



คุณลักษณะทางชีวภาพของไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกา  
ที่มีผลต่อเซลล์กระดูก

**Bioactivity of Silica Doped Hydroxyapatite to Bone Cell**

จาร์ นิคม

**Jaru Nikom**

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา  
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศ  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the  
Degree of Master of Science in Molecular Biology and Bioinformatics  
Prince of Songkla University**

**2555**

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



ชื่อวิทยานิพนธ์	คุณสมบัติทางชีวภาพของไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาต่อเซลล์กระดูก
ผู้เขียน	นายจรรุ นิคม
สาขาวิชา	ชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศ
ปีการศึกษา	2554

## บทคัดย่อ

กระบวนการวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกเป็นกระบวนการออกแบบและสร้างเนื้อเยื่อทดแทนด้วยวัสดุทางชีวภาพสำหรับการรักษาโรคในเนื้อเยื่อกระดูก ถึงแม้ว่าสารประกอบไฮดรอกซีอะพาไทต์เป็นวัสดุที่นิยมนำมาสร้างเป็นวัสดุเซรามิกชีวภาพ เนื่องจากคุณสมบัติที่ดีในด้านความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเนื้อเยื่อกระดูก แต่ข้อด้อยของวัสดุสารประกอบไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่นำมาทดแทนกระดูกในปัจจุบันคือการไม่สามารถรองรับน้ำหนักมากได้ ดังนั้นจึงสามารถนำมาใช้ในการรักษาโรคที่มีขนาดเล็กเท่านั้น งานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าการนำเอาสารประกอบซิลิกามาผสมลงในวัสดุสารประกอบไฮดรอกซีอะพาไทต์จะช่วยเพิ่มคุณสมบัติความแข็งแรงให้กับวัสดุสารประกอบไฮดรอกซีอะพาไทต์ อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานถึงปริมาณของสารประกอบซิลิกาที่เหมาะสมในการใช้เจือวัสดุสารประกอบไฮดรอกซีอะพาไทต์ ดังนั้นการศึกษาดังนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางด้านชีวภาพของไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาในปริมาณต่าง ๆ กันตั้งแต่ 0 ถึง 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และมีความหนาแน่นของรูพรุนที่แตกต่างกัน 3 กลุ่ม (45, 60 และ 75 รูพรุนต่อพื้นที่หนึ่งตารางนิ้ว) โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์บนวัสดุโครงสร้างไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาเป็นระยะเวลา 4 ถึง 14 วัน จากนั้นทำการศึกษารูปร่างและลักษณะการยึดเกาะของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสแตอริโอภายหลังการย้อมสีคริสตัลไวโอเลต บลูและด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด นอกจากนี้ทำการวัดปริมาณของเซลล์ที่อยู่รอดโดยใช้วิธีเอ็มทีเอสและวัดการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ผลการทดลอง พบเซลล์สร้างกระดูกเกาะอยู่ทั่วไปบริเวณพื้นผิวรวมทั้งภายในรูพรุนของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาหลังจากทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 4 วัน โดยในวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่มีปริมาณสารประกอบซิลิกา 3, 5, และ 10 เปอร์เซ็นต์จะมีความหนาแน่นของเซลล์ที่มากกว่ากลุ่มอื่น นอกจากนี้ยังพบลักษณะของส่วนยื่นของเซลล์ที่เรียกว่าลามาเลียโพเดียและไฟโลโพเดียในเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกา สำหรับการวิเคราะห์ความอยู่รอดของเซลล์สร้างกระดูกในวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกา พบว่า

วัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาที่มีปริมาณของสารประกอบซิลิกาที่สูง 3, 5, และ 10 เปอร์เซ็นต์จะมีปริมาณการอยู่รอดของเซลล์สร้างกระดูกมากกว่ากลุ่มวัสดุที่มีปริมาณของสารประกอบซิลิกาที่ต่ำกว่าหรือไม่มีเลยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) นอกจากนี้ยังพบว่าวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาปริมาณ 0.5 ถึง 5 เปอร์เซ็นต์ที่มีความหนาแน่นของรูพรุน 45 รูพรุนต่อพื้นที่หนึ่งตารางนิ้วจะมีปริมาณการอยู่รอดของเซลล์สร้างกระดูกสูงกว่ากลุ่มที่มีความหนาแน่นของรูพรุน 60 และ 75 รูพรุนต่อพื้นที่หนึ่งตารางนิ้วอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) สำหรับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์สร้างกระดูกจากการวิเคราะห์การสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส พบว่า หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์ในวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาเป็นเวลา 7 และ 14 วัน เซลล์สร้างกระดูกที่เลี้ยงอยู่บนวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาที่มีปริมาณสารประกอบซิลิกา 0.5 ถึง 5 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสอยู่ในกลุ่มที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่น ในขณะที่วัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาที่มีความหนาแน่นของรูพรุน 75 รูพรุนต่อพื้นที่หนึ่งตารางนิ้วมีปริมาณการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสต่ำกว่าวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาที่มีความหนาแน่นของรูพรุน 45 และ 60 รูพรุนต่อพื้นที่หนึ่งตารางนิ้ว ดังนั้นสรุปได้ว่า วัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาที่ใช้ในการศึกษานี้ มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์และทำให้เกิดการยึดเกาะของเซลล์ได้ดี โดยวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาในปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์และมีความหนาแน่นของรูพรุน 45 รูพรุนต่อพื้นที่หนึ่งตารางนิ้ว มีคุณสมบัติทางชีวภาพที่ดีที่สุดรวมทั้งสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์ได้

**Thesis Title** Bioactivity of silica doped hydroxyapatite to bone cell  
**Author** Mister Jaru Nikom  
**Major Program** Molecular Biology and Bioinformatics  
**Academic Year** 2011

## **Abstract**

Bone tissue engineering is the process of designing and constructing artificial tissue replacements using biomaterials for treatment of bone defects. Although hydroxyapatite is widely used to fabricate the bioceramics scaffolds due to its biocompatibility with bone tissues, the disadvantage of hydroxyapatite implant is its low mechanical strength so it can be used only in small bone defects. Improvement of mechanical properties has been reported in the hydroxyapatite scaffolds containing silica compound. However, the optimal concentration of silica compound in silica doped hydroxyapatite has not been investigated. The aims of this study were to determine the bioactivity of silica doped hydroxyapatite scaffolds containing 0 to 10 percent of silica compound by weight with three different pore density (45 ppi, 60 ppi and 75 ppi). The human osteoblasts were cultured in the silica doped hydroxyapatite scaffolds for 4 to 14 days. The cell morphology and adhesion were examined by stereomicroscopy after crystal violet blue staining and by scanning electron microscopy. Cell viability was analyzed by MTS assay and alkaline phosphatase activity was also determined. The results showed that human osteoblasts were adhered and spread well on the surface and inside the pores of silica doped hydroxyapatite scaffold after culture for 4 days. The cell density in silica doped hydroxyapatite scaffolds containing 3, 5, and 10 percent of silica compound was higher than the other groups. In addition, cell projections called lamellipodia and filopodia were observed in human osteoblasts cultured on silica doped hydroxyapatite scaffolds. The analysis of cell viability in the silica doped hydroxyapatite scaffolds by MTS assay revealed that silica doped hydroxyapatite scaffolds containing 3, 5, and 10 percent of silica compound had statistically significant higher cell viability than the other groups containing lower or without silica compound ( $p < 0.05$ ). In addition, the silica doped hydroxyapatite containing 0.5-5.0 percent of silica with pore density 45

ppi had significantly higher cell viability than the other groups with pore density 60 and 75 ppi ( $p < 0.05$ ). For differentiation analysis, alkaline phosphatase activity assays demonstrated that, after culture for 7 and 14 days, human osteoblasts cultured on silica doped hydroxyapatite scaffolds containing 0.5 and 5 percent of silica compound had higher increase in alkaline phosphatase activity compared to the other groups. The silica doped hydroxyapatite with pore density 75 ppi showed significantly lower alkaline phosphatase activity than the other groups with pore density 45 and 60 ppi. In conclusion, silica doped hydroxyapatite scaffolds used in this study have good cytocompatibility with human osteoblasts and support cell adhesion. Finally, 5 percent of silica compound and pore density 45 ppi is most likely to be the optimal silica compound concentration and pore density to be used in silica doped hydroxyapatite scaffolds based on the good bioactivity as well as the stimulative effects on human osteoblast cell proliferation and differentiation.

## สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการภาพประกอบ	(10)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
บทตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	19
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	20
สารเคมี	20
อุปกรณ์ และเครื่องมือ	21
ขั้นตอนอย่างวัสดุเซรามิกชีวภาพ	22
เซลล์ที่ใช้ในการศึกษา	25
วิธีการทำการทดลอง	26
3. ผลการทดลอง	30
4. วิจารณ์ผลการทดลอง	46
5. สรุปและข้อเสนอแนะ	52
เอกสารอ้างอิง	53
ภาคผนวก	63
ประวัติผู้เขียน	81

## รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงสัญลักษณ์แทนปริมาณเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของสารประกอบซิลิกาที่ผสมอยู่ในวัสดุขึ้นตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา	23
2	แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์สร้างกระดูกที่เลี้ยงอยู่ในวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกา ในกลุ่มต่างๆ หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน	64
3	แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของเซลล์สร้างกระดูกที่เลี้ยงอยู่ในวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกา ในกลุ่มต่างๆ หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 และ 14 วัน	72



## รายการภาพประกอบ

รูปที่		หน้า
1	แสดงเซลล์ต่าง ๆ บริเวณผิวหน้าและภายในเนื้อเยื่อกระดูก	3
2	แสดงกระดูกปลูกถ่ายจากตนเอง (autografts) ที่นำมาจากกระดูกสะโพก	5
3	แสดงกระดูกปลูกถ่ายจากผู้อื่น (allografts) ซึ่งผ่านขบวนการทำให้แห้งด้วยความเย็น	6
4	แสดงวัสดุโครงร่างที่มีลักษณะเป็นรูพรุนซึ่งสามารถทำให้เซลล์เจริญเติบโตอยู่ภายในวัสดุ และเกิดการสร้างเส้นเลือดใหม่ได้	8
5	แสดงการส่งสัญญาณของโมเลกุลต่าง ๆ ภายในเซลล์กระดูกในการเกิดการสร้างกระดูก	9
6	แสดงลักษณะของสูตรโครงสร้างโมเลกุลของสารประกอบไฮดรอกซีอะพาไทต์	13
7	แสดงวัสดุสารประกอบวัสดุโครงร่างไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่มีโครงสร้างแบบสามมิติ	14
8	แสดงเซลล์สร้างกระดูกเกาะอยู่บนวัสดุโครงร่างสารประกอบแคลเซียมฟอสเฟต (calcium phosphate scaffold) ถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)	15
9	แสดงภาพของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ไม่เจือด้วยซิลิกา (HA-0.0S) เปรียบเทียบกับวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่เจือด้วยซิลิกาในปริมาณสูง (HA-10.0S)	24
10	แสดงภาพของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาที่มีความหนาแน่นของรูพรุนที่แตกต่างกัน (45 ppi, 60 ppi, และ 75 ppi)	24
11	แสดงเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์ หรือ NHOst ที่เพาะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์จากการถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบเฟสคอนทราสต์ (Phase contrast microscope) ที่กำลังขยาย 40 และ 100 เท่า	25
12	ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอที่กำลังขยาย 40 เท่า แสดงลักษณะของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาที่ไม่มีการเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูก	31
13	ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอที่กำลังขยาย 40 เท่า แสดงรูปร่างและลักษณะเซลล์สร้างกระดูกที่เลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ หลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 วัน และย้อมด้วยสีคริสตัลไวโอเลตบลู	31

## รายการภาพประกอบ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
14	ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอที่กำลังขยาย 100 เท่า แสดงรูปร่างและลักษณะเซลล์สร้างกระดูกที่เลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ หลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 วันและย้อมด้วยสีคริสตัลไวโอเลตบลู	32
15	ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอที่กำลังขยาย 40 เท่า แสดงรูปร่างและลักษณะเซลล์สร้างกระดูกที่เลี้ยงลงในวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักและมีความหนาแน่นของรูพรุนเท่ากับ 45 ppi หลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 วันและย้อมด้วยสีคริสตัลไวโอเลตบลู	33
16	ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอที่กำลังขยาย 100 เท่า แสดงรูปร่างและลักษณะเซลล์สร้างกระดูกที่เลี้ยงลงในวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และมีความหนาแน่นของรูพรุนเท่ากับ 60 ppi หลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 วันและย้อมด้วยสีคริสตัลไวโอเลตบลู	34
17	ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอที่กำลังขยาย 40 เท่า แสดงความหนาแน่นของเซลล์สร้างกระดูกที่เลี้ยงอยู่ในวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาในปริมาณต่างๆ กัน และมีความหนาแน่นของรูพรุนเท่ากับ 75 ppi หลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 วัน และย้อมด้วยสีคริสตัลไวโอเลตบลู	35
18	ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอที่กำลังขยาย 40 เท่า แสดงความหนาแน่นของเซลล์สร้างกระดูกที่เลี้ยงอยู่ในวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาในปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และมีความหนาแน่นของรูพรุนแตกต่างกัน (A= 75 ppi, B= 60 ppi, C= 45 ppi) หลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 วัน และย้อมด้วยสีคริสตัลไวโอเลตบลู	36
19	ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงลักษณะของเซลล์สร้างกระดูกที่อยู่บนพื้นผิวของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกา 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และมีความหนาแน่นของรูพรุนเท่ากับ 60 ppi หลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 วัน	37
20	ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงลักษณะของเซลล์สร้างกระดูกที่อยู่บนพื้นผิวของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกา 5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และมีความหนาแน่นของรูพรุนเท่ากับ 75 ppi หลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 วัน	38

## รายการภาพประกอบ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
21	ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงลักษณะของเซลล์สร้างกระดูกที่อยู่ภายในรูพรุนของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาหลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน	39
22	ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงลักษณะพื้นผิวของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาที่มีปริมาณสารประกอบซิลิกาต่าง ๆ กัน และลักษณะของเซลล์สร้างกระดูกที่อยู่ภายในรูพรุนของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาในกลุ่มต่าง ๆ หลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน	40
23	ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงลักษณะของเซลล์สร้างกระดูกที่อยู่ภายในรูพรุนของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาในกลุ่มต่าง ๆ ที่มีความหนาแน่นของรูพรุนแตกต่างกัน (A= 75 ppi, B= 60 ppi, C= 45 ppi) หลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน	41
24	กราฟแสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์สร้างกระดูก เปรียบเทียบกันในแต่ละกลุ่มของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาที่มีความหนาแน่นของรูพรุนแตกต่างกัน หลังทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 4 วัน และทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีเอ็มทีเอส	43
25	กราฟแสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของเซลล์สร้างกระดูก เปรียบเทียบกันในแต่ละกลุ่มของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาที่มีความหนาแน่นของรูพรุนแตกต่างกันหลังทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7 และ 14 วัน	45

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 บทนำต้นเรื่อง

กระดูกเป็นอวัยวะสำคัญของร่างกาย ทำหน้าที่เกี่ยวกับการป้องกัน การเคลื่อนไหว การผลิตเม็ดเลือดต่างๆ การสะสมแร่ธาตุ และเป็นแหล่งผลิตพวกเซลล์ต้นกำเนิดต่างๆ ปัญหาความผิดปกติของกระดูกนั้นส่วนใหญ่เกิดจากการที่กระดูกได้สูญเสียไปอันเนื่องมาจากการเกิดการบาดเจ็บ หรือความหนาแน่นของกระดูกลดต่ำลงหรือเกิดโรคต่าง ๆ ที่ทำให้เกิดความอ่อนแอของกระดูก ส่งผลให้กระดูกนั้นเกิดการเปราะและแตกหักง่าย (Allgrove, 2007) ซึ่งกระบวนการรักษาที่นำมาใช้ในการรักษาในปัจจุบัน ได้แก่ การปลูกถ่ายเนื้อเยื่อกระดูก (bone graft transplants), การฝังวัสดุทางชีวภาพ (implants of biomaterials) และการรักษาด้วยวิธีการเคลื่อนกระดูก (bone transportation methods) แต่ก็ยังไม่มีกระบวนการใดที่ให้ผลการรักษาที่สมบูรณ์แบบและเป็นที่น่าพึงพอใจ เนื่องจากกระบวนการที่ใช้ส่วนใหญ่มักจะเกิดผลข้างเคียงต่างๆ ตัวอย่างเช่น กระดูกปลูกถ่าย (bone graft) ที่ใช้อาจจะทำให้เกิดความเสียหายต่อการติดเชื้อต่างๆ อีกทั้งกระดูกปลูกถ่ายอาจจะเกิดการแตกหักในระหว่างกระบวนการรักษา และอาจเป็นสาเหตุก่อให้เกิดภาวะแทรกซ้อนระหว่างหรือภายหลังการรักษา รวมทั้งการต่อต้านของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อกระดูกปลูกถ่าย (Cancedda *et al.*, 2007) นอกจากนี้ การเกิดการสร้างกระดูกใหม่ (osteoconductivity) ซึ่งเป็นกระบวนการที่มีความสำคัญในการเกิดการสร้างใหม่ของเนื้อเยื่อกระดูก (bone tissue regeneration) ของวัสดุฝังและเนื้อเยื่อปลูกถ่ายที่ใช้ในปัจจุบัน ยังไม่อยู่ในระดับที่น่าพึงพอใจเช่นกัน

