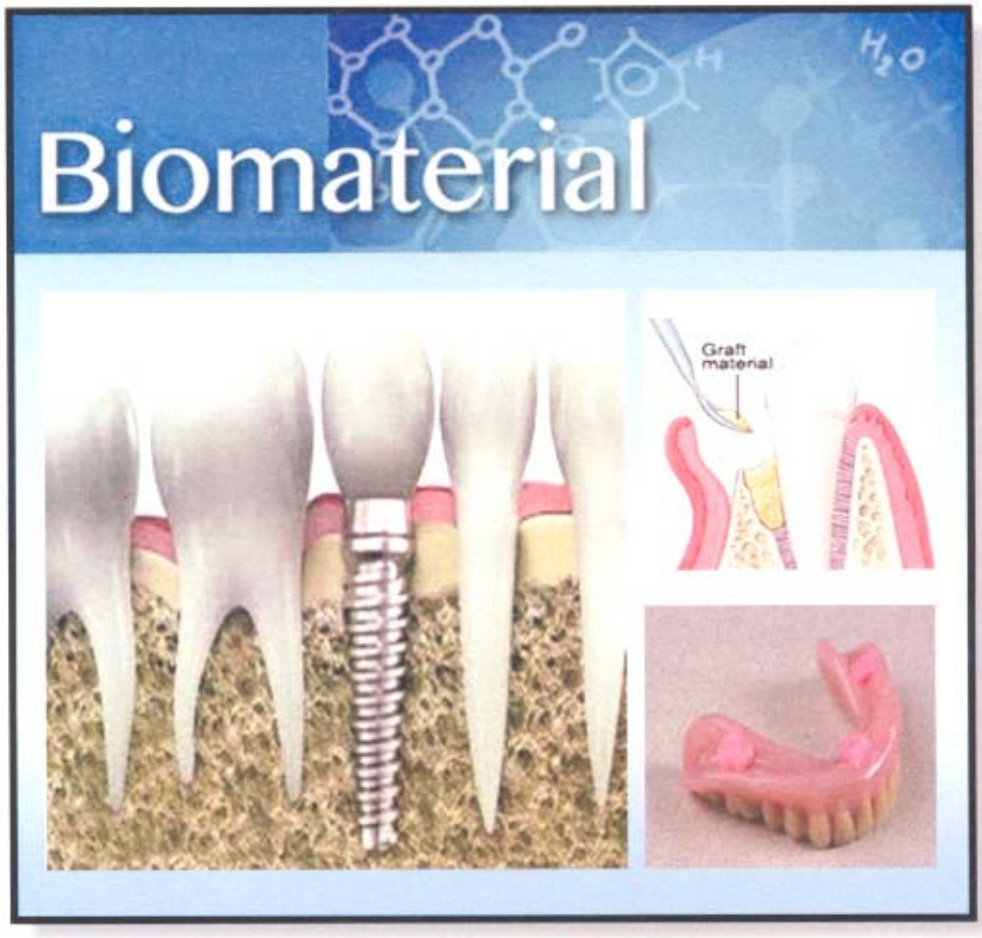
วว.TISTR

โครงการวิจัยที่ ภ.56-07/ย.4/รายงานฉบับที่ 1 (ฉบับสมบูรณ์)

การประเมินคุณสมบัติทางชีวภาพ และความปลอดภัยของ ชีววัสดุทางทันตกรรม



สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

โครงการวิจัยที่ ภ.56-07
การพัฒนาวัสดุและอุปกรณ์ทางการแพทย์เพื่อส่งเสริมสุขภาวะกลุ่มผู้สูงอายุ

โครงการย่อยที่ 4
การประเมินคุณสมบัติทางชีวภาพและความปลอดภัยทางชีววัสดุทางทันตกรรม

รายงานฉบับที่ 1 (ฉบับสมบูรณ์)
การประเมินคุณสมบัติทางชีวภาพและความปลอดภัย ของชีววัสดุทางทันตกรรม

โดย

ภาคภูมิ ศิริอาชาวัฒนา **เตือนตา เสมาทอง**
สรียา เรืองพัฒนพงศ์ **ศรัญญา เหล่าวิทยางค์กูร**

บรรณาธิการ
นฤมล รื่นไวย์
บุญเรียม น้อยชุมแพ
สลิลดา พัฒนศิริ

วว., ปทุมธานี 2559

สงวนลิขสิทธิ์

รายงานฉบับนี้ได้รับการอนุมัติให้พิมพ์โดย
ผู้ว่าการสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

(นางลักษมี ปลั่งแสงมาศ)
ผู้ว่าการ

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ในการสนับสนุนสิ่งอำนวยความสะดวกต่างๆ ในการดำเนินการวิจัยในครั้งนี้ รวมทั้งขอขอบคุณนางสาวชุลีรัตน์ บรรจงลิขิตกุล ผู้อำนวยการฝ่ายเภสัชและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ และนางชุติมา เอี่ยมโชติชวลิต ผู้อำนวยการฝ่ายนวัตกรรมวัสดุ ที่ให้การสนับสนุน และคำปรึกษาในการดำเนินการวิจัยจนสำเร็จลุล่วงด้วยดี.

นอกจากนี้ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในอาคารสัตว์ทดลองทุกท่านที่ให้ความร่วมมือในการทำงานได้อย่างดีเยี่ยมจนงานสำเร็จด้วยดี.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ	ก
สารบัญตาราง	ค
สารบัญรูป	จ
ABSTRACT	1
บทคัดย่อ	3
1. บทนำ	5
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	11
3. ผลการวิจัยและวิจารณ์	27
4. สรุปผลการวิจัย	42
5. แนวทางการนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์	44
6. ข้อเสนอแนะ	47
7. เอกสารอ้างอิง	48

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1.	เกณฑ์การให้คะแนนขอบเขตแสดงความเป็นพิษของเซลล์	17
ตารางที่ 2.	เกณฑ์การให้คะแนนการแตกของเซลล์ที่แสดงความเป็นพิษ	17
ตารางที่ 3.	เกณฑ์การประเมินผลความเป็นพิษของเซลล์	17
ตารางที่ 4.	เกณฑ์การให้คะแนนการระคายเคืองของผิวหนังตามแบบ Magnusson and Kligman scale	20
ตารางที่ 5.	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วย MTT assay	27
ตารางที่ 6	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์กระดูกด้วยวิธี MTS assay	28
ตารางที่ 7.	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี Agar gel diffusion	29
ตารางที่ 8.	ผลการทดสอบการระคายเคืองต่อผิวหนังกระต่ายของตัวอย่าง C 1	29
ตารางที่ 9.	ผลการทดสอบการระคายเคืองต่อผิวหนังกระต่ายของตัวอย่าง C 31	30
ตารางที่ 10.	ผลการทดสอบการระคายเคืองต่อผิวหนังกระต่ายของตัวอย่าง TCP+$CaCO_3$	30
ตารางที่ 11.	ผลการทดสอบการระคายเคืองต่อผิวหนังกระต่ายของตัวอย่าง TCP+ HA 043237	30
ตารางที่ 12.	ผลการทดสอบการระคายเคืองต่อผิวหนังกระต่ายของตัวอย่าง TC 1	31
ตารางที่ 13.	ผลการทดสอบการระคายเคืองต่อผิวหนังกระต่ายของตัวอย่าง TC 2	31
ตารางที่ 14.	ผลการทดสอบการก่ออาการแพ้ของตัวอย่าง C 31	32
ตารางที่ 15.	ผลการทดสอบการก่ออาการแพ้ของตัวอย่าง TCP+HA 043237 และ TCP+$CaCO_3$	32
ตารางที่ 16.	ผลการทดสอบการก่ออาการแพ้ของตัวอย่าง TC 1 และ TC 2	33
ตารางที่ 17.	ผลการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางระบบหมุนเวียนเลือดของตัวอย่าง “TCP+HA 043237” และ “TCP+$CaCO_3$”	34
ตารางที่ 18.	ผลการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางระบบหมุนเวียนเลือดของตัวอย่าง “TCP+HA 043237” และ “TCP+$CaCO_3$”	35
ตารางที่ 19.	ผลการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางระบบหมุนเวียนเลือดของตัวอย่าง “TC 1”และ “TC 2”	36

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่ 20.	ผลการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางระบบหมุนเวียนเลือดของตัวอย่าง “TC 1”และ “TC 2”	36
ตารางที่ 21.	ผลการทดสอบความเป็นพิษทางการกินของตัวอย่าง C 31	37
ตารางที่ 22.	ผลการทดสอบความเป็นพิษทางการกินของตัวอย่าง C 31 (น้ำหนักตัวของหนูทดลองบันทึกในระหว่างการทดสอบ และเมื่อสิ้นสุดการทดสอบ)	38
ตารางที่ 23.	ผลการทดสอบความเป็นพิษทางการกินของตัวอย่าง C 31 (อัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวของหนูทดลองในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ)	39
ตารางที่ 24.	ผลการทดสอบความเป็นพิษทางการกินของตัวอย่าง C 31 (การตรวจชันสูตรพยาธิภาพ เมื่อสิ้นสุดการทดสอบ)	39
ตารางที่ 25.	ผลการทดสอบปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อโดยวิธีการปลูกฝังของวัสดุทดแทนกระดูก	41
ตารางที่ 26.	กลุ่มเป้าหมายการนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ รูปแบบการนำไปใช้ประโยชน์ และผลลัพธ์และผลกระทบที่คาดว่าจะเกิดขึ้น	44

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1.	รูปลักษณะของวัสดุทดแทนกระดูกชนิด TCP+HA 04237 และ TCP+$CaCO_3$ ที่ใช้ในการทดสอบ	9
รูปที่ 2.	รูปลักษณะของวัสดุทดแทนกระดูกชนิด TC 1 และ TC 2 ที่ใช้ในการทดสอบ	9
รูปที่ 3.	รูปลักษณะของวัสดุทดแทนกระดูกจากท้องตลาด ที่ใช้เป็นตัวอย่างเปรียบเทียบในการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์	10
รูปที่ 4.	รูปลักษณะของกาวติดฟันปลอม C 31 และ C 1 ที่ใช้ในการทดสอบ	10

EVALUATION OF BIOLOGICAL PROPERTIES AND SAFETY IN DENTAL BIOMATERIALS

Parkpoom Siriarchavatana, Tuanta Sematong,
Sareeya Reungpatthanaphong and Saranya Laovitthayanggoon

ABSTRACT

The objectives of this study were to develop the toxicological evaluation methods and to conduct the biocompatibility test of each type of biomaterials used for medical purpose that could provide safety material profiles in fabricated processes for researchers or manufacturers. Cytotoxicity test was used for evaluation of toxic substance contaminated in biomaterials. There were two approaches: the direct contact and indirect contact depending upon characteristics of test substance. Some modification of a direct contact method was available for solid materials (metals, polymers) by making the extract from pre-incubation of materials with physiological solution so that some extractable chemical substances could be released into liquid. L929 cell line, mouse fibroblast cell was employed in a cytotoxicity study of Membrane HF77. The study showed no toxic effects on cells; however this material was designed to be used as a filter in a hemodialysis machine so the efficiency of blood component filtration was a major concern rather than safety test. This has to be further developed.

For denture adhesives (C 31), cytotoxicity was employed using an indirect contact method (agar gel diffusion assay) because the polymer contained in the product was capable of absorbing large amount of water that could be a problem for a regular cytotoxicity test. The result showed no toxic effect in cell culture. Skin irritation test and skin sensitivity test in animal model were also negative in results. However, the formulation should be reviewed for the instability of texture and color of C 31.

For testing of bone graft substitute (TCP+$CaCO_3$, TCP+HA 04237, TC 1, TC 2), the materials were designed to conjunct with bone tissue so osteoblast cell line, mouse pre-osteoblast (MC3T3-E1 subclone 4) was employed in the cytotoxicity test. The data revealed that no cytotoxicity effects were found. In animal model (according to ISO 10993 test for biocompatibility of medical devices), a systemic injection test, skin irritation test, skin sensitization test were conducted and showed no toxic effects. The bone graft substitute was aimed to contact within the body for long lasting; therefore, an implantation test was required to ensure that material was safe and compatible with the surrounding tissue. The materials were placed inside the longissimus dorsi muscle and tissue reaction was observed for 1 month. The study revealed that no incompatibility response was presented. The result implied that TCP+$CaCO_3$, TCP+HA 04237, TC 1 and TC 2 should be continued for further development.

การประเมินคุณสมบัติทางชีวภาพและความปลอดภัยทางชีววัสดุทางทันตกรรม

ภาคภูมิ ศิริอาชาวัฒนา[1], เตือนตา เสมาทอง[1], สรียา เรืองพัฒนพงศ์[1] และ ศรัญญา เหล่าวิทยางค์กูร[1],

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ดำเนินการเลือกพัฒนาวิธีการทดสอบความเป็นพิษและความเข้ากันได้ของวัสดุแต่ละประเภทให้เหมาะสมกับสภาพของวัสดุที่จะใช้ในทางการแพทย์ ซึ่งสามารถให้ข้อมูลกับผู้พัฒนาผู้ผลิต ถึงแนวทางและกระบวนการผลิตวัสดุที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้จริงในผู้ป่วยได้อย่างปลอดภัย.

การทดสอบความเป็นพิษที่เกิดขึ้นในเซลล์เพาะเลี้ยง สามารถช่วยประเมินความเป็นพิษในเบื้องต้นของสารเคมีที่อาจปนเปื้อนหรือตกค้างอยู่ในวัสดุที่จะนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ ซึ่งสามารถเลือกทำการทดสอบโดยวิธีการสัมผัสโดยตรงและโดยอ้อมอันขึ้นกับลักษณะของวัสดุที่นำมาทดสอบ. การทดสอบแบบสัมผัสโดยตรงในวัสดุที่เป็นโลหะหรือพอลิเมอร์อาจใช้วิธีการนำไปสกัดในตัวกลางของเหลว ซึ่งเป็นการจำลองสภาพที่อยู่ในร่างกาย ซึ่งหากมีสารเคมีที่อาจเป็นอันตรายต่อเซลล์จะได้ถูกปลดปล่อยออกมา. จากการทดสอบ Membrane HF 77 ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสนั้นยังไม่พบว่า สารสกัดของ Membrane HF 77 ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์แต่อย่างไร. อย่างไรก็ตาม การพัฒนาวัสดุเพื่อใช้ในงาน hemodialysis ยังมีเรื่องของประสิทธิภาพการคัดกรองสารชีวเคมีต่างในเลือดที่จะต้องทำการพัฒนาต่อไป.

กาวติดฟันปลอม C 31 ได้ทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี Agar gel diffusion ซึ่งเป็นการสัมผัสโดยอ้อม เนื่องจากวัสดุนี้เป็นพอลิเมอร์ที่ดูดซึมน้ำได้มาก ผลจากการทดสอบไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ การทดสอบในสัตว์ทดลอง คือ การก่อระคายเคือง และการก่ออาการภูมิแพ้ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน ไม่ก่อให้เกิดอาการผิดปกติ. อย่างไรก็ตาม วัสดุกาวติดฟันปลอมนี้ยังอาจต้องได้รับการพัฒนาต่อไปเพื่อให้ตัวผลิตภัณฑ์มีสีที่คงตัว และรูปลักษณะที่คงตัวเมื่อเก็บไว้เป็นเวลานาน.

