โครงการวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนโดยใช้ อัลจิเนท/เจลาติน เป็นโครงเลี้ยงเซลล์

นางสาวพัชราภา โอสธีรกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมชีวเวช(สหสาขาวิชา)

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

FEASIBILITY OF ALGINATE/GELATIN SCAFFOLD IN HUMAN CHONDROCYTE REGENERATION FOR CARTILAGE TISSUE ENGINEERING

MISS PHATCHARAPA OSATEERAKUN

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the requirements

for the Degree of Master of Science Program in Biomedical Engineering

(Interdisciplinary Program) Faculty of Engineer

Chulalongkorn University

Academic Year 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์ โครงการวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนโดยใช้
อัลจิเนท/เจลาตินเป็นโครงเลี้ยงเซลล์

โดย นางสาวพัชราภา โอสธีรกุล
สาขาวิชา วิศวกรรมชีวเวช
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ศาสตราจารย์ นายแพทย์ พิบูลย์ อิทธิระวิวงศ์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ถนอม บรรณประเสริฐ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โศรดา กนกพานนท์

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.บุญสม เลิศหิรัญวงศ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ทวีชัย เตชะพงศ์วรชัย)
.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ พิบูลย์ อิทธิระวิวงศ์)
.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ถนอม บรรณประเสริฐ)
.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โศรดา กนกพานนท์)
.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ สมศักดิ์ คุปต์นิรัติศัยกุล)
.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ นายแพทย์ กฤษณ์ เจริญลาภ)

พัชราภา โอสธีรกุล : โครงการวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนโดยใช้อัลจิเนท/เจลลาติน เป็นโครงเลี้ยงเซลล์ (FEASIBILITY OF ALGINATE/GELATIN SCAFFOLD IN HUMAN CHONDROCYTE REGENERATION FOR CARTILAGE TISSUE ENGINEERING) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ศ.นพ.พิบูลย์ อิทธิระวิวงศ์ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ผศ.นพ.ถนอม บรรณประเสริฐ, ผศ.ดร.โศรดา กนกพานนท์, 65หน้า.

เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนเป็นเนื้อเยื่อของร่างกายที่เมื่อได้รับบาดเจ็บ จะมีความสามารถในการซ่อมแซมของบาดแผลต่ำ ดังนั้นเมื่อเกิดการบาดเจ็บขึ้น จึงมักส่งผลให้เกิดความเจ็บปวดบริเวณบริเวณข้อต่อและเกิดอาการแทรกซ้อนอื่นๆ ทำให้พิสัยการเคลื่อนไหวของข้อต่อลดลง ที่สำคัญจะทำให้เกิดภาวะข้อเสื่อมตามมาในที่สุด การรักษาอาการบาดเจ็บกระดูกอ่อนผิวข้อด้วยวิธีการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ (Autologous Chondrocyte Implantation) ถูกนำมาใช้การรักษาทางคลินิก พบว่าการรักษาเป็นที่น่าพอใจ แต่มีข้อจำกัดหลายประการในการนำโครงเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสม เพื่อนำมาใช้ให้ได้ผลดีในทางคลินิก รวมถึงการรักษาด้วยวิธีดังกล่าว ยังไม่เป็นที่แพร่หลายในประเทศไทย ด้วยปัญหาเรื่องราคาของโครงเลี้ยงเซลล์แบบเชิงพานิชย์ที่ยังสูงและข้อจำกัดเรื่องเทคนิคการผ่าตัดส่งผลให้การรักษาผู้ป่วยยังไม่เป็นผลดี การทดลองครั้งนี้ เพื่อศึกษาหาความเป็นไปได้ในการใช้โครงเลี้ยงเซลล์ไฮโดรเจลที่ออกแบบและผลิตจากอัลจิเนตซึ่งเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติ หาง่าย ราคาถูก และใช้ในร่างกายมนุษย์ได้อย่างปลอดภัย ร่วมกับเจลโฟมซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ชนิดเจลาตินซึ่งมีจำหน่ายในท้องตลาดอยู่แล้ว โดยการนำเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนผิวข้อจากผู้ป่วยที่เข้ารับการผ่าตัดจากแผนกออร์โธปิดิกส์ รพ.จุฬาลงกรณ์ มาสกัดเซลล์กระดูกอ่อนด้วยเอนไซม์คอลลาจีเนส เพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนในห้องทดลอง แล้วนำไปปลูกถ่ายลงใต้ผิวหนังของหนูทดลองในโครงเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ผลการทดลอง พบว่าได้เนื้อเยื่อลักษณะคล้ายกระดูกอ่อนเกิดขึ้น เมื่อนำไปย้อมสีส่องกล้องตรวจสอบทาง พยาธิวิทยา พบว่ามีลักษณะเนื้อเยื่อคล้ายกับเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน และเมื่อทำการย้อมด้วยแอนติบอดีเฉพาะเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนพบว่าเนื้อเยื่อที่ได้เป็นลักษณะของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน แสดงว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตขึ้นจากอัลจิเนต และ เจลโฟมสามารถนำไปใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนของมนุษย์ได้จริง จากการวิจัยยืนยันความเป็นไปได้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนโดยใช้โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากวัสดุชีวภาพที่หาได้ง่ายภายในประเทศปลอดภัย และมีราคาถูก ซึ่งมีศักยภาพสูงที่จะนำไปประยุกต์ใช้กับการรักษาผู้ป่วยโดยใช้เทคนิคการผ่าตัดแบบเนื้อเยื่อบาดเจ็บน้อยได้จริงในอนาคต

ลายมือชื่อนิสิต.....

ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

สาขาวิชา วิศวกรรมชีวเวช ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

ปีการศึกษา 2554 ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

##5287218521 : MAJOR BIOMEDICAL ENGINEERING

KEYWORD : cartilage engineering / autologous chondrocyte implantation/ alginate scaffold

PHATCHARAPA OSATEERAKUN: FEASIBILITY OF ALGINATE/GELATIN SCAFFOLD IN HUMAN CHONDROCYTE REGENERATION FOR CARTILAGE TISSUE ENGINEERING. ADVISOR: PROF. PIBUL ITTIRAWIWONG M.D., CO-ADVISOR : ASST.PROF. TANOM BANNAPRASERT M.D., ASST.PROF SORADA KANOKPANONT Ph.D, 65 pp.

Articular cartilage is a specific tissue which has poor capacity to heal spontaneously due to its limited number of vasculars, lymphatic and nervous system. Autologous Chondrocyte Implantation (ACI) is one of treatment strategy for articular cartilage defect proven effective for clinically use. Treatment with this technique is not wildly use in Thailand due to the limitation of instruments and expensive cost of commercial tissue engineering scaffolds. This current research has an objective to study the feasibility of using a newly designed composited scaffold composes of alginate, the biocompatible and low cost biopolymer, and gelfoam, a commercial gelatin scaffold, to provide proper environment for chondrocyte culture and cartilage tissue engineering. Fresh human cartilage tissue was obtained from the donor who underwent arthrodesis operation in the orthopedic department of King Chulalongkorn Memorial Hospital. Chondrocytes were extract in collagenase II enzyme and were cultured in alginate/gelfoam composited scaffold. The scaffold were implanted subcutaneously in nude mice for 12 weeks. The harvested tissue was evaluated for histology and immunohistochemistry. The hyaline cartilage-liked tissue was observed, type II collagen and proteoglycan were produced. The results showed potential of alginate/gelfoam scaffold for cartilage tissue engineering in human. This experiment confirmed the possibility of engineering cartilage tissue using scaffold made from biomaterials that were readily available in the country, safe and inexpensive. The new scaffold was designed in the form of injectable hydrogel that it can be applied to the treatment of patients using minimal invasive surgery technique in the future.

student'signature……

Advisor's signature……

Field of study: Biomedical engineering

Co-advisor's signature……

Academic year 2011

C0-advisor's signature……

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะไม่สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ หากไม่ได้รับการแนะนำ ความช่วยเหลือ ความร่วมมือจากทุกท่านต่อไปนี้

ขอขอบพระคุณ ศ.นพ.พิบูลย์ อิทธิระวิวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.นพ.สมศักดิ์ คุปต์นิรัติศัยกุล ผศ.นพ.ถนอม บรรณประเสริฐ ผศ.ดร. โศรดา กนกพานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม เป็นอย่างสูงที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะแนวทางออกแบบและวางแผนงานวิจัยนี้ ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งงานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณ อ.นพ.จิรันดร์ อภินันทน์ ผู้ริเริ่ม และสนับสนุนให้ผู้วิจัยได้เข้ามาทำงานวิจัย

ขอขอบคุณ รศ.นพ.ยงศักดิ์ หวังรุ่งทรัพย์ หัวหน้าภาควิชาออร์โธปิดิกส์ คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผศ.นพ.ณพชาติ ลิมปพยอม, และคณาจารย์ ภาควิชาออร์โธปิดิกส์ทุกท่าน คุณพัชรา ตุลยวศินพงศ์ และเจ้าหน้าที่ห้องผ่าตัดออร์โธปิดิกส์ ที่ให้ความอนุเคราะห์และช่วยเหลือผู้วิจัยในการเก็บเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนไปใช้ในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ขอขอบคุณ รศ.พญ.วรนุช ธนากิจ , คุณปรีชา เรืองเวชวรชัย และบุคคลากร ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ อ.นพ.สรนาท เมืองสมบูรณ์ ภาควิชาพยาธิวิทยาคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ในการวิเคราะห์ชิ้นเนื้อ

ขอขอบคุณ นพ.พงศ์พร ประทีปทองคำ นพ.ชินดนัย หงสประภาส คุณกนกวรรณ อนันตทิพยเมธี, คุณรุ่งนภา วรภักดี, คุณฐากูร ฐิติเศรษฐ์ และ นักวิจัยในห้องปฏิบัติการ I- tissue ที่ให้ความช่วยเหลือมาตลอดการทำงานวิจัย

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยกราบขอบคุณ คุณพ่อ คุณแม่และทุกคนในครอบครัวที่ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจจนกระทั่งงานวิจัยสำเร็จลงด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง.

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ.

กิตติกรรมประกาศ.....ฉ.

สารบัญ.....ช.

สารบัญตาราง.....ฎ.

สารบัญภาพ.....ฎ.

บทที่ 1 บทนำ..... 1

1.1 ที่มาของงานวิจัย 1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย..... 3

1.3 ขอบเขตงานวิจัย..... 3

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4

2.1 เนื้อเยื่อกระดูกอ่อน (Cartilage tissue) และเซลล์กระดูกอ่อน (chondrocyte) 4

2.2 กระดูกอ่อนผิวข้อ (Articular Cartilage) 6

2.3 การได้รับบาดเจ็บเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน..... 7

2.4 การรักษาผู้ป่วยที่ได้รับบาดเจ็บกระดูกอ่อนผิวข้อ..... 9

2.4.1 Mesenchymal stem cell stimulating technique..... 9

2.4.2 Soft tissue graft..... 9

2.4.3 Osteochondral transfer (Mosaicplastic , OATS) 9

2.4.4 Cell Transplantation (Autologous Chondrocyte Implantation : ACI)..... 11

2.5 Cartilage Tissue Engineering Technique..... 15

2.5.1 แหล่งที่มาของเซลล์ (Cell Source)..... 15

2.5.2 โครงเลี้ยงเซลล์ (Scaffolds)..... 16

2.5.2.1 แบบไฮโดรเจล (Hydrogel)..... 18

2.5.2.2 แบบฟองน้ำ (Sponge)..... 19

2.5.2.3 แบบตาข่าย (mesh)..... 19

2.5.3 ปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงเซลล์ (environmental factor)..... 20

2.5.3.1 โกรท แฟคเตอร์ (Growth factor)..... 20

2.5.3.2 การกระตุ้นเชิงกล (Mechanical stimulation)..... 20

2.6 โครงเลี้ยงเซลล์จาก alginate ในรูปแบบไฮโดรเจล (Alginate hydrogel scaffold)..... 21

2.7 Gelfoam (Gelatin sponge)..... 23

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย..... 25

3.1 เซลล์และสัตว์ทดลอง..... 25

3.2 เคมีภัณฑ์..... 26

3.3 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย..... 27

3.4 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงสัตว์ทดลอง..... 28

3.5 ขั้นตอนการทดลอง..... 28

3.5.1 การสกัดแยกเซลล์กระดูกอ่อนจากเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน..... 28

3.5.2 การเลี้ยงเซลล์ภายนอกร่างกาย (*in vitro* culture)..... ฌ

3.5.3 การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ (scaffold) 29

3.5.4 การเตรียม cell suspension สำหรับนำไปปลูกถ่ายลงในสัตว์ทดลอง.....30

3.5.5 การเลี้ยงเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ในสัตว์ทดลอง (in vivo culture).....30

3.5.6 การวิเคราะห์ผลการทดลอง.....31

3.5.6.1 ผลการทดลองทางกายภาพ…….....31

3.5.6.2 การวิเคราะห์ผลการทดลองโดยการตรวจสอบชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา....31

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง.....33

4.1 การสกัดเซลล์กระดูกอ่อนจากเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนและนำไป
เพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนในจานเลี้ยงเซลล์.....33

4.2 การผลิตโครงเลี้ยงเซลล์จาก alginate และ gelfoam.....35

4.3 ผลการทดลองทางกายภาพ.....38

4.3.1 การสังเกตหนูทดลองจากภายนอก.....38

4.3.2 ลักษณะทางกายภาพของชิ้นงาน.....39

4.3.3 ชั่งน้ำหนักของชิ้นงานที่ได้หลังจากทำการทดลอง 40

4.4 การตรวจสอบชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา 41

4.4.1 การย้อม Hematoxcilin and Eosin (H&E) 41

4.4.2 การย้อมด้วย แอนติบอดี S-100 โปรตีน 45

4.4.3 การย้อมด้วยแอนติบอดี ของคอลลาเจนชนิดที่ 2.....46

4.4.4 การย้อมด้วย Safarin-O.....47

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ.....54

5.1 สรุปผลการทดลอง.....54

5.2 ข้อเสนอแนะ.....54

5.3 งานวิจัยต่อไปในอนาคต.....54

หน้า

รายการอ้างอิง.....55

ภาคผนวก..... 58

ภาคผนวก ก. รายชื่อ, หมายเลขผลิตและแหล่งผลิตของสารเคมีที่ใช้.....58

ภาคผนวก ข. การเตรียมสารเคมี..... 60

ภาคผนวก ค. วิธีการเลี้ยงสัตว์ทดลอง..... 62

ภาคผนวก ง. การย้อมสีชิ้นเนื้อและเทคนิคการย้อม.....63

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 65

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงวิวัฒนาการของการรักษาการบาดเจ็บกระดูกอ่อนผิวข้อด้วย
งานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน..... 13

ตารางที่ 2 แสดงวิธีการรักษา ภาวะการณ์บาดเจ็บกระดูกอ่อนผิวข้อในขนาดต่างๆ.....14

ตารางที่ 3 วัสดุชีวภาพที่สามารถนำมาใช้ผลิตเป็นโครงเลี้ยงเซลล์สำหรับ
งานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน..... 18

ตารางที่ 4 แสดงน้ำหนักของชิ้นงาน และ เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักที่ลดลงระหว่างการทดลอง.....41

ตารางที่ 5 การเปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างงานวิจัยนี้ และงานวิจัยของ Dobratz EJ.....50

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนชนิดต่างๆ..... 5

ภาพที่ 2 ชั้นของกระดูกอ่อนผิวข้อ..... 7

ภาพที่ 3 รอยโรคในเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน..... 8

ภาพที่ 4 แสดงการรักษาด้วยวิธี OATS..... 10

ภาพที่ 5 Autologous Chondrocyte Implantation : ACI..... 11

ภาพที่ 6 ผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาด้วยวิธี Autologous Chondrocyte Implantation
จากการศึกษาของ Brittberg..... 12

ภาพที่ 7 องค์ประกอบหลักของวิศวกรรมเนื้อเยื่อ กระดูกอ่อน..... 17

ภาพที่ 8 โครงเลี้ยงเซลล์ ชนิดต่างๆ 19

ภาพที่ 9 ตัวอย่างเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
กระดูกอ่อนภายในห้องปฏิบัติการ..... 20

ภาพที่ 10 โครงสร้าง โมเลกุล และการเกิดเจล ของ alginate..... 21

ภาพที่ 11 การเกิดเจลลักษณะเป็นเม็ดกลม..... 22

ภาพที่ 12 Gelfoam..... 23

ภาพที่ 13 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนด้วยโครงเลี้ยงเซลล์ gelfoam ภายในห้องปฏิบัติการ.....24

ภาพที่ 14 กระดูกอ่อนที่เก็บมาจากห้องผ่าตัด..... 25

หน้า

ภาพที่ 15 หนูทดลองชนิด Nude mouse (BALB/C-nu) อายุ 4-5 สัปดาห์.....26

ภาพที่ 16 เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่ถูกตัดเป็นชิ้น ขนาด 2 มม^3 ใน แช่ในเอนไซม์ คอลลาจีเนส.....34

ภาพที่ 17 เซลล์กระดูกอ่อนในจานเลี้ยงเซลล์ที่เวลา 1 สัปดาห์..... 34

ภาพที่ 18 การเกิดเจลของ สารละลาย alginate ที่ผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์.....35

ภาพที่ 19 เมื่อผสม alginate และ gelfoam เข้าด้วยกัน..... 36

ภาพที่ 20 โครงเลี้ยงเซลล์จาก alginate และ gelfoam..... 36

ภาพที่ 21 ลำดับขั้นตอนการวิจัย 37

ภาพที่ 22 ภาพการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อลงในหนูทดลองที่ช่วงเวลาต่างๆ.....38

ภาพที่ 23 เส้นเลือดขนาดเล็ก กระจายทั่วไปบนชิ้นงาน สังเกตได้จากผิวหนังของหนูทดลอง 39

ภาพที่ 24 ลักษณะเนื้อเยื่อที่เกิดขึ้นเมื่อครบ 12 สัปดาห์..... 40

ภาพที่ 25 เซลล์กระดูกอ่อนที่เจริญเต็มที่อยู่ใน lacuna 42

ภาพที่ 26 เส้นเลือดที่กระจายอยู่ทั่วไปในชิ้นงาน..... 42

ภาพที่ 27 เซลล์กระดูกอ่อน กระจายตัวอยู่อย่างสม่ำเสมอ ในชั้นใต้ผิวหนังของหนูทดลอง.....43

ภาพที่ 28 ชิ้นงานที่กำลังขยาย 40 เท่า มีลักษณะคล้ายกับเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนตามธรรมชาติ.....44

ภาพที่ 29 การย้อมแอนติบอดีต่อ S 100 protein ให้ผลบวก..... 45

ภาพที่ 30 การย้อมแอนติบอดีต่อคอลลาเจนชนิดที่ 2 ให้ผลบวก..... 46

ภาพที่ 31 การย้อม safranin O ให้ผลบวก..... 47

หน้า

ภาพที่ 32 เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่เกิดขึ้นหลังการเพาะเลี้ยงในชั้นใต้ผิวหนัง
ของหนูทดลองจากงานวิจัยของ Dobratz EJ..... 49
ภาพที่ 33 การรักษาภาวะบาดเจ็บข้อเข่าด้วยวิธี ACI โดยใช้ alginate ไฮโดรเจล
จากการศึกษาของ Almqvist K. และคณะ..... 51
ภาพที่ 34 ผลการตรวจเนื้อเยื่อที่สร้างใหม่จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษา
ภาวะบาดเจ็บข้อเข่าด้วยวิธี ACI จากการศึกษาของ Almqvist K. และคณะ..... 52

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาของงานวิจัย

ภาวะข้อเสื่อม โดยเฉพาะข้อต่อในตำแหน่งที่ต้องรับน้ำหนักหรือการใช้งานอยู่ตลอดเวลา เช่น ข้อเข่า,ข้อเท้า เป็นภาวะที่ก่อให้เกิดปัญหาทางสาธารณสุขเป็นอย่างมาก ต้องใช้ทรัพยากรและเงินจำนวนมหาศาลในการดูแลรักษาและป้องกันโดยผู้ป่วยโรคข้อเสื่อม จะเกิดภาวะทุพพลภาพ ไม่สามารถใช้ชีวิตประจำวันได้เนื่องจากความเจ็บปวดที่เกิดขึ้น ซึ่งการรักษาสุดท้ายคือการผ่าตัดเปลี่ยนข้อ

การได้รับการบาดเจ็บบริเวณกระดูกอ่อนผิวข้อ เป็นสาเหตุสำคัญประการหนึ่งที่ส่งผลให้เกิดภาวะข้อเสื่อม เนื่องจากเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน เป็นเนื้อเยื่อที่ไม่มีระบบเลือด น้ำเหลืองและเส้นประสาทมาหล่อเลี้ยง จึงไม่สามารถซ่อมแซมตัวเองได้ เหมือนเนื้อเยื่อชนิดอื่นของร่างกาย