สารประกอบไฮดรอกซีอะพาไทต์ (hydroxyapatite, HA) ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการเกิดการสร้างใหม่ของเนื้อเยื่อกระดูก ได้แก่ การนำมาเป็นวัสดุทดแทนอวัยวะหรือเป็นสารที่นำมาใช้เคลือบบนวัสดุอื่น ๆ รวมทั้งมีบทบาทสำคัญอื่นๆ เกี่ยวกับทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (tissue engineering) โดยที่ผ่านมามีการวิจัยพัฒนาสารประกอบไฮดรอกซีอะพาไทต์ เช่น การผสมรวมของสารประกอบพอลิเมอร์ (polymer) และวัสดุโครงร่างไฮดรอกซีอะพาไทต์ (hydroxyapatite scaffold) ซึ่งทำให้สามารถเพิ่มการดูดซับโปรตีนและลดการตายของเซลล์สร้างกระดูก (Woo *et al.*, 2007) นอกจากนี้ Huang และคณะ (2009) ได้นำสารประกอบไฮดรอกซีอะพาไทต์มาเคลือบวัสดุไททาเนียม (titanium) บริสุทธิ์ เพื่อชักนำให้เซลล์สร้างกระดูกเกิดการแปรสภาพ (differentiation) ซึ่งบ่งชี้ถึงคุณสมบัติของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์ในการเป็นโครงร่างในการเกิดการสร้างใหม่ของกระดูกได้ นอกจากนี้วัสดุไฮดรอกซีอะ

พาไทต์ยังสามารถมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเนื้อเยื่อ (biocompatibility) อีกด้วย (Kobayashi *et al.*, 2006) ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้มีบทบาทสำคัญต่อการสนับสนุนการสร้างเซลล์กระดูกใหม่ การเจริญเติบโต การแปรสภาพ การสังเคราะห์โปรตีน และสะสมแร่ธาตุต่าง ๆ ด้วย จึงนับได้ว่าสารประกอบวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์นั้น เป็นตัวเลือกที่ดีในการนำมาใช้เป็นวัสดุในกระบวนการวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก

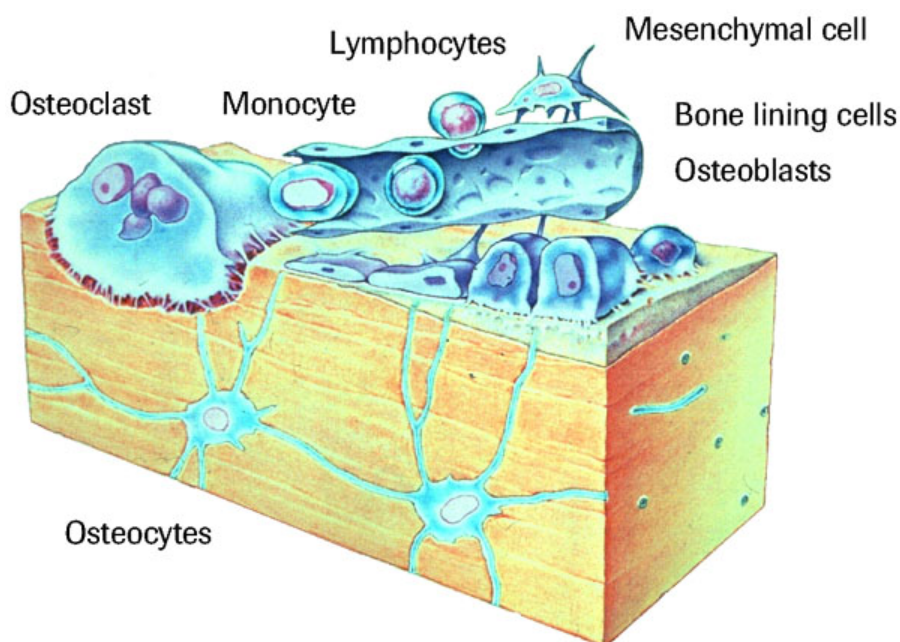
ถึงแม้ว่านักวิจัยจำนวนมากจะสนับสนุนการใช้สารประกอบวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เป็นวัสดุที่ใช้ทดแทนกระดูก เนื่องจากว่ามีรายงานการวิจัยถึงคุณสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพต่อเซลล์กระดูกของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์ (Toshitane and Kuniomi, 1999) อย่างไรก็ตามการเกิดรอยแตกของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่เพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่เปียกชื้นนับเป็นปัญหาที่สำคัญมาก (De With *et al.*, 1981) นอกจากนี้การเกิดลักษณะรูพรุนขนาดเล็ก (microporosity) ขึ้นในวัสดุเป็นอีกปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเกิดการสร้างกระดูกใหม่ ซึ่งอาจมีผลต่อคุณสมบัติเชิงกลของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์ (Woodard *et al.*, 2007; Morejón *et al.*, 2004) ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีการวิจัยมากขึ้นเพื่อพัฒนาคุณสมบัติของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์ โดยมีการรวมสารประกอบไฮดรอกซีอะพาไทต์กับสารอื่น ๆ เพื่อเพิ่ม หรือเสริมคุณสมบัติต่าง ๆ เพื่อให้กระบวนการรักษามีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น เช่น สารประกอบซิลิกา (Silica,  $\text{SiO}_2$ ) ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติเชิงกลที่ดี (Jia and Guo, 2007) และยังพบว่า สารประกอบซิลิกาเมื่อรวมกับสารประกอบไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่เป็นสารเคลือบที่อยู่บนวัสดุโครงร่าง (scaffold) มีคุณสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์สร้างกระดูก (Lopez-Alvarez *et al.*, 2009) นอกจากนี้ในการศึกษาต่อมาพบว่าปัจจัยที่เกี่ยวกับลักษณะของรูพรุน เช่น ปริมาณของรูพรุน และขนาดของรูพรุนในโครงร่างของวัสดุ ก็มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์สร้างกระดูกเช่นกัน เนื่องจากปัจจัยเหล่านี้ส่งผลเกี่ยวกับพื้นที่ในการที่เซลล์จะสามารถเกาะได้ และความสามารถที่จะนำส่งเซลล์เข้าสู่ในโครงร่างของวัสดุสำหรับการเจริญเติบโตต่อไป (Bae *et al.*, 2006)

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาคูณสมบัติความกันดีทางชีวภาพของวัสดุโครงร่างสามมิติไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกา (Silica doped hydroxyapatite scaffold) ที่มีปริมาณสารประกอบซิลิกาและปริมาณรูพรุนที่แตกต่างกันในแต่ละโครงร่างของวัสดุต่อเซลล์สร้างกระดูกของมนุษย์ และคุณสมบัติของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาที่มีปริมาณสารประกอบซิลิกาและปริมาณรูพรุนที่ต่างกันในการชักนำการเกิดการแปรสภาพของเซลล์สร้างกระดูก

## 1.2 การตรวจเอกสาร

### 1.2.1 วิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก: แนวทางเลือกของการรักษาความพิการของกระดูก

กระดูกเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันพิเศษ (specialized connective tissue) มีหน้าที่ค้ำจุนอวัยวะต่าง ๆ ในร่างกายของสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง มีการพัฒนาโดยกระบวนการของการสะสมแร่ธาตุ (ossification) เพื่อให้เกิดการสร้างเป็นเนื้อเยื่อกระดูกขึ้น (osteogenesis) กระดูกมีองค์ประกอบที่มาจากสารอินทรีย์ (organic matrix) และและสารประกอบแคลเซียมฟอสเฟต สำหรับส่วนที่เป็นสารอินทรีย์ ส่วนใหญ่ประกอบด้วยคอลลาเจน ชนิดที่ 1 (type I collagen) ซึ่งมีอยู่ในประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ของเมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix) และอีกประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์เป็นสารประกอบโปรตีโอไกลแคน (proteoglycan) และโปรตีนที่ไม่ได้อยู่ในกลุ่มของคอลลาเจน (non-collagenous protein) นอกจากนี้กระดูกยังประกอบด้วยเซลล์ต่าง ๆ เช่น เซลล์สร้างกระดูก (osteoblast), เซลล์ละลายกระดูก (osteoclast) และเซลล์ออสติโอไซต์ (osteocyte) เป็นต้น ดังแสดงในรูปที่ 1

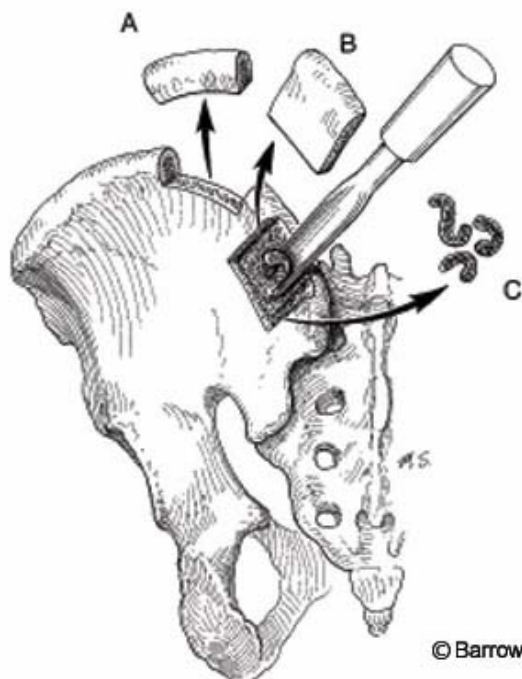


รูปที่ 1 แสดงเซลล์ต่าง ๆ บริเวณผิวหน้าและภายในเนื้อเยื่อกระดูก

(ที่มา: [http://www.roche.com/pages/facets/11/bone\\_cells2.jpg](http://www.roche.com/pages/facets/11/bone_cells2.jpg))

ความบกพร่องหรือการเสียหายของกระดูก เกิดจากการที่กระดูกสูญเสียของความหนาแน่นของกระดูก หรือการหายไปของชิ้นส่วนของกระดูก โดย Mackey และคณะ (2007) ได้แบ่งรูปแบบความเสียหายหรือการบาดเจ็บของกระดูกออกเป็น 2 แบบ คือ การแตกหักของกระดูกจากการได้รับภัยอันตรายแบบรุนแรง (high-trauma fractures) ซึ่งมักเกิดจากการปะทะกับยานพาหนะที่ขับเคลื่อนด้วยเครื่องยนต์ต่างๆ เช่น รถยนต์ รถจักรยานยนต์ และอื่นๆ และการแตกหักของกระดูกจากการได้รับภัยอันตรายแบบไม่รุนแรง (low-trauma fractures) ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการสูญเสียความหนาแน่นของโครงสร้างกระดูก นอกจากนี้การเป็นเนื้องอกในกระดูกอาจส่งผลข้างเคียงทำให้กระดูกเกิดการแตกหักของกระดูกได้ (Komaki *et al.*, 2006) ดังนั้นการรักษาเพื่อให้เกิดการสร้างกระดูกขึ้นมาใหม่ในบริเวณที่เกิดรอยร้าว การแตกหัก หรือเกิดความเสียหายของกระดูก จึงเป็นปัญหาที่สำคัญอย่างมากสำหรับในวงการศัลยกรรมกระดูก นอกจากนี้คุณสมบัติของการสร้างกระดูกใหม่นั้นเป็นข้อจำกัดอย่างมากในกรณีที่กระดูกเกิดความเสียหายขนาดใหญ่ (Rimondini *et al.*, 2005)

วิศวกรรมเนื้อเยื่อเป็นกระบวนการของการออกแบบลักษณะของเนื้อเยื่อ การสร้างโครงสร้างรูปแบบของเนื้อเยื่อ และนำเอาเนื้อเยื่อที่สร้างขึ้นนั้นเข้าไปแทนที่อวัยวะต่างๆ ในร่างกาย (Ingber *et al.*, 2006) สำหรับเนื้อเยื่อกระดูกถึงแม้ว่าจะมีความสามารถในการสร้างใหม่ทดแทนกรณีที่เกิดการแตกหัก แต่ในกรณีที่มีการสูญเสียกระดูกเป็นบริเวณกว้าง อาจจำเป็นต้องมีการใช้วิธีการรักษาที่ต้องมีการทดแทนชิ้นส่วนของกระดูก เช่น การปลูกถ่ายกระดูกจากตนเอง (autografts) หรือการปลูกถ่ายกระดูกจากผู้อื่น (allografts) โดยวิธีการปลูกถ่ายกระดูกจากตนเอง เป็นวิธีการรักษาโดยผ่าตัดนำชิ้นกระดูกจากบริเวณอื่นๆ ภายในร่างกายมาปลูกถ่ายในบริเวณที่มีการสูญเสียกระดูก ดังแสดงในรูปที่ 2 อย่างไรก็ตามการรักษาด้วยวิธีนี้อาจก่อให้เกิดผลข้างเคียงตามมา ได้แก่ การเกิดการติดเชื้อ และการเกิดการปิดรอยปลูกถ่ายเนื้อเยื่อไม่สนิท ซึ่งสามารถพบได้บ่อยโดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีของการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อกระดูกส่วนที่เป็นกระดูกท่อนยาวที่มีขนาดใหญ่ นอกจากนี้การรักษาด้วยวิธีการปลูกถ่ายกระดูกจากตนเองมักจะต้องมีการรักษาด้วยกระบวนการอื่นอีกร่วมด้วย หรือในบางกรณีอาจไม่สามารถใช้วิธีการรักษาแบบนี้ได้เลย เนื่องจากสภาวะทางร่างกายของผู้ป่วยซึ่งอาจส่งผลทำให้เกิดโรคแทรกซ้อนขึ้น รวมทั้งข้อจำกัดทางด้านค่ารักษาพยาบาลที่เพิ่มขึ้นเนื่องจากในวิธีการรักษานี้ด้วย



รูปที่ 2 แสดงกระดูกปลูกถ่ายจากตนเอง (autografts) ที่นำมาจากกระดูกสะโพก  
(ที่มา: [http://www.thebarrow.org/Education\\_And\\_Resources/Barrow\\_Quarterly/205303](http://www.thebarrow.org/Education_And_Resources/Barrow_Quarterly/205303))

ในการปลูกถ่ายกระดูกของผู้อื่นเป็นวิธีการรักษาที่นำกระดูกจากผู้บริจาคคนอื่นมาใช้ปลูกถ่าย โดยผู้บริจาคตันอาจมีชีวิตอยู่หรือเสียชีวิตแล้วก็ได้แล้วแต่กรณีการรักษา เช่น การศัลยกรรมตกแต่งข้อกระดูกสะโพก (Carson and Bostrom, 2007) อย่างไรก็ตามการรักษาวิธีนี้สามารถก่อให้เกิดความเสี่ยงที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคที่ติดต่อทางเลือด หรือการถ่ายทอดโรคบางอย่างจากผู้บริจาคไปสู่ผู้รับบริจาค และยังคงเกิดการติดเชื้ออื่นๆ โดยพบอัตราของการได้รับเชื้อถึง 13 เปอร์เซ็นต์ (Mankin *et al.*, 2005) ซึ่งการรักษาด้วยกระบวนการนี้จะมีกฎหมายควบคุมอย่างเคร่งครัดในขั้นตอนต่างๆ และมีบางประเทศเท่านั้นที่ให้ออกรักษาเนื้อเยื่อที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิแช่แข็ง และเนื้อเยื่อต้องมีการเข้ากันได้กับผู้รับบริจาคเพื่อป้องกันการปฏิเสธของระบบภูมิคุ้มกันของผู้รับบริจาคเอง ในปัจจุบันเนื้อเยื่อที่นำมาใช้ในรักษาส่วนใหญ่เป็นเนื้อเยื่อที่มาจากผู้บริจาคที่เสียชีวิตไปแล้ว ในกรณีของเนื้อเยื่อกระดูกส่วนใหญ่จะมีการนำชิ้นกระดูกไปผ่านขบวนการต่าง ๆ ก่อนนำมาใช้หรือจำหน่าย เช่น การทำให้แห้งด้วยความเย็น (freeze-dried) ดังแสดงในรูปที่ 3 หรือการกำจัดแร่ธาตุออก (demineralized) ซึ่งมีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง นอกจากนี้ระยะเวลาในการรักษามักจะค่อนข้างยาวนาน (Mastrogiacomo *et al.*, 2005) ดังนั้นวิธีการรักษาที่เลือกใช้จึงขึ้นอยู่กับดุลยพินิจของแพทย์และผู้ป่วย



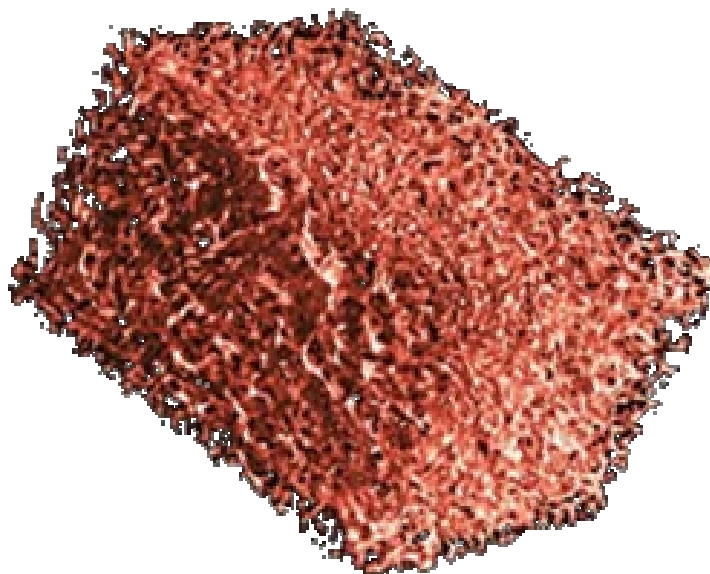


รูปที่ 3 แสดงกระดูกปลูกถ่ายจากผู้อื่น (allografts) ซึ่งผ่านขบวนการทำให้แห้งด้วยความเย็น (ที่มา: [http://www.morningstarsurgical.co.za/pages/periodontal/allo\\_bone.htm](http://www.morningstarsurgical.co.za/pages/periodontal/allo_bone.htm))

เนื่องจากวิธีการการรักษาโดยใช้เนื้อเยื่อปลูกถ่ายดังกล่าวข้างต้นมีข้อจำกัดในการรักษา และอาจเกิดปัญหาภาวะแทรกซ้อนตามมา ในปัจจุบันได้มีการใช้การทดแทนอวัยวะหรือการทดแทนเนื้อเยื่อต่างๆ ด้วยวัสดุทางชีวภาพ (biomaterials) ซึ่งไม่ได้มาจากเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต แต่จะใช้วัสดุต่างๆ ที่สังเคราะห์ขึ้นมาในการรักษาผู้ป่วยแทน โดยได้มีการพัฒนาและวิจัยเพิ่มขึ้นอย่างมากในช่วงที่ผ่านมา ซึ่งการใช้วัสดุทางชีวภาพจะช่วยลดการติดต่อกับโรคลงได้ มีขั้นตอนของการผ่าตัดที่น้อยลง สามารถลดการติดเชื้อโรคต่างๆ หรือการต่อต้านของระบบภูมิคุ้มกันได้ และยังมีคุณสมบัติที่เป็นประโยชน์อื่นๆ (Porter *et al.*, 2009) ดังนั้นวิธีการรักษาด้วยการทดแทนเนื้อเยื่อด้วยวัสดุทางชีวภาพจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง ซึ่งจำเป็นต้องอาศัยวิธีการทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อที่มีประสิทธิภาพ สามารถนำไปผลิตได้ง่าย มีความน่าเชื่อถือ มีมาตรฐานระดับนานาชาติ มีกฎหมายควบคุม มีการควบคุมคุณภาพ รวมทั้งมีการทดสอบที่แสดงความสำเร็จในการใช้วัสดุเหล่านั้น (Hench, 1998)

ในการพัฒนาสังเคราะห์วัสดุโครงสร้างทดแทน จำเป็นต้องคำนึงถึงคุณสมบัติทางฟิสิกส์และเคมีของวัสดุโครงสร้างที่มีลักษณะเลียนแบบธรรมชาติ (biomimetic) คุณสมบัติการย่อยสลายได้ทางชีวภาพหลังทำการใส่วัสดุโครงสร้างในเนื้อเยื่อของร่างกาย และการเกิดการตอบสนองทางสรีรวิทยาของร่างกายต่อวัสดุอย่างเป็นไปตามขั้นตอน ซึ่งคุณสมบัติที่สำคัญในการสร้างวัสดุโครงสร้างเลียนแบบธรรมชาติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการสังเคราะห์วัสดุโครงสร้างสำหรับกระดูก (bone scaffold) จะต้องมีคุณสมบัติต่อไปนี้ (Porter *et al.*, 2009)

- 1) มีความแข็งแรงและสามารถรับแรงได้ดีในบริเวณที่ทำใส่วัสดุ
- 2) มีลักษณะพื้นผิวที่ทำให้เกิดการสร้างเมทริกซ์ของกระดูก (osteoid) ได้
- 3) มีลักษณะโครงสร้างแบบมีรูพรุนภายในวัสดุ เพื่อให้สามารถเกิดการสร้างเส้นเลือดและการเจริญเติบโตของเซลล์กระดูกได้ ดังแสดงในรูปที่ 4
- 4) สนับสนุนให้เซลล์กระดูกสามารถเคลื่อนที่ภายในวัสดุโครงสร้างทดแทนได้
- 5) มีความสามารถในการสนับสนุนให้มีการสร้างหรือการซ่อมแซมกระดูกในวัสดุโครงสร้างทดแทน
- 6) สามารถสนับสนุนการตอบสนองของเซลล์กระดูกจนกระทั่งวัสดุโครงสร้างทดแทนกับกระดูกเกิดการเชื่อมต่อกันได้ (osteointegration)
- 7) สามารถถูกย่อยสลายในลักษณะที่ควบคุมได้ เพื่อให้เกิดการแทนที่ด้วยกระดูกใหม่ที่ร่างกายสร้างขึ้นแทนที่
- 8) สารประกอบที่เกิดจากย่อยสลายของวัสดุโครงสร้างต้องไม่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต
- 9) ต้องไม่กระตุ้น หรือตอบสนองต่อโรค หรือการอักเสบเรื้อรังต่างๆ
- 10) สามารถทำการรณวิธีการฆ่าเชื้อโรคต่างๆ โดยที่ไม่เกิดการสูญเสียคุณสมบัติทางชีวภาพต่างๆ
- 11) สามารถขนส่งเคลื่อนย้ายสารโมเลกุลชีวภาพหรือยาในลักษณะที่ควบคุมได้ เพื่อช่วยร่นระยะเวลาในการรักษา และป้องกันโรคต่างๆ ได้

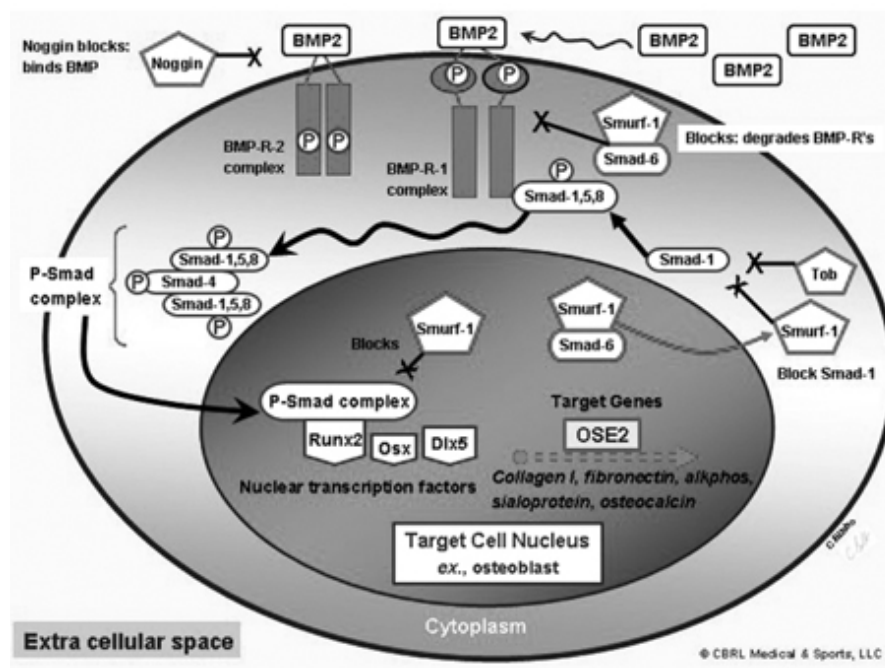


รูปที่ 4 แสดงวัสดุโครงร่างที่มีลักษณะเป็นรูพรุนซึ่งสามารถทำให้เซลล์เจริญเติบโตอยู่ภายในวัสดุ และเกิดการสร้างเส้นเลือดใหม่ได้

(ที่มา: [http://www.rsc.org/images/b706654f-250-for-tridion\\_tcm18-95841.jpg](http://www.rsc.org/images/b706654f-250-for-tridion_tcm18-95841.jpg))

องค์ประกอบต่างๆ ของวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกล้วนมีวัตถุประสงค์ในการที่จะทำให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ เช่น วัสดุโครงร่างทดแทนที่มีโครงสร้างแบบสามมิติสำหรับให้เซลล์กระดูกเจริญเติบโต (osteoconductive), ปัจจัยที่กระตุ้นการเจริญเติบโต (growth factor) สำหรับการชักนำให้เกิดกระบวนการสร้างกระดูก (osteoinduction) และการสร้างเส้นเลือดของกระดูกที่สร้างใหม่ และเซลล์ที่มีศักยภาพในการสร้างกระดูก (Cancedda *et al.*, 2007) ซึ่งสำหรับโครงร่างทดแทนของกระดูกจากวัสดุทางชีวภาพที่มีลักษณะเป็นโครงร่างสามมิติ นอกจากจะทำหน้าที่ในการเป็นโครงร่างให้เซลล์จากร่างกายเจริญเติบโตแล้ว ยังควรทำหน้าที่ในการนำพาปัจจัยที่กระตุ้นการเจริญเติบโตหรือเซลล์ได้อีกด้วย โดยอาศัยเทคโนโลยีการใส่ปัจจัยที่กระตุ้นการเจริญเติบโตลงในวัสดุ (growth factor based) หรือการใส่เซลล์ลงในวัสดุ (cell based) สำหรับเทคโนโลยีการใส่ปัจจัยที่กระตุ้นการเจริญเติบโตลงในวัสดุ ในปัจจุบันมีประโยชน์อย่างมากทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ซึ่งปัจจัยที่กระตุ้นการเจริญเติบโตที่นิยมใช้ในการกระตุ้นการสร้างกระดูกใหม่ คือ โบนมอร์โฟเจเนติกโปรตีน (bone morphogenetic proteins หรือ BMPs) ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการส่งสัญญาณในเซลล์สร้างกระดูกเพื่อให้เกิดการสร้างโปรตีนต่าง ๆ ที่จำเป็นสำหรับการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกขึ้นมาใหม่ ดังแสดงในรูปที่ 5 นอกจากนี้ได้มีรายงานวิจัยจำนวนมากเกี่ยวกับการนำโปรตีนลูกผสมของโบนมอร์โฟเจเนติกโปรตีนชนิดที่ 2 (recombinant human bone morphogenetic proteins-2 หรือ rhBMP-2) และโปรตีนลูกผสมโบนมอร์โฟเจเนติกโปรตีนชนิดที่ 7 (recombinant human bone morphogenetic proteins-7

หรือ rhBMP-7) มาใช้ในการรักษาสัตว์ชนิดต่างๆ ในการปลูกถ่ายกระดูกและการสร้างกระดูกใหม่ (Cook and Rueger, 1996; Rosen and Wozney, 2002)



รูปที่ 5 แสดงการส่งสัญญาณของโมเลกุลต่างๆ ภายในเซลล์กระดูกในการเกิดการสร้างกระดูก (ที่ มา : [http://www.wisconsinfootandankleinstitute.com/img/research/Recombinant-Bone-Morphogenetic-Protein\\_fig2.jpg](http://www.wisconsinfootandankleinstitute.com/img/research/Recombinant-Bone-Morphogenetic-Protein_fig2.jpg))

สำหรับเทคโนโลยีการใส่เซลล์ลงในวัสดุ ในกระบวนการวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกส่วนมากจะนิยมนำเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคมอล (mesenchymal stem cells) มาใช้รักษา (Friedenstein *et al.*, 1987) โดยในงานวิจัยของ Ohgushi และคณะ พบว่าการใช้มีเซนไคมอลสเต็มเซลล์ร่วมกับวัสดุโครงร่างทดแทน สามารถกระตุ้นการหลั่งสารที่ไปออกฤทธิ์กับเซลล์ข้างเคียง (paracrine signals) และเซลล์กระดูกสามารถที่จะหลั่งสารที่เป็นปัจจัยสำคัญต่อการสร้างเมทริกซ์ในกระดูก (bone matrix) สำหรับการนำเทคโนโลยีนี้มาใช้ในการรักษาความผิดปกติของกระดูก ได้มีรายงานการนำเซลล์มาใช้ร่วมกับวัสดุโครงร่างในกระดูกต้นขา (femur) ของหนู (Ohgushi *et al.*, 1989) สุนัข (Bruder *et al.*, 1998) และแกะ (Kon *et al.*, 2000) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีรายงานของความสำเร็จในการสร้างกระดูกขึ้นมาใหม่หลังการรักษาที่บริเวณของกระดูกส่วนกะโหลกศีรษะ (skull) และขากรรไกรล่าง (mandible) ของแกะ (Shang *et al.*, 2001; Schliephake *et al.*, 2001) และบริเวณกระดูกสะโพกของแพะ (Kruyt *et al.*, 2004)

จากองค์ประกอบของวิศวกรรมเนื้อเยื่อที่กล่าวมาข้างต้น แสดงให้เห็นว่ามีองค์ประกอบหลายด้านที่มีความสำคัญในการสร้างวัสดุเพื่อนำมาใช้ในการรักษาอวัยวะในกระดูก ซึ่งในปัจจุบันได้มีงานวิจัยเป็นจำนวนมากศึกษาพัฒนาการสร้างวัสดุโครงร่างที่ดี การใช้ปัจจัยที่กระตุ้นการเจริญเติบโต และเทคโนโลยีการใส่เซลล์ลงในวัสดุ เพื่อให้เกิดเป็นโครงร่างที่กระตุ้นเหนี่ยวนำการสร้างกระดูก (osteoinductive scaffold) ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ในวงการแพทย์ (Meijer *et al.*, 2007) สำหรับการสังเคราะห์วัสดุโครงร่างเพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการรักษาความเสียหายของกระดูกที่เกิดเป็นรอยวิการขนาดใหญ่ในยุคปัจจุบันสารประกอบที่นิยมนำมาใช้ทดแทนกระดูก คือ สารประกอบแคลเซียมฟอสเฟต (calcium phosphates) (Welch *et al.*, 2003; Trenholm *et al.*, 2005) และแคลเซียมซัลเฟต (Calcium sulfates) (Moed *et al.*, 2003) ซึ่งจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าผลสำเร็จดีเทียบเท่าหรือดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ การปลูกถ่ายกระดูกจากตนเอง โดยสารประกอบแคลเซียมฟอสเฟตที่นำมาใช้ส่วนใหญ่จะผ่านกระบวนการทำให้กลายเป็นวัสดุเซรามิก (ceramic) ก่อนนำมาใช้เป็นวัสดุโครงร่างสำหรับการรักษา ซึ่งวัสดุเซรามิกสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ชนิดตามลักษณะปฏิกิริยาทางเคมีที่เกิดขึ้นหลังจากการปลูกถ่ายไปแล้ว คือ วัสดุเซรามิกที่มีการดูดซึมทางชีวภาพ (bioabsorbable ceramics), วัสดุเซรามิกที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive ceramics) และวัสดุเซรามิกที่มีคุณสมบัติที่มีความเฉื่อยทางชีวภาพ (bioinert ceramics) (Yamamuro, 1994)

### 1.2.2 การใช้วัสดุสารประกอบไฮดรอกซีอะพาไทต์เป็นวัสดุทดแทนกระดูก

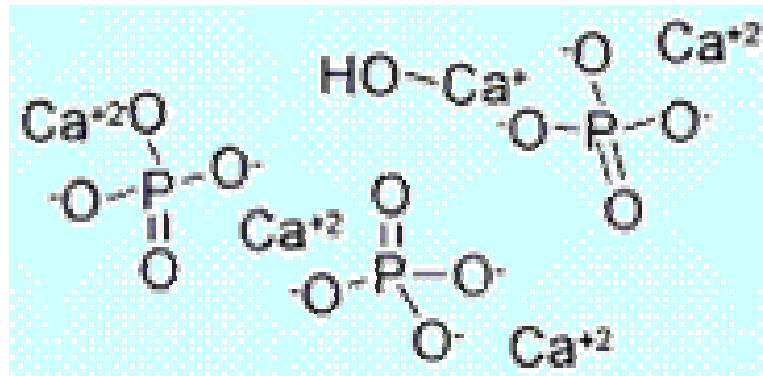
วัสดุที่นำมาใช้สำหรับการสร้างกระดูกทดแทนนั้นสามารถจัดจำแนกโดยลักษณะโครงสร้างและคุณสมบัติต่าง ๆ เช่น กระดูกที่ผ่านขบวนการดึงแร่ธาตุออก (demineralized bone matrix หรือ DBM), โพลีเมอร์สังเคราะห์ (synthetic polymer), โลหะ (metal), เซรามิก (ceramics) และ วัสดุที่มีการรวมสารประกอบ (composite scaffold) ซึ่งในช่วงยุคแรกๆ ในปี ค.ศ. 1965 Urist และคณะ ได้ค้นพบกระบวนการที่สามารถดึงแร่ธาตุและเกลือแร่ต่างๆ ของกระดูกและทดสอบการชักนำให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ในสัตว์ทดลองต่างๆ โดยกระบวนการที่ใช้เป็นการสกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริกเพื่อย่อยสลายแคลเซียมหรือสารประกอบแคลเซียมจากกระดูก ทำให้กระดูกเหลือแต่ส่วนเมทริกซ์ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นโครงสร้างให้เซลล์กระดูกเจริญเติบโตและสามารถชักนำให้เกิดกระบวนการสร้างกระดูก นอกจากนี้ได้มีรายงานวิจัยต่างๆ พบว่า กระดูกเนื้อแน่น (cortical bone) เป็นตัวเลือกที่ดีสำหรับกระบวนการดึงแร่ธาตุออก เนื่องจากแสดงคุณสมบัติชักนำให้เกิดกระบวนการสร้างกระดูกได้ดีกว่าและก่อให้เกิดอาการแพ้ที่ต่ำกว่ากระดูกเนื้อโปร่ง (cancellous bone)

สำหรับโพลีเมอร์สังเคราะห์เป็นวัสดุที่นิยมนำมาใช้ในทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกโดยไม่ต้องใช้ร่วมกับเซลล์ อาทิเช่น โพลีแอลแลกไทด์ (Poly-L-Lactide หรือ PLLA) โดยในงานวิจัยของ Gogolewski และคณะ (1997) ได้ใช้วัสดุสังเคราะห์จากโพลีแอลแลกไทด์มาใช้รักษาอวัยวะของกระดูกในกระต่ายและสุกร ต่อมาได้มีการพัฒนาโพลีเมอร์สังเคราะห์เป็นโพลีแอลโคดี แอลแลกไทด์ (Poly-L-co-D, L-lactide หรือ PLDL) และมีการสังเคราะห์ร่วมกับแคลเซียมคาร์บอเนต (calcium carbonate) เพื่อให้เกิดเป็นวัสดุสารประกอบระหว่างสารประกอบโพลีเมอร์ กับสารประกอบเซรามิก นอกจากนี้ยังมีการศึกษาวิจัยอย่างต่อเนื่องเรื่อยมาในการสร้างโพลีเมอร์สังเคราะห์ โดยในงานวิจัยของ Peter และคณะได้รายงานวิธีการทดลองการสร้างวัสดุด้วยสารประกอบโพลีแลกไทด์โคไกลโคไลด์ (Poly(lactide-co-glycolide)) จากนั้นนำสารประกอบมาบดเป็นผง ก่อนนำไปกดอัดในแม่พิมพ์พร้อมด้วยผงของสารประกอบไฮดรอกซีอะพาไทต์ และนำไปทดลองสอบเพื่อหาผลของความแข็งแรงจากการแรงกดอัด (Peter *et al.*, 1998) นอกจากนี้การศึกษาของ Peter และคณะในปีถัดมา ได้รายงานเกี่ยวกับการใช้สารประกอบโพลี (โพรพิลีนฟูมาเรต) (Poly (propylene fumarate)) เป็นวัสดุซีเมนต์ที่ใช้ทดแทนกระดูกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable bone cement) โดยฉีดสารประกอบนั้นเข้าไปในจุดที่ผิดปกติของกระดูก (Peter *et al.*, 1999)

ถึงแม้ว่ารายงานวิจัยจำนวนมากแสดงถึงการใช้วัสดุโพลีเมอร์สังเคราะห์ในการส่งเสริมการสร้างกระดูกใหม่ ในช่วงเวลาหลายปีที่ผ่านมาได้มีการพัฒนาวัสดุเซรามิกเพื่อนำมาใช้ในทางการแพทย์ โดยเน้นการวิจัยทางด้านการออกแบบและการสังเคราะห์วัสดุเซรามิกซึ่งวัสดุเซรามิกชีวภาพสามารถสร้างขึ้นมาให้อยู่ในหลายสถานะ (phase) ด้วยกัน และสามารถสร้างในลักษณะเป็นวัสดุผลึกเดี่ยว (single crystals), วัสดุพหุผลึก (polycrystalline) เช่น ไฮดรอกซีอะพาไทต์, วัสดุแก้ว (glass), วัสดุแก้วเซรามิก (glass-ceramics) หรือวัสดุที่มีการรวมสารประกอบ โดยลักษณะรูปร่างของวัสดุเซรามิกที่สร้างขึ้นเพื่อนำมาใช้ขึ้นขึ้นอยู่กับคุณสมบัติและหน้าที่ที่ต้องการ สำหรับในวงการทันตกรรมวัสดุเซรามิกได้ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในการบูรณะฟัน เช่น ใช้เป็นวัสดุในการทำครอบฟัน เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการใช้วัสดุเซรามิกเป็นวัสดุทดแทนเนื้อเยื่อภายในร่างกาย เช่น หลอดเลือดและลิ้นหัวใจ เป็นต้น สำหรับการรักษารอยวิการในกระดูก ได้มีรายงานถึงคุณสมบัติที่ดีในการเป็นโครงสร้างให้เซลล์กระดูกเจริญเติบโตของวัสดุสังเคราะห์เซรามิกชีวภาพเมื่อเทียบกับวัสดุอื่นๆ (Mastrogiacomo *et al.*, 2005) เป็นวัสดุที่ไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อในสิ่งมีชีวิต มีความแข็งแรงเชิงกลสูงกว่าวัสดุอื่น รวมทั้งมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพที่ดีมาก และมีผลข้างเคียงของการย่อยสลายทางชีวภาพที่น้อยมากหรือไม่มีเลย (Habraken *et al.*, 2007) นอกจากนี้ยังมีการใช้วัสดุเซรามิกชีวภาพร่วมกับสารประกอบโลหะออกไซด์ เช่น อะลูมิเนียมออกไซด์ (Aluminum oxide หรือ  $Al_2O_3$ ), เซอร์โคเนียมออกไซด์ (Zirconium oxide หรือ  $ZrO_2$ ) และไทเทเนียมออกไซด์ (Titanium oxide หรือ  $TiO_2$ )

วัสดุสังเคราะห์เซรามิกชีวภาพที่นิยมใช้ในปัจจุบันสร้างมาจากสารประกอบไฮดรอกซีอะพาไทต์ และ/หรือ สารประกอบไตรแคลเซียมฟอสเฟต (tricalcium phosphate หรือ TCP) เนื่องด้วยลักษณะของโครงสร้างภายในที่มีลักษณะคล้ายโครงสร้างตามธรรมชาติของกระดูกโปร่ง จึงทำให้วัสดุสารประกอบเหล่านี้ถูกนำมาใช้ในการรักษาซ่อมแซมกระดูกอย่างกว้างขวาง และยังพบว่า การเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของสารประกอบไตรแคลเซียมฟอสเฟตให้สูงขึ้นในวัสดุเซรามิกชีวภาพจะทำให้การตอบสนองต่อคุณสมบัติของการเป็นวัสดุโครงสร้างทดแทนนั้นจะเพิ่มสูงขึ้นด้วย นอกจากนี้จากการศึกษาการตอบสนองของเซลล์มนุษย์ต่อวัสดุโครงสร้างทดแทนที่สร้างจากสารอนินทรีย์ในธรรมชาติและการเกิดการสร้างกระดูกใหม่ พบว่าการเพิ่มขึ้นของพื้นที่ผิวของวัสดุเนื่องจากการมีรูพรุนอยู่ภายในจะส่งเสริมการสะสมของเมทริกซ์ของกระดูกโดยเซลล์สร้างกระดูกซึ่งเข้าไปอยู่ภายในโครงสร้างของวัสดุโครงสร้างทดแทน (Le Geros, 2002) สำหรับสารประกอบไฮดรอกซีอะพาไทต์มีสูตรทางเคมี คือ  $Ca_5(PO_4)_3(OH)$  (ดังแสดงในรูปที่ 6) ซึ่งเป็นสารประกอบอนินทรีย์หลักที่มีอยู่ในธรรมชาติของกระดูกและฟันของสัตว์มีกระดูกสันหลัง และยังเป็นสารประกอบที่ใช้ในการสร้างวัสดุชีวภาพที่นำมาประยุกต์ใช้ในการแพทย์ มีลักษณะเป็นแร่ธาตุรูปร่างเป็นผลึกที่มีขนาดเล็กมาก และมีขนาดประมาณ 10-

20×5×5 ลูกบาศก์นาโนเมตร อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงลักษณะของผลึกของแร่ธาตุในกระดูก และฟัน พบว่าจะมีลักษณะผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ไม่สมบูรณ์แบบ

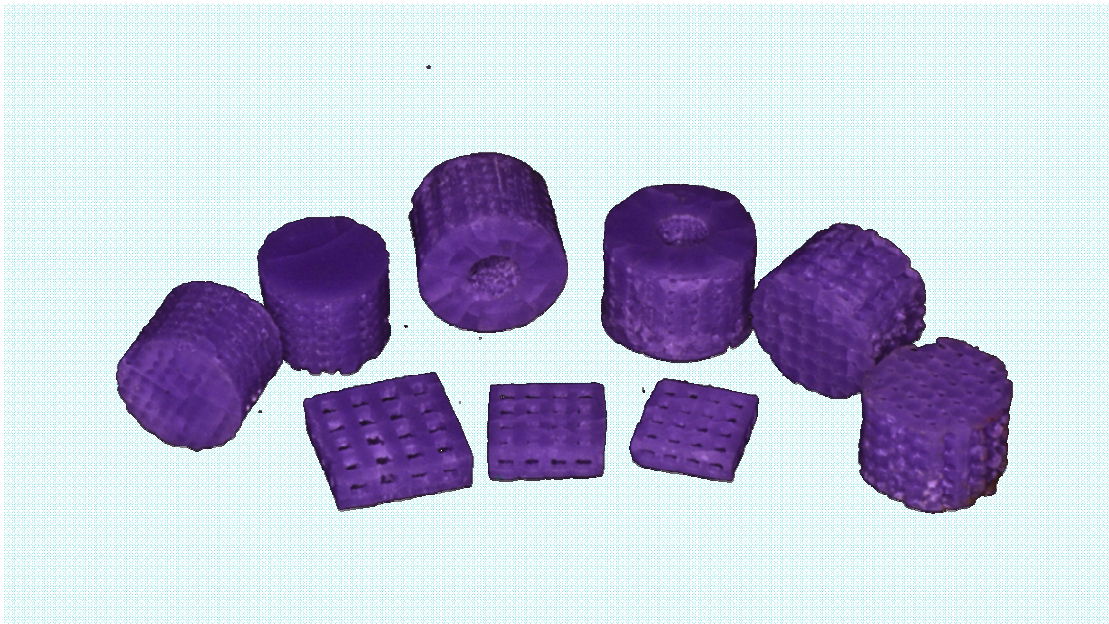


รูปที่ 6 แสดงลักษณะของสูตรโครงสร้างโมเลกุลของสารประกอบไฮดรอกซีอะพาไทต์ (ที่มา: <http://www.chemicalbook.com/CAS%5CGIF%5C68439-86-1.gif>)

สารประกอบไฮดรอกซีอะพาไทต์ได้ถูกนำมาใช้ในการรักษา ซ่อมแซม และฟื้นฟูเนื้อเยื่อในวงการทางการแพทย์มาเป็นระยะเวลาหลายปี โดยอยู่ในลักษณะวัสดุสารประกอบเซรามิกชีวภาพไฮดรอกซีอะพาไทต์ (hydroxyapatite bioceramics) ที่มีโครงสร้างแบบรูพรุน (ดังแสดงในรูปที่ 7) ตัวอย่างเช่น การนำมาเป็นวัสดุเพื่อการซ่อมแซมเนื้อเยื่อกระดูก โดยมีคุณสมบัติในการส่งเสริมการแผ่และเจริญเติบโตของเซลล์ รวมทั้งการขนส่งถ่ายโอนยาเข้าสู่ร่างกาย ซึ่งในกระบวนการทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้เป็นวัสดุที่จะเชื่อมต่อสำหรับกระดูกที่มีรอยร้าว แตกหัก และนำมาทำเป็นวัสดุทดแทนเนื้อเยื่อกระดูกโดยการผ่าตัดใส่วัสดุเข้าไปในบริเวณที่มีรอยวิการ นอกจากนี้สารประกอบไฮดรอกซีอะพาไทต์มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพอย่างดีกับเนื้อเยื่อกระดูก เนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีที่มีส่วนคล้ายคลึงกับสารประกอบที่เป็นองค์ประกอบของกระดูกธรรมชาติ และการมีพื้นผิวหน้าที่มีความสามารถในการสนับสนุนการเกิดการสร้างกระดูก รวมทั้งสามารถถูกละลายได้ (resorbability) ทำให้เกิดการแทนที่ด้วยกระดูกธรรมชาติได้เร็วขึ้น สำหรับการสร้างวัสดุโครงสร้างทดแทนจากสารประกอบไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่มีรูพรุน สามารถสร้างขึ้นได้ด้วยหลายวิธีการ (Sopyan *et al.*, 2007) เช่น การใช้โพลีไวนิลบูทียรัล (Poly vinyl butyral หรือ PVB) เพื่อควบคุมขนาดและจำนวนรูพรุน เพื่อสังเคราะห์วัสดุโครงสร้างรูพรุนไฮดรอกซีอะพาไทต์ (Liu, 1997) การใช้เทคนิคการขึ้นรูปเซรามิกด้วยโฟม (ceramic foaming) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Nishikawa และคณะได้ทำการพัฒนาการสร้างโครงสร้างรูพรุนแบบเชื่อมต่อกัน (interconnected) ของวัสดุสารประกอบเซรามิกแคลเซียมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (calcium hydroxyapatite ceramic) ให้มีรูพรุน 2 ขนาด