---

[1]ฝ่ายเภสัชและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ, สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

การทดสอบวัสดุทดแทนกระดูก TCP+$CaCO_3$ และ TCP+HA 04237 เนื่องจากเป็นวัสดุที่ปลูกฝังลงในบริเวณที่เชื่อมต่อกับกระดูก จึงทำการเลือกทดสอบกับเซลล์ osteoblast ซึ่งในการทดลองนี้ คือ Mouse pre-osteoblast (MC3T3-E1 subclone 4) ผลปรากฏว่า สารสกัดที่ได้จากการสกัดตัวอย่างนี้ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ จึงนำไปทำการทดสอบในสัตว์ทดลองตามข้อกำหนดของ ISO 10993 ที่เกี่ยวข้องกับอุปกรณ์ทางการแพทย์ ได้ทำการทดสอบความเป็นพิษต่อระบบหมุนเวียนเลือด, ความก่อระคายเคืองต่อผิวหนังกระต่าย, การก่ออาการภูมิแพ้ ซึ่งไม่พบว่าก่อให้เกิดผลกระทบกับสัตว์ทดลอง และเนื่องจากวัสดุทดแทนกระดูกเป็นวัสดุที่จะต้องถูกฝังอยู่ในร่างกายเป็นระยะเวลายาวนาน จึงได้ทำการทดสอบในระยะยาว. โดยในงานวิจัยนี้ได้เลือกทำการปลูกฝังวัสดุไว้ในกล้ามเนื้อเป็นเวลา 1 เดือน เพื่อดูผลปฏิกิริยาการตอบสนองของเนื้อเยื่อต่อวัสดุทดแทนกระดูก จากการทดสอบยังไม่พบว่า วัสดุทดแทนกระดูกที่พัฒนาขึ้น แสดงให้เห็นความเป็นพิษหรือปัญหาความเข้ากันไม่ได้กับเนื้อเยื่อร่างกาย ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวัสดุ TCP+$CaCO_3$, TCP+HA 04237, TC 1 และ TC 2 มีแนวโน้มที่จะพัฒนาเป็นวัสดุทดแทนกระดูกได้ต่อไป.

1. บทนำ

ในปัจจุบันค่าใช้จ่ายด้านสุขภาพทั่วโลกเป็นงบประมาณที่เกี่ยวข้องกับวัสดุและเครื่องมือแพทย์มากถึง 6 ล้านล้านบาท ด้วยเหตุที่ทุกประเทศมีสถานการณ์ของอัตราการเพิ่มขึ้นของประชากรผู้สูงอายุเช่นเดียวกัน ในปี พ.ศ. 2552 ข้อมูลจำนวนประชากรที่อายุมากกว่า 60 ปี ของประเทศไทยมีเป็นจำนวน 7.6 ล้านคน หรือคิดเป็น 11.5% ของประชากรทั้งหมด และสามารถคาดการณ์ได้ว่าภายในปี พ.ศ. 2573 จะเพิ่มขึ้นเป็น 17.6 ล้านคน คิดเป็น 25% หรือ เท่ากับ 1 ใน 4 ของประชากรทั้งประเทศ สถานการณ์ดังนี้จะทำให้ประเทศต้องใช้งบประมาณส่วนใหญ่ในด้านสาธารณสุขไปกับการรักษาพยาบาล ซึ่งส่วนหนึ่งนั้นจะเป็นค่าใช้จ่ายของวัสดุทางการแพทย์ประมาณ 25,928 ล้านบาท. ปัจจุบันประเทศไทยได้นำเข้าเครื่องมืออุปกรณ์และวัสดุทางการแพทย์เกือบทุกชนิด ตัวเลขการนำเข้าสินค้าทางการแพทย์ของประเทศไทยในช่วงปี พ.ศ. 2549 เป็นการนำเข้าผลิตภัณฑ์ทางทันตกรรม 15.3% ผลิตภัณฑ์กระดูกและอุปกรณ์ฝังในประมาณ 35.2% ที่เหลือเป็นวัสดุสิ้นเปลืองทางการแพทย์และอื่นๆ รวมมูลค่า ราว 18,000 ล้านบาท จะเห็นว่าปริมาณนำเข้าจากต่างประเทศของเครื่องมือและอุปกรณ์ทางการแพทย์มีปริมาณสูงมาก และราคาแพง.

ด้านอุตสาหกรรมการผลิตวัสดุและอุปกรณ์ทางการแพทย์ของไทย เป็นวงการที่มีศักยภาพโดยสามารถสร้างยอดการส่งออกสินค้าไปต่างประเทศในปี พ.ศ. 2546 ได้ถึง 40,905 ล้านบาท แต่อย่างไรก็ตาม การส่งออกเครื่องมือและวัสดุทางศัลยกรรมกระดูกรวมทั้งทางทันตกรรมนั้นมีเพียง 0.3% เท่านั้นหรือคิดเป็นเงินประมาณ 150 ล้านบาท ขณะที่มีการนำเข้าสินค้าในหมวดดังกล่าวจากต่างประเทศสูงถึง 1,000 ล้านบาท. การที่เรายังพึ่งพาการนำเข้าสินค้าเหล่านี้และไม่สามารถผลิตขึ้นเองได้เนื่องจากมีข้อจำกัดที่สำคัญหลายประการ เช่น การขาดองค์ความรู้และเทคโนโลยีในการผลิต ความเชื่อถือของผู้ใช้ต่อผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้ในประเทศยังอยู่ในระดับต่ำ, การขาดข้อมูลและความช่วยเหลือในด้านการตรวจสอบและรับรองคุณภาพความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์.

เนื่องจากวัสดุทางการแพทย์เหล่านี้มีการสัมผัสกับเนื้อเยื่อหรือถูกฝังอยู่ภายในร่างกายเป็นเวลานาน อาจก่อให้เกิดผลอันไม่พึงประสงค์หรือเกิดความเป็นพิษต่อร่างกายได้ ดังนั้น วัสดุต่างๆ ที่พัฒนาขึ้นจะต้องได้รับการทดสอบที่เหมาะสมเพื่อสามารถนำไปใช้ได้อย่างปลอดภัย. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย มีองค์ความรู้ด้านวัสดุศาสตร์ที่สั่งสมมา มีความพร้อมด้านบุคลากรและเครื่องมืออุปกรณ์ต่างๆ ที่ส่งเสริมให้สามารถทำการวิจัยและพัฒนาวัสดุทางการแพทย์ขึ้นได้ ตลอดทั้งมีอาคารปฏิบัติการทดสอบทางชีวภาพและความปลอดภัย ที่จะเสริมสร้าง

ให้การพัฒนาวัสดุทางการแพทย์ ดังนั้น หากประเทศไทยสามารถผลิตและพัฒนาวัสดุทางการแพทย์ได้เอง จะลดการนำเข้าและลดการสูญเสียรายได้ให้กับต่างประเทศ.

เทคโนโลยีทางด้านชีววัสดุทางการแพทย์ก้าวหน้าขึ้นอย่างมากในช่วงเวลา 2-3 ทศวรรษ ที่ผ่านมา มีการผสมผสานวัสดุหรือการสังเคราะห์วัสดุใหม่ ตลอดจนการใช้นาโนเทคโนโลยีเข้ามาบูรณาการเพื่อสร้างวัสดุที่มีคุณสมบัติใหม่ๆ สำหรับใช้ทางการแพทย์. เอกลักษณ์ใหม่ที่เกิดขึ้นนี้อาจยังไม่มีข้อมูลในแง่ของความปลอดภัยที่มากเพียงพอ เนื่องจากวัสดุเหล่านี้จะต้องสัมผัสกับร่างกายของมนุษย์ทั้งภายในและภายนอก ในช่วงระยะเวลาหนึ่งหรือคงอยู่ในร่างกายไปตลอดชีวิต จึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพและความปลอดภัยของชีววัสดุเหล่านี้ที่อาจปลดปล่อยสารพิษจากการถูกกระบวนการของร่างกายกัดกร่อนตามระยะเวลาที่ผ่านไป. การทดสอบทางชีวภาพและความปลอดภัยสำหรับชีววัสดุจึงสำคัญอย่างยิ่งเพราะเกี่ยวข้องกับคุณภาพชีวิตของมนุษย์โดยตรง ในการผลิตวัสดุการแพทย์นั้น ทุกขั้นตอนการผลิตอาจสามารถก่อให้เกิดความเป็นพิษในผลิตภัณฑ์นั้นได้ ตั้งแต่การคัดเลือกสูตรการผลิต, วัตถุดิบในการผลิต, สารเคมีที่เป็นพิษตกค้างระหว่างกระบวนการผลิต หรือสารพิษที่เกิดจากปฏิกิริยาเคมีในขั้นตอนการผลิต, วิธีการชะล้างสารเคมีตกค้างออกจากผิว, วิธีการฆ่าเชื้อเพื่อทำให้ปลอดเชื้อ ซึ่งอาจก่อให้เกิดสารตกค้างได้ เช่น การบ่มด้วยก๊าซเอทีลีนไดออกไซด์ ตลอดจนกระทั่งวัสดุบรรจุภัณฑ์ที่ต้องสัมผัสกับผิวผลิตภัณฑ์นั้นๆ ด้วย. ดังนั้น การทดสอบผลิตภัณฑ์ควรทำตั้งแต่ขั้นตอนการพัฒนาจนถึงการผลิต ทุกขั้นตอนตั้งแต่การวิเคราะห์ทดสอบวัตถุดิบ เพื่อให้ได้วัตถุดิบที่ปลอดภัยและปราศจากความเป็นพิษมาใช้ในการผลิต, การวิเคราะห์ในระหว่างกระบวนการผลิต จนถึงการวิเคราะห์ทดสอบผลิตภัณฑ์ที่สำเร็จแล้ว

การทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้นในวัตถุดิบจะช่วยคัดเลือกวัตถุดิบที่ไม่มีสารเคมีตกค้างซึ่งอาจก่อให้เกิดความเป็นพิษในภายหลัง หรือเกิดความเป็นพิษหลังกระบวนการทำให้ปราศจากเชื้อได้ การทดสอบความเป็นพิษในระหว่างกระบวนการผลิต จะทำให้เลือกใช้กระบวนการผลิตที่เหมาะสมในแต่ละขั้นตอนต่างๆ ที่ไม่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อผลิตภัณฑ์ที่เป็นผลต่อปฏิกิริยาของเนื้อเยื่อสิ่งมีชีวิต ซึ่งมีสิ่งที่ควรทำ ได้แก่ การหาสารพิษตกค้าง, การหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์บนผลิตภัณฑ์ก่อนผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อ (Bioburden test), การหาวิธีการและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับฆ่าเชื้อในวัสดุ, การทดสอบความปราศจากเชื้อภายหลังกระบวนการฆ่าเชื้อ (sterility test), การวิเคราะห์ทดสอบผลิตภัณฑ์ที่สำเร็จแล้ว. แม้ว่ากระบวนการคัดเลือกวัตถุดิบและวิธีการผลิตที่ปลอดภัยแล้ว วัสดุอุปกรณ์ทางการแพทย์ยังจำเป็นที่จะต้องวิเคราะห์ทดสอบคุณสมบัติทางชีววิทยา เพื่อมั่นใจได้ว่าผลิตภัณฑ์นั้นสามารถนำไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพและปลอดภัย การทดสอบเหล่านี้ เช่น การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์, การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันและความเป็นพิษระยะยาว รวมทั้ง

การทดสอบความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อ เป็นต้น. การทดสอบดังกล่าวจะต้องทำการศึกษาออกแบบให้สอดคล้องกับวัสดุทางการแพทย์แต่ละชนิดซึ่งต่างมีคุณสมบัติและวัตถุประสงค์ที่จำเพาะและการใช้งานที่แตกต่างกันไป.

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมีประโยชน์อย่างมากในการใช้ประเมินวัสดุเบื้องต้น เนื่องจากสามารถทำได้สะดวกรวดเร็ว ให้ผลที่ทำซ้ำได้ และมีความสัมพันธ์สอดคล้องกับการทดลองในสัตว์ แต่โดยทั่วไปเซลล์เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองมักมีแนวโน้มตอบสนองต่อความเป็นพิษมากกว่าเนื้อเยื่อสัตว์ แต่อย่างไรก็ตาม การทดสอบในสัตว์ทดลองยังคงต้องทำเพื่อศึกษาความเกี่ยวเนื่องของเซลล์หลากหลายชนิดที่อยู่ในร่างกาย ตลอดจนระยะเวลายาวนานที่ต้องสัมผัส ซึ่งเหล่านี้ไม่สามารถเกิดขึ้นได้ในการทดสอบกับเซลล์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Harmand 1997).

งานวิจัยนี้ได้ทำการนำตัวอย่างชีววัสดุทางทันตกรรมที่พัฒนาขึ้นภายในสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย มาทดสอบความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์เพื่อศึกษาว่าต้นแบบของผลิตภัณฑ์ทางทันตกรรมที่จะพัฒนาขึ้นใช้เองหรือถ่ายทอดให้กับผู้ประกอบการมีความเป็นไปได้และปลอดภัยต่อผู้บริโภคหรือไม่ โดยผลิตภัณฑ์ต้นแบบที่นำมาศึกษาในการวิจัยนี้ประกอบด้วย

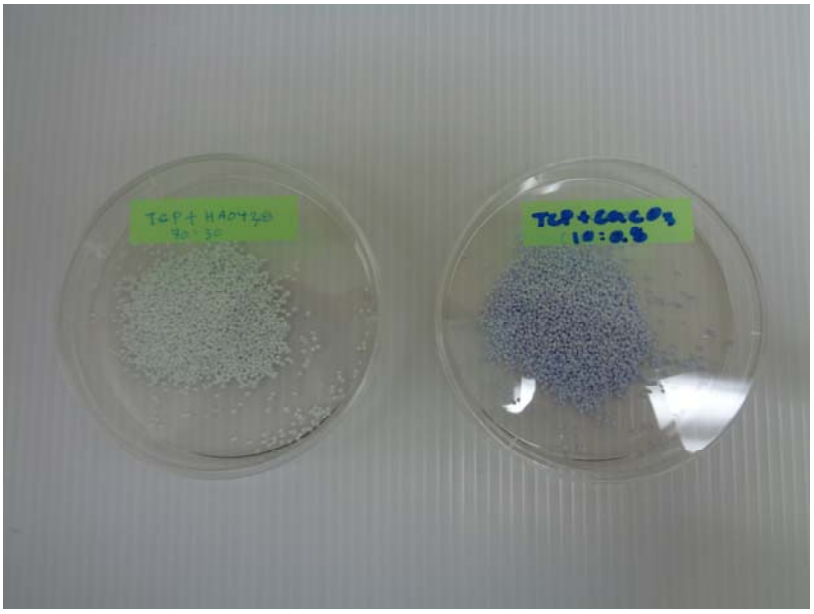
1. Membrane HF 77 เป็นลักษณะของเส้นใยท่อกลวง (hollow fiber membrane) ซึ่งได้วางแนวทางสำหรับการพัฒนาเป็นไตเทียม เพื่อใช้ฟอกเลือดของผู้ป่วยโรคไตวาย (hemodialysis) วัสดุนี้ใช้อยู่ภายนอกร่างกาย แต่เสมือนใช้ภายในร่างกายเพราะมีการสัมผัสกับเลือดของผู้ป่วยโดยตรง มีความเสี่ยงต่อการเกิดปฏิกิริยาต่อร่างกายอย่างมาก เนื่องจากเลือดของผู้ป่วยจะเคลื่อนเข้ามาภายในรูของท่อกลวงที่มีน้ำยาล้างไต (dialysate) ล้อมรอบอยู่ ภายใต้แรงดันที่สร้างขึ้นจากการทำงานของเครื่องและการแพร่ผ่าน จะทำให้สารชีวเคมีในร่างกายโดยเฉพาะที่เป็นของเสียที่ร่างกายต้องการกำจัดผ่านทางไตนั้น ถูกผลักดันออกมาจากเลือด ดังจะเห็นว่าเลือดได้สัมผัสกับวัสดุทางการแพทย์นี้ผ่านใต้แรงดันและการเสียดสีต่อวัสดุ ซึ่งอาจเป็นผลให้เกิดการปนเปื้อนกับสารเคมีที่ตกค้างหรือปลดปล่อยออกมาจากวัสดุ อีกทั้งการเสียดสีที่ผิวอาจเป็นสาเหตุให้เม็ดเลือดแดงแตก (hemolysis) หรือกระตุ้นให้ clotting factors ต่างๆ ในเลือดทำงานและเกิดการจับแข็งตัวของเลือดที่เรียกว่า thrombosis ซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้ป่วยอย่างมาก. นอกจากนี้ สิ่งที่เป็นคุณสมบัติเฉพาะของเมมเบรนนี้ คือ ความสามารถในการเลือกผ่านของสารชีวเคมีในร่างกาย เพราะว่าในการกรองที่เกิดขึ้นจะมีสารที่ร่างกายต้องการขจัดออกและสารอื่นๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายถูกขจัดออกไปด้วย เช่น albumin, globulin, vitamin, essential mineral เมมเบรนจึงต้องพัฒนาให้สามารถเลือกขจัดเฉพาะของเสีย

ที่ร่างกายไม่ต้องการเท่านั้น ในการวิจัยนี้ไม่ได้ประเมินถึงประสิทธิภาพของเมมเบรน แต่เพียงศึกษาดูความปลอดภัยของเมมเบรนต่อเซลล์พื้นฐานเท่านั้น เพื่อประเมินว่าในกระบวนการผลิตขึ้นรูปวัสดุนั้นมีสารเคมีที่ตกค้างและอาจเป็นพิษต่อเซลล์ได้หรือไม่.

2. TCP+HA 04237, TCP+$CaCO_3$, TC 1, TC 2 เป็นวัสดุทดแทนกระดูก (bone graft substitution) ที่ประกอบขึ้นจากแคลเซียม และไฮดรอกซีแอปฟาไทต์ ในสูตรต่างๆ เพื่อประโยชน์ใช้ในทางการแพทย์, ทางทันตกรรม เป็นวัสดุที่ใช้ภายในร่างกายของผู้ป่วยและมีการสัมผัสกับเยื่อเมือกหรือเลือดของผู้ป่วยตลอดเวลา มีวัตถุประสงค์เพื่อเสริม, ทดแทนส่วนของกระดูกที่แตกหัก หรือทำหน้าที่เป็นโครงสร้างชั่วคราวเพื่อรอให้เซลล์กระดูก (osteoblast) ร่างกายเคลื่อนเข้ามายึดเกาะและพัฒนาเป็นกระดูกต่อไป.

3. C 31 เป็นกาวติดฟันปลอม (denture adhesives) ที่ประกอบขึ้นจากวัสดุในกลุ่มพอลิเมอร์ เพื่อประโยชน์ใช้ในทางทันตกรรมสำหรับผู้ป่วยที่ใส่ฟันปลอมชนิดสวม ซึ่งมักเกิดปัญหาฟันปลอมไม่ยึดติดกับเพดานปาก (hard palate) และหลุดหล่นออกมา ทำให้ผู้ป่วยเกิดความกังวลต่อการเสียบุคลิกภาพในขณะพูดหรือรับประทานอาหาร กาวติดฟันปลอมนี้จะช่วยทำให้ชิ้นฟันปลอมยึดติดกับเพดานปากได้ดีขึ้น โดยลักษณะของผลิตภัณฑ์ชนิดนี้เป็นผลิตภัณฑ์ที่สัมผัสกับเยื่อเมือกของร่างกายแต่มีลักษณะการใช้งานเป็นครั้งคราวเท่านั้น.

การดำเนินการศึกษาหรือประเมินความปลอดภัยของวัสดุทางทันตกรรมในครั้งนี้ จะยึดหลักเกณฑ์ของมาตรฐานอุตสาหกรรม ISO 10993-1 : 2003 (Biological Evaluation of Medical Devices ได้กำหนดหลักการทั่วไปที่ใช้ในการประเมินทางชีวภาพของเครื่องมือแพทย์ตามประเภทของเครื่องมือ, ลักษณะการสัมผัสและระยะเวลาที่สัมผัสกับร่างกาย โดยให้มีการทดสอบ 2 ประเภท คือ การทดสอบเพื่อประเมินผลการตอบสนองเบื้องต้นทางชีวภาพของเครื่องมือ เช่น ความเป็นพิษต่อเซลล์, ความไวต่อการตอบสนอง, การระคายเคือง, ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในชั้นใต้ผิวหนัง, ความเป็นพิษต่อระบบต่างของร่างกายที่เป็นพิษเฉียบพลัน, เป็นพิษกึ่งเรื้อรัง และความเป็นพิษต่อระบบพันธุกรรม ผลที่เกิดขึ้นเฉพาะที่ภายหลังการฝังวัสดุทางการแพทย์ในร่างกาย, ความเข้ากันได้กับเลือดของเครื่องมือแพทย์ และการทดสอบเพื่อประเมินเพิ่มเติมทางชีวภาพ เช่น ความเป็นพิษเรื้อรัง, การก่อมะเร็ง, ความเป็นพิษต่อระบบสืบพันธุ์. นอกจากนี้ ยังเกี่ยวเนื่องกับมาตรฐาน ISO 7405 : 2008 (Evaluation of Biocompatibility of Medical Devices Used in Dentistry) และ OECD/GLP Guideline for Testing Chemicals.



รูปที่ 1. รูปลักษณะของวัสดุทดแทนกระดูกชนิด TCP+HA 04237 และ TCP+$CaCO_3$ ที่ใช้ในการทดสอบ.

รูปที่ 2. รูปลักษณะของวัสดุทดแทนกระดูกชนิด TC 1 และ TC 2 ที่ใช้ในการทดสอบ.

รูปที่ 3. รูปลักษณะของวัสดุทดแทนกระดูกจากท้องตลาด ที่ใช้เป็นตัวอย่างเปรียบเทียบในการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์.

รูปที่ 4. รูปลักษณะของกาวติดฟันปลอม C 31 และ C 1 ที่ใช้ในการทดสอบ.

หมายเหตุ: C 1 = กาวติดฟันปลอมที่มีจำหน่ายในท้องตลาด

C 31 = กาวติดฟันปลอมที่พัฒนาขึ้นโดยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

2.1 วัสดุ

- สัตว์ทดลอง : หนูขาวพันธุ์ Wistar เพศผู้ น้ำหนัก 200-300 กรัม ซื้อจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา จังหวัดนครปฐม.
- อาหารสัตว์ บริษัทโภคภัณฑ์อาหารสัตว์ ประเทศไทย จำกัด.
- กระบอกฉีดยาขนาด 1-5 มิลลิลิตร, สำลี, แอลกอฮอล์.
- 0.9% normal saline.
- น้ำดื่มเป็นน้ำกรอง.
- Sodium Carboxymethylcellulose (Na CMC) บริษัท ฮงฮวด ประเทศไทย.
- Earle's Minimum essential media(EMEM), GIBCO, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
- Horse serum, GIBCO, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
- Phosphate buffer solution(PBS), GIBCO, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
- Penicillin/Streptomycin, GIBCO, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
- 0.25% Trypsin-versene (Trypsin/EDTA), GIBCO, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
- Tryphan blue 0.4%, GIBCO, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
- 3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide, (MTT), GIBCO, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
- Dimethyl sulfoxide (DMSO), Sigma Chemical, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
- 96-well plate, Corning, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
- 75 cm^2 flask, Corning, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
- เซลล์เนื้อเยื่อชนิด L929 CRL-CCL-1 cell line, Mouse fibroblast, ATCC, USA.
- Methanol, Acetonitrile, น้ำ AR grade, และ HPLC grade บริษัท Lab-Scan, ประเทศไทย.
- 95 % Ethanol, commercial grade บริษัทองค์การสุรามหาชน จำกัด, ประเทศไทย.
- น้ำมันพืช.
- ขวดเตรียมสารขนาด 50, 100, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร, NUNC, ประเทศเดนมาร์ก.
- กระบอกฉีดยาขนาด 1- 10 มิลลิลิตร, Nipro, Nissho, Nipro Co. Ltd., ประเทศไทย.
- เข็ดฉีดยาใช้แล้วทิ้ง No. 26 G, Nipro, Nissho, Nipro Co. Ltd., ประเทศไทย.
- Plastic centrifuge tube 15 และ 50 มิลลิลิตร, NUNC, ประเทศเดนมาร์ก.

- เข็มป้อนอาหารสัตว์ทดลอง (feeding needles), สำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขต ศาลายา จังหวัดนครปฐม, ประเทศไทย

2.2 อุปกรณ์

- เครื่องชั่ง OHAUS รุ่น E 02140, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์.
- เครื่องตรวจเลือด Reflovet จากบริษัท Roche Diagnostics, ประเทศเยอรมนี.
- กรรไกรผ่าตัด.
- หลอดป้อนสเตนเลส, ผลิตในประเทศไทย.
- เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง, Satorius รุ่น BP160P, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
- เครื่องชั่งละเอียด 2 ตำแหน่ง, AND รุ่น EK 120 I ประเทศญี่ปุ่น.
- ตู้ฆ่าเชื้อด้วยความร้อนแห้ง, Hereus, ประเทศเยอรมนี.
- ตู้ปลอดเชื้อระดับ 2, Hereus, ประเทศเยอรมนี.
- เครื่องนับจำนวนโคโลนีของจุลินทรีย์ในจานเพาะเชื้อ ยี่ห้อ Stuart รุ่น SCS ประเทศอังกฤษ.
- ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator) ยี่ห้อ Termark รุ่น B 112 V, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ, Sanyo, ประเทศญี่ปุ่น.
- Microplate reader, GENios plus, ประเทศออสเตรีย พร้อมโปรแกรมการวัดของ Magellan.
- Autopipette, Gilson, ประเทศฝรั่งเศส.
- Multichannel, Eppendorf, ประเทศเยอรมนี.
- Vortex Mixer, Scientific Industries, Inc., ประเทศสหรัฐอเมริกา.
- เครื่องเขย่า (KS 250, Janke & Kunkel Ika labortechnik).
- อ่างน้ำปรับอุณหภูมิ (Water bath).
- เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (UV- Spectrophotometer, Shimadzu, Japan).
- เครื่องปั่นเหวี่ยง Becman coulter, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
- เครื่อง High Intensity Ultrasonic 500 watt model.
- เครื่องทำแห้งแบบแช่แข็ง (Freeze dryer).
- กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM).
- เครื่องวัดขนาดอนุภาค (Mastersizer 2,000, Malvern Instruments).
- pH meter, Hanna Instruments, Mauritius.
- เมมเบรน (Spectra/ Por 6 dialysis membrane, MWCO : 2,000).

- ไนลอนฟิวเตอร์ (nylon filters, 0.45 um, Whatman England).
- เครื่องชั่ง (digital) 2 ตำแหน่ง, Kern, EW4200, ประเทศเยอรมนี.
- เครื่องชั่ง (digital) 3 ตำแหน่ง, AND, GF-300, ประเทศญี่ปุ่น.
- ตู้อบลมร้อน, Memmert, ULM 400, ประเทศเยอรมนี.
- Hotplate stirrer, C-MAG HS10, ประเทศเยอรมนี.
- เครื่องชั่ง (Mettler Toledo, New Classic MF ML 204).

2.3 วิธีการทดลอง

2.3.1 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสด้วย MTT assay

การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด L 929 : mouse lung fibroblasts ซึ่งเป็นเซลล์มาตรฐานตาม ISO 10993-5 จะถูกนำมาใช้ในการทดสอบ โดยทำการเตรียมเซลล์ดังกล่าวในอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งประกอบไปด้วย EMEM ร่วมกับ 10% Horse serum และ 1% penicillin-streptomycin ในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร และทำการบ่มที่ตู้บ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°ซ. พร้อมทั้ง 5% CO_2 จนกระทั่งเซลล์เจริญเป็นชั้นเดี่ยวและมีความหนาแน่นประมาณ 80% ของพื้นที่ขวดเพาะเลี้ยง ภายหลังจากนั้นนำขวดเพาะเลี้ยงดังกล่าวที่มีเซลล์ชั้นเดี่ยวเจริญอยู่ มาย่อยด้วย 0.05% trypsin-versene และทำการนับจำนวนเซลล์ให้ได้ปริมาตร 1 x 10^5 เซลล์/มิลลิลิตร และนำไปเพาะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยง 96 หลุม และทำการบ่มที่ตู้บ่มเพาะเลี้ยงที่ อุณหภูมิ 37°ซ. พร้อมทั้ง 5% CO_2 รอจนกระทั่งเซลล์เจริญเป็นชั้นเดี่ยวและมีความหนาแน่นประมาณ 80% ของพื้นที่จานเพาะเลี้ยง เพื่อนำมาทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ชนิดดังกล่าว.

การเตรียมตัวอย่างทดสอบ

(1) ตัวอย่างทดสอบ : วัสดุผลิตไส้กรอง ชนิด Membrane HF 77

การเตรียมตัวอย่างทดสอบโดยทำการสกัด "Membrane HF 77" น้ำหนัก 0.1 กรัม มาสกัดด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ (EMEM) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ซึ่งเทียบเท่ากับ 100% ของสารสกัดนำสารสกัดดังกล่าวมากรองผ่าน filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร หลังจากนั้นนำสารสกัดดังกล่าวมาละลายด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ให้เป็นความเข้มข้นดังนี้ 100, 75, 50, 25, 12.5 และ 6.25% ตามลำดับ.

(2) สารละลายควบคุม :

เตรียมสารละลายควบคุมเชิงบวก (positive control) โดยใช้ 10% DMSO ในอาหารเลี้ยงเชื้อ.

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity test) :

ภายหลังบ่มเซลล์ L929 ในจานเพาะเลี้ยง ขนาด 96 หลุม ครบ 24 ชั่วโมง ทำการเปลี่ยนถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์ดังกล่าว โดยล้างด้วย PBS 2 ครั้ง และแทนที่ด้วยสารสกัดที่มีความเข้มข้น 100%, 75%, 50%, 25% 12.5 และ 6.25% ร่วมด้วยกับสารละลายควบคุมเชิงบวก (10%DMSO) และสารละลายกลุ่มควบคุมเชิงลบ (blank control) ภายหลังใส่สารทดสอบและสารกลุ่มควบคุมแล้ว ทำการบ่มที่ตู้บ่ม 37°ซ. ในสภาวะ 5% CO_2 .

หลังจากปล่อยให้เซลล์สัมผัสกับสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ นาน 24 ชั่วโมง ทำการวัดเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่มีชีวิตโดย MTT assay ตามขั้นตอน ดังนี้:

1. ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้ง เติมสารละลาย MTT ขนาด 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในสารละลาย PBปริมาณ 50 ไมโครลิตร/หลุม และอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ 150 ไมโครลิตร/หลุม บ่มทิ้งไว้ในตู้บ่มเซลล์ที่ 37 °ซ. นาน 4 ชั่วโมง.

2. ดูดสารละลายทิ้ง ล้างตะกอนด้วยการเติมสารละลาย DMSO 100 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ นาน 15 นาที.

3. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 590 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่มีชีวิตเทียบกับกลุ่มควบคุม.

การประเมินผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

1. มีอัตราการรอดชีวิตน้อยกว่า 30% ของกลุ่มควบคุมเชิงลบ สามารถบ่งบอกได้ว่า cytotoxic potential.

2. ที่ความเข้มข้นของการสกัด 50% มีอัตราการรอดชีวิต เทียบเท่าหรือมีอัตราการรอดชีวิตมากกว่าที่ความเข้มข้นของการสกัด 100%.

2.3.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์กระดูกด้วย MTS assay

การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้เป็นเซลล์ Mouse pre-osteoblast (MC3T3-E1 subclone 4).

การเตรียมตัวอย่าง

(1) ตัวอย่างทดสอบ : วัสดุทดแทนกระดูก 2 ชนิด คือ

เตรียมตัวอย่างทดสอบโดยบดตัวอย่างดังกล่าวด้วยโกร่ง แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยตู้อบที่อุณหภูมิ 180°ซ. เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำผงตัวอย่างมากระจายตัวใน cell culture media ชนิด Minimum Essential Medium (MEM) alpha ที่ผสมด้วย Fetal bovine serum (FBS) ใน

อัตราส่วนความเข้มข้น 10% โดยให้ตัวอย่างมีความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 10, 25, 50, 75 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร.

วิธีการทดสอบ

1. เลี้ยงเซลล์ Mouse pre-osteoblast (MC3T3-E1 subclone 4) จำนวน 8,000 เซลล์ ใน cell culture media ชนิดเดียวกับที่ใช้เตรียมตัวอย่าง ใน 96-well plate บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37°ซ., ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และความชื้นที่ 95% เป็นเวลารวม 24 ชั่วโมง.

2. ดูด cell culture media ออก จากนั้นหยอดตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงใน well นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °ซ., ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และความชื้นสัมพัทธ์ที่ 95% เป็นเวลารวม 24 ชั่วโมง.

3. หยอดสารลาย [3-(4,5-dimethyl-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในแต่ละ well.

4. บ่มต่อเป็นเวลา 3 ชั่วโมง.

5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 490 นาโนเมตร.

2.3.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วย Agar gel diffusion

การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด L 929 : mouse lung fibroblasts.

การเตรียมตัวอย่างทดสอบ

ตัวอย่างที่ใช้ คือ กาวติดฟันปลอม C 31.

วิธีการทดสอบ

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง (complete media)
MEM, 10% Fetal bovine serum, 1% Penicillin/Streptomycin.

2. การเตรียม Agar 3% Noble Agar ที่ปราศจากเชื้อ.

3. การเตรียม Agar Media Overlay (2X Media).

4. การเตรียมเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง

- ดูดสารละลายอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เจริญขยายเต็มที่ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาดพื้นที่ 75 ตารางเซนติเมตร ออกและล้างเซลล์ด้วย PBS.

- เติม Trypsin/EDTA 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้นาน 3 นาที เติมอาหารเลี้ยงเซลล์อีก 15 มิลลิลิตร ให้เซลล์อยู่ในลักษณะแขวนลอย.

- นำไปปั่นที่ 3,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที จากนั้นนับจำนวนเซลล์ด้วย Haematocytometer.

- เจือจางเซลล์ให้ได้ 1×10^5 เซลล์/มิลลิลิตร ประมาณ 20 มิลลิลิตร ต่อ 96 well plate.

- ดูดเซลล์ที่เจือจางปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่แต่ละ 35 มิลลิเมตร, culture dish.

- นำไปเพาะเลี้ยงใน CO_2 Incubator ที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง.

5. การเตรียม Cell Layer

1. เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ ใน CO_2 Incubator ที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จนเซลล์แผ่ขยายเป็นชั้นเดี่ยว (monolayer) อย่างน้อย 80% ของพื้นที่เลี้ยงเซลล์แต่ละหลุม.

2. ทำการเตรียม 3% Noble Agar ตามวิธีการข้างต้น.

3. อุ่น 3% Noble Agar ที่อุณหภูมิ 45°ซ. ใน waterbath.

4. อุ่น 2XMEM ที่อุณหภูมิ 45°ซ. โดยห้ามนานเกิน 1 ชั่วโมง.

5. ผสม 2XMEM และ 3% Noble Agar ในอัตราส่วน 1 : 1 และทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 39°ซ.

6. ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าบน culture dish.

6. เทส่วนผสมจากข้อ 5 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในแต่ละ culture dish.

7. ทำให้เย็นและเซ็ตตัวที่อุณหภูมิห้อง.

8. เมื่อ Agar แข็งตัว ทำการวางตัวอย่างทดสอบลงบนพื้น Agar โดยให้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Blank filter disk และผลิตภัณฑ์กาวติดฟันปลอมมาตรฐานเป็น blank และใช้ 0.45% neutral red เป็น positive control.

9. นำไปเพาะเลี้ยงใน CO_2 Incubator ที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 24±1 ชั่วโมง.

6. การประเมินผลการทดสอบ

1. กำหนดตำแหน่งโดยใช้ปากกา และทำการกำจัดตัวอย่างทดสอบ.

2. เท Neutral Red Solution, 2 มิลลิลิตร ลงบน Agar ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง.

3. เทสารละลาย Neutral Red ออก และอ่านผลภายในกล้องจุลทรรศน์.

4. อ่านผล Zone Index ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยการวัดเซลล์ที่ไม่มีการติดสี (clear zone).

5. อ่านผล Lysis Index ดังแสดงในตารางที่ 2 โดยการวัดจำนวนของเซลล์ที่ได้รับผลกระทบจากกลุ่มที่มีความเป็นพิษ.

6. คำนวณหาค่า Response Index จากสูตรต่อไปนี้

ตารางที่ 1. เกณฑ์การให้คะแนนขอบเขตแสดงความเป็นพิษของเซลล์ (zone description)

Zone Index	Description of Zone
0	No detecable zone around or under specimen
1	Zone limited to area under specimen
2	Zone extends less than 0.5 cm beyond specimen
3	Zone extends 0.5 to 1.0 cm beyond specimen
4	Zone extends greater than 1.0 cm beyond specimen but does not involve entire dish
5	Zone involves entire dish

ตารางที่ 2. เกณฑ์การให้คะแนนการแตกของเซลล์ที่แสดงความเป็นพิษ (lysis description)

Lysis Index	Description of Zone
0	No observable cytotoxicity
1	Less than 20% of zone affected
2	20 to 39% of zone affected
3	40 to 59% of zone affected
4	60 to 80% of zone affected
5	Greater than 80% of zone affected

หมายเหตุ: Response Index = Zone Index (0-5) / Lysis Index (0-5)

ตารางที่ 3. เกณฑ์การประเมินผลความเป็นพิษของเซลล์
(scoring system for estimating cytotoxicity in the agar diffusion test)

Response Index	Interpretation of cytotoxicity
0/0 – 0.5/0.5	None
1/1 – 1.5/1.5	Mild
2/2 – 3/3	Moderate
>4/4	Marked

2.3.4 การทดสอบการก่อระคายเคืองต่อผิวหนังในกระต่าย

การเตรียมตัวอย่าง สำหรับตัวอย่าง C 1 และ C 31 ไม่ต้องทำการเตรียมตัวอย่าง ในการทดสอบจะใช้การสัมผัสตัวอย่างโดยตรง สำหรับตัวอย่าง TCP+$CaCO_3$ อัตราส่วน 10 : 8, TCP+HA 04237 อัตราส่วน 70 : 30, TC 1 และ TC 2 จะทำการเตรียมตัวอย่างโดยวิธีการสกัดด้วย

สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9% โดยใช้ตัวอย่างหนัก 0.2 กรัม/สารละลาย 1 มิลลิลิตร ทำการตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 °ซ. เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.

วิธีการทดสอบ ดำเนินการตามวิธีการทดสอบหมายเลข 404 : การทดสอบการก่อความระคายเคืองต่อผิวหนังของ OECD Guidelines for Testing of Chemicals (OECD 2002)

นำกระต่าย 6 ตัว มาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการก่อนทำการทดสอบ 1 สัปดาห์ (ใช้กระต่ายทดสอบ 3 ตัว/หนึ่งตัวอย่างทดสอบ) เพื่อให้สัตว์ทดลองปรับตัวคุ้นเคยกับสถานที่ ก่อนทำการทดสอบ 1 วัน โกนขนบริเวณลำตัวใต้หัวไหล่ชิดกระดูกสันหลังทั้งสองข้างเป็นบริเวณ 10 × 10 เซนติเมตร ด้วยปัตตาเลี่ยนไฟฟ้าให้ขนสั้นที่สุดเท่าที่จะทำได้แต่ไม่ให้ผิวหนังเป็นแผล ปิด patch ที่เกลี่ยด้วยตัวอย่างทดสอบ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร/ตัวอย่างทดสอบ ลงบนผิวหนังกระต่ายด้านหนึ่งที่โกนขนเตรียมไว้ (บริเวณทดสอบ), ส่วนอีกด้านหนึ่งของกระต่ายตัวเดิมปิดด้วย patch ที่เกลี่ยด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (บริเวณควบคุม) ยึด patch ด้วยพลาสเตอร์ชนิด Transpore ห่อลำตัวกระต่ายด้วยผ้ายืด เพื่อยึด patch ติดกับผิวหนังไม่ให้เคลื่อนหลุด เมื่อครบ 4 ชั่วโมง เปิด patch ออก แล้วใช้สำลีชุบน้ำอุ่นเช็ดเบาๆ เพื่อให้ตัวอย่างทดสอบที่เหลือค้างอยู่บนผิวหนังหลุดออก ตรวจดูอาการแดงและอาการบวมตรงบริเวณทดสอบ ที่เวลา 1, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง และถ้าพบว่ายังมีอาการแดง และอาการบวมอยู่ให้ตรวจดูอาการต่อจนถึงวันที่ 14 การให้คะแนนยึดตามหลักเกณฑ์ดังนี้:

หลักเกณฑ์การให้คะแนน

อาการแดง	คะแนน
ไม่แดง	0
แดงเล็กน้อยแทบสังเกตไม่ได้	1
แดงจนมองเห็นได้ชัด	2
แดงปานกลางถึงแดงมาก	3
แดงช้ำถึงผิวหนังตกสะเก็ด	4
อาการบวม	**คะแนน**
ไม่บวม	0
บวมเล็กน้อยแทบสังเกตไม่ได้	1
บวมน้อย (ขอบนูนเห็นได้ชัดเจน)	2
บวมปานกลาง (นูนขึ้นมา 1 มิลลิเมตร)	3
บวมมาก (นูนขึ้นมา 1 มิลลิเมตร และลามออกไป)	4

2.3.5 การทดสอบการก่ออาการแพ้ในหนูตะเภา ตามวิธีทดสอบหมายเลข 406 : Skin Sensitization (Buehler Method) of the OECD Guidelines for Testing of Chemicals (OECD 1992)

- การเตรียมตัวอย่าง

เช่นเดียวกับการทดสอบการก่อระคายเคืองในกระต่าย.

- การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำหนูตะเภามาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการก่อนการทดสอบ 1 สัปดาห์ เพื่อให้สัตว์ทดลองปรับตัวคุ้นเคยกับสภาพแวดล้อม ก่อนทำการทดสอบ 1 วัน โกนขนหนูตะเภาทุกตัวบริเวณลำตัวใต้หัวไหล่และเหนือสะโพกชิดกระดูกสันหลังด้านใดด้านหนึ่งเป็นบริเวณกว้างประมาณ 3 x 3 เซนติเมตร ให้สั้นที่สุดเท่าที่จะทำได้แต่ไม่ให้ผิวหนังเป็นแผล แบ่งหนูตะเภาออกเป็น 3 กลุ่ม โดยกลุ่มควบคุมและกลุ่มควบคุมบวกใช้หนูตะเภากลุ่มละ 10 ตัว แบ่งเป็นเพศละ 5 ตัว และกลุ่มทดสอบใช้หนูตะเภา 20 ตัว แบ่งเป็นเพศละ 10 ตัว.

- วิธีการทดลอง

การทดลองมี 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนที่ 1 ขั้นการชักนำอาการแพ้ (induction phase) ขั้นตอนที่ 2 ขั้นการกระตุ้นอาการแพ้ (challenge phase) ดังนี้:

การชักนำอาการแพ้ (induction phase)

ปิด patch ที่เกลี่ยด้วย (1) น้ำกลั่นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (2), (3) ตัวอย่างทดสอบปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (ต่อตัวอย่างทดสอบ) และ (4) DNCB เข้มข้น 0.075% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้วปิด patch ลงบนผิวหนังหนู (ด้านซ้าย) ที่โกนขนในกลุ่มควบคุม, กลุ่มทดสอบ และกลุ่มควบคุมบวก ตามลำดับ. โดยในขั้นการชักนำอาการแพ้ของหนูทุกกลุ่มจะถูกทำการปิด patch ทดสอบในแต่ละวันนาน 6 ชั่วโมง สำหรับในวันที่ 0 (เริ่มต้นการทดลอง), 7-9 และ 14-16 หลังจากนั้นหนูตะเภาทุกกลุ่มจะถูกพักการทดสอบและเลี้ยงต่อไปอีกประมาณอย่างน้อย 1 สัปดาห์ ก่อนที่เข้าสู่ขั้นตอนการกระตุ้นอาการแพ้.

- การกระตุ้นอาการแพ้ (challenge phase)

ในวันที่ 28 ของการทดสอบ ปิด patch ที่เกลี่ยด้วย (1) น้ำกลั่นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (2), (3) ตัวอย่างทดสอบปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (ต่อตัวอย่างทดสอบ) และ (4) DNCB เข้มข้น 0.075% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้วปิด patch ลงบนผิวหนังหนู (ด้านขวา) ที่โกนขนในกลุ่มควบคุม, กลุ่มทดสอบ และกลุ่มควบคุมบวก ตามลำดับ โดยปิด patch ทดสอบนาน 6 ชั่วโมง

สังเกตอาการผิดปกติบนผิวหนังหนูตะเภาภายหลังจากเปิด patch ออกที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง และให้คะแนนโดยยึดตามหลักเกณฑ์การให้คะแนนของ Magnusson and Kligman grading ถ้าผิวหนังหนูตะเภาในกลุ่มทดสอบมีคะแนนเป็น 1 หรือมากกว่า ให้บ่งชี้ว่าตัวอย่างทดสอบนั้นก่อให้เกิดอาการแพ้ต่อผิวหนังในหนูตะเภา.

- เกณฑ์การให้คะแนนอาการผิดปกติบนผิวหนังหนูตะเภา

ในระหว่างการทดลอง สังเกตและบันทึกอาการผิดปกติต่างๆ บริเวณผิวหนังหนูตะเภาในบริเวณที่ปิดแผ่นทดสอบทั้งในระหว่างการทดลอง ในระหว่างขั้นการชักนำอาการแพ้ และในระหว่างขั้นตอนการกระตุ้นอาการแพ้.

หลังจากการกระตุ้นอาการแพ้ สังเกตอาการผิดปกติบนผิวหนังหนูตะเภาภายหลังจากเปิด patch ออกที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง และให้คะแนนโดยยึดตามหลักเกณฑ์การให้คะแนนของ Magnusson and Kligman grading ในการทดลองจะใช้การสังเกตอาการแบบ Blind reading คือ ผู้สังเกตผลจะไม่ทราบว่าหนูแต่ละตัวได้รับสารทดสอบชนิดใด.

ตารางที่ 4. เกณฑ์การให้คะแนนการระคายเคืองของผิวหนังตามแบบ Magnusson and Kligman scale

อาการผิดปกติของผิวหนัง	คะแนน
ผิวหนังไม่มีการเปลี่ยนแปลง	0
ผิวหนังมีแดงเป็นหย่อมๆ	1
ผิวหนังแดงปานกลาง เป็นบริเวณชัดเจน	2
ผิวหนังแดงมากและบวม	3

2.3.6 การทดสอบการก่ออาการแพ้ในหนูตะเภา ดำเนินการตามวิธีการทดสอบ ISO (2002a) ISO 10993-10, 2nd ed., Tests for irritation and delayed-type hypersensitivity และ ISO (2002b) ISO 10993-12, 2nd ed., Sample preparation and reference materials.

- การเตรียมตัวอย่างทดสอบ

เตรียมตัวอย่างทดสอบโดยสกัดตัวอย่างทดสอบ “TC 1 และ TC 2” ที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยใช้อัตราส่วน ตัวอย่างทดสอบปริมาณ 0.2 กรัม/สารละลายของน้ำเกลือสำหรับ

ฉีด (ความเข้มข้น 0.9% น้ำหนัก/ปริมาตร) 1 มิลลิลิตร สำหรับกลุ่มควบใช้วิธีสกัดเช่นเดียวกับตัวอย่างทดสอบแต่มีเฉพาะสารละลายของน้ำเกลือสำหรับฉีด.

- การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำหนูตะเภาจำนวน 40 ตัว มาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการก่อนการทดสอบ 1 สัปดาห์ เพื่อให้สัตว์ทดลองปรับตัวคุ้นเคยกับสภาพแวดล้อม ก่อนทำการทดสอบ 1 วัน โกนขนหนูตะเภาทุกตัวบริเวณลำตัวใต้หัวไหล่ และเหนือสะโพกชิดกระดูกสันหลังด้านใดด้านหนึ่งเป็นบริเวณกว้างประมาณ 2.8 x 2.9 เซนติเมตร ด้วยปัตตาเลี่ยนไฟฟ้าให้ขนสั้นที่สุดเท่าที่จะทำได้แต่ไม่ให้ผิวหนังเป็นแผล แบ่งหนูตะเภาออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้:

กลุ่มที่ 1 : กลุ่มทดสอบ (เพศละ 10 ตัว ต่อกลุ่ม)

กลุ่มที่ 2 : กลุ่มควบคุม (เพศละ 5 ตัว ต่อกลุ่ม)

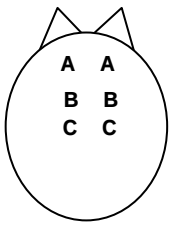
กลุ่มที่ 3 : กลุ่มควบคุมบวก (เพศละ 5 ตัว ต่อกลุ่ม)

- วิธีการทดสอบ

การทดลองมี 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนที่ 1 ขั้นตอนการชักนำอาการแพ้ (induction phase) ขั้นตอนที่ 2 ขั้นตอนการกระตุ้นอาการแพ้ (challenge phase)

การชักนำอาการแพ้โดยให้สารใต้ผิวหนัง (intradermal induction phase) วันที่ 0 - กลุ่มทดสอบ

ฉีดตัวอย่างทดสอบใต้ผิวหนังปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร บริเวณไหล่ที่โกนขนในหนูกลุ่มทดสอบโดยฉีดข้างละ 3 ตำแหน่ง บริเวณที่ทำการฉีดสารทดสอบในแต่ละตำแหน่งได้กำหนดไว้ดังรูปด้านล่าง.



ตำแหน่ง A : อัตราส่วน 50 : 50 (โดยปริมาตร) ของสารละลายผสมระหว่าง Freund's complete adjuvant (FCA) กับ น้ำเกลือ 0.9% สำหรับฉีด

ตำแหน่ง B : สารสกัดตัวอย่างทดสอบ "TC 1 หรือ TC 2"

ตำแหน่ง C : อัตราส่วน 50 : 50 (โดยปริมาตร) ของสารละลายผสมระหว่าง FCA กับสารสกัดตัวอย่างทดสอบ

วันที่ 0–กลุ่มควบคุม

ฉีดสารใต้ผิวหนังโดยใช้ปริมาตรสารเทียบเท่ากับกลุ่มทดสอบ แต่ใช้สารละลาย Blank แทนสารสกัดตัวอย่างทดสอบ.

ตำแหน่ง A : อัตราส่วน 50 : 50 (โดยปริมาตร) ของสารละลายผสมระหว่าง FCA กับน้ำเกลือ 0.9% สำหรับฉีด

ตำแหน่ง B : สารละลาย Blank (น้ำเกลือ 0.9% สำหรับฉีด)

ตำแหน่ง C : อัตราส่วน 50 : 50 (โดยปริมาตร) ของสารละลายผสมระหว่าง FCA กับ Blank

วันที่ 0–กลุ่มควบคุมบวก

ฉีดสารใต้ผิวหนังโดยใช้ปริมาตรสารเทียบเท่ากับกลุ่มทดสอบ แต่ใช้ 0.1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) dinitrochlorobenzene (DNCB) ในเอทานอลแทนสารสกัดตัวอย่างทดสอบ.

ตำแหน่ง A : อัตราส่วน 50 : 50 (โดยปริมาตร) ของสารละลายผสมระหว่าง FCA กับน้ำเกลือ 0.9% สำหรับฉีด

ตำแหน่ง B : 0.1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) DNCB ในเอทานอล

ตำแหน่ง C : อัตราส่วน 50 : 50 (โดยปริมาตร) ของสารละลายผสมระหว่าง FCA กับ 0.1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) DNCB ในเอทานอล

- การชักนำอาการแพ้โดยให้แปะสารบนผิวหนัง (topical induction phase)

วันที่ 7-นวดผิวหนังหนูบริเวณที่ทำการฉีดสารทดสอบด้วย 10% sodium dodecyl sulfate ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ที่เวลา 24±2 ชั่วโมง ก่อนการปิด patch ลงบนผิวหนัง.

วันที่ 8–กลุ่มทดสอบ

หยดสารสกัดตัวอย่างทดสอบ “TC 1 หรือ TC 2” ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บน patch แล้วปิดลงบนผิวหนังบริเวณเดียวกันกับที่ฉีดสารทดสอบใต้ผิวหนังของหนูกลุ่มทดสอบ ยึด patch ด้วยพลาสเตอร์ชนิด Transpore ห่อลำตัวด้วยผ้ายืด เพื่อยึด patch ติดกับผิวหนังไม่ให้เคลื่อนหลุดเมื่อครบ 48 ชั่วโมง นำ patch ออก.

วันที่ 8-กลุ่มควบคุม

หยดสารละลาย Blank แทนสารสกัดตัวอย่างทดสอบโดยใช้ปริมาตรสารเทียบเท่ากับกลุ่มทดสอบ.

วันที่ 8–กลุ่มควบคุมบวก

หยดสาร 0.1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) DNCB ในเอทานอล แทนสารสกัดตัวอย่างทดสอบโดยใช้ปริมาตรสารเทียบเท่ากับกลุ่มทดสอบ.

จากนั้นหนูทุกกลุ่มจะถูกพักเป็นเวลา 14 วัน ก่อนเข้าสู่ขั้นตอนการกระตุ้นอาการแพ้.

- การกระตุ้นอาการแพ้ (challenge phase)

ในวันที่ 22 ของการทดสอบ โกนขนบริเวณไหล่อีกด้านหนึ่งที่ยังไม่เคยทำการทดสอบ (ด้านซ้าย) จากนั้นปิด patch ที่เกลี่ยด้วยสารสกัดตัวอย่างทดสอบสารละลาย Blank และ DNCB ลงบนผิวหนังหนูในกลุ่มทดสอบ, กลุ่มควบคุม และกลุ่มควบคุมบวก ตามลำดับ โดยปิด patch ทดสอบนาน 24 ชั่วโมง สังเกตอาการผิดปกติบนผิวหนังหนูตะเภาภายหลังจากเปิด patch ออกที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง และให้คะแนนโดยยึดตามหลักเกณฑ์การให้คะแนนของ Magnusson and Kligman grading ถ้าผิวหนังหนูตะเภาในกลุ่มทดสอบมีคะแนนเป็น 1 หรือมากกว่า ให้บ่งชี้ว่าตัวอย่างทดสอบนั้นก่อให้เกิดอาการแพ้ต่อผิวหนังในหนูตะเภา.

- การตรวจผลอาการผิดปกติบนผิวหนังหนูตะเภา

ในระหว่างการทดลอง สังเกตและบันทึกอาการผิดปกติต่างๆ บริเวณผิวหนังหนูตะเภาในบริเวณที่ปิดแผ่นทดสอบทั้งในระหว่างการทดลอง ในระหว่างขั้นการชักนำอาการแพ้ และในระหว่างขั้นตอนการกระตุ้นอาการแพ้.

หลังจากการกระตุ้นอาการแพ้ สังเกตอาการผิดปกติบนผิวหนังหนูตะเภาภายหลังจากเปิด patch ออกที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง และให้คะแนนโดยยึดตามหลักเกณฑ์การให้คะแนนของ Magnusson and Kligman grading ในการทดลองจะใช้การสังเกตอาการแบบ Blind reading คือ ผู้สังเกตผลจะไม่ทราบว่าหนูแต่ละตัวได้รับสารทดสอบชนิดใด.

2.3.7 การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางระบบหมุนเวียนเลือด

ดำเนินการตามวิธีทดสอบของ ISO (2006) ISO 10993-11, 2nd ed., Tests for systemic.

- การเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่าง TCP+$CaCO_3$ อัตราส่วน 10 : 8, TCP+HA 04237 อัตราส่วน 70 : 30, TC 1 และ TC 2 ทำการสกัดเช่นเดียวกับการทดสอบการก่อระคายเคืองต่อผิวหนังกระต่าย แต่นำสารสกัดที่ได้มาทำการกรองด้วยฟิลเตอร์ขนาด 0.2 ไมครอน ก่อนนำไปฉีดในสัตว์ทดลอง.

- การเตรียมสัตว์ทดลอง

ก่อนทำการทดสอบนำหนูมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการนาน 1 สัปดาห์ เพื่อให้หนูปรับตัวคุ้นเคยกับสิ่งแวดล้อมในห้องปฏิบัติการ ซึ่งมีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 24±1°ซ. จัดกลุ่มหนูโดยใช้วิธีการสุ่มตัวอย่างแบบง่าย และทำสัญลักษณ์ประจำตัวโดยการแต้มเบอร์ที่หาง.

- วิธีการทดสอบ

ฉีดสารละลายตัวอย่างทดสอบทั้ง 2 ตัวอย่าง ทางเส้นเลือดดำที่หางในหนูกลุ่มทดลอง ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (ต่อตัวอย่างทดสอบ) และฉีดสารละลายโซเดียมคลอไรด์สำหรับฉีด (ความเข้มข้น 0.9% น้ำหนัก/ปริมาตร) ในกลุ่มควบคุมปริมาตรเทียบเท่าในกลุ่มทดลอง.

สังเกตและบันทึกอาการผิดปกติของหนูหลังฉีดสารทดสอบทันที จากนั้นติดตามสังเกตอาการผิดปกติของหนูที่ 24 ชั่วโมง และอย่างน้อยวันละครั้งทุกวันติดต่อกันเป็นเวลานาน 14 วัน ชั่งน้ำหนักหนูแต่ละตัวในวันที่ 1 และ 15 (วันสิ้นสุดการทดลอง).

เปรียบเทียบน้ำหนักตัวหนูระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม โดยการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี Student's t-Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เพื่อดูผลของตัวอย่างทดสอบต่ออัตราการเจริญเติบโตของหนู.

2.3.8 การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางการกิน

ดำเนินการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันดัดแปลงวิธีทดสอบหมายเลข 420 : Acute Oral Toxicity- Fixed Dose Method (Limit test) of the OECD Guidelines for Testing of Chemicals (OECD 2001)

- การเตรียมตัวอย่าง

ใช้ตัวอย่างกาวติดฟันปลอม C31.

- การเตรียมสัตว์ทดลอง

ใช้หนูทดลอง 20 ตัว เป็นเพศผู้และเพศเมียเพศละ 10 ตัว ก่อนทำการทดสอบ 1 สัปดาห์ นำหนูทดลองมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ซึ่งมีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 24±1°ซ. และความชื้นสัมพัทธ์ที่ 50-70% เพื่อให้หนูทดลองปรับตัวคุ้นเคยกับสิ่งแวดล้อมในห้องปฏิบัติการ ก่อนวันทดสอบแบ่งกลุ่มหนูทดลองโดยใช้วิธีการสุ่มตัวอย่างแบบง่ายเป็นกลุ่มควบคุม 1 กลุ่ม และกลุ่มทดสอบ 1 กลุ่ม แต่ละ

กลุ่มประกอบด้วยหนูเพศผู้และเพศเมียเพศละ 5 ตัว หนูทดลองแต่ละตัวได้รับการทำสัญลักษณ์ประจำตัวโดยการแต้มเบอร์ที่หาง และอดอาหารหนูทดลอง 16 ชั่วโมง ก่อนป้อนตัวอย่างทดสอบ แต่ให้น้ำดื่มตามปกติ.

- วิธีการทดสอบ

ในวันทดสอบชั่งน้ำหนักหนูทดลองทุกตัว ป้อนตัวอย่างทางปากให้หนูกลุ่มทดสอบ ในขนาด 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว และป้อนน้ำกลั่นแก่หนูกลุ่มควบคุมด้วยปริมาตรเทียบเท่ากับกลุ่มทดสอบ ภายหลังป้อนตัวอย่างทดสอบครบ 4 ชั่วโมง ให้อาหารแก่หนูทดลองทุกกลุ่ม.

- การสังเกตผลการทดสอบ

สังเกตและบันทึกอาการผิดปกติของหนูทดลองที่เวลา ½, 1 และ 3 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตอาการอย่างน้อยวันละครั้งทุกวันติดต่อกันเป็นเวลานาน 14 วัน.

ชั่งน้ำหนักหนูทดลองแต่ละตัวในวันที่ 1, 8 และ 15 (วันสิ้นสุดการทดสอบ) คำนวณค่าเฉลี่ยเปรียบเทียบน้ำหนักตัวหนูแต่ละกลุ่มทดสอบเทียบกับกลุ่มควบคุม และวิเคราะห์ค่าความแตกต่างของข้อมูลเพื่อประเมินผลของตัวอย่างทดสอบต่ออัตราการเจริญเติบโตของหนูทดลอง บันทึกความผิดปกติของอวัยวะภายใน (gross pathology) หนูทดลองที่แสดงอาการผิดปกติอย่างรุนแรง หรือหนูทดลองที่มีชีวิตรอดจนถึงวันสิ้นสุดการทดสอบครบ 15 วัน ทำการฆ่าโดยการให้สูดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และทำการผ่าตัดชันสูตรซากเพื่อตรวจสอบดูความผิดปกติของอวัยวะภายใน

2.3.9 การทดสอบปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อโดยวิธีการปลูกฝัง (implantation test)

ดำเนินการโดยปรับเปลี่ยนจากวิธีทดสอบของ ISO (2007) ISO 10993-6, Biological evaluation of medical devices- Part6: Tests for local effects after implantation.

- การเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างวัสดุทดแทนกระดูก TCP+HA 04237, TCP+$CaCO_3$, TC 1 และ TC 2 ทำการฆ่าเชื้อโดยวิธีการอบลมร้อนที่อุณหภูมิ 180°ซ. เป็นเวลา 3 ชั่วโมง.

- การเตรียมสัตว์ทดลอง

ใช้หนูแรทเพศผู้ น้ำหนัก 300-400 กรัม จำนวน 20 ตัว แบ่งเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 4 ตัว นำหนูทดลองมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ซึ่งมีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 24±1°ซ. และความชื้นสัมพัทธ์ที่ 50-70% เพื่อให้หนูทดลองปรับตัวคุ้นเคยกับสิ่งแวดล้อมในห้องปฏิบัติการ.

- การเตรียมตัวอย่างทดสอบและวิธีทดสอบ

วัสดุอุปกรณ์และตัวอย่างทดสอบได้ผ่านการอบนึ่งฆ่าเชื้อ สัตว์ทำการโกนขนบริเวณแนวหลังและทำความสะอาดผิวหนังตามขั้นตอนการเตรียมผ่าตัด ผ่าตัดเปิดผิวหนังและชั้นกล้ามเนื้อสันหลังแล้วนำตัวอย่างทดสอบใส่ไว้ในชั้นกล้ามเนื้อปริมาณ 1 กรัม จึงทำการเย็บปิดแผล ติดตามอาการต่อไป 1 เดือน เมื่อครบกำหนดจึงทำการเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อจากบริเวณที่มีการฝังตัวอย่างทดสอบเพื่อเตรียมเป็นสไลด์ชิ้นเนื้อสำหรับการวิเคราะห์ทางจุลพยาธิสภาพ.

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วย MTT assay

ผลจากการศึกษาความปลอดภัยของตัวอย่างทดสอบ “MEMBRANE HF 77” ต่อการเจริญของเซลล์ L929 พบว่า ที่ความเข้มข้นของการสกัดที่ 100% ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ โดยพบว่ามีอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ 99.00±0.14% และเมื่อประเมินผลการทดสอบตามเงื่อนไขดังกล่าวพบว่า ตัวอย่างทดสอบ “MEMBRANE HF 77” ไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ ค่าอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ในแต่ละความเข้มขัน ดังแสดงในตารางที่ 5.

ตารางที่ 5. ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วย MTT assay (อัตราการรอดชีวิตของเซลล์)

ลำดับที่	ตัวอย่าง	อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ (%)
1	กลุ่มควบคุมเชิงลบ	100.00±0.00
2	กลุ่มควบคุมเชิงบวก	14.14±1.57
3	100% "MEMBRANE HF 77"	99 .00±0.14
4	75% "MEMBRANE HF 77"	101.00±0.54
5	50% "MEMBRANE HF 77"	104.00±0.30
6	25% "MEMBRANE HF 77"	99.30±0.23
7	12.5% "MEMBRANE HF 77"	103.00±0.07
8	6.25% "MEMBRANE HF 77"	108.00±0.29

3.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์กระดูกด้วย MTS assay

จากการทดสอบพบว่า ตัวอย่างของวัสดุทดแทนกระดูกที่มีจำหน่ายในท้องตลาด และตัวอย่าง TCP+HA 04237 และ TCP+$CaCO_3$ มีค่าอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ไม่แตกต่างกัน โดยเซลล์มีอัตราการรอดชีวิตเทียบเท่ากับกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับตัวอย่างทดสอบแต่อย่างไร ผลการทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 6.

ตารางที่ 6. ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์กระดูก ด้วยวิธี MTS assay (อัตราการรอดชีวิตของงเซลล์)

ตัวอย่าง	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ (%)	ค่าเบี่ยงเบน (S.D.)
ควบคุมลบ	0	100.00	11.60
ตัวอย่างเปรียบเทียบที่มี	10	105.32	12.94
จำหน่ายในท้องตลาด	25	111.75	8.87
	50	114.74	10.17
	75	111.57	18.96
	100	107.64	18.59
TCP+HA 04237	10	98.36	13.58
	25	99.58	18.53
	50	100.79	14.65
	75	98.04	18.18
	100	91.61	12.26
TCP+$CaCO_3$	10	101.57	24.71
	25	105.25	19.94
	50	98.74	20.67
	75	103.46	24.37
	100	98.63	15.35
ควบคุมลบ (Triton-X)	0.10%	2.95	4.59

3.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วย Agar gel diffusion

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxic) ของผลิตภัณฑ์กาวติดฟันปลอม C 31 ตามหลักวิธีมาตรฐานของ ASTM (F748 : Practice for Selecting Generic Biological Test Methods for Materials and Devices) และมาตรฐาน ATCC (American Type Culture Collection, Cataloque of StrainII, USP Negative Control Plastic Reference Standard) และ ISO 10993-5 พบว่า ผลิตภัณฑ์กาวติดฟันปลอม C 31 ไม่ได้ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ ผลการทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 7.

ตารางที่ 7. ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี Agar gel diffusion

ชนิดตัวอย่าง	Zone Index	Lysis Index	Response index	Result
Filter Paper/Blank	0	0	0/0	None
C 31	0	0	0/0	None
กาวติดฟันปลอม (market brand)	0	0	0/0	None
Positive control (0.45% Neutral Red)	3	4	3/4	Marked

3.4 การทดสอบการก่อระคายเคืองต่อผิวหนังในกระต่าย

ภายหลังล้างตัวอย่างทดสอบออก และสังเกตความผิดปกติของผิวหนังกระต่ายที่ระยะเวลา 1, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตรวจพบอาการแดงเล็กน้อยของผิวหนังกระต่าย 1 ตัว ที่ได้รับการสาร C 1 และ C 31 ที่เวลา 1 ชั่วโมง ซึ่งอาการแดงดังกล่าวของผิวหนังกระต่ายหายไปภายใน 24 ชั่วโมง ของการตรวจผล ในขณะที่สารสกัดตัวอย่าง TCP+$CaCO_3$ อัตราส่วน 10 : 8, TCP+HA 04237 อัตราส่วน 70 : 30, TC 1 และ TC 2 ไม่แสดงการก่อระคายเคืองต่อผิวหนังกระต่าย คะแนนความผิดปกติของผิวหนังกระต่ายที่ได้รับตัวอย่างทดสอบต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 8-13 สำหรับคะแนนของผิวหนังกระต่ายทุกตัวบริเวณที่ได้รับน้ำกลั่น มีค่าเท่ากับ 0 (ไม่ได้แสดงในตาราง).

ตารางที่ 8. ผลการทดสอบการระคายเคืองต่อผิวหนังกระต่ายของตัวอย่าง C 1
(แสดงคะแนนความผิดปกติของผิวหนังกระต่ายบริเวณที่ได้รับ "C 1")

กระต่ายตัวที่	ระยะเวลาที่สังเกตอาการ (ชั่วโมง)							
	1		24		48		72	
	แดง	บวม	แดง	บวม	แดง	บวม	แดง	บวม
1	1	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0

ตารางที่ 9. ผลการทดสอบการระคายเคืองต่อผิวหนังกระต่ายของตัวอย่าง C 31

(แสดงคะแนนความผิดปกติของผิวหนังกระต่ายบริเวณที่ได้รับ "C 31")

กระต่าย ตัวที่	ระยะเวลาที่สังเกตอาการ (ชั่วโมง)							
	1		24		48		72	
	แดง	บวม	แดง	บวม	แดง	บวม	แดง	บวม
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	1	0	0	0	0	0	0	0

ตารางที่ 10. ผลการทดสอบการระคายต่อผิวหนังกระต่ายของตัวอย่าง TCP+$CaCO_3$

(แสดงคะแนนความผิดปกติของผิวหนังกระต่ายบริเวณที่ได้รับ "TCP+$CaCO_3$")

กระต่าย ตัวที่	ระยะเวลาที่สังเกตอาการ (ชั่วโมง)							
	1		24		48		72	
	แดง	บวม	แดง	บวม	แดง	บวม	แดง	บวม
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0

ตารางที่ 11. ผลการทดสอบการระคายต่อผิวหนังกระต่ายของตัวอย่าง TCP+HA 043237

(แสดงคะแนนความผิดปกติของผิวหนังกระต่ายบริเวณที่ได้รับ "TCP+HA 043237")

กระต่าย ตัวที่	ระยะเวลาที่สังเกตอาการ (ชั่วโมง)							
	1		24		48		72	
	แดง	บวม	แดง	บวม	แดง	บวม	แดง	บวม
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0

ตารางที่ 12. ผลการทดสอบการระคายต่อผิวหนังกระต่ายของตัวอย่าง TC 1

(แสดงคะแนนความผิดปกติของผิวหนังกระต่ายบริเวณที่ได้รับ "TC 1")

กระต่ายตัวที่	ระยะเวลาที่สังเกตอาการ (ชั่วโมง)							
	1		24		48		72	
	แดง	บวม	แดง	บวม	แดง	บวม	แดง	บวม
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0

ตารางที่ 13. ผลการทดสอบการระคายต่อผิวหนังกระต่ายของตัวอย่าง TC 2

(แสดงคะแนนความผิดปกติของผิวหนังกระต่ายบริเวณที่ได้รับ "TC 2")

กระต่ายตัวที่	ระยะเวลาที่สังเกตอาการ (ชั่วโมง)							
	1		24		48		72	
	แดง	บวม	แดง	บวม	แดง	บวม	แดง	บวม
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0

3.5 การทดสอบการก่ออาการแพ้ในหนูตะเภา

ตามวิธีทดสอบหมายเลข 406: Skin Sensitization (Buehler Method) of the OECD Guidelines for Testing of Chemicals (OECD 1992).

การทดสอบการก่ออาการแพ้ในหนูตะเภาตามวิธี Buehler Method พบว่า ตัวอย่างกาวติดฟันปลอม C 31 และตัวอย่างสารสกัดของวัสดุทดแทนกระดูก TCP+HA 043237 และ TCP+$CaCO_3$ ที่ได้รับการสัมผัสสารโดยตรงบนผิวหนังหนูตะเภาเป็นเวลาต่อเนื่องไม่ก่อให้เกิดการกระตุ้นผิวหนังให้มีปฏิกิริยาการแพ้ ผลการทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 14 และ 15.

ตารางที่ 14. ผลการทดสอบการก่ออาการแพ้ของตัวอย่าง C31 (Buehler method)

กลุ่มทดสอบ/ตัวอย่างทดสอบ	คะแนนความผิดปกติ				จำนวนหนูที่แสดงอาการแพ้	เปอร์เซ็นต์การแพ้
	0	1	2	3		
(1) กลุ่มควบคุม “น้ำกลั่น”						
การกระตุ้นอาการแพ้ - 24 ชั่วโมง	10	0	0	0	0/10	0%
การกระตุ้นอาการแพ้ - 48 ชั่วโมง	10	0	0	0	0/10	0%
(2) กลุ่มทดสอบ “กาวติดฟันปลอม”						
การกระตุ้นอาการแพ้ - 24 ชั่วโมง	20	0	0	0	0/20	0%
การกระตุ้นอาการแพ้ - 48 ชั่วโมง	20	0	0	0	0/20	0%
(3) กลุ่มควบคุมบวก “0.075% (W/V) DNCB”						
การกระตุ้นอาการแพ้ - 24 ชั่วโมง	0	1	6	3	10/10	100%
การกระตุ้นอาการแพ้ - 48 ชั่วโมง	1	5	4	0	9/10	90%

ตารางที่ 15. ผลการทดสอบการก่ออาการแพ้ของตัวอย่าง TCP+HA 043237 และ TCP+$CaCO_3$ (Buehler Method)

กลุ่มทดสอบ/ตัวอย่างทดสอบ	คะแนนความผิดปกติ				จำนวนหนูที่แสดงอาการแพ้	เปอร์เซ็นต์การแพ้
	0	1	2	3		
(1) กลุ่มควบคุม “น้ำกลั่น”						
การกระตุ้นอาการแพ้ - 24 ชั่วโมง	10	0	0	0	0/10	0%
การกระตุ้นอาการแพ้ - 48 ชั่วโมง	10	0	0	0	0/10	0%
(2) กลุ่มทดสอบ “TCP+HA 043237”						
การกระตุ้นอาการแพ้ - 24 ชั่วโมง	20	0	0	0	0/20	0%
การกระตุ้นอาการแพ้ - 48 ชั่วโมง	20	0	0	0	0/20	0%
(3) กลุ่มทดสอบ “TCP+$CaCO_3$”						
การกระตุ้นอาการแพ้ - 24 ชั่วโมง	20	0	0	0	0/20	0%
การกระตุ้นอาการแพ้ - 48 ชั่วโมง	20	0	0	0	0/20	0%

ตารางที่ 15. (ต่อ)

กลุ่มทดสอบ/ตัวอย่างทดสอบ	คะแนนความผิดปกติ				จำนวนหนูที่แสดงอาการแพ้	เปอร์เซ็นต์การแพ้
	0	1	2	3		
(4) กลุ่มควบคุมบวก "0.075 % (W/V) DNCB"						
การกระตุ้นอาการแพ้ - 24 ชั่วโมง	0	0	10	0	10/10	100%
การกระตุ้นอาการแพ้ - 48 ชั่วโมง	0	7	3	0	10/10	100%

3.6 การทดสอบการก่ออาการแพ้ในหนูตะเภา

ดำเนินการตามวิธีการทดสอบ ISO (2002) ISO 10993-10, 2nd ed., Tests for irritation and delayed-type hypersensitivity และ ISO (2002) ISO 10993-12, 2nd Edition, Sample preparation and reference materials. (Maximization test).

จากการทดสอบการก่ออาการแพ้ของวัสดุทดแทนกระดูก TC 1 และ TC 2 ด้วยวิธี Maximization test หนูทุกตัวที่ได้รับการกระตุ้นซ้ำด้วยสารสกัดของตัวอย่างไม่ได้แสดงอาการผิวหนังแดงหรือปฏิกิริยาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของผิวหนังแบบ delayed-type hypersensitivity ผลการทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 16.

ตารางที่ 16. ผลการทดสอบการก่ออาการแพ้ของตัวอย่าง TC 1 และ TC 2 (maximization test)

กลุ่มทดสอบ/ตัวอย่างทดสอบ	คะแนนความผิดปกติ				จำนวนหนูที่แสดงอาการแพ้	เปอร์เซ็นต์การแพ้
	0	1	2	3		
(1). กลุ่มควบคุม "น้ำกลั่น"						
การกระตุ้นอาการแพ้ - 24 ชั่วโมง	10	0	0	0	0/10	0%
การกระตุ้นอาการแพ้ - 48 ชั่วโมง	10	0	0	0	0/10	0%
(2). กลุ่มทดสอบ "TCP+HA 043237"						
การกระตุ้นอาการแพ้ - 24 ชั่วโมง	20	0	0	0	0/20	0%
การกระตุ้นอาการแพ้ - 48 ชั่วโมง	20	0	0	0	0/20	0%

ตารางที่ 16. (ต่อ)

กลุ่มทดสอบ/ตัวอย่างทดสอบ	คะแนนความผิดปกติ				จำนวนหนูที่แสดงอาการแพ้	เปอร์เซ็นต์การแพ้
	0	1	2	3		
(3). กลุ่มทดสอบ “TCP+$CaCO_3$”						
การกระตุ้นอาการแพ้ - 24 ชั่วโมง	20	0	0	0	0/20	0%
การกระตุ้นอาการแพ้ - 48 ชั่วโมง	20	0	0	0	0/20	0%
(3). กลุ่มควบคุมบวก “0.075% (W/V) DNCB”						
การกระตุ้นอาการแพ้ - 24 ชั่วโมง	4	6	0	0	10/10	100%
การกระตุ้นอาการแพ้ - 48 ชั่วโมง	6	4	0	0	10/10	100%

3.7 การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางระบบหมุนเวียนเลือด

จากการดำเนินการตามวิธีทดสอบของ ISO (2006) ISO 10993-11, 2nd ed., Tests for systemic โดยฉีดสารสกัดของตัวอย่าง TCP+HA 043237, TCP+$CaCO_3$, TC 1 และ TC 2 ตามวิธีการสกัดพบว่า หนูทุกตัวภายหลังการฉีดทันที ไม่ได้แสดงอาการความผิดปกติแต่อย่างไร และหนูทุกตัวยังคงมีชีวิตจนถึงวันครบกำหนดการทดลอง โดยไม่พบอาการทางคลินิกที่แสดงให้เห็นถึงการได้รับพิษจากสารทดสอบ การผ่าชันสูตรซากหลังเสร็จสิ้นการทดลองไม่พบความผิดปกติของอวัยวะภายในใดๆ ผลการทดสอบแสดงให้เห็น ดังแสดงในตารางที่ 17-20.

ตารางที่ 17. ผลการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางระบบหมุนเวียนเลือดของตัวอย่าง “TCP+HA 043237” และ “TCP+$CaCO_3$” (แสดงน้ำหนักตัวในแต่ละสัปดาห์)

ตัวอย่างทดสอบ/ปริมาตร	สัตว์ทดลอง	เพศ	น้ำหนักตัว (กรัม)		
			วันที่ 1	วันที่ 8	วันที่ 15
กลุ่มควบคุม 0.9% น้ำเกลือสำหรับฉีด 0.5 มิลลิลิตร	1	ผู้	29	34	35
	2	ผู้	29	33	35
	3	ผู้	29	33	34
	4	ผู้	29	34	35
	5	ผู้	28	33	35

ตารางที่ 17. (ต่อ)

ตัวอย่างทดสอบ/ปริมาตร	สัตว์ทดลอง	เพศ	น้ำหนักตัว (กรัม)		
			วันที่ 1	วันที่ 8	วันที่ 15
กลุ่มทดสอบ	6	ผู้	28	33	35
“TCP+HA”	7	ผู้	29	34	35
0.5 มิลลิลิตร	9	ผู้	27	32	33
	10	ผู้	28	34	35
กลุ่มทดสอบ	11	ผู้	29	33	34
“TCP+$CaCO_3$”	12	ผู้	30	32	35
0.5 มิลลิลิตร	13	ผู้	30	32	34
	14	ผู้	29	32	34
	15	ผู้	28	33	35

ตารางที่ 18. ผลการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางระบบหมุนเวียนเลือดของตัวอย่าง “TCP+HA 043237” และ “TCP+$CaCO_3$” (แสดงอัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวของหนู)

เพศ	ตัวอย่างทดสอบ/ปริมาตร	* ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (กรัม)	
		วันที่ 8	วันที่ 15
ผู้	กลุ่มควบคุม 0.9% น้ำเกลือสำหรับฉีด 0.5 มิลลิลิตร	4.60±0.24	6.00±0.32
	กลุ่มทดสอบ “TCA+HA” 0.5 มิลลิลิตร	5.80±0.58	7.00±0.55
	กลุ่มทดสอบ “TCP+$CaCO_3$” 0.5 มิลลิลิตร	4.20±0.37	6.20±0.49

หมายเหตุ: * น้ำหนักหนูทดลองที่เพิ่มขึ้น Mean±SEM

ตารางที่ 19. ผลการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางระบบหมุนเวียนเลือดของตัวอย่าง “TC 1” และ “TC 2” (แสดงน้ำหนักตัวของหนูเมื่อเริ่มต้น ในระหว่างการทดลอง และเมื่อสิ้นสุดการทดสอบ)

ตัวอย่างทดสอบ/ปริมาตร	สัตว์ทดลอง	เพศ	น้ำหนักตัว (กรัม)		
			วันที่ 1	วันที่ 8	วันที่ 15
กลุ่มควบคุม 0.9% น้ำเกลือสำหรับฉีด 0.5 มิลลิลิตร	1	ผู้	29	34	36
	2	ผู้	30	36	39
	3	ผู้	30	34	38
	4	ผู้	29	31	32
	5	ผู้	28	34	36
กลุ่มทดสอบ “TC 1” 0.5 มิลลิลิตร	6	ผู้	29	36	40
	7	ผู้	30	31	33
	8	ผู้	28	34	38
	9	ผู้	27	33	37
	10	ผู้	28	34	36
กลุ่มทดสอบ “TC 2” 0.5 มิลลิลิตร	11	ผู้	30	35	38
	12	ผู้	29	34	38
	13	ผู้	27	35	37
	14	ผู้	29	36	40
	15	ผู้	30	33	37

ตารางที่ 20. ผลการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางระบบหมุนเวียนเลือดของตัวอย่าง “TC 1” และ “TC 2” (แสดงอัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวของหนู)

เพศ	ตัวอย่างทดสอบ/ปริมาตร	* ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (กรัม)	
		วันที่ 8	วันที่ 15
ผู้	กลุ่มควบคุม 0.9% น้ำเกลือสำหรับฉีด 0.5 มิลลิลิตร	4.60±0.74	7.00±1.04
	กลุ่มทดสอบ “TC 1” 0.5 มิลลิลิตร	5.20±1.06	8.40±1.43
	กลุ่มทดสอบ “TCP 2” 0.5 มิลลิลิตร	5.60 ± 0.87	9.00±0.70

หมายเหตุ: * น้ำหนักหนูทดลองที่เพิ่มขึ้น Mean±SEM

3.8 การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางการกิน

จากการทดสอบพบว่า หนูกลุ่มที่ได้รับตัวอย่างทดสอบ “กาวติดฟัน C 31” ขนาด 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ไม่พบอาการผิดปกติและไม่พบการตาย และตรวจไม่พบความผิดปกติของอวัยวะภายในจากการชันสูตรซาก (gross pathology) เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการทดสอบ.

อัตราการตายของหนูทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 21 น้ำหนักตัวของหนูทดลองในระหว่างการทดสอบ (วันที่ 8) และสิ้นสุดการทดสอบ (วันที่ 15) ดังแสดงในตารางที่ 22 น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นของหนูทดลองในระหว่างการทดสอบ และเมื่อสิ้นสุดการทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 23 ผลการชันสูตรซากหนูทดลองเมื่อสิ้นสุดการทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 24.

ตารางที่ 21. ผลการทดสอบความเป็นพิษทางการกินของตัวอย่าง C 31 (อัตราการตายของหนูทดลองตลอดการสังเกตผลนาน 14 วัน)

ตัวอย่างทดสอบ/ขนาดของตัวอย่างทดสอบ	[a]อัตราการตาย		รวม
	เพศผู้	เพศเมีย	
กลุ่มควบคุม น้ำกลั่น ปริมาตรเทียบเท่ากับกลุ่มทดสอบ	0/5	0/5	0/10
กลุ่มทดสอบ “กาวติดฟัน C 31” 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว	0/5	0/5	0/10

หมายเหตุ: a จำนวนสัตว์ทดลองที่ตาย/จำนวนสัตว์ทดลองที่ใช้ทดสอบ

ตารางที่ 22. ผลการทดสอบความเป็นพิษทางการกินของตัวอย่าง C 31 (น้ำหนักตัวของหนูทดลองบันทึกในระหว่างการทดสอบ และเมื่อสิ้นสุดการทดสอบ)

ตัวอย่างทดสอบ/ขนาด	สัตว์ทดลอง	เพศ	น้ำหนักตัว (กรัม)		
			[a]วันที่ 1	วันที่ 8	วันที่ 15
กลุ่มควบคุม	1	ผู้	398	431	453
น้ำกลั่น	2	ผู้	380	410	420
ปริมาตรเทียบเท่ากับกลุ่มทดสอบ	3	ผู้	384	411	437
	4	ผู้	359	375	381
	5	ผู้	392	404	410
	6	เมีย	222	237	242
	7	เมีย	236	255	260
	8	เมีย	240	231	264
	9	เมีย	228	247	265
	10	เมีย	220	247	255
กลุ่มทดสอบ	11	ผู้	379	411	420
“กาวติดฟัน C 31”	12	ผู้	393	420	428
2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว	13	ผู้	375	417	426
	14	ผู้	357	426	431
	15	ผู้	357	432	447
	16	เมีย	247	255	275
	17	เมีย	242	262	272
	18	เมีย	237	242	258
	19	เมีย	223	252	263
	20	เมีย	238	267	266

หมายเหตุ: a น้ำหนักตัวเริ่มต้นของหนูทดลองภายหลังอดอาหาร 16 ชั่วโมง ก่อนป้อนตัวอย่างทดสอบ

ตารางที่ 23. ผลการทดสอบความเป็นพิษทางการกินของตัวอย่าง C 31 (อัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวของหนูทดลองในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ)

เพศ	ตัวอย่างทดสอบ/ขนาด	*ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (กรัม)	
		วันที่ 8	วันที่ 15
ผู้	กลุ่มควบคุม น้ำกลั่น ปริมาตรเทียบเท่ากับกลุ่มทดสอบ	23.60±4.07	37.60±7.65
	กลุ่มทดสอบ “กาวติดฟัน C 31” 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว	**49.00±9.72	58.20±10.34
เมีย	กลุ่มควบคุม น้ำกลั่น ปริมาตรเทียบเท่ากับกลุ่มทดสอบ	14.20±6.11	28.00±1.80
	กลุ่มทดสอบ “กาวติดฟัน C 31” 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว	18.20±5.06	29.40±3.05

หมายเหตุ: * น้ำหนักหนูทดลองที่เพิ่มขึ้น Mean ± SEM

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 24. ผลการทดสอบความเป็นพิษทางการกินของตัวอย่าง C 31 (การตรวจชันสูตรพยาธิภาพเมื่อสิ้นสุดการทดสอบ)

ตัวอย่างทดสอบ/ขนาด	สัตว์ทดลอง	เพศ	ผลการชันสูตรอวัยวะภายใน (gross pathology)
กลุ่มควบคุม น้ำกลั่น ปริมาตรเทียบเท่ากับกลุ่มทดสอบ	1	ผู้	ปกติ
	2	ผู้	ปกติ
	3	ผู้	ปกติ
	4	ผู้	ปกติ
	5	ผู้	ปกติ
	6	เมีย	ปกติ
	7	เมีย	ปกติ
	8	เมีย	ปกติ
	9	เมีย	ปกติ
	10	เมีย	ปกติ

ตารางที่ 24. (ต่อ)

ตัวอย่างทดสอบ/ขนาด	สัตว์ทดลอง	เพศ	ผลการชันสูตรอวัยวะภายใน (gross pathology)
กลุ่มทดสอบ “กาวติดฟัน C 31” 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว	11	ผู้	ปกติ
	12	ผู้	ปกติ
	13	ผู้	ปกติ
	14	ผู้	ปกติ
	15	ผู้	ปกติ
	16	เมีย	ปกติ
	17	เมีย	ปกติ
	18	เมีย	ปกติ
	19	เมีย	ปกติ
	20	เมีย	ปกติ

3.9 การทดสอบปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อโดยวิธีการปลูกฝัง (implantation test)

จากผลการทดสอบหนูทุกตัวมีสุขภาพปกติภายหลังการผ่าตัดปลูกฝังวัสดุทดแทนกระดูก แผลผ่าตัดหายและปิดสนิทภายใน 7 วัน ไม่มีลักษณะการติดเชื้อ หรือการต่อต้านของเนื้อเยื่อแสดงให้เห็น เมื่อครบกำหนด 1 เดือน หลังผ่าตัดผิวหนังบริเวณที่ผ่าตัดของหนูทุกตัวยังคงสภาพปกติ ไม่มีการเกิดก้อนฝีหนองหรือผิวหนังมีลักษณะบวมจากปฏิกิริยาต่อต้านของเนื้อเยื่อ แสดงให้เห็นจากการดำเนินการผ่าซากหลังครบกำหนดระยะเวลาการทดสอบ, บริเวณที่ผ่าตัด และชั้นกล้ามเนื้อปิดเรียบร้อย ยังคงพบชิ้นส่วนของตัวอย่างปรากฏในชั้นกล้ามเนื้อสันหลังโดยมีเยื่อ fibrous tissue ยึดคลุมให้เห็นบางๆ ลักษณะของตัวอย่างไม่มีความเปลี่ยนแปลงอย่างใด ไม่พบความผิดปกติของม้าม, ต่อมน้ำเหลืองหรืออวัยวะภายในของสัตว์ทดลอง ผลการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 25.

ตารางที่ 25. ผลการทดสอบปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อโดยวิธีการปลูกฝังของวัสดุทดแทนกระดูก

ตัวอย่างทดสอบ	สัตว์ทดลอง	เพศ	น้ำหนักตัว (กรัม)		พยาธิสภาพ/อาการทางคลินิก
			[a]วันที่ 1	วันที่ 30	
กลุ่มควบคุม	1	ผู้	283	403	ไม่พบการเกิด nodule หรือ
Sham control	2	ผู้	311	465	abscess ลักษณะจุลพยาธิสภาพพบ
	3	ผู้	280	408	inflammatory cell infiltration
	4	ผู้	294	411	เล็กน้อย บริเวณรอบแผล
กลุ่มทดสอบ	5	ผู้	370	462	ไม่พบการเกิด nodule หรือ
“TCP+HA”	6	ผู้	399	495	abscess ลักษณะจุลพยาธิสภาพพบ
	7	ผู้	416	478	inflammatory cell infiltration
	8	ผู้	420	507	เล็กน้อย บริเวณรอบแผลและชิ้นตัวอย่าง
กลุ่มทดสอบ	9	ผู้	293	407	ไม่พบการเกิด nodule หรือ
“TCP+$CaCO_3$”	10	ผู้	312	388	abscess ลักษณะจุลพยาธิสภาพพบ
	11	ผู้	299	389	inflammatory cell infiltration
	12	ผู้	304	408	เล็กน้อย บริเวณรอบแผลและชิ้นตัวอย่าง
กลุ่มทดสอบ	13	ผู้	448	521	ไม่พบการเกิด nodule หรือ
“TC 1”	14	ผู้	433	486	abscess ลักษณะจุลพยาธิสภาพพบ
	15	ผู้	423	466	inflammatory cell infiltration
	16	ผู้	393	472	เล็กน้อย บริเวณรอบแผลและชิ้นตัวอย่าง
กลุ่มทดสอบ	17	ผู้	442	502	ไม่พบการเกิด nodule หรือ
“TC 2”	18	ผู้	401	480	abscess ลักษณะจุลพยาธิสภาพพบ
	19	ผู้	420	485	inflammatory cell infiltration
	20	ผู้	429	508	เล็กน้อย บริเวณรอบแผลและชิ้นตัวอย่าง

หมายเหตุ: a น้ำหนักตัวเริ่มต้นของหนูทดลองภายหลังอดอาหาร 16 ชั่วโมง ก่อนป้อนตัวอย่างทดสอบ

4. สรุปผลการวิจัย

การทดสอบความเป็นพิษที่เกิดขึ้นในเซลล์เพาะเลี้ยง สามารถช่วยประเมินความเป็นพิษในเบื้องต้นของสารเคมีที่อาจปนเปื้อนหรือตกค้างอยู่ในวัสดุที่จะนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ ซึ่งสามารถเลือกทำการทดสอบโดยวิธีการสัมผัสโดยตรงและโดยอ้อมอันขึ้นกับลักษณะของวัสดุที่นำมาทดสอบ การทดสอบแบบสัมผัสโดยตรงในวัสดุที่เป็นโลหะหรือพอลิเมอร์อาจใช้วิธีการ นำไปสกัดในตัวกลางของเหลว เป็นการจำลองสภาพที่อยู่ในร่างกาย ซึ่งหากมีสารเคมีที่อาจเป็นอันตรายต่อเซลล์จะได้ถูกปลดปล่อยออกมา จากการทดสอบ Membrane HF 77 ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสนั้นยังไม่พบว่าสารสกัดของ Membrane HF 77 ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์แต่อย่างไร อย่างไรก็ตาม การพัฒนาวัสดุเพื่อใช้ในงาน hemodialysis ยังมีเรื่องของประสิทธิภาพการคัดกรองสารชีวเคมีต่างในเลือดที่จะต้องทำการพัฒนาต่อไป.

กาวติดฟันปลอม C 31 ได้ทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี Agar gel diffusion ซึ่งเป็นการสัมผัสโดยอ้อม เนื่องจากวัสดุนี้เป็นพอลิเมอร์ที่ดูดซึมน้ำได้มาก ผลจากการทดสอบไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ การทดสอบในสัตว์ทดลอง คือ การก่อระคายเคือง และการก่ออาการภูมิแพ้ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน ไม่ก่อให้เกิดอาการผิดปกติ อย่างไรก็ตาม วัสดุกาวติดฟันปลอมนี้ยังอาจต้องได้รับการพัฒนาต่อไปเพื่อให้ตัวผลิตภัณฑ์มีสีที่คงตัว และรูปลักษณะที่คงตัวเมื่อเก็บไว้เป็นเวลานาน.

การทดสอบวัสดุทดแทนกระดูก TCP+$CaCO_3$ และ TCP+HA 04237 เนื่องจากเป็นวัสดุที่ปลูกฝังลงในบริเวณที่เชื่อมต่อกับกระดูก จึงทำการเลือกทดสอบกับเซลล์ osteoblast ซึ่งในการทดลองนี้ คือ Mouse pre-osteoblast (MC3T3-E1 subclone 4) ผลปรากฏว่า สารสกัดที่ได้จากการสกัดตัวอย่างนี้ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ จึงนำไปทำการทดสอบในสัตว์ทดลองตามข้อกำหนดของ ISO 10993 ที่เกี่ยวข้องกับอุปกรณ์ทางการแพทย์ ได้ทำการทดสอบความเป็นพิษต่อระบบหมุนเวียนเลือด, ความก่อระคายเคืองต่อผิวหนังกระต่าย, การก่ออาการภูมิแพ้ ซึ่งไม่พบว่าก่อให้เกิดผลกระทบกับสัตว์ทดลอง และเนื่องจากวัสดุทดแทนกระดูกเป็นวัสดุที่จะต้องถูกฝังอยู่ในร่างกายเป็นระยะเวลายาวนาน จึงได้ทำการทดสอบในระยะยาว. โดยในงานวิจัยนี้ได้เลือกทำการปลูกฝังวัสดุไว้ในกล้ามเนื้อเป็นเวลา 1 เดือน เพื่อดูผลปฏิกิริยาการตอบสนองของเนื้อเยื่อต่อวัสดุทดแทนกระดูก จากการทดสอบยังไม่พบว่าวัสดุทดแทนกระดูกที่พัฒนาขึ้น แสดงให้เห็นความเป็นพิษหรือปัญหาความเข้ากันไม่ได้กับเนื้อเยื่อร่างกาย ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวัสดุ TCP+$CaCO_3$, TCP+HA 04237, TC 1 และ TC 2 มีแนวโน้มที่จะพัฒนาเป็นวัสดุทดแทนกระดูกได้ต่อไป.

งานวิจัยนี้ได้ดำเนินการเลือกพัฒนาวิธีการทดสอบความเป็นพิษและความเข้ากันได้ของวัสดุแต่ละประเภทให้เหมาะสมกับสภาพของวัสดุที่จะใช้ในทางการแพทย์ ซึ่งสามารถให้ข้อมูลกับผู้พัฒนาผู้ผลิต ถึงแนวทางและกระบวนการผลิตวัสดุที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้จริงในผู้ป่วยได้อย่างปลอดภัย โดยจากการทดสอบวัสดุหลายๆ ชนิดพบว่า สามารถพัฒนาวัสดุที่มีความปลอดภัยได้ แต่ยังอาจต้องคำนึงถึงเรื่องของการใช้งานและความคงตัวของวัสดุอีกด้วย.

5. แนวทางการนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ชีววัสดุหรือผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในทางการแพทย์หรือในงานทันตกรรม จะเป็นวัสดุที่จะต้องสัมผัสกับร่างกายของผู้ป่วย หรือบางครั้งมีความจำเป็นที่จะต้องทำการปลูกฝังอยู่ในร่างกายผู้ป่วยเป็นระยะเวลานาน ซึ่งวัสดุดังกล่าวนั้นอาจส่งผลกระทบต่อร่างกายผู้ป่วยได้. ความปลอดภัยของวัสดุนั้นจึงเป็นปัจจัยที่ต้องคำนึงอย่างมาก ความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ไม่ได้ขึ้นอยู่กับการเลือกวัสดุที่เข้ากันได้กับร่างกายเท่านั้น แต่ยังขึ้นอยู่กับกระบวนการผลิตที่อาจมีการปนเปื้อนสารเคมีต่างๆ, ความเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ, ทางเคมี หรือแม้แต่การปนเปื้อนเชื้อจุลชีพก็สามารถส่งผลกระทบต่อความปลอดภัยของผู้ป่วยได้. ดังจะเห็นได้ว่า การพัฒนาชีววัสดุทางทันตกรรมจะต้องอาศัยองค์ความรู้ขั้นสูงเพื่อให้งานนั้นมีความปลอดภัยต่อร่างกาย และงานวิจัยนี้ได้นำเสนอและแสดงให้เห็นตัวอย่างของชีววัสดุทางทันตกรรมที่ได้ผ่านการวิจัยและพัฒนาและศึกษาความปลอดภัยอย่างเป็นระบบ ผลการวิจัยนี้สามารถก่อให้เกิดประโยชน์ต่อกลุ่มต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 26.

ตารางที่ 26. กลุ่มเป้าหมายการนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ รูปแบบการนำไปใช้ประโยชน์ และผลลัพธ์และผลกระทบที่คาดว่าจะเกิดขึ้น

กลุ่มเป้าหมาย (ภาคอุตสาหกรรม/ บริการ/สังคมชุมชน)	หน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับการนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์	รูปแบบการนำไปใช้ประโยชน์/ การนำไปต่อยอดให้เกิดมูลค่าเพิ่ม	ผลลัพธ์จากการนำไปใช้ประโยชน์	ผลกระทบที่คาดว่าจะเกิดขึ้นทางเศรษฐกิจ สังคม และสิ่งแวดล้อม
สถาบันการศึกษา	- วว. - อาจารย์ นักศึกษาในระดับอุดมศึกษา	- วว. นำข้อมูลไปสนับสนุนผลิตภัณฑ์เพื่อถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตในกับเอกชนต่อไป - อาจารย์ นักศึกษานำข้อมูลในการวิจัยต่อไป	- ได้สิทธิบัตรและผลิตภัณฑ์ต้นแบบ - ได้ผลงานตีพิมพ์เพื่อเป็นข้อมูลให้กับนักวิจัยอื่นต่อไป	- ประเทศไทยเป็นที่ยอมรับด้านการศึกษาและงานวิจัยมากยิ่งขึ้น
อุตสาหกรรม	- บริษัทผู้ผลิตชีววัสดุทางทันตกรรม	- รับถ่ายทอดเทคโนโลยีเพื่อทำการผลิต	- ได้ผลิตภัณฑ์ใหม่ๆ เกิดขึ้นในประเทศ - นำผลิตภัณฑ์ไปจำหน่ายในต่างประเทศ	- ลดการนำเข้าจากต่างประเทศและเพิ่มตัวเลือกผลิตภัณฑ์ให้มากขึ้น - เพิ่มรายได้เข้าประเทศ

ตารางที่ 26. (ต่อ)

กลุ่มเป้าหมาย (ภาคอุตสาหกรรม/ บริการ/สังคมชุมชน)	หน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับการนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์	รูปแบบการนำไปใช้ประโยชน์/ การนำไปต่อยอดให้เกิดมูลค่าเพิ่ม	ผลลัพธ์จากการนำไปใช้ประโยชน์	ผลกระทบที่คาดว่าจะเกิดขึ้นทางเศรษฐกิจ สังคม และสิ่งแวดล้อม
สังคม	- คลินิกโรงพยาบาลต่างๆ - ผู้ป่วย	- ได้รับรู้ข้อมูลของผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาขึ้นในประเทศ	- จำนวนผู้ป่วยเลือกใช้ผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ในประเทศเพิ่มขึ้น	- ประชาชนเข้าถึงบริการทางทันตกรรมขั้นสูงได้ง่ายขึ้น - ลดการขาดดุลการค้า

ดังที่ได้เป็นนโยบายของชาติเพื่อพัฒนาขีดความสามารถในการแข่งขันของประเทศ โดยกรอบการพัฒนาที่สำคัญอย่างหนึ่ง คือ การสร้างนวัตกรรมและพัฒนางานวิจัยของประเทศในก้าวหน้าเทียบเท่าระดับสากล ในกระบวนการงานวิจัยนี้ได้ขับเคลื่อนให้เกิดความรู้ ความเข้าใจใหม่ๆ ต่อการพัฒนาชีววัสดุทางทันตกรรมและวิธีการทดสอบความปลอดภัยของวัสดุเหล่านี้ ข้อมูลที่เกิดขึ้นนี้ซึ่งจะเกิดการเผยแพร่ในวงการการศึกษา จะเกิดการกระตุ้นการคิดค้นวิจัยวัสดุใหม่เพื่อตอบสนองต่อความต้องการของผู้ป่วยอย่างต่อเนื่อง. เมื่องานวิจัยชิ้นหนึ่งสามารถเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่นำไปใช้ได้จริง ก่อให้เกิดการสร้างรายได้ให้กับผู้ประกอบการ และผู้ประกอบการสามารถที่จะมองเห็นกำไรที่เกิดจากการคิดค้นนวัตกรรม เกิดเป็นความต้องการพัฒนานวัตกรรมของตนเองก็สามารถจัดสรรงบประมาณบางส่วนจากกำไรสู่วงจรการวิจัย ให้งานวิจัยมีแรงขับเคลื่อนจากความต้องการของภาคอุตสาหกรรม การสร้างความร่วมมือระหว่างองค์กรที่มีความเชี่ยวชาญในด้านที่แตกต่างกันจะเกิดเป็นรูปธรรม และเกิดการสร้างนักวิจัยรุ่นใหม่ขึ้นเพื่อทำงานในวงการต่อไป.

ปัจจุบันบริษัทที่ผลิตวัสดุทางการแพทย์ภายในประเทศมีเพียงจำนวนน้อย และวัสดุที่ผลิตโดยส่วนใหญ่เป็นกลุ่มวัสดุสิ้นเปลืองที่ใช้ภายนอกร่างกาย ไม่ได้ใช้เทคโนโลยีขั้นสูง และมีราคาไม่แพง เนื่องจากการพัฒนาวัสดุใหม่ๆ ที่ต้องนำไปสัมผัสหรือปลูกฝังในผู้ป่วย จะต้องมีการพัฒนาและวิจัยขั้นสูงซึ่งบริษัทไม่สามารถที่จะดำเนินการในส่วนนี้ได้. การรับเทคโนโลยีจากสถาบันวิจัยและการศึกษาของภาครัฐเพื่อไปผลิตจำหน่ายต่อจะเป็นช่องทางที่สามารถเป็นไปได้ของภาคเอกชน ทำให้ไม่ต้องลงทุนและเสี่ยงต่อความไม่ประสบผลสำเร็จจากการดำเนินการวิจัยเอง และไม่ต้องสิ้นเปลืองเวลาขณะที่ภาคเอกชนมีความสามารถในการผลิตเป็นปริมาณมาก มีช่องทางการกระจายสินค้าและ

จำหน่ายเพื่อให้ผลิตภัณฑ์สามารถเข้าถึงผู้บริโภคอย่างทั่วถึง ภาคเอกชนจะสามารถสร้างรายได้จากงานวิจัยของภาครัฐ และความจำเป็นในการนำเข้าผลิตภัณฑ์ที่มีราคาแพงจากต่างประเทศก็จะลดน้อยลงตามลำดับ.

การเลือกใช้วัสดุหรือผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ในผู้ป่วยนั้น โดยส่วนใหญ่ขึ้นอยู่กับดุลยพินิจของแพทย์ผู้ที่ทำการรักษา โดยแพทย์ผู้รักษาย่อมต้องมีความรับผิดชอบต่อผลของการรักษานั้น ดังนั้น การเลือกใช้วัสดุหรือผลิตภัณฑ์ใดๆ แพทย์ต้องคำนึงถึงความน่าเชื่อถือของผลิตภัณฑ์เพื่อความปลอดภัยต่อตัวผู้ป่วย. ผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์มักเป็นสินค้านำเข้าที่ผลิตขึ้นในต่างประเทศ ซึ่งมีการลงทุนวิจัยและทดสอบความปลอดภัยมาแล้วแต่มักมีราคาแพงมาก ผู้ป่วยบางรายเท่านั้นที่มีฐานะทางเศรษฐกิจดีจึงจะสามารถเข้าถึงการบริการได้ แม้ว่าผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาขึ้นในประเทศจะได้ผ่านการรับรองของหน่วยงานที่ให้การรับรองและขึ้นทะเบียนแล้วก็ตาม. การนำเสนอข้อมูลงานวิจัยและกระบวนการวิจัยต่างๆ ให้เห็นอย่างชัดเจนย่อมสร้างความเชื่อมั่นของตัวผลิตภัณฑ์ให้กับแพทย์ได้ การทำให้กระบวนการยอมรับของแพทย์เกิดขึ้นได้ จะส่งผลให้ผู้ป่วยมีโอกาสเข้าถึงการรักษาขั้นสูง ที่เป็นผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาในประเทศและมีราคาถูกกว่า ผู้ป่วยและประชาชนทั่วไปก็สามารถได้รับการรักษาที่ดีมีคุณภาพ.

6. ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาความเป็นพิษที่อาจเกิดขึ้นต่อเซลล์หรือร่างกายของวัสดุชีวการแพทย์ ซึ่งจำเป็นต้องทำควบคู่ไปกับขั้นตอนการพัฒนาผลิตภัณฑ์ แต่การทดสอบบางอย่างที่กระทำในสัตว์ทดลองจะต้องใช้เวลามาก อีกทั้งยังเป็นการใช้ชีวิตของสัตว์จำนวนมาก ดังนั้น เพื่อให้เกิดความเหมาะสมต่อจริยธรรมการใช้สัตว์ทดลอง, ลดค่าใช้จ่าย และระยะเวลาการดำเนินงาน ผู้พัฒนาผลิตภัณฑ์อาจต้องใช้การทดสอบในหลอดทดลองเป็นหลัก เพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานความเป็นพิษสำหรับนำไปปรับปรุงพัฒนาการผลิตจนเมื่อขั้นตอนการผลิตเสร็จสิ้น ได้ผลิตภัณฑ์ต้นแบบจึงนำเข้าสู่กระบวนการทดสอบในสัตว์ต่อไป.

7. เอกสารอ้างอิง

Akarasereenont, P., Bakhle, Y. S., Thiemermann, C. and Vane, J. R., 1995. Cytokine-mediated induction of cyclo-oxigenase-2 by activation of tyrosine kinase in bovine endothelial cells stimulated by bacterial lipopoly-saccharide. *British Journal of Pharmacology*, **115**, pp. 401-408.

Ekdahl, K. N., Lambris, J. D., Elwing H., Ricklin, D., Nilsson, P. H., Teramura Y, Nicholls, I.A. and Nilsson, B., 2011. Innate immunity activation on biomaterial surfaces: A mechanistic model and coping strategies. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **63**, pp. 1042-1050.

Harmand, M. F., 1997. Cytotoxicity Part I: Toxicological risk evaluation using cell culture. *In*: Braybrook, J. H., ed. Biocompatibility Assessment of Medical Devices and Materials, Biomaterials Science and Engineering Series. Chichester: John Wiley & Sons, pp. 119-124.

International Organization for Standardization (ISO). 2002a. *ISO 10993-10 Biological evaluation of medical devices -- Part 10: Tests for irritation and skin sensitization*. Geneva: ISO.

International Organization for Standardization (ISO). 2002b. *ISO 10993-12 Biological evaluation of medical devices -- Part 12: Sample preparation and reference materials*. Geneva: ISO.

International Organization for Standardization (ISO). 2006. *ISO 10993-11 Biological evaluation of medical devices -- Part 11: Tests for systemic toxicity*. Geneva: ISO.

International Organization for Standardization (ISO). 2007. *ISO 10993-6 Biological evaluation of medical devices -- Part 6: Tests for local effects after implantation*. Geneva: ISO.

Naij, A. and Harmand, M. F., 1990. Study on the effect of the surface state on the cytocompatibility of a Co-Cr alloy using human osteoblasts and fibroblasts. *Journal of Biomedical Materials Research*, **24**, pp. 861-871.

Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). 1992. Guidelines *for Testing of Chemicals Section 4, Test No. 406: Skin sensitisation*. Paris: OECD.

Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). 2001. *Guidelines for Testing of Chemicals Section 4, Test No. 420: Acute oral toxicity: Fixed dose procedure*. Paris: OECD.

Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). 2002. *Guidelines for Testing of Chemicals Section 4, Test No. 404: Acute dermal irritation/corrosion*. Paris: OECD.

Sun Z. L., Wataha, J. C. and Hanks, C. T., 1997. Effects of metal ions on osteoblast-like cell metabolism and differentiation. *Journal of Biomedical Materials Research*, **34**, pp. 29-37.

Witkin, K.B., 1998. Clinical evaluation of medical devices: Principles and case studies. New Jersey: Humana Press Inc.

Willium, D.F., 1982. Biocompatibility of orthopedic implants. V.1. Boca Raton: CRC Press.