# การเตรียมและศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกที่เตรียมจากพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์

# Preparation and Examination of Physical Properties of Bone Scaffolds from Polycaprolactone Microspheres


**นิติวัฒน์ ศรีโมรา**

**Nitiwat Srimora**


**วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา**
**วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี**
**มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์**

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Engineering in Chemical Engineering**
**Prince of Songkla University**
**2554**


**ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์**

**ชื่อวิทยานิพนธ์** การเตรียมและศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกที่เตรียมจากพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์

**ผู้เขียน** นายนิติวัฒน์ ศรีโมรา

**สาขาวิชา** วิศวกรรมเคมี

---

**อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก**

……

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ลือพงศ์ แก้วศรีจันทร์)

**อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม**

……

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เจษฎ์ แก้วศรีจันทร์)

**คณะกรรมการสอบ**

……ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุกฤทธิรา รัตนวิไล)

……กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.นุรักษ์ กฤษดานุรักษ์)

……กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กุลชนาฐ ประเสริฐสิทธิ์)

……กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ลือพงศ์ แก้วศรีจันทร์)

……กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เจษฎ์ แก้วศรีจันทร์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี

……

(ศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

**ชื่อวิทยานิพนธ์** การเตรียมและศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกที่เตรียมจากพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์

**ผู้เขียน** นายนิติวัฒน์ ศรีโมรา

**สาขาวิชา** วิศวกรรมเคมี

**ปีการศึกษา** 2554

## บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาโครงสร้างและคุณสมบัติทางกายภายของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากการผสมไคโตซานรูปแบบต่างๆ กับพอลิคาโปรแล็คโตน ไมโครสเฟียร์ และ ไบโอเซรามิกส์ ไคโตซานไมโครสเฟียร์เตรียมได้จากการครอสลิงก์ของพอลิเมอร์กับโซเดียมไตรพอลิฟอสเฟต ซึ่งเกิดในรูปแมทริกซ์ของพอลิเมอร์ จากนั้นนำไปอบให้แห้งและบดให้มีขนาดอนุภาคระดับไมครอน สำหรับการเตรียมไคโตซานพอลิเมอร์เตรียมได้จากการผสมสารละลายไคโตซานกับส่วนประกอบอื่นที่เหลือ ตามด้วยการครอสลิงก์ และการระเหิดแห้ง ในส่วนของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ ไคโตซานไมโครสเฟียร์ และไบโอเซรามิกซ์จะขึ้นรูปโดยวิธีการอัด จากนั้นทำการศึกษา หาอัตราส่วนของพอลิคาโปรแล็คโตน ไมโครสเฟียร์ กับส่วนประกอบที่มีคุณสมบัติชอบน้ำ เช่น ไบโอเซรามิกซ์กับไคโตซานเพื่อหาพื้นผิวที่เหมาะสมที่สุดสำหรับโครงร่างสัณฐาน และโครงสร้างของโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 2 ชนิด จะทำการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด และทำการศึกษาคุณสมบัติความชอบน้ำต่อคุณสมบัติความไม่ชอบน้ำของพื้นผิวของโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยการวัดค่ามุมสัมผัส สำหรับคุณสมบัติทางชีวภาพเบื้องต้นของโครงเลี้ยงเซลล์จะทำการศึกษาหลังจากแช่โครงเลี้ยงเซลล์ลงใน สารละลาย phosphate buffer saline (PBS) เป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ ชั้นแอพาไทต์ที่เกิดขึ้นในโครงเลี้ยงเซลล์จะเป็นตัวบ่งชี้คุณสมบัติทางชีวภาพเบื้องต้นของโครงเลี้ยงเซลล์ จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์มีลักษณะ สำคัญที่ สามารถ นำไปทดลองในระดับ *in vivo* เพื่อประยุกต์ ในงาน ด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกได้ต่อไป

**Thesis Title** Preparation and Examination of Physical Properties of Bone Scaffolds from Polycaprolactone Microspheres

**Author** Mr. Nitiwat Srimora

**Major Program** Chemical Engineering

**Academic Year** 2011

## ABTRACT

This work is aimed to determine whether scaffold architectures and physical properties are affected by using different forms of chitosan in chitosan-polycaprolactone microspheres (PCL-microspheres)-bioceramic blends. Chitosan microspheres are prepared by cross-linking the polymer with sodium tripolyphosphate by which the polymer matrix was formed. The matrix is dried and grinded until obtaining micro-particles. In contrast, chitosan polymers are revealed by blending chitosan solution with the remaining components followed by cross-linking and freeze-drying. Scaffolds containing PCL-microspheres / chitosan microspheres and bioceramic are prepared by the compression method. The ratios of PCL-microspheres and the mixed hydrophilic ingredient, e.g., bioceramic plus chitosan, are varied in order to obtain suitable surface. The morphologies and structures of both scaffold types are observed by SEM. Surface hydrophobic/hydrophilic property is determined by using contact angle. The bioactivity of the scaffolds is evaluated after soaking in phosphate buffer saline (PBS) for 1, 2, 3 and 4 weeks. Apatite layers that form following the immersion are destined as the scaffolds are bioactive. The results imply that particular scaffold combinations are valuable for subjecting to the next *in vivo* experiments prior they can be applied in bone tissue engineering.

# กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จไปได้ด้วยดี โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว . สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ที่ให้การสนับสนุนการศึกษาและการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ลือพงศ์ แก้วศรีจันทร์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เจษฎ์ แก้วศรีจันทร์ อาจารย์ที่ปรึกษาที่กรุณาให้คำปรึกษา คอยชี้แนะแนวทางการแก้ปัญหา และให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ตลอดมา อีกทั้งยังช่วยตรวจทานและแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุกฤทธิรา รัตนวิไล และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กุลชนาฐ ประเสริฐสิทธิ์ กรรมการผู้แทนคณะวิศวกรรมศาสตร์ และ รองศาสตราจารย์ ดร.นุรักษ์ กฤษดานุรักษ์ กรรมการผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์พื้นที่ในการทำงานวิจัย และอุปกรณ์การทำวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อและคุณแม่ที่ให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคน ที่มีส่วนช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้การทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้เสร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

นิติวัฒน์ ศรีโมรา

# สารบัญ


| เรื่อง | หน้า |
|---|---|
| สารบัญ | (6) |
| รายการตาราง | (8) |
| รายการภาพประกอบ | (10) |
| บทที่ 1 บทนำ | 1 |
| บทตรวจเอกสาร | 2 |
| วัตถุประสงค์ของงานวิจัย | 25 |
| ขอบเขตงานวิจัย | 25 |
| ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย | 26 |
| บทที่ 2 วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการวิจัย | 27 |
| สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง | 27 |
| อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง | 27 |
| วิธีการทดลอง | 28 |
| วิธีวิเคราะห์ | 33 |
| บทที่ 3 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง | 35 |
| ผลการทดลองเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์เพื่อทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้น | 35 |
| การทดลองหาตัวประสานที่เหมาะสมสำหรับเตรียมพอลิคาโปรแล็คโตน ไมโครสเฟียร์ และการผสมไบแคลเซียมฟอสเฟต เพื่อปรับปรุงสมบัติความชอบน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์ | 37 |
| โครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมโดยใช้เทคนิคการอัด ซึ่งมีเมนทอลเป็นสารก่อรูพรุน และที่เตรียมโดยเทคนิคการระเหิดแห้ง | 43 |
| คุณสมบัติด้านกิจกรรมทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์และการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชั่นของโครงเลี้ยงเซลล์ โดยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectrometry | 51 |
| บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ | 57 |

# สารบัญ (ต่อ)


| เรื่อง | หน้า |
|---|---|
| ภาคผนวก | 65 |
| ภาคผนวก ก การศึกษาความเร็วของการกวนสารละลายที่มีผลต่อลักษณะพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ และหลักการทำงานของเครื่อง High Pressure Homogenizer | 66 |
| ภาคผนวก ข ข้อมูลที่ได้จากการทดลอง | 71 |
| ภาคผนวก ค FTIR สเปกตรัมของสารที่เป็นส่วนประกอบในโครงเลี้ยงเซลล์ | 76 |
| ประวัติผู้เขียน | 82 |

# รายการตาราง


**ตารางที่** **หน้า**

1.1 ขนาดรูพรุนและความพรุนที่ได้จากการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์วิธีต่างๆ 15

1.2 โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากโพลิคาโปรแล็คโตนที่ใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ 19

1.3 การละลายของไคโตซานในสารละลายกรดชนิดต่างๆ 22

3.1 ค่าขนาดและการกระจายตัวของอนุภาคพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ เมื่อใช้ 0.5% PVA เป็นตัวประสาน 40

3.2 ค่าขนาดและการกระจายตัวของอนุภาคพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ เมื่อใช้ 1% PVA เป็นตัวประสาน 41

3.3 ค่าขนาดและการกระจายตัวของอนุภาคพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ เมื่อใช้ 2% PVA เป็นตัวประสาน 42

3.4 อัตราส่วนของพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ ไบแคลเซียมฟอสเฟต ไคโตซานไมโครสเฟียร์ และเมนทอลที่เป็นส่วนประกอบของโครงเลี้ยงเซลล์ เตรียมโดยเทคนิคการอัด ค่ามุมสัมผัส และเปอร์เซ็นต์ความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ รายงานเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงแบนมาตรฐาน 45

3.5 อัตราส่วนพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ ไบแคลเซียมฟอสเฟต และไคโตซานพอลิเมอร์ที่ใช้เป็นส่วนประกอบของโครงเลี้ยงเซลล์เตรียมโดยเทคนิคการระเหิดแห้ง ค่ามุมสัมผัส และเปอร์เซ็นต์ความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ รายงานเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงแบนมาตรฐาน 49

3.6 หมู่ฟังก์ชั่นและความยาวคลื่นของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร C7 และ F7 ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectrometry (FT-IR) 56

1ข ค่ามุมสัมผัสของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมเพื่อทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้น และเตรียมโดยใช้เทคนิคการอัด ซึ่งมีเมนทอลเป็นสารก่อรูพรุน แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงแบนมาตรฐาน 71

2ข ค่ามุมสัมผัสของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมโดยเทคนิคการระเหิดแห้ง แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงแบนมาตรฐาน 71

## รายการตาราง(ต่อ)

**ตารางที่** **หน้า**

3ข ผลของตัวประสานที่ใช้เตรียมพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์
และปริมาณที่เตรียมได้เมื่อกวนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง 74

4ข ค่าความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมโดยเทคนิคการอัด ซึ่งมีเมนทอล
เป็นสารก่อรูพรุน แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงแบนมาตรฐาน 74

5ข ค่าความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมโดยเทคนิคระเหิดแห้ง
แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงแบนมาตรฐาน 75

# รายการภาพประกอบ

**ภาพประกอบที่ หน้า**


1.1 ภาพตัดขวางของกระดูกแบบยาว 3

1.2 องค์ประกอบของกระดูก 4

1.3 เซลล์กระดูกชนิดต่างๆ 6

1.4 วิวัฒนาการของวัสดุชีวภาพที่ใช้เป็นวัสดุทดแทนกระดูก 12

1.5 โครงสร้างทางเคมีของพอลิคาโปรแล็คโตน 17

1.6 โครงสร้างทางเคมีของไคโตซาน 21

2.1 แผนผังการทดลองเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์เพื่อทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ 28

2.2 แม่พิมพ์เหล็กที่ใช้เตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร และอัดด้วยเครื่องไฮดรอลิค 32

2.3 เครื่องอัดไฮดรอลิคสำหรับใช้ขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ 32

3.1 ลักษณะของพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ที่ได้จากการใช้ 0.5% PVA เป็นตัวประสาน 36

3.2 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงลักษณะโครงร่างสัณฐานของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย พอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ที่เตรียมโดยใช้ 0.5% PVA เป็นตัวประสาน ใช้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1% (w/v) เพื่อขึ้นรูปโดยเทคนิคการระเหิดแห้ง 36

3.3 การทดสอบความชอบน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์โดยวัดมุมสัมผัสของหยดน้ำวิเคราะห์โดยใช้เครื่องวัดมุมสัมผัส (θ, OCA15+, Data-physics) 37

3.4 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงลักษณะโครงสร้างของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมโดยการผสมพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์กับไบแคลเซียมฟอสเฟต ในอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก ใช้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1% (w/v) เพื่อขึ้นรูปเป็นโครงสร้าง 3 มิติ โดยเทคนิคการระเหิดแห้ง 39

3.5 กราฟแสดงขนาดและการกระจายตัวของอนุภาคพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์เมื่อใช้ 0.5% PVA เป็นตัวประสานปริมาตร 1 มิลลิลิตร และขึ้นรูปโดยเทคนิคการระเหิดแห้ง 40

## รายการภาพประกอบ (ต่อ)

**ภาพประกอบที่** **หน้า**


3.6 กราฟแสดงขนาดและการกระจายตัวของอนุภาคพอลิคาโปรแล็คโตน ไมโครสเฟียร์เมื่อใช้ 1% PVA เป็นตัวประสาน 41

3.7 กราฟแสดงขนาดและการกระจายตัวของอนุภาคพอลิคาโปรแล็คโตน ไมโครสเฟียร์เมื่อใช้ 2% PVA เป็นตัวประสาน 42

3.8 โครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมโดยผสมพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์กับ ไบแคลเซียมฟอสเฟต ไคโตซานไมโครสเฟียร์ และเมนทอล ขึ้นรูป โดยเทคนิคการอัด 44

3.9 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงลักษณะโครงสร้าง ของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ขึ้นรูปโดยเทคนิคการอัด ใช้เมนทอลเป็นสารก่อรูพรุน เมื่อโครงเลี้ยงเซลล์ประกอบด้วยพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ต่ำกว่า 60% 46

3.10 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงลักษณะโครงสร้าง ของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ขึ้นรูปโดยเทคนิคการอัด ใช้เมนทอลเป็นสารก่อรูพรุน เมื่อโครงเลี้ยงเซลล์ประกอบด้วยพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์สูงกว่า 60% 47

3.11 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงลักษณะโครงสร้าง ของโครงเลี้ยงเซลล์เตรียมโดยผสมพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ ไบแคลเซียมฟอสเฟต และสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1% (w/v) ในกรดอะซิติกความเข้มข้น 3% (v/v) ขึ้นรูปโดยเทคนิคการระเหิดแห้ง 50

3.12 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงการเกิดผลึก แอพาไทต์บนโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมโดยเทคนิคการอัด ซึ่งมีเมนทอล เป็นสารก่อรูพรุน 52

3.13 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงการเกิดผลึก แอพาไทต์บนโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมโดยเทคนิคการระเหิดแห้ง 53

3.14 FTIR สเปกตรัมของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร C7 และ F7 56

1ก ชุดเครื่องมือที่ใช้เตรียมพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์โดยกวนสาร ละลายที่ความเร็ว 600 และ 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 67

## รายการภาพประกอบ (ต่อ)


**ภาพประกอบที่** **หน้า**

2ก ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงลักษณะของพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ที่กวนที่ความเร็ว 600 และ 1,000 รอบต่อนาที และผสมกับสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1% (w/v) และขึ้นรูปโดยเทคนิคการระเหิดแห้ง 68

3ก หลักการทำงานของเครื่อง High Pressure Homogenizer 69

4ก เครื่อง High Pressure Homogenizer (Microfluidics, รุ่น M110P) 70

1ข ผลการทดสอบโครงเลี้ยงเซลล์ โดยวัดมุมสัมผัสของหยดน้ำเมื่อโครงเลี้ยงเซลล์มีพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ต่ำกว่า 70% ด้วยเครื่องวัดมุมสัมผัส 72

2ข ผลการทดสอบโครงเลี้ยงเซลล์ โดยวัดมุมสัมผัสของหยดน้ำเมื่อโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์สูงกว่า 70% ด้วยเครื่องวัดมุมสัมผัส 73

1ค FTIR สเปกตรัมของพอลิคาโปรแล็คโตน 76

2ค FTIR สเปกตรัมของไฮดรอกซีแอพาไทต์ 77

3ค FTIR สเปกตรัมของไคโตซาน 78

4ค FTIR สเปกตรัมของไคโตซานครอสลิงก์ 79

5ค FTIR สเปกตรัมของไตรแคลเซียมฟอสเฟต 80

6ค FTIR สเปกตรัมของเมนทอล 81

# บทที่ 1

# บทนำ

## 1.1 บทนำต้นเรื่อง

เนื่องด้วยการเปลี่ยนแปลงทางสภาพเศรษฐกิจและสังคมในประเทศไทยในปัจจุบันมีแนวโน้มพัฒนาเปลี่ยนแปลงตามแนวทางของประเทศตะวันตก และประเทศอุตสาหกรรมใหม่ในเอเชีย ในอัตราค่อนข้างเร็ว ส่งผลกระทบต่อโครงสร้างพื้นฐาน เช่น ระบบคมนาคม การสื่อสาร ตลอดจนการเจริญเติบโตของประชากรอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางด้านสาธารณสุข ประชากรมีอายุเฉลี่ยสูงขึ้น โรคที่เกี่ยวเนื่องจากวัยชราจึงเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะปัญหาที่เกี่ยวเนื่องจากความผิดปกติของกระดูก (สมชัย ปรีชาสุข และคณะ , 2537) ปัญหาเกี่ยวกับความผิดปกติของกระดูกนั้นพบมาตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน ก่อให้เกิดปัญหาทางสาธารณสุขและเศรษฐกิจที่สำคัญของประชากรในประเทศไทย (วิวัฒน์ วจนะวิศิษฐ และคณะ , 2550) เนื่องจากความผิดปกติของกระดูกในบางกรณีผู้ป่วยต้องได้รับการรักษาด้วยการผ่าตัด เพื่อปลูกถ่ายกระดูก แต่มีปัญหาที่เกิดขึ้น คืออวัยวะหรือเนื้อเยื่อไม่เพียงพอต่อการรักษา เนื่องจากไม่มีผู้บริจาคอวัยวะในขณะที่ความต้องการมีสูง และปริมาณเวชภัณฑ์ สารเคมี และอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องในการรักษาความผิดปกติของกระดูก ยังต้องนำเข้าจากต่างประเทศ จึงทำให้ประเทศไทยเสียดุลการค้า จากข้อมูลของกรมศุลกากร พบว่ามูลค่าการนำเข้ารวมของสารเคมี ยา และเวชภัณฑ์ ในปี พ .ศ.2545 มีสูงถึง 852,209,666 บาท (กรมศุลกากร , 2546) งานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ( tissue engineering) จึงเป็นเทคนิคใหม่ที่ใช้ทดแทนความเสียหายของกระดูก และช่วยลดการนำเข้าวัสดุทดแทนทางการแพทย์ที่มีราคาสูงมากจากต่างประเทศ นำไปสู่การพัฒนาและกระตุ้นเศรษฐกิจของประเทศไทย แล้วส่งผลให้คุณภาพชีวิตความเป็นอยู่ของประชากรในประเทศดีขึ้น

โดยงานวิจัยนี้ได้ใช้เทคนิคทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อเพื่อเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์จากวัสดุผสมที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ คื อ พอลิคาโปรแล็คโตน ไคโตซาน ไฮดรอกซีแอพาไทต์ และไตรแคลเซียมฟอสเฟต โดยมีเป้าหมาย คือหาสัดส่วนของวัสดุผสมที่เหมาะสมในการทำให้เกิดลักษณะทางกายภาพ และชีวภาพ ที่ดีของโครงเลี้ยงเซลล์ เพื่อให้ได้โครงเลี้ยงเซลล์ที่มี คุณสมบัติเทียบเคียงได้กับกระดูกของมนุษย์ และสามารถนำไปทดสอบสมบัติทางชีวภาพ และใช้ ได้จริงต่อไป

**1.2 บทตรวจเอกสาร**

**1.2.1 กระดูก (bone)**

**1.2.1.1 กายวิภาคศาสตร์ และโครงสร้างจุลภาคของกระดูก** (Baron et al., 1999)

กระดูกเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดพิเศษที่รวมกับกระดูกอ่อน ประกอบขึ้นเป็นระบบโครงกระดูก (skeletal system ) มีหน้าที่หลัก 3 ประการคือ

1. เป็นโครงร่างสำหรับค้ำจุน และเป็นที่เกาะของกล้ามเนื้อเพื่อทำหน้าที่เคลื่อนไหว

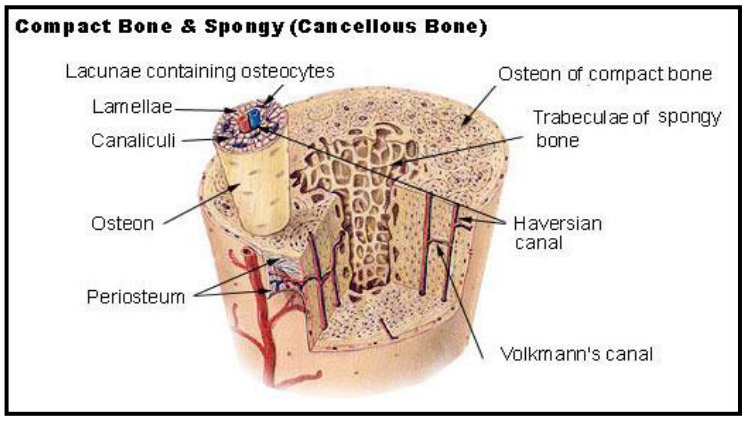
2. ป้องกันอวัยวะภายในที่สำคัญและไขกระดูก

3. เป็นที่สะสมของธาตุโดยเฉพาะแคลเซียมและฟอสฟอรัสที่สำคัญต่อชีวิต ซึ่งร่างกายต้องปรับระดับให้สมดุลตลอดเวลา เรียกว่าภาวะธำรงดุล

**1.2.1.2 กระดูกเป็นเสมือนอวัยวะ (bone as an organ)**

แบ่งโครงกระดูกตามกายวิภาคศาสตร์ออกเป็น 2 ประเภท คือกระดูกแผ่นแบน (flat bone) และกระดูกท่อนยาว (long bone) ซึ่งเป็นผลจากการพัฒนาที่แตกต่างกัน 2 รูปแบบ คือ รูปแบบการสร้างกระดูกในแผ่นเยื่อ (intramembranous ossification) และรูปแบบการสร้างกระดูกในกระดูกอ่อน (endochondral ossification) แต่ในความเป็นจริงกระดูกท่อนยาวมีการเจริญเติบโตทั้ง 2 รูปแบบร่วมกัน ในกระดูกที่กำลังเจริญเติบโตจะมีลักษณะเฉพาะเรียกว่า epiphysis และ metaphysis ซึ่งเกิดขึ้นจากการที่มีศูนย์เริ่มสร้างกระดูก ( ossification center) 2 ตำแหน่ง ส่วนที่อยู่ระหว่างกลางจะเป็นชั้นกระดูกอ่อน เรียกว่า epiphyseal plate หรือ growth plate ซึ่งมีการแบ่งตัวและขยายกว้างออกทำให้กระดูกยืดยาว ชั้นนอกสุดของกระดูกแต่ละท่อนจะเป็นเนื้อเยื่อแคลเซียมหนาและอัดแน่น เรียกว่ากระดูกเนื้อแน่น (cortical หรือ compact bone) ซึ่งตรงบริเวณ diaphysis จะห่อหุ้มโพรงกระดูก ( medullary cavity) ไว้ เป็นที่สำหรับไขกระดูกสร้างเม็ดเลือด เมื่อไล่ลงไปบริเวณ metaphysic และ epiphysis ส่วน cortex จะบางลงเรื่อยๆ ส่วนที่อยู่ด้านในจะเป็นร่างแหบางๆ ของเสี้ยนกระดูก (calcified trabeculae) เรียกว่ากระดูกฟ่าม (trabecular หรือ cancellous bone) ทั้งกระดูกเนื้อแน่น ( cortical) และกระดูกฟ่าม ( trabecular bone) (ภาพประกอบที่ 1.1) จะประกอบด้วยเซลล์ และแมทริกซ์ที่เหมือนกัน แตกต่างกันที่ลักษณะโครงสร้างและหน้าที่การทำงาน ส่วนประกอบในโครงสร้างที่ต่างกัน คือปริมาณของเนื้อเยื่อแคลเซียมมีถึงร้อยละ 80 ใน cortical bone แต่เนื้อเยื่อดังกล่าวมีเพียงร้อยละ 20 ใน trabecular bone ส่วนที่เหลือเป็นไขกระดูกหลอดเลือด และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันอื่นๆ จากความแตกต่างดังกล่าวทำให้กระดูกทั้งสองส่วนมีหน้าที่แตกต่างกัน คือ cortical bone ทำหน้าที่หลักในการป้องกันอวัยวะ และเป็นกลไกสำหรับการ

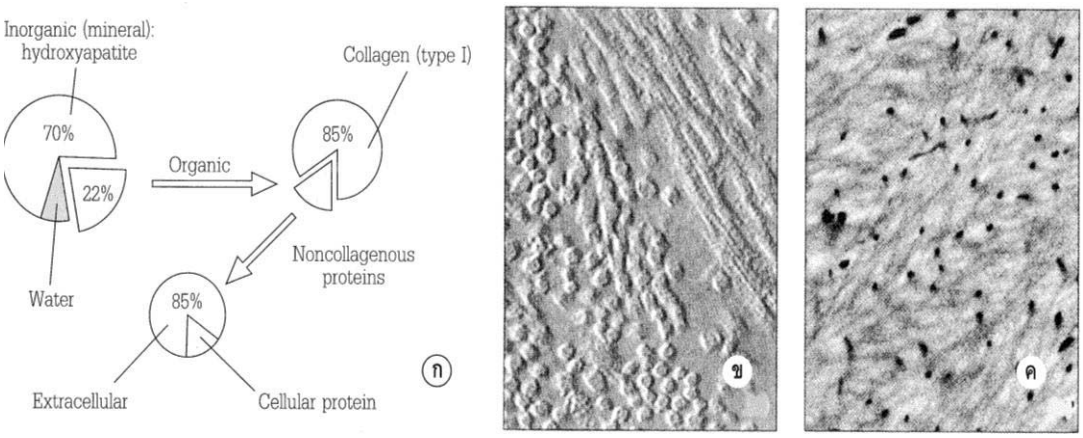
เคลื่อนไหว ส่วน trabecula bone ทำหน้าที่เกี่ยวกับเมแทบอลิซึมของร่างกาย (Baron et al., 1999; Buckwalter et al., 1995)




**ภาพประกอบที่ 1.1** ภาพตัดขวางของกระดูกแบบยาว (http://en.wikipedia.org/wiki/bone)

**1.2.1.3 กระดูกเป็นเสมือนเนื้อเยื่อ (bone as a tissue)**

กระดูกสร้างขึ้นจากเส้นใยคอลลาเจนและโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจนมีผลึกไฮดรอกซีแอพาไทต์ (hydroxyapatite) [$Ca_{10}$ $(PO_4)_6$ $(OH)_2$] เป็นรูปเข็มหรือเป็นแผ่น ฝังตัวอยู่บนเส้นใยคอลลาเจนและเรียงตัวไปในทิศทางเดียวกัน เนื้อกระดูกส่วนที่เหลือหรือแมทริกซ์จะประกอบด้วยโปรตีน เช่น glycoprotein หรือ proteoglycan เป็นสารประกอบที่มีประจุบวกจึงจับกับประจุลบของเกลือแร่ได้ดีมาก สันนิษฐานว่า โปรตีนทั้งสองประเภทมีความ สำคัญในกระบวนการตกตะกอนเกลือแร่และการฝังตัวของผลึก ไฮดรอกซีแอพาไทต์ ในเส้นใยคอลลาเจ น (ภาพประกอบที่ 1.2 ก) ส่วนโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจนในแมทริกซ์นั้นมีอยู่จำนวนเล็กน้อยแต่มีความสำคัญ ส่วนใหญ่ผลิตจากเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast) เช่น osteocalcin, osteopontin, fibronectin และ growth factor อีกหลายตัว ทิศทางการเรียงตัวของเส้นใยคอลลาเจนจะเรียงสลับในแต่ละชั้น มีลักษณะคล้ายไม้อัด เรียกตามการเรียงตัวเฉพาะว่า lamellar bone (ภาพประกอบที่ 1.2 ข., ค.) การจัดเรียงแบบนี้ทำให้ความหนาแน่นของคอลลาเจนต่อปริมาตรมีค่าสูงสุด ในบางกรณี lamellae อาจเรียงขนานเป็นชั้น ๆ ก็ได้ โดยเฉพาะบนพื้นผิวที่แบนราบ เช่นใน trabecular bone หรือในเยื่อหุ้มกระดูก หรือจะเรียงเป็นทรงกระบอกล้อมรอบหลอดเลือดเรียกว่า haversian system เช่นใน cortical bone ส่วนการสร้างกระดูกที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว เช่น ในเนื้องอกกระดูก หรือกระดูกซ่อม ( callus) ที่เกิดภายหลักจากกระดูกหัก การเรียงตัวของเส้นใยคอลลาเจนจะเป็นไปอย่างสะเปะสะปะ และอยู่หลวมๆ ไม่อัดแน่น เรียกว่า woven bone (วิวัฒน์ วจนะวิศิษฐ และคณะ, 2550)




**ภาพประกอบที่ 1.2** องค์ประกอบของกระดูก ก . กระดูกประกอบด้วยสารอินทรีย์และอนินทรีย์ มีสารอนินทรีย์หรือเกลือแร่ร้อยละ 70 มีน้ำร้อยละ 5-8 ที่เหลือเป็นสารอินทรีย์หรือแมทริกซ์ ข . ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แสดงให้เห็นเส้นใยคอลลาเจนทั้งแนวยาวและตัดขวาง ค . การกระจายของลำแสงอิเล็กตรอนในรูปแบบสม่ำเสมอตามการเรียงตัวเป็นชั้นๆ ของคอลลาเจนใน lamellar bone (วิวัฒน์ วจนะวิศิษฐ และคณะ, 2550)

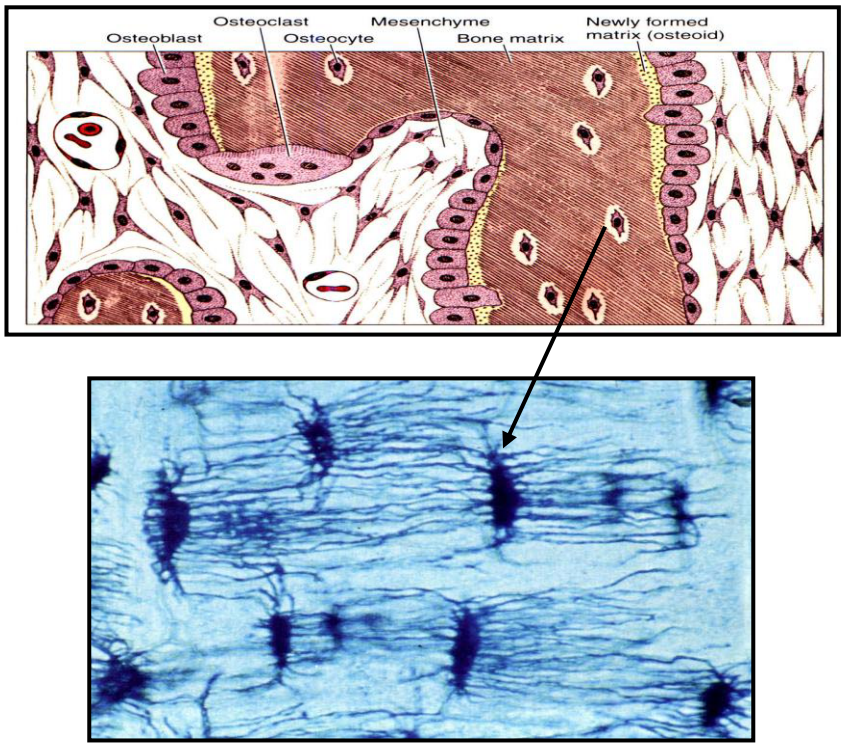
**1.2.1.4 กระดูกเป็นวัสดุผสม (composite material)**