ในปัจจุบันมีการศึกษาค้นคว้า และพัฒนาวิธีการต่างๆ เพื่อนำมาใช้ในการรักษาภาวะบาดเจ็บของกระดูกอ่อนผิวข้อ วิธีการรักษาที่ได้ผลการรักษาดี และเริ่มนำมาใช้แพร่หลายมากขึ้น ในทางคลินิคคือ การปลูกถ่ายเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน (Autogenous chondrocyte implantation :ACI) โดยใช้หลักการวิศวกรรมเนื้อเยื่อทำโดยการ นำเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนจากผู้ป่วย ออกมาสกัดเซลล์กระดูกอ่อน (chondrocyte) แล้วนำไปเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนเซลล์ ในห้องปฏิบัติการ แล้วนำกลับไปปลูกถ่ายลงในกระดูกอ่อนผิวข้อในตำแหน่งที่ได้รับบาดเจ็บ

องค์ประกอบที่สำคัญของการวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน คือ การเพาะเลี้ยงเซลล์ บนโครงเลี้ยงเซลล์ ที่เป็นโครงสร้างสามมิติ เพื่อดำรงสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมสำหรับการมีชีวิต การแบ่งตัวและเมตาบอลิซึมของเซลล์ ทำให้ได้เนื้อเยื่อที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับกระดูกอ่อนในธรรมชาติ มีการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนจากโครงเลี้ยงเซลล์ ซึ่งออกแบบและผลิตจากพลลิเมอร์ชนิดต่าง ๆ ทั้งในห้องทดลอง และในมนุษย์พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ แต่ละชนิดที่ถูกผลิตขึ้น ยังมีข้อดีและข้อด้อยแตกต่างกัน และเมื่อนำมาใช้ในการรักษาผู้ป่วย จึงคาดการณ์ผลการรักษาได้ไม่แน่นอน และค้าใช้จ่างในการรักษาผู้ป่วยด้วยวิธีนี้ยังสูง เมื่อเทียบกับการรักษาด้วยวิธีอื่น

การศึกษาเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนในประเทศไทยยังเป็นที่สนใจ มีการวิจัยเฉพาะในบางสถาบัน ส่งผลให้การรักษาผู้ป่วยด้วยวิธีการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน ยังไม่เป็นที่แพร่หลาย

รวมถึงข้อจำกัดในการศึกษาค้นคว้า เช่น การเลือกใช้โครงเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสม ราคาของโครงเลี้ยงเซลล์ ข้อจำกัดในเรื่องความพร้อมของห้องทดลอง เป็นต้น

ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยมุ่งเน้นการออกแบบและผลิตโครงเลี้ยงเซลล์สำหรับ เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน ด้วยพอลิเมอร์จากธรรมชาติ ได้แก่ alginate และ gelatin sponge (gelfoam) เนื่องจากเป็นวัสดุที่หาง่าย มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatible) กับร่างกายมนุษย์ ไม่ทำให้เกิดปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อ มีราคาถูกและสามารถนำมาออกแบบเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ชนิด ไฮโดรเจล (Hydrogel) ซึ่งเป็นโครงเลี้ยงเซลล์แบบใหม่ ยังไม่มีการศึกษาในประเทศไทย สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษาผู้ป่วยด้วยวิธีผ่าตัด โดยเนื้อเยื่อบาดเจ็บน้อย (Minimal invasive surgery) ซึ่งเป็นเทคนิคการผ่าตัดรักษาโดยต่าง ๆ ที่มีความสำคัญมากต่อวงการแพทย์ในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนของมนุษย์โดยใช้โครงเลี้ยงเซลล์จาก alginate และ gelfoam ร่วมกัน

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1. ออกแบบและผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ชนิด hydrogel จาก alginate และ gelfoam สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อน เพื่องานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนผิวข้อ

2. ทดสอบการเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนของมนุษย์ภายในร่างกายสัตว์ทดลองด้วยโครงเลี้ยงเซลล์ที่สร้างขึ้น เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์

3. วิเคราะห์ผลการทดลองด้วยการตรวจสอบเนื้อเยื่อทางพยาธิวิทยา

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เนื้อเยื่อกระดูกอ่อน (Cartilage tissue) และเซลล์กระดูกอ่อน (Chondrocyte)

เนื้อเยื่อกระดูกอ่อน (Cartilage) เป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดหนึ่งทำหน้าที่เป็นโครงสร้าง มีคุณสมบัติพิเศษในเรื่องของความยืดหยุ่น สามารถรับน้ำหนัก (mechanical load) ดูดซับและกระจายแรงที่เกิดขึ้นในอวัยวะต่างๆ เช่น ข้อต่อ หมอนรองกระดูกสันหลัง

เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนประกอบไปด้วยองค์ประกอบหลัก 2 ชนิดคือ

1. เซลล์กระดูกอ่อน (Chondrocyte) พบประมาณ 2 % กระจายอยู่ทั่วไปในเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน ถูกล้อมรอบด้วยสารประกอบภายนอกเซลล์ (Extracellular Matrix) [1] มีหน้าที่หลักในการสร้างสารประกอบภายนอกเซลล์ เซลล์กระดูกอ่อนจะตอบสนองต่อ การรับน้ำหนัก, แรงดัน hydrostatic, แรงดัน osmotic ที่เปลี่ยนไป มีความสามารถในการแบ่งตัวได้น้อยมาก ส่งผลให้มีการซ่อมแซมกระดูกอ่อนได้น้อยเมื่อเกิดการบาดเจ็บขึ้น

2. สารประกอบภายนอกเซลล์ เป็นองค์ประกอบหลักของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน 65-80% คือน้ำ ส่วนที่เหลือได้แก่ คอลลาเจน (Collagen) และ Proteoglycan ชนิดต่างๆ คอลลาเจน ชนิดที่ 2 (collagen type II) เป็นชนิดที่พบมากที่สุดกระดูกอ่อนแบ่งออกเป็น 3 ประเภท (ภาพที่ 1) ตามชนิดและปริมาณของสารประกอบภายนอกเซลล์ ได้แก่

1) Hyaline Cartilage พบอยู่บริเวณผิวข้อ และ แผ่นศูนย์การเจริญเติบโตของกระดูก (growth plate) ลักษณะเซลล์กระดูกอ่อนที่เจริญเติบโตเต็มที่ (mature) อยู่ในช่องว่าง (lacuna) ล้อมรอบด้วยสารประกอบภายนอกเซลล์ ซึ่งได้แก่ คอลลาเจนชนิดที่ 2 และ proteoglycan ไม่มีเส้นเลือด หรือเส้นประสาท เซลล์กระดูกอ่อนมีรูปร่างค่อนข้างแบนในเนื่อเยื่อชั้นผิว และรูปร่างกลมมากขึ้นในเยื่อเยื่อชั้นลึก
2) Elastic Cartilage เป็นกระดูกอ่อนชนิดที่มีเส้นใย elastic เป็นหลัก มีความยืดหยุ่นสูง เช่น ในใบหู กล่องเสียง
3) Fibro Cartilage มี collagen ชนิดที่ 1 (collagen type I) มากกว่า เช่นใน annulus fibrosus ของหมอนรองกระดูกสันหลัง (intervertebral disc), pubic symphysis ของกระดูกเชิงกราน

ภาพที่ 1 เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนชนิดต่างๆ a. Hyaline cartilage b. Elastic cartilage c. Fibro cartilage

ที่มา: http://www.jeremyswan.com/anatomy/203/html/03r.html

2.2 กระดูกอ่อนผิวข้อ (Articular Cartilage)

เป็นกระดูกอ่อนชนิด Hyaline Cartilage ทำหน้าที่ลดแรงเสียดทาน ดูดซับแรงกระแทกและกระจายแรงต่างๆที่เกิดขึ้นภายในข้อ ไม่มีระบบเลือด น้ำเหลือง และเส้นประสาทมาหล่อเลี้ยง[2] โดยที่เซลล์กระดูกอ่อนจะพบอยู่โดดเดี่ยวหรืออยู่เป็นกลุ่ม เซลล์จะอยู่ในช่องว่างเรียกว่า Lacuna ซึ่งจะฝังตัวอยู่ในเนื้อของกระดูกอ่อน ในส่วนของ สารประกอบภายนอกเซลล์ ซึ่งประกอบไปด้วย เส้นใยคอลลาเจน ส่วนมากเป็นคอลลาเจนชนิดที่ 2 (Collagen type II) ประสานเป็นร่างแห และ โปรตีโอไกลแคน (proteoglycan) ได้แก่ กรดไฮยาลูโรนิค (Hyaluronic acid) คอนดรอยติน ซัลเฟต (chondroitin sulfate) และ เคราแตน ซัลเฟต (keratan sulfate) เป็นส่วนทำให้ สารประกอบภายนอกเซลล์ มีลักษณะแข็ง เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนผิวข้อ ถูกแบ่งออกเป็น 4 ชั้นตามลักษณะโครงสร้าง และองค์ประกอบที่แตกต่างกัน (ภาพที่ 2)

2.2.1 Superficial zone เป็นชั้นที่อยู่นอกสุดของผิวข้อ ลักษณะ collagen จะเรียงตัวขนานกับเซลล์กระดูกอ่อนบริเวณผิวนอก (surface chondrocyte) ซึ่งมีรูปร่างค่อนข้างยาว การเรียงตัวของเส้นใยคอลลาเจนเช่นนี้ช่วยในการต้านทานแรงอัด (compressive force) ที่เกิดขึ้นในขณะที่มีการใช้งานของข้อ ชั้นนี้มี proteoglycan น้อย และมีน้ำอยู่ในสัดส่วนมากกว่าชั้นอื่น

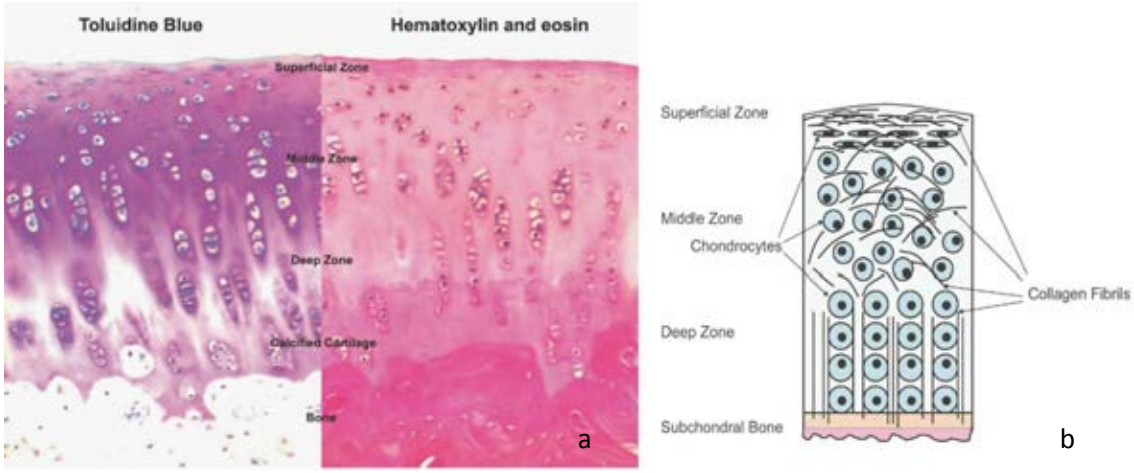
2.2.2 Transitional zone เป็น ชั้นที่อยู่ถัดมาจาก superficial zone มีลักษณะเส้นใย คอลลาเจนขนาดใหญ่เรียงตัวไม่เป็นระเบียบเซลล์กระดูกอ่อนจะมีรูปร่างกลม เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนจะพบเซลล์ที่มีลักษณะ active

2.2.3 Deep zone เป็นชั้นที่อยู่ถัดมาจาก transitional zone เข้ามาใกล้ส่วนที่เป็นกระดูกมากขึ้น ลักษณะเส้นใยคอลลาเจน มีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาดใหญ่มากขึ้น เรียงตัวเป็นมุมฉากกับ เซลล์กระดูกอ่อน การเรียงตัวของเส้นใยคลอลาเจนจะช่วยต้านทานแรงเฉือน (shear force) ที่เกิดขึ้นขณะที่ข้อมีการเคลื่อนไหว เซลล์กระดูกอ่อนมีรูปร่างรีและเรียงตัวเป็นแถว (column) ชั้นนี้จะมีปริมาณ proteoglycan มากที่สุดและมีปริมาณน้ำน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับชั้นอื่น

2.2.4 Calcified zone เป็นชั้นที่อยู่ลึกที่สุดแยกออกจาก deep zone ด้วย tidemark เซลล์ในส่วนนี้จะมีขนาดเล็ก และกระจายตัวอยู่ใน สารประกอบภายนอกเซลล์ ซึ่งมีแคลเซียมสะสมอยู่มากกว่าชั้นอื่น ทำให้ สารอาหาร (nutrient) จากกระดูกใต้ผิวข้อ (subchondral bone) ไม่สามารถ ผ่านเข้ามาหล่อเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนได้ เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนจะได้รับสารอาหาร จากน้ำในข้อ (synovial fluid) เพียงทางเดียว

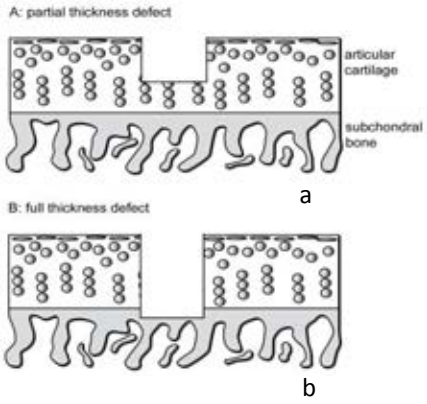
2.3 การได้รับบาดเจ็บเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน

แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มตามความลึกของชั้นเนื้อเยื่อที่ได้รับบาดเจ็บ คือ partial thickness defect และ full thickness defect (ภาพที่ 3) โดย full thickness defect หมายถึงการได้รับบาดเจ็บของเนื้อเยื่อลึกถึงกระดูกใต้ผิวข้อ โดยลักษณะการซ่อมแซมตัวเองของทั้ง 2 กลุ่มจะแตกต่างกัน ในกรณี partial thickness defect ขนาดเล็ก เซลล์กระดูกอ่อนที่อยู่รอบจะแบ่งตัว และสร้างสารประกอบภายนอกเซลล์ [3]



ภาพที่ 2 ชั้นของกระดูกอ่อนผิวข้อ a. กระดูกอ่อนผิวข้อเมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ b. แผนผังแสดงเซลล์กระดูกอ่อนในแต่ละชั้น

ที่มา: http://www.grin.com/en/doc/240401/regulation-of-superficial-zone-protein-in-articular-cartilage-by-tgf-beta



ภาพที่ 3 รอยโรคในเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน

a. partial thickness b. full thickness

ที่มา: European Cells and Materials, 2005. 9: p. 23-32.

ในกรณีที่รอยโรคมีขนาดใหญ่ กลไกดังกล่าวอาจไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอ เนื่องจาก เซลล์กระดูกอ่อนมีความสามารถในการแบ่งตัวจำกัด อาจส่งผลให้รอยโรคยังคงอยู่ ส่วนในกรณีของ full thickness defect ภายหลังจากได้รับบาดเจ็บลึกไปถึง กระดูกใต้ผิวข้อจะทำให้เกิดเลือดออก และมีการแข็งตัวของเลือด (blood clot) มี เซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (bone marrow derived mesenchymal stem cell) เข้ามาและแบ่งตัว

อย่างไรก็ดีวิธีนี้จะมีประสิทธิภาพดีในรอยโรคที่มีขนาดเล็ก (1 – 2 ม .ม.) ในรอยโรคขนาดใหญ่ พบว่าเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนจะมาสมานกันด้วย fibrous tissue หรือ Fibrocartilage ซึ่งจะส่งผลให้สูญเสียคุณสมบัติเชิงกลของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน กระดูกอ่อนผิวข้อถูกทำลายได้ง่ายและ นำไปสู่ภาวะข้อเสื่อมในที่สุด

นอกจากนี้ในการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า เนื้อเยื่อที่ถูกสร้างขึ้นมาเพื่อซ่อมแซม defect เมื่อเวลาหนึ่งก็เสื่อมสภาพลง และเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนปกติที่อยู่รอบข้าง เกิดการเสื่อมสภาพมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง บางครั้งพบว่ามีการตายเฉพาะส่วน (necrosis) ของ กระดูกอ่อนผิวข้อที่อยู่โดยรอบแยกชัดเจนระหว่างเนื้อเยื่อที่สร้างใหม่กับเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนเดิม และไม่พบการโยกย้ายเปลี่ยนตำแหน่ง (migrate) ของ เซลล์ต้นกำเนิดเข้าไปยังเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนเพื่อทำหน้าที่ซ่อมแซมกระดูกอ่อนส่วนที่ถูกทำลาย รวมถึงไม่พบการเคลื่อนที่ของเซลล์กระดูกอ่อน เข้ามายังเนื้อเยื่อที่สร้างใหม่เลย [2, 4]

2.4 การรักษาผู้ป่วยที่ได้รับบาดเจ็บกระดูกอ่อนผิวข้อ

ในปัจจุบัน ประกอบไปด้วย วิธีหลักดังนี้[3]

2.4.1 Mesenchymal stem cell stimulating technique

เหมาะสมกับ defect ขนาดเล็ก ไม่เกิน 2 ซม.การรักษาด้วยวิธีนี้ ใช้หลักการกระตุ้นให้เกิด การบาดเจ็บในตำแหน่งกระดูกใต้ผิวข้อ กระตุ้นให้เกิดเลือดออกและก้อนเลือดแข็งตัว (blood clot) กลไกนี้ จะมี เซลล์ต้นกำเนิดมากระจุกตัวกันหนาแน่นที่ defect และทำให้เกิดการสมานตัวของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนต่อไป โดยกระดูกอ่อนที่เกิดขึ้นใหม่จะเป็นชนิด Fibrocartilage

2.4.1.1 Abrasion arthroplasty ทำได้โดยการใช้ อุปกรณ์พิเศษ กรอบริเวณกระดูกใต้ผิวข้อ เพื่อทำให้เกิดการ แข็งตัวของ เลือด มักทำร่วมกับการ ตัดเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนส่วนที่ได้รับบาดเจ็บทิ้ง (debridement)

2.4.1.2 Pridie drilling ใช้สว่านขนาดเล็กเจาะรูไปบน กระดูกใต้ผิวข้อ เพื่อให้มีเลือดออกและแข็งตัวอยู่ใน defect

2.4.1.3 Microfracture technique ใช้โลหะปลายแหลม (awl) ขนาดเล็ก เจาะเข้าในกระดูกใต้ผิวข้อ เพื่อให้มีเลือดออกและแข็งตัวอยู่ใน defect

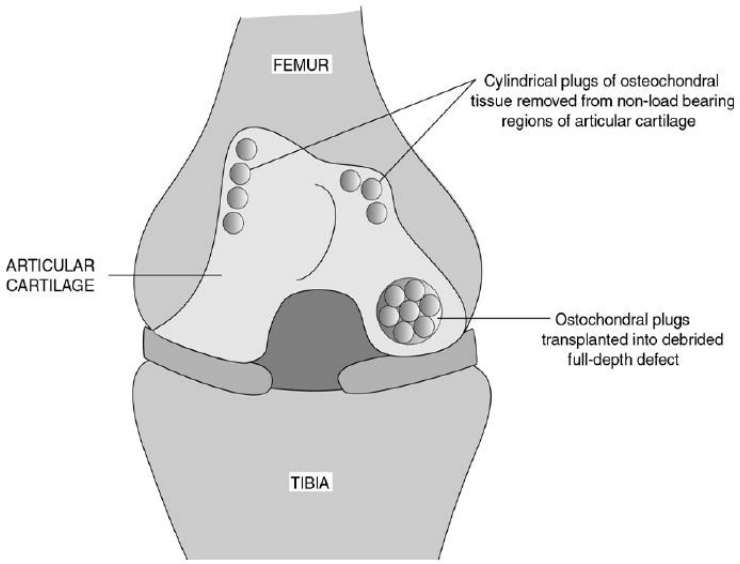
2.4.2 Soft tissue graft

การรักษาวิธีนี้ใช้ เยื่อหุ้มกระดูก (periosteum) หรือ เยื่อหุ้มกระดูกอ่อน (perichondrium) เข้ามาบรรจุใน defect ขนาดประมาณ 4 มม. แล้วยึดติดกับ กระดูกใต้ผิวข้อ ด้วย Fibrin glue โดยทฤษฎีแล้วพบว่ามีเซลล์ต้นกำเนิดอยู่ในเยื่อหุ้มกระดูกและเยื่อหุ้มกระดูกอ่อน ดังนั้นเมื่อนำเข้ามาใส่ใน defect สามารถทำให้เกิดการสมานตัวกันของกระดูกอ่อนได้ อย่างไรก็ดีวิธีนี้ผลการรักษาได้เป็นเนื้อเยื่อ fibrous tissue ไม่ใช่ Hyaline Cartilage

2.4.3 Osteochondral graft transfer (Mosaicplastic , OATS, osteochondral allograft transfer)

หลักการรักษาวิธีนี้คือการนำเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนและกระดูกใต้ผิวข้อ ตัดออกมาเป็นชิ้นเดียวกันเรียกว่า Osteochondral graft แล้วนำไปปลูกถ่ายลงใน defect จะใช้ในกรณีที่ defect มีขนาดเล็กหรือขนาดกลาง โดยชิ้นกระดูกที่นำมาใช้ปลูกถ่ายอาจเป็นของผู้ป่วยเอง (autogenous

graft) หรือจากกระดูกของผู้บริจาค (allogenous graft) (ภาพที่ 4) ข้อเสียของการรักษาด้วยวิธีนี้คือ ตำแหน่งของกระดูกอ่อน บริเวณรอยต่อระหว่างชิ้นกระดูกที่ปลูกถ่ายกับกระดูกอ่อนจริง จะเกิดการสมานตัวกันด้วย blood clot



ภาพที่ 4 แสดงการรักษาด้วยวิธี osteochondral transfer: OATS10

ที่มา: European Cells and Materials, 2005. 9: p. 23-32.

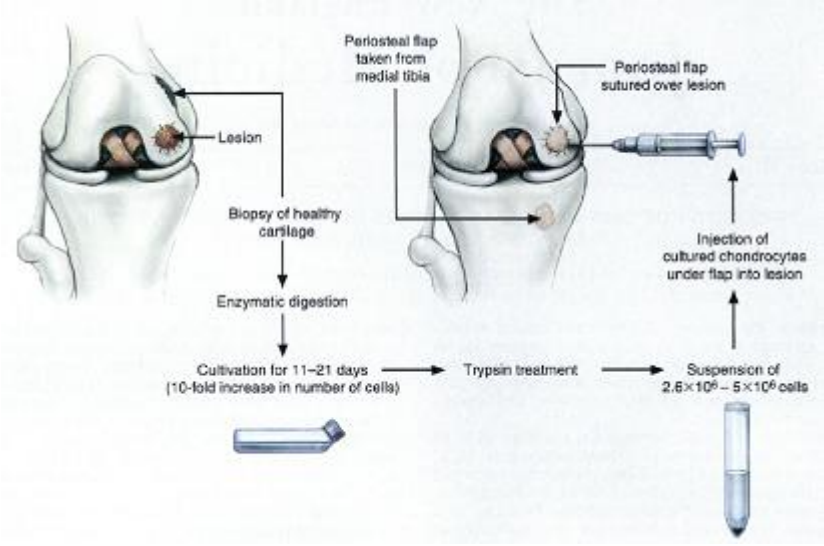
มีรายงานจากการวิจัยหลายรายงานพบว่า เกิดลักษณะของ Fibrocartilage ขึ้นบริเวณช่วงรอยต่อ และ fibrocartilage เจริญเติบโตมากเกิน (hypertrophy) หรือเป็น Fibrocartilage ที่หยุดการเจริญเติบโต (lack of regrowth) ส่งผลให้เกิดอาการข้อยึดติด (stiff) หรือพิสัยการเคลื่อนไหวของข้อถูกจำกัด (limit range of motion) ตามมา นอกจากนี้ตำแหน่งที่ชิ้น osteochondral graft ถูกตัดออกมา ซึ่งเชื่อว่าเป็นตำแหน่งของข้อที่ไม่ต้องลงน้ำหนักนั้น ก็ได้มีการศึกษาพบว่า ไม่มีตำแหน่งใดของข้อต่อที่ไม่ได้ลงน้ำหนักอย่างแท้จริง ดังนั้นเมื่อถูกตัดเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนออกมาก็อาจเป็นการทำลายผิวข้อในตำแหน่งใหม่ เพิ่มขึ้นมาอีก

2.4.4 Cell Transplantation (Autologous Chondrocyte Implantation : ACI)

เป็นการรักษาด้วยวิธีการวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue Engineering) ซึ่งมีความก้าวหน้ามากขึ้นในการแพทย์ยุคปัจจุบัน

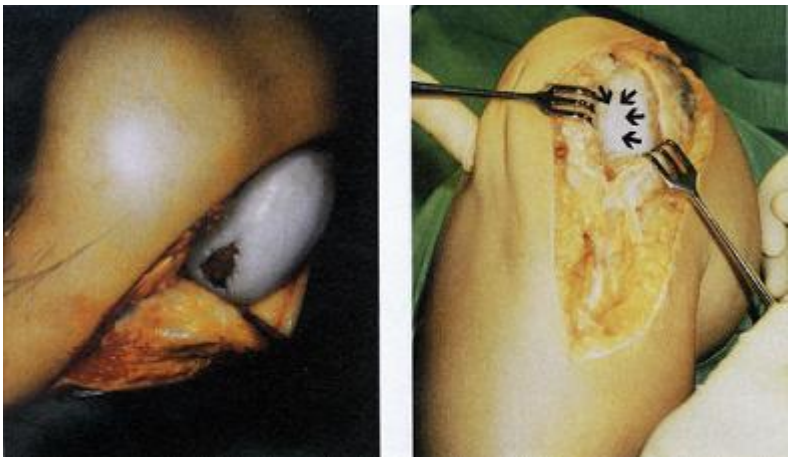
Brittberg[5] ได้รายงานวิธีการรักษาผู้ป่วยที่มีการบาดเจ็บของกระดูกอ่อนผิวข้อ ด้วยวิธี ACI เมื่อปี1994 โดยมีวิธีการ คือ ส่องกล้องเข้าไปในข้อเข่าเพื่อเก็บเอาเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนในตำแหน่งที่ไม่ได้รับน้ำหนัก นำออกมาสกัดเอา เซลล์กระดูกอ่อน เพิ่มจำนวนในห้องทด ลอง แล้วจึงผ่าตัดเปิดข้อเข่า นำเซลล์กระดูกอ่อนที่เพาะเลี้ยงได้ ใส่กลับเข้าไปบริเวณ defect และใช้เยื่อหุ้มกระดูก มาเย็บปิดหุ้ม defect (ภาพที่ 5 และ 6) จากการศึกษาในผู้ป่วย 23 คน ระยะเวลาติดตามเฉลี่ย 39 เดือนพบว่าได้ผลการรักษาดี 80% ของผู้ป่วยจากการรักษาด้วยวิธีดังกล่าวพบว่า defect ถูกแทนที่ด้วย Hyaline cartilage

ข้อจำกัดจากงานวิจัยนี้คือ การจัดการเซลล์กระดูกอ่อน ซึ่งแขวนลอยอยู่ในสารละลายของอาหารเลี้ยงเซลล์ (culture media) ทำได้ยากเซลล์สามารถรั่วไหลออกจาก defect ได้ จึงต้องใช้เยื่อหุ้มกระดูก มีลักษณะเนื้อเยื่อเป็นแผ่นบางมาทำการเย็บปิดบริเวณ defect เพื่อป้องกันการรั่วไหลของเซลล์ วิธีการดังกล่าวใช้การผ่าตัดที่มีแผลผ่าตัดขนาดใหญ่ ส่งผลให้ผู้ป่วยมีการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อรอบข้อและมีภาวะแทรกซ้อน คือ ข้อติดแข็งตามมา (Stiff) ร่วมกับพบภาวะการเจริญเติบโตผิดปกติ (hypertrophy) ของเยื่อหุ้มกระดูก



ภาพที่ 5 Autologous Chondrocyte Implantation : ACI

ที่มา: N Engl J Med, 1994. 331(14): p. 889-95



ภาพที่ 6 ผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาด้วยวิธี Autologous Chondrocyte Implantation จากการศึกษาของ Brittberg

ที่มา: N Engl J Med, 1994. 331(14): p. 889-95

ตารางที่ 1 แสดงวิวัฒนาการของการรักษาการบาดเจ็บกระดูกอ่อนผิวข้อด้วยงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน

Generation	Description	Strength	Weakness	Examples
First	-A piece of periosteal flap sutured to te cartilage defect -culture-expanded chondrocyte in the culture media was injected inside the periosteal flap	-introducing the concept of cell- base therapy to replace the conventional treatment technique	-need to harvest the periosteal flap, complex suture technique -chondrocyte leakage from the sealing periosteal flap -chondrocyte dedifferentiation during culture process -need arthrotomy (large joint open) and subsequence joint stiffness	-ACI
Second	-Chondrocyte seeded in the absorbable porous scaffold that support the chondrocyte during culture period	-Introducing bodegradable scaffold to ensure cellular habitation at defect site and support cellular presentation -Some model can be applied through minimally invasive surgery to decrease post operative joint stiffness	-The safety of scaffold has to be test -Lack of long term outcome	-Collagen membrane -Hyalograft C™ -Fibrin glue -Atelocollagen gel
Third	-Cell of more promising source and chondrogenesis -Scaffold of chondro-inductive and /or chondro-conductive material -Improvement of culture condition eg. mechanical stimulation -Simpler surgical technique to reduce repeats of operation to the joint	-Introducing various improvement of culture conditions that better preserve the chondrogenic ability of chondrocytes -All three elements of the "tissue engineering triad" are considered for the cartilage regeration	-Limited in clinical information -Information derives largely from the companies that provide the materials, lack independent studies	-DeNovo ET™ -NeoCart™
Fourth	-Chondrocytes are treated with gene therapy to improve chondrogenesis -Stem cells from various origins -Growth factor used -More improvements on biomaterial	-More potential cells can give more promising regeneration of cartilage tissue -Information is derived from evidence-based control studies	-Unclear about the safety of gene therapy and growth factor used to chondrogenesis -In vitro study, no human information avialable to date -Ethical concern	-Hyaff-11

ที่มา:ดัดแปลงจาก J Formos Med Assoc, 2009. 108(2): p. 87-101

ข้อดีของการรักษาด้วยการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน เมื่อเปรียบเทียบกับการรักษาด้วยวิธีอื่น คือ 14 ได้กระดูกอ่อนที่สร้างใหม่เป็นชนิด Hyaline cartilage ลดภาวะแทรกซ้อนจากการทำ osteochondral graft ซึ่งต้องนำเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนจากผิวข้อบริเวณอื่นมาใส่บริเวณ defect และยังสามารถใช้รักษาผู้ป่วยที่มี defect ในผิวข้อที่มีหลายตำแหน่ง หรือ defect ที่มีขนาดใหญ่ได้ จากข้อดีและข้อด้อยของการรักษาด้วยวิธีการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน ทำให้มีการพัฒนาการรักษา มาตามลำดับ ดังตารางที่ 1 [6] [7]

โดยในทางปฏิบัติ แพทย์จะเลือกวิธีการรักษาภาวะบาดเจ็บของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนโดยขึ้นอยู่กับขนาดของรอยโรค ความถนัดของแพทย์ และลักษณะของเครื่องมือที่มีอยู่ในสถาบัน ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงวิธีการรักษา ภาวะการบาดเจ็บกระดูกอ่อนผิวข้อในขนาดต่างๆ

Lesion Size	Operative Treatment
≤ 1 cm	Observation, Abrasion chondroplasty, Microfracture, Osteochondral autograft transfer
1-2 cm	Abrasion chondroplasty, Microfracture, Osteochondral autograft transfer
2-3.5 cm	Fresh osteochondral allograft Autologous chondrocyte implantation
3.5-10 cm	Autologous chondrocyte implantation
Multiple (2-3 lesions)	Autologous chondrocyte implantation

ที่มา:ดัดแปลงจาก Canale & Beaty: Campbell's Operative Orthopaedics, 11th ed

2.5 Cartilage Tissue Engineering Technique

ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ มีวัตถุประสงค์หลักคือ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขึ้นใหม่เพื่อนำไปใช้ทดแทนของเดิม ที่เกิดพยาธิสภาพ ทำให้เกิดการสูญเสียทำลายไปของเนื้อเยื่อในส่วนอวัยวะต่างๆของร่างกาย โดยมีหลักการดังต่อไปนี้

1. สกัดเซลล์จากเนื้อเยื่อด้วยวิธีต่างๆ เช่น การใช้เอนไซม์ในการย่อย

2. ออกแบบและผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ (scaffold) ให้เหมาะสมกับชนิดของเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยง

3. เพิ่มจำนวนเซลล์ เพาะเลี้ยงเซลล์ที่สกัดในโครงเลี้ยงเซลล์

4. นำไปปลูกถ่ายลงในตำแหน่งรอยโรคที่อวัยวะต่างๆ

ด้วยหลักการที่กล่าวมา จะเห็นได้ว่า มีองค์ประกอบสำคัญอยู่ 3 ประการ ในงานวิศวกรรม เนื้อเยื่อกระดูกอ่อน ได้แก่ แหล่งที่มาของเซลล์ (cell source) โครงเลี้ยงเซลล์ (scaffold) และปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงเซลล์ (environmental factor) (ภาพที่ 7) [8]

2.5.1 แหล่งที่มาของเซลล์ (cell source)

เซลล์ที่นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน สามารถสกัดได้จาก เนื้อเยื่อหลายชนิด ได้แก่ เซลล์กระดูกอ่อน (chondrocyte) เซลล์ต้นกำเนิด (stem cell) เป็นต้น [9, 10] โดยเซลล์ที่มีการวิจัยและถูกนำมาใช้อย่างมากก็คือ เซลล์กระดูกอ่อน ซึ่งสกัดได้ จากการย่อยเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน ด้วยเอนไซม์ เนื่องจากเซลล์กระดูกอ่อน เป็นเซลล์ดั้งเดิม (native cell) เพียงชนิดเดียวที่อาศัยอยู่ และสร้างกระดูกอ่อนอยู่แล้วตามธรรมชาติ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วย เซลล์กระดูกอ่อน จึงสามารถให้เนื้อเยื่อที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกระดูกอ่อนผิวข้อมากที่สุด

ในทางปฏิบัติผู้ป่วยจะได้รับการส่องกล้องเข้าไปเพื่อเก็บ เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนผิวข้อ ในบริเวณที่ไม่ได้รับน้ำหนัก (Non weight bearing area) นำออกมาสกัดเอาเซลล์กระดูกอ่อน และเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนในงานเลี้ยงเซลล์ภายในห้องปฏิบัติการ

ข้อด้อยในการใช้ เซลล์กระดูกอ่อน คือ เซลล์ชนิดนี้ เมื่อถูกเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ ซึ่งมีลักษณะสิ่งแวดล้อมรอบเซลล์ เป็น 1 มิติ เมื่อเวลาผ่านไปหรือเมื่อเซลล์ถูกเพิ่มจำนวนจนถึงจุดหนึ่ง เซลล์จะไม่สามารถดำรงฟีโนไทป์ (phenotype) เป็นเซลล์กระดูกอ่อน และจะเปลี่ยน ชนิดของเซลล์ (dedifferentiate)

เป็นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) ซึ่งไม่สามารถ สร้างสารประกอบภายนอกเซลล์เพื่อให้เป็นเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนได้

ด้วยเหตุผลนี้ จึงมีการศึกษาการใช้เซลล์ต้นกำเนิด นำมาสกัดเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนร่วมกับการใช้ โกรท แฟคเตอร์ (Growth Factor) ที่เหมาะสม เพื่อกระตุ้นให้เซลล์ต้นกำเนิด เปลี่ยนเป็น เซลล์ที่สามารถสร้างกระดูกอ่อนได้ต่อไป เซลล์ต้นกำเนิด ที่นำมาใช้ได้มาจากหลายแหล่งเช่น ไขกระดูก (Bone Marrow-derived stem cells), เนื้อเยื่อไขมัน (Adipose – derived stem cells), เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน (Embryonic stem cells) ข้อดีของการใช้เซลล์ต้นกำเนิด คือ สามารถเพาะเลี้ยงและเพิ่มจำนวนได้ง่า ยโดยไม่เปลี่ยนสภาพและคุณสมบัติ แต่ก็มีข้อด้อยในแง่ของวิธีการสกัดเซลล์ การเลือกใช้ โกรท แฟคเตอร์ และที่สำคัญคือเรื่องของจริยธรรมทางการแพทย์ (Ethical issue)

2.5.2 โครงเลี้ยงเซลล์ (Scaffolds)

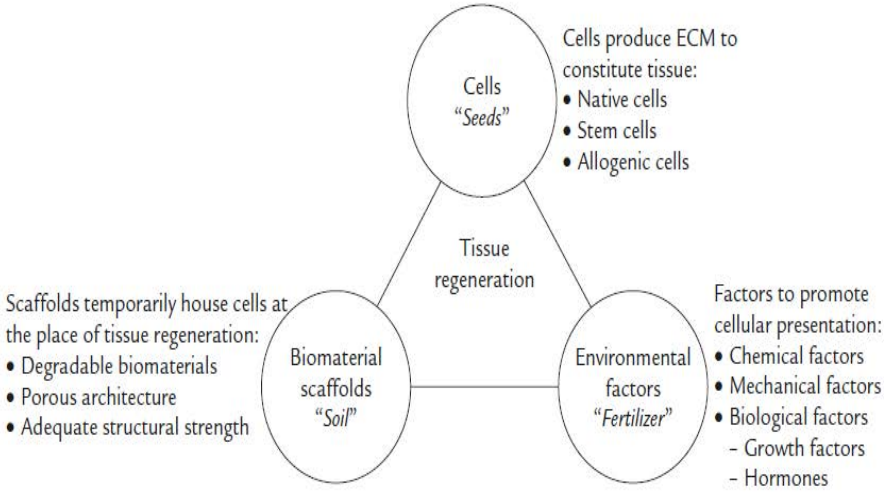
การเลือกใช้ โครงเลี้ยงเซลล์ ที่เหมาะสมเป็นสิ่งสำคัญมากในวิศวกรรมเนื้อเยื่อ โดยเฉพาะการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน เนื่องจากในธรรมชาติ เซลล์กระดูกอ่อนจะฝังตัวอยู่ในเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนและถูกล้อมรอบด้วยสารประกอบภายนอกเซลล์ ทำให้เกิดลักษณะโครงสร้าง 3 มิติ ซึ่งเอื้อต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ และกิจกรรมต่างๆของเซลล์กระดูกอ่อน เช่น การตอบสนองต่อสิ่งเร้า แรงกด แรงเฉือน และ เมตาบอลิซึม (metabolism) ของเซลล์

การศึกษาที่ผ่านมาพิสูจน์ว่า โครงเลี้ยงเซลล์ ที่ให้โครงสร้าง 3 มิติ ในการเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนนั้น ทำให้งานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนประสบความสำเร็จเป็นอย่างดี

คุณสมบัติที่สำคัญของโครงเลี้ยงเซลล์

1. ย่อยสลาย (degrade) ได้เองในช่วงเวลาที่เหมาะสมและควบคุมการย่อยสลายได้
2. มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatible) กับร่างกายมนุษย์ ไม่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อ
3. ส่งเสริมให้ คงฟีโนไทป์ของเซลล์กระดูกอ่อน เพิ่มจำนวน และผลิตสารประกอบภายนอกเซลล์ได้
4. มีความพรุน (porosity) ที่เหมาะสมเพื่อส่งเสริม ให้เกิดการไหลเวียนของสารอาหารและของเสียที่เกิดขึ้นจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์
5. เกาะยึดและเชื่อมประสานเป็นเนื้อเดียวกับเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนปกติ

6. ปรับแต่งรูปร่างได้ง่าย เพื่อให้มีขนาดและรูปร่างที่พอดีกับ defect ในตำแหน่งต่างๆ
7. ให้เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมีคุณสมบัติเชิงกลใกล้เคียงกับ กระดูกอ่อนตามธรรมชาติ



ภาพที่ 7 องค์ประกอบหลักของวิศวกรรมเนื้อเยื่อ กระดูกอ่อน

ที่มา : Adv Drug Deliv Rev, 2008. 60(2): p. 243-62

โครงเลี้ยงเซลล์ สามารถผลิตขึ้นมาจากวัสดุชีวภาพ (biomaterial) ทั้ง พอลิเมอร์ธรรมชาติ (natural polymer) และ พอลิเมอร์สังเคราะห์ (Synthetic polymer) ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ในการใช้งาน [11] ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 วัสดุชีวภาพที่สามารถนำมาใช้ผลิตเป็นโครงเลี้ยงเซลล์สำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน

Natural Polymer	Synthetic Polymer
Agarose	Poly (4-hydoxy esters)
Alginate	Poly (ethylene glycol /oxide)
Cellulose	Poly (NIPAAm)
Collagen	Poly (propylene fumarate)
Chondroitin sulfate	Poly (urethane)
Fibrin glue	Poly (vinyl alcohol)
Gelatin	Self-assembling peptide
Hyaluronic acid	

ที่มา:ดัดแปลงจาก Adv Drug Deliv Rev, 2008. 60(2): p. 243-62

โดยโครงเลี้ยงเซลล์ 3 มิติ สามารถผลิตออกมาใน 3 รูปแบบ (ภาพที่ 8) ได้แก่

2.5.2.1 แบบไฮโดรเจล (Hydrogel)

โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีลักษณะเป็นเจล (gel) มีความหนืด (Viscoelastic) แตกต่างกันไปตามชนิดและความเข้มข้นของวัสดุชีวภาพที่นำมาใช้ โครงเลี้ยงเซลล์ ในรูปแบบนี้จะมีคุณสมบัติ อุ้มน้ำ (water swollen network) สามารถนำมาใช้ฉีด (inject) เข้าในรอยโรคบนผิวกระดูกอ่อน ที่มีรูปร่างและขนาดแตกต่างกัน เนื้อของโครงเลี้ยงเซลล์ มีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneous) นำพาสารอาหารและของเสียออกจากเซลล์ได้ดี และเป็นโครงสร้างสามมิติ ที่สามารถผสมกับเซลล์กระดูกอ่อน ให้แขวนลอยอยู่ ทำให้เซลล์สามารถคงรูปร่าง กลม(round morphology) ซึ่งเป็นรูปร่างของเซลล์กระดูกอ่อนที่พบในเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนตามธรรมชาติ นอกจากนี้ยังสามารถ ส่งสัญญาณ (transducer signal) เมื่อมีแรงมากระทำ ไปยังเซลล์ ทำให้ช่วยกระตุ้นการสร้าง สารประกอบ

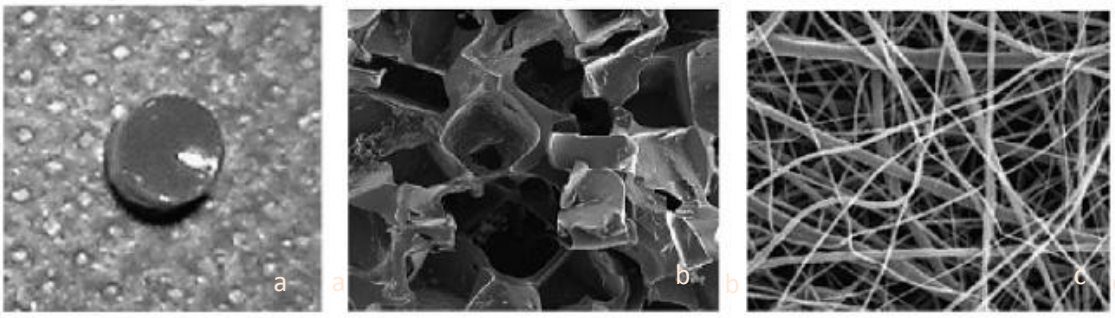
ภายนอกเซลล์ รวมถึงองค์ประกอบหลักของ โครงเลี้ยงเซลล์ชนิดนี้คือน้ำ จึงให้สิ่งแวดล้อมรอบเซลล์ใกล้เคียงกับกระดูกอ่อนตามธรรมชาติ [12, 13]

2.5.2.2 แบบฟองน้ำ (Sponge)

โครงเลี้ยงเซลล์ชนิดนี้อยู่ในรูปของแข็งมีรูพรุน มีความโดดเด่นในเรื่องขนาดของรูพรุน และความพรุนของโครงสร้าง ซึ่งจะช่วยให้เซลล์เกาะ ยึดกับโครงเลี้ยงเซลล์ มีการติดต่อเชื่อมโยงกันระหว่างเซลล์ กระตุ้นการสร้างสารประกอบภายนอกเซลล์ เอื้อต่อการแพร่เข้าออกของสารอาหารและของเสียที่ถูกสร้างขึ้น มีการศึกษาเกี่ยวกับการใช้โครงเลี้ยงเซลล์ชนิดนี้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนอย่างมาก โดยผลิตมาจากวัสดุชีวภาพหลากหลายและมีการผลิตในรูปแบบ โครงเลี้ยงเซลล์สำเร็จรูปพร้อมใช้ ออกจำหน่ายในเชิงพาณิชย์

2.5.2.3 แบบตาข่าย (mesh)

โครงเลี้ยงเซลล์ ชนิดนี้ผลิตขึ้นให้มีลักษณะของเส้นใยที่สานกันเป็น ตาข่าย คุณสมบัติอยู่ที่เรื่องของความแข็งแรงทนต่อแรงต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในข้อต่อได้ดี แต่มีข้อด้อยในเรื่องของความพรุน



ภาพที่ 8 โครงเลี้ยงเซลล์ชนิดต่างๆ a. แบบไฮโดรเจล b. แบบฟองน้ำ c. แบบตาข่าย

ที่มา : Adv Drug Deliv Rev, 2008. 60(2): p. 243-62

2.5.3 ปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงเซลล์ (environmental factor)

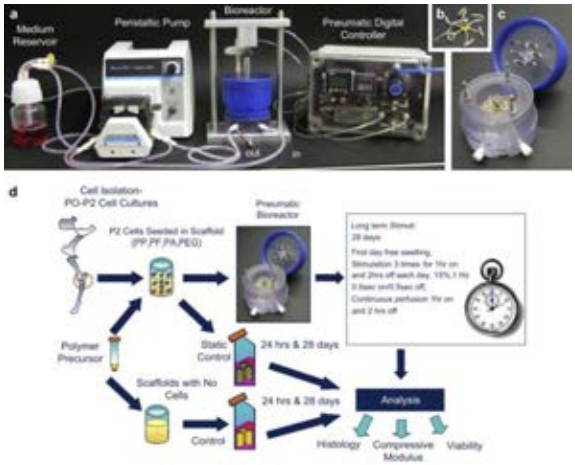
นอกเหนือจากชนิดของเซลล์ และโครงเลี้ยงเซลล์แล้วยังมีองค์ประกอบสำคัญ ซึ่งจำเป็นต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน ช่วยให้เนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงเจริญเป็นกระดูกอ่อนที่สมบูรณ์

2.5.3.1 โกรท แฟคเตอร์ (Growth factor)

Bone morphogenetic proteins(BPMPs), fibroblast growth factor (FGF-2), insulin like growth factor(IGF-1), transforming growth factor (TGF-B) growth foctor [14] ต่างๆ เหล่านี้ มีส่วนช่วยในการกระตุ้น chondrocyte differentiation และ ECM production ให้เกิดขึ้น ได้ใกล้เคียงในธรรมชาติ

2.5.3.2 การกระตุ้นเชิงกล (Mechanical stimulation)

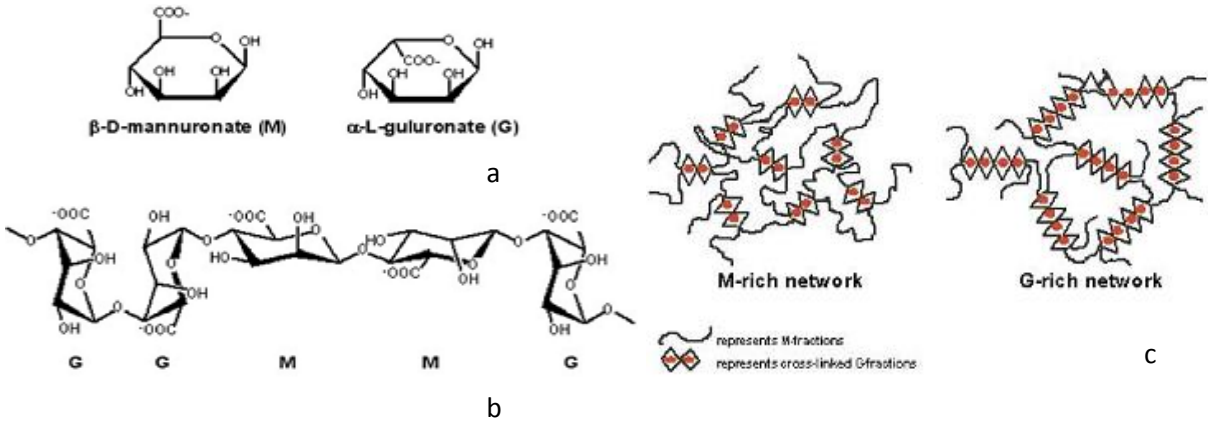
แรงกดอัด (compressive force), แรงดัน hydrostatic (hydrostatic pressure), แรงดัน osmotic (osmotic pressure) ที่ถูกส่งผ่านไปยังเซลล์ เป็นการกระตุ้นโดยเลียนแบบการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนตามอวัยวะต่าง ๆ ของร่างกาย ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนภายในห้องปฏิบัติการ จะใช้ เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ (bioreactor) เป็นเครื่องมือสำหรับทำให้เกิดแรงในลักษณะที่ต้องการ ตามวัตถุประสงค์และตามชนิดของเนื้อเยื่อเพื่อให้เกิดสิ่งแวดล้อมรอบเซลล์ที่คล้ายคลึงกับการสร้างกระดูกอ่อนในธรรมชาติ (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 ตัวอย่างเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนภายในห้องปฏิบัติการ ที่มา : Biomaterials. 2009 ;30(4):518-25.

2.6 โครงเลี้ยงเซลล์จาก Alginate ในรูปแบบไฮโดรเจล (Alginate hydrogel scaffold)

Alginate เป็น พอลิเมอร์ธรรมชาติ ประเภทพอลิแซคคาไรด์ (polysaccharide) มีประจุลบ (anionic polymer) สกัดได้จากสาหร่ายสีน้ำตาล (brown algae) ประกอบด้วยโมเลกุลของ โมโนเมอร์ 2 ชนิด คือ 1,4 link β-D-mannuronic acid (M) และ α-L guluronic acid (G) ในสัดส่วน M:G ประมาณ 30:70 มีมวลโมเลกุล 5000-200000 ด้วยคุณสมบัติที่เป็นขั้วลบ alginate จะสามารถนำไป เชื่อมขวาง (crosslink) กับสารที่เป็นขั้วบวก (bivalent cation) เช่น Ca^{2+} Ba^{2+} แล้วเกิดเป็น scaffold ในรูปแบบ ไฮโดรเจล ซึ่งไม่ละลายน้ำ (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 10 โครงสร้าง โมเลกุล และการเกิดเจล ของ Alginate

a โมโนเมอร์ (β-D-mannuronic acid (M) และ α-L guluronic acid (G))

b Alginate พอลิเมอร์

c การเกิดเจลเมื่อมีปฏิกิริยาเชื่อมขวางทางเคมี กับสารละลายแคลเซียม

ที่มา: Injury, 2008. 39 :p. 77-87

Alginate ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางทั้งในวิศวกรรมเนื้อเยื่ออุตสาหกรรมอาหาร และด้านอื่น ๆ เนื่องจาก หาง่าย , มีปริมาณมาก ,ราคาถูก และมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatibility) สูง โดยมีระยะเวลาในการย่อยสลาย (degrade) ประมาณ 90 วัน และ องค์การอาหารและยาประเทศสหรัฐอเมริกา (USFDA) อนุญาตให้นำมาใช้ในมนุษย์ได้อย่างปลอดภัย การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนโดยใช้ โครงเลี้ยงเซลล์จาก alginate ในรูปแบบไฮโดรเจล ตามปกติ จะใช้สารละลาย alginate ช่วงความเข้มข้น ระหว่าง 0.5%-4% ทำการ เชื่อมขวาง กับ 102 mM $CaCl_2$ ใช้ระยะเวลาเกิด เจล (Gelation time) ประมาณ 40 วินาที (ภาพที่ 11) จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า จะเกิดเจลได้ง่ายกว่า ถ้ามีปริมาณ guluronate ในสัดส่วนที่มากกว่า ด้านของคุณสมบัติเชิงกล พบว่า โมดูลัสการอัด (compressive modulus) และ ความแข็งแรง (strength) ของ โครงเลี้ยงเซลล์ จะมาก หรือน้อย ขึ้นกับ มวลโมเลกุลของ alginate ความเข้มข้นของสารละลาย alginate ความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียม[15] มีรายงานการใช้ alginate ไฮโดรเจล

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน เป็นจำนวนมาก[16 , 17] [18 , 19] ทั้งการทดลองในห้องทดลองและในทางคลินิก พบว่าสามารถสร้างเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนได้อย่างสมบูรณ์ ทั้งการใช้ alginate อย่างเดียว หรือเชื่อมขวางกับพอลิเมอร์ ชนิดอื่น [20, 21]

ภาพที่ 11 เมื่อหยดสารละลาย alginate ในอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งเป็นของเหลวสีชมพู ลงในสารละลาย แคลเซียมคลอไรด์ พบว่าเกิดเจลลักษณะเป็นเม็ดกลม(bead) ตามวิธีการหยด (drop)

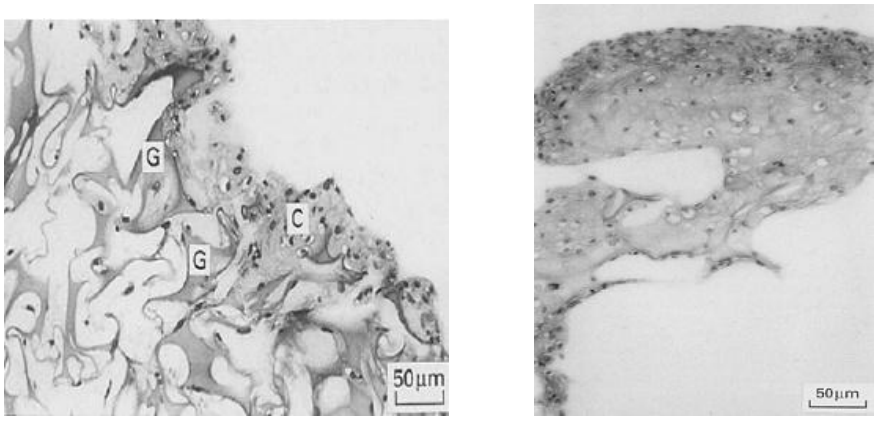
2.7 Gelfoam (Gelatin sponge)

เจลาติน (Gelatin) เป็นสารอนุพันธ์ ของคอลลาเจน ถูกนำมาใช้เพื่อเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ มีคุณสมบัติคล้ายคอลลาเจน โดย gelfoam (ภาพที่ 12) เป็นผลิตภัณฑ์เชิงพาณิชย์ผลิตจาก gelatin sponge มีลักษณะเป็นของแข็ง มีรูพรุน สามารถเกิดเจลได้ เมื่อสัมผัสของเหลว [22, 23] gelfoam ถูกนำมาใช้อย่างมาก ในทางศัลยกรรม เพื่อห้ามเลือดขณะผ่าตัด ซึ่งสามารถนำมาใช้ในร่างกายมนุษย์ได้อย่างปลอดภัย ไม่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อในร่างกาย คุณสมบัติในการเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ ของพอลิเมอร์ชนิดนี้ คือมีความพรุนที่เหมาะสม สำหรับการมีชีวิตของเซลล์ และทำให้แพร่ผ่านของน้ำ อาหาร และของเสียออกจากเซลล์เกิดได้ดี ข้อด้อยของ gelfoam คือ ถูกย่อยสลายได้เร็วโดยเอนไซม์ของร่างกาย

ในด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน การศึกษาส่วนใหญ่จะเป็นการใช้gelfoam เป็นโครงเลี้ยงเซลล์ในรูปแบบฟองน้ำ และเป็นการศึกษาอย่างมากในห้องทดลอง (*in vitro*)[24] [25]ผลจากการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนด้วย โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจาก gelfoam พบว่าสามารถสร้างเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนขึ้นมาได้(ภาพที่13) มีการสร้าง glycosaminoglycan (GAG) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของโปรตีโอไกลแคน และ คอลลาเจนชนิดที่ II เกิดขึ้น [26] ถึงแม้ว่า gelfoam จะมีข้อดีมากมาย แต่ข้อด้อยของ gelfoam คือ เป็น โครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มั่นคง (stable) คงรูปร่างไม่ได้นานและถูกย่อยสลายได้ภายในระยะเวลาสั้นประมาณ 6 สัปดาห์ ดังนั้นในกระบวนการผลิต โครงเลี้ยงเซลล์ จึงมักใช้เทคนิคการเชื่อมขวางร่วมกับพอลิเมอร์ชนิดอื่น เพื่อให้เกิดความมั่นคงมากยิ่งขึ้น [25, 27]

ภาพที่ 12 Gelfoam ยี่ห้อ spongostan ที่ใช้ในเป็นเวชภัณฑ์เพื่อห้ามเลือดขณะผ่าตัด มีรูพรุนขนาด 180-250 ไมครอน และสามารถ ปรับแต่งเป็นรูปร่างต่างๆตามการใช้งาน

ที่มา: http://www.whichmedicaldevice.com/by-manufacturer/132/260/spongostan



a b

ภาพที่ 13 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนด้วยโครงเลี้ยงเซลล์ Gelfoam ภายในห้องปฏิบัติการ

a สัปดาห์ที่ 1 พบเซลล์กระดูกอ่อนอยู่ใน lacuna (C) และ Gelfoam (G)

b สัปดาห์ที่ 4 พบเป็นเนื้อเยื่อใหม่ที่คล้ายกระดูกอ่อน

ที่มา: Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 1995. 6(12): p. 739-744

บทที่3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เซลล์และสัตว์ทดลอง

1. เซลล์กระดูกอ่อนสกัดจากเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนของผู้ป่วยที่มาเข้ารับการผ่าตัดเชื่อมข้อ ที่แผนกออร์โธปิดิกส์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ (ภาพที่ 14)

2. หนูทดลองชนิด Nude mouse (BALB/C-nu) อายุ 4-5 สัปดาห์เพศเมีย จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล (ภาพที่ 15)

3. การวิจัยครั้งนี้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมวิจัย คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 14 กระดูกอ่อนที่เก็บมาจากห้องผ่าตัด

ภาพที่ 15 หนูทดลองชนิด Nude mouse (BALB/C-nu) อายุ 4-5 สัปดาห์

3.2 เคมีภัณฑ์

1. Antibiotic (L-Glutamine/Penicillin/Streptomycin) จากบริษัท Sigma-Aldrich, St Louis, USA
2. Gelfoam ยี่ห้อ Spongostan จากบริษัท Johnson and Johnson , USA
3. Calcium Chloride จากบริษัท APS Finechem, Seven Hills, Australia
4. Collagenase Type II จากบริษัท Invitrogen Corp., Auckland, NZ
5. Ethanol 70% จากฝ่ายเภสัชกรรม โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
6. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), Trisodium salt จากบริษัท Sigma-Aldrich, St Louis, USA
7. Fetal Bovine Serum (FBS) จากบริษัท Invitrogen Corp., Paisley, UK
8. Fibroblast Growth Factor (FGF) จากบริษัท Sigma-Aldrich, St. Louise, USA
9. Gentamycin (Antibiotics) จากบริษัท M&H Manufacturing, Samutprakarn, Thailand
10. Glutaraldehyde จาก บริษัท APS Finechem. Seven Hills, Australia

11. DMEM F-12 จากบริษัท Hyclone, USA
12. L-Ascorbic Acid จากบริษัท Sigma-Aldrich, St Louis, USA
13. Lipase จากบริษัท Sigma-Aldrich, St Louis, USA
14. Magnesium Chloride hexahydrate จากบริษัท Carlo Erba, Italy
15. Normal Saline Solution (NSS) จากบริษัท General Hospital Products, Patumthani, Thailand
16. Paraformaldehyde จากบริษัท Sigma-Aldrich, St Louis, USA
17. Phosphale Buffer Saline (PBS) จากบริษัท Invitrogen Corp., Paisley, UK
18. Potassium Phosphate monobasic จากบริษัท APS Finechem, Seven Hills, Australia
19. Sodium alginate จากบริษัท Sigma-Aldrich, St Louis, USA
20. Sodium Chloride จากบริษัท APS Finechem, Seven Hills, Australia
21. Trypan Blue 0.4% จากบริษัท Gibco RBL, USA
22. Trypsin-EDTA จากบริษัท Invitrogen Corp., Canada

- ดูหมายเหตุของเคมีภัณฑ์และหมายเลขสารเคมี (Catalog Number) ที่ภาคผนวก ก

3.3 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (4- digit balance) ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland
2. เครื่องชั่ง 5 ตำแหน่ง (5- digit balance) รุ่น AE 240 ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland
3. เครื่องฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำความดันสูง (Autoclave) รุ่น HE 25/50 ของบริษัท Hirayama, Japan
4. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น GPR ของบริษัท Beckman
5. ตู้อบ (Oven) อุณหภูมิ 45-65 องศาเซลเซียส
6. ตู้เย็น (Refrigerator)
7. ตู้เพาะเชื้อ (Incubator)
8. CO_2 Incubator แบบ 3336 ของบริษัท Forma Scientific
9. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น 1235 PC ของบริษัท Shel-Lab
10. ตู้แช่เย็นอุณหภูมิต่ำ (Deep Freeze) ของบริษัท Revco
11. Laminar air flow รุ่น 18 ของบริษัท Labcaire

3.4 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงสัตว์ทดลอง

1. กรงพลาสติก
2. วัสดุรองนอน
3. ขวดน้ำพร้อมหลอด
4. ตัวกรองอากาศพร้อมแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมครอน

3.5 ขั้นตอนการทดลอง

3.5.1 การสกัดแยกเซลล์กระดูกอ่อนจากเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน

1. กระดูกอ่อนที่ได้แยกจากกระดูกอ่อนบริเวณข้อเท้าของผู้ป่วยหญิง อายุ 15 ปี ที่เข้ารับการผ่าตัดเชื่อมข้อเท้า ในแผนกออร์โธปิดิกส์ ล้างทำความสะอาดในสารละลาย phosphate buffer saline (PBS)
2. ทำการลอกกล้ามเนื้อที่หุ้มออก
3. แช่ในสารละลายของยาปฏิชีวนะ 1% pen/strep ซึ่งผสมใน PBS
4. หั่นชิ้นกระดูกอ่อนให้มีขนาด 0.2 x 0.2 x 0.2 ลูกบาศก์เซนติเมตร จากนั้นแช่ในสารละลาย Collagenase 0.3% (w/v) (ดูวิธีการเตรียมที่ ภาคผนวก ข.) ไว้อย่าน้อย 12 ชั่วโมง
5. ดูดส่วนที่เป็นน้ำ แล้วนำมากรองด้วยตัวกรองขนาด 70 ไมครอน ล้างส่วนที่เป็นตะกอนด้านล่างด้วย สารละลาย PBS จากนั้น ทำการกรองน้ำที่ล้างได้อีกครั้งหนึ่ง
6. นำตะกอนส่วนที่กรองได้ ผสมกับสารละลาย PBS แล้วนำไปปั่นแยกเซลล์ ที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จะได้ชั้นเซลล์ตกตะกอน
7. ดูดส่วนที่เป็นน้ำใสออก และล้างเซลล์ด้วยสารละลาย PBS จากนั้นทำการปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที ขั้นตอนนี้ซ้ำอีก 2 ครั้ง
8. ดูดส่วนที่เป็นน้ำทิ้ง และทำการนับจำนวนเซลล์ ปรับปริมาณเซลล์ เพื่อทำการเพิ่มจำนวนเซลล์ในจานเลี้ยงเซลล์ต่อไป

3.5.2 การเลี้ยงเซลล์ภายนอกร่างกาย (*in vitro* culture)

เป็นขั้นตอนแรกในการเพาะเลี้ยงเซลล์ กล่าวคือ เมื่อสกัดแยกเซลล์กระดูกอ่อนได้แล้ว จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ตามที่ต้องการ จากนั้น จึงนำเซลล์ไปเลี้ยงบนโครงเลี้ยงเซลล์ต่อไป ซึ่งวิธีการเลี้ยงเซลล์ในจานเลี้ยงเซลล์ มีดังนี้

1. นำเซลล์กระดูกอ่อนแช่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (Media) ซึ่งประกอบด้วย Fetal Bovine Serum (FBS), DMEM F-12 และ Antibiotic (ดูวิธีการเตรียมที่ ภาคผนวก ข.)
2. ทำการนับเซลล์กระดูกอ่อนโดยใช้เครื่องนับเม็ดเลือด Haemocytometer ใช้สี Trypan Blue 0.2% เป็นสีย้อมเซลล์ ซึ่งไม่ติดสีน้ำเงินในเซลล์กระดูกอ่อนที่มีชีวิต เพื่อทำการนับ
3. ทำการปรับจำนวนเซลล์ ให้มีความเข้มข้นของเซลล์ (จำนวนเซลล์ต่อปริมาตร) ที่ $2x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ (DMEM F-12+10% FBS)
4. ทำการเลี้ยงเซลล์ในจานเลี้ยงเซลล์เป็นเวลาประมาณ 3 สัปดาห์ (3 passage) ที่ 37° C ภายใต้บรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ 5% โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์สัปดาห์ละ 2 ครั้ง

3.5.3 การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์

1. เตรียมสารละลาย 2% alginate ใน culture media

2. บด gelfoam จนเป็นผงละเอียด นำมาผสมกับ สารละลาย 2% alginate

3. ผสมในอัตราส่วนสารละลาย 2% alginate 0.5 มล. ต่อ gelfoam 0.25 กรัม

จนได้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกันในรูปของเหลวกึ่งเจล

นำไปทำปลอดเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ121 c° แรงดัน 1 bar เวลา 15 นาที

3.5.4 การเตรียม cell suspension สำหรับนำไปปลูกถ่ายลงในสัตว์ทดลอง

1. trypsonized เซลล์ออกจากจานเลี้ยงเซลล์ด้วย trypsin เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ เพื่อหยุดปฏิกิริยา

2. นำเซลล์ไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

3. ล้างด้วย PBS แล้ว เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ นับเซลล์และเตรียม cell suspension ให้มีปริมาณ $20x10^6$ เซลล์ ต่อ 1 มล.

4. นำสารละลายเซลล์ที่ได้มาผสมกับ โครงเลี้ยงเซลล์จากข้อ 3.5.3 ด้วยเทคนิคการผสมผ่านหลอดฉีดยาขนาด 3 มล. ในอัตราส่วนสารละลายเซลล์ 0.5 มล. ต่อ โครงเลี้ยงเซลล์ 0.5 มล.

5.นำสารประกอบระหว่างเซลล์กับโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้ในข้อ 4. ไปทำการเชื่อมขวางกับสารละลาย $CaCl_2$ ในจานเลี้ยงเซลล์ระยะเวลา 10 นาที

6. นำไฮโดรเจลที่ได้ฉีดเข้าใต้ผิวหนังหนูทดลอง 1 มล/ 1 ตัว โดยใช้ยา thiopental ในการทำสลบให้หนูทดลอง

3.5.5 การเลี้ยงเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ในสัตว์ทดลอง (*in vivo* culture)

หลังจากการเลี้ยงเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ในจานเลี้ยงเซลล์ (Petri Dish) หรือวิธีการเลี้ยงภายนอกร่างกาย เป็นเวลาประมาณ 4 สัปดาห์ (3 passage) จึงทำการเลี้ยงในสัตว์ทดลอง ซึ่งในงานวิจัยนี้ใช้ หนู Nude Mice (BALB/c-nu) ที่มีอายุประมาณ 4-5 สัปดาห์ เป็นสัตว์ทดลอง โดยในการทดลองได้ทำการปลูกถ่าย (Implant) โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีเซลล์กระดูกอ่อน ในชั้นใต้ผิวหนัง (subcutaneous layer) บริเวณหลังของหนูทดลอง และทำการเลี้ยงเซลล์ใน หนูทดลอง เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (ดูวิธีการเลี้ยง หนูทดลอง ได้ที่ภาคผนวก ค.)

3.5.6 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในหนูทดลองครบ 12 สัปดาห์ ชิ้นงานถูกนำออกจากหนูทดลอง ที่ได้รับยาสลบเกินขนาด แล้วนำไปวิเคราะห์ผลด้วย

3.5.6.1 ผลการทดลองทางกายภาพ

1. การเฝ้าสังเกตพฤติกรรมของหนูทดลอง จากการกินอาหารและน้ำการมีชีวิตของหนูหลังจากทำการปลูกถ่ายเซลล์ โครงเลี้ยงเซลล์ ลงในชั้นใต้ผิวหนัง และปฏิกิริยาของเนื้อเยื่อหนูทดลองต่อชิ้นงานที่ปลูกถ่าย

2. ลักษณะทางกายภาพของชิ้นงานที่สักเกตได้ จากชั้นใต้ผิวหนังของหนูทดลอง ได้แก่ ขนาดของชิ้นงาน ความแข็งของชิ้นงาน เมื่อสัมผัสผ่านผิวหนังของหนูทดลอง ในระยะเวลาที่ต่างกัน

3. การชั่งน้ำหนักของชิ้นงาน เมื่อครบระยะเวลาการวิจัย เปรียบเทียบกับ น้ำหนักของชิ้นงานก่อนปลูกถ่ายลงหนูทดลอง รวมถึงการสังเกต สี รูปร่าง และลักษณะของเนื้อเยื่อที่ถูกสร้างขึ้นใหม่

3.5.6.2 การวิเคราะห์ผลการทดลองโดยการตรวจสอบชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา

1. การย้อมสีเนื้อเยื่อด้วย Hematoxylin and Eosin (H&E)

การย้อมชิ้นเนื้อด้วย H&E เป็นวิธีการย้อมชิ้นเนื้อมาตรฐาน โดยเนื้อเยื่อแต่ละชนิดจะมีลักษณะการติดสีที่เป็นลักษณะเฉพาะ ในการวิจัยนี้ เนื้อเยื่อที่คาดว่าจะได้หลังจากทำการเพาะเลี้ยง คือ เนื้อเยื่อกระดูกอ่อน ซึ่งเมื่อย้อมสี H&E แล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ จะเห็นเซลล์กระดูกอ่อนติดสีแดง บริเวณ ไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ติดสีน้ำเงินบริเวณนิวเคลียส (nucleus) และติดสีชมพูปนเทาในตำแหน่ง ของสารประกอบภายนอกเซลล์

2. การย้อมด้วยแอนติบอดี (antibody) ต่อ S-100 โปรตีน

การย้อมด้วยวิธีนี้เพื่อตรวจสอบว่าเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเป็นเซลล์กระดูกอ่อนจริง เนื่องจากโปรตีน S-100 เป็นโปรตีนที่มีอยู่ในเซลล์ กระดูกอ่อนและเซลล์ของระบบประสาทเท่านั้น

3.การย้อมด้วย แอนติบอดี ต่อคอลลาเจนชนิดที่ 2 (collagen type II)

การย้อมวิธีนี้เพื่อตรวจสอบว่า เซลล์ที่ถูกปลูกถ่ายลงในหนูทดลอง ยังคงสภาพฟีโนไทป์ เป็นเซลล์กระดูกอ่อน ซึ่งสามารถผลิตคอลลาเจนชนิดที่ 2 ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนชนิด Hyaline ได้

4. การย้อมด้วย safranin-O

เพื่อตรวจสอบว่า เซลล์ที่ปลูกถ่ายในหนูทดลองสร้าง GAG ซึ่งเป็นองค์ประกอบของสารประกอบภายนอกเซลล์

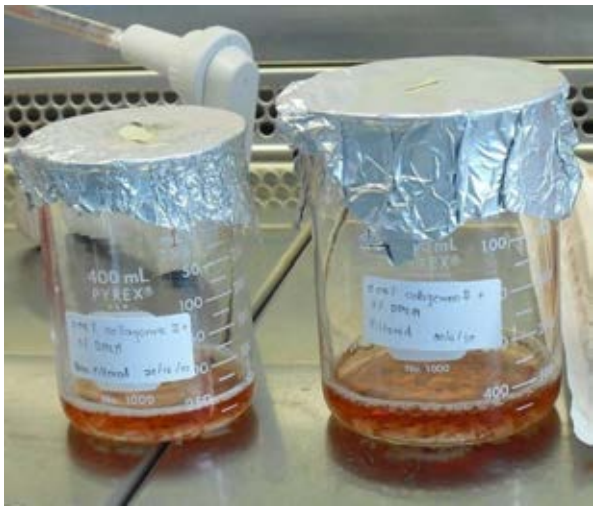
บทที่ 4

ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

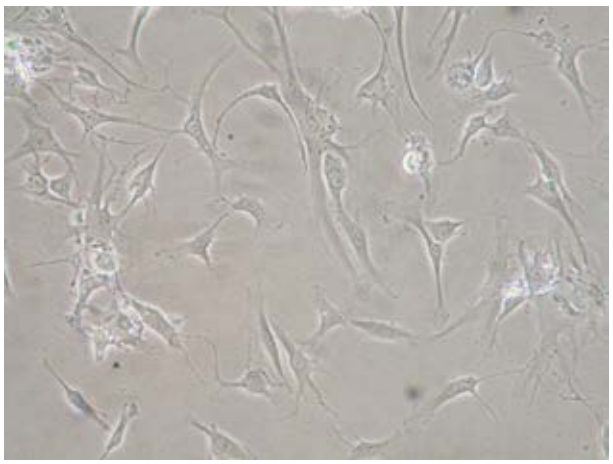
การเลี้ยงทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนโดยใช้โครงเลี้ยงเซลล์ alginate/gelfoam มีวิธีการดำเนินการทดลองเป็นลำดับขั้น และรายงานผลการทดลองตามลำดับดังนี้

4.1 การสกัดเซลล์กระดูกอ่อนจากเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนและนำไปเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนในจานเลี้ยงเซลล์

เมื่อนำเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ขนาดประมาณ 1-2 มม. แล้วนำไปย่อยด้วย เอนไซม์คอลลาจิเนส II (collagenase II) จะได้เซลล์ที่มีลักษณะ กลมมน หลังจากนั้นนำเซลล์ที่ได้ ไปเพาะเลี้ยงลงในจานเลี้ยงเซลล์ที่ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ ไว้ จะสังเกตเห็นเซลล์เริ่มเกาะตัวอยู่ที่ก้นจานเลี้ยง และเริ่มยืดส่วน cytoplasm ออก ทำให้เซลล์มีลักษณะเป็นรูปหกเหลี่ยม (hexagonal) (ภาพที่ 16) ทำการเปลี่ยน อาหารเลี้ยงเซลล์ ทุก 3 วัน และทำการ trypsonize เมื่อเซลล์เจริญเต็มจานเลี้ยงเซลล์ (reach confluence) ประมาณ 1 สัปดาห์ เซลล์จะเต็มพอดี ทำลักษณะเดียวกัน ประมาณ 3 ครั้ง (3 passage) ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์กระดูกอ่อน ยังคงฟีโนไทป์ ไม่ dedifferentitate เป็น เซลล์fibroblast ซึ่งเป็นเซลล์ รูปร่างกระสวย



ภาพที่ 16 เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่ถูกตัดเป็นชิ้น ขนาด 2 มม^3 ใน แช่ในเอนไซม์ คอลลาจีเนส ประมาณ**12** ชั่วโมง



ภาพที่ 17 เซลล์กระดูกอ่อนในจานเลี้ยงเซลล์ที่เวลา 1 สัปดาห์

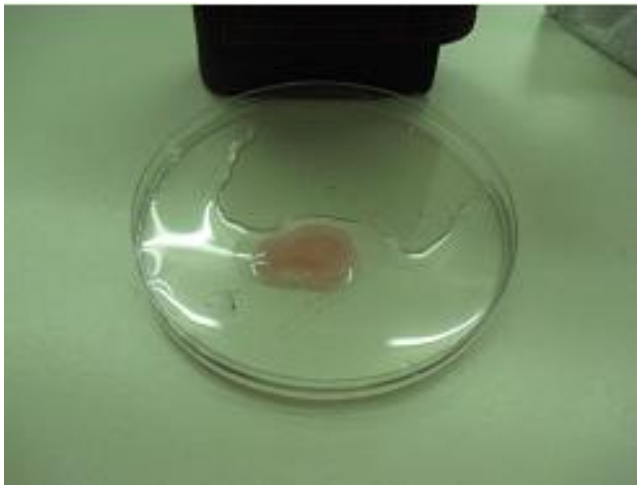
สังเกตเซลล์แบ่งตัวเพิ่มจำนวนเกือบเต็มพื้นที่จานเลี้ยงเซลล์ และเซลล์มีรูปร่างหลายเหลี่ยม

4.2 การผลิตโครงเลี้ยงเซลล์จาก alginate และ gelfoam

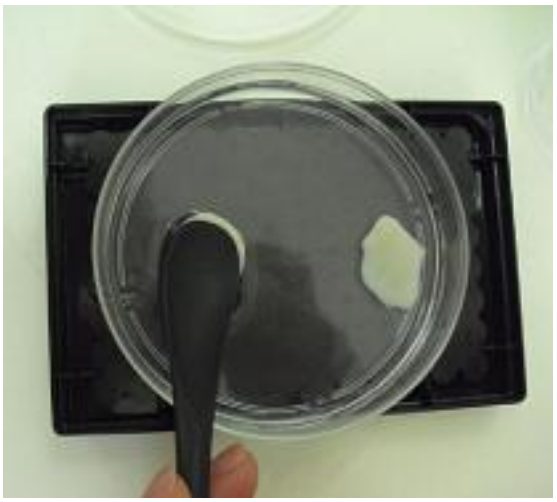
Alginate เมื่อ นำมาทำละลายกับ อาหารเลี้ยงเซลล์ จะได้ สารละลายที่มีสีชมพูใส มีความหนืด (viscoelastic) เล็กน้อย เมื่อนำไปเชื่อมขวาง กับ $CaCl_2$ จะได้ ลักษณะเป็นเจลสีชมพู ที่มีความยืดหยุ่น และไม่ละลายน้ำ (ภาพที่18)

ส่วน gelfoam มีลักษณะเป็นเนื้อโฟมสีขาวเหลือง มีความยืดหยุ่นสูงสามารถเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นเจลนิ่มลง เมื่อเปียกน้ำ เมื่อนำไปบด จะได้ผงละเอียดคล้ายแป้ง

เมื่อผสมสารทั้งสองชนิดเข้าด้วยกัน จะได้สารที่มีลักษณะเป็น เจล ที่คล้ายยาสีฟัน มีความหนืดมากขึ้น เมื่อเทียบกับ alginate ไฮโดรเจล เนื้อสารจะเห็นเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับแต่งให้เป็นรูปทรงต่างๆได้ (ภาพที่ 19, 20) โครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำปลอดเชื้อแล้วจะถูกนำมาผสมกับสารละลายเซลล์กระดูกอ่อนในอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนนำไปปลูกถ่ายลงในหนูทดลอง (ภาพที่ 21)



ภาพที่ 18 การเกิดเจลจากการเชื่อมขวางระหว่างสารละลาย Alginate ที่ผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ (สีชมพู) และสารละลายแคลเซียม (ใส ไม่มีสี)

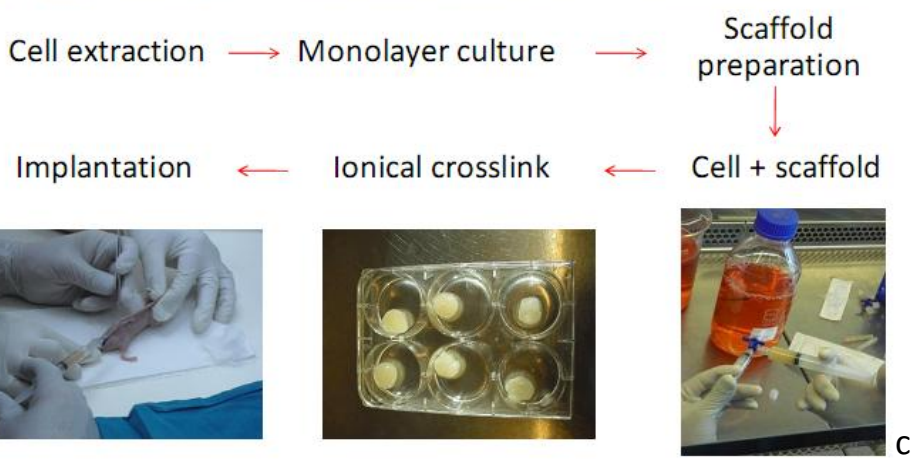


ภาพที่ 19 เมื่อผสม Alginate และ Gelfoam เข้าด้วยกัน แล้วนำไปเชื่อมขวางกับสารละลายแคลเซียม ได้โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีลักษณะเป็นเจลข้น เปลี่ยนรูปตามแรงกด

ภาพที่ 20 โครงเลี้ยงเซลล์จาก Alginate และ Gelfoam ที่ทำการปลอดเชื้อด้วย autoclave

a

b



c

ภาพที่ 21

a โครงเลี้ยงเซลล์ปลอดเชื้อ (ขวา) และ สารละลายเซลล์กระดูกอ่อนในอาหารเลี้ยงเซลล์ (ซ้าย) เตรียมพร้อมสำหรับการเชื่อมขวาง

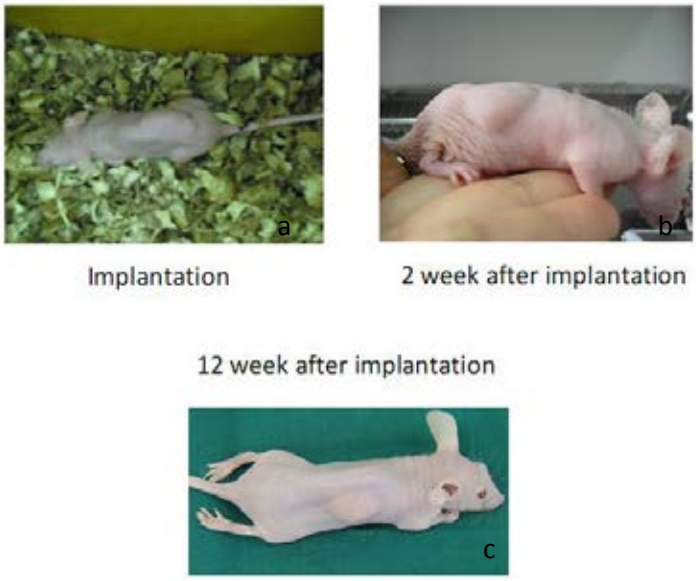
b การผสมเซลล์เข้ากับโครงเลี้ยงเซลล์ก่อนการเชื่อมขวาง

c ลำดับขั้นตอนการวิจัย

4.3 ผลการทดลองทางกายภาพ

4.3.1 การสังเกตหนูทดลองจากภายนอก

ในงานวิจัยนี้ ปลูกถ่ายลงในหนูทดลองจำนวน 8 ตัว ตัวละ 1 ชิ้นงาน เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ที่ 12 สัปดาห์ มีหนูทดลองตายไป 3 ตัว ไม่ทราบสาเหตุ ในสัปดาห์ที่ 2,3และ 6ของการทดลอง และมีหนู 1 ตัว ที่ชิ้นงานไม่เจริญและฝ่อไป หนูที่เหลืออีกสี่ตัว พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 2 สัปดาห์ ชิ้นงานที่ทำการปลูกถ่ายลงไป ซึ่งตอนแรกมีลักษณะเป็นเจล ยุบตัวได้เมื่อกดผ่านผิวหนังหนูทดลอง จะฟอร์มตัว คลำได้เป็นก้อนที่แข็งมากขึ้น คงรูป ไม่เปลี่ยนไปตามแรงกด แต่จะสังเกตได้ว่าชิ้นงานมีขนาดเล็กลงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับช่วงสัปดาห์แรก และเมื่อครบ 12 สัปดาห์ จะคลำชิ้นงานได้ลักษณะแข็ง และคงรูปมากขึ้น ไม่พบว่ามีปฏิกิริยาหรือการอักเสบขึ้นที่บริเวณผิวหนังของหนูทดลอง (ภาพที่ 22)

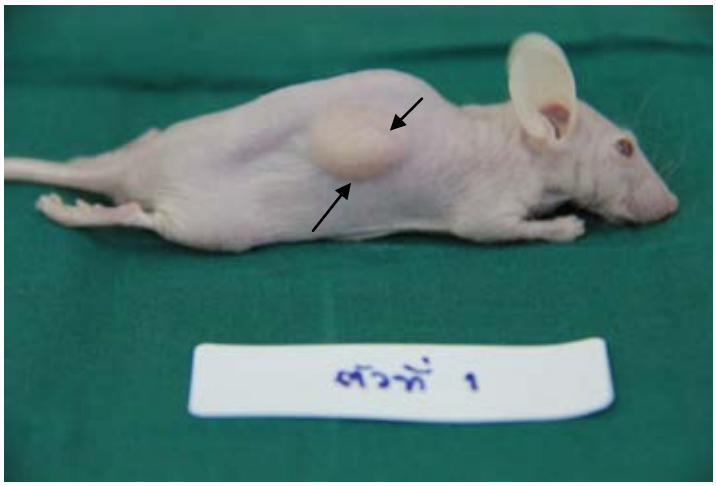


ภาพที่ 22 ภาพการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อลงในหนูทดลองที่ช่วงเวลาต่างๆ ชิ้นงานคงรูปได้ดีตลอดระยะเวลาการวิจัย

a. ทันทีหลังปลูกถ่ายชิ้นเนื้อ b. 2 สัปดาห์หลังปลูกถ่าย c. เมื่อสิ้นสุดการทดลอง

4.3.2 ลักษณะทางกายภาพของชิ้นงาน

ชิ้นงานที่ถูกนำออกมาจากสัตว์ทดลองทั้ง 4 ตัว หลังจากที่ปลูกถ่าย 12 สัปดาห์ พบว่าลักษณะชิ้นงานที่ได้มีสีเหลืองใส ครอบคลุมเนื้อที่ส่วนใหญ่ของชิ้นงาน มีพื้นที่ผิวบางส่วนของชิ้นงานมีสีออกขาวขุ่นคล้ายกับสีของกระดูกอ่อน ชิ้นงานมีความแข็งแต่หยุ่น และเปลี่ยนแปลงรูปร่างน้อยมากเมื่อออกแรงกด สามารถเลาะออกจากเนื้อเยื่อข้างเคียงได้ง่าย ไม่มีเนื้อเยื่อพังผืดยึดเกาะชิ้นงานกับเนื้อเยื่อหนูทดลอง สังเกตเห็นเส้นเลือดขนาดเล็กกระจายอยู่โดยรอบชิ้นงาน (ภาพที่ 23, 24)สำหรับ หนูทดลองตัวที่ 5 เนื้อเยื่อบริเวณที่ปลูกถ่ายเซลล์ลงไป มีลักษณะของ fibrous tissue ขึ้นปะปนอยู่กับชิ้นงาน สีเหลืองใสที่ไม่ได้ฟอร์มตัวเป็นก้อนอย่างชัดเจน บริเวณกึ่งกลางของชิ้นงานมีลักษณะเปื่อยยุ่ย



ภาพที่ 23 เส้นเลือดขนาดเล็ก กระจายทั่วไปบนชิ้นงาน สังเกตได้จากผิวหนังของหนูทดลอง (ลูกศร)

ภาพที่ 24 ลักษณะเนื้อเยื่อที่เกิดขึ้นเมื่อครบ 12 สัปดาห์ สังเกตเห็นเส้นเลือดอยู่ทั่วไป (ลูกศร)

S : ผิวหนังปกติของหนูทดลอง

4.3.3 ชั่งน้ำหนักของชิ้นงานที่ได้หลังจากทำการทดลอง

เปรียบเทียบกับน้ำหนักเฉลี่ยของชิ้นงานก่อนการทดลอง เนื่องจากในการทดลองสารผสม (mixture) ระหว่าง โครงเลี้ยงเซลล์ และเซลล์ จะต้องผ่านการฆ่าเชื้อ จะไม่สามารถนำไปทำการชั่งน้ำหนักได้ จึงดัดแปลงการหาน้ำหนักเฉลี่ยของชิ้นงานก่อนทำงานปลูกถ่ายด้วยการทำโครงเลี้ยงเซลล์ ในลักษณะเดียวกันขึ้น 8 ชิ้น แล้วนำไปชั่งน้ำหนักเพื่อหาค่าเฉลี่ยของน้ำหนักที่จะนำใช้มาเปรียบเทียบได้ โดยหาค่าเฉลี่ยของน้ำหนัก ได้ 1.074 กรัม และน้ำหนักของชิ้นงานที่ได้หลังนำออกจากหนูทดลอง พบว่าน้ำหนักของชิ้นงานลดลงเฉลี่ยประมาณ 37% เป็นดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงน้ำหนักของชิ้นงาน และ เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักที่ลดลงระหว่างการทดลอง

(หมายเหตุ:ชิ้นงานจากหนูตัวที่ 5 ฝ่อไปไม่สามารถนำไปคำนวณได้)

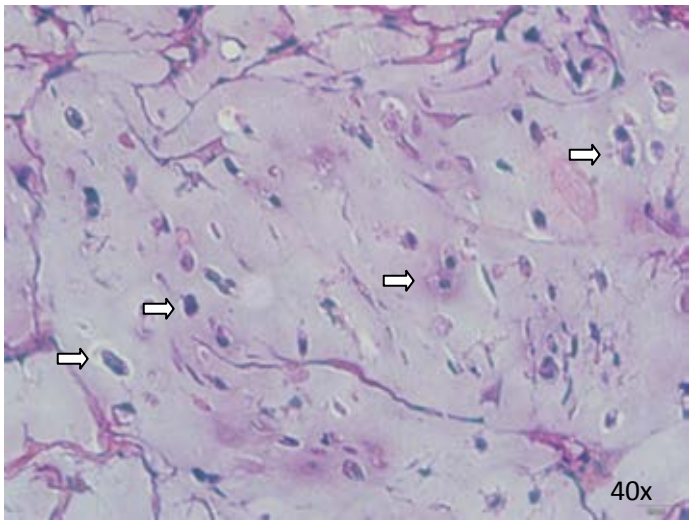
ชิ้นงาน	น้ำหนัก (กรัม)	% loss
หนูตัวที่ 1	0.689	35.85
หนูตัวที่ 2	0.641	40.32
หนูตัวที่ 3	0.677	36.96
หนูตัวที่ 4	0.695	35.29
หนูตัวที่ 5	-	-
เฉลี่ย	0.676	37.11

4.4 การตรวจสอบชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา

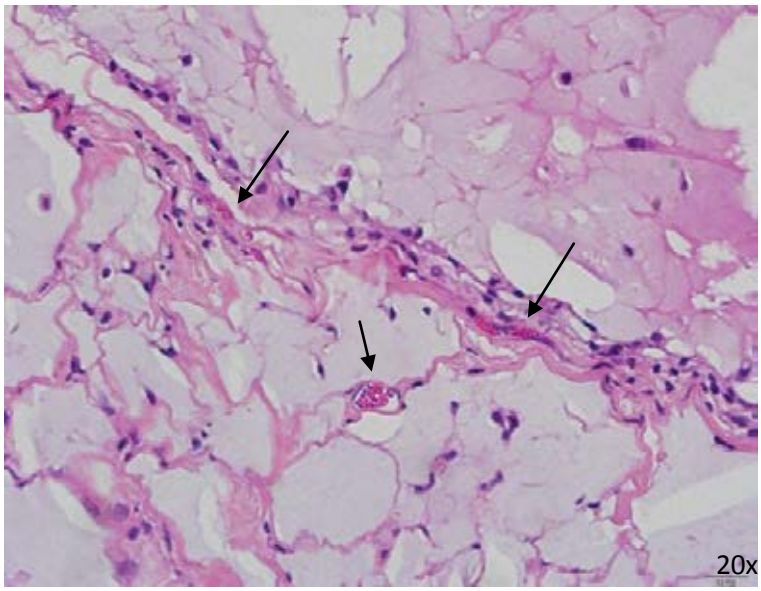
4.4.1 การย้อม Hematoxcilin and Eosin (H&E)

เมื่อนำไปย้อมสี Hematoxcilin and Eosin เพื่อดูลักษณะทางพยาธิวิทยาพบว่ามีลักษณะของ เซลล์กระดูกอ่อนที่เจริญเต็มที่ (mature) เกิดขึ้น (ภาพที่ 25) โดยเห็นเซลล์รูปร่างกลม มีช่องว่างอยู่ รอบเซลล์ (lacuna) มีบางส่วนที่อยู่ร่วมกันเป็นคู่ หรือเป็นกลุ่ม นอกจากนี้ยังมีส่วนของ เซลล์กระดูกอ่อนที่ยังเจริญไม่เต็มที่ (immature) กระจายอยู่ทั่วไป พบเส้นเลือดสร้างขึ้น แทรกตัวอยู่โดยรอบของ เนื้อเยื่อ ที่สร้างขึ้นใหม่ (ภาพที่ 26) และไม่พบ เซลล์อักเสบ (inflammatory cell) (ภาพที่ 27)

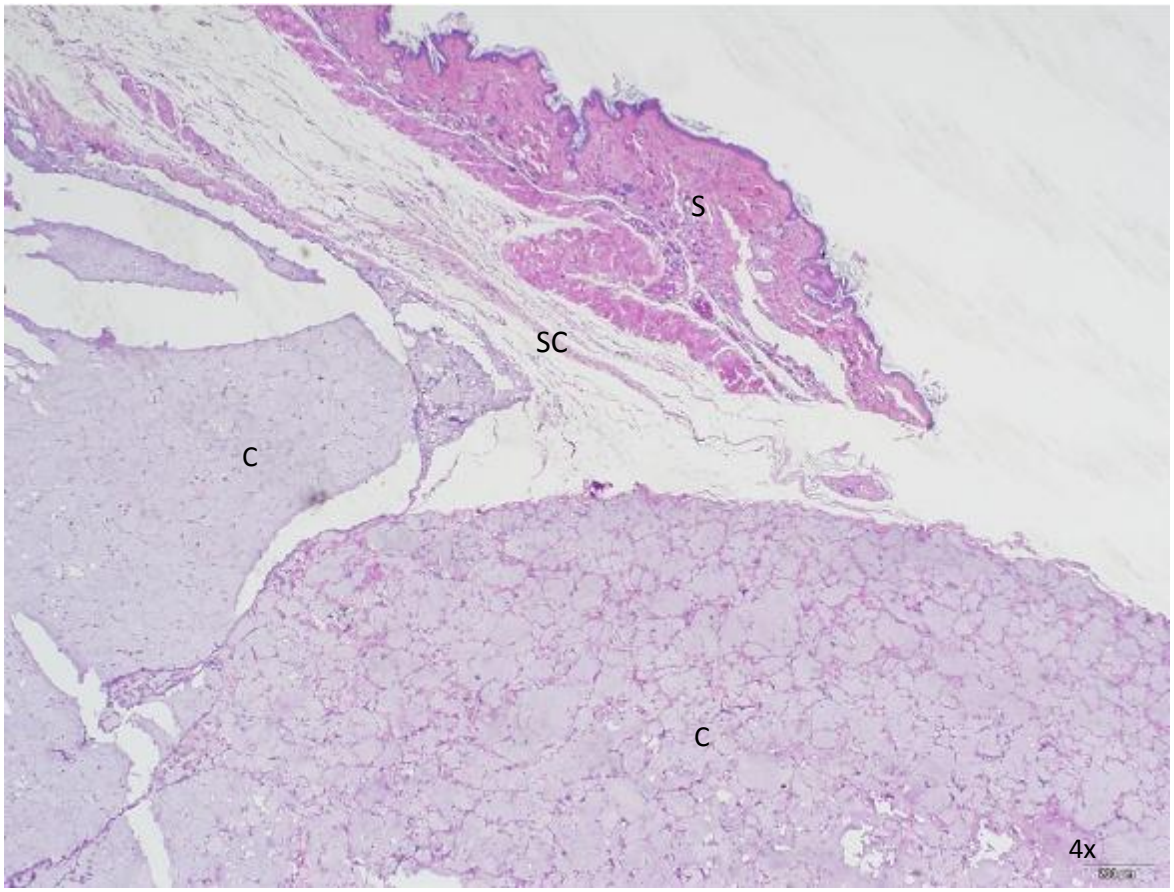
โครงเลี้ยงเซลล์ ที่มองด้วยตาเปล่าเห็นเป็นเนื้อเดียวกัน เมื่อย้อมสี แล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่า มีเส้นใยของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ยังสลายไปไม่สมบูรณ์ ย้อมติดสีชมพูเข้ม แทรกตัวอยู่อย่างสม่ำเสมอในชิ้นงาน และ alginate เป็นพื้นย้อมติดสีชมพูอ่อน (ภาพที่ 28)



ภาพที่ 25 เซลล์กระดูกอ่อนที่เจริญเต็มที่อยู่ใน lacuna กระจายตัวสม่ำเสมอ (ลูกศร) (กำลังขยาย 40 เท่า)

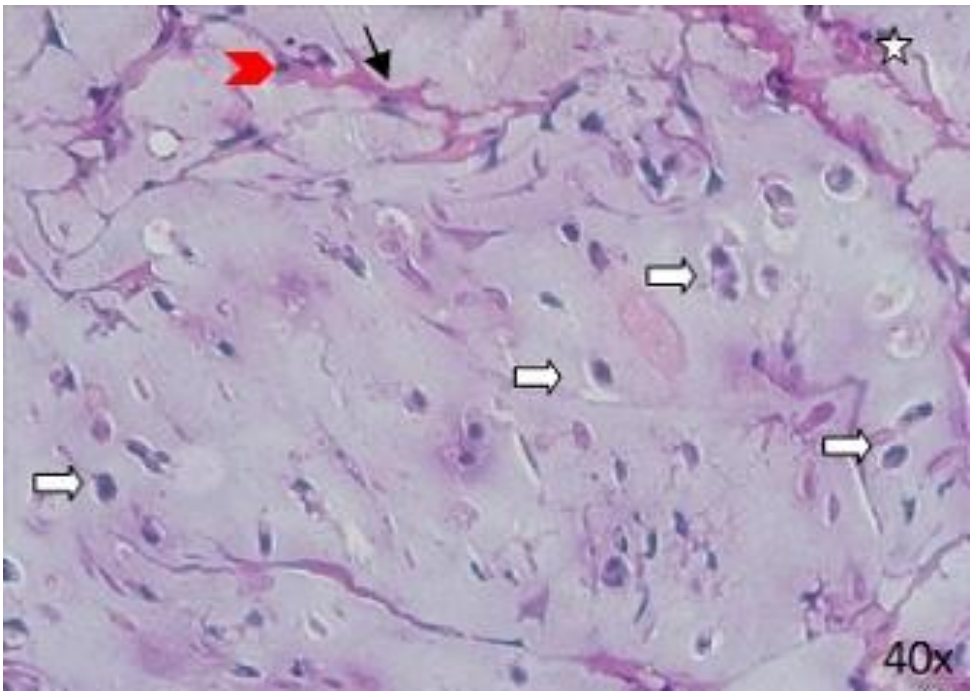


ภาพที่ 26 เส้นเลือดที่กระจายอยู่ทั่วไปในชิ้นงาน (ลูกศร) (กำลังขยาย 20 เท่า)



ภาพที่ 27 เซลล์กระดูกอ่อน กระจายตัวอยู่อย่างสม่ำเสมอ ในชั้นใต้ผิวหนังของหนูทดลอง และไม่พบเซลล์อักเสบ หรือปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อข้างเคียง

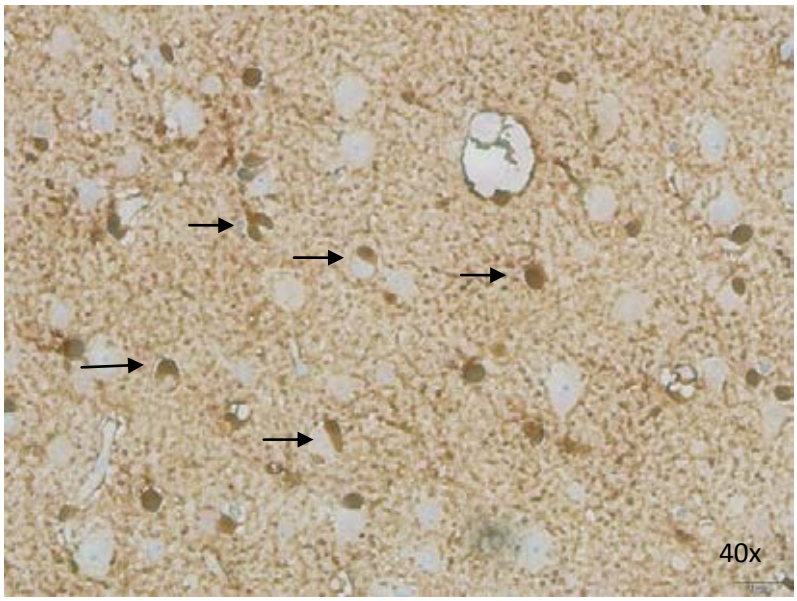
S : ชั้นผิวหนังของหนูทดลอง C : ชิ้นงาน SC : ชั้นใต้ผิวหนัง (กำลังขยาย 4 เท่า)



ภาพที่ 28 ชิ้นงานที่กำลังขยาย 40 เท่า มีลักษณะคล้ายกับเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนตามธรรมชาติ พบ เซลล์กระดูกอ่อนเจริญเต็มที่ (ลูกศรสีขาว) เซลล์กระดูกอ่อนที่ไม่เจริญ (ลูกศรสีแดง) โครงเลี้ยงเซลล์ที่ยังสลายไม่สมบูรณ์ (ลูกศรสีดำ) และ เส้นเลือด (รูปดาว)

4.4.2 การย้อมด้วย แอนติบอดี S-100 โปรตีน

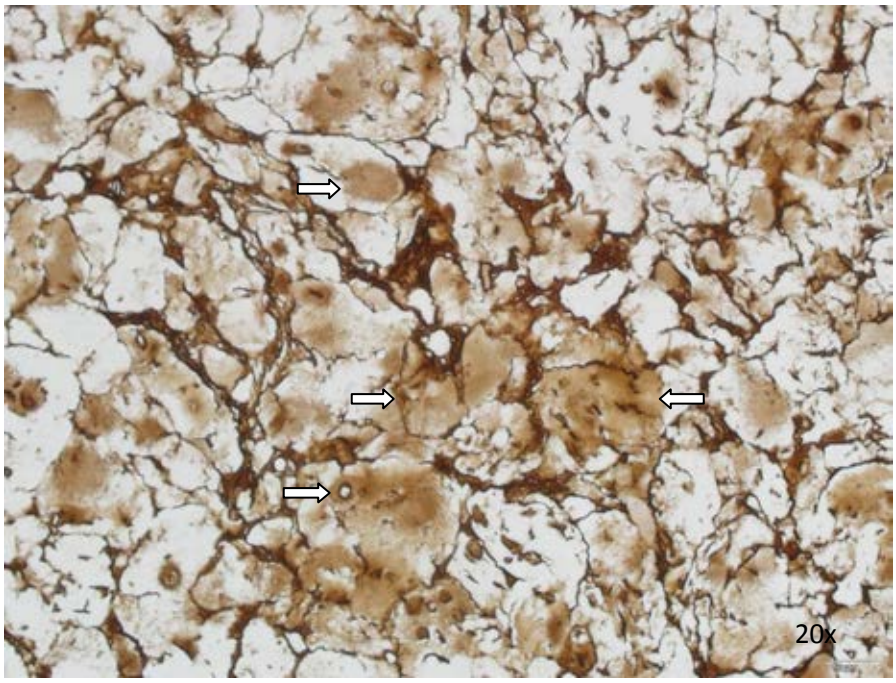
เนื้อเยื่อที่ได้ เมื่อนำมาย้อมด้วย แอนติบอดีของ S-100 โปรตีน พบว่าให้ผลบวก โดยสังเกตได้จากการย้อมติดสีน้ำตาลเข้ม ที่บริเวณนิวเคลียสของเซลล์ (ภาพที่ 29)



ภาพที่ 29 การย้อมแอนติบอดีต่อ S 100 protein ให้ผลบวก โดยสังเกตได้จากการย้อมติดสีน้ำตาลเข้ม ที่บริเวณนิวเคลียสของเซลล์(ลูกศร) (กำลังขยาย 40 เท่า)

4.4.3 การย้อมด้วยแอนติบอดี ของคอลลาเจนชนิดที่ 2

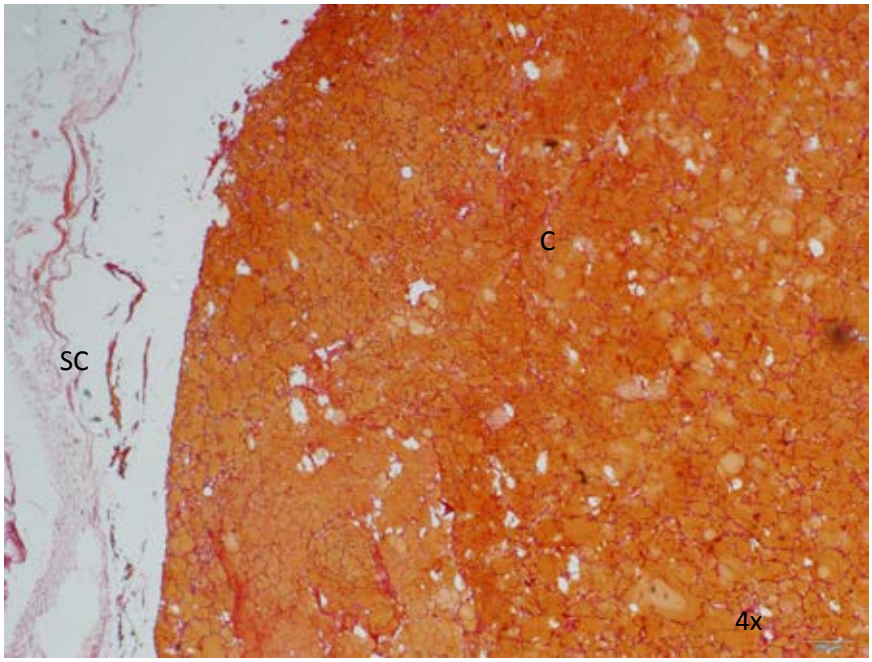
เนื้อเยื่อที่ได้ เมื่อนำมาย้อมด้วยแอนติบอดีของคอลลาเจนชนิดที่ 2 พบว่าให้ผลบวก โดยจะติดสีน้ำตาลเข้มรอบเซลล์ และพบเห็นได้อย่างสม่ำเสมอในสารประกอบภายนอกเซลล์ (ภาพที่ 30)



ภาพที่ 30 การย้อมแอนติบอดีต่อคอลลาเจนชนิดที่ 2 ให้ผลบวก โดยสังเกตได้จากการย้อมติดสีน้ำตาลเข้ม ที่บริเวณสารประกอบภายนอกเซลล์ (ลูกศร) (กำลังขยาย 20 เท่า)

4.4.4 การย้อมด้วย Safarin-O

เนื้อเยื่อที่ได้ มีส่วนประกอบของ GAG ซึ่งย้อมติดสีส้มแดงในสารประกอบภายนอกเซลล์(ภาพที่ 31)



ภาพที่ 31 การย้อม safranin O ให้ผลบวก โดยสังเกตได้จากการย้อมติดสีส้มแดง ที่บริเวณสารประกอบภายนอกเซลล์ (C) เปรียบเทียบกับตำแหน่งเนื้อเยื่อชั้นใต้ผิวหนัง (SC)

(กำลังขยาย 4 เท่า)

ในการทดลองในครั้งนี้ มีระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสัตว์ทดลอง 12 สัปดาห์ เนื้อเยื่อที่ถูกสร้างขึ้นใหม่จึงมีลักษณะเป็นเนื้อเยื่อที่ไม่สมบูรณ์มาก เมื่อเทียบกับการศึกษาก่อนหน้า แต่จากผลตรวจทาง พยาธิวิทยา พบว่ามีลักษณะ เซลล์กระดูกอ่อนที่เจริญเต็มที่ อยู่ใน lacuna คล้ายกับใน hyaline cartilage ตามธรรมชาติ เป็นการยืนยันว่า โครงเลี้ยงเซลล์ ที่ ผลิตมาจาก alginate ร่วมกับ gelfoam ให้สิ่งแวดล้อม ที่เหมาะสมต่อเซลล์กระดูกอ่อน สามารถนำมาศึกษาต่อเนื่องเพื่อนำไปใช้ ในงาน วิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน โดยเฉพาะเพื่อการนำไปใช้รักษาคนไข้ทางคลินิก

จุดเด่นของการเลือกใช้สารทั้งสองชนิดคือ alginate เป็นพอลิเมอร์ ที่ถูกรับรอง โดย องค์การอาหารและยา ของประเทศสหรัฐอเมริกา และ สหภาพยุโรป ว่าสามารถนำมาใช้ในคนได้อย่างปลอดภัย ส่วน gelatin sponge หรือ gelfoam ที่นำมาใช้ในการทดลองนี้ก็เป็นวัสดุทางการแพทย์ที่ใช้มาอย่างยาวนาน เพื่อช่วยในการห้ามเลือดในระหว่างผ่าตัด โดยไม่มีปฏิกิริยาตอบสนอง (tissue reaction) ที่รุนแรง การนำสารทั้งสองมาผสมกัน ไม่ได้เปลี่ยนแปลงคุณสมบัติ ดั้งเดิมของ สาร ไป เพราะ มีการ ค้นคว้า วิจัย [28] เกี่ยวกับการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน โดยใช้สารทั้งสองชนิด เมื่อนำ alginate ไฮโดรเจล มาผสมเป็นเนื้อเดียวกับ gelfoam ทำให้ได้ โครงเลี้ยงเซลล์ ที่มีคุณสมบัติที่เหลว ในรูปแบบเจล แต่ยังมีความหนืด ยืดหยุ่ นตัวได้ดีขึ้น รวมถึงคุณสมบัติเรื่องรูพรุนของ gelfoam จะช่วยลดข้อด้อยของ alginate ไฮโดรเจล ซึ่งเป็น โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีความพรุนต่ำ เกิดเป็น โครงเลี้ยงเซลล์ ชนิดใหม่ ซึ่งคล้ายคลึงกับเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน ธรรมชาติ [29] ที่มีลักษณะเป็น ไฮโดรเจล องค์ประกอบที่เป็นน้ำเป็นส่วนใหญ่ และมีเส้นใยของ เจลาติน ที่คล้ายคลึงกับเส้นใยคอลลาเจน ในสารประกอบภายนอกเซลล์ ทำหน้าที่รับส่งสัญญาณระหว่างเซลล์กระดูกอ่อน กับสิ่งแวดล้อมที่มากระตุ้น นอกจากนี้ สามารถนำไปใช้ในรูปแบบ โครงเลี้ยงเซลล์สำหรับฉีด (injectable) ได้ [17, 30] ซึ่งเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ ที่ เข้ารูป (fit) ได้กับ defect ทุกรูปร่าง และสามารถปรับแต่ง (mold) ให้อยู่ในรูปร่างตามที่ต้องการได้เป็นอย่างดี และความพรุนที่เหมาะสมก็เอื้อในการแลกเปลี่ยน น้ำ อาหาร แลกเปลี่ยนของเสีย ให้กับเซลล์ทำให้กระตุ้นกระบวนการ เมตาบอลิซึมต่างๆ ของเซลล์ เกิดขึ้นได้ใกล้เคียงกับในธรรมชาติมากที่สุด[31]

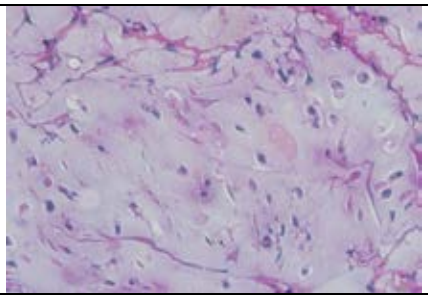
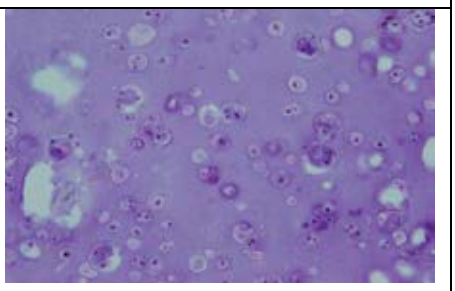
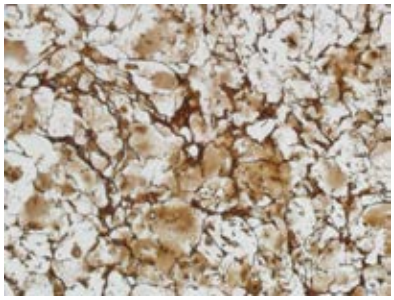
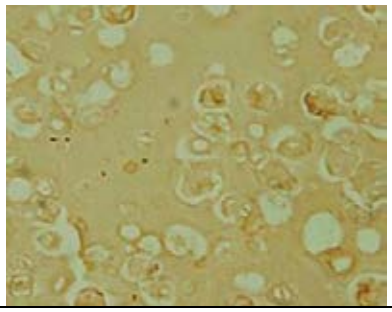
ดังนั้นโครงเลี้ยงเซลล์ ที่ผลิตขึ้นใหม่นี้ น่าจะช่วยส่งเสริมการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนได้เป็นอย่างดี และปลอดภัยเมื่อนำมาใช้ในผู้ป่วย

Dobratz EJ. [32] ได้ทำการศึกษา เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนมนุษย์ ในหนูทดลอง โดยใช้ Alginate hydrogel injectable scaffold เมื่อปลูกถ่ายลงไปในตัวหนูทดลอง ประมาณ 38 สัปดาห์ ได้เนื้อเยื่อที่มี ลักษณะเหมือนกระดูกอ่อน และเมื่อทดสอบดูด้าน พยาธิวิทยา และสารชีวเคมี พบว่า ได้เป็นคอลลาเจนชนิดที่ II จริง สรุปเนื้อเยื่อที่ได้เป็นกระดูกอ่อนที่มีลักษณะสมบูรณ์ ในการทดลองดังกล่าวมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษา scaffold ที่มีลักษณะ hydrogel สามารถฉีดเข้าในรอยโรค บริเวณที่เป็น defect และสามารถ) ปรับรูปให้ขึ้นงานอยู่ในรูปร่างต่างๆตามต้องการ (ภาพที่ 32) โดยหวังผลนำไปศึกษาต่อยอดในงานศัลยกรรมตกแต่ง ซึ่งคล้ายคลึงกับวัตถุประสงค์ของงานวิจัยครั้งนี้ ที่จะศึกษาเพื่อคิดค้นหาโครงเลี้ยงเซลล์ ที่เหมาะกับ defect ในกระดูกอ่อนผิวข้อ

ภาพที่ 32 เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่เกิดขึ้นหลังการเพาะเลี้ยงในชั้นใต้ผิวหนังของหนูทดลองจากงานวิจัยของ Dobratz EJ

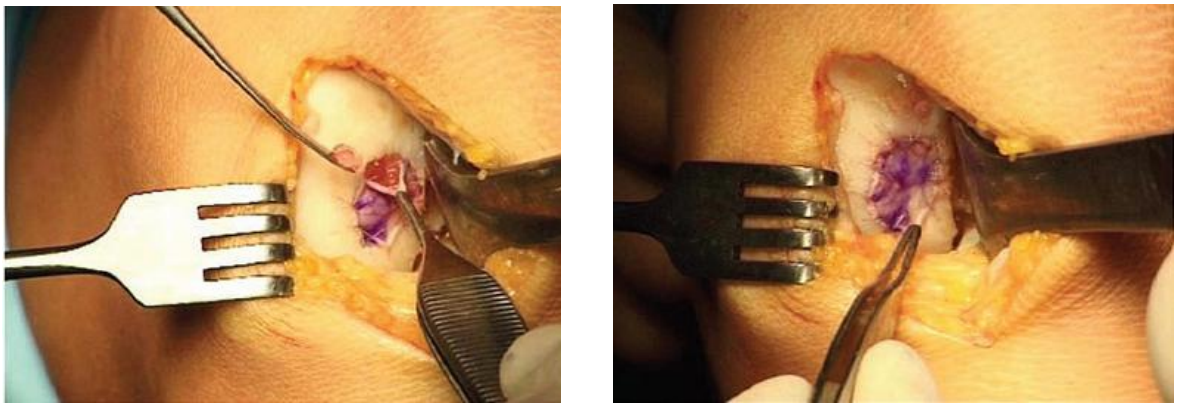
เมื่อนำมาเปรียบเทียบกันระหว่างงานวิจัย มีความแตกต่างกันดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 การเปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างงานวิจัยนี้ และงานวิจัยของ Dobratz EJ

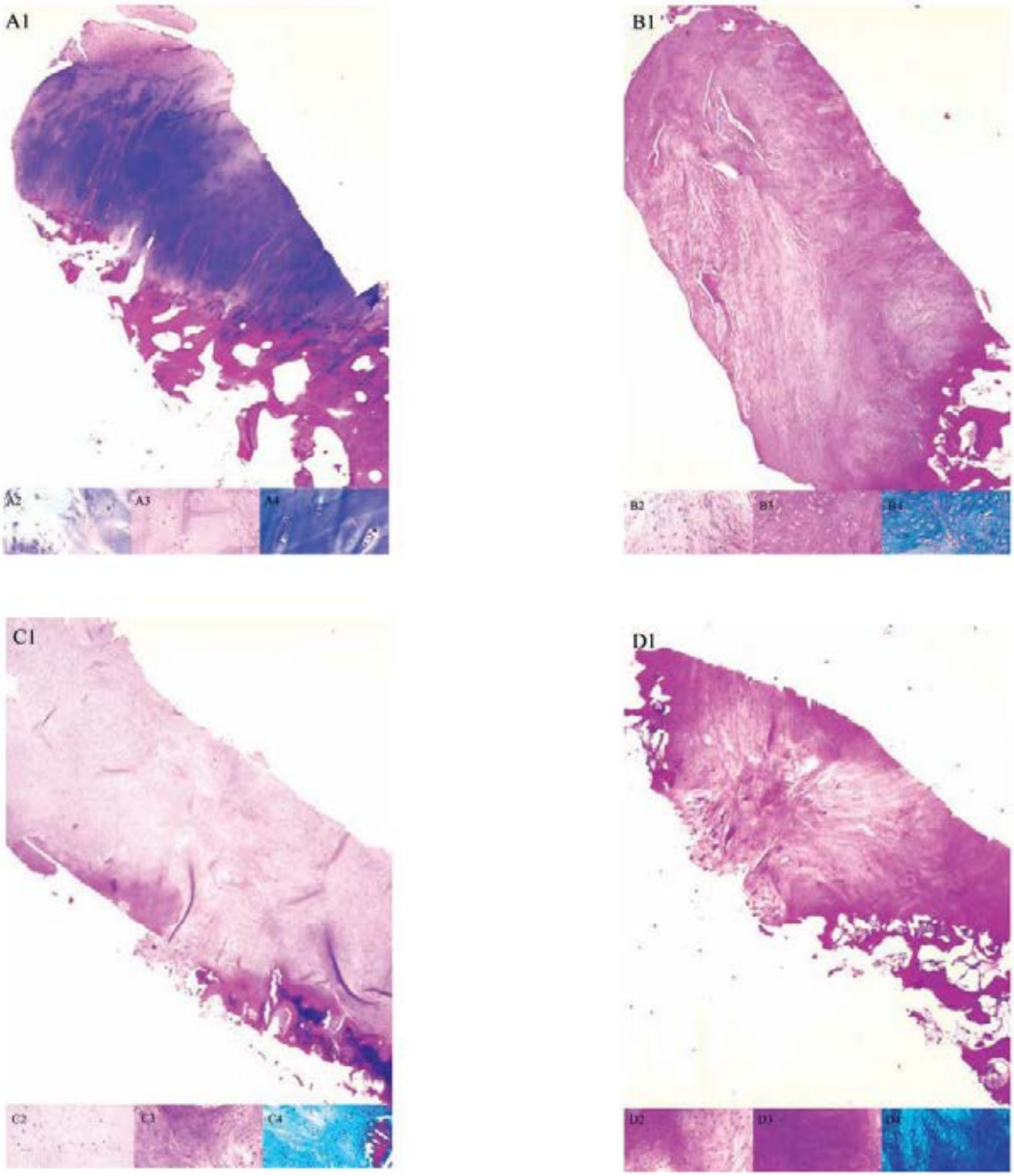
รายละเอียด	**งานวิจัยนี้**	**งานวิจัยของ Dobratz EJ**
ระยะเวลาที่ปลูกถ่าย	12 สัปดาห์	38 สัปดาห์
จำนวนชิ้นงาน	4	14
เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่นำมาสกัดเซลล์	Articular cartilage	Nasal cartilage
จำนวนเซลล์ ต่อ scaffold 1 มล.	20×10^6	20×10^6
อาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์	DMEM F-12	DMEM
ลักษณะ ทาง Histology		
Immunohistochemistry	Collagen type II 	Collagen type II 

งานวิจัยทางคลินิก โดยการใช้ alginateไฮโดรเจล เพื่อรักษา การบาดเจ็บของกระดูกอ่อนผิวข้อ ก็มีการเผยแพร่ออกมาเป็นระยะ ในปี 2009 Almqvist K. และคณะ ได้ ทำการรักษาผู้ป่าย 21 ราย ที่ได้รับการบาดเจ็บต่อกระดูกอ่อนผิวข้อบริเวณข้อเข่า และมี defect ด้วยวิธี Autologous Chondrocyte Implantation (ACI) โดยใช้ alginate bead hydrogel scaffold (ภาพที่ 33) และติดตามการรักษาไปเป็นเวลา 2 ปี พบว่า ผู้ป่วยกลับมาใช้งานข้อเข่าได้ใกล้เคียงปกติ โดยประเมินจากการให้คะแนนความเจ็บปวดจากการใช้งานของข้อเข่า (visual analog score) และ คะแนนความสามารถในการใช้ข้อเข่าในชีวิตประจำวัน (Western Universities Osteoarthritis Ontario and McMaster Index : WOMAC score)

อย่างไรก็ดี จากรายงานนี้ พบว่าเมื่อทำการนำตัวอย่างเนื้อเยื่อในตำแหน่งที่ได้รับการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ พบว่า ยังมีลักษณะของ fibrocartilage อยู่ในระดับที่ค่อนข้างมาก (ภาพที่ 34) และด้วยวิธีการผ่าตัดที่ต้อง เปิดแผลขนาดใหญ่บริเวณข้อเข่า เพื่อนำ alginate bead เข้าไปใส่ใน defect แล้วใช้ เยื่อหุ้มกระดูกเย็บ หุ้มรอยโรคไว้ เหล่านี้ เป็นข้อเสียของเทคนิคการรักษาแบบดั้งเดิม ผู้ป่วยมีความเจ็บปวดจากแผลผ่าตัดและมีโอกาสทำให้ข้อเกิดการติดแข็ง (stiff)



ภาพที่ 33 การรักษาภาวะบาดเจ็บข้อเข่าด้วยวิธี ACI โดยใช้ Alginate ไฮโดรเจล จากการศึกษาของ Almqvist K. และคณะ



ภาพที่ 34 ผลการตรวจเนื้อเยื่อที่สร้างใหม่จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาภาวะบาดเจ็บข้อเข่าด้วยวิธี ACI โดยใช้ Alginate ไฮโดรเจล จากการศึกษาของ Almqvist K. และคณะ พบว่ามี hyaline cartilage ปะปนกับ fibrocartilage

จากงานวิจัยนี้ ที่เวลา 12 สัปดาห์ เนื้อเยื่อที่ปลูกถ่ายลงในหนูทดลอง มีขนาดเล็กลงเมื่อเทียบกับสัปดาห์แรก และมีความแข็งมากขึ้นคลำได้ชัดเจนหลังจากสัปดาห์ที่สอง บ่งบอกว่าเซลล์น่าจะมีการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนเกิดขึ้น และ ชิ้นงาน ยังคงสภาพได้ดี ไม่มีปฏิกิริยาการอักเสบเกิดขึ้นที่ผิวหนังของหนูทดลอง

เมื่อนำชิ้นงานที่ได้มาชั่งน้ำหนักเปรียบเทียบกับน้ำหนักเฉลี่ยของ โครงเลี้ยงเซลล์ พบว่าน้ำหนักเมื่อสิ้นสุดการทดลองลดลง เฉลี่ย 37.11 % ซึ่งอธิบายจากน้ำหนักเริ่มแรก โครงเลี้ยงเซลล์ จะมีน้ำเป็นองค์ประกอบจำนวนมาก เมื่อเวลาผ่านไป สัดส่วนของน้ำลดลงเนื่องจากการแพร่เข้าออกของน้ำตามธรรมชาติของร่างกายสัตว์ทดลอง ร่วมกับ การย่อยสลายของ เจลาติน ซึ่งจะถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ เมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 4 สัปดาห์ รวมถึงการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ที่ยังเกิดไม่สมบูรณ์เนื่องจากมีเซลล์บางส่วนไม่เจริญเติบโตเต็มที่ ซึ่งตามทฤษฎี เซลล์ดังกล่าวจะไม่สามารถผลิตสารประกอบภายนอกเซลล์ได้ ประเด็นนี้มีความสำคัญที่จะต้องนำไปศึกษาต่อเนื่องเกี่ยวกับสัดส่วนที่เหมาะสมระหว่าง alginate และgelfoam หากนำไปใช้ในการรักษาผู้ป่วยด้วยวิธี ปลูกถ่ายเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนให้ได้ผลสำเร็จและไม่เกิดภาวะแทรกซ้อนในการรักษา

การที่มีเซลล์บางส่วนไม่เจริญเติบโตและมีการ dedifferentiate ไปนั้น เป็นไปได้จากหลายสาเหตุ คือ การเพาะเลี้ยงเซลล์ในห้องทดลองในช่วงแรกนั้น ใช้เวลานาน และเพาะเลี้ยงหลาย passage ซึ่งเป็นข้อด้อยของการเลือกใช้เซลล์กระดูกอ่อนในการวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน รวมถึงวิธีการเพาะเลี้ยงภายในร่างกายโดยใช้รูปแบบของการฝังในชั้นใต้ผิวหนังหนูทดลอง ที่แม้ว่าจะให้สิ่งแวดล้อมทางด้านชีวภาพที่ดี แต่การควบคุมด้านสิ่งแวดล้อมเชิงกล (mechanical environment) ยังไม่เหมาะสมเพียงพอเมื่อเทียบกับสิ่งแวดล้อมเชิงกลที่เกิดในข้อต่อตามธรรมชาติ

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

โครงเลี้ยงเซลล์ รูปแบบไฮโดรเจล ที่ผลิตจาก alginate/gelfoam มีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม สำหรับการเพาะเลี้ยง เซลล์กระดูกอ่อน สามารถคงฟีโนไทป์ของเซลล์ โดยการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ 2 และ GAG เกิดเนื้อเยื่อที่มีคุณสมบัติคล้าย กระดูกอ่อนชนิด hyaline และเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ ชนิดที่นำมาใช้ในรูปแบบฉีดได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากผลการวิจัย พบว่าชิ้นงานมีการหดตัวเล็กลงและมีน้ำหนักลดลง จึงควรมีการศึกษาต่อเนื่องเพื่อหาสัดส่วนที่พบเหมาะระหว่าง พอลิเมอร์ ทั้ง 2 ชนิด และศึกษาเพื่อพัฒนาเทคนิคในการ เชื่อมขวาง ให้ เกิดเจล ที่มีความเหมาะสมยิ่งขึ้นในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน

5.3 งานวิจัยต่อไปในอนาคต

5.3.1 ศึกษา เกี่ยวกับค่าความแข็งแรงของเนื้อเยื่อที่ได้จากการเพาะเลี้ยง เปรียบเทียบกับ เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนธรรมชาติ

5.3.2 ศึกษาเทคโนโลยีในการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ ด้วยสัดส่วนของพอลิเมอร์ที่เหมาะสม ที่จะไม่ลดขนาดของชิ้นงานเมื่อปลูกถ่าย

5.3.3 ศึกษาเพื่อยืนยันความปลอดภัยต่อร่างกาย เมื่อใช้โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตขึ้น เช่นการเกิดปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อเนื่องจากในการศึกษาครั้งนี้ใช้หนูทดลอง เป็นnude mice

5.3.4 ศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์เพื่อนำไปใช้ในการรักษาผู้ป่วยทางคลินิก

รายการอ้างอิง

[1] Poole, C.A. Articular cartilage chondrons: Form, function and failure. *Journal of Anatomy,* 1997. 191(1): p. 1-13.

[2] Hunziker, E.B. Articular cartilage repair: Basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2002. **10**(6): p. 432-463.

[3] Redman, S.N., et al. Current strategies for articular cartilage repair. *European Cells and Materials*, 2005. **9**: p. 23-32.

[4] Hunziker, E.B. and L.C. Rosenberg Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane. *J Bone Joint Surg Am*, 1996. **78**(5): p. 721-33.

[5] Brittberg, M., et al. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. N Engl J Med, 1994. **331**(14): p. 889-95.

[6] Gikas, P.D., et al. An overview of autologous chondrocyte implantation. *Journal of Bone and Joint Surgery - Series B*, 2009. **91**(8): p. 997-1006.

[7] Chiang, H. and C.C. Jiang Repair of articular cartilage defects: review and perspectives. *J Formos Med Assoc*, 2009. **108**(2): p. 87-101.

[8] Chung, C. and J.A. Burdick Engineering cartilage tissue. *Adv Drug Deliv R*ev, 2008. **60**(2): p. 243-62.

[9] Vinatier, C., et al. Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors. *Trends in Biotechnology*, 2009. **27**(5): p. 307-314.

[10] Awad, H.A., et al. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. Biomaterials, 2004. **25**(16): p. 3211-22.

[11] Stoop, R. Smart biomaterials for tissue engineering of cartilage. *Injury*, 2008. **39**(1 SUPPL.): p. 77-87.

[12] Yamaoka, H., et al.Cartilage tissue engineering using human auricular chondrocytes embedded in different hydrogel materials. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 2006. **78**(1): p. 1-11.

[13] Kessler, M.W. and D.A. Grande Tissue engineering and cartilage. *Organogenesis*, 2008. **4**(1): p. 28-32.

[14] Gaissmaier, C., J.L. Koh, and K. Weise, Growth and differentiation factors for cartilage healing and repair. *Injury*, 2008. **39**(1 SUPPL.): p. 88-96.

[15] Wan, L.Q., et al. Calcium Concentration Effects on the Mechanical and Biochemical Properties of Chondrocyte-Alginate Constructs. *Cell Mol Bioeng*, 2008. **1**(1): p. 93-102.

[16] Kuo, C.K. and P.X. Ma Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. *Biomaterials*, 2001. **22**(6): p. 511-21.

[17] Paige, K.T., et al. De Novo Cartilage Generation Using Calcium Alginate-Chondrocyte Constructs. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 1996. **97**(1): p. 168-178.

[18] Guo, J.F., G.W. Jourdian, and D.K. MacCallum Culture and growth characteristics of chondrocytes encapsulated in alginate beads. *Connect Tissue Res*, 1989. **19**(2-4): p. 277-97.

[19] Gerard, C., et al. The effect of alginate, hyaluronate and hyaluronate derivatives biomaterials on synthesis of non-articular chondrocyte extracellular matrix. *J Mater Sci Mater Med*, 2005. **16**(6): p. 541-51.

[20] Pound, J.C., et al. An ex vivo model for chondrogenesis and osteogenesis. *Biomaterials*, 2007. **28**(18): p. 2839-2849.

[21] Pabbruwe, M.B., et al. Induction of cartilage integration by a chondrocyte/collagen-scaffold implant. *Biomaterials*, 2009. **30**(26): p. 4277-4286.

[22] Rohanizadeh, R., M.V. Swain, and R.S. Mason Gelatin sponges (Gelfoam) as a scaffold for osteoblasts. *Journal of Materials Science: Materials in Medicin*e, 2008. **19**(3): p. 1173-1182.

[23] Liu, X. and P.X. Ma Phase separation, pore structure, and properties of nanofibrous gelatin scaffolds. *Biomaterials*, 2009. **30**(25): p. 4094-4103.

[24] Henson, F.M.D. and T. Vincent Chondrocyte outgrowth into a gelatin scaffold in a single impact load model of damage/repair - Effect of BMP-2. *BMC Musculoskeletal Disorders,* 2007. **8**.

[25] Chang, C.H., et al. Gelatin-chondroitin-hyaluronan tri-copolymer scaffold for cartilage tissue engineering. *Biomaterials, 2003*. **24**(26): p. 4853-4858.

[26] Stanton, J.S., et al. The growth of chondrocytes using Gelfoam as a biodegradable scaffold. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 1995. **6**(12): p. 739-744.

[27] Tan, H., et al. Gelatin/chitosan/hyaluronan scaffold integrated with PLGA microspheres for cartilage tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 2009. **5**(1): p. 328-337.

[28] Fisher, J.P., et al. Thermoreversible hydrogel scaffolds for articular cartilage engineering. J*ournal of Biomedical Materials Research - Part A*, 2004. **71**(2): p. 268-274.

[29] Shieh, A.C. and K.A. Athanasiou Principles of cell mechanics for cartilage tissue engineering. *Annals of Biomedical Engineering*, 2003. **31**(1): p. 1-11.

[30] Yun, K. and H.T. Moon Inducing Chondrogenic Differentiation in Injectable Hydrogels Embedded with Rabbit Chondrocytes and Growth Factor for Neocartilage Formation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2008. **105**(2): p. 122-126.

[31] Iwasa, J., et al. Clinical application of scaffolds for cartilage tissue engineering. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 2009. **17**(6): p. 561-577.

[32] Dobratz, E.J., et al. Injectable cartilage: using alginate and human chondrocytes. *Arch Facial Plast Surg*, 2009. **11**(1): p. 40-7.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

รายชื่อ, หมายเลขผลิตและแหล่งผลิตของสารเคมีที่ใช้

สารเคมีที่นำมาใช้ในการทดลองนั้น ได้มาจากแหล่งต่างๆ และมีหมายเลขสารเคมี (Catalog Number) ดังแสดงในตารางที่ ก. 1

ตารางที่ ก. 1 รายชื่อ, หมายเลขผลิตและแหล่งผลิตของสารเคมีที่ใช้

สารเคมี	ผู้ผลิต	Cat. No.
Acetic Acid (Glacial)	APS Finechem, Seven Hills, Australia	1-2.5L GL
Antibiotic (L- Glutamine /Penicillin/Streptomycin)[1]	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	G1146
Calcium Chloride	APS Finechem, Seven Hills, Australia	127-500G
Cloxa M.H.	M&H Manufacturing, Thailand	-
Collagenase Type II[3]	Invitrogen Corp., Auckland, NZ	17101-015
70% Ethanol	ฝ่ายเภสัชกรรม โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์	-
DMEM F-12	Hyclone , USA	
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), Trisodium salt	Sigma-Aldrich, St Louis, USA	
Fetal Bovine Serum (FBS)	Invitrogen Corp., Paisley, UK	10086-148
Fibroblast Growth Factor (FGF)	Sigma-Aldrich, St. Louise, USA	F0291
Gentamycin	M&H Manufacturing, Thailand	-
Gelfoam ยี่ห้อ Spongostan®	Johnson and Johnson, USA	
Magnesium Chloride hexahydrate	Carlo Erba, Italy	459337
Normal Saline Solution	General Hospital Products, Thailand	-
Paraformaldehyde	Sigma-Aldrich, St Louis, USA	P6148

Phosphale Buffer Saline (PBS)[6]	Invitrogen Corp., Paisley, UK	10010-031
Sodium Alginate[7]	Sigma-Aldrich, St Louis, USA	A2033
Sodium Phosphate monobasic	Antibioticos, Spain	480087
Trypan Blue 0.4%	Gibco RBL, USA	15250-061
Trypsin-EDTA[8]	Invitrogen Corp., Canada	25300-054

หมายเหตุ

[1] L- Glutamine /Penicillin/Streptomycin Solution with 200 mM L- Glutamine, 10,000 U Penicillin and 10 mg Streptomycin/ml in 0.9% Sodium Chloride

[2] Collagen Solution Type I, 0.1% solution in 0.1 N Acetic Acid

[3] 264 Units/mg

[4] With L-Glutamine

[5] 500 units. From *pseudomonas,* lyophilized powder โดย 1 Unit สามารถผลิตกลีเซอรอล 1μ mol จาก triglyceride ต่อนาที ที่ pH 7.0 อุณหภูมิ 37° C

[6] Dulbecco's

[7] From *Macrocystis Pyrifera* (Kelp) Medium Viscosity

[8] 0.5 g Trypsin and 0.2 g EDTA-4 Na/L in HBSS without Mg^{2+} and Ca^{2+}

ภาคผนวก ข.
การเตรียมสารเคมี

ตารางที่ ข. 1 การเตรียมสารเคมี

	สารเคมี/อุปกรณ์	วิธีการ
Collagenase Type ll Enzyme Solution 0.3%	สารเคมี 1. Collagenase Type ll 2. Calcium Chloride 3. DMEM F-12 อุปกรณ์ 1. Sterile Syringe 2. Sterile Brown Bottle 500 ml 3. Filter 0.22 micron	1. ผสม Collagenase Type ll 1 กรัม ใน DMEM-F12 Media 333 ml และCalcium Chloride 2. กรองสารที่ทำการผสมผ่าน Filter ขนาด 0.22 micron 3. เก็บใส่ขวดสีชาที่ฆ่าเชื้อแล้วที่ –20° C
Media for Chondrocyte	สารเคมี 1. Fetal Bovine Serum (FBS) 2. DMEM-F12 Media 3. Antifungal Agent (Fungizone) 4. Fibroblast Growth Factor ที่ความเข้มข้น 2.5 ng/ml 5. Insulin Like Growth factor 2.5 ng/ml 6. Antibiotic(L-Glutamine/Penicillin/Streptomycin)	1. ผสม DMEM-F12 Media และ FBS 50 ml แล้วผสมกับ Antobiotic จำนวน 5 ml และ Fibroblast Growth Factor , Insulin Like Growth factor ที่ความเข้มข้น 2.5 ng/ml จำนวน 0.1 ml 2. ทำการกรอง Media ที่ได้จากข้อ 1. ผ่าน Filter Unit ที่ 0.22 micron 3. เก็บใส่ขวดที่ 4°C

	<u>อุปกรณ์</u> 1. Sterile Bottle 100 ml 6 ขวด 2. Filter Unit 0.22 micron 3. Serological Pipet 10 ml, 25 ml	
Phosphate Buffer Saline ที่ pH 7.4	<u>สารเคมี</u> 1. Sodium phosphate monobasic 2. Sodium phosphate dibasic 3. น้ำปราศจากไอออน <u>อุปกรณ์</u> 1. ขวดเก็บสารขนาด 250 ml 2. กระบองตวง 3. บีกเกอร์ขนาด 500 ml	1. ละลาย Sodium phosphate monobasic จำนวน 0.264 g ในน้ำปราศจากไอออน 100 ml 2. ละลาย Sodium phosphate dibasic จำนวน 2.17g ในน้ำปราศจากไอออน 100 ml 3. ผสมละลาย Sodium phosphate monobasic ที่ได้จากข้อ 1 กับสารละลาย Sodium phosphate dibasic ที่ได้จากข้อ 2 และคนให้เข้ากัน 4. เก็บสารที่ได้ในขวดเก็บสาร 5. ฆ่าเชื้อโดยใช้ Autoclave 6. เก็บที่อุณหภูมิห้อง

ภาคผนวก ค.

วิธีการเลี้ยงสัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้ในงานวิจัยคือ Nude Mouse (BALB/c-nu) ซึ่งเป็นหนูพันธุ์พิเศษที่ไม่ T-lymphocyte ซึ่งทำให้ระบบภูมิคุ้มกันไม่สามารถทำงานได้อย่างเต็มที่ ดังนั้น การเลี้ยงหนูชนิดนี้ จึงต้องมีวิธีที่แตกต่างจากการเลี้ยงหนูอื่นๆ ซึ่งมีวิธีการเลี้ยงดังนี้

1. สภาวะที่ทำการเลี้ยงที่ 25 ° C ความชื้นสัมพัทธ์ 60 -70%
2. ก่อนทำการเปลี่ยนอุปกรณ์ใดๆ ควรใส่ถุงมือที่ฆ่าเชื้อแล้ว โดยพ่น Alcohol 70% ที่ถุงมือ
3. การเปิด Filter Cap ควรเปิดใน Laminar Flow Hood ที่มีอากาศไหลตลอดเวลา
4. เปลี่ยนน้ำทุกๆ 2 วัน โดยน้ำที่ใช้เป็นน้ำที่ฆ่าเชื้อแล้ว (Sterile Water)
5. เปลี่ยนอาหารทุกๆ 2 วัน โดยทิ้งอาหารที่กินเหลือ และใส่อาหารใหม่เข้าไป
6. ขวดน้ำ (รวมทั้งจุกและหลอดน้ำ) เมื่อใช้แล้วล้างให้สะอาดและเข้า Autoclave
7. การเปลี่ยนกรงและขี้เลื่อย เปลี่ยนสัปดาห์ละ 2 ครั้ง โดย
    a. กรงเมื่อเปลี่ยนแล้ว ให้ล้างให้สะอาดและผึ่งให้แห้ง ก่อนการใช้ครั้งต่อไปให้ฆ่าเชื้อโดยเช็ด Alcohol 70%
    b. ขี้เลื่อย เมื่อใช้แล้วให้ทิ้ง และขี้เลื่อยที่นำมาเปลี่ยนใหม่ให้เข้า Autoclave ก่อนทำการเปลี่ยน
8. เปลี่ยนแผ่นกรองอากาศ (Filter Sheet) สัปดาห์ละ 1 ครั้ง

หมายเหตุ

- กรงที่ใช้เป็นกรงพลาสติกใสผลิตจาก Polystyrene มีตะแกรงสำหรับใส่ขวดน้ำและอาหาร และมีที่กรองอากาศติดตั้งอยู่ด้านบน
- ขวดน้ำเป็นขวดแก้ว, จุกเป็นจุกยาง และหลอดน้ำเป็นหลอดสแตนเลส
- แผ่นกรองอากาศมีขนาดที่ 0.22 ไมครอน
- สัตว์ทดลอง, อาหาร และอุปกรณ์ที่ใช้ทั้งหมดทำการสั่งซื้อมาจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล

ภาคผนวก ง.
การย้อมสีชิ้นเนื้อและเทคนิคการย้อม

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการพิสูจน์ชิ้นเนื้อเยื่อที่ได้โดยการย้อมสีทางด้าน พยาธิวิทยา (Histology) ซึ่งการย้อมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนนั้น ได้ใช้เทคนิคการย้อม 2 ประเภท คือ Hematoxylin and Eosin (H&E) และ Alcian Blue ซึ่งแต่ละเทคนิคที่ใช้มีคุณสมบัติดังนี้

Hematoxylin and Eosin (H&E) – เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในทาง Histology ซึ่งเป็นการย้อมสีเซลล์และเนื้อเยื่อขั้นพื้นฐาน โดยส่วนของ Hematoxylin จะติดสีม่วงอมน้ำเงินในโครงสร้างที่มีความเป็นกรด เช่น นิวเคลียส ในขณะที่ Eosin จะติดสีชมพูหรือแดงในโครงสร้างที่มีความเป็นเบส เช่นที่ Cytoplasm

เทคนิคการย้อมสีชิ้นเนื้อเยื่อ

Hematoxylin and Eosin

<u>สารเคมีที่ใช้</u>

1. Mayer's Hematoxylin solution
2. Eosin Stock Solution

Eosin y Water	1.0 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

3. Phloxine Stock Solution

Phloxine B	1.0 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

4. Eosin-Phloxine working solution

Eosin Stock Solution	100 มิลลิลิตร
Phloxine Stock Solution	10 มิลลิลิตร
95% Ethanol	780 มิลลิลิตร
Glacial Acetic Acid	4 มิลลิลิตร

วิธีการย้อม

1. Deparaffinize โดยการอบให้แห้งมาแช่ใน Xylene นาน 10 นาที 3 ครั้ง และล้าง Xylene โดยการแช่ใน 95% Ethanol นาน 1 นาที
2. ล้างในน้ำประปา โดยแช่ให้น้ำไหลผ่าน นาน 2 นาที
3. แช่ในสาร Mayer's Hematoxylin นาน 5 นาที
4. จุ่มในสารละลาย Lithium Carbonate
5. ล้างในน้ำประปา โดยแช่ให้น้ำไหลผ่าน นาน 5 นาที
6. จุ่มในสารละลาย 95% Ethanol 3 ครั้ง
7. แช่ใน Eosin-Phloxine working solution นาน 5 นาที
8. จุ่มใน 95% Ethanol 16 ครั้ง
9. จุ่มใน Absolute Alcohol 2 ครั้ง
10. จุ่มใน Xylene 2 ครั้ง
11. ปิดฝาสไลด์แล้วนำไปดูสี

ผลที่ได้จากการย้อมโดยใช้เทคนิค Hematoxylin and Eosin

- ติดสีน้ำเงินที่นิวเคลียสของเซลล์
- ติดสีแดงที่ Cytoplasm

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวพัชราภา โอสธีรกุล เกิดเมื่อ วันที่ 25 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2524 ที่จังหวัดสุพรรณบุรี เข้าศึกษาระดับชั้นมัธยมศึกษาที่โรงเรียนสงวนหญิง จังหวัดสุพรรณบุรี
สำเร็จการศึกษาคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ปีการศึกษา 2548
เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรแพทย์ประจำบ้านออร์โธปิดิกส์ ปีการศึกษา 2551
เข้าศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมชีวเวช คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2552

การเสนอผลงานวิชาการ

Phatcharapa Osateerakun , Somsak Kuptniratsaikul , Tanom Bunaprasert, Sorada Kanokpanont and Pibul Itiravivong “Feasibility of using alginate/gelatin composite scaffold for human chondrocyte regeneration” (oral presentation) , BMEiCON 2011, โรงแรม แคนทารี ฮิลล์ จังหวัดเชียงใหม่ วันที่ 29-31 ม.ค. 2555