

วิธีการทดลอง

การวางรูปแบบการวิจัย

เป็นการศึกษาแบบ pilot study เปรียบเทียบผลการรักษาก่อนและหลังการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด (BM-MSCs) และเซลล์กระดูกอ่อน (chondrocyte) การติดตามผลการรักษาภายหลังการปลูกถ่ายทางคลินิกโดยดูภาวะแทรกซ้อนภายหลังการผ่าตัดร่วมกับการประเมินทางคลินิก โดยใช้ KOOS (Knee and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS) และ MRI และผลการรักษาทางพยาธิ (pathology) นำมาย้อม histology เพื่อศึกษากระดูกอ่อนที่สร้างขึ้นใหม่ ตัวอย่างได้แก่ ผู้ป่วยที่มีการบาดเจ็บหรือผิดปกติของกระดูกอ่อนขนาดใหญ่ (มากกว่า 2 ตารางเซนติเมตร) และมีอาการเจ็บหรือความผิดปกติทางคลินิก โดยผู้ประเมินผลการรักษาจะถูกปิดการรักษาเพื่อหลีกเลี่ยงอคติ

เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครเข้าสู่โครงการวิจัย

ผู้ป่วยที่เหมาะสมในการปลูกถ่ายเซลล์กระดูกอ่อนที่เพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก ได้แก่

- ผู้ป่วยที่มีการบาดเจ็บของกระดูกอ่อนขนาดใหญ่
- มีอาการทางคลินิก
- อายุน้อยกว่า 45 ปี

เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครออกจากโครงการวิจัย

ผู้ป่วยที่ไม่เหมาะสมในการปลูกถ่ายเซลล์กระดูกอ่อนที่เพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก ได้แก่

- ผู้ป่วยที่ไม่มีภาวะข้อเสื่อม
- ผู้ป่วยที่ไม่มีโรคประจำตัวที่เป็นอันตรายต่อการผ่าตัด
- ผู้ป่วยที่ปฏิเสธการผ่าตัด 2 ครั้ง และขั้นตอนการทำกายภาพภายหลังการผ่าตัด

เซลล์กระดูกอ่อน (chondrocyte) ได้มาจากการแยกจากชิ้นกระดูกอ่อนนำมาเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์ต้นกำเนิด (stem cell) ที่แยกจากไขกระดูก (bone marrow) ของผู้ป่วยเองในห้องปฏิบัติการ ผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดเปิดข้อเข่า (arthrotomy) เพื่อปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดและเซลล์กระดูกอ่อนลงในรอยโรค และติดตามผลการรักษาระยะสั้นที่ 1 ปี ภายหลังการผ่าตัดและติดตามผลการรักษาระยะยาวที่ 3 – 5 ปี ภายหลังการผ่าตัด

การปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด (stem cell) แก่ผู้ป่วยที่มีการบาดเจ็บหรือผิดปกติของกระดูกอ่อนประกอบด้วยขั้นตอนสำคัญ ได้แก่ การเตรียมเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวผู้ป่วยเอง และการนำเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ และเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์กระดูกอ่อน (chondrocyte) ก่อนนำเซลล์ต้นกำเนิดหรือเซลล์ต้นกำเนิดที่เพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์กระดูกอ่อนปลูกถ่ายกลับไปยังผู้ป่วย และการประเมินผลการรักษาโดยอาศัยอาการทางคลินิกและการตรวจ MRI (magnetic resonance imaging) ในการประเมินสภาวะของกระดูกอ่อนภายหลังการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด ซึ่งมีรายละเอียดคือ

1. การเตรียมเซลล์ต้นกำเนิด (Bone marrow mesenchymal stem cell, BM-MSCs)

เจาะ bone marrow บริเวณ iliac crest โดยใช้ยาชาเฉพาะที่ (local anesthesia) นำ heparinized bone marrow samples จำนวน 20 ml. ส่งไปยังห้องปฏิบัติการ

การแยก BM-MSCs ใช้วิธี density gradient centrifugation โดยผสม heparinized bone marrow กับ ficoll นำไป centrifuge ด้วย refrigerated centrifuge 1200 g 20 องศา แล้วแยกส่วนที่เป็น mononuclear cell นำมาล้างด้วย PBS นำเซลล์ที่ได้มานับจำนวนและเลี้ยงใน DMEM, 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco BRL, NY, USA), 1% Penicillin-Streptomycin (Gibco BRL) at 37 °C, 5% CO₂ in CO₂ incubator. นำมาล้าง non-adherent cells ออก จนได้ MSCs ก่อนนำมา trypsinized ด้วย 0.05% trypsin (Gibco BRL) และ เลี้ยงเพิ่มจำนวน MSCs ต่อไป .

2. การเตรียมเซลล์กระดูกอ่อน

เก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อกระดูกอ่อนข้อเข่าจากบริเวณที่ไม่มีการลงน้ำหนักของข้อเข่า (non-weight bearing area) จากการส่องกล้อง (Arthroscopy) ขนาดประมาณ 1 – 2 cm² ในสารละลาย Hanks' solution ที่อุณหภูมิ 4 °C แล้วส่งไปห้องปฏิบัติการทันที

นำเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ และย่อยสลายด้วยเอนไซม์ collagenase type II เพื่อย่อยสลาย extracellular matrix เซลล์ Chondrocyte จะหลุดออกมา นำ Chondrocyte ที่ได้กรองเอาเศษชิ้นเนื้อที่เหลือออก และนำไปเพาะเลี้ยงในสารละลาย DMEM และ 5 % human serum, 1% penicillin/streptomycin, 1mM proline, 50 U_g/mL ascorbic acid ที่อุณหภูมิ 37 °C และ 5 %CO₂ จน Chondrocyte มีจำนวนประมาณ 10 x 10⁶ เซลล์ จึงเตรียมเพื่อนำไปใส่กลับให้กับผู้ป่วยต่อไป ได้มีการตรวจสอบคุณภาพ phenotype ของ Chondrocyte โดยวิธี gel electroporesis

3. การเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนร่วมกับ MSCs

นำเซลล์ Chondrocyte มาเลี้ยงร่วมกับ MSCs ในสารละลาย DMEM และ 5 % human serum, 1% penicillin/streptomycin, 1mM proline, 50 U_g/mL ascorbic acid ที่อุณหภูมิ 37 °C และ 5 %CO₂ และนับจำนวนเซลล์ Chondrocyte และ MSCs ที่ 3, 7, 10, 14, 28 วัน หลังการเลี้ยงร่วมกัน เทียบกับกลุ่มเปรียบเทียบที่เป็น เซลล์ Chondrocyte และ MSCs เพื่อหาเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงเซลล์ Chondrocyte ร่วมกับ MSCs นำเซลล์ MSCs หรือ MSCs ที่เลี้ยงร่วมกับ Chondrocyte มาเพาะเลี้ยงใน three-dimension collagen scaffold (Koken) ก่อนนำมาปลูกถ่ายในผู้ป่วย

4. การปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด (MSCs) แก่ผู้ป่วย

ผู้ป่วยที่มีการบาดเจ็บหรือผิดปกติของกระดูกอ่อนจะได้รับการผ่าตัดเปิดข้อเข่า (arthrotomy) เพื่อเตรียมกระดูกอ่อนส่วนที่มีการบาดเจ็บหรือผิดปกติ ต่อมาเตรียม periosteal graft จากบริเวณ proximal tibia มีขนาดเท่ากับ defect ของกระดูกอ่อนนำ periosteal graft มาเย็บปิด defect ด้วย ethilon number 6-0 และปิดด้วย fibrin glue เพื่อป้องกันการซึมผ่านของ BM-MSCs นำ three-dimensional scaffold ที่มีเซลล์ต้นกำเนิดที่เพาะเลี้ยงจากห้องปฏิบัติการ นำมาใส่เข้าไปในบริเวณ defect และเย็บปิดด้วย ethilon number 6-0 และ fibrin glue เพื่อให้เซลล์ต้นกำเนิดอยู่ใน defect และสามารถเจริญเติบโต (proliferation) และพัฒนา (differentiation) ไปเป็นเซลล์กระดูกอ่อน (chondrocyte) ซึ่งเซลล์กระดูกอ่อนที่ได้จากการพัฒนามาจากเซลล์ต้นกำเนิดจะสามารถสร้าง matrix ของกระดูกอ่อนซึ่งเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้กระดูกอ่อนสามารถมีคุณสมบัติในการรับแรงของข้อเข่า

5. การปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด (BM-MSCs) และเซลล์กระดูกอ่อน (chondrocyte) แก่ผู้ป่วย ผู้ป่วยที่มีการบาดเจ็บหรือผิดปกติของกระดูกอ่อนจะได้รับการผ่าตัดเปิดข้อเข้า (arthrotomy) เพื่อเตรียมกระดูกอ่อนส่วนที่มีการบาดเจ็บหรือผิดปกติต่อมาเตรียม periosteal graft จากบริเวณ proximal tibia มีขนาดเท่ากับ defect ของกระดูกอ่อนนำ periosteal graft มาเย็บปิด defect ด้วย ethilon number 6-0 และปิดด้วย fibrin glue นำ three-dimensional scaffold ที่มีเซลล์ Chondrocyte และ MSCs นำมาใส่เข้าไปในบริเวณ defect และเย็บปิด ด้วย ethilon number 6-0 และ fibrin glue การรักษาดังกล่าวข้างต้นได้รับอนุมัติของคณะกรรมการจริยธรรมการทำวิจัยในมนุษย์ของคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การประเมินประสิทธิผล

1. การกำหนดตัววัดประสิทธิผล (efficacy parameters)

การติดตามผลการรักษาภายหลังการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด (BM-MSCs) และเซลล์กระดูกอ่อน (chondrocyte)

1 การติดตามผลการรักษาทางคลินิกโดยดูภาวะแทรกซ้อนภายหลังการผ่าตัดร่วมกับการประเมินทางคลินิก โดยใช้ Knee and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS) และ International Knee Documentation Committee (IKDC) และ MRI

2 การติดตามผลการรักษาทางพยาธิ (pathology) โดยทำ Needle biopsy จากบริเวณที่ได้รับการปลูกถ่าย (MSCs) และ chondrocyte นำมาย้อม histology และ Immunohistochemistry ของคอลลาเจน ชนิดที่ 2 (Type II collagen) เพื่อศึกษากระดูกอ่อนที่สร้างขึ้นใหม่

2. วิธีและช่วงเวลาทำการประเมิน บันทึก และวิเคราะห์ตัววัดประสิทธิผลเหล่านั้น

การเก็บข้อมูลใช้วิธีบันทึกผลทางคลินิกเมื่อผู้ป่วยมารับการตรวจรักษาเบื้องต้นภายหลังการผ่าตัด และการใช้แบบสอบถาม (Knee and Osteoarthritis Outcome Score; KOOS และ International Knee Documentation Committee; IKDC) ที่ระยะเวลา 1 – 3 ปี ภายหลังการผ่าตัดและทำ Needle biopsy ในผู้ป่วยที่จำเป็นต้องได้รับการส่องกล้อง (arthroscopy) เพื่อรักษาพยาธิสภาพอื่นๆ โดยเทียบกับชิ้นเนื้อของกระดูกอ่อนปกติ (hyaline cartilage)