ลักษณะโครงสร้างของกระดูก เป็นแบบผสมผสานทำให้สามารถทนต่อแรงกลต่างๆ ได้ดี ส่วนที่เป็นสารอนินทรีย์ คือผลึกไฮดรอกซีแอพาไทต์จะทำให้กระดูกทนต่อแรงอัดได้ดี แต่ทนต่อแรงดึงได้ไม่ดี ส่วนที่ทำหน้าที่รับแรงดึง คือเส้นใยคอลลาเจนระหว่างชั้น ( lamellae) ที่ติดกันสามารถหมุนได้ถึง 90° ทำให้เนื้อเยื่อสามารถทนต่อแรง และโมเมนต์ที่มากระทำในทิศทางต่างๆ ลักษณะเหมือนกับไม้อัดที่สามารถเพิ่มความแข็งแรงได้ โดยการเรียงไฟเบอร์ในแต่ละชั้นไปทางเดียว แต่ในระหว่างชั้นจะหมุนไปคนละทิศทาง การที่คอลลาเจนที่สร้างขึ้นถูกเรียงไปในแนวต่างๆ กัน ทำให้กระดูกเป็น anisotropy แม้ว่าการจัดเรียงนี้จะถูกกำหนดโดยพันธุกรรม แต่สภาพแวดล้อมในชีวิตประจำวันก็มีผลต่อการเรียงตัวของ lamellae ด้วย เนื่องจากในชีวิตประจำวันแรงเค้นที่เกิดขึ้นนั้นร้อยละ 80 เป็นแรงงอ (bending) ดังนั้นผลที่สุดที่จะบ่งบอกคุณภาพของกระดูกคือคุณภาพของคอลลาเจน และการจัดเรียงตัวในโครงสร้างระดับจุลภาค จากการศึกษา ที่ผ่านมาพบว่าตัวของคอลลาเจนเองจะเปลี่ยนแปลงไปตามอายุ คุณภาพของคอลลาเจนที่ลดลงก็จะทำให้คุณสมบัติของโครงกระดูกลดน้อยลงไปด้วย (Oxlund et al., 1996)

**1.2.1.5 เซลล์ต่าง ๆ ในกระดูก**

เซลล์กระดูก ( osteocyte) จะฝังตัวอยู่ในกระดูกในแอ่งเล็กๆ ( lacuna) เซลล์นี้มีกำเนิดมาจากเซลล์สร้างกระดูก ซึ่งสร้างแมทริกซ์ออกมารอบๆตัว และต่อมามีการตกตะกอนเกลือแคลเซียม เซลล์จึงถูกขังอยู่ภายในกลายเป็นเซลล์กระดูก เซลล์กระดูกทั้งหลายจะเชื่อ มต่อกันหมดผ่านคลองเล็กๆ หรือ canaliculi เกิดเป็นเครือข่ายระดับเซลล์มีลักษณะคล้ายคลึงกับเครือข่ายของเซลล์ประสาท และเชื่อว่าระบบนี้เป็นระบบที่ตอบสนองต่อแรงกล แรงกลนั้นมีผลอย่างมากต่อรูปร่างของกระดูก และกระบวนการปรับแต่งรูปทรงกระดูก

เซลล์สร้างกระดูก (osteoblast) เป็นเซลล์ที่เรียงตัวอยู่บนผิวกระดูก ( bone lining cell) ทำหน้าที่ผลิตสารแมทริกซ์ต่างๆ ( collagen และ precursor) มีแหล่งกำ เนิดจากเซลล์โครง (stromal cell precursor) ซึ่งอาจจะเป็นเซลล์ต้นกำเนิดในไขกระดูก ( bone marrow stem cell) หรือเซลล์ต้นกำเนิดในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue mesenchymal stem cell) สิ่งสำคัญที่เหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างกระดูกขึ้นใหม่ คือการกระตุ้นยีนสำหรับการเปลี่ยนสภาพ (differentiate) เป็นเซลล์สร้างกระดูก ขั้นต่อไปของการสร้างกระดูกต้องอาศัย growth factor ปัจจุบันค้นพบ growth factor ที่เกี่ยวข้อง กับการสร้างกระดูกแล้ว หลายชนิด เช่น insulin-like growth factors (IGFs), fibroblast growth factors (FGFs) และสมาชิกในตระกูล transforming growth factor beta (TGF-$\beta$) เช่น bone motphognetic proteins (BMPs) เป็นต้น (วิวัฒน์ วจนะวิศิษฐ และคณะ, 2550)




**ภาพประกอบที่ 1.3** เซลล์กระดูกชนิดต่างๆ ได้แก่ osteoblast, osteocyte, osteoclast และเซลล์ mesenchyme (http://202.28.95.5/11department/anatomy/Profile/Yanyong/bone48MD/bone48MD.files/frame.htm#slide0030.htm)

**1.2.1.6 ภาวะความผิดปกติของกระดูก** (ยงยุทธ วัชรดุลย์, 2526)

ภาวะความผิดปกติของกระดูกไม่ว่าจะมาจากอุบัติเหตุหรือจากโรคภัยไข้เจ็บ ย่อมส่งผลกระทบโดยตรงต่อผู้ป่วยทั้งสิ้น ตัวอย่างภาวะความผิดปกติของกระดูกที่พบ คือ

1. ความผิดปกติแต่กำเนิด (congenital anomalies) ได้แก่ ความผิดปกติในการเจริญของอวัยวะแขน ขา หรือลำตัว เช่น เท้าปุก สันหลังคด เป็นต้น

2. การติดเชื้อ (infection) เป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อจุลชีพ เช่น แบคทีเรีย และเชื้อรา ทำให้เกิดโรคกระดูก และข้ออักเสบเป็นหนองหรือวัณโรคข้อและกระดูก

3. ความผิดปกติของเมแทบอลิซึม (metabolic disorders) ทำให้มีสิ่งผิดปกติเกิดขึ้นในเนื้อเยื่อของกระดูกและข้อ เช่น โรคเกาต์ เป็นต้น

4. โรคเนื้องอก (neoplasm) คือการที่มีเนื้องอกผิดปกติขึ้นในเนื้อเยื่อกระดูกเอง หรือเนื้อเยื่อใกล้เคียง มีทั้งชนิดไม่ร้ายแรง (benign) และชนิดร้ายแรง (malignant) ซึ่งอาจเรียกเป็นมะเร็งของกระดูก มะเร็งของกล้ามเนื้อแล้วแต่ชนิด

5. ความผิดปกติของต่อมไร้ท่อ (endocrine disorders) มีผลต่อการ เปลี่ยนแปลงของกระดูกอย่างมาก เช่น กระดูกมีการละลายตัวมาก เนื่องจากมีการผลิตฮอร์โมนจากต่อมพาราไทรอยด์มากเกินไป

6. ความผิดปกติของการไหลเวียนเลือดในกระดูก (circulatory disorders) เช่น การขาดเลือดที่ส่วนสร้างกระดูก ทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อกระดูกขึ้นได้

7. ความผิดปกติทางประสาท (neurologic disorders) ทำให้เกิดการพิการของระบบกล้ามเนื้อ ทำให้ข้อและกระดูกพิการผิดรูป เช่น อัมพาตสมอง โรคกล้ามเนื้อลีบ เป็นต้น

8. ความผิดปกติทางจิต (psychologic disorders) ภาวะทางจิตทำให้มีความผิดปกติของระบบการเคลื่อนไหวได้ เช่น การหดรั้งของกล้ามเนื้อ โดยไม่ทราบสาเหตุ

9. ความผิดปกติเนื่องจากอุบัติเหตุ เช่น กระดูกหัก กระดูกแตก และกระดูกผิดรูป เป็นต้น

**1.2.1.7 แนวทางการรักษาความผิดปกติของกระดูก**

จากภาวะความผิดปกติของกระดูกที่กล่าวมาข้างต้น แนวทางการรักษาย่อมแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมและความร้ายแรงที่เกิดขึ้นกับกระดูก ซึ่งสามารถแยกการรักษาโรคทางกระดูกได้ 2 วิธี คือ การรักษาโดยไม่ผ่าตัด และการรักษาโดยการผ่าตัด

**1. วิธีการรักษาโดยไม่ผ่าตัด**

การเข้าเฝือกซึ่งอาจเป็นเฝือกปูน เฝือกสังเคราะห์หรือวัสดุอื่นๆ ที่ใช้แทนเฝือกปูน ใช้สำหรับการแก้ไขความพิการผิดรูป และเพื่อทำให้ข้อเคลื่อนไหวได้ดีขึ้น วิ ธีการปฏิบัติในการรักษาอาจจะต้องใช้ยาสลบหรือฉีดยาชาเฉพาะที่ ทั้งนี้เพื่อไม่ให้ผู้ป่วยเจ็บปวดและยังทำให้กล้ามเนื้อไม่หดเกร็งตัวเกินไปด้วย การรักษาโดยมากจะใช้เฝือกเป็นเครื่องมือ โดยมีความมุ่งหมายหลายอย่างดังนี้

1. การเข้าเฝือกเพื่อกระชับ มีที่ใช้หลายกรณี เช่น การพันเฝือกเพื่อป้องกันการบวม และการคั่งของน้ำในข้อ ซึ่งจะช่วยให้เลือดไหลเวียนดีขึ้น

2. การเข้าเฝือกเพื่อดัดอวัยวะให้เข้ารูป มีหลักว่าอย่าพันให้แน่นเกินไป การพันแผลชนิดนี้จะช่วยให้กล้ามเนื้อลดความเกร็งตัวลงหรือลดความผิดรูปที่ข้อ

3. การเข้าเฝือกดาม ใช้ในการทำให้ข้อที่เป็นโรคอยู่ในท่าที่เหมาะสมเพื่อป้องกันไม่ให้เอ็นหุ้มข้อหรือเอ็นยึดข้อถูกยืด และอาจใช้ในพวกที่ข้อเคลื่อนแต่ดึงเข้าที่แล้ว

4. เฝือกนอน อาจทำด้วยปูน เฝือกพลาสติกหรือโลหะ เพื่อให้ผู้ป่วยสวมเวลานอนในท่าที่ต้องการ อาจใช้รักษาโรคข้อสันหลัง โรคกล้ามเนื้อเป็นอัมพาต เป็นต้น

5. เฝือกหล่อ เพื่อใช้ในการทำพื้นรองเท้า ต้องใช้เฝือกเป็นแม่พิมพ์โดยใช้เท้าเหยียบไปบนเฝือก

นอกจากวิธีการรักษาผู้ป่วยด้วย วิธีการรักษาโดยไม่ผ่าตัด โดยการใช้เฝือก ในปัจจุบันมีวิธีการรักษาโดยใช้เซลล์ต้นกำเนิด (stem cell) จากไขกระดูก (bone marrow adult stem cell) ในการรักษาความผิดปกติของกระดูก กล่าวคือแพทย์จะฉีดเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากไขกระดูกลงไปในบริเวณที่เกิดความผิดปกติของกระดูก โดยไขกระดูกของผู้ป่วยจะถูกแทนที่ด้วยไขกระดูกของผู้ให้ซึ่งไม่เป็นโรค และไขกระดูกของผู้ให้ต้องเข้ากันได้กับไขกระดูกของผู้รับ เพื่อให้เซลล์เกิดการแบ่งตัวและเจริญเติบโตแล้วสร้างเป็นกระดูกใหม่ แต่วิธีการนี้มีข้อเสีย คือมีวิธีการนำมาใช้ค่อนข้างยุ่งยาก กล่าวคือผู้ให้เซลล์ต้นกำเนิดจะต้องวาง ยาสลบ และทำในห้องศัลยกรรมของโรงพยาบาล โดยแพทย์จะเจาะเข้าไปบริเวณกระดูกเชิงกรานให้ถึงไขกระดูก แล้วดูดเซลล์ต้นกำเนิดที่อยู่ในโพรงไขกระดูกให้เพียงพอกับจำนวนที่ต้องใช้ บางครั้งเมื่อทำการ ฉีดเซลล์ต้นกำเนิด ที่ได้จากไขกระดูกลงไปในบริเวณที่เกิดความผิดปกติของกระดูก พบว่า เซลล์ไม่เกิดการแบ่งตัวและเจริญเติบโตทำให้ไม่สามารถเกิดเป็นกระดูกใหม่ได้ (อัจฉรา-อาทิตย์คลินิก, 2550)

**2. วิธีการรักษาด้วยการผ่าตัด**

โดยปกติเมื่อกระดูกแตกร้าวจะมีการประสานของเซลล์กระดูกโดยธรรมชาติ แต่หากกระดูกมีรอยแตกหักเกิน 8 มิลลิเมตร การรักษาจะค่อนข้างยาก เนื่องจากมีช่องว่างมากเกินไป การรักษาที่ผ่านมาจึงใช้วิธีการผ่าตัด (โรงพยาบาลราชวิถี , 2554) การผ่าตัดมีหลายวิธีอาจแก้ไขความพิการผิดรูปหรือแก้ไขส่วนที่เป็นโรคที่กระดูกหรือที่ข้อ ตลอดจนเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้อง เช่น เอ็น กล้ามเนื้อหรือเอ็นที่ข้อ วิธีการผ่าตัดมีหลายวิธีดังนี้ (ยงยุทธ วัชรดุลย์, 2526)

1. การผ่าตัดเพื่อดัดกระดูก คือตัดกระดูกให้ขาดจากกัน แล้วจัดชิ้นของกระดูกที่ตัดขาดให้อยู่ในท่าที่ต้องการ การยึดชิ้นกระดูกเหล่านี้แล้วแต่ความจำเป็น

2. การดัดหักกระดูก คือการใช้มือหรือเครื่องมือหักกระดูกที่ติดกันแล้วหรือเริ่มติด ให้หลุดออกจากกันเพื่อจัดให้เข้าแนวกันมากขึ้น

3. การผ่าตัดยึดตรึงกระดูกด้วยเครื่องมือ การผ่าตัดชนิดนี้ใช้กันมากในปัจจุบัน คือผ่าตัดเพื่อจัดชิ้นกระดูกให้เข้าที่แล้วดามกระดูกด้วยเครื่องมือ เช่น ตะปูควง แกนโลหะหรือแผ่นโลหะ

4. การผ่าตัดข้อต่อกระดูก การผ่าตัดเกี่ยวกับข้อมีหลายวิธีด้วยกัน อาจผ่าตัดเพื่อเอาชิ้นส่วนที่ลอยหลุดอยู่ในข้อ ซึ่งเป็นผลจากการแตกของชิ้นกระดูกงอกที่ขอบของข้อที่เกิดจากการอักเสบเสื่อมเป็นเวลานาน

5. การผ่าตัดเนื้อเยื่ออย่างอื่น เพื่อแก้ไขความพิการอาจจะต้องผ่าตัดเอ็น กล้ามเนื้อ เอ็นยึดข้อ เอ็นหุ้มข้อ เป็นต้น บางครั้งอาจจะเป็นการตัดเอ็นให้ขาด หรือบางครั้งอาจเป็นการเย็บทบเอ็นให้สั้นเพื่อกระชับข้อ

6. การผ่าตัดปลูกผิวหนัง การผ่าตัดเกี่ยวกับกระดูกบางกรณีจำเป็นต้องผ่าตัดแก้ไขสภาพผิวหนังที่ปกคลุมกระดูกและข้อให้ดีเสียก่อน เพื่อผลการผ่าตัดกระดูกจะดียิ่งขึ้น และลดการติดเชื้อจากผิวหนังที่เป็นแผลเรื้อรัง

7. การผ่าตัดปลูกถ่ายกระดูก เหตุผลที่ใช้ในการผ่าตัดชนิดนี้เป็นเพราะกระดูกโหว่ไปหรือมีช่องเกิดขึ้นระหว่างชิ้นกระดูก การใช้กระดูกปลูกถ่ายเพื่อเป็นสะพานเชื่อมให้กระดูกสร้างกระดูกให้ติดกัน ในปัจจุบันการปลูกถ่ายกระดูกมีหลายวิธีด้วยกัน คือ

7.1 Autogenous bone grafting เป็นวิธีการปลูกถ่ายกระดูกที่แพทย์นิยมใช้มากที่สุดในปัจจุบัน โดยจะผ่าตัดเอากระดูกบริเวณอื่นของผู้ป่วยมาปลูกถ่ายลงบริเวณที่รับบาดเจ็บ มีข้อดีคือลดความเสี่ยงในการปฏิเสธเนื้อเยื่อของผู้ป่วย เนื่องจากกระดูกที่นำมาปลูกถ่ายเป็นของผู้ป่วยเอง แต่ก็มีข้อเสียหลายประการ เช่น มีความยากในการปรับแต่งเนื้อเยื่อให้พอดีกับตำแหน่งที่มีปัญหา มีขั้นตอนการผ่าตัดที่ยุ่งยาก หลังการผ่าตัดผู้ป่วยเกิดความทุกทรมานจากแผลที่ได้รับการผ่าตัด และเกิดภาวะแทรกซ้อนหลังการผ่าตัด เช่น การติดเชื้อ อาจเป็นเหตุให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้ (Hollinger and Battisan, 1986)

7.2 Allogenous bone grafting เป็นวิธีการปลูกถ่ายกระดูกโดยใช้กระดูกจากผู้บริจาค มาปลูกถ่ายกระดูกให้กับผู้ป่วย ใช้ในกรณีที่กระดูกของผู้ป่วยเองมีจำนวนไม่เพียงพอหรือในเด็กซึ่งไม่สามารถเอากระดูกของตนไปใช้ได้ มีข้อเสียหลายประการในการรักษา เช่น การปฏิเสธเนื้อเยื่อของผู้ป่วย ความเสี่ยงในการได้รับเชื้อ โรคจากผู้บริจาค ความขาดแคลนเนื้อเยื่อบริจาค ความจำเป็นที่ผู้ป่วยต้องรับยากดการทำงานของภูมิคุ้มกัน เป็นต้น (Hollinger and Battisan, 1986)

7.3 Xenogenous bone grafting เป็นวิธีการปลูกถ่ายกระดูกโดยใช้กระดูกจากสัตว์มาปลูกถ่ายกระดูกให้แก่ผู้ป่วย เช่น กระดูกวัว มีข้อเสีย คือทำให้ผู้รับเสี่ยงต่อการติดเชื้อ อาจจะเป็นพาหะนำโรคและเกิดปฏิกิริยาต่อต้านจากระบบภูมิคุ้มกันของผู้รับ เป็นต้น (อนิรุทธิ์ คำใจ, 2548)

**1.2.2 วัสดุทดแทนกระดูก**

วัสดุทดแทนกระดูก ( bone graft) คือกระดูกที่ตัดออกมาจากอวัยวะส่วนอื่นในร่างกายของผู้ป่วย ( autograft bone) หรือกระดูกที่ได้รับการบริจาคจากผู้อื่น ( allograft bone) และกระดูกสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น กระดูกวัว (xenograft bone) จากปัญหาของวัสดุทดแทนกระดูกที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ทำให้นักวิจัยมีความพยายามในการแก้ปัญหา โดยศึกษาและพัฒนาวัสดุชีวภาพ

ซึ่งจะสามารถใช้ทดแทนกระดูก ทั้งที่เป็นสารธรรมชาติ และสารสังเคราะห์ โดยพยายามที่จะให้มีโครงสร้างและสมบัติคล้ายกับกระดูกมากที่สุด (อนิรุทธิ์ คำใจ , 2548) การพัฒนาวัสดุชีวภาพแบ่งเป็น 4 ยุคดังนี้ (ภาพประกอบที่ 1.4)

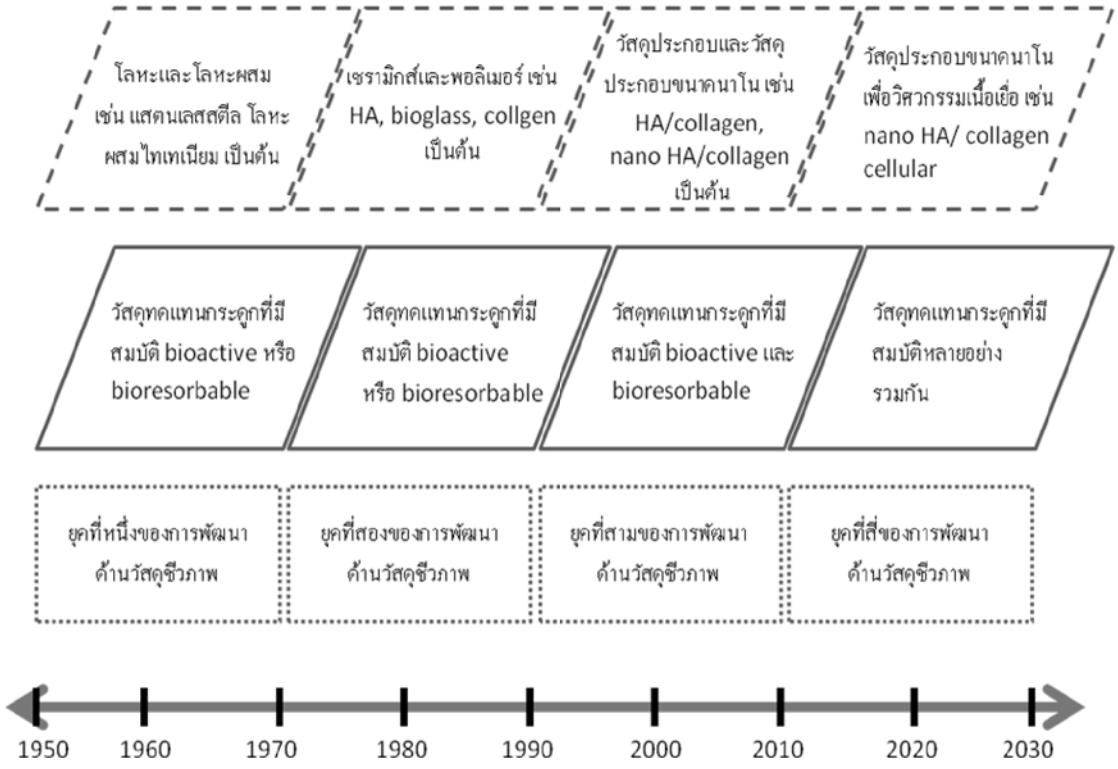
1. ยุคที่หนึ่งของการพัฒนาวัสดุชีวภาพ เป็นวัสดุประเภท โลหะ ได้แก่ ไททาเนียม และโลหะผสมระหว่าง สแตนเลส ทองคำ เงิน หรือแพลทินัม มีข้อดี คือ มีค่าความแข็งแรงทนทานต่อแรงกระแทกสูง ทนทานต่อการขัดถู และเหนียว แต่มีข้อเสีย คือเกิดการกัดกร่อนและปล่อยสาร พิษในร่างกาย ยากต่อการขึ้นรูปและความหนาแน่นสูง ถึงแม้ว่าวัสดุประเภทโลหะจะมีความความแข็งแรงสูง แต่ในความเป็นจริงแล้วความแข็งแรงสามารถส่งผลลบต่อกระดูกเช่นเดียวกัน กล่าวคือกระดูกมีการตอบรับต่อสภาพแวดล้อมเหมือนวัสดุชีวภาพอื่นๆ เมื่อกระดูกได้รับแรง เซลล์สร้างกระดูกจะถูกกระตุ้น และสร้างกระดูกเพิ่มขึ้น ทำให้กระดูกมีความสามารถในการปรับตัวเองให้เข้ากับแรงที่กระดูกจะต้องรับ ถ้ากระดูกถูกแทนที่ด้วยโลหะซึ่งมีความแข็งแรงกว่ากระดูก โลหะจะรับแรงส่วนใหญ่ที่เกิดขึ้น ซึ่งทำให้กระดูกที่อยู่รอบโลหะไม่ได้รับแรงเท่าที่ควรจะเป็น กระดูกมีการละลายในร่างกายตามธรรมชาติอย่างสม่ำเสมอ ซึ่งในกรณีปกติเซลล์สร้างกระดูกจะสร้างสังเคราะห์กระดูกใหม่ขึ้นมาทดแทนกระดูกที่เสียไป กระบวนการนี้จะช่วยทำให้กระดูกในร่างกายมนุษย์ไม่เสื่อมสภาพลงตามอายุ ซึ่งขึ้นอยู่กับเซลล์สร้างกระดูก ว่าจะต้องมีสภาพที่สมบูรณ์แข็งแรงและทำงานได้ตามปกติ การที่เราไปป้องกันไม่ให้กระดูกได้รับแรงที่ควรจะเป็น ทำให้กระบวนการนี้ไม่เกิดหรือเกิดอย่างไม่สมบูรณ์ เนื่องจากกระดูกไม่มีความต้องการที่จะทำให้ตัวมันเองแข็งแรง ดังนั้นโลหะที่ใช้ทดแทนกระดูกที่ติดอยู่กับกระดูกบริเวณรอบข้างด้วยซีเมนต์ จะเริ่มหลวมเมื่อเวลาผ่านไป ในขณะที่กระดูกมีการละลายในร่างกายตามธรรมชาติ จากเหตุผลที่กล่าวมานี้ อายุการใช้งานของโลหะที่ใช้ทดแทนกระดูกจึงมีระยะเวลาไม่เกิน 20 ปี หลังจากนั้นต้องทำการผ่าตัดเอาโลหะออก ซึ่งเป็นข้อเสียของวัสดุประเภทโลหะที่ไม่อาจมองข้ามได้ (จุมพฏ วานิชสัมพันธ์ , 2550) ตัวอย่างการใช้งานทางการแพทย์ของวัสดุประเภทโลหะ เช่น ข้อต่อ ( joint replacements) รากฟันเทียม (dental root implacements) และกระดูกและส่วนยึดกระดูก (bone plates and screws) เป็นต้น

2. ยุคที่สองของการพัฒนาวัสดุชีวภาพ เป็นวัสดุประเภท เซรามิกส์ และพอลิเมอร์ วัสดุประเภทเซรามิกส์ ได้แก่ อะลูมิเนียมออกไซด์ (aluminium oxide) แคลเซียมฟอสเฟต ( calcium phosphate) ไฮดรอกซีแอพาไทต์ (hydroxyapatite) และไบโอกลาส (bioglass) มีข้อดี คือมีเข้ากันได้ดีกับร่างกาย ทนต่อการกัดกร่อน มีทั้งเฉื่อยและว่องไวทางชีวภาพ ทนทานต่อการกดอัด มีข้อเสีย คือ เปราะไม่มีความยืดหยุ่น และความเหนียวต่ำ ตัวอย่างการใช้งานทางการแพทย์ของวัสดุประเภทนี้ เช่น ข้อต่อ (joint replacements) และฟันปลอม เป็นต้น วัสดุประเภทพอลิเมอร์ ได้แก่ ยางซิลิโคน เทฟลอน และไนลอน มีข้อดี คือมีความยืดหยุ่นสูง ความหนาแน่นต่ำ และผลิตได้ง่าย มีข้อเสีย คือ

ไม่แข็งแรงเกิดการเสียสภาพเมื่อใช้เป็นเวลานาน และพอลิเมอร์บางชนิดมีความเป็นพิษ ตัวอย่างการใช้งานทางการแพทย์ของวัสดุประเภทพอลิเมอร์ เช่น เส้นเลือดเทียม หู จมูก และเนื้อเยื่ออ่อนต่างๆ เป็นต้น

3. ยุคที่ส ามของการพัฒนาวัสดุชีวภาพ เป็นวัสดุประเภท วัสดุผสม (composite) เช่น ceramics-coated metal, carbon-coated material เป็นต้น มีข้อดี คือมีความแข็งแรงทนทานต่อการกัดกร่อน และมีสมบัติเชิงกลเหมาะสมต่อการใช้งาน มีข้อเสีย คือยากต่อการผลิต ตัวอย่างการใช้งานทางการแพทย์ของวัสดุประเภทวัสดุนี้ เช่น ข้อต่อ (joint replacements) และลิ้นหัวใจเทียม (artificial heart valve) เป็นต้น

4. ยุคที่สี่ของการพัฒนาวัสดุชีวภาพ เป็นวัสดุ ที่มีอนุภาค ขนาดนาโน เมตร เพื่อวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เช่น nano HA/collagen cellular เป็นต้น วัสดุประกอบขนาดนาโนเพื่อวิศวกรรมเนื้อเยื่อเป็นวัสดุทดแทนกระดูกที่มีสมบัติหลายอย่างรวมกัน เช่น ความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatibility) ความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เนื้อเยื่อกระดูกเจริญ เติบโต (osteoinductive capabilities) ความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพ (biodegradability) และมีสมบัติเชิงกลที่ดี เป็น ต้น (Stylios et al., 2007)




**ภาพประกอบที่ 1.4** วิวัฒนาการของวัสดุชีวภาพที่ใช้เป็นวัสดุทดแทนกระดูก (Stylios et al., 2007)

### 1.2.3 วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (tissue engineering)

จากภาวะความผิดปกติของกระดูก และแนวทางการรักษาที่กล่าวมาข้างต้น จะเห็นได้ว่าในรายที่ผู้ป่วยต้องได้รับการรักษากระดูกโดยวิธีการผ่าตัด โดยเฉพาะการปลูกถ่ายกระดูกแบบ autogenous bone grafting ซึ่งเป็นวิธีที่แพทย์นิยมใช้ หลังการผ่าตัดผู้ป่วยเกิดความทุกข์ทรมานจากแผลที่ได้รับจากการผ่าตัด เกิดภาวะแทรกซ้อนหลังการผ่าตัด และผู้ป่วยอาจเสียชีวิตหลังการผ่าตัดได้ นักวิจัยจึงได้พัฒนางานด้านวิศวกรรม เนื้อเยื่อให้เป็นเทคนิคใหม่ที่ใช้ซ่อมแซมหรือทดแทนความเสียหายของกระดูกโดยประกอบด้วย 3 ส่วนหลักๆ ได้แก่ เซลล์ สารกระตุ้น และโครงเลี้ยงเซลล์ (scaffolds) (นราวุธ ทองมะโรงสี, 2547)

งานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (tissue engineering) เป็นศาสตร์ที่นำหลักการของวิศวกรรม และชีววิทยามาประยุกต์ใช้ในการฟื้นฟูรักษา และพัฒนาหน้าที่การทำงานของเนื้อเยื่อ (tissue function) โดยงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อเริ่มต้นในทศวรรษที่ 1930 โดย Bisceglie ซึ่งนำเซลล์เนื้องอกของหนูมาเลี้ยงในเยื่อแผ่นของพอลิเมอร์ (polymer membrane) แล้วใส่เข้าไปในช่องว่างบริเวณท้องของหมู จากการทดลองพบว่าเซลล์ที่ใส่เข้าไปนั้นสามารถอยู่รอดได้โดยไม่ถูกทำลายโดยระบบภูมิคุ้มกัน จากการทดลองครั้งนี้เป็นตัวอย่างการห่อหุ้มเซลล์ (cell encapsuiation) ในยุคแรกๆ ซึ่ง

การห่อหุ้มนั้นจะยอมให้สารอาหารและของเสียสามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) และป้องกันเซลล์ภูมิคุ้มกัน (immune Cell) และแอนติบอดี (antibody) ไม่ให้ทำลายเซลล์ ในปลายทศวรรษที่ 1970 มีการนำแผ่นคอลลาเจนหรือวัสดุผสมของคอลลาเจนกับไกลโคซามิโนไกลแคน (collagen-glycosanimoglycan (GAGs) composite) มาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อผิวหนัง โดยใช้แผ่นคอลลาเจนเลี้ยงเนื้อเยื่อในระบบ 2 มิติ พบว่าไม่เกิดการต่อต้านจากระบบภูมิคุ้มกัน

งานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อมีหลักการสำคัญ 3 ประการดังนี้ (Langer, 2000)

1. เซลล์ที่มีความเหมาะสม จะต้องบ่งบอกได้ว่าเป็นเซลล์ชนิดใด และสามารถแยกเซลล์จากเนื้อเยื่อได้

2. วัสดุที่นำมาใช้ผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ จะต้องสามารถผลิตหรือสังเคราะห์ขึ้นมาได้ สามารถขึ้นรูปให้มีรูปร่างและขนาดตามที่ต้องการได้ และอัตราการย่อยสลายของพอลิเมอร์จะต้องมีค่าใกล้เคียงกับอัตราการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ

3. การเลี้ยงเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ จะต้องเพาะ (seed) เซลล์อย่างเป็นระเบียบบนวัสดุที่ใช้และเลี้ยงเซลล์ให้เพิ่มจำนวนหรือเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (differentiate) ในห้องปฏิบัติการหรือถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (bioreactor) หรืออาจปลูกถ่ายโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีเซลล์เจริญเติบโตในจำนวนที่เหมาะสมลงในสิ่งมีชีวิตให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไปเป็นเนื้อเยื่อที่ทำงานได้

ในปัจจุบันงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อมีการพัฒนาและเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วและต่อเนื่อง ดังจะเห็นได้จากงานวิจัยทางด้านนี้ที่มีการตีพิมพ์อย่างมากมาย

### 1.2.4 โครงเลี้ยงเซลล์ (scaffolds)

ปัจจุบันการทำ bone tissue engineering จะใช้โครงเลี้ยงเซลล์ในการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อให้กับผู้ป่วย เนื่องจากปกติแล้วเซลล์ที่แยกอยู่เดี่ยวๆ นั้นไม่สามารถสร้างตัวเป็นเนื้อเยื่อได้ จำเป็นต้องอยู่ในสภาวะและสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสมเพื่อให้เซลล์เหล่านี้สามารถเจริญและสร้างตัวเป็นเนื้อเยื่อใหม่ได้ โดยโครงเลี้ยงเซลล์จะทำหน้าที่เสมือนบ้านของเซลล์ และทำหน้าที่เป็นโครงให้เซลล์เกาะ และมีช่องทางในการลำเลียงสารอาหาร และ growth factors ไปยังเซลล์ที่อยู่ในโครงเลี้ยงเซลล์ เซลล์จะเจริญเติบโตแทนที่การสลายตัวของโครงเลี้ยงเซลล์ ทำให้เนื้อเยื่อที่ผิดปกติสามารถกลับมาทำงานได้ปกติดังเดิม (Hollinger and Battisan, 1986) โดยโครงเลี้ยงเซลล์ที่ดีควรมีคุณสมบัติดังนี้

1. Biocompatibility คือความสามารถที่เข้ากับเนื้อเยื่อกระดูกในร่างกายได้ ซึ่งจะทำให้มีการเจริญของเนื้อเยื่อกระดูกผสานเข้าไปภายในสารทดแทนกระดูกจนเป็นเนื้อเดียวกัน โดยปริมาณ

สารเคมีที่ใช้เตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ไม่ทำให้เกิดพิษ การติดเชื้อหรือเกิดผลข้างเคียงในลักษณะเฉพาะที่หรือทั่วร่างกาย (http://en.wikipedia.org/wiki/Biocompatible)

2. Biodegradability คือความสามารถที่จะค่อยๆ ถูกสลายโดยกลไกต่างๆ ภายในร่างกาย ทำให้โครงเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ค่อยๆ ถูกกำจัดออกไปจากตำแหน่งที่ใส่หลังจากมีการเจริญของเนื้อเยื่อกระดูกเข้าไปแทนที่แล้ว จนในที่สุดเมื่อหมดหน้าที่แล้วโครงเลี้ยงเซลล์ถูกร่างกายสลายและกำจัดออกไป จนหมด จุดสำคัญที่น่าสนใจ คืออัตราของการสลายตัวของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ดีจะต้องสอดคล้องกับอัตราการเจริญของเนื้อเยื่อกระดูกที่เข้าไปแทนที่ เพราะถ้าหากการสลายตัวเกิดขึ้นเร็วเกินไป จะทำให้บริเวณที่ใส่โครงเลี้ยงเซลล์ขาดความแข็งแรง และเกิดการแตกหรือหักได้เมื่อได้รับแรงกระทำ เนื่องจากการเจริญของกระดูกยังเข้าไปไม่มากพอที่จะทำหน้าที่แทน แต่ถ้าการสลายตัวเกิดขึ้นช้าหรือไม่มีการสลายตัว โครงเลี้ยงเซลล์นั้นก็จะเป็นตัวขัดขวางการเจริญของเนื้อเยื่อกระดูก ทำให้เนื้อเยื่อกระดูกไม่สามารถเจริญเข้าไปแทนที่ได้

3. Bioresorbable คือผลผลิตจากการย่อยสลายในร่างกายไม่ก่อให้เกิดโทษทั้งเฉพาะที่และทั่วร่างกาย ร่างกายสามารถกำจัดออกโดยกระบวนการปกติได้โดยไม่มีผลข้างเคียงเกิดขึ้น (Hutmacher, 2000)

4. Osteoinductive capabilities คือความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เนื้อเยื่อกระดูกมีการเจริญเข้าไปในโครงเลี้ยงเซลล์

5. Bioinert คือโครงเลี้ยงเซลล์ต้องเป็นสารที่มีความเฉื่อย ไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่นโดยง่าย

6. ความมีรูพรุน คือมีขนาดและความพรุนที่เหมาะสม เพราะขนาดและรูปร่างของรูพรุนมีผลต่อการเข้าไปได้ของเซลล์ในโครงเลี้ยงเซลล์ และยังมีผลต่อการนำส่งสารอาหาร growth factors และการกำจัดของเสียที่เซลล์สร้างขึ้น ซึ่งจะส่งผลให้เซลล์สามารถเจริญเติบโตและเปลี่ยนแปลงตัวเองได้ ขนาดของรูพรุนและความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์จะขึ้นอยู่กับวิธีการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ (ตารางที่ 1.1)

7. มีพื้นผิวที่เหมาะสม คือสามารถทำให้เซลล์เกาะติดได้ กล่าวคือพื้นผิวต้องมีความชอบน้ำสูง (hydrophilicity) เพราะเซลล์ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในที่ที่ไม่มีน้ำ

8. มีคุณสมบัติเชิงกลที่เหมาะสม คือในทางคลินิกนั้นจะทำการฝังโครงเลี้ยงเซลล์ในส่วนกระดูกที่เกิดความผิดปกติ ดังนั้นโครงเลี้ยงเซลล์ควรมีคุณสมบัติที่สามารถทนต่อแรงกดได้ ซึ่งถ้าโครงเลี้ยงเซลล์สามารถทนต่อแรงกดได้ดีก็สามารถนำไปใช้ในบริเวณที่ต้องรับน้ำหนักมากๆ ได้ เช่น บริเวณสะโพก กระดูกต้นขา เป็นต้น แต่หากโครงเลี้ยงเซลล์ทนแรงกดได้น้อย ก็อาจจำกัดการใช้แทนกระดูกในส่วนที่รับน้ำหนักไม่มาก เช่น บริเวณข้อนิ้ว กะโหลก เป็นต้น

นอกจากคุณสมบัติข้างต้นแล้วในการออกแบบโครงเลี้ยงเซลล์ จำเป็นต้องพิจารณาถึงคุณสมบัติที่จะใช้กับเซลล์แต่ละชนิด รวมถึงปัจจัยด้านหน้าที่และโครงสร้าง และปัจจัยที่ไม่ควรมองข้าม คือช่องว่างที่ใช้เพื่อในกระบวนการต่างๆ ของเซลล์ เช่น การแลกเปลี่ยนก๊าซหรือของเหลว การหายใจ การได้รับอาหาร และผลจากกิจกรรมเหล่านี้จะใช้ เลือดเป็น สื่อกลางในการแลกเปลี่ยนสารต่างๆ ดังนั้นในการเลี้ยงเนื้อเยื่อบางชนิดจึ งต้องมีการสร้าง หลอดเลือด/เส้นเลือด ด้วย ซึ่งเส้นเลือดระหว่างเซลล์นั้นมีขนาดประมาณ 100 ไมครอน ดังนั้นโครงเลี้ยงเซลล์จึงควรมีขนาดรูพรุน ไม่น้อยกว่านี้ จึงต้องนำเรื่องนี้มาพิจารณาด้วย (Humacher, 2000; วินิตา บัณฑิต และคณะ (บรรณาธิการ), 2535)

**ตารางที่ 1.1** ขนาดรูพรุนและความพรุนที่ได้จากการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์วิธีต่างๆ (Humacher, 2000)

| วิธีการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ | ขนาดของรูพรุน (μm) | ความพรุน (%) |
|---|---|---|
| การหล่อ (solvent casting) | 30-300 | 20-50 |
| เยื่อแผ่นบางแบบซ้อนทับ (membrane lamination) | 30-300 | < 85 |
| การหลอม (melt-molding) | 50-500 | < 80 |
| การรีด (extrusion) | < 100 | < 84 |
| การระเหิดแห้ง (freeze dry) | < 200 | < 97 |
| ของไหลเหนือวิกฤติ (supercritical-fluid) | <100 | 10-30 |

**1.2.4.1 วัสดุที่ใช้เตรียมโครงเลี้ยงเซลล์**

ปัจจุบันวัสดุที่นิยมใช้เพื่อเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์มีด้วยกันหลายประเภท ได้แก่ พอลิเมอร์สังเคราะห์ พอลิเมอร์จากธรรมชาติ และสารตัวเติมประเภทสารอนินทรีย์ (inorganic filler) โดยวัสดุแต่ละประเภทมีลักษณะสำคัญดังนี้

1. พอลิเมอร์สังเคราะห์ คือพอลิเมอร์ที่ได้จากการสังเคราะห์โดยปฏิกิริยาเคมี ที่นิยมใช้เตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ เป็นจำพวกพอลิแซคคาไรด์ (polysaccharide) และพอลิเอสเทอร์ (polyesters) โดยที่พอลิแซคคาไรด์ เกิดจากการต่อมอนอเมอร์ของ น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เป็นสายพอลิเมอร์ ด้วยพันธะ glucosidic อัลจิเนต (alginate) เป็นพอลิแซคคาร์ไรด์ที่ได้จากสาหร่ายสีน้ำตาล (brown alginate) นำมาใช้งานในรูปของไฮโดรเจล (hydrogel) ทำหน้าที่ตรึงเซลล์ให้อยู่กับที่ โดยมีขนาดรูพรุนเล็กยอมให้น้ำและของเสียแพร่ผ่านไปได้ (Eiselt, et al., 2000) อัลจิเนตที่มีมวลโมเลกุลสูงสามารถรับ

แรงได้ดีกว่าที่มีมวลโมเลกุลต่ำ (Kuo และ Ma, 2001) และเมื่อพิจารณาคุณสมบัติทางชีวภาพ พบว่ามีความคล้ายคลึงกับคอลลาเจน และมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Shapiro และ Cohen, 1997) ส่วนพอลิเอสเทอร์จัดเป็นพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ ทางชีวภาพเช่นกัน ประกอบด้วยพันธะเอสเทอร์ภายในสายโซ่พอลิเมอร์จำนวนมาก พันธะนี้มีความแข็งแรงน้อยแตกตัวได้ง่ายเมื่อทำปฏิกิริยากับน้ำ จึงถูกย่อยสลายเป็นสารโมเลกุลเล็กลงได้ พอลิเอสเทอร์ยังสามารถจำแนกตามส่วนประกอบของสายโซ่เป็น 2 ประเภท คือ แบบโซ่ตรงยาว (aliphatic) และโซ่วงแหวน (aromatic) ปัจจุบันมีการผลิตพอลิเมอร์ในกลุ่มนี้หลายชนิดส่วนใหญ่เป็นพอลิเมอร์ประเภทที่มีสายโซ่ตรงยาว เนื่องจาก การสลายพันธะดีกว่า ส่วนพอลิเมอร์ที่มีสายโซ่เป็นวงแหวน จะต้องปรับปรุงโครงสร้างให้เหมาะสมมากขึ้น โดยอาจต่อ สายโซ่ตรงยาวเข้าไป เป็นต้น (มัณฑนา โอภาประกาสิต , 2550) ตัวอย่างพอลิเมอร์สังเคราะห์ที่ใช้เตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ เช่น พอลิคาโปรแล็คโตน (PCL) พอลิไกลโคลิก แอซิด (PGA) พอลิแล็คติก แอซิด (PLLA) และ พอลิโปรปีลีน ฟูมาเรท เป็นต้น (Lu et al., 2001) การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ส่วนใหญ่นิยมนำพอลิเมอร์สังเคราะห์หลายชนิดมาผสมกัน เพื่อเพิ่มจุดเด่นและลดจุดด้อยของพอลิเมอร์แต่ละชนิด เช่น โครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมจากพอลิแล็คติก โค ไกลโคลิก แอซิดซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของพอลิไกลโคลิก แอซิด และพอลิแล็คติก แอซิด ซึ่งต้องการระยะเวลาในการย่อยสลายสั้นลงเมื่อเปรียบเทียบกับที่เป็นพอลิแล็คติก แอซิดอย่างเดียว อัตราส่วนระหว่างพอลิแล็คติก แอซิดและพอลิไกลโคลิก จึงเป็นตัวกำหนดระยะเวลาที่ใช้เพื่อย่อยสลายพอลิเมอร์ พอลิเมอร์ผสมชนิดนี้มีข้อดี คือมีความแข็งแรงสูงเนื่องจากเป็นโครงสร้างที่ความเป็นผลึกสูง และส่งเสริมการเจริญเติบโตและการแบ่งตัวของเซลล์ได้ดี เป็นต้น (Iwasaki et al., 2002)

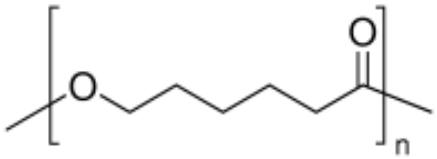
2. พอลิเมอร์ธรรมชาติ คือพอลิเมอร์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ เป็นพอลิเมอร์อีกชนิดที่นิยมใช้เตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ เนื่องจากมีคุณสมบัติที่เข้ากันได้ทางชีวภาพและมีคุณสมบัติให้เซลล์เกาะติดและเพิ่มจำนวนเซลล์ในโครงเลี้ยงเซลล์ แต่มี ข้อเสีย คือเมื่อใช้เป็นส่วนประกอบของโครงเลี้ยงเซลล์จะมีสมบัติเชิงกลที่ไม่ดี เปราะ แตกหักง่าย เนื่องจากการขึ้นรูปทำให้ได้โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีความพรุนสูง ที่ใช้ในปัจจุบัน ได้แก่ คอลลาเจน (collagen) ไคโตซาน (chitosan) ไฮยาลูโรนิค แอซิด (hyaluronic acid) และไฟบริโนเจน-ไฟบริน (fibrinogen-fibrin) เป็นต้น

3. สารตัวเติมประเภทสารอนินทรีย์ จากความรู้พื้นฐานที่ว่ากระดูกประกอบด้วย แคลเซียมและฟอตเฟต ประมาณ 50% โดยน้ำหนัก นักวิจัยจึงได้นำ สารอนินทรีย์ มาเป็นส่วนผสมในโครงเลี้ยงเซลล์เพื่อให้โครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้มีสมบัติคล้ายคลึงกับกระดูกมากขึ้น และอีกทั้งมีความชอบน้ำเพิ่มมากขึ้นด้วย ทำให้เซลล์มายึดเกาะและเจริญบนโครงเลี้ยงเซลล์ได้ดี สารอนินทรีย์ที่ นิยมใช้เป็นส่วนประกอบ ของ โครงเลี้ยงเซลล์ ได้แก่ แคลเซียมซิลิเกต ( calcium silicate) คุณสมบัติเด่นของแคลเซียมซิลิเกต คือมีความสามารถในการเชื่อมต่อกับกระดูกเดิมได้เร็ว ดูดซับน้ำได้ดี (Best, et al.,

2008) ไตรแคลเซียมฟอสเฟต (tricalcium phosphate) มีคุณสมบัติเด่น คือไม่มีพิษ สามารถเข้ากันได้ดีกับเนื้อเยื่อ สามารถย่อยสลายได้ และสามารถเหนี่ยวนำให้ เซลล์เจริญเติบโต ได้ แต่มีข้อจำกัดในการใช้งาน คือไม่สามารถนำไปใช้ทดแทนกระดูกในส่วนรองรับน้ำหนักได้ เพราะมีความเปราะและไม่ทนต่อแรงกระแทก (สุพัตรา วรรณโชติ, 2550) และไฮดรอกซีแอพาไทต์ ซึ่งมีคุณสมบัติเด่น คือมีองค์ประกอบทางเคมีใกล้เคียงกับกระดูก ในมนุษย์ เป็นตัวเร่งให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อ ใหม่ เนื่องจากเซลล์มาเกาะติดและเจริญเติบโตได้ดี (อนิรุทธิ์ คำใจ, 2548)

**1.2.4.2 โครงเลี้ยงเซลล์จากพอลิคาโปรแล็คโตน (polycaprolactone scaffold)**

พอลิคาโปรแล็คโตนเป็นพอลิเมอร์สังเคราะห์ที่มีสายโซ่ตรงยาว (ภาพประกอบที่ 1.5) ผลิตจากมอนอเมอร์ 2-methylene-1, 3-dioxepane (Elfick, 2002) โดยปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชัน (polymerization) ที่ 80 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศของไนโตรเจน และใช้ diethyl-zinc เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Corden et al., 2000)




**ภาพประกอบที่ 1.5** โครงสร้างทางเคมีของพอลิคาโปรแล็คโตน

โพลิคาโปรแล็คโตนที่นำมาใช้เตรียมโครงเลี้ยงเซลล์มีขนาดโมเลกุล ประมาณ 25,000-75,000 ดาลตัน มีจุดหลอมเหลว ( $T_m$) ที่ 50-60 องศาเซลเซียส ค่าพลังงาน การหลอมเหลวของโครงสร้างผลึก (heat of fusion) ประมาณ 135.4-135.6 จูลต่อกรัม เมื่อโครงสร้างมีรูปผลึกที่สมบูรณ์ (fully crystalline) แต่ในการใช้งาน จะใช้พอลิคาโปรแล็คโตนที่ มีค่าพลังงาน การ หลอมเหลวของโครงสร้างผลึก 62.2-73.2 จูลต่อกรัม (Corden et al.,2000; Hutmacher et al., 2001; Kweon et al.,2003)

ปัจจุบันนิยมนำพอลิคาโปรแล็คโตนมาใช้เพื่อเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ (ตารางที่ 1.2) เนื่องจากมีข้อดี คือสามารถเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อของร่างกาย และเป็นพอลิเมอร์ที่มีราคาถูกกว่าพอลิเมอร์ชนิดอื่นๆ แต่ก็มีข้อเสีย คือมีความยืดหยุ่นต่ำ รับแรงกดได้น้อย ไม่ชอบน้ำ และใช้เวลาย่อยสลายนานประมาณ 24-36 เดือนในสารละลายของเซลล์ fibroblast (Hutmacher, 2000) ดังนั้นจึงนิยมใช้พอลิคาโปรแล็คโตนมาเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ในลักษณะพอลิเมอร์ผสม เช่นนำไปผสมกับ Poly-D,L-Lactide จะสามารถลดระยะเวลาในการย่อยสลาย ลงจากเดิมมาใช้เวลา ประมาณ 3 เดือน ทั้งยังเพิ่มความแข็งแรงให้กับโครงเลี้ยงเซลล์อีกด้วย (Gunatillake และ Adhikari, 2003) นอกจากนี้

ยังได้มีการเติมสารอนินทรีย์ เช่น ไตรแคลเซียมฟอสเฟต แคลเซียมซิลิเกตลงไปด้วยเพื่อปรับปรุงคุณสมบัติความไม่ชอบน้ำของพอลิคาโปรแล็คโตน ส่งผลให้จำนวนเซลล์ที่เกาะและเจริญบนโครงเลี้ยงเซลล์มีเพิ่มขึ้นด้วย

**ตารางที่ 1.2** โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากโพลิคาโปรแล็คโตนที่ใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ

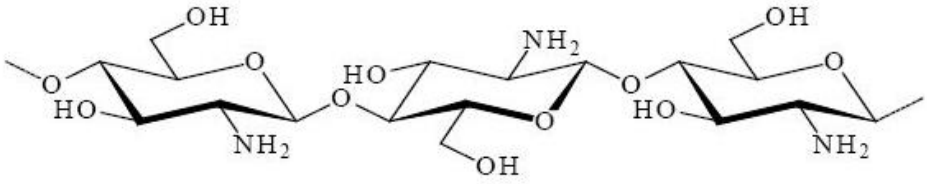
| No. | ชนิดของพอลิเมอร์ | วิธีการขึ้นรูป | ชนิดของเซลล์ที่ใช้ | วิธีการเลี้ยงเซลล์/ เวลา | จำนวนเซลล์เริ่มต้น | ผลการเลี้ยงเซลล์ | เอกสารอ้างอิง |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Network PCL | UV Photopolymerization | Human MG63 Osteoblast | *in vitro*: ใน 12-well plate นาน 4 วัน | $1.5x10^5$ เซลล์ต่อ มล. | เซลล์สามารถแบ่งตัวได้มากขึ้นถึง 2.67-4.51 รอบ | Kweon et al., 2003 |
| 2 | PCL | Fused Deposition modelling | Human fibroblast | *in vitro*: ในจานเลี้ยงเซลล์นาน 4 สัปดาห์ | $15x10^6$ เซลล์ต่อ มล. | มี Extracellular matrix เกิดขึ้นในสัปดาห์ที่ 2 | Hutmacher et al., 2001 |
| 3 | PCL | Extrusion and knit | Human craniofacial osteoblast-like cells | *in vitro*: ในจานเลี้ยงเซลล์นาน 1 วัน | $40x10^3$ เซลล์ต่อ โครงเลี้ยงเซลล์ขนาด 80x30x3 มม. | ดูการจัดเรียงตัวของเซลล์ในโครงเลี้ยงเซลล์มีรูปร่างเรียวยาวและจัดตัวเป็นกลุ่ม | Corden et al., 2000 |
| 4 | PCL Film | Solvent Casting | Human Articular Cartilage | *in vitro*: ในจานเลี้ยงเซลล์นาน 3 สัปดาห์ | $6.5x10^3$ เซลล์ต่อ ซม.$^2$ | เซลล์เพิ่มขึ้นเป็น $10x10^3$ เซลล์ต่อ ซม.$^2$ | Ishuag-Riley et al., 1999 |

**ตารางที่ 1.2 (ต่อ)**

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 5 | 50/50 PCL-PLA Sponge | Freeze dry | Lewis Rates Caritilage | *in vitro*: ในจานเลี้ยงเซลล์นาน 3 สัปดาห์ | $10x10^6$ เซลล์ต่อ มล. | เป็นกระดูกอ่อนโดยตรวจจากการย้อมสี | Honda et al., 2000 |
| 6 | 9/91 PDLA-PCL Film | Solvent Casting | Human Articular Cartilage | *in vitro*: ในจานเลี้ยงเซลล์นาน 3 สัปดาห์ | $6.5x10^3$ เซลล์ต่อ ซม.$^2$ | เซลล์เพิ่มขึ้นเป็น $10.4x10^3$ เซลล์ต่อ ซม.$^2$ | Ishuag-Riley, et al., 1999 |
| 7 | 90/10 PDLA-PCL Film | Solvent Casting | Human Articular Cartilage | *in vitro*: ในจานเลี้ยงเซลล์นาน 3 สัปดาห์ | $6.5x10^3$ เซลล์ต่อ ซม.$^2$ | เซลล์เพิ่มขึ้นเป็น $18.8x10^3$ เซลล์ต่อ ซม.$^2$ | Ishuag-Riley et al., 1999 |

**1.2.4.3 โครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน (chitosan-based scaffold)**

ไคโตซานเป็นพอลิเมอร์ของ β-1,4-2-amino-2 deoxy-D-glucopyranose ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของไคตินที่มีการกำจัดหมู่อะซิทิล (deacetylation) ออกไปด้วยด่างเข้มข้น ทำให้โครงสร้างทางเคมีของไคตินเปลี่ยนไป โดยหมู่อะซิทาไมด์ (-$NHCOCH_3$) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ในวงไพราโนสเปลี่ยนเป็นหมู่อะมิโนอิสระ (-$NH_2$) ที่สามารถรับโปรตรอนได้ ทำให้ได้พอลิเมอร์ที่มีประจุเป็นบวก (ภาพประกอบที่ 1.6) (ภาวดี เมธะคานนท์ และคณะ, 2542)




**ภาพประกอบที่ 1.6** โครงสร้างทางเคมีของไคโตซาน

ระดับการกำจัดหมู่อะซิทิล (%DAC) เป็นค่าที่ใช้บ่งชี้ความเป็นไคโตซาน เนื่องจากไคโตซานเป็นพอลิเมอร์ระหว่างสองมอนอเมอร์ของ N-acetyl-D-glucosamine และ D-glucosamine ถ้าสัดส่วนที่อยู่รวมกันของมอนอเมอร์แรกมากกว่า จะมี %DAC ต่ำซึ่งจะแสดงคุณสมบัติเด่นของไคติน ถ้ามีสัดส่วนของมอนอเมอร์ที่สองมากกว่า จะมี %DAC สูงซึ่งจะแสดงสมบัติเด่นของไคโตซาน (Pillai et al., 2009) ปัจจุบันประเทศไทยสามารถผลิตไคโตซานในระดับที่ใช้เป็นส่วนประกอบในอาหาร (food grade) ที่มีความบริสุทธิ์สูง มีค่า % DAC (Percent of Deacetylated) ระหว่าง 0% ถึง 95% โดยทั่วไปไคโตซานมีขนาดโมเลกุลระหว่าง 50,000-1,000,000 ดาลตัน โดยไคโตซานที่มีขนาดโมเลกุลสูงจะส่งผลให้สารละลายไคโตซานมีความหนืดสูงสามารถละลายในสารละลายกรดที่มี pH น้อยกว่า 6 และไม่ละลายในสารละลายที่มี pH มากกว่า 7 ซึ่งชี้ให้เห็นว่าความสามารถในการละลายของไคโตซานขึ้นกับค่า pH ของตัวทำละลาย (pH-dependent soluble) (Francis-Suh และ Matthew, 2000) กรดที่นิยมนำมาใช้ละลายไคโตซาน ได้แก่ กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก กรดไนตริก กรดไฮโดรคลอริก กรดเปอร์คลอริก และกรดฟอสฟอริก (ตารางที่ 1.3) ที่อุณหภูมิสูงปานกลาง ทั้งนี้อาจมีตะกอนขาวคล้ายเจลเกิดขึ้น แต่พบว่าไคโตซานไม่ละลายในกรดซัลฟูริก

**ตารางที่ 1.3** การละลายของไคโตซานในสารละลายกรดชนิดต่างๆ (1 มิลลิกรัมของไคโตซานต่อ 100 มิลลิลิตร ของสารละลายกรด) (ดัดแปลงจาก สุวดี อุสาหะ, 2549)

| Acid concentration | 1% | 5% | 10% |
|---|---|---|---|
| Acetic | + | + | + |
| Citric | - | - | - |
| Formic | + | + | + |
| Lactic | + | + | + |
| Malic | + | + | + |
| Tartaric | - | - | + |
| Hydrochloric | + | - | - |

+ : ละลาย , - : ไม่ละลาย

การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์จากไคโตซาน โดยทั่วไปนิยมใช้วิธีระเหิดแห้ง ( freeze dry) ที่อุณหภูมิระหว่าง -20 ถึง -78 องศาเซลเซียส ซึ่งทำให้โครงเลี้ยงเซลล์ มีขนาดรูพรุน ประมาณ 100–230 ไมครอน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของไคโตซาน และอุณหภูมิที่ใช้ในการทำระเหิดแห้ง พบว่าที่อุณหภูมิต่ำรูพรุน จะมีขนาดเล็ก ลงไปด้วย จากการศึกษาความเข้ากันได้กับร่างกาย และกิจกรรมทางชีวภาพ (bioactivity) พบว่าไคโตซานมีคุณสมบัติดังกล่าวใกล้เคียงกับพอลิเมอร์ประเภท glycosaminoglycan ซึ่งพบในกระดูกอ่อนของมนุษย์ ดังนั้นไคโตซานจึงเป็นพอลิเมอร์ที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้เตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ (Madihally และ Matthew, 1999)

**1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**

Lin et al. (2007) ศึกษาการยึดติดของเซลล์ต้นกำเนิดบนโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมจากไคโตซาน โดยเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์จาก เทคนิคระเหิดแห้ง (freeze-drying) มี sodium triphosphate penta-basic ($Na_5P_3O_{10}$) เป็นตัวครอสลิงก์ ในขั้นตอนแรกนำสารละลายไคโตซานใส่ลงในแม่พิมพ์ แช่เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน ระเหิดแห้งเป็นเวลา 2 วัน นำไปจุ่มในสารละลาย 5% $Na_5P_3O_{10}$ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เพื่อให้เกิด การครอสลิงก์ ล้างด้วยน้ำกลั่น เป็นเวลา 1 วัน แล้วนำไประเหิดแห้งต่ออีก 1 วัน จะได้โครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมจากไคโตซาน พบว่าการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์ใน สารละลาย phosphate-buffered saline (PBS) เมื่อเวลาผ่านไป 30 วัน ทำให้ น้ำหนัก ลดลงเหลืออยู่ 76% ซึ่งสูงกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไ ด้ทำให้เกิด การ ครอสลิงก์ซึ่ง

น้ำหนักเหลืออยู่ 46% ทั้งนี้เนื่องจากโครงเลี้ยงเซลล์ที่เกิด ครอสลิงก์มีโครงสร้าง 3 มิติ ในลักษณะเป็นโครงร่างตาข่าย จึงทนต่อการ ย่อย สลายได้ ส่งผลให้ เซลล์ สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ และเจริญเติบโตได้ดี จำนวนเซลล์ที่เกาะบน ฟองน้ำ ไคโตซาน พบว่ามีจำนวนเซลล์เทียบได้กับไคโตซานที่เติมคอลลาเจน 10 ไมโครลิตร และเทียบได้กับจำนวนเซลล์ที่เกาะกับเนื้อเยื่อบนจานเพาะเชื้อ ผู้วิจัยยังได้ทำการทดสอบในหนูทดลอง โดยใช้โครงเลี้ยงเซลล์ตกแต่งบาดแผลของหนูพบว่าเมื่อผ่านไป 12 วัน บาดแผลของหนูไม่มีการอักเสบเกิดขึ้นและหายในที่สุด

นราวุธ ทองมะโรงสี , (2547) ได้ทำการศึกษาโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมจากพอลิคาโปรแล็คโตน (PCL) ทำการขึ้นรูปโดยใช้เทคนิคการหล่อ (casting) โดยแปรผันค่าความเข้มข้นของพอลิคาโปรแล็คโตนที่ละลายในคลอโรฟอร์มที่ 20, 25 และ 30% (w/v) และใช้สารก่อรูพรุน คือ เกลือและผงชูรส ในอัตราส่วนของเกลือต่อผงชูรสต่อพอลิคาโปรแล็คโตนคงที่ ที่ 7.5:7.5:1 โดยน้ำหนัก เปรียบเทียบกับการใช้เกลือเพียงอย่างเดียวที่อัตราส่วนเกลือต่อพอลิคาโปรแล็คโตน ที่ 15:1 โดยน้ำหนัก พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตได้มีค่าความเค้นแรงดึงในช่วง 0.0147-0.0784 MPa ขนาดรูพรุนในช่วง 105-205 ไมครอน ค่าความพรุนในช่วง 78.44-85.72% อัตราการย่อยสลายใน phosphate-buffered saline (PBS) ประมาณ 0.28% (โดยน้ำหนัก) ต่อสัปดาห์ อัตราการย่อยสลายในสารละลายเอนไซม์ไลเปสที่ความเข้มข้น 30 U/l ประมาณ 1.68% (โดยน้ำหนัก) ต่อสัปดาห์ ทดสอบการย่อยสลายในร่างกายเมื่อปลูกถ่ายโครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโปรแล็คโตนในสัตว์ทดลอง พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ย่อยสลายได้ 53.29% (โดยน้ำหนัก) ในเวลา 3 เดือน ความเข้มข้นของสารละลายพอลิคาโปรแล็คโตนและชนิดของสารก่อรูพรุนที่ใช้ไม่มีผลต่อคุณสมบัติการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์ภายนอกร่างกาย

นอกจากนี้ผู้วิจัยยังทำการทดสอบการผลิตเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนของมนุษย์ในโครงเลี้ยงเซลล์รูปใบหู โดยนำโครงเลี้ยงเซลล์ไปเลี้ยงภายนอกร่างกายเป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่าเซลล์สามารถยึดติดกับโครงเลี้ยงเซลล์ได้ เมื่อนำไปปลูกถ่ายใต้ผิวหนังของสัตว์ทดลองเป็นเวลา 6 เดือน พบว่าเซลล์สามารถเปลี่ยนเป็นเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนได้อย่างสมบูรณ์ แสดงให้เห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดนี้สามารถนำไปใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนเพื่อประโยชน์ทางด้านการแพทย์ได้

Lakanaporn, (2006) ทำการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์จากไคโตซาน ซีเอ็ม-ไคติน และซีเอ็มไคโตซาน ทำการขึ้นรูปโดยใช้เทคนิคการระเหิดแห้ง (freeze drying) จากนั้นใช้วิธีอบไอน้ำในออโต้เคลฟเพื่อทำให้เกิดการครอสลิงก์ งานวิจัยนี้ได้ศึกษาถึงผลของอุณหภูมิที่ใช้อบไอน้ำต่อการเกิดครอสลิงก์ คุณสมบัติเชิงกล การบวมตัว และลักษณะโครงเลี้ยงเซลล์ พบว่าการอบไอน้ำทำให้หมู่อะมิโนมีจำนวนลดลง เนื่องจากหมู่อะมิโนเกี่ยวข้องกับการครอสลิงก์ ดังนั้นการอบไอน้ำในออโต้เคลฟจึงทำให้เกิดครอสลิงก์ขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าเปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักที่หายไปและการ

บวมตัวของโครงเลี้ยงเซลล์ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิที่ใช้อบไอน้ำด้วย โครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ได้ผ่านการอบไอน้ำและผ่านการอบไอน้ำมีรูปแบบเปิดและมีรูปร่างเป็นแท่ง

Shanmugasundaram et al., (2001) เตรียมโครงเลี้ยงเซลล์จากไคโตซาน และคอลลาเจน โดยใช้ glutaraldehyde เป็นสารครอสลิงก์ พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีอัตราส่วนของคอลลาเจนต่อไคโตซาน ที่ 6:4 มีการบวมตัวสูงสุด และเมื่อนำโครงเลี้ยงเซลล์ไปทดสอบกับ human epidermoid carcinoma cells พบว่าเซลล์สามารถเกาะติด และเจริญเติบโตบนโครงเลี้ยงเซลล์ ได้ ซึ่งผู้วิจัยได้ประยุกต์ใช้โครงเลี้ยงเซลล์นี้เพื่อเป็นแบบจำลองในการทดสอบยาต้านมะเร็งอื่นด้วย

Park et al. (2002) เตรียมโครงเลี้ยงเซลล์จากคอลลาเจ น และ hyaluronic acid ในอัตราส่วน 8:2 โดยน้ำหนัก และใช้ 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl)carbodiimide (EDC) เป็นสารครอสลิงก์ ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1-100 mM. และใช้เทคนิคการระเหิดแห้ง (freeze-drying) ที่อุณหภูมิ -20, -70 และ -196 องศาเซลเซียส จากการศึกษาพบว่าอุณหภูมิที่ใช้ในเทคนิคระเหิดแห้ง มีผลต่อความพรุนและขนาดของรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ กล่าวคือที่อุณหภูมิต่ำ -70 และ -196 องศาเซลเซียส ค่าความพรุนและขนาดของรูพรุนจะเพิ่มขึ้น แต่ที่ -20 องศาเซลเซียส ค่าพารามิเตอร์ดังกล่าวจะ ลดลง การ ทดสอบ คุณ สมบัติ การย่อยสลาย ของ โครงเลี้ยงเซลล์โดยใช้ เอนไซม์คอลลาจีเนส (collagenase) พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ ที่ใช้ EDC เป็นสารครอสลิงก์ สามารถ ต้าน ทานการย่อยของเอนไซม์คอลลาจีเนสได้ดีกว่าการใช้ glutaraldehyde 0.625% เป็นสารครอสลิงก์ นอกจากนี้ผลการทดสอบความเป็นพิษของ EDC กับเซลล์เนื้อเยื่อไขกระดูกของหนู (L929) พบว่าไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษกับเนื้อเยื่อดังกล่าวแต่อย่างใด

Tangsadthakun et al. (2007) พบว่ามวลโมเลกุลของไคโตซานมีผลต่อ คุณสมบัติทางกายภาพและทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมจากคอลลาเจนและไคโตซา น จากการเปรียบเทียบโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมจากไคโตซานที่มีมวลโมเลกุลสูง กลาง และต่ำ โดยเทคนิคการระเหิดแห้ง และ ทำให้เกิด ครอสลิงก์ ระหว่างคอลลาเจนและไคโตซานโดย วิธี dehydrothemal treatment พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยคอลลาเจนกับไคโตซานมวลโมเลกุลต่ำ ให้ค่า compressive modulus สูงสุด และอัตราส่วนระหว่างคอลลาเจนกับไคโตซานที่ให้ค่า compressive modulus สูงสุด คือ 70:30 นอกจากนี้ยังพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีไคโตซานต่ำกว่า 30 %wt ให้ค่าการบวมตัวสูงสุดด้วย และเข้ากันได้กับเซลล์เนื้อเยื่อไขกระดูกของหนู (L929) โดยมีผลกระตุ้นและเร่งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ โดยเฉพาะโครงเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยไคโตซาน 30 %wt

Ratanavaraporn, (2009) ทำการศึกษาอิทธิพลของปัจจัยต่างๆ อาทิชนิดของกรดที่ใช้เป็นตัวทำละลาย น้ำหนักโมเลกุลของวัสดุชีวภาพ และสัดส่วนองค์ประกอบใน วัสดุชีวภาพ ผสมต่อคุณสมบัติทางกายภาพและทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากคอลลาเจน เจลาตินและไค

โตซาน พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจนที่ผลิตจากกรดไฮโดรคลอริก จะให้ รูพรุน ขนาด ใหญ่ สามารถทนแรงกดได้ดี และส่งเสริมการยึดเกาะของเซลล์ ในขณะที่โครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจนที่ผลิตจากกรดอะซิติก ให้ค่าความพรุนมากกว่า มีความสามารถในการอุ้มน้ำได้ดี และส่งเสริมการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ในงานวิจัยนี้ยังได้มีการศึกษาถึง ผลของน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซาน และสัดส่วนการผสมระหว่างเจลาตินกับไคโตซาน เพื่อพัฒนาโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีสมบัติเหมาะสมสำหรับ ใช้เป็นต้นแบบในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก โดยพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากเจลลาตินและไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ( 1,000 กิโลดาลตัล) มี คุณสมบัติทางกายภาพและเชิงกลที่ดี แต่ไม่ส่งเสริมกิจกรรมของเซลล์ต้นกำเนิดไขมันและเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก ในด้านการยึดเกาะและการเพิ่มจำนวน เซลล์ ในทางตรงข้ามโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากเจลาตินและไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (1.4 กิโลดาลตัล) มีความเหมาะต่อเซลล์ใน การยึดเกาะ และการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากกว่า

**1.4 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย**

1. เพื่อเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกจากวัสดุที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ คือ พอลิคาโปรแล็คโตน ไคโตซาน ไฮดรอกซีแอพาไทต์ และไตรแคลเซียมฟอสเฟต

2. ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและทางชีวภาพเบื้องต้นของโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกที่เตรียมได้

**1.5 ขอบเขตงานวิจัย**

1. ศึกษาหาชนิดและความเข้มข้นของตัวประสานที่เหมาะสมสำหรับใช้เตรียมพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์เพื่อใช้เป็นส่วนประกอบของโครงเลี้ยงเซลล์

2. ศึกษาหาอัตราส่วนขององค์ประกอบที่เหมาะสมสำหรับเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์โดยเทคนิคการอัดซึ่งมีเมนทอลเป็นสารก่อรูพรุน และเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์โดยเทคนิคการระเหิดแห้ง

3. เปรียบเทียบคุณสมบัติทางชีวภาพเบื้องต้นของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมโดยเทคนิคการอัดซึ่งมีเมนทอลเป็นสารก่อรูพรุน และเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์โดยเทคนิคการระเหิดแห้ง

**1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย**

ได้โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีคุณสมบัติทางกายภาพที่เหมาะสม ที่จะนำไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวภาพต่อไป

# บทที่ 2

# วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

## 2.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. น้ำปราศจากไอออน
2. พอลิคาโปรแล็คโตน (polycaprolactone) น้ำหนักโมเลกุล 14,000 (Aldrich, Japan)
3. ไคโตซานจากเปลือกปู (chitosan; middle-viscous) (Sigma, Japan)
4. พอลิ(ไวนิลแอลกอฮอล์) (poly (vinyl alcohol)) น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย 85,000-124,000 (Aldrich, USA)
5. ไฮดรอกซีแอพาไทต์ (hydroxyapatite) (Fluka, United Kingdom)
6. ผลึกเมนทอล (menthol crystal) (Vidhyasom, Thailand)
7. คลอโรฟอร์ม (chloroform; $CHCl_3$) (Merck, Germany)
8. ไตรแคลเซียมฟอสเฟต (tricalcium phosphate) (Fluka, Germany)
9. โซเดียมไตรพอลิฟอสเฟต (sodiumtripolyphosphate; $Na_5P_3O_{10}$) (Sigma-Aldrich)
10. กรดอะซิติก (acetic acid; $C_2H_4O_2$) (Merck, Germany)
11. ทวีน 80 (tween 80) (Vidhyasom, Thailand)
12. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide; NaOH) (Merck, Germany)

## 2.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (4-digit balance) รุ่น CP224S ผลิตโดยบริษัท Sartorius
2. เครื่องกวนระบบแม่เหล็ก (magnetic stirrer) รุ่น MGS-1001 ผลิตโดยบริษัท Lab Tech
3. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น Z206A ผลิตโดยบริษัท Labor Technik
4. ตู้อบ (oven) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
5. ตู้เย็น (refrigerator) อุณหภูมิ -40 ± 2 องศาเซลเซียส
6. เครื่องกรองสุญญากาศ (vacuum filter) รุ่น WJ-20 ผลิตโดยบริษัท Sibata
7. เครื่องทำแห้งแบบแช่แข็ง (freeze dryer) รุ่น FlexiDry ผลิตโดยบริษัท FTS Systems
8. ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด 10-100 ไมโครลิตร รุ่น Discovery comfort ผลิตโดย

บริษัท HTL Lab Solutions

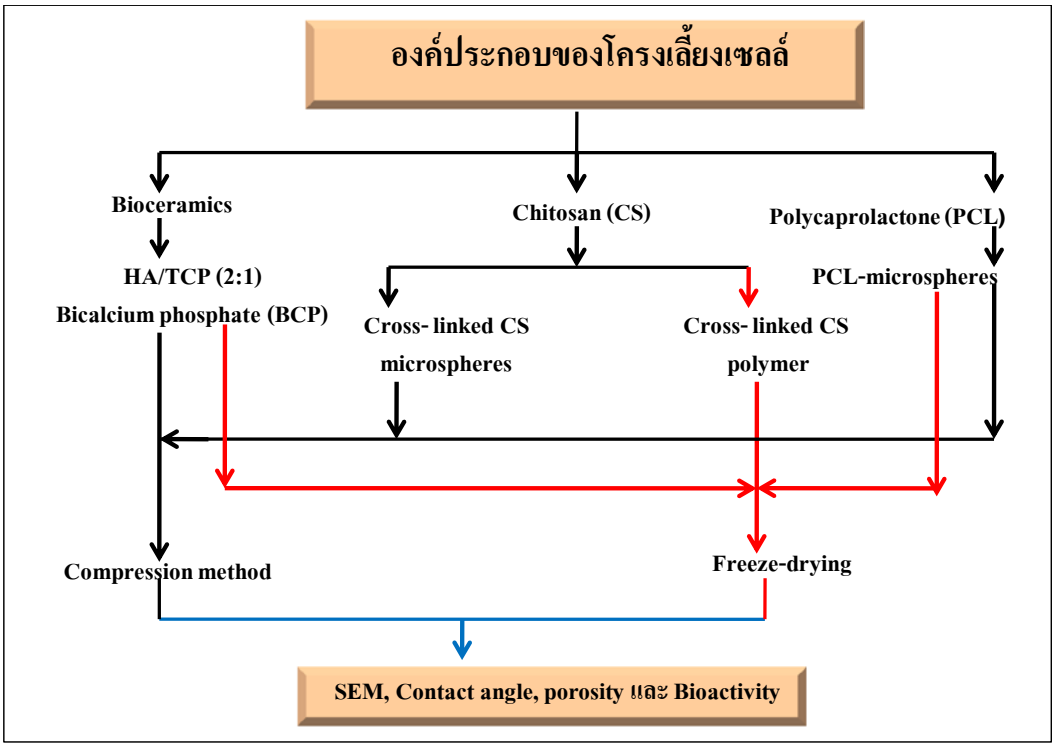
9. เครื่องอัดไฮดรอลิค (hydraulic presses) รุ่น HP ผลิตโดยบริษัท T.M.C. manufacturing Co., Ltd

10. แม่พิมพ์ (mold) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร

**2.3 วิธีการทดลอง**

ในงานวิจัยนี้ได้แบ่งลักษณะการวิจัยเป็น 4 กิจกรรม ประกอบด้วย

**กิจกรรมที่ 1** การทดลองเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์เพื่อทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ สรุปเป็นแผนผังดังภาพประกอบที่ 2.1




**ภาพประกอบที่ 2.1** แผนผังการทดลองเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์เพื่อทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ

**กิจกรรมที่ 2** ศึกษาหาตัวประสานที่เหมาะสมสำหรับเตรียมพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ เพื่อใช้เป็นส่วนประกอบของโครงเลี้ยงเซลล์ และทำการผสมไฮดรอกซีแอพาไทต์และไตรแคลเซียมฟอสเฟต เพื่อปรับปรุงคุณสมบัติความชอบน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์

**กิจกรรมที่ 3** เตรียมโครงเลี้ยงเซลล์โดยเทคนิคการอัด ซึ่งมีเมนทอลเป็นสารก่อรูพรุน และเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์โดยเทคนิคการระเหิดแห้ง

**กิจกรรมที่** 4 การทดสอบและวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพ และสมบัติทางชีวภาพ (bioactivity) เบื้องต้นของโครงเลี้ยงเซลล์

### 2.3.1 การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์เพื่อทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้น

1. ละลาย พอลิคาโปรแล็คโตน (PCL) 1 กรัม ในคลอโรฟอร์ม ($CHCl_3$) 20 มิลลิลิตร จะได้ 5% PCL ใน $CHCl_3$
2. เติมสารละลายที่ได้ลงในสารละลาย 0.5% PVA (ใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นตัวทำละลาย) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร กวนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง นำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
3. ล้างสารที่ได้จากข้อ 2 ด้วยน้ำปราศจากไอออน 5 ครั้ง เพื่อกำจัด PVA และคลอโรฟอร์มออก นำไประเหิดแห้งที่ -48 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้พอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์
4. ผสมพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์กับสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1% (w/v) ในกรดอะซิติก (3% v/v) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน อัดลงแม่พิมพ์พลาสติกเบาๆ
5. นำสารผสมไประเหิดแห้งที่ -48 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และแช่ในสารละลายโซเดียมไตรพอลิฟอสเฟต (0.1% w/v) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
6. ล้างโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้ด้วยน้ำปราศจากไอออน 5 ครั้ง แล้วนำไประเหิดแห้งที่ -48 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
7. ทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของ โครงเลี้ยงเซลล์ ได้แก่ วิเคราะห์โครงร่างสัณฐานด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) และ วัดความชอบน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์โดยเครื่องวัด contact angle

**2.3.2 การศึกษาหาตัวประสานที่เหมาะสมสำหรับเตรียม พอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ เพื่อใช้เป็นส่วนประกอบในโครงเลี้ยงเซลล์ โดยผสมกับไฮดรอกซีแอพาไทต์ และไตรแคลเซียมฟอสเฟต (2:1 โดยน้ำหนัก ซึ่งต่อไปจะเรียกว่าไบแคลเซียมฟอสเฟต (BCP)) เพื่อปรับปรุงคุณสมบัติความชอบน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์**

1. ละลายพอลิคาโปรแล็คโตน 2 กรัม ในคลอโรฟอร์ม 40 มิลลิลิตร จะ ได้ 5% PCL ใน $CHCl_3$
2. เติมสารละลาย ที่ได้ลงในสารละลาย 0.5%, 1% และ 2% PVA และ 0.5%, 1% และ 2% Tween 80 (ในน้ำปราศจากไอออน ) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร กวนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
3. ล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน 5 ครั้ง นำไประเหิดแห้งที่ -48 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้พอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์
4. นำ พอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ ผสมกับไบแคลเซียมฟอสเฟตในอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก ผสมกับสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1% w/v ในกรดอะซิติก (3% v/v) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร
5. บรรจุใส่แม่พิมพ์พลาสติก และนำไประเหิดแห้งที่ -48 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
6. นำโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้แช่ในสารละลายโซเดียมไตรพอลิฟอสเฟต (0.1% w/v) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
7. ล้างโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยน้ำปราศจากไอออน 5 ครั้ง แล้วนำไประเหิดแห้งที่ -48 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
8. นำไปวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด เพื่อดูลักษณะพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ ที่เกิดขึ้น หาขนาดและการกระจายตัวของพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ด้วยเครื่องวัดขนาดและการกระจายตัวของอนุภาค (Laser Particle Size Analyzer) เปรียบเทียบขนาดและการกระจายตัวของพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ ที่ใช้ 0.5%, 1% และ 2% PVA และ 1% Tween 80 เป็นตัวประสาน เพื่อหาตัวประสานที่เหมาะสมที่สุด และทดสอบความชอบน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์โดยวัดค่ามุมสัมผัส

**2.3.3 การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์โดยเทคนิคการอัดซึ่งมีเมนทอลเป็นสารก่อรูพรุน และการเตรียมโดยเทคนิคการระเหิดแห้ง**

2.3.3.1 เตรียมโครงเลี้ยงเซลล์โดยเทคนิคการอัดซึ่งมีเมนทอลเป็นสารก่อรูพรุน

2.3.3.1.1 การเตรียมไคโตซานไมโครสเฟียร์

1. เตรียมสารละลาย ไคโตซานความเข้มข้น 0.5% (w/v) ในกรดอะซิติก ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และมี pH เท่ากับ 4
2. ค่อยหยดสารละลาย ไคโตซานความเข้มข้น 0.5% (w/v) ปริมาตรรวม 50 มิลลิลิตร ลงในสารละลาย โซเดียมไตรพอลิฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.4% (w/v) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร พร้อมกวนตลอดเวลา
3. นำสารที่ได้ไปกรองด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ จะได้ไคโตซานเมตริกซ์
4. ล้างไคโตซานเมตริกซ์ ด้วยน้ำปราศจากไอออน 5 ครั้ง นำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน
5. นำไคโตซานเมตริกซ์มา บดให้ละเอียด จะได้ไคโตซานไมโครสเฟียร์เพื่อใช้เป็นส่วนประกอบของโครงเลี้ยงเซลล์

2.3.3.1.2 เตรียมโครงเลี้ยงเซลล์โดยเทคนิคการอัดซึ่งมีเมนทอลเป็นสารก่อรูพรุน

1. ผสมพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์กับไบแคลเซียมฟอสเฟต ไคโตซานไมโครสเฟียร์ และเมนทอล (อัตราส่วนของแต่ละสารเป็นไปตามตารางที่ 3.4) ให้เข้ากันอย่างดี
2. ค่อยๆหยดน้ำลงไปเพื่อทำให้สารผสมรวมตัวกันเป็นก้อน แล้วอัดลงแม่พิมพ์พลาสติกเบาๆ
3. นำไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน และนำสารผสมที่แห้งบรรจุใส่แม่พิมพ์เหล็กขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร (ภาพประกอบที่ 2.2) อัดขึ้นรูปด้วยเครื่องอัดไฮดรอลิค (ภาพประกอบที่ 2.3) ใช้แรง 1 ตันต่อตารางนิ้ว
4. นำโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้ไปอบที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เพื่อให้เมนทอลระเหยออกไปเกิดเป็นรูพรุนในโครงเลี้ยงเซลล์
5. นำโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้ ไปทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ และคุณสมบัติด้านกิจกรรมทางชีวภาพ (bioactivity)

**ภาพประกอบที่ 2.2** แม่พิมพ์เหล็กที่ใช้เตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร และอัดด้วยเครื่องไฮดรอลิค

**ภาพประกอบที่ 2.3** เครื่องอัดไฮดรอลิคสำหรับใช้ขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์

2.3.3.2 การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์โดยเทคนิคการระเหิดแห้ง

1. ผสม พอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟีย ร์ และไบแคลเซียมฟอสเฟตกับสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1% (w/v) ในกรดอะซิติกความเข้มข้น 3% (v/v) (อัตราส่วนของสารแต่ละชนิดที่ใช้เป็นไปตามตารางที่ 3.5)
2. นำสารผสมที่ได้บรรจุใส่แม่พิมพ์พลาสติก แล้วนำไประเหิดแห้งที่ -48 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. นำโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากข้อ 2 แช่ในสารละลายโซเดียมไตรพอลิฟอสเฟต (ความเข้มข้น 0.1% w/v) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
4. ล้างโครงเลี้ยงเซลล์ด้วย น้ำปราศจากไอออน 5 ครั้ง นำไประเหิดแห้งที่ -48 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
5. นำโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้มา ทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ และคุณสมบัติด้านกิจกรรมทางชีวภาพ

**2.4 วิธีการวิเคราะห์**

1. การวิเคราะห์โครงเลี้ยงเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope หรือ SEM)

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (FEL รุ่น Quanta 400) ของศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เป็นเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์พื้นผิวของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้ ประกอบด้วยส่วนสำคัญ คือ ระบบผลิตลำแสงอิเล็กตรอน ระบบการจับและถ่ายทอดสัญญาณ และระบบการถ่ายทอดสัญญาณ กำลังขยายสูงสุด 3000,000 เท่า มีความดันไฟฟ้า 1 ถึง 40 กิโลโวลต์ โดยต้องฉาบผิววัตถุด้วยทองคำ (gold coating) ด้วยเครื่อง Ion Sputtering (INC รุ่น STI) ก่อนทำการวิเคราะห์

2. การวิเคราะห์ขนาด และการกระจายตัวของพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ในโครงเลี้ยงเซลล์ ด้วยเครื่องวัดขนาดและการกระจายตัวของอนุภาค (Laser Particle Size Analyzer)

เครื่องวัดขนาดและการกระจายตัวของอนุภาค (Beckman รุ่น Coulter LS 230) ของศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เป็นเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์ขนาดและการกระจายตัวของพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ในโครงเลี้ยงเซลล์ในตัวกลางที่เป็นน้ำ โดยสามารถวัดขนาดอนุภาคในช่วง 0.04-2000 ไมโครเมตร

3. การวิเคราะห์ความชอบน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์

ทำการวิเคราะห์มุมสัมผัสของหยดน้ำบนโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้ ด้วยเครื่องวัดมุมสัมผัส (θ, OCA15+, Data-physics) ของศูนย์เครือข่ายความเป็นเลิศด้านนาโนเทคโนโลยีภาคใต้ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยทำการวัด 3 ครั้งต่อ 1 ชิ้นงาน หาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงแบนมาตรฐานของมุมสัมผัสที่วัดได้

4. วิเคราะห์ความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ (Porosity)

วิเคราะห์ความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์โดยอาศัยหลักการของ Archimedes มีขั้นตอนดังนี้ ชั่งน้ำหนักแห้งของโครงเลี้ยงเซลล์ ($m_1$) นำโครงเลี้ยงเซลล์จุ่มในน้ำรอจนไม่มีฟองอากาศที่ผิว ชั่งน้ำหนักของโครงเลี้ยงเซลล์ในน้ำ ($m_2$) นำโครงเลี้ยงเซลล์ขึ้นจากน้ำแล้วซับให้แห้ง ชั่งน้ำหนักโครงเลี้ยงเซลล์ในอากาศ ($m_3$) และคำนวณค่าความพรุนตามสมการ

$$\text{Porosity} = (m_2-m_1)/(m_2-m_3) \times 100\%$$

5. การวิเคราะห์คุณสมบัติด้านกิจกรรมทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์

แช่โครงเลี้ยงเซลล์ในสารละลาย PBS ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ในช่วงเวลาต่างๆ กัน คือ 1, 7, 14, 21 และ 28 วัน เมื่อครบกำหนดล้างโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยน้ำปราศจากไอออน 5 ครั้ง อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด เพื่อดูการเกิดผลึก แอพาไทต์บน โครงเลี้ยงเซลล์ โครงเลี้ยงเซลล์จะมีคุณสมบัติด้านกิจกรรมชีวภาพที่ดีหากมีแอพาไทต์เกิดขึ้นจำนวนมากในเวลาอันสั้น

6. การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชั่นของโครงเลี้ยงเซลล์

วิเคราะห์หมู่ฟังก์ชั่นของโครงเลี้ยงเซลล์โดยหลักการ Fourier Transform Infrared Spectrometry (Spectrum One FT-IR Spectrometer (Perkin Elmer)) ของภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยบันทึก IR สเปกตรัม เพื่อใช้ในวิเคราะห์ หมู่ฟังก์ชั่นบนโครงสร้างของโครงเลี้ยงเซลล์

# บทที่ 3

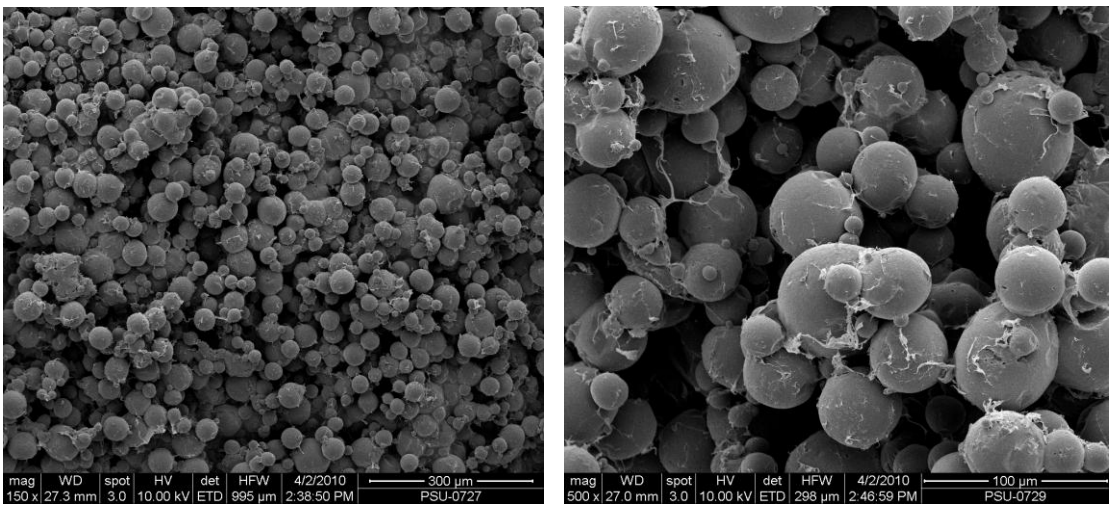
# ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

## 3.1 ผลการทดลองเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์เพื่อทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้น

เตรียมโครงเลี้ยงเซลล์เพื่อทดสอบสมบัติเบื้องต้น โดยผสมพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ ที่มี 0.5% PVA เป็นตัวประสานกับสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1% (w/v) ในกรดอะซิติกความเข้มข้น 3% (v/v) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใช้สารละลาย โซเดียมไตรพอลิฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.1% (w/v) เพื่อทำให้เกิดการครอสลิงก์ในโครงเลี้ยงเซลล์ ทำการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์โดยเทคนิคการระเหิดแห้ง พบว่าลักษณะของ พอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ ที่ได้มีลักษณะเป็นผงสีขาวละเอียด (ภาพประกอบที่ 3.1) เมื่อวิเคราะห์โครงร่างสัณฐานของโครงเลี้ยงเซลล์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้มีส่วนของพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์อยู่ภายใน (ภาพประกอบที่ 3.2) โดยมีไคโตซานเกิดครอสลิงก์เคลือบอยู่ที่ผิวพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ให้ได้โครงสร้าง 3 มิติ พบว่าผิวของพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ บางส่วนไม่ถูกเคลือบด้วยไคโตซาน เมื่อนำโครงเลี้ยงเซลล์ไปทดสอบมุมสัมผัส (ภาพประกอบที่ 3.3) พบว่าได้ค่ามุมสัมผัสเท่ากับ 126.8 ± 1.3 องศา ซึ่งค่าบ่งบอกถึงสมบัติความไม่ชอบน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์ กล่าวคือ ถ้ามุมสัมผัสของหยดน้ำมีค่าน้อยกว่า 90 องศา แสดงว่าพื้นผิวมีความชอบน้ำ (hydrophilicity) แต่ถ้ามุมสัมผัสมีค่ามากกว่า 90 องศา แสดงว่าพื้นผิวมีความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) พื้นผิวของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้จึงยังมีคุณสมบัติที่ไม่เหมาะสมที่จะนำไปศึกษาต่อ จึง ต้องปรับพื้นผิวของโครงเลี้ยงเซลล์ โดยเติมไฮดรอกซีแอพาไทต์ และไตรแคลเซียมฟอสเฟตลงไป เพื่อเพิ่มความชอบน้ำให้มากขึ้น นอกจากนี้ยังทดลองหาตัวประสานที่เหมาะสมสำหรับเตรียมพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ด้วย

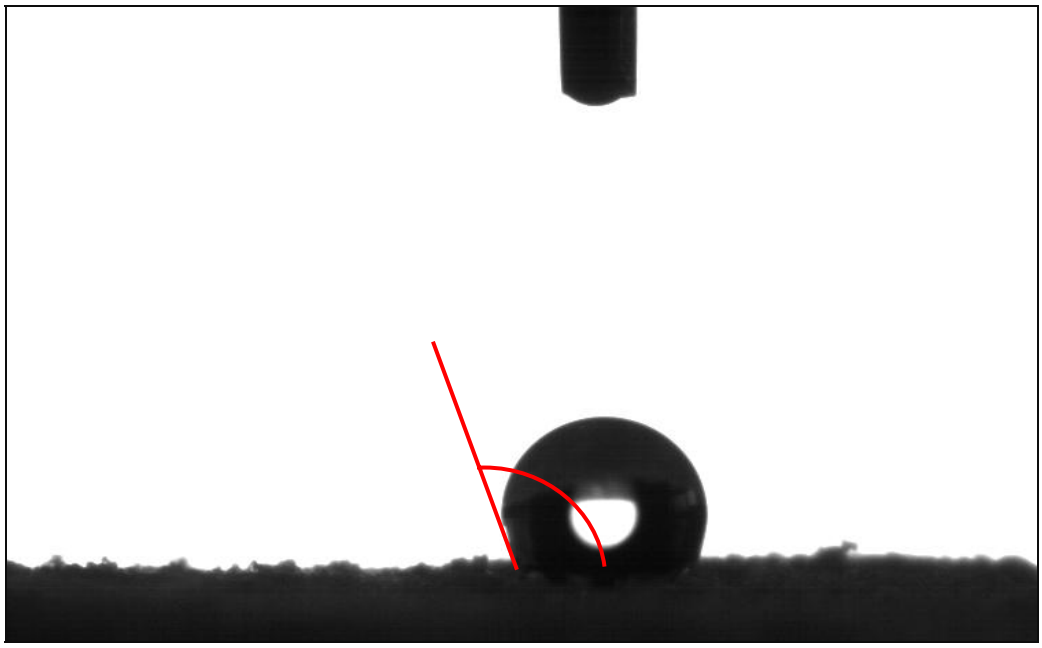
ในงานวิจัยผู้วิจัยยังทดลองเตรียมพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ โดยใช้เครื่อง High Pressure Homogenizer (Microfluidics, รุ่น M110P) โดยใช้แรงดันที่ 500, 700, 1000 และ 1500 bar พบว่าสารที่ผสมด้วยเครื่อง High Pressure Homogenizer ไม่เกิดเป็นผงไมโครสเฟียร์ แต่มีลักษณะรวมเป็นก้อน ดังนั้นการผสมสารด้วยเครื่อง High Pressure Homogenizer จึงไม่เหมาะสมสำหรับใช้เตรียมพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์

**ภาพประกอบที่ 3.1** ลักษณะของพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ที่ได้จากการใช้ 0.5% PVA เป็นตัวประสาน




(ก) (ข)

**ภาพประกอบที่ 3.2** ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงลักษณะโครงร่างสัณฐานของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย พอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ที่เตรียมโดยใช้ 0.5% PVA เป็นตัวประสาน ใช้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1% (w/v) เพื่อขึ้นรูปโดยเทคนิคการระเหิดแห้ง (ก) ที่กำลังขยาย 150 เท่า (ข) ที่กำลังขยาย 500 เท่า



**ภาพประกอบที่ 3.3** การทดสอบความชอบน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์ในภาพประกอบที่ 3.2 โดยวัดมุมสัมผัสของหยดน้ำ วิเคราะห์โดยใช้เครื่องวัดมุมสัมผัส (θ, OCA15+, Data-physics)

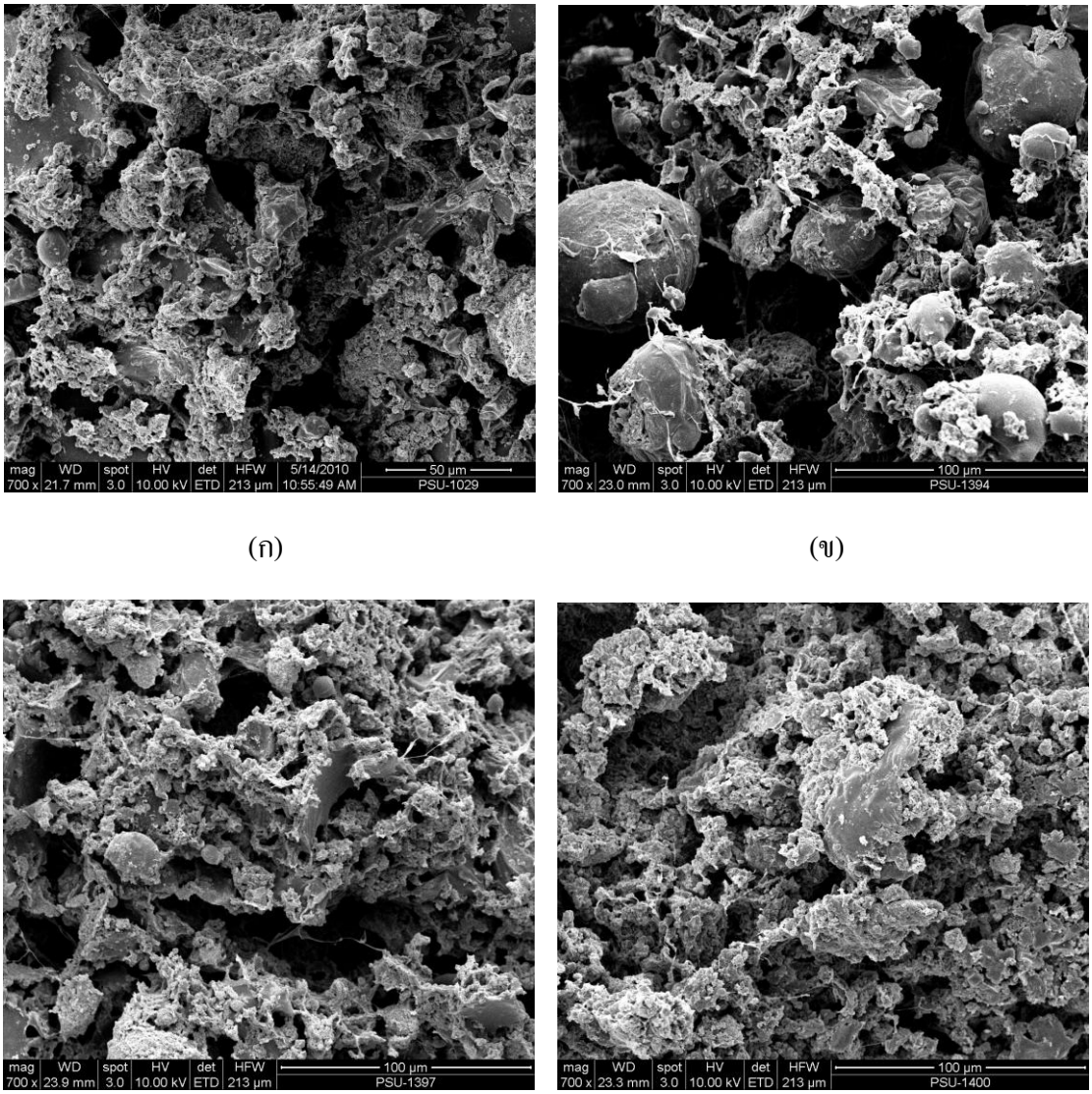
**3.2 การทดลองหาตัวประสานที่เหมาะสมสำหรับเตรียมพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ และการผสมไบแคลเซียมฟอสเฟต เพื่อปรับปรุงคุณสมบัติความชอบน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์**

ทดลองหาตัวประสานที่เหมาะสมเพื่อเตรียม พอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ และใช้เป็นส่วนประกอบของโครงเลี้ยงเซลล์ โดยเปลี่ยนแปลงทั้ง % และชนิดของตัวประสาน คือ 0.5%, 1% และ 2% PVA และ 0.5%, 1% และ 2% Tween 80 ตกตะกอนผงที่ได้โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน 5 ครั้ง พบว่าการใช้ 0.5% และ 2% Tween 80 เป็นตัวประสานไม่ประสบผลสำเร็จในการเตรียม พอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ เนื่องจากไม่สามารถปั่นให้เกิดเป็นสารเนื้อเดียวได้ (เกิดการแยกชั้นระหว่าง $CHCl_3$ และชั้นน้ำที่มี Tween 80) แต่เมื่อใช้ 0.5%, 1% และ 2% PVA และ 1% Tween 80 ปรากฏว่ามีผงสีขาวเกิดขึ้น จากการวิเคราะห์โครงร่างสัณฐานของโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (ภาพประกอบที่ 3.4) พบว่าผงสีขาวที่เกิดจากการใช้ 1% Tween 80 เป็นตัวประสานไม่เกิดเป็น ไมโครสเฟียร์ (ภาพประกอบที่ 3.4 ง) แต่ผงสีขาวที่มี 0.5%, 1% และ 2% PVA เป็นตัวประสาน มีลักษณะไมโครสเฟียร์เกิดขึ้น (ภาพประกอบที่ 3.4 ก, ข และ ค) อย่างไรก็ตามจะสังเกตเห็น พอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ ไม่ชัดเจนมากนัก เนื่องจากถูกบดบังด้วยผงไฮดรอกซีแอพาไทต์และ

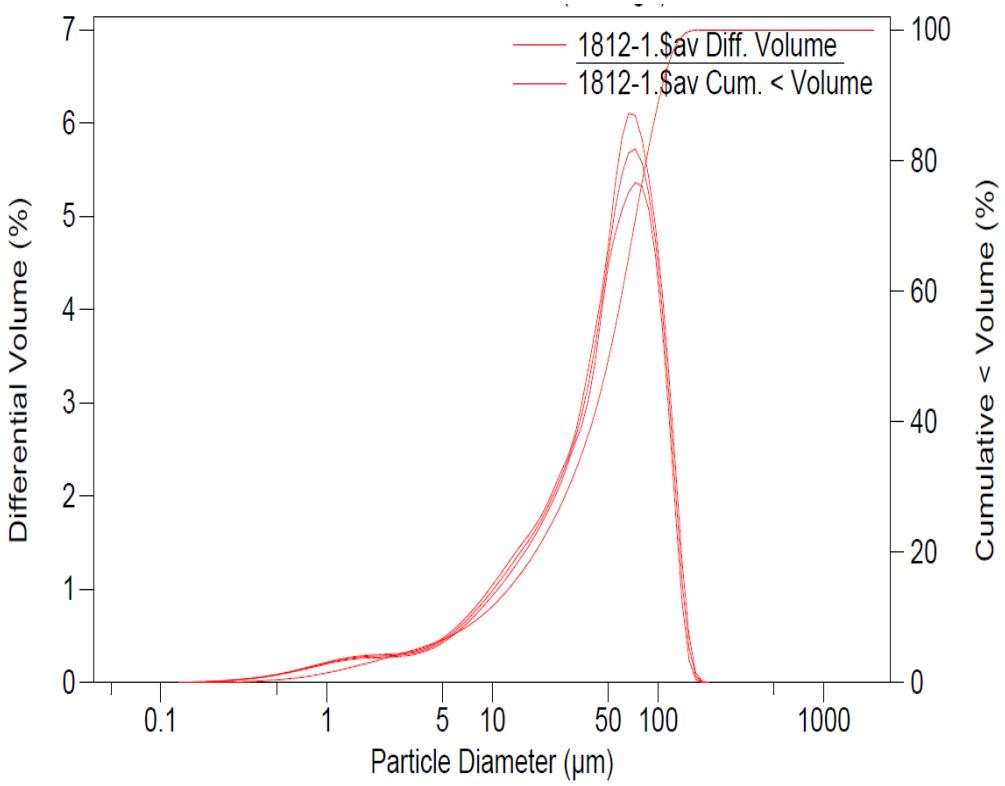
ไตรแคลเซียมฟอสเฟตที่เป็นองค์ประกอบในโครงเลี้ยงเซลล์ เมื่อนำผงสีขาวที่เกิดจากการใช้ 0.5%, 1%, และ 2% PVA เป็นตัวประสานมาวิเคราะห์ขนาดและการกระจายตัวของอนุภาคด้วยเครื่องวัดขนาดและการกระจายตัวของอนุภาค พบว่าที่ 0.5% PVA ไมโครสเฟียร์มีขนาดอนุภาคเฉลี่ยเท่ากับ 33.37 ± 35.22 ไมครอน ที่ 1% PVA มีขนาดอนุภาคเฉลี่ยเท่ากับ 22.37 ± 18.87 ไมครอน และที่ 2% PVA มีขนาดอนุภาคเฉลี่ยเท่ากับ 36.75 ± 30.12 ไมครอน จะเห็นได้ว่าขนาดอนุภาคไมโครสเฟียร์ที่ใช้ 0.5%, 1%, และ 2% PVA เป็นตัวประสานมีค่าใกล้เคียงกัน แต่เมื่อพิจารณาการกระจายตัวของขนาดอนุภาค พบว่าไมโครสเฟียร์ที่มี 1% และ 2% PVA เป็นตัวประสานมีการกระจายตัวของขนาดอนุภาคมากกว่าที่ใช้ 0.5% PVA (ภาพประกอบที่ 3.6 และ 3.7) กล่าวคือ ไมโครสเฟียร์ ที่มี 0.5% PVA เป็นตัวประสานมีการกระจายตัวของขนาดอนุภาคน้อยที่สุด จากภาพประกอบที่ 3.5 แสดงให้เห็นว่าขนาดอนุภาค พอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ ที่มี 0.5% PVA เป็นตัวประสานมีขนาดใกล้เคียงกันมากกว่า จากขนาดอนุภาคที่ใกล้เคียงกันนี้ ส่งผลให้รูพรุนที่เกิดขึ้นในโครงเลี้ยงเซลล์มีขนาดใกล้เคียงกันด้วย ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่เหมาะสมของโครงเลี้ยงเซลล์ ในการเตรียมพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ ต่อมาจึงเลือกใช้ 0.5% PVA เป็นตัวประสาน เมื่อหาเปอร์เซ็นต์ผลได้ (%yield) ของพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ที่ 0.5%, 1%, และ 2% PVA ให้ค่าเปอร์เซ็นต์ผลได้เท่ากับ 74, 39 และ 36% ตามลำดับ แสดงว่าที่ 0.5% PVA ให้ค่าเปอร์เซ็นต์ผลได้ดีที่สุด โดยสภาวะที่ใช้เหมาะสมในการเกิดพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ มากที่สุด พบว่าประสิทธิภาพการเกิดไมโครสเฟียร์ขึ้นอยู่กับปริมาณและความหนืดของตัวประสานเมื่อตัวประสานมีความหนืดน้อย ทำให้การกวนเกิดขึ้นได้ดีจึงเกิดเป็นไมโครสเฟียร์ได้มากที่สุด

จากการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีการเติมไฮดรอกซีแอพาไทต์ และไตรแคลเซียมฟอสเฟตในอัตราส่วน 2:1 โดยน้ำหนัก (ต่อมาเรียกว่าไบแคลเซียมฟอสเฟต ) และผสมกับ พอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ ในอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก จากนั้นผสมกับสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1% (w/v) ในกรดอะซิติกความเข้มข้น 3% (v/v) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร อัดลงแม่พิมพ์พลาสติก นำไประเหิดแห้งก่อนแช่ในสารละลายโซเดียมไตรพอลิฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.1% (w/v) เพื่อทำให้เกิดครอสลิงก์ เมื่อวิเคราะห์โครงร่างสัณฐานของโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (ภาพประกอบที่ 3.4 ก) พบส่วนประกอบทั้ง 3 ส่วน คือไบแคลเซียมฟอสเฟต พอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ และสายไคโตซาน เมื่อนำโครงเลี้ยงเซลล์มาทดสอบมุมสัมผัส พบว่าไม่สามารถวัดค่ามุมสัมผัสได้ เนื่องจากโครงเลี้ยงเซลล์มีความพรุนมาก เป็นผลมาจากการเติมไบแคลเซียมฟอสเฟตในโครงเลี้ยงเซลล์ เนื่องจากโครงเลี้ยงเซลล์ที่ดีควรมีคุณสมบัติความชอบน้ำและความไม่ชอบน้ำในอัตราส่วนที่เหมาะสม จากค่ามุมสัมผัสทำให้ต้องปรับ

อัตราส่วนของ พอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ และไบแคลเซียมฟอสเฟต เพื่อให้ได้โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีคุณสมบัติความชอบน้ำที่เหมาะสมต่อไป



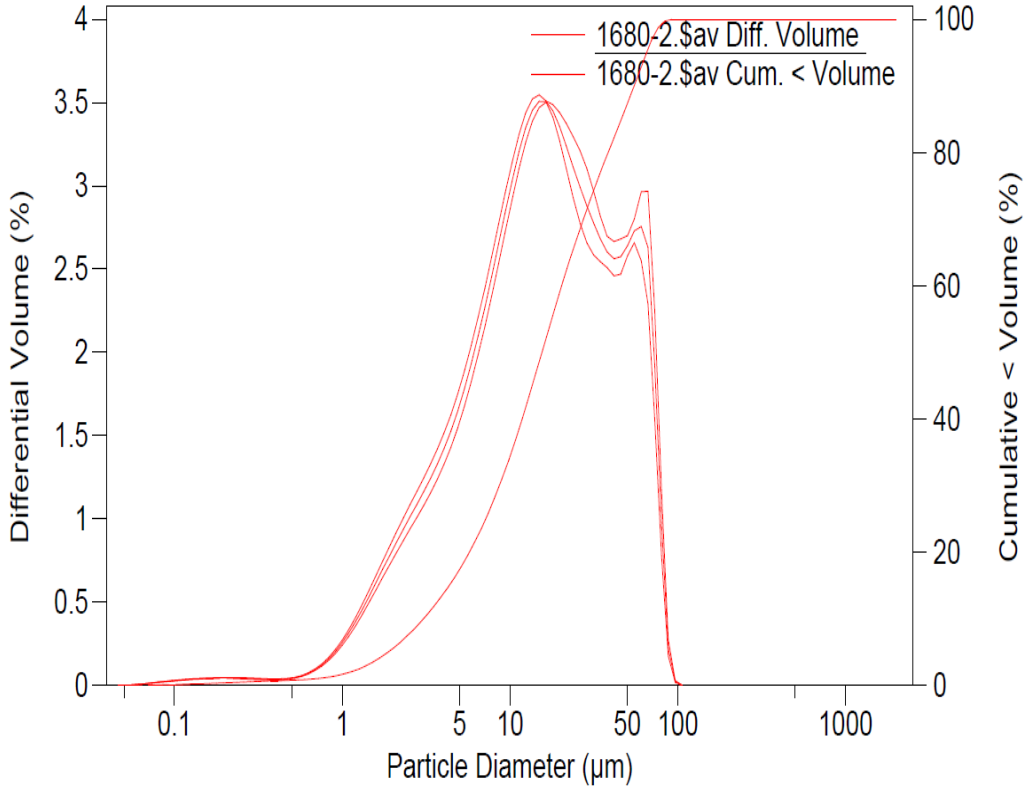

**ภาพประกอบที่ 3.4** ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงลักษณะโครงสร้างของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมโดยการผสม พอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ กับไบแคลเซียมฟอสเฟต ในอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก ใช้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1% (w/v) เพื่อขึ้นรูปเป็นโครงสร้าง 3 มิติ โดยเทคนิคการระเหิดแห้ง (ก) 0.5% PVA เป็นตัวประสาน (ข) 1% PVA เป็นตัวประสาน (ค) 2% PVA เป็นตัวประสาน (ง) 1% Tween 80 เป็นตัวประสาน




**ภาพประกอบที่ 3.5** กราฟแสดงขนาดและการกระจายตัวของอนุภาคพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์เมื่อใช้ 0.5% PVA เป็นตัวประสาน

**ตารางที่ 3.1** ค่าขนาดและการกระจายตัวของอนุภาคพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์เมื่อใช้ 0.5% PVA เป็นตัวประสาน

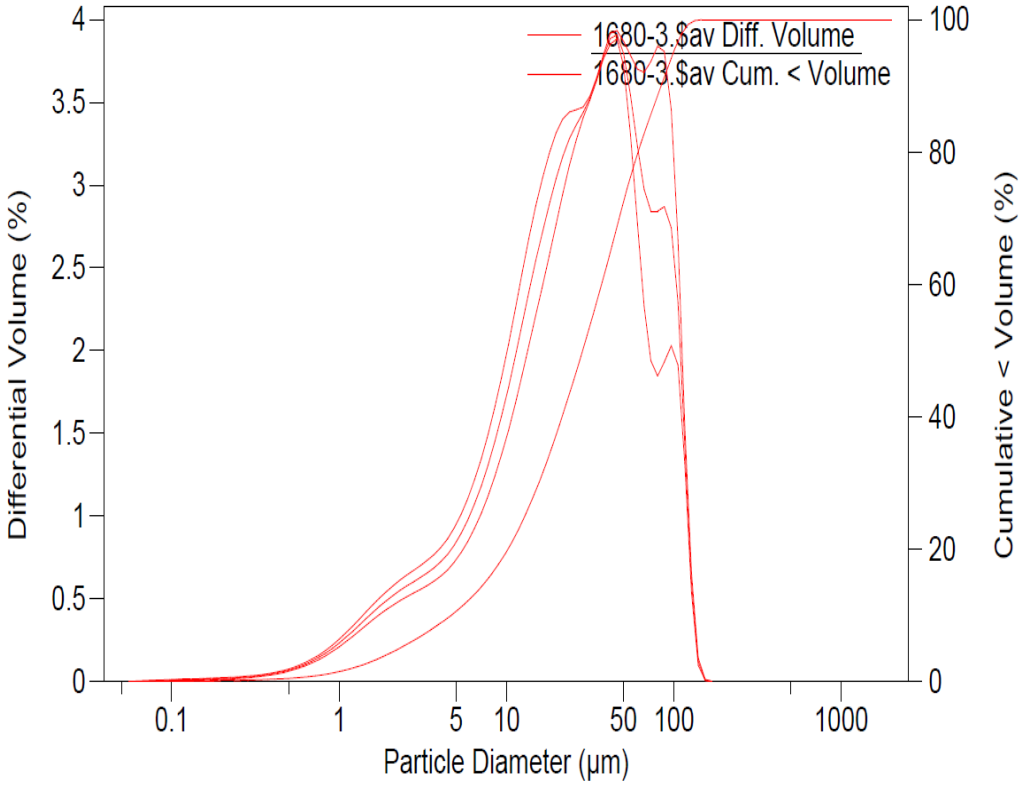
| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Volume: | | 100% | | |
| Mean: | | 53.37 µm | | |
| Median: | | 50.75 µm | | |
| Mean/Median ratio: | | 1.052 | | |
| Mode: | | 72.94 µm | | |
| S.D.: | | 35.22 µm | | |
| Variance: | | 1240 $\mu m^2$ | | |
| <10% | <25% | <50% | <75% | <90% |
| 8.437 µm | 23.54 µm | 50.75 µm | 78.07 µm | 102.8 µm |




**ภาพประกอบที่ 3.6** กราฟแสดงขนาดและการกระจายตัวของอนุภาคพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์เมื่อใช้ 1% PVA เป็นตัวประสาน

**ตารางที่ 3.2** ค่าขนาดและการกระจายตัวของอนุภาคพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ เมื่อใช้ 1% PVA เป็นตัวประสาน

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Volume: | | 100% | | |
| Mean: | | 22.37 µm | | |
| Median: | | 15.51 µm | | |
| Mean/Median ratio: | | 1.442 | | |
| Mode: | | 14.94 µm | | |
| S.D.: | | 19.87 µm | | |
| Variance: | | 394.7 $\mu m^2$ | | |
| <10% | <25% | <50% | <75% | <90% |
| 3.055 µm | 7.170 µm | 15.51 µm | 32.30 µm | 55.01 µm |




**ภาพประกอบที่ 3.7** กราฟแสดงขนาดและการกระจายตัวของอนุภาคพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์เมื่อใช้ 2% PVA เป็นตัวประสาน

**ตารางที่ 3.3** ค่าขนาดและการกระจายตัวของอนุภาคพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ เมื่อใช้ 2% PVA เป็นตัวประสาน

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Volume: | | 100% | | |
| Mean: | | 36.75 µm | | |
| Median: | | 28.54 µm | | |
| Mean/Median ratio: | | 1.288 | | |
| Mode: | | 45.76 µm | | |
| S.D.: | | 30.12 µm | | |
| Variance: | | 906.9 $\mu m^2$ | | |
| <10% | <25% | <50% | <75% | <90% |
| 4.680 µm | 12.89 µm | 28.54 µm | 53.36 µm | 84.08 µm |

## 3.3 โครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียม โดย เทคนิค การอัดซึ่งมีเมนทอลเป็นสารก่อรูพรุน และที่เตรียมโดยเทคนิคการระเหิดแห้ง

### 3.3.1 โครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมโดยเทคนิคการอัดซึ่งมีเมนทอลเป็นสารก่อรูพรุน

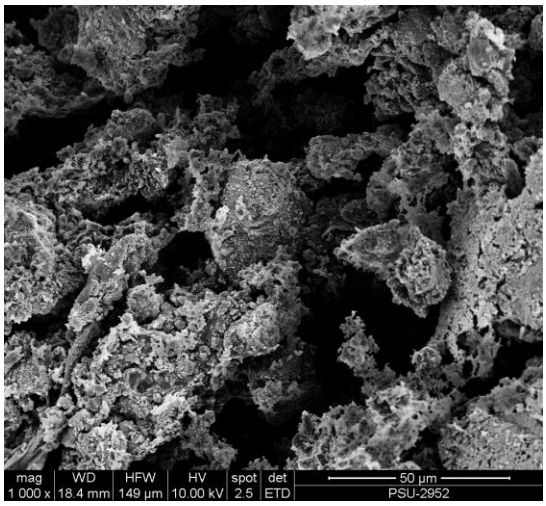
เตรียมโครงเลี้ยงเซลล์โดยผสมพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ กับไบแคลเซียมฟอสเฟต ไคโตซานไมโครสเฟียร์ และเมนทอล (อัตราส่วนของสารที่ใช้เป็นไปตามตารางที่ 3.4) ขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์โดยเทคนิคการอัด พบว่าโครงสร้างที่มีรูพรุนเกิดจากการระเหยออกไปของเมนทอล อัตราส่วนของสารที่ใช้ในการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ เป็นอัตราส่วนระหว่างสาร hydrophobic คือพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ และสาร hydrophilic ในที่นี้คือไฮดรอกซีแอพาไทต์ ไตรแคลเซียมฟอสเฟต และไคโตซานไมโครสเฟียร์ จากการทดสอบมุมสัมผัสของโครงเลี้ยงเซลล์ พบว่าแปรผันโดยตรงกับปริมาณสาร hydrophobic ที่ใช้ กล่าวคือโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีเปอร์เซ็นต์พอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์สูงจะให้ค่ามุมสัมผัสสูงด้วย ส่วนโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีเปอร์เซ็นต์พอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ต่ำจะให้ค่ามุมสัมผัสต่ำด้วย จากการทดสอบพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีเปอร์เซ็นต์พอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์มากกว่า 60% ในที่นี้คือสูตร C7, C8 และ C9 ให้ค่ามุมสัมผัสในช่วง 71-74 องศา โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีเปอร์เซ็นต์พอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ต่ำกว่า 60% จะเกิดการบวมตัวและแตกออกเมื่อแช่ในน้ำ จึงไม่นำมาศึกษาอีกต่อไป โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีเปอร์เซ็นต์พอลิคาโปรแล็คโตนมากกว่า 60% วัดค่าความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ได้เท่ากับ 79.57 ± 2.98%, 79.78 ± 2.29% และ 83.00 ± 1.26% สำหรับ C7, C8 และ C9 ตามลำดับ เนื่องจากความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์มีความสำคัญต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์ การแพร่ผ่านของอาหารและน้ำ เพื่อให้เซลล์ได้รับอาหารและน้ำเพียงพอ และยังส่งผลต่อปฏิกิริยาระหว่างเซลล์ด้วยกัน (cell-cell interaction) ด้วย โดยค่าความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมไม่ควรมีค่าต่ำกว่า 70% โดยค่าความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ขึ้นอยู่กับปริมาณสารก่อรูพรุนที่ใช้ โดยทั่วไปโครงเลี้ยงเซลล์ที่ขึ้นรูปโดยกระบวนการนี้ให้ความพรุนในช่วง 20-93% (Hutmacher, 2000; Lanza et al., 2000 and Pego et al., 2003) ในการทดลองนี้วัดความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ได้ในช่วง 79-83% แสดงว่าเมนทอลเป็นสารก่อความพรุนที่ดี เมื่อวิเคราะห์โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีเปอร์เซ็นต์พอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ต่ำกว่า 60% สูตร C2 และC5 ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่ารูพรุนไม่เชื่อมต่อกัน และรูพรุนมีขนาดใหญ่ (ภาพประกอบที่ 3.9) ส่วนโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีเปอร์เซ็นต์พอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์มากกว่า 60% สูตร C7 และ C8 พบว่ามีรูพรุนที่เชื่อมต่อกัน และมีขนาดรูพรุนที่ใกล้เคียงกัน (ภาพประกอบที่ 3.10) ถึงแม้ว่าค่ามุมสัมผัสและความ

พรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ C7, C8 และ C9 จะมีค่าไม่แตกต่างกันมาก แต่เมื่อพิจารณาส่วนประกอบของสารที่ใช้เป็นส่วนประกอบในโครงเลี้ยงเซลล์ พบว่า C7 เป็นโครงเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจากมีปริมาณไฮดรอกซีแอพาไทต์และไตรแคลเซียมฟอสเฟตมากที่สุด ซึ่งจะส่งผลให้โครงเลี้ยงเซลล์เกิดผลึกแอพาไทต์ได้มาก เมื่อแช่ในสารละลาย PBS โดยผลึกแอพาไทต์ที่เกิดขึ้นเป็นตัวบ่งชี้เบื้องต้นว่าโครงเลี้ยงเซลล์จะมีกิจกรรมทางชีวภาพที่ดีเมื่อใส่เข้าไปในร่างกาย ดังนั้น C7 จึงมีความเหมาะสมมากที่สุดสำหรับการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์โดยเทคนิคการอัดซึ่งมีเมนทอลเป็นสารก่อรูพรุน

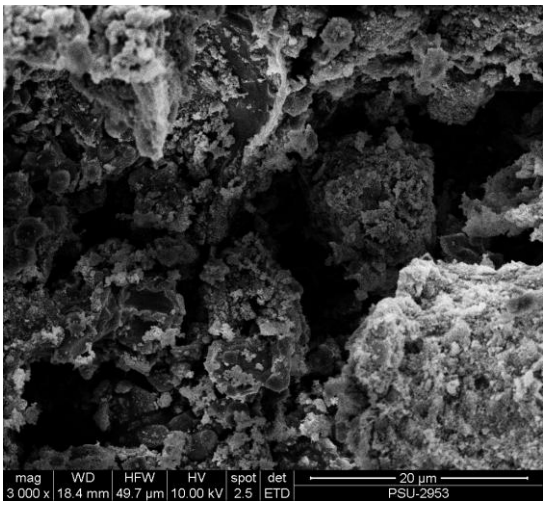
**ภาพประกอบที่ 3.8** โครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมโดยผสมพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์กับไบแคลเซียมฟอสเฟต ไคโตซานไมโครสเฟียร์ และเมนทอล ขึ้นรูปโดยเทคนิคการอัด

**ตารางที่ 3.4** อัตราส่วนของพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ ไบแคลเซียมฟอสเฟต ไคโตซานไมโครสเฟียร์ และเมนทอลที่เป็นส่วนประกอบของโครงเลี้ยงเซลล์เตรียมโดยเทคนิคการอัด ค่ามุมสัมผัส และเปอร์เซ็นต์ความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ รายงานเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงแบนมาตรฐาน

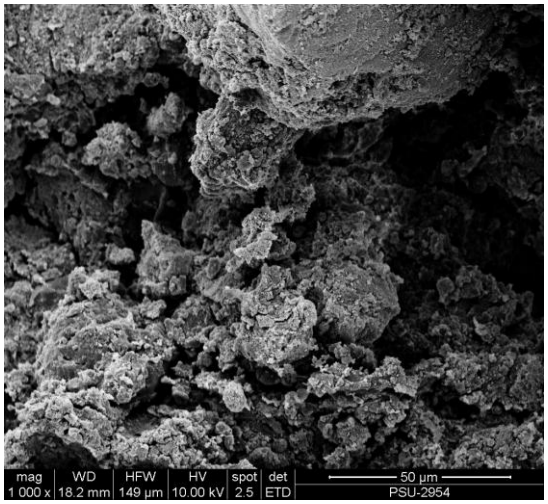
| **โครงเลี้ยงเซลล์** | **พอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ (กรัม)** | **ไบแคลเซียมฟอสเฟต (กรัม)** | **ไคโตซานไมโครสเฟียร์ (กรัม)** | **เมนทอล (กรัม)** | **wt% พอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ (กรัม)** | **ค่ามุมสัมผัส (องศา)** | **ความพรุน (%) n = 3** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| C1 | 0.1 | 0.45 | 0.45 | 0.26 | 10 | 40.44 ± 5.99 | - |
| C2 | 0.2 | 0.4 | 0.4 | 0.26 | 20 | 40.72 ± 1.05 | - |
| C3 | 0.3 | 0.35 | 0.35 | 0.26 | 30 | 44.42 ± 9.61 | - |
| C4 | 0.4 | 0.3 | 0.3 | 0.26 | 40 | 48.23 ±1.91 | - |
| C5 | 0.5 | 0.25 | 0.25 | 0.26 | 50 | 51.44 ± 3.46 | - |
| C6 | 0.6 | 0.2 | 0.2 | 0.26 | 60 | 57.07 ± 2.45 | - |
| C7 | 0.7 | 0.15 | 0.15 | 0.26 | 70 | 71.19 ± 6.07 | 79.57 ± 2.98 |
| C8 | 0.8 | 0.1 | 0.1 | 0.26 | 80 | 73.86 ± 1.12 | 79.78 ± 2.29 |
| C9 | 0.9 | 0.05 | 0.05 | 0.26 | 90 | 74.85 ± 2.94 | 83.00 ± 1.26 |



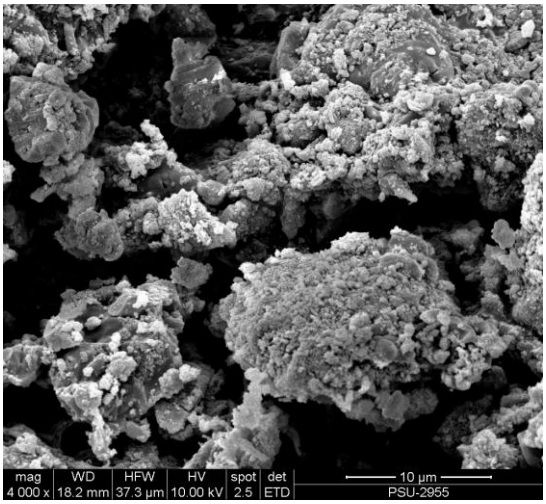

(ก)




(ข)

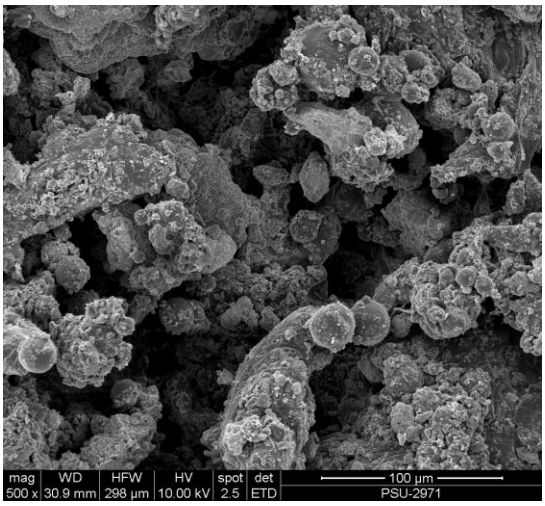



(ค)

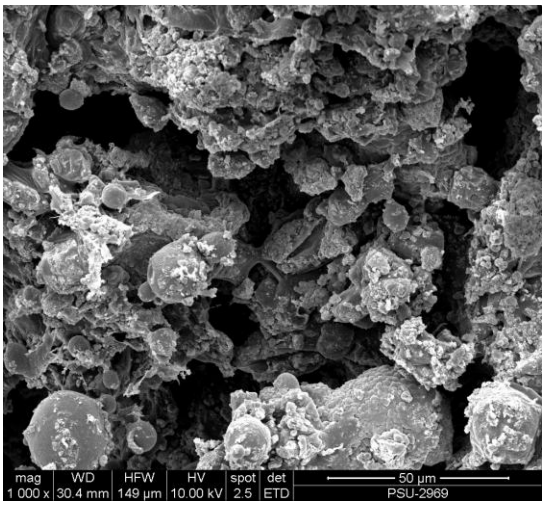



(ง)

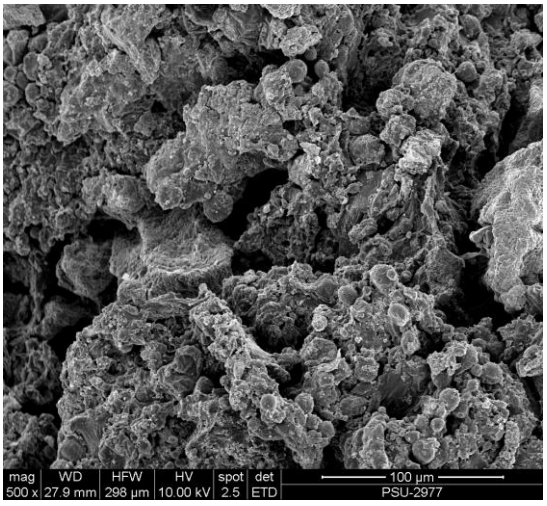
**ภาพประกอบที่ 3.9** ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงลักษณะโครงสร้างของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ขึ้นรูปโดยเทคนิคการอัดซึ่งมีเมนทอลเป็นสารก่อรูพรุน เมื่อโครงเลี้ยงเซลล์ประกอบด้วยพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ต่ำกว่า 60% (ก) C2 ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า (ข) C2 ที่กำลังขยาย 3,000 เท่า (ค) C5 ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า (ง) C5 ที่กำลังขยาย 4,000 เท่า



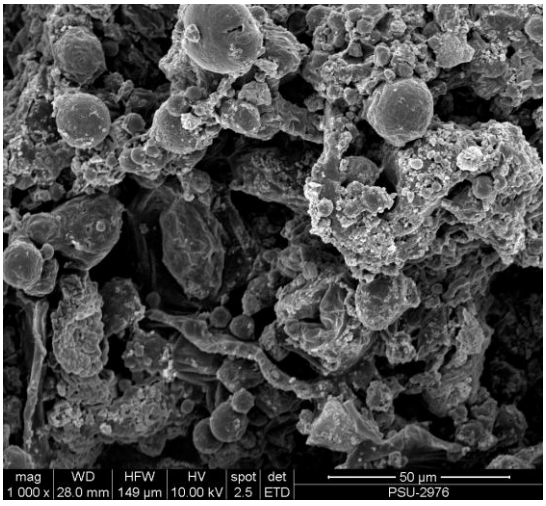

(ก)




(ข)




(ค)




(ง)

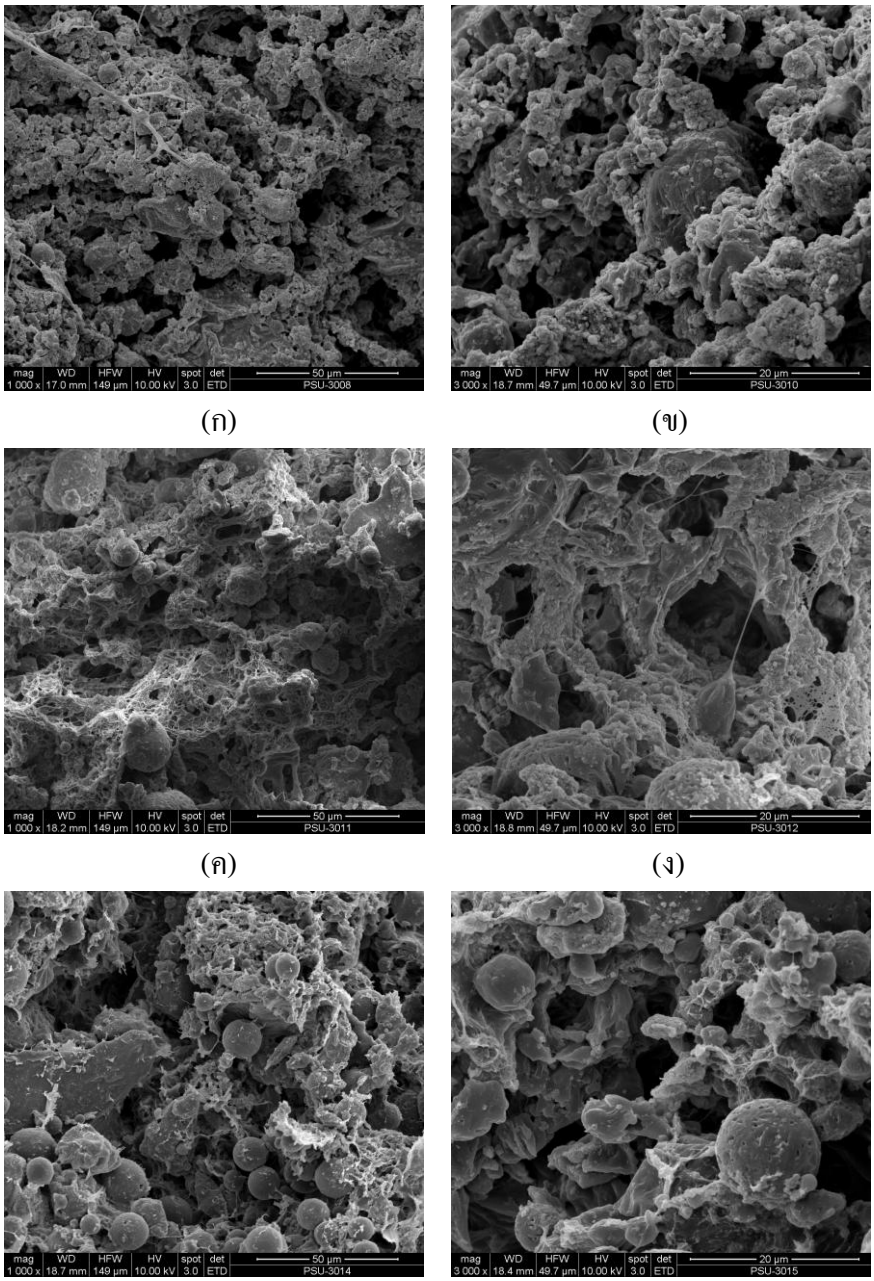
**ภาพประกอบที่ 3.10** ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงลักษณะโครงสร้างของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ขึ้นรูปโดยเทคนิคการอัดซึ่งมีเมนทอลเป็นสารก่อรูพรุน เมื่อโครงเลี้ยงเซลล์ประกอบด้วยพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์สูงกว่า 60% (ก) C7 ที่กำลังขยาย 500 เท่า (ข) C7 ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า (ค) C8 ที่กำลังขยาย 500 เท่า (ง) C8 ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

**3.3.2 โครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมโดยเทคนิคการระเหิดแห้ง**

ทำการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์โดยผสม พอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ กับไบแคลเซียมฟอสเฟต และสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1% (w/v) ในกรดอะซิติกความเข้มข้น 3% (v/v) (อัตราส่วนของสารที่ใช้เป็นไปตามตารางที่ 3.5) และขึ้นรูปโดยเทคนิคการระเหิดแห้ง โดยการทดลองได้ใช้แนวทางจากการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ที่ขึ้นรูปโดยเทคนิคการอัด กล่าวคือใช้พอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ที่มากกว่า 60% มาเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ สูตร F5, F7 และ F9 นำโครงเลี้ยงเซลล์มาวิเคราะห์ลักษณะโครงร่างสัณฐานด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าได้โครงสร้างที่มีรูพรุน โดยสังเกตเห็นลักษณะ พอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ ในโครงเลี้ยงเซลล์ ซึ่งพบมากที่สุดในสูตร F9 (ภาพประกอบที่ 3.11 จ และ ฉ เทียบกับ ก และ ข, ค และ ง) เนื่องจากมีปริมาณพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ในโครงเลี้ยงเซลล์มากที่สุด พบการเกิดครอสลิงก์ไคโตซานพอลิเมอร์ในโครงเลี้ยงเซลล์ด้วย เมื่อนำโครงเลี้ยงเซลล์มาทดสอบความพรุน พบว่าได้ค่าความพรุนเท่ากับ 79.93 ± 1.02, 89.39 ± 1.85 และ 89.83 ± 1.66 สำหรับสูตร F5, F7 และ F9 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าสูง เนื่องจากการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์โดยเทคนิคการระเหิดแห้งซึ่งจะให้ค่าความพรุนในช่วง 90-99% (Mao, et al., 2003) ดังนั้นโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้จึงมีค่าความพรุนที่เหมาะสม ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ ค่าความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ที่แตกต่างกัน อาจเป็นผลมาจากปริมาณพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ที่ผสมลงไป กล่าวคือไฮดรอกซีแอพาไทต์ และไตรแคลเซียมฟอสเฟตจะเข้าไปอยู่ในช่องว่างระหว่างไมโครสเฟียร์ทำให้รูพรุนลดลง และมีโครงสร้างหนาแน่นเพิ่มขึ้น จากการทดสอบมุมสัมผัสของโครงเลี้ยงเซลล์ พบว่ามีค่าเท่ากับ 40.35 ± 8.98, 49.67 ± 11.30 และ 57.05 ± 6.01 สำหรับสูตร F5, F7 และ F9 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์มีความชอบน้ำ อย่างไรก็ตามค่าที่วัดได้ไม่แตกต่างกันมากนัก และพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมด้วยเทคนิคการระเหิดแห้งมีความชอบน้ำสูงกว่าเมื่อเทียบกับที่เตรียมโดยเทคนิคการอัด ในปริมาณพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ที่เท่ากัน ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากไคโตซานที่เกิดครอสลิงก์ในลักษณะที่แตกต่างกัน กล่าวคือโครงเลี้ยงเซลล์ที่ขึ้นรูปโดยเทคนิคการระเหิดแห้งจะมีไคโตซานเคลือบอยู่ที่ผิว ส่วนโครงเลี้ยงเซลล์ที่ขึ้นรูปโดยเทคนิคการอัดจะมีไคโตซานไมโครสเฟียร์อยู่ด้านใน แม้ว่าโครงเลี้ยงเซลล์ F7 และ F9 จะมีค่ามุมสัมผัสและความพรุนที่ใกล้เคียงกัน แต่เมื่อพิจารณาส่วนประกอบในโครงเลี้ยงเซลล์ พบว่า F7 น่าจะเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจากมีปริมาณไฮดรอกซีแอพาไทต์มากที่สุด ซึ่งจะส่งผลให้โครงเลี้ยงเซลล์เกิดผลึก แอพาไทต์ได้มากเมื่อแช่ในสารละลาย PBS

**ตารางที่ 3.5** อัตราส่วนพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ ไบแคลเซียมฟอสเฟต และไคโตซานพอลิเมอร์ที่ใช้เป็นส่วนประกอบของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมโดยเทคนิคการระเหิดแห้ง ค่ามุมสัมผัส และเปอร์เซ็นต์ความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ รายงานเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงแบนมาตรฐาน

| **โครงเลี้ยงเซลล์** | **พอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ (กรัม)** | **ไบแคลเซียมฟอสเฟต (กรัม)** | **ไคโตซานพอลิเมอร์ (กรัม)** | **wt% พอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ (กรัม)** | **ค่ามุมสัมผัส (องศา)** | **ความพรุน (%) n = 3** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| F5 | 0.5 | 0.25 | 0.0020 | 66.49 | 40.35 ± 8.98 | 79.93 ± 1.02 |
| F7 | 0.7 | 0.15 | 0.0027 | 82.10 | 49.67 ± 11.30 | 89.39 ± 1.85 |
| F9 | 0.9 | 0.05 | 0.0038 | 94.36 | 57.05 ± 6.01 | 89.83 ± 1.66 |




(ก) (ข)

(ค) (ง)

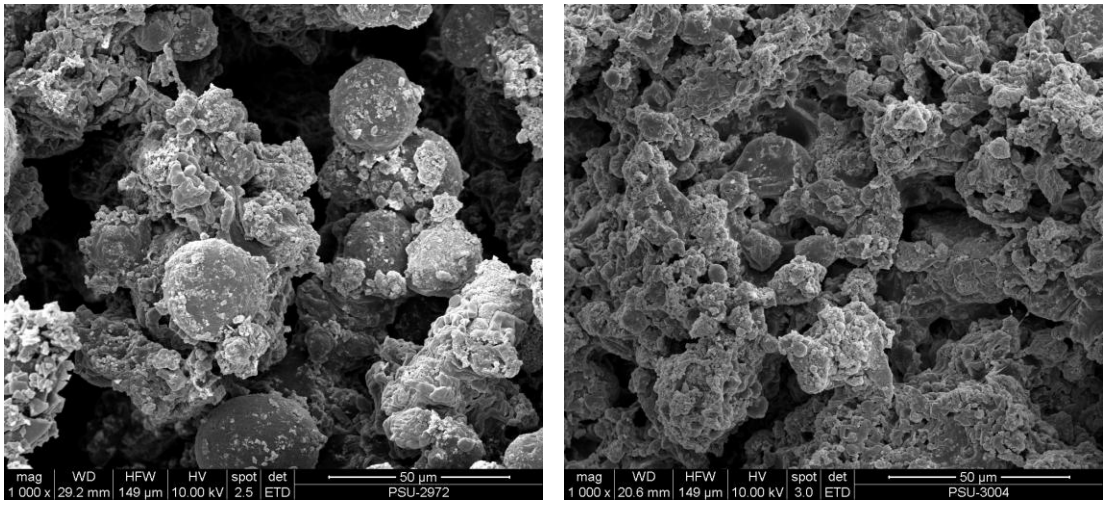
(จ) (ฉ)

**ภาพประกอบที่ 3.11** ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงลักษณะโครงสร้างของโครงเลี้ยงเซลล์ เตรียมโดยผสมพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ ไบแคลเซียมฟอสเฟต และสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1% (w/v) ในกรดอะซิติกความเข้มข้น 3% (v/v) ขึ้นรูปโดยเทคนิคการระเหิดแห้ง (ก) F5 ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า (ข) F5 ที่กำลังขยาย 3,000 เท่า (ค) F7 ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า (ง) F7 ที่กำลังขยาย 3,000 เท่า (จ) F9 ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า (ฉ) F9 ที่กำลังขยาย 3,000 เท่า

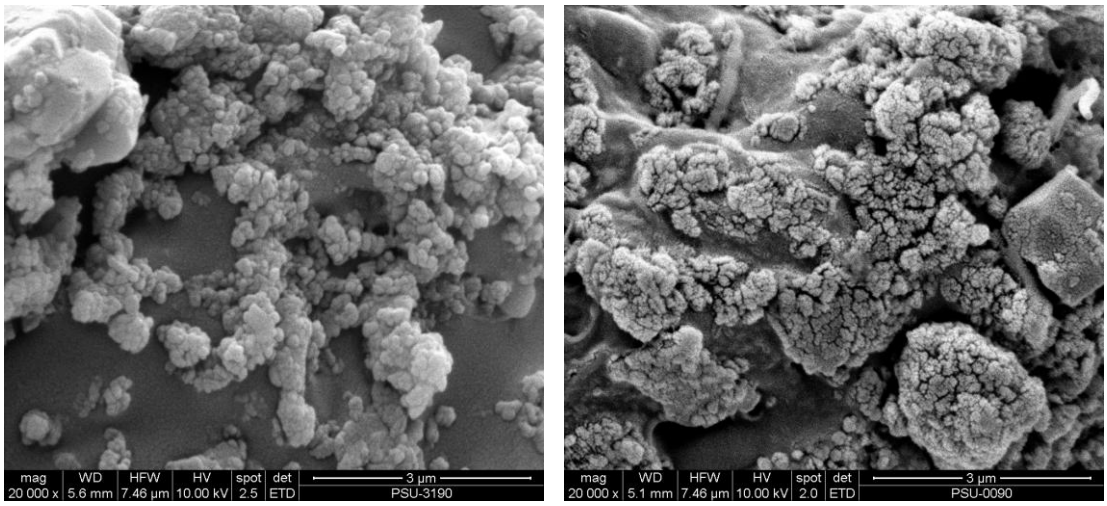
**3.4 คุณสมบัติด้านกิจกรรมทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ และการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชั่นของโครงเลี้ยงเซลล์ โดยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectrometry**

**3.4.1 การทดสอบคุณสมบัติด้านกิจกรรมทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์**

ทดสอบคุณสมบัติด้านกิจกรรมทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ โดยแช่โครงเลี้ยงเซลล์สูตร C7 และ F7 ในสารละลาย PBS ที่ pH เท่ากับ 7.4 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ โดยสารละลาย PBS มีปริมาณและชนิดของไอออนเลียนแบบของเหลวในร่างกาย (Campbell et al., 1999) ภาพประกอบที่ 3.12 แสดงการเปลี่ยนแปลงของโครงเลี้ยงเซลล์ (C7) หลังการแช่ในสารละลาย PBS เป็นเวลา 2 สัปดาห์ โดยมีผลึกแอพาไทต์เกิดขึ้น (ภาพประกอบที่ 3.12 ข) ผลึกแอพาไทต์จะเพิ่มจำนวนมากขึ้นเมื่อแช่เป็นเวลา 3 สัปดาห์ (ภาพประกอบที่ 3.12 ค) และที่ 4 สัปดาห์ ผลึกแอพาไทต์ เกิดการซ้อนทับกับที่เกิดอยู่เดิม ทำให้เห็นลักษณะเป็นชั้นของผลึกแอพาไทต์บนโครงเลี้ยงเซลล์ (ภาพประกอบที่ 3.12 ง) ภาพประกอบที่ 3.13 แสดงการเกิดผลึกแอพาไทต์ของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร F7 โดยเริ่มมีผลึก แอพาไทต์ เกิดขึ้นเมื่อแช่ในสารละลาย PBS เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ซึ่งจะเพิ่มจำนวนมากขึ้นเมื่อแช่เป็นเวลา 2, 3 และ 4 สัปดาห์ (ภาพประกอบที่ 3.13) โดยที่ 4 สัปดาห์ ปริมาณผลึกแอพาไทต์จะเกิดขึ้นมากที่สุด เนื่องจากผู้วิจัยต้องการให้เกิดผลึกแอพาไทต์บนโครงเลี้ยงเซลล์อย่างรวดเร็วในปริมาณมาก เพราะเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์เมื่อใส่เข้าไปในร่างกาย เมื่อเปรียบเทียบโครงเลี้ยงเซลล์สูตร C7 และ F7 พบว่า F7 เกิดผลึกแอพาไทต์ได้เร็วกว่า C7 (ภาพประกอบที่ 3.12 ก และ 3.13 ก) กล่าวคือ F7 เกิดผลึกแอพาไทต์ภาย 1 สัปดาห์ แต่ C7 เกิดผลึกแอพาไทต์ภายใน 2 สัปดาห์ เมื่อพิจารณาปริมาณการเกิดผลึกแอพาไทต์ในโครงเลี้ยงเซลล์พบว่าสูตร F7 เกิดผลึกแอพาไทต์ ได้มากกว่า C7 (ภาพประกอบที่ 3.12 ค และ ง และ 3.13 ค และ ง) ดังนั้นจึงสรุปว่าสูตร F7 มีคุณสมบัติด้านกิจกรรมทางชีวภาพมากกว่า C7 ทั้งนี้การเกิดผลึกแอพาไทต์สัมพันธ์กับความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ด้วย โดยถ้าความพรุนมีมาก สารละลาย PBS จะแทรกเข้าไปได้มาก ผลึกแอพาไทต์จึงเกิดได้ดี




(ก) (ข)




(ค) (ง)

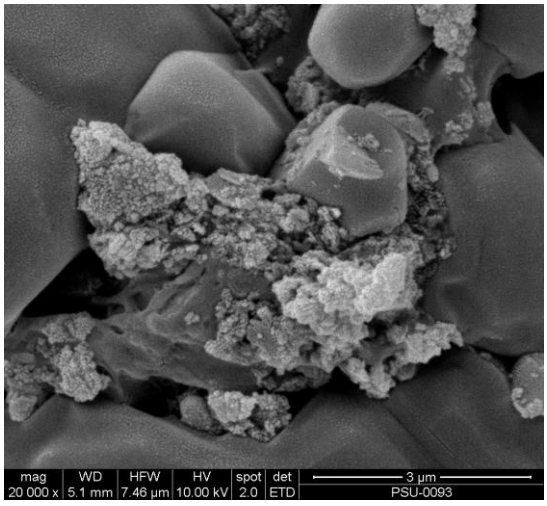
**ภาพประกอบที่ 3.12** ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงการเกิดผลึก แอพาไทต์บนโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมโดยเทคนิคการอัดซึ่งมีเมนทอลเป็นสารก่อรูพรุน

(ก) C7 ที่แช่ในสารละลาย PBS ระยะเวลา 1 สัปดาห์ ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

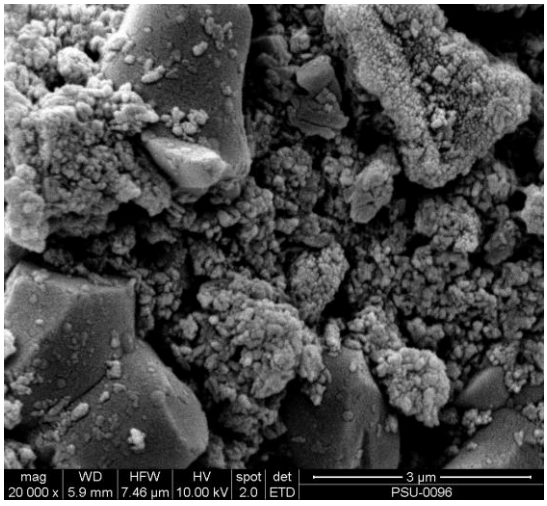
(ข) C7 ที่แช่ในสารละลาย PBS ระยะเวลา 2 สัปดาห์ ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

(ค) C7 ที่แช่ในสารละลาย PBS ระยะเวลา 3 สัปดาห์ ที่กำลังขยาย 20,000 เท่า

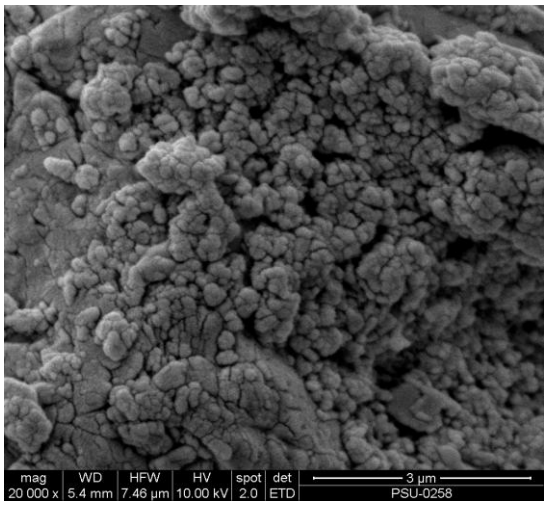
(ง) C7 ที่แช่ในสารละลาย PBS ระยะเวลา 4 สัปดาห์ ที่กำลังขยาย 20,000 เท่า



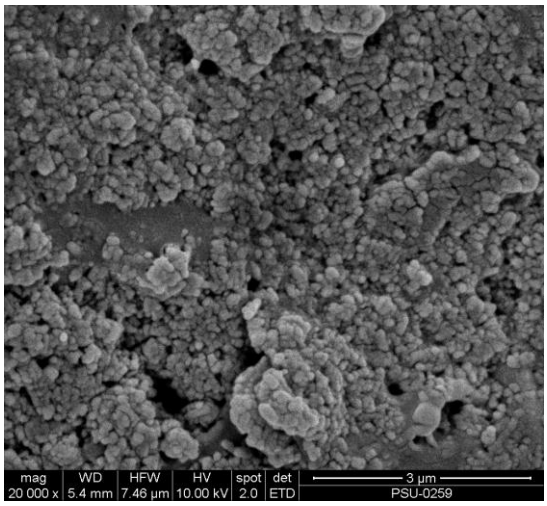

(ก)




(ข)




(ค)




(ง)

**ภาพประกอบที่ 3.13** ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงการเกิดผลึก แอพาไทต์บนโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมโดยเทคนิคการระเหิดแห้ง

(ก) F7 ที่แช่ในสารละลาย PBS ระยะเวลา 1 สัปดาห์ ที่กำลังขยาย 20,000 เท่า

(ข) F7 ที่แช่ในสารละลาย PBS ระยะเวลา 2 สัปดาห์ ที่กำลังขยาย 20,000 เท่า

(ค) F7 ที่แช่ในสารละลาย PBS ระยะเวลา 3 สัปดาห์ ที่กำลังขยาย 20,000 เท่า

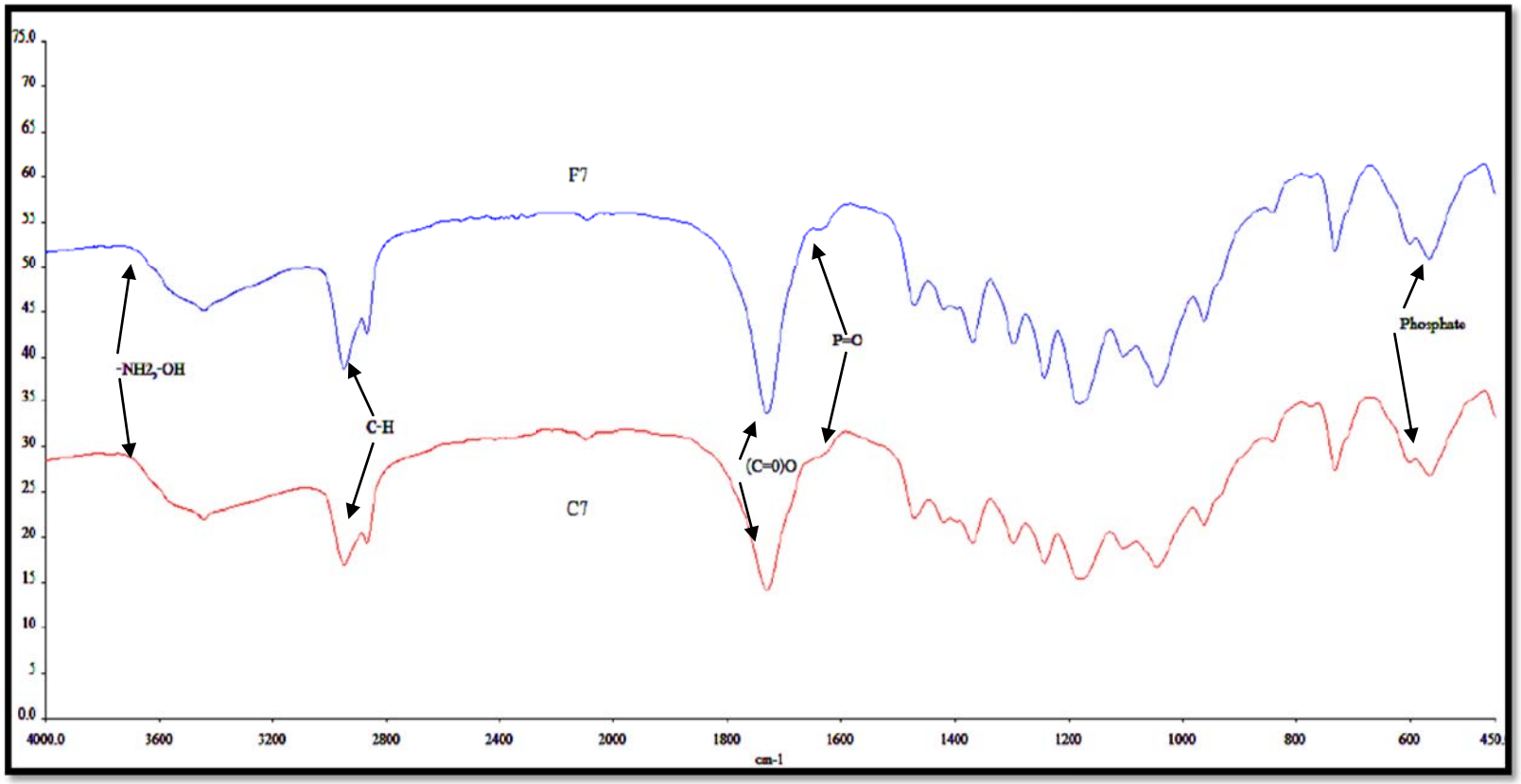
(ง) F7 ที่แช่ในสารละลาย PBS ระยะเวลา 4 สัปดาห์ ที่กำลังขยาย 20,000 เท่า

**3.4.2 การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชั่นของโครงเลี้ยงเซลล์โดยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectrometry (FT-IR)**

จากการวิเคราะห์โครงเลี้ยงเซลล์โดยเทคนิค FTIR พบว่าสูตร C7 และ F7 มีสเปกตรัมคล้ายกันมาก (ภาพประกอบที่ 3.14) โดยมีแถบดูดกลืนแสงของการยืดของพันธะ alkyl C-H และ carbonyl (C=O)O ที่ 3060 $cm^{-1}$ ซึ่งเป็นพันธะที่แสดงลักษณะเด่นของพอลิคาโปรแล็คโตน (ภาพประกอบที่ 3.14 และ 1ค ภาคผนวก ค ) พันธะที่แสดงแถบดูดกลืนแสงของไฮดรอกซีแอพาไทต์ในสูตร C7 และ F7 คือพันธะ O-H ที่ 3572 และ 632 $cm^{-1}$ (Mohamed และ Mostafa, 2008) และการยืดของพันธะของหมู่ฟอสเฟต ที่ 1089, 1045 และ 960 $cm^{-1}$ แต่ที่แสดงลักษณะของไฮดรอกซีแอพาไทต์ใน C7 และ F7 ได้ชัดเจนที่สุด คือแถบดูดกลืนแสง เนื่องจากการงอของพันธะของหมู่ฟอสเฟต 601 และ 571 $cm^{-1}$ (ภาพประกอบที่ 3.14 และ 2ค ภาคผนวก ค ) และใน C7 และ F7 พบแถบดูดกลืนของไคโตซาน และไคโตซานครอสลิงก์ (ภาพประกอบที่ 3.14 และ 3ค และ 4ค ภาคผนวก ค) กล่าวคือ มีแถบดูดกลืนแสงเนื่องจากการยืดของพันธะ $–NH_2$ และ O-H ที่ 3466 $cm^{-1}$ และปรากฏแถบดูดกลืนของพันธะ amide I ที่ 1640 $cm^{-1}$ แต่เมื่อเกิดครอสลิงก์ของไคโตซานแถบดูดกลืนที่ 1640 $cm^{-1}$ หายไปเกิดเป็นแถบดูดกลืนแสงใหม่ ที่ 1638 และ 1537 $cm^{-1}$ ไคโตซานครอสลิงก์จะแสดงแถบดูดกลืนแสงของพันธะ P=O ที่ 1278 $cm^{-1}$ (Xu et al., 2003; Knaul et al., 1999 และ Wang et al., 2001) ส่วนแถบดูดกลืนแสงของพันธะในโมเลกุลไตรแคลเซียมฟอสเฟตในสูตร C7 และF7 ถูกบดบังด้วยแถบดูดกลืนแสงของพอลิคาโปรแล็คโตนจึงสังเกตเห็นได้ไม่ชัดเจนนัก แต่ไตรแคลเซียมฟอสเฟต (ภาพประกอบที่ 5ค ภาคผนวก ค ) จะพบแถบดูดกลืนแสงเนื่องจากการยืดของพันธะในหมู่ฟอสเฟตที่ 1181, 1084, 1044 และ 973 $cm^{-1}$ และแถบดูดกลืนแสงเนื่องจากการงอของพันธะในหมู่ฟอสเฟตที่ 604 และ 549 $cm^{-1}$ (Habelitz, 2001) ไม่ปรากฏแถบดูดกลืนแสงของเมนทอลในสูตร C7 (ภาพประกอบที่ 3.14 และ 6ค ภาคผนวก ค ) แสดงว่าเมนทอลระเหยออกไปหมดแล้ว ซึ่งค่าการดูดกลืนแสงของแต่ละหมู่ฟังก์ชั่นสรุปให้ชัดเจนอีกครั้งในตารางที่ 3.6

**ตารางที่ 3.6** หมู่ฟังก์ชั่นและความยาวคลื่นของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร C7 และ F7 ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectrometry (FT-IR)

| | **องค์ประกอบในโครงเลี้ยงเซลล์** | **หมู่ฟังก์ชั่น** | **ความยาวคลื่น ($cm^{-1}$)** |
|---|---|---|---|
| **โครงเลี้ยงเซลล์สูตร C7 และ F7** | พอลิคาโปรแล็คโตน ไมโครสเฟียร์ | C-H | 3060 |
| | | (C=O)O | 3060 |
| | ไฮดรอกซีแอพาไทต์ | O-H | 3572 และ 632 |
| | | การยืดของพันธะหมู่ฟอสเฟต | 1089, 1045 และ 960 |
| | | การงอของพันธะหมู่ฟอสเฟต | 601 และ 571 |
| | ไคโตซานครอสลิงก์ | $-NH_2$ และ O-H | 3466 |
| | | amide I | 1638 และ 1537 |
| | | P=O | 1278 |
| | ไตรแคลเซียมฟอสเฟต | การยืดของพันธะหมู่ฟอสเฟต | 1181, 1084, 1044 และ 973 |
| | | การงอของพันธะหมู่ฟอสเฟต | 604 และ 549 |
| | เมนทอล | - | - |




**ภาพประกอบที่ 3.14** FTIR สเปกตรัมของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร C7 และ F7

# บทที่ 4

# สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

## 4.1 การทดลองเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์เพื่อทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้น

โครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้มีรูพรุนที่เชื่อมต่อกัน เป็นช่องว่างระหว่างอนุภาคพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ โดยผิวของพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์มีครอสลิงก์ไคโตซานพอลิเมอร์เคลือบอยู่ จากการทดสอบมุมสัมผัสของโครงเลี้ยงเซลล์ พบว่ามีคุณสมบัติความไม่ชอบน้ำ เนื่องจากมีค่ามุมสัมผัสสูงกว่า 90 องศา ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ไม่ดีของโครงเลี้ยงเซลล์

## 4.2 การทดลองหาตัวประสานที่เหมาะสมสำหรับเตรียม พอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ และผสมไบแคลเซียมฟอสเฟต (ไฮดรอกซีแอพาไทต์ :ไตรแคลเซียมฟอสเฟต 2:1 โดยน้ำหนัก) เพื่อปรับปรุงคุณสมบัติความชอบน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์

ผลการหาตัวประสานที่เหมาะสมสำหรับเตรียมพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ พบว่า 0.5, 1 และ 2% Tween 80 เป็นตัวประสานที่ไม่ดี เนื่องจากไม่เกิดเป็นพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ และเมื่อใช้ 1 และ 2% PVA เป็นตัวประสาน พบว่ามี ไมโครสเฟียร์ เกิดขึ้น แต่มีการกระจายตัวของขนาดอนุภาคมากเมื่อเทียบกับที่ 0.5% PVA นอกจากนี้ปริมาณไมโครสเฟียร์ที่เกิดขึ้นยังน้อยกว่าด้วย ดังนั้น 0.5% PVA จึงเป็นตัวประสานที่เหมาะสมที่สุดในการเตรียม พอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์

## 4.3 การทดลองและวิเคราะห์โครงสร้างโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมโดยเทคนิคการอัด และที่เตรียมโดยเทคนิคการระเหิดแห้ง

โครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมโดยเทคนิคการอัดซึ่งมีเมนทอลเป็นสารก่อรูพรุน ให้ค่ามุมสัมผัสที่แปรผันโดยตรงกับปริมาณ พอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ ที่ใช้เป็นส่วนประกอบในโครงเลี้ยงเซลล์ โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีค่ามุมสัมผัสเหมาะสม คือประกอบด้วย พอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ มากกว่า 60% สูตร C7, C8 และ C9 ซึ่งมีความพรุนเท่ากับ $79.57 \pm 2.98$, $79.78 \pm 2.29$ และ $83.00 \pm 1.26$ สำหรับสูตร C7, C8 และ C9 ตามลำดับ แม้ความพรุนที่ได้จะมีค่าใกล้เคียงกัน แต่เมื่อพิจารณาส่วนประกอบของโครงเลี้ยงเซลล์ พบว่าสูตร C7 เป็นโครงเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมที่สุด

เนื่องจากมีปริมาณไฮดรอกซีแอพาไทต์และไตรแคลเซียมฟอสเฟตมากที่สุด ซึ่งจะส่งผลให้เกิดผลึกแอพาไทต์ได้มาก เมื่อแช่ในสารละลาย PBS

โครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมโดยเทคนิคการระเหิดแห้ง พบว่าสูตร F5, F7 และ F9 มีค่าความพรุนสูง และค่าที่ได้มีความแตกต่างกัน จากการทดสอบมุมสัมผัสของโครงเลี้ยงเซลล์ พบว่าค่าที่ได้แสดงว่าโครงเลี้ยงเซลล์มีความชอบน้ำ แม้ค่ามุมสัมผัสของแต่ละสูตรจะแตกต่างกันไม่มากนัก แต่พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมโดยเทคนิคการระเหิดแห้งมีความชอบน้ำที่สูงกว่าที่เตรียมโดยเทคนิคการอัด อย่างไรก็ตามแม้ว่าโครงเลี้ยงเซลล์สูตร F7 และ F9 จะมีความเหมาะสมของมุมสัมผัสและความพรุนซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน แต่เมื่อพิจารณาส่วนประกอบในโครงเลี้ยงเซลล์จะพบว่าสูตร F7 เป็นโครงเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจากมีปริมาณไฮดรอกซีแอพาไทต์มากที่สุด ซึ่งจะส่งผลให้เกิดผลึกแอพาไทต์ได้มากเมื่อแช่ในสารละลาย PBS

**4.4 การทดสอบคุณสมบัติทางด้านกิจกรรมชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์**

การทดสอบคุณสมบัติทางด้านกิจกรรมทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ โดยแช่โครงเลี้ยงเซลล์สูตร C7 และ F7 ในสารละลาย PBS ที่ pH เท่ากับ 7.4 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์สูตร F7 มีคุณสมบัติทางด้านกิจกรรมชีวภาพที่เหมาะสมมากกว่าสูตร C7 เนื่องจากเกิดผลึกแอพาไทต์ได้เร็ว และมีปริมาณมากกว่า

**4.5 วิเคราะห์หมู่ฟังก์ชั่นของโครงเลี้ยงเซลล์โดยอาศัยหลักการ Fourier Transform Infrared Spectrometry**

จากการวิเคราะห์โครงเลี้ยงเซลล์สูตร C7 และ F7 โดยใช้ FTIR พบว่า C7 และF7 มีหมู่ฟังก์ชั่นที่แสดงลักษณะของพอลิคาโปรแล็คโตน ไตรแคลเซียมฟอสเฟต ไฮดรอกซีแอพาไทต์ ไคโตซาน และไคโตซานครอสลิงก์เกิดขึ้นในโครงเลี้ยงเซลล์ โดยลักษณะสเปกตรัมที่ได้ของสูตร C7 และ F7 มีลักษณะคล้ายกันมาก

**4.6 ข้อเสนอแนะ**

1. ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาหาตัวประสานที่เหมาะสมของการเตรียมพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ โดยใช้ 0.5% PVA เป็นตัวประสาน ดังนั้นจึงควรศึกษาผลของความเร็วที่ใช้กวนสารละลายเพื่อทำให้เกิดเป็นไมโครสเฟียร์ ด้วย (ภาคผนวก ก ) เพื่อนำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบ และเป็นข้อมูลเพื่อใช้เตรียม พอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ ในปริมาณที่มาก และมีขนาดอนุภาคใกล้เคียงกันต่อไป

2. พอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ ที่เตรียมได้จากงานวิจัยนี้สามารถนำมาทดลองต่อได้โดยการบรรจุยาไว้ภายใน และศึกษาการปลดปล่อยยาจาก พอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ เพื่อเป็นแนวทางในการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีคุณสมบัติ osteoinduction

3. งานวิจัยนี้เตรียมโครงเลี้ยงเซลล์โดยใช้เทคนิคการอัดซึ่งมีเมนทอลเป็นสารก่อรูพรุน ดังนั้นจึงควรทำการศึกษาปริมาณของเมนทอลว่ามีผลต่อความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์อย่างไร เพื่อให้ได้โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีคุณสมบัติเชิงกลที่ดี

4. งานวิจัยนี้เตรียมโครงเลี้ยงเซลล์โดยใช้เทคนิคการระเหิดแห้ง ดังนั้นจึงควรศึกษาการผสมคอลลาเจนในโครงเลี้ยงเซลล์ด้วย เพื่อศึกษาผลของคอลลาเจนที่มีผลต่อโครงเลี้ยงเซลล์

5. ผลจากงานวิจัยนี้ควรนำโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้ไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวภาพ เช่น การเกาะติดของเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ อัตราการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์เมื่ออยู่ในสัตว์ทดลอง เป็นต้น เพื่อให้ได้โครงเลี้ยงเซลล์ที่สามารถทดแทนกระดูกจริงได้

# บรรณานุกรม


กรมศุลกากร . 2545. สถิติการนำเข้าสินค้าประเภทยา เวชภัณฑ์และสารเคมีที่ใช้ในการแพทย์ ประจำปี พ.ศ.2545. http://www.customs.go.th (สืบค้นเมื่อ 20 มกราคม 2554)

จุมพฏ วานิชสัมพันธ์ . 2550. การทดแทนกระดูกที่ชำรุดในร่างกายมนุษย์ . http://www.material .chula.ac.th/RADIO44/december/radio12-4.htm (สืบค้นเมื่อ 28 มกราคม 2554)

นราวุธ ทองมะโรงสี. 2547. การผลิตโครงเลี้ยงเซลล์จากวัสดุที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพเพื่องานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน. วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต , สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาวดี เมธะคานนท์, อศิรา เฟื่องฟูชาติ และก้องเกียรติ คงสุวรรณ. 2542. ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับไคติน-ไคโตซาน . ใน Chitin-chitosan Technical Note. จัดโดยกลุ่มไคตินไคโตซาน โปรแกรมการวิจัยพอลิเมอร์ชีวภาพ ศูนย์เทคโนโลยีและวัสดุแห่งชาติ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ: 1-4.

มัณฑนา โอภาประกาสิต. 2550. พอลิเมอร์วัสดุเอนกประสงค์ . http://www.vcharkarn.com (สืบค้นเมื่อ 31 มกราคม 2554)

ยงยุทธ วัชรดุลย์ . 2526. โรคกระดูกและข้อที่พบในประเทศไทย . พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพมหานคร : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

โรงบาลราชวิถี . 2554. การจดสิทธิบัตรกระดูกเทียม . http://www.rajavithi.go.th (สืบค้นเมื่อ 23 มกราคม 2554)

วินิตา บัณฑิต, อรศรี รมยะนันทน์ และสุจินต์ อึ้งถาวร (บรรณาธิการ). 2535. วิทยาฮิสโต: เซลล์และเนื้อเยื่อพื้นฐาน. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วิวัฒน์ วจนะวิศิษฐ , วิเชียร เลาหเจริญสมบัติ , วิโรจน์ กวินวงศ์โกวิท และพรชัย มูลพฤกษ์ (บรรณาธิการ ). 2547. ออร์โธปิดิกส์ . พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร : ภาควิชาออโธปิดิกส์ คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี.

สุพัตรา วรรณโชติ. 2550. การเตรียมวัสดุชีวภาพจากแคลเซียมซิลิเกตและพอลิเอทิลีนชนิดความหนาแน่นสูงโดยใช้ไซเลนเป็นสารคู่ควบ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีพอลิเมอร์ คณะวิทยาศาสตร์ , สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สมชัย ปรีชาสุข, วิโรจน์ กวินวงศ์โกวิท และวิวัฒน์ วจนะวิศิษฐ . 2536. ออร์โธปิดิกส์ . พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล: 1-10.

สุวดี อุสาหะ . 2549. ผลของระดับการกำจัดหมู่อะซิทิล และน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานจากเปลือกกุ้งกุลาดำต่อสมบัติการเกิดอิมัลชัน . วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา เทคโนโลยีอาหาร คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อัจฉรา-อาทิตย์คลินิก . 2550. สเต็มเซลล์จากไขกระดูก . http://www.aaclinic.com (สืบค้นเมื่อ 22 มกราคม 2554)

อนิรุทธิ์ คำใจ. 2548. การหาลักษณะเฉพาะ และการปรับปรุงสมบัติเชิงกลของเซรามิกส์ไฮดรอกซีแอพาไทต์เพื่อใช้ทดแทนกระดูกมนุษย์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

Baron, R. 1999. Anatomy and ultrastructure of bone. In: Favas MJ, editor. Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins: 3-38.

Best, S.M. Porter, A.E. Thian, E.S. and Huang, J. 2008. Bioceramics: Past, present and for the future. *Journal of the European Ceramic Society*, 28: 1319-1327.

Buckwalter J.A. Glimcher M.J. Cooper R.R. and Recker R. 1995. Bone biology. *J Bone joint surg*, 77A: 1256-1289.

Corden, T.J. Jones, I.A. Rudd, C.D. Christian, P. Downes, S. and Mcdougall, K.E. 2000. Physical and biocompatibility properties of poly-ε-caprolactone produced using in situ polymerization: a novel manufacturing technique for long-fibre composite materials. *Biomaterials*, 21: 713-724.

Eiselt, P. Yeh, J. Latvata R.K. Shea, L.D. and Moony, D.J. 2000. Porous carriers for biomedical applications based on alginate hydrogels. *Biomaterials*, 21: 1921-1927.

Elfick, A.P.D. 2002. Poly(εε-caprolactone) as a potential material for a temporary joint spacer. *Biomaterials*, 23: 4463-4467.

Francis Suh, J.K. and Matthew, H.W.T. 2000. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials*, 21: 25892598.

Gunatillake, P.A. and Adhikari, R. 2003. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *European Cells and Materials*, 5: 1-16.

Hollinger, J.O. and Battisan, G.C. 1986. Biodegradable bone repair materials: synthethic polymers and ceramic. *Clinic Orthopedics and Related Researc*, 207: 290-305.

Honda, M. Yada, T. Ueda, M. and Kimata, K. 2000. Cartilage formation by cultured chondrocytes in a new scaffolds made of Poly(L-Lactide-ε-caprolactone) spong. *Journal of Oral Maxillofacial Surgery*, 58: 767-775.

Hutmacher, D.W. 2000. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, 21: 2529-2543.

Hutmacher, D.W. Schantz, T. Zein, I. Ng, K.W. Teoh, S.H. and Tan, K.C. 2001. Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling. *Journal of Biomedical Material Research*, 55:203-216.

Ishuag-Riley, S.L. Okun, L.E. Prado, G. Applegate, M.A. and Ratcliffe, A. 1999. A Human articular chondrocyte adhesion and proliferation on synthetic biodegradable polymer films. *Biomaterials*, 20: 2245-2256.

Iwasaki, Y. Sawada, S. Ishihara, K. Khang, G. and Lee, H.B. 2002. Reduction of surface-induced inflammatory reaction on PLGA/MPC polymer blend. *Biomaterials*, 23: 3897-3903.

Knaul, J.Z. Hudson, SM. Creber, K.A.M. 1999. Improved mechanical properties of chitosanfibres. *Journal of Applied Polymer Science,* 72:1721-1731.

Kuo, C.K. and Ma, P.X. 2001. Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Stucture, gelation rate and mechanical properties. *Biomaterials*, 22: 511-521.

Kweon, H.Y. Yoo, M.K. Park, I.K. Kim, T.H. Lee, H.C. Lee, H.S. Oh, J.S. Akaike, T. and Cho, C.S. 2003. A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering. *Biomaterials*, 24: 801-808.

Lakanaporn, L. 2004. Preparation and characterization of chitosan, CM-chitin, and CM-chitosan scaffolds by using freeze-drying technique. *Thesis (M.Eng.), Chulalongkorn University*, 5-9.

Langer, R. 2000. Tissue engineering. *Molecular Therapy*, 1: 12-15.

Lin, H.R. Chen, K.Z. Chen, S.C. Lee, C.H. Chiou, S.H. Chang, T.L. and Wu, T.H. 2007. Attachment of stem cells on porous chitosan scaffold crosslinked by $Na_5P_3O_{10}$. *Materials Science and Engineering*, C 27:280-284.

Lu, L. Zhu, X. Valenzuela, R.G. Currier, B.L. and Yaszemski, M.J. 2001. Biodegradable polymer scaffolds for cartilage tissue engineering. *Clinical Orthopaedics and related research*, 391: 251-270.

Madihally, S.V. and Matthew, H.W.T. 1999. Porous scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, 20: 1133-1142.

Mao, J.S. Zhao, L.G. Yin, Y.J. and Yao, K.D. 2003. Structure and properties of bilayer chitosan-gelatin scaffolds. *Biomaterials*, 24: 1067-1074.

Mohamed, K.R. and Mostafa, A. 2008. Preparation and bioactivity evaluation of hydroxyapatite-titania/chitosan-gelatin polymeric biocomposites. *Materials Science and Engineering*, C 28: 1087-1099.

Oxlund, H. Mosekilde, L. and Ortoft, G. 1996. Reduced concentration of collagen reducible cross links in human trabecula bone with respect to age and osteoporosis. *Bone*, 19: 479-484.

Park, S.N. Park, J.C. Kim, H.O. Song,M.J. and Suh, H. 2002. Characterization of porous collagen /hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl1-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide cross-linking. *Biomaterials*, 23:1205–1212.

Pego, A.P. Poot, A.A. Grijpma, D.W. and Feijen, J. 2003. Biodegradable elastomeric scaffolds for soft tissue engineering. *Journal of Controlled Release*, 87: 69-79.

Pillai, C.K.S. Paul, W. and Sharma, C.P. 2009. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*, 34: 641–678.

Ratanavaraporn, J. 2009. Behavior of bone marrow-derived and adipose-derived stem cells on gelatin/chitosan scaffolds for bone tissue engineering. *Thesis (M.Eng.), Chulalongkorn University*, 1-10.

Shanmugasundaram, N. Ravichandran, P. Neelakanta, R.P. Ramamurty, N. Pal, S. and Panduranga, R.K. 2001. Collagen-chitosan polymeric scaffolds for the in vitro culture of human epidermoid carcinoma cells. *Biomaterials*, 22:1943-1951.

Shapiro, L. and Cohen, S. 1997. Novel alginate sponges for cell culture and transplantation. *Biomaterials*, 18: 583-590.

Stylios, G. Wan, T. and Giannoudis, P. 2007. Present status and future potential of enhancing bone healing using nanotechnology. *Journal of Orthopedic Trauma*, 38: 63-74.

Tangsadthakun, C. Kanokpanont, S. Sanchavanakit, N. Pichyangkura, R. Banaprasert, T. Tabata, Y. and Damrongsakkul, S. 2007. The influence of molecular weight of chitosan on the physical and biological properties of collagen/chitosan scaffolds. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 18: 147-163.

Wang, X. Ma, J. Wang, Y. and He, B. 2001. Structural characterization of phosphorylated chitosan and their applications as effective additives of calcium phosphate cements. *Biomaterials*, 22: 2247-2255.

Wiria, F.E. Leong, K.F. Chua, C.K. and Liu, Y. 2007. Poly-ε-caprolactone/hydrpxyapatite for tissue engineering scaffold fabrication via selective laser sintering. *Acta Biomaterialia*, 3: 1-12.

Xu, Y. and Du, Y. 2003. Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. *Int J Pharm*, 250:215-226.

http://en.wikipedia.org/wiki/bone (Accessed January 10, 2011)

http://en.wikipedia.org/wiki/Biocompatible (Accessed January 18, 2011)

http://www.polysciences.com (Accessed January 31, 2011)

http://202.28.95.5/11department/anatomy/Profile/Yanyong/bone48MD/bone48MD.files/frame.htm#slide0030.htm (Accessed January 25, 2011)

# ภาคผนวก

# ภาคผนวก ก

## การศึกษาความเร็วของการกวนสารละลายที่มีผลต่อลักษณะพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ และหลักการทำงานของเครื่อง High Pressure Homogenizer

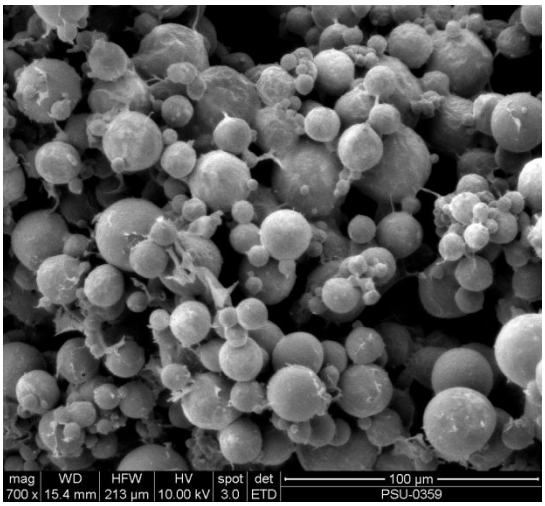
**การศึกษาความเร็วที่มีผลต่อลักษณะของพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์**

ทำการเตรียมพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ โดยศึกษาความเร็วของการกวนสารละลายที่มีผลต่อลักษณะของ ไมโครสเฟียร์ ที่ได้ ที่ความเร็วรอบ 600 และ 1,000 รอบต่อนาที และวิเคราะห์โครงร่างสัณฐานด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ใช้ชุดการทดลองตามภาพประกอบที่ 1ก มีขั้นตอนการทดลอง คือ ละลายพอลิคาโปรแล็คโตน 5 กรัม ในคลอโรฟอร์ม 100 มิลลิลิตร จะได้ 5% PCL ใน $CHCl_3$ เติมสารละลายที่ได้ลงใน สารละลาย 0.5% PVA ที่ใช้น้ำปราศจากไอออนปริมาตร 500 มิลลิลิตร กวนสารละลาย 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้ความเร็วของการกวนที่ 600 และ 1,000 รอบต่อนาที นำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นทำการล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน 5 ครั้ง เพื่อกำจัด PVA และคลอโรฟอร์มออกไป นำไประเหิดแห้งที่ -48 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้พอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ นำพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ผสม กับสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1% (w/v) ในกรดอะซิติกความเข้มข้น 3% (v/v) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน อัดลงแม่พิมพ์พลาสติกเบาๆ นำไประเหิดแห้งที่ -48 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้แช่ในสารละลายโซเดียมไตรพอลิฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.1% (w/v) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ล้างโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้ด้วยน้ำปราศจากไอออน 5 ครั้ง แล้วนำไประเหิดแห้งที่ -48 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

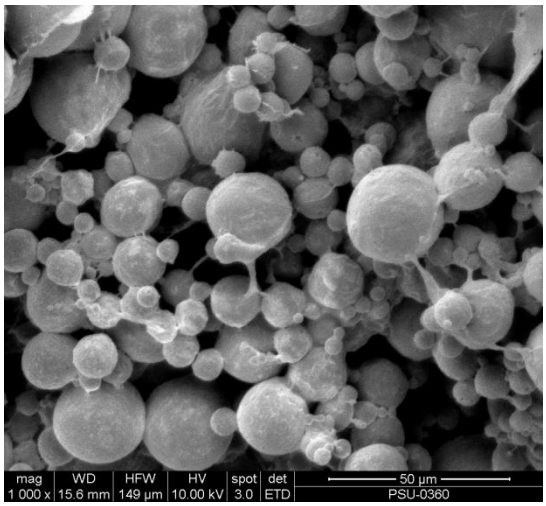
จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (ภาพประกอบที่ 2ก) พบว่ามีพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์เกิดขึ้น มีลักษณะเป็นอนุภาคระดับไมโครเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองในงานวิจัย โดยใช้ความเร็วในการกวนสารละลายที่ 600 รอบต่อนาที พบว่ามีขนาดเล็กกว่าการกวนสารละลายที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที ลักษณะขนาดที่เล็กลงทำให้มีพื้นที่ผิวต่อปริมาตรมากขึ้น นั้นหมายถึงมีพื้นที่ให้เซลล์เกาะตัว และเจริญเติบโตได้มากขึ้นด้วย แต่ควรศึกษาที่ความเร็วอื่นๆ ด้วย เช่นที่น้อยกว่า 600 รอบต่อนาที และที่มากกว่า 1,000 รอบต่อนาที รวมทั้งศึกษาชนิดของใบพัดกวนที่มีผลต่อการเกิดพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ด้วย เพื่อทำให้การกระจายตัวของไมโครสเฟียร์มีขนาดที่น้อย กล่าวคือพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์มีขนาด

ที่ใกล้เคียงกัน และทำการทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ และชีวภาพเพื่อให้ได้โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีคุณสมบัติที่ดี

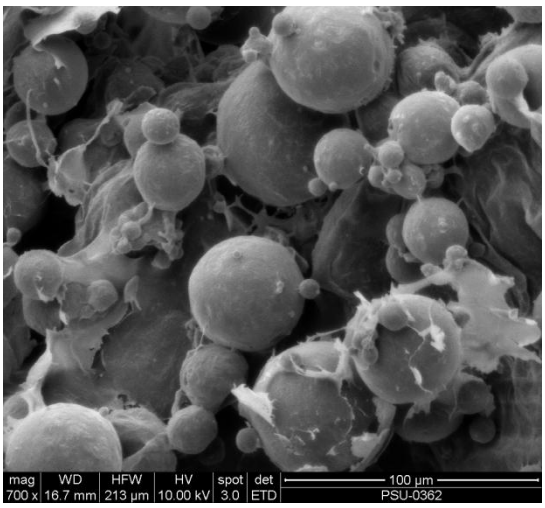
**ภาพประกอบที่ 1ก** ชุดเครื่องมือที่ใช้เตรียมพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์โดยกวนสารละลายที่ความเร็ว 600 และ 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



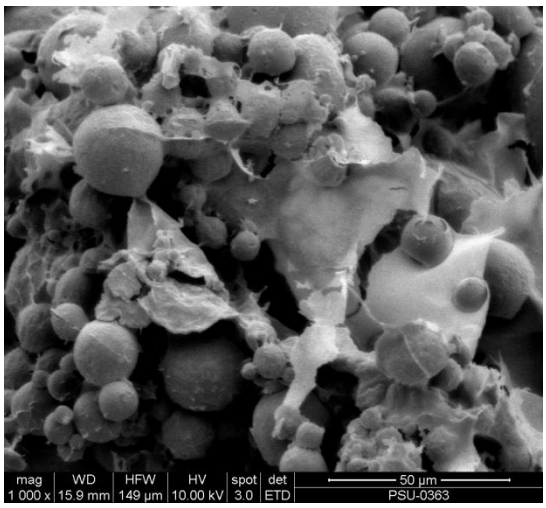

(ก)




(ข)




(ค)




(ง)

**ภาพประกอบที่ 2ก** ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงลักษณะของ พอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ที่กวนที่ความเร็ว 600 และ 1,000 รอบต่อนาที และผสมกับสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1% (w/v) และขึ้นรูปโดยเทคนิคการระเหิดแห้ง

(ก) กวนที่ความเร็ว 600 รอบต่อนาที ที่กำลังขยาย 700 เท่า

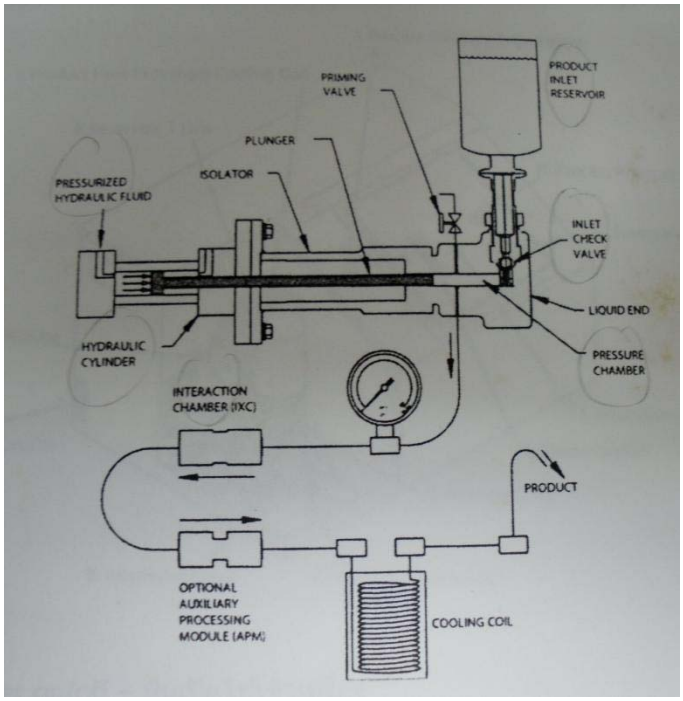
(ข) กวนที่ความเร็ว 600 รอบต่อนาที ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

(ค) กวนที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที ที่กำลังขยาย 700 เท่า

(ง) กวนที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

**หลักการทำงานของเครื่อง High Pressure Homogenizer**

หลักการทำงานของเครื่อง High Pressure Homogenizer คือใช้แรง hydraulic power ที่ติดตั้งภายในเครื่อง ดัน single acting intensifier pump ทำให้สารตัวอย่างไหลเข้าไปในระบบได้ โดยระบบมีแรงดันสูงสุด (working pressure level) ที่ 30,000 psi ในจังหวะการดูดสารตัวอย่าง (suction stroke) เข้าสู่เครื่อง intensifier pump ทำหน้าที่ดึงตัวอย่างจาก inlet reservoir เข้ามายัง pressure chamber ผ่านทาง inlet check valve ซึ่งจะเปิดในช่วงอัดสารตัวอย่าง เป็นการป้องกันสารไหลย้อนกลับไปยัง inlet reservoir การอัดสารตัวอย่างจะถูกอัดด้วยแรงที่คงที่ โดยตัวอย่างจะวิ่งไปยัง interaction chamber ผ่านช่องเล็กๆ ภายในมีขนาดไมครอน ทำให้ตัวอย่างวิ่งด้วยความเร็วสูง สารตัวอย่างถูกกระทำด้วยแรง 2 แรง คือ แรง shear และแรง impact ทำให้ตัวอย่างถูกบดผสม (ภาพประกอบที่ 3ก)




**ภาพประกอบที่ 3ก** หลักการทำงานของเครื่อง High Pressure Homogenizer

**ภาพประกอบที่ 4ก** เครื่อง High Pressure Homogenizer (Microfluidics, รุ่น M110P)

# ภาคผนวก ข

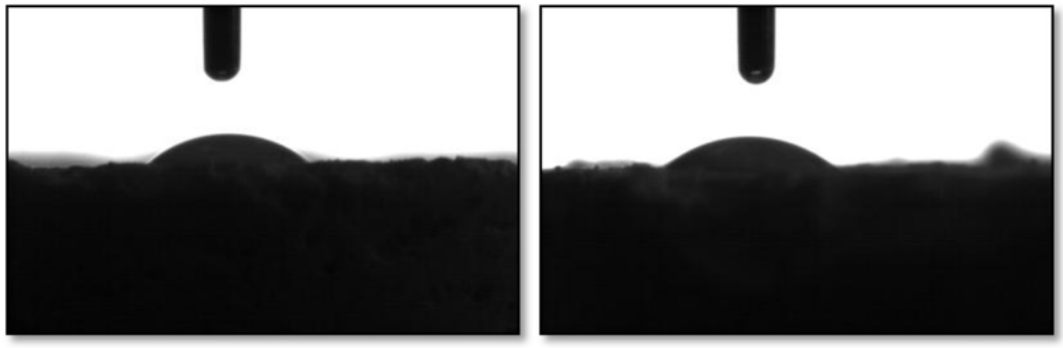
## ข้อมูลที่ได้จากการทดลอง

**ตารางที่ 1ข** ค่ามุมสัมผัสของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมเพื่อทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้น และเตรียมโดยเทคนิคการอัดซึ่งมีเมนทอลเป็นสารก่อรูพรุน แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงแบนมาตรฐาน

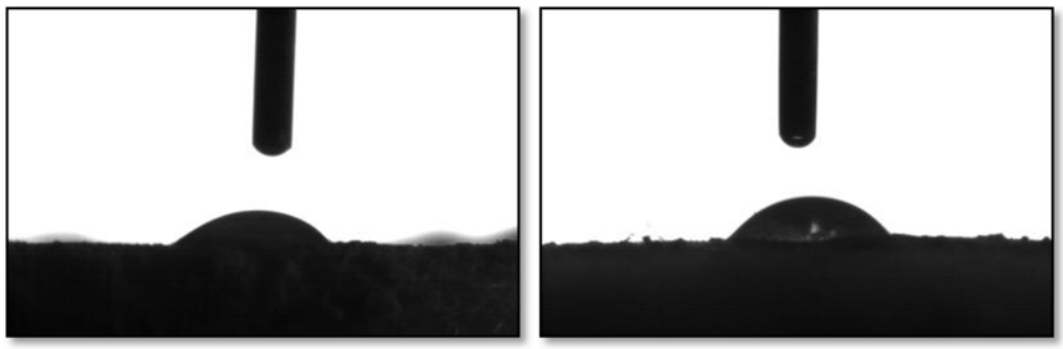
| โครงเลี้ยงเซลล์ สูตร | ค่ามุมสัมผัส (องศา) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | เฉลี่ย |
| ทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้น | 127.36 | 125.30 | 127.82 | 126.83 ± 1.09 |
| C1 | 33.71 | 42.42 | 45.21 | 40.44 ± 5.99 |
| C2 | 41.87 | 40.49 | 39.80 | 40.72 ± 1.05 |
| C3 | 55.37 | 40.52 | 37.37 | 44.42 ± 9.61 |
| C4 | 50.37 | 46.71 | 47.60 | 48.23 ±1.91 |
| C5 | 48.21 | 55.12 | 50.98 | 51.44 ± 3.46 |
| C6 | 58.30 | 58.67 | 54.25 | 57.07 ± 2.45 |
| C7 | 74.04 | 64.22 | 75.32 | 71.19 ± 6.07 |
| C8 | 74.30 | 74.70 | 72.60 | 73.86 ± 1.12 |
| C9 | 72.29 | 78.05 | 74.20 | 74.85 ± 2.94 |

**ตารางที่ 2ข** ค่ามุมสัมผัสของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมโดยเทคนิคการระเหิดแห้ง แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงแบนมาตรฐาน

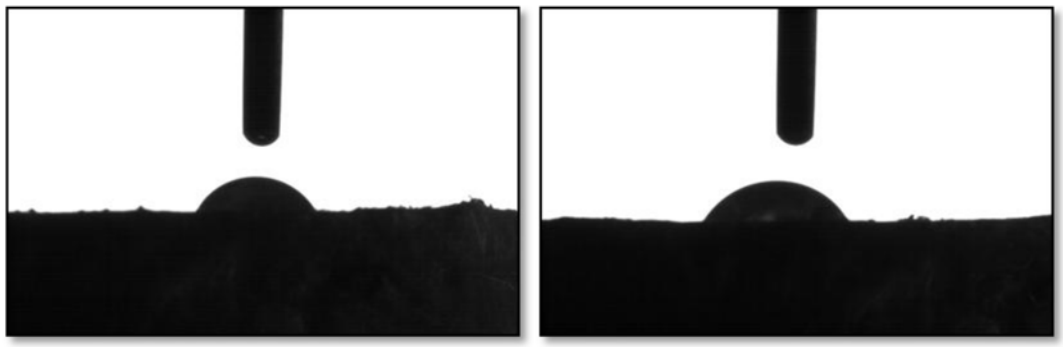
| โครงเลี้ยงเซลล์ สูตร | ค่ามุมสัมผัส (องศา) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | เฉลี่ย |
| F5 | 42.57 | 30.46 | 48.01 | 40.35 ± 8.98 |
| F7 | 50.15 | 60.70 | 49.66 | 49.67 ± 11.30 |
| F9 | 50.98 | 57.17 | 63.01 | 57.05 ± 6.01 |



(ก) (ข)

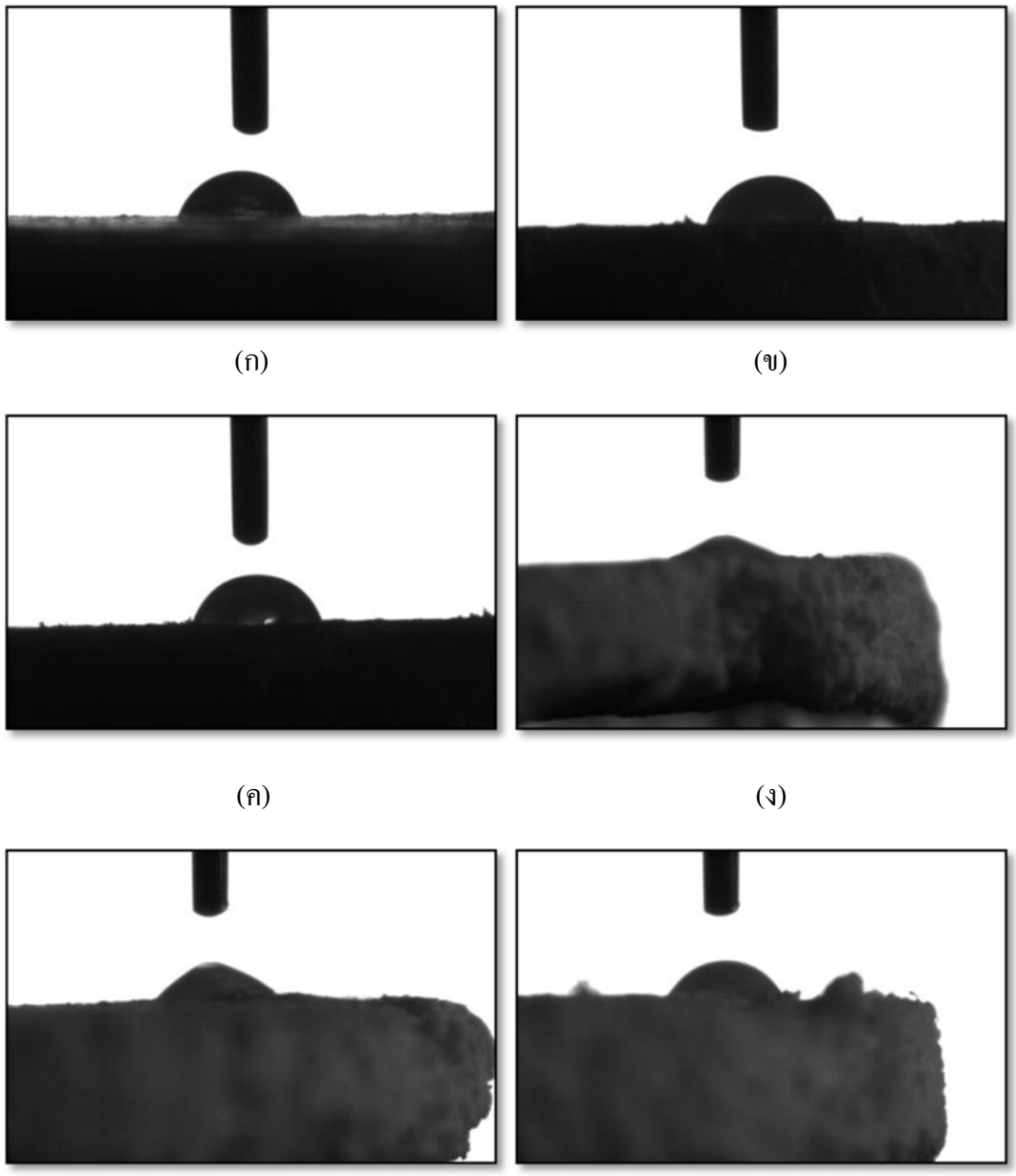


(ค) (ง)



(จ) (ฉ)

**ภาพประกอบที่ 1ข** ผลการทดสอบโครงเลี้ยงเซลล์ โดยวัดมุมสัมผัสของหยดน้ำเมื่อโครงเลี้ยงเซลล์มีพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ต่ำกว่า 70% ด้วยเครื่องวัดมุมสัมผัส (ก) C1, (ข) C2, (ค) C3, (ง) C4, (จ) C5 และ (ฉ) C6



(ก) (ข)

(ค) (ง)

(จ) (ฉ)

**ภาพประกอบที่ 2ข** ผลการทดสอบโครงเลี้ยงเซลล์โดยวัดมุมสัมผัสของหยดน้ำ เมื่อโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์สูงกว่า 70% ด้วยเครื่องวัดมุมสัมผัส (ก) C7, (ข) C8, (ค) C9, (ง) F5, (จ) F7 และ (ฉ) F9

**ตารางที่ 3ข** ผลของตัวประสานที่ใช้เตรียมพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ และปริมาณที่เตรียมได้เมื่อกวนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

| ตัวประสานที่ใช้เตรียมพอลิคาโปรแล็คโตนไมโครสเฟียร์ | % Yield |
|---|---|
| 0.5% PVA | 74 |
| 1% PVA | 39 |
| 2% PVA | 36 |

**ตารางที่ 4ข** ค่าความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมโดยเทคนิคการอัดซึ่งมีเมนทอลเป็นสารก่อรูพรุน แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงแบนมาตรฐาน

| โครงเลี้ยงเซลล์สูตร | ครั้งที่ | $m_1$ (กรัม) | $m_2$ (กรัม) | $m_3$ (กรัม) | ความพรุน (%) | เฉลี่ย (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| C7 | 1 | 0.7451 | 0.6126 | 0.7851 | 76.81 | 79.57 ± 2.98 |
| | 2 | 0.7662 | 0.6253 | 0.7956 | 82.74 | |
| | 3 | 0.7332 | 0.5001 | 0.7946 | 79.15 | |
| C8 | 1 | 0.7591 | 0.6529 | 0.7901 | 77.41 | 79.78 ± 2.29 |
| | 2 | 0.7449 | 0.6385 | 0.7683 | 81.97 | |
| | 3 | 0.7416 | 0.6110 | 0.7743 | 79.98 | |
| C9 | 1 | 0.7861 | 0.6489 | 0.8129 | 83.66 | 83.00 ± 1.26 |
| | 2 | 0.7829 | 0.7100 | 0.7994 | 81.54 | |
| | 3 | 0.9382 | 0.7954 | 0.9658 | 83.80 | |

**ตารางที่ 5ข** ค่าความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมโดยเทคนิคการระเหิดแห้ง แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงแบนมาตรฐาน

| โครงเลี้ยงเซลล์ สูตร | ครั้งที่ | $m_1$ (กรัม) | $m_2$ (กรัม) | $m_3$ (กรัม) | ความพรุน (%) | เฉลี่ย (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| F5 | 1 | 0.4566 | 0.3809 | 0.4763 | 79.35 | 79.93 ± 1.02 |
| | 2 | 0.4587 | 0.3763 | 0.4803 | 79.33 | |
| | 3 | 0.4012 | 0.3200 | 0.4201 | 81.11 | |
| F7 | 1 | 0.6673 | 0.6059 | 0.6755 | 88.22 | 89.39 ± 1.85 |
| | 2 | 0.6607 | 0.6286 | 0.6649 | 88.43 | |
| | 3 | 0.6698 | 0.6212 | 0.6743 | 91.53 | |
| F9 | 1 | 0.7601 | 0.7622 | 0.6601 | 88.60 | 89.83 ± 1.66 |
| | 2 | 0.7289 | 0.7301 | 0.6287 | 91.71 | |
| | 3 | 0.7645 | 0.7651 | 0.6638 | 89.17 | |

$m_1$ = น้ำหนักแห้งของโครงเลี้ยงเซลล์

$m_2$= น้ำหนักโครงเลี้ยงเซลล์ที่แช่ในน้ำจนไม่มีฟองอากาศที่ผิว

$m_3$ = น้ำหนักโครงเลี้ยงเซลล์หลังจากซับน้ำให้แห้ง โดยชั่งน้ำหนักในอากาศ

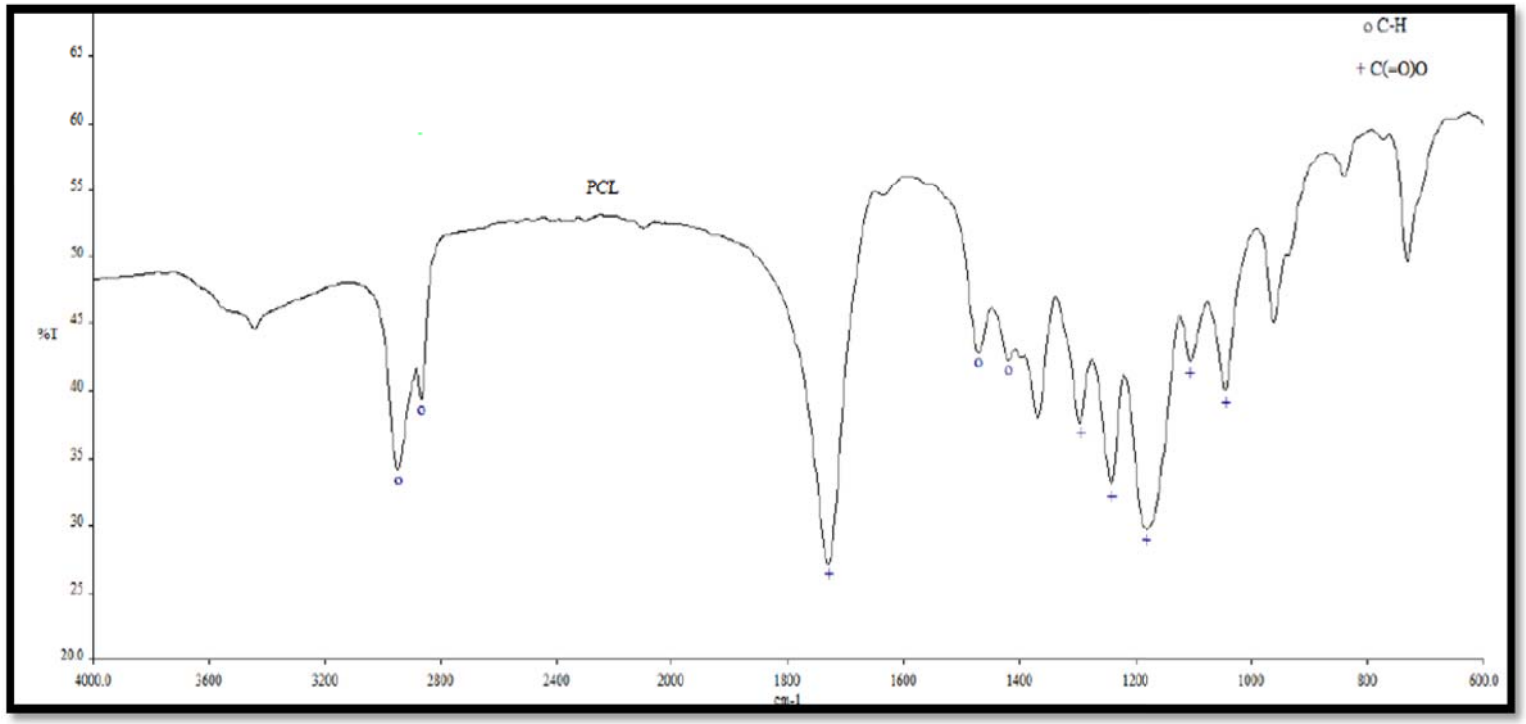
ตัวอย่างการคำนวณความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ C7

Porosity = $(m_2-m_1)/(m_2-m_3)$ x 100%

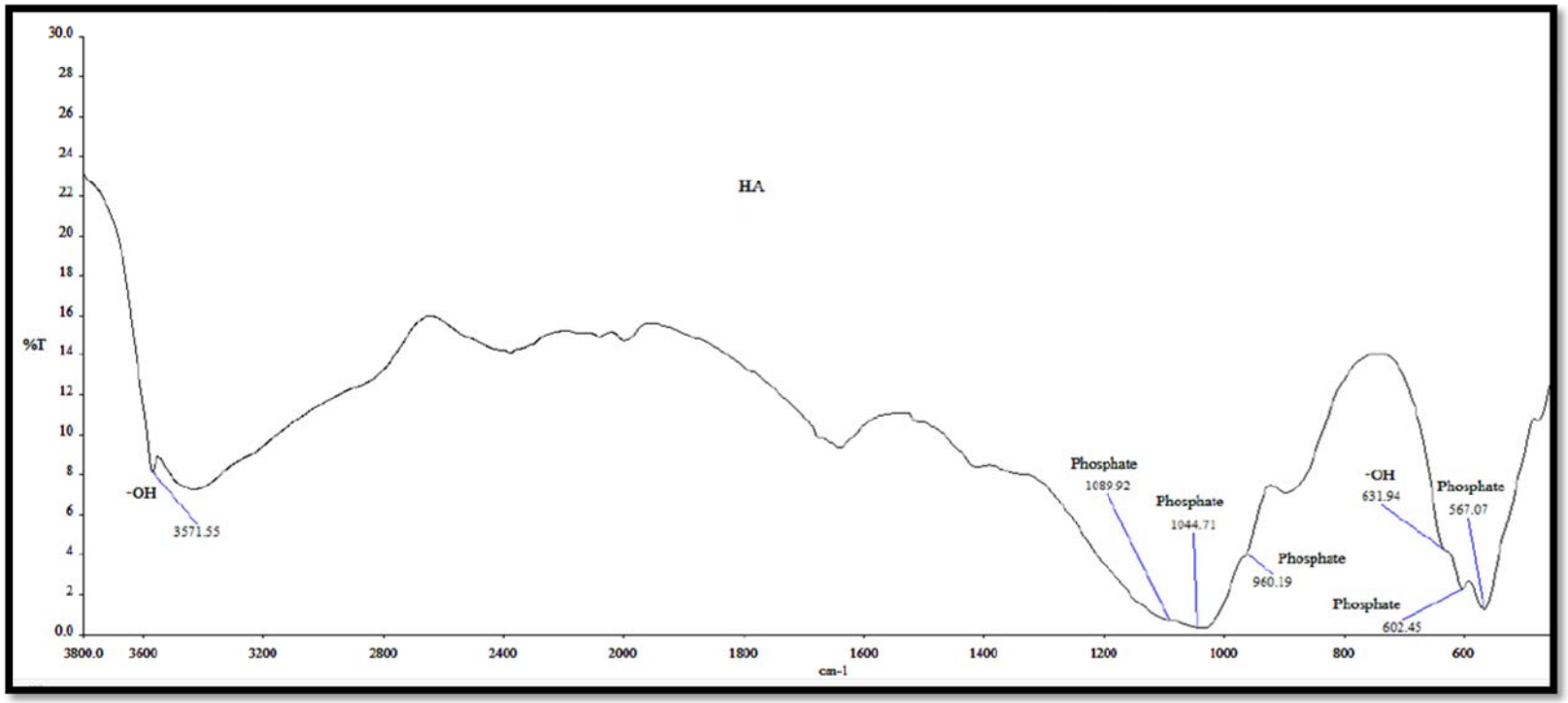
= (0.61-0.75)/(0.61-0.79)x100

= 76.81%

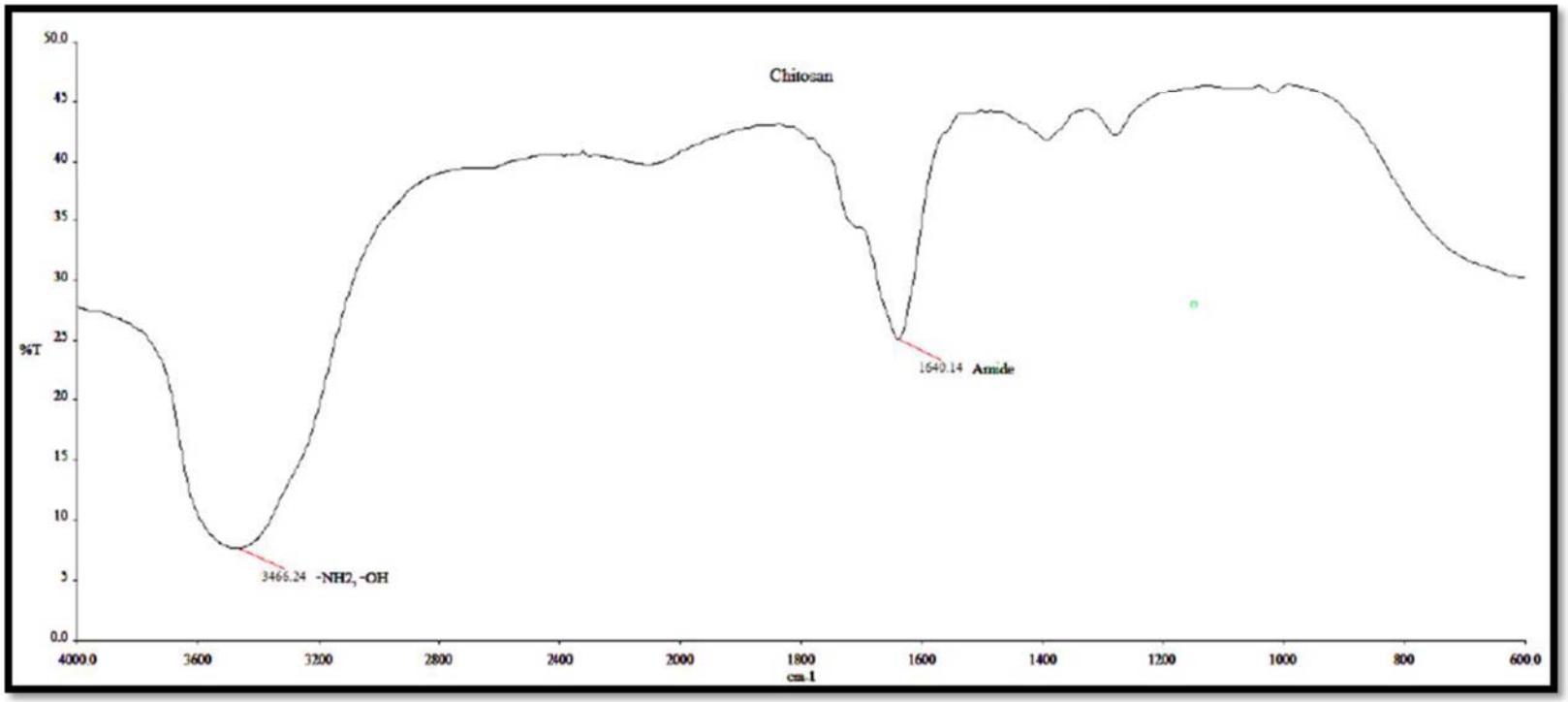
## ภาคผนวก ค



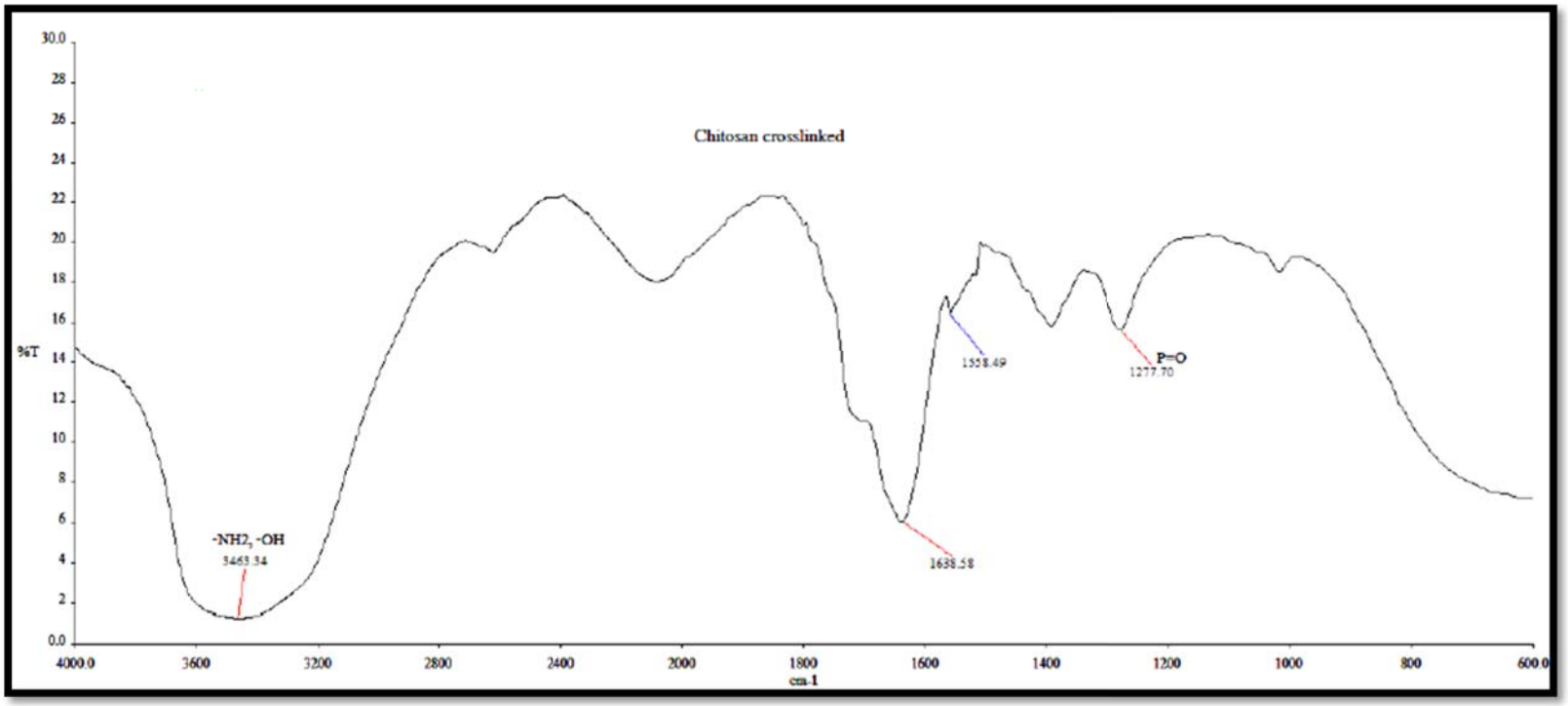

**ภาพประกอบที่ 1ค** FTIR สเปกตรัมของพอลิคาโปรแล็คโตน



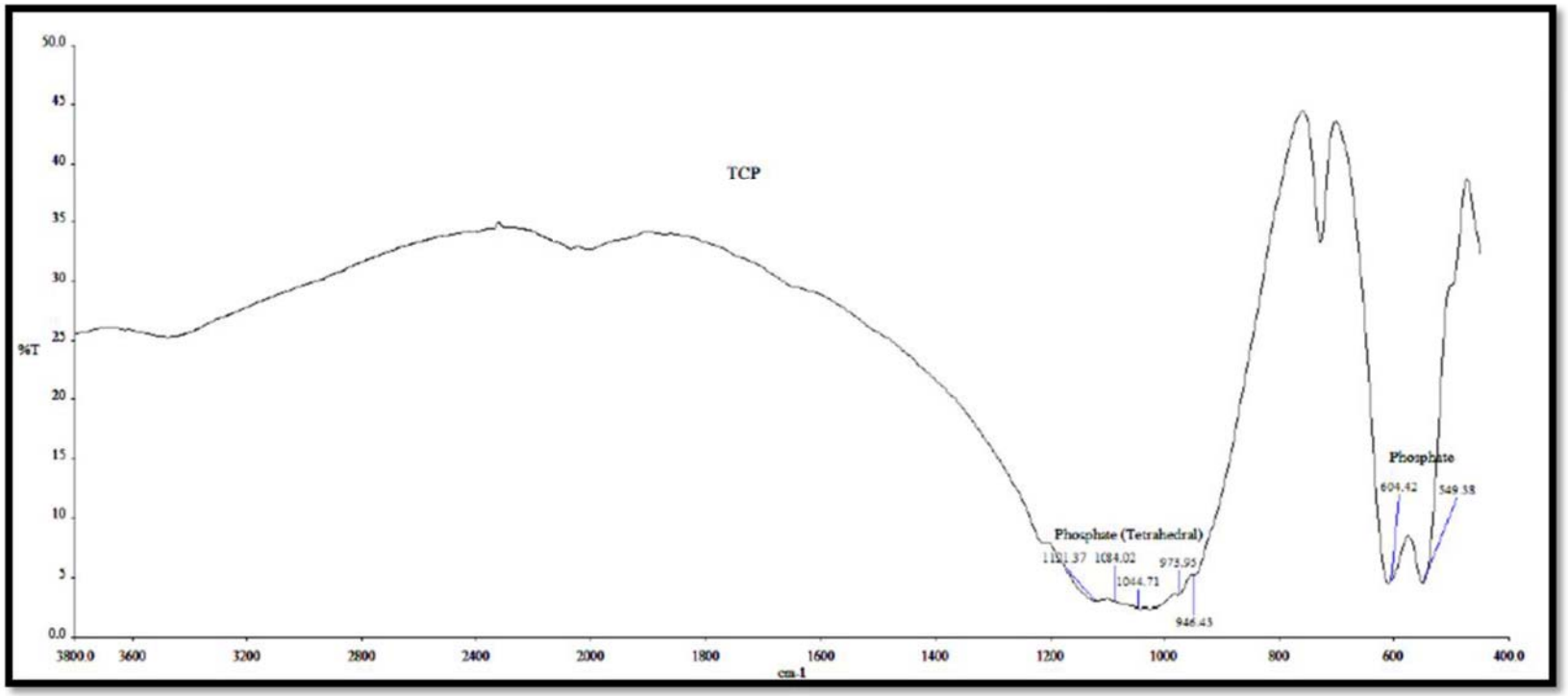

**ภาพประกอบที่ 2ค** FTIR สเปกตรัมของไฮดรอกซีแอพาไทต์



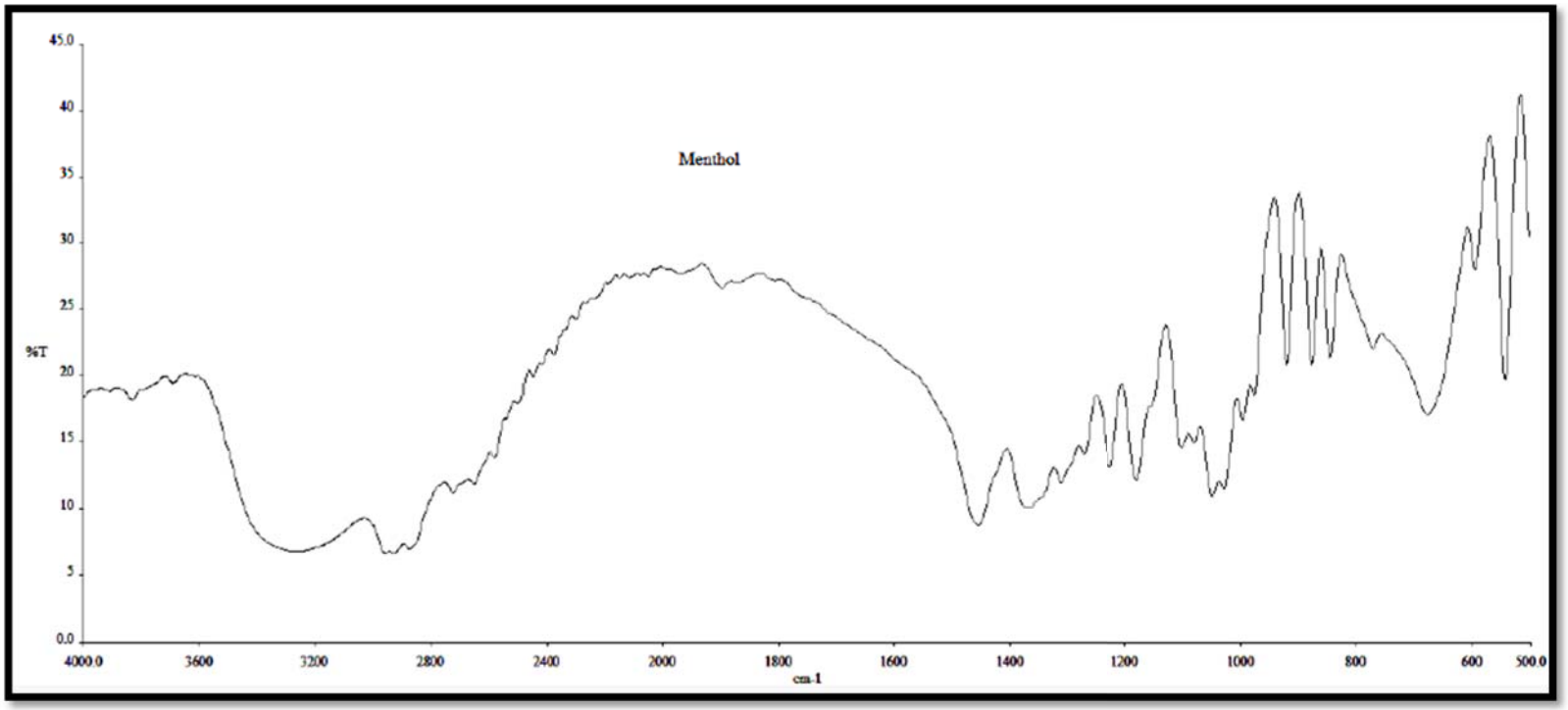

**ภาพประกอบที่ 3ค** FTIR สเปกตรัมของไคโตซาน




**ภาพประกอบที่ 4ค** FTIR สเปกตรัมของไคโตซานครอสลิงก์




**ภาพประกอบที่ 5ค** FTIR สเปกตรัมของไตรแคลเซียมฟอสเฟต




**ภาพประกอบที่ 6ค** FTIR สเปกตรัมของเมนทอล

# ประวัติผู้เขียน

**ชื่อ สกุล** นายนิติวัฒน์ ศรีโมรา

**รหัสประจำตัวนักศึกษา** 5210120018

**วุฒิการศึกษา**

| **วุฒิ** | **ชื่อสถาบัน** | **ปีที่สำเร็จการศึกษา** |
|---|---|---|
| วิทยาศาสตรบัณฑิต (วิทยาศาสตรเคมี) | มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ | 2550 |

**ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)**

ทุนสาขาความเป็นเลิศ (DOE) ด้านวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และทุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี