

รายงานการวิจัย

ชื่อแผนงานวิจัย (ภาษาไทย) โครงการวิจัยบูรณาการด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อเพื่อการพัฒนากระดูกเทียม
ระยะที่ 2

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

โครงการวิจัยย่อย 3 โครงการภายใต้แผนงานวิจัยนี้ :

ชื่อโครงการวิจัยที่ 1: การทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพและการประเมินความสามารถในการสร้างกระดูก
ของกระดูกเทียมที่ทำจากไหมไทยและไคโตซานในสัตว์ทดลอง

In vivo test of biocompatibility and bone formation of Thai silk fibroin- and chitosan-
based bone substitutes

ชื่อโครงการวิจัยที่ 2: การทดสอบความปลอดภัยของกระดูกเทียมที่ทำจากไหมไทยและไคโตซานตามมาตรฐาน

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

ชื่อโครงการวิจัยที่ 3: การพัฒนาเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพเพื่อการเพาะเลี้ยงเซลล์และวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก
ที่ใช้ ครงเลี้ยงเซลล์สามมิติจากไหมไทยและไคโตซาน

Development of a bioreactor for cell culture and bone tissue engineering using three
dimensional Thai silk fibroin and chitosan scaffolds

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปี _____ 2552 _____ จำนวนเงิน _____ 3,000,000 _____ บาท

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

รายนามคณะผู้วิจัย พร้อมทั้งหน่วยงานที่สังกัดและหมายเลขโทรศัพท์

1. รศ.ดร.ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล (siriporn.d@chula.ac.th)
ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทร.0-2218-6862 โทรสาร 0-2218-6877 มือถือ 081-832-3019
2. ผศ.ดร.โสธรา กนกพานนท์ (sorada.k@chula.ac.th)
ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทร 0-2218-6867 โทรสาร 0-2218-6877
3. ผศ.น.สพ.ดร.กัมปนาท สุนทรวิภาต (skumpana@hotmail.com, Kumpanart.S@chula.ac.th)
ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทร 02-218-9639 โทรสาร 02-218-9638 มือถือ 081-482-8488
4. ผศ.ดร.รัฐ พิษยางกูร (rpitchyangkura@yahoo.com)
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทร.0-2218-5437 โทรสาร 0-2218-5561

5. อ.สพ.ญ. ชาลิกา หวังดี (chalika_vet@hotmail.com)
ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทร 0-2218-9639 โทรสาร 0-2218-9638
6. รศ.น.สพ.ดร. วิจิตร บรรณารุ (wijit.b@hotmail.com)
ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทร 02-218-9629
7. นพ. ประวิทย์ กิตติดำรงสุข (fmedpkd@md.chula.ac.th)
ภาควิชาออร์โทปิดิกส์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทร.0-2256-4230 โทรสาร 0-2256-4625
8. รศ.ดร. ประเสริฐ ภูสันต์ (prasert.p@chula.ac.th)
ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทร. 0-2218-6870 โทรสาร 0-2218-6877
9. ผศ.นพ. ถนอม บรรณประเสริฐ (drtanom@yahoo.com)
ภาควิชาโสต ศอ นาสิกวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทร.0-2256-3562 โทรสาร 02-256-3562

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี
งบประมาณ 2552

บทคัดย่อ (Abstract)

ภาษาไทย

แผนการวิจัยเรื่อง โครงการวิจัยบูรณาการด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อเพื่อการพัฒนากระดูกเทียม ระยะที่ 2 นี้ เป็นแผนงานวิจัยต่อเนื่องปีที่ 2 ของแผนงานวิจัยในระยะที่ 1 (ปีที่ 1) ซึ่งได้ทำการพัฒนาต้นแบบโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมที่ผลิตจากชีววัสดุหลักในประเทศ 2 ชนิดคือ ไพโบรอนไหมไทย และไคโตซาน ซึ่งมีสมบัติทางกายภาพ (ฟิสิกส์) ทางกล ที่เหมาะสม รวมทั้งมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการต่อเซลล์กระดูก และเซลล์ต้นกำเนิด ในแผนงานนี้ได้ทำการพัฒนาต้นแบบโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกทั้งสองชนิดอย่างต่อเนื่อง เพื่อให้สามารถนำไปทดสอบในมนุษย์ได้ในระยะที่ 3 โดยประกอบด้วยงานใน 3 โครงการย่อย ได้แก่ การทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมในสัตว์ทดลอง การทดสอบความปลอดภัยในการใช้งานของโครงเลี้ยงเซลล์ตามมาตรฐานการทดสอบผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ที่มีในประเทศ และการพัฒนาเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพเพื่อการเพาะเลี้ยงเซลล์และวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก

ผลการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพและการประเมินความสามารถในการสร้างกระดูกของกระดูกเทียมในสุนัขด้วยภาพถ่ายทางรังสีและทางจุลพยาธิวิทยา พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ชนิดที่มีไคโตซานเป็นส่วนประกอบหลักก่อให้เกิดปฏิกิริยาอักเสบที่รุนแรง และไม่ย่อยสลายภายหลังการปลูกถ่ายเป็นเวลา 4 เดือน ในขณะที่โครงเลี้ยงเซลล์ชนิดที่มีไหมไทยเป็นส่วนประกอบหลัก ก่อให้เกิดการอักเสบที่น้อยมาก และมีการแทรกของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเข้าไปในโครงเลี้ยงเซลล์ พบกระดูกงอกใหม่ได้เร็วกว่าการใช้โครงเลี้ยงเซลล์ชนิดที่มีไคโตซานเป็นส่วนประกอบหลัก จากการส่งตรวจมาตรฐานเพื่อรับรองความปลอดภัยสำหรับผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) และการตรวจสอบความปลอดภัยโดยคณะผู้วิจัยเองตามมาตรฐาน ISO-10993 พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมที่ผลิตจากไหมไทยเป็นหลัก หรือ TSF-bone substitute ไม่เป็นพิษต่อสัตว์ทดลอง ไม่พบอาการระคายเคืองอย่างเฉียบพลัน รวมถึงไม่ก่อให้เกิดผื่นแดงและการบวมที่ผิวหนังของสัตว์ทดลอง ทั้งนี้โครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำจากไคโตซานเป็นหลักมิได้ส่งตรวจความปลอดภัยเนื่องจากพบว่าทำให้เกิดการอักเสบอย่างรุนแรงจากผลการศึกษาในโครงการย่อยที่ 1 ส่วนผลการพัฒนาเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบไหลวนผ่าน เพื่อการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกบนโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่าเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพที่ออกแบบสามารถส่งเสริมการเพาะขยายจำนวน และกระตุ้นเซลล์ต้นกำเนิดให้มีการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูกได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ด้านการศึกษาวิจัยเซลล์ และการรักษาที่มีการใช้เซลล์ต้นกำเนิด

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า โครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมชนิดที่มีไหมไทยเป็นส่วนประกอบหลัก มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพในสัตว์ทดลอง มีความปลอดภัยในสัตว์ทดลอง ไม่ก่อให้เกิดการระคายเคือง และผื่นแดง ถือว่าเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีศักยภาพในการพัฒนาต่อไปเพื่อนำมาใช้งานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก เพื่อสร้างเนื้อเยื่อกระดูกทดแทนด้วยต้นทุน ที่ต่ำกว่าต่างประเทศ

ภาษาอังกฤษ

The project on Multidisciplinary Researches in Tissue Engineering for Development of Bone Substitutes: Phase II is the continuous phase (second year) of the main project. In Phase I, two types of bone substitute scaffolds having suitable physical, mechanical and *in vitro* biological properties have been developed from mainly Thai silk fibroin and chitosan. In this Phase, two obtained scaffolds were further developed as divided into three subprojects: *in vivo* test of biocompatibility and bone formation, standard safety testing of Thai silk fibroin- and chitosan-based bone substitutes, and development of a bioreactor for cell culture and bone tissue engineering.

The results of radiographic evaluations and histopathological examinations on the biocompatibility of two types of scaffolds with bone implanted sites in dogs showed that chitosan based scaffold could profound the higher inflammatory responses to the surgical implanted site and the chitosan based scaffolds still remained after 4 months of implantation. Thai silk fibroin based scaffold showed the lower grade of inflammation and the penetration of fibrous tissue into the scaffold. The scaffold could not be grossly detected after 2 months of implantation. The results on the safety of the developed bone substitutes were obtained from the certified test by Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR) and in-house test according to ISO-10993. It was noticed that Thai silk-based bone substitute or TSF-bone substitute was not toxic to animals. There were no dermal irritation and skin erythema. However, chitosan-based scaffold was not tested for its safety due to high inflammatory responses observed in Subproject 1. From the development of an infused bioreactor for dynamic culture of bone marrow derived mesenchymal stem cells (MSC) on 3D scaffolds *in vitro*, it was found that the designed bioreactor was able to enhance the seeding, proliferation, and differentiation of stem cells which would benefit cell culture system for research and therapeutic purposes.

In conclusion, Thai silk fibroin based scaffold has good biocompatibility *in vivo*. It is not toxic and does not exhibit any irritation and skin erythema. Thai silk fibroin based scaffold has high potential to be further developed as a promising scaffold for bone tissue engineering. It could be used to repair bone defects with a lower cost than imported bone substitutes.

คำสำคัญ : ไฟโบรอินไหมไทย, กระดูกเทียม, วิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก, การทดสอบความปลอดภัย, ความเข้ากันได้ทางชีวภาพ, เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ (Thai silk fibroin, bone substitute, bone tissue engineering, safety test, biocompatibility, bioreactor)

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
บทคัดย่อ ภาษาไทย.....	4
บทคัดย่อ ภาษาอังกฤษ.....	5
คำสำคัญ.....	5
สารบัญเรื่อง.....	6
บทนำรวม.....	7
1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา.....	7
2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย.....	8
3. รายละเอียดความเชื่อมโยงระหว่างโครงการวิจัยย่อย.....	9
4. ประโยชน์ที่ได้รับ.....	13
5. หน่วยงานที่นำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์.....	13

บทนำรวม

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

การสูญเสียกระดูก (bone defects) เป็นปัญหาที่พบได้ในทุกเพศ ทุกวัย ซึ่งเกิดขึ้นจากสาเหตุต่างๆ อาทิ จากอุบัติเหตุ จากการตัดเนื้องอกของกระดูกออก หรือจากการติดเชื้อ เป็นต้น การรักษานิยมใช้กระดูกจากตัวผู้ป่วยเอง (autologous bone graft) เนื่องจากเหตุผลสำคัญคือ ทำให้เกิดการรักษากระดูกที่ดี และมีการปรับสภาพของบริเวณที่นำกระดูกไปใส่ (remodeling) หลังจากใช้งาน ส่วนใหญ่นิยมนำมาเป็นชิ้นเล็ก (cortico-cancellous chip) โดยนำมาจากบริเวณเชิงกรานสำหรับกรณีที่ต้องการความแข็งแรงเป็นพิเศษ เช่น บริเวณที่ต้องรับน้ำหนัก อาจใช้กระดูกที่มีลักษณะเป็นแท่ง (strut graft) โดยนำมาจากกระดูกข้าง กระดูกหน้าแข้ง (fibula) หรือบางส่วนของกระดูกหน้าแข้ง ข้อจำกัดของการนำกระดูกจากตัวผู้ป่วยเองมาใช้คือ ปริมาณที่จำกัด และความเจ็บปวดจากบาดแผลบริเวณที่นำกระดูกมาใช้ (donor site morbidity) ในบางครั้ง มีการนำกระดูกของบุคคลอื่น (allograft bone) มาใช้ในการรักษา แต่ก็ไม่สามารถกำจัดข้อจำกัด ข้างต้นได้อย่างสมบูรณ์ ในปัจจุบัน มีการใช้เทคโนโลยีการรักษาเพื่อเสริมสร้างและส่งเสริมการเจริญเติบโต ของเนื้อเยื่อกระดูกที่มีรายงานในต่างประเทศ อาทิ การกระตุ้นการเจริญเติบโตของกระดูกด้วย cytokines และการใช้กระดูกเทียมจากวัสดุประเภทเซรามิก และใช้โลหะไทเทเนียมช่วยยึดเกาะกระดูกบริเวณที่หัก อาจมีการเติมหรือเคลือบสารเร่งการสร้างกระดูก (osteoinductive materials) คือ ไซโตรอกซิมะพาไทต์ เพื่อช่วยเร่งการรักษากระดูกให้ดีขึ้น ปัญหาของกระดูกเทียมที่สำคัญเมื่อเทียบกับกระดูกจากตัวผู้ป่วยคือ การรักษาของกระดูกด้อยกว่ากระบวนการ remodeling เกิดขึ้นช้ากว่ามาก ซึ่งเป็นข้อเสียหากนำไปใช้บริเวณใกล้ส่วนของผิวข้อ อาจจะทำให้เกิดข้อเสื่อมได้ และอาจเกิดการระคายเคืองบริเวณที่สัมผัส ระหว่างเนื้อเยื่อกระดูกกับโลหะ ทำให้เกิดแผลเรื้อรังหรือติดเชื้อ นอกจากนี้ในกรณีใช้โลหะ เมื่อกระดูกเชื่อมต่อกันเป็นปกติแล้ว จำเป็นต้องผ่าตัดเป็นครั้งที่สองเพื่อนำโลหะออกจากร่างกาย

คณะผู้วิจัยซึ่งมีประสบการณ์วิจัยร่วมกันในจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อของผิวหนัง เส้นประสาท และกระดูกอ่อน ได้เล็งเห็นความจำเป็นในการใช้เทคโนโลยีด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เพื่อพัฒนาเทคโนโลยีด้านสุขภาพและการแพทย์เพื่อคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้นของประชากรในประเทศ ซึ่งเป็นรากฐานสำคัญในการพัฒนาประเทศอย่างยั่งยืน และเนื่องจากในปัจจุบันยังไม่มีการใช้กระดูกเทียมหรือกระดูกสังเคราะห์ (Bone Substitutes) อย่างแพร่หลายในประเทศไทย คณะผู้วิจัยจึงมุ่งเน้นที่จะพัฒนาชีววัสดุธรรมชาติที่ย่อยสลายได้ในร่างกายและผลิตได้ภายในประเทศ ได้แก่ โปรตีนไฟโบรอินจากไหมไทย (Thai silk fibroin) และไคโตซาน เพื่อประยุกต์ใช้ให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกทดแทนด้วยต้นทุน ที่ต่ำกว่าต่างประเทศ

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

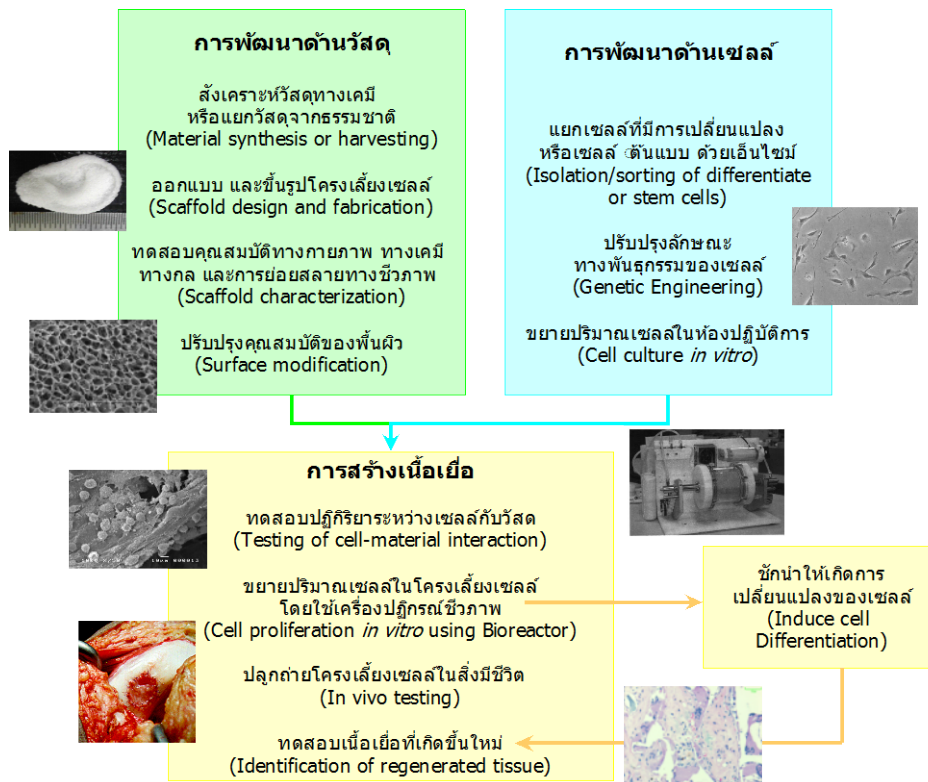
- 2.1 เพื่อพัฒนาต้นแบบกระดูกเทียมที่ผลิตโดยใช้ชีววัสดุหลักที่ย่อยสลายได้ในร่างกายและหาได้ภายในประเทศ ได้แก่ โปรตีนจากไหมไทย และไคโตซาน ที่มีสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพ และส่งเสริมการสร้างกระดูกในสัตว์ทดลอง
- 2.2 เพื่อพัฒนาเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบไหลวนผ่าน ในการเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูก และเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก รวมทั้งทดสอบการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกบนโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมสามมิติจากไหมไทยและไคโตซาน
- 2.3 เพื่อพัฒนาบุคลากรที่มีความรู้ความสามารถในสาขาวิชาด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ

3. รายละเอียดความเชื่อมโยงระหว่างโครงการวิจัยย่อย

วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue Engineering) เป็นกระบวนการสร้างเนื้อเยื่อ (regeneration of functional tissues) เพื่อทดแทน ซ่อมแซม หรือปรับปรุงการทำงานของเนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่สูญเสียหรือบาดเจ็บ ซึ่งโดยปกติจะไม่มีทางงอกใหม่เองในมนุษย์

เนื่องจากเนื้อเยื่อของร่างกายมีวัตถุประสงค์การใช้งานที่แตกต่างกันออกไป เช่น ใช้เป็นโครงสร้างเสริมแรง ได้แก่ กระดูกและกระดูกอ่อน เป็นโครงสร้างปกป้องอวัยวะ ได้แก่ ผิวหนัง ทำหน้าที่เฉพาะ ได้แก่ กล้ามเนื้อหัวใจ เส้นประสาท หรือมีการผลิตสารที่ร่างกายต้องการ เช่น ฮอร์โมน (ผลิตอินซูลิน) กระบวนการสร้างเนื้อเยื่อเหล่านี้จึงมีรายละเอียดวิธีการและความต้องการที่จำเพาะ แต่มีหลักการโดยทั่วไป ที่คล้ายคลึงกัน ดังแสดงในรูปที่ 1

วิธีการโดยทั่วไปโดยย่อ คือ การสกัดเซลล์ออกมาจากเนื้อเยื่อของผู้ป่วยแล้วนำมาเพิ่มจำนวน ในห้องปฏิบัติการ จากนั้นนำมาเพาะลงในโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีการออกแบบอย่างเหมาะสม แล้วจึงปลูก ถ้ายาโครงเลี้ยงเซลล์นั้นในร่างกายของผู้ป่วย ต่อมาเซลล์จะต้องเกิดการเปลี่ยนแปลง (differentiation) ไปเป็นเนื้อเยื่อที่ต้องการ จะเห็นว่าวิศวกรรมเนื้อเยื่อที่จะประสบความสำเร็จจะต้องอาศัยหลักการหลายศาสตร์ผสมผสานกัน นอกจากความรู้ทางด้านการแพทย์ ได้แก่ Chemistry, Material Science & Engineering, Cell-Materials Interface, Stem Cell Technology, Controlled Release และ Bioprocess Engineering โดยแต่ละศาสตร์จะต้องมีการทำงานร่วมกันอย่างใกล้ชิดเพื่อการสร้างเนื้อเยื่อทดแทนที่สามารถเลียนแบบธรรมชาติให้มากที่สุด



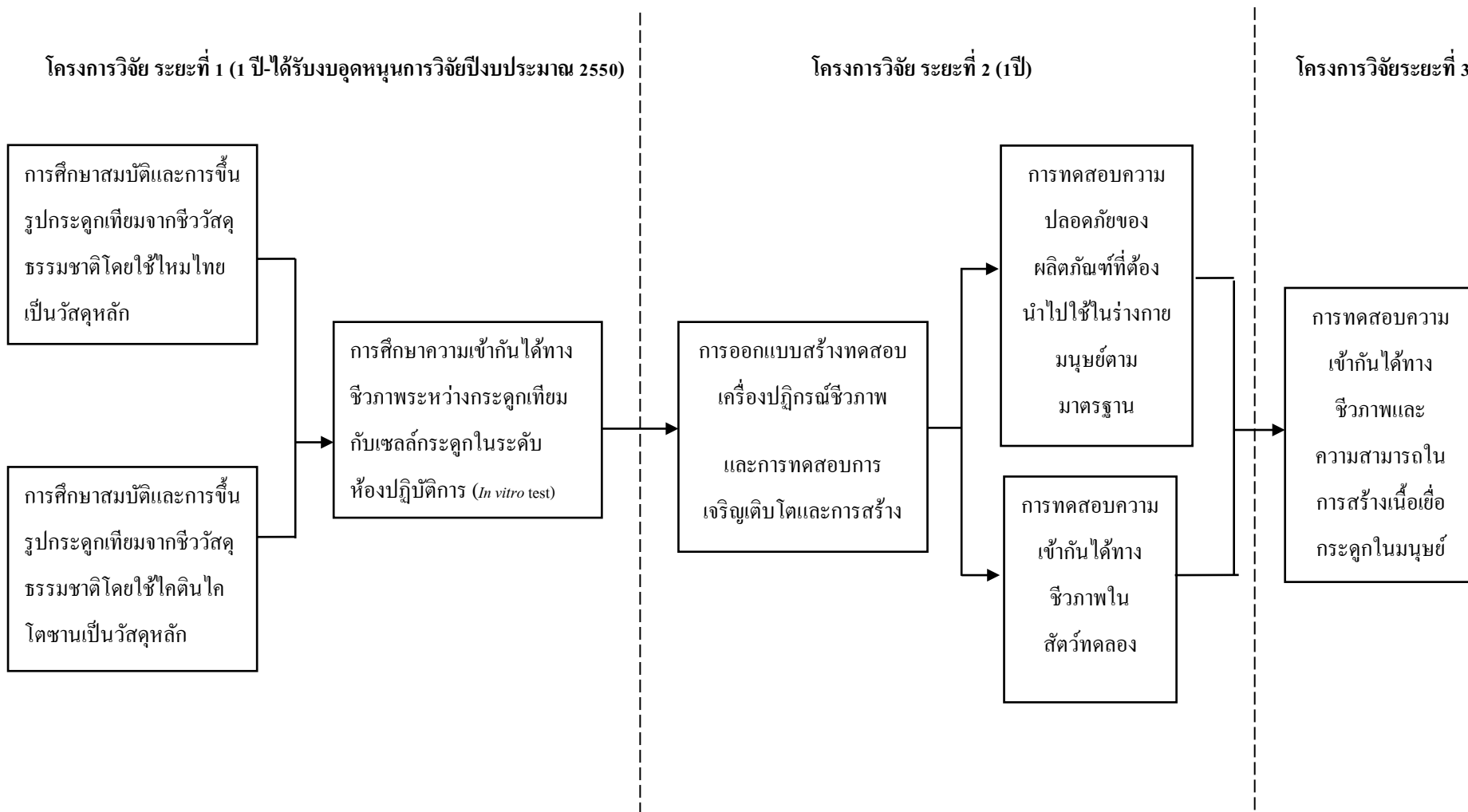
รูปที่ 1 กระบวนการสร้างเนื้อเยื่อ ประกอบด้วยการพัฒนาความรู้ต่างๆตามด้านหลัก ได้แก่ ด้านวัสดุ ด้านเซลล์ และด้านวิศวกรรมของเซลล์ มีการชักนำ (induce) เซลล์ชนิดต่างๆ (โดยการควบคุมสภาวะแวดล้อมภายนอก) ในโครงเลี้ยงเซลล์ (scaffold) ให้เจริญเติบโตขยายจำนวน (proliferation) และเปลี่ยนแปลง (differentiation) ไปเป็นเนื้อเยื่อที่ทำงานได้จริง

โดยคณะผู้วิจัยได้เลือกใช้ภาวะปลายกระดูกเรเดียสหักเป็นแบบจำลองสำหรับการวิจัยพัฒนากระดูกเทียมสำหรับมนุษย์ เนื่องจากกระดูกหักชนิดนี้เป็นกระดูกหักบริเวณข้อมือที่พบได้บ่อยที่สุดในเวชปฏิบัติ และในการผ่าตัดรักษามักพบภาวะมวลกระดูกบริเวณที่หักถูกบดอัดสูญหายไป ต้องนำกระดูกมาเสริมทดแทน ปรากฏการณ์ดังกล่าวเกิดขึ้นเนื่องจากธรรมชาติของกระดูกบริเวณใกล้ข้อจะเป็นกระดูกชนิดที่มีลักษณะพรุน (cancellous bone) เมื่อถูกการกดอัดจากการบาดเจ็บจะเกิดช่องว่างขึ้น หากปล่อยทิ้งไว้ช่องว่างดังกล่าวจะค่อย ๆ ทรุดตัวเข้าหากันจนกระทั่งช่องว่างดังกล่าวหายไป เกิดการติดผิดรูปของกระดูก (malunion) การป้องกันทำได้โดยนำกระดูกมาเสริมในช่องว่างที่เกิดขึ้น ดังนั้น การนำกระดูกมาเสริม (bone grafting) จึงเป็นการรักษามาตรฐานเพื่อป้องกันการทรุดตัวจนเกิดภาวะกระดูกติดผิดรูปดังกล่าว ซึ่งกระดูกที่นำมาใช้อาจเป็นกระดูกของผู้ป่วยเองซึ่งขุดมาเป็นชิ้นเล็ก ๆ หรือกระดูกเทียมชนิดอื่น ๆ โดยในงานวิจัยนี้จะพัฒนาการผลิตกระดูกเทียมจากชีววัสดุธรรมชาติที่ย่อยสลายได้ในร่างกายและผลิตได้ภายในประเทศ คือ ไพโบรอินที่สกัดจากไหมไทย และโคไคซาน ซึ่งเป็นสารอนุพันธ์ที่ได้จากเปลือกกุ้ง เปลือกปู แกนปลาหมึกที่

เป็นอาหารทะเลส่งออกหลักของประเทศ โดยมีการรายงานว่าโปรตีนไฟโบรอินจากไหมมีความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อต่าง ๆ โดยเฉพาะการสร้างเนื้อเยื่อกระดูก มีรายงานว่าไหมบ้าน *Bombyx mori* สามารถชักนำให้เกิดกระดูกได้ แต่สำหรับไหมไทยซึ่งถึงแม้จะเป็นไหมบ้าน *Bombyx mori* แต่มีความแตกต่างด้านสีสันจากไหมบ้านในต่างประเทศ และยังไม่เคยมีรายงานว่ามีการพัฒนาไหมไทยเพื่อการใช้งานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก ส่วนไคตินไคโตซานเป็นชีววัสดุธรรมชาติอีกชนิดหนึ่งที่ได้รับคความนิยมในการวิจัยพัฒนาเพื่อประยุกต์ใช้ในการส่งเสริมให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อกระดูก โดยมีทั้งโดยตัวมันเอง และการใช้ร่วมกับสารกลุ่มไฮดรอกซีอะปาทิตในรูปแบบต่าง ๆ

งานวิจัยนี้จะทำการแยกชีววัสดุทั้งสองชนิดจากแหล่งกำเนิดในประเทศ และนำมาขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติเพื่อใช้เป็นกระดูกเทียมในรูปแบบของกระดูกยาว (long bone) ขนาดเล็ก โครงเลี้ยงเซลล์นี้จะต้องมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Biocompatibility) ต่อเซลล์ และมีสมบัติด้านต่างๆ ที่เหมาะสม โดยจะถูกนำมาศึกษาลักษณะสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ทางกายภาพ (ฟิสิกส์) ทางเคมี และทางกล และการทดสอบปฏิกิริยาระหว่างโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมที่ผลิตขึ้นกับเซลล์กระดูก และเซลล์ต้นกำเนิด (stem cells) ในระดับห้องปฏิบัติการ (*in vitro* cell-materials interactions) เมื่อได้โครงเลี้ยงเซลล์กระดูกที่มีสมบัติเหมาะสมแล้ว จะได้ทำการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพในสัตว์ทดลอง และการทดสอบการใช้งานในมนุษย์เบื้องต้น (ISO-10993) รวมทั้งการทดสอบการสร้างกระดูกจริง ทั้งในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ (Bioreactor) ในสัตว์ทดลอง และในมนุษย์ โดยมีการประเมินความสำเร็จของการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกทั้งทางกายภาพ ทางเคมี โดยทิมสตัล แพทย์ออร์โทปิดิกส์ เพื่อให้สามารถใช้งานได้จริง โดยคาดว่ากระดูกเทียมที่ผลิตขึ้นนี้จะมีต้นทุนที่ต่ำกว่าต่างประเทศ และเทคโนโลยีที่ได้จากโครงการนี้ จะสามารถไปใช้ประโยชน์ด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อด้านอื่นๆ ต่อไป

จากที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น จะเห็นว่าโครงการวิจัยบูรณาการด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อเพื่อ การพัฒนากระดูกเทียมนี้เป็นโครงการวิจัยที่ต้องอาศัยความรู้จากบุคลากรหลายฝ่ายและมีระยะเวลาดำเนินงานวิจัยที่เป็นขั้นตอน ดังนั้นโครงการวิจัยบูรณาการนี้จึงถูกแบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือ ระยะที่ 1 (ปีที่ 1) ระยะที่ 2 (ปีที่ 2) และระยะที่ 3 ดังแสดงในรูปที่ 2 โดยโครงการวิจัยบูรณาการด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เพื่อการพัฒนกระดูกเทียมระยะที่ 1 ซึ่งได้ดำเนินการเสร็จสิ้นแล้วโดยทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2550 นั้น ได้ผลลัพธ์คือต้นแบบกระดูกเทียมที่ผลิตจากชีววัสดุหลัก 2 ชนิดคือไฟโบรอินไหมไทย และไคโตซาน ซึ่งมีสมบัติทางกายภาพ (ฟิสิกส์) ทางเคมี และทางกล ที่เหมาะสม รวมทั้งมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการต่อเซลล์กระดูก และเซลล์ต้นกำเนิด แผนงานโครงการวิจัยบูรณาการด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เพื่อการพัฒนกระดูกเทียมระยะที่ 2 ที่เสนอนี้ จะเป็นแผนงานโครงการต่อเนื่องเพื่อพัฒนกระดูกเทียมที่ได้รับคัดเลือกจากแผนงานระยะที่ 1 ซึ่งประกอบด้วยงานใน 3 ส่วนหลักดังแสดงใน โครงการวิจัยย่อย 3 โครงการภายใต้แผนงานวิจัยนี้ (ดูรูปที่ 2 ประกอบ) คือ



รูปที่ 2 แผนผังการดำเนินการวิจัยโครงการบูรณาการด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อเพื่อพัฒนากระดูกเทียมทั้งโครงการ (3 ระยะ)

โครงการย่อยที่ 1 : การทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพและการประเมินความสามารถในการสร้าง

กระดูกของกระดูกเทียมที่ทำจากไหมไทยและไคโตซานในสัตว์ทดลอง

โครงการย่อยนี้จะมีครอบคลุมการดำเนินการทดสอบกระดูกเทียมในสัตว์ทดลอง โดยกระดูกเทียมที่ใช้จะเป็นกระดูกเทียมที่ทำจากไหมไทยและไคโตซานซึ่งมีสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการที่ดี มีการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์กระดูกและเซลล์ต้นกำเนิดในระดับห้องปฏิบัติการที่ดีที่สุด (จากแผนงานระยะที่ 1) โดยการทดสอบในสัตว์ทดลองนี้จะมุ่งเน้นความสามารถในการชักนำให้เกิดการสร้างเนื้อกระดูกในสัตว์ทดลองประเภทสุนัข ซึ่งจะดำเนินการโดยสัตวแพทย์ผู้เชี่ยวชาญด้านสัลยกรรมกระดูก

โครงการย่อยที่ 2 : การทดสอบความปลอดภัยของกระดูกเทียมที่ทำจากไหมไทยและไคโตซานตาม

มาตรฐาน

การพัฒนาโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมที่มีสมบัติขั้นต้นเหมาะสมตามผลลัพธ์ที่ได้จากแผนงานระยะที่ 1 นอกจากต้องทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพและการประเมินความสามารถในการสร้างกระดูกของกระดูกเทียมในสัตว์ทดลองซึ่งจะดำเนินการในโครงการย่อยที่ 1 ภายใต้อำนาจงานวิจัยระยะที่ 2 นี้แล้ว ยังต้องมีการทดสอบความปลอดภัยของกระดูกเทียมที่ทำจากไหมไทยและไคโตซานตามมาตรฐานสากลควบคู่กันไป เพื่อเตรียมพร้อมนำกระดูกเทียมดังกล่าวไปใช้ในร่างกายนมนุษย์ต่อไป หากกระดูกเทียมที่ผลิตขึ้นมีความสามารถในการชักนำให้เกิดการสร้างเนื้อกระดูกในสัตว์ทดลองที่ดี โดยงานทดสอบความปลอดภัยของกระดูกเทียมที่จะดำเนินการในโครงการย่อยที่ 2 นี้ จะเริ่มจากการผลิตกระดูกเทียมสูตรที่ได้รับการคัดเลือกจากแผนงานระยะที่ 1 และนำไปทดสอบความปลอดภัยซึ่งแบ่งการดำเนินการออกเป็น 2 ทาง คือ การส่งตรวจมาตรฐานเพื่อรองรับความปลอดภัยสำหรับผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์โดยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ซึ่งเป็นหน่วยงานในประเทศซึ่งให้บริการทดสอบดังกล่าว และการตรวจสอบความปลอดภัยของกระดูกเทียมตามมาตรฐาน ISO-10993 โดยคณะผู้วิจัยจะดำเนินการเอง (เฉพาะการทดสอบที่คณะผู้วิจัยมีความพร้อมด้านเครื่องมือ อุปกรณ์ และสถานที่) เพื่อสอบกลับผลการทดสอบ

โครงการย่อยที่ 3 : การพัฒนาเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพเพื่อการเพาะเลี้ยงเซลล์และวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกที่ใช้โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติจากไหมไทยและไคโตซาน

โครงการย่อยนี้จะมีครอบคลุมการพัฒนาเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบไหลวนผ่านในการเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูก และเซลล์ต้นกำเนิด รวมทั้งทดสอบการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกบนโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมจากไหมไทยและไคโตซาน ทั้งนี้เนื่องจากโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมที่ผลิตขึ้นมีความหนาซึ่งทำให้เกิดผลเสีย

เช่น การใส่เซลล์ลงในโครงเลี้ยงเซลล์ (cell seeding) ไม่มีประสิทธิภาพ การเลี้ยงให้เซลล์ต้นกำเนิดเจริญเติบโตได้ไม่ดี เนื่องจากการจำกัดของ Mass transfer และการพัฒนาเป็นเนื้อเยื่อกระดูกของเซลล์ต้นกำเนิด ต้องอาศัยการให้แรงทางกลซึ่งต้องดำเนินการโดยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ (bioreactor) ดังนั้นการพัฒนาเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพจึงมีบทบาทสำคัญสำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ในการควบคุมสถานะต่างๆให้เหมาะสมกับการเลี้ยงเซลล์และเปลี่ยนแปลงให้เป็นเนื้อเยื่อกระดูกอย่างมีประสิทธิภาพ

4. ประโยชน์ที่ได้รับ

- 4.1 ได้รับองค์ความรู้ด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกสำหรับประยุกต์ใช้ในการวิจัยด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อสาขาอื่นต่อไป
- 4.2 ต้นแบบผลิตภัณฑ์โครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมที่ผลิตจากไฟโบรอินไหมไทยที่ผ่านการทดสอบความเข้ากันได้ในสัตว์ทดลอง และผ่านการทดสอบความปลอดภัยตามมาตรฐาน เพื่อนำไปสู่การผลิตเชิงพาณิชย์ ทั้งนี้ต้นแบบผลิตภัณฑ์นี้จะต้องถูกนำไปทดสอบในมนุษย์อย่างสมบูรณ์ในเฟสต่อไป ก่อนที่จะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความพร้อมที่จะไปใช้งานจริงด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกทางการแพทย์

5. หน่วยงานที่นำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- 5.1 อาจารย์นักวิจัย และบุคลากรระดับมหาวิทยาลัยและชุมชน
- 5.2 ผู้ผลิตวัสดุอุปกรณ์การแพทย์เพื่อทดแทนการนำเข้าจากต่างประเทศ
- 5.3 ประชาชนที่มีปัญหาสุขภาพเรื่องการสูญเสียกระดูก