encapsulation of chitosan hydroxyapatite composite material with fibrous tissue, new bone developed at the end of each fragments as endochondral ossification and found white blood cell include of mononuclear (MN) and polymorphonuclear cell (PMN) in area of composite material. From all results shown that the chitosan hydroxyapatite composite may cause of inflammation at the large bone defect due to delay callus development when compare with control group. In an *in vitro* research show chitosan sponge had potential for use as bone substitute material because it can stimulate osteoblast proliferation and differentiation⁽⁶⁾. However, a property of chitosan is stimulate activity of phagocytic cell such as macrophage and polymorphonuclear cell (PMN) especially neutrophil⁽²⁾. In addition, chitosan has activity on antiangiogenesis of chicken chorioallantoic membrane (CAM) and inhibit proliferation, migration and tube formation of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)⁽⁸⁾. From the affect of chitosan on antiangiogenesis and induce inflammation suggest that chitosan may not appropriate to use as bone substitute material in clinic.

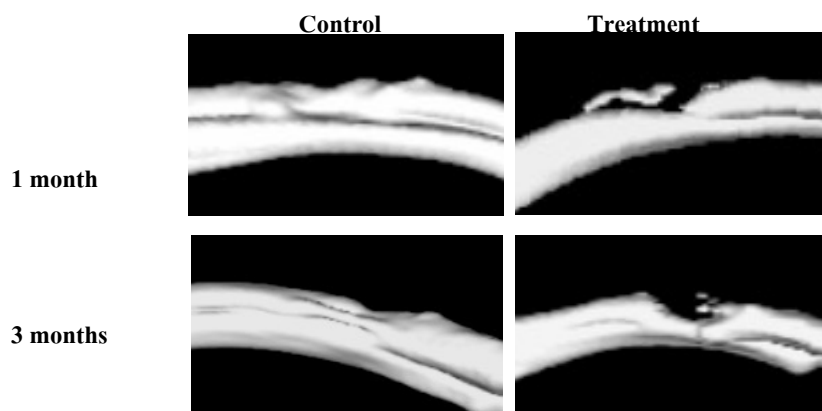


Figure 1. The CT-scan of rabbit radial bone defects with and without chitosan/hydroxyapatite (Chi/HA) composite scaffold.

Acknowledgements

The present study was supported by Strategic Scholarships Fellowships Frontier Research Network, Ministry of Education, and grant from Kasetsart University Research and Development Institute (KURDI).

References

- 1.Kenley, R.A., Yim, K., Abrams, J., Ron, E. and Turek, T. 1993. Review: Biotechnology and bone graft substitutes. Pharmaceutical Research. 10 (4):1393-1401
- 2.Kosaka, T., Kaneko, Y., Nakada, Y., Matsuura, M. and Tanaka, S. 1996. Effect of chitosan implantation on activation of canine macrophages and polymorphonuclear cells after surgical stress. J. Vet. Med. Sci. 58(10): 963-967
- 3.Madhally, S.V. and Matthew, H.W.T. (1999) Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. Biomaterial. 20: 1133-1142
- 4.Muzzarelli, R.A.A., Zucchini, C., Ilari, P., Pughaloni, A., Belmonte, M.M., Biagini, G. and Castaldini, C. 1993. Osteoconductive properties of methyl-pyrrolidinone chitosan in an animal model. Biomaterial. 14: 925-929
- 5.Muzzarelli, R.A.A., Ramos, V., Stanic, V., Dubini, B., Belmonte, M.M., Tosi, G. and Giardino R. 1998. Osteogenesis promoted by calcium phosphate *N,N*-dicarboxymethyl chitosan. Carbohydr. Polym. 36: 267-276
- 6.Seol, Y.J., Lee, J.Y., Park, Y.J., Lee, Y.M., Ku, Y., Rhyu, I., Lee, S.J., Han, S.B. and Chung C.P. 2004. Chitosan sponges as tissue engineering scaffolds for bone formation. Biotechnology Letters. 26: 1037-1041
- 7.Wang, A., Ao, Q., Cao, W., Zhao, C., Gong, Y., Zhao, N. and Zhao, X. 2005. Fiber-based chitosan tubular scaffolds for soft tissue engineering: fabrication and *in vitro* evaluation. Tsinghua Science and Technology. 10 (4): 449-453
- 8.Wu, H., Yao, Z., Bai, X., Du, Y. and Lin, B. 2008. Anti-angiogenic activities of chitoooligosaccharides. Carbohydrate Polymers. 73: 105-110

ภาคผนวก ข.

รายละเอียดและผลการทดสอบมาตรฐานเพื่อรองรับความปลอดภัยของโครงเลี้ยงเซลล์
กระดูกเทียม โดย วว.

- Safety test (Systemic injection test)
- Acute dermal irritation test
- Skin sensitization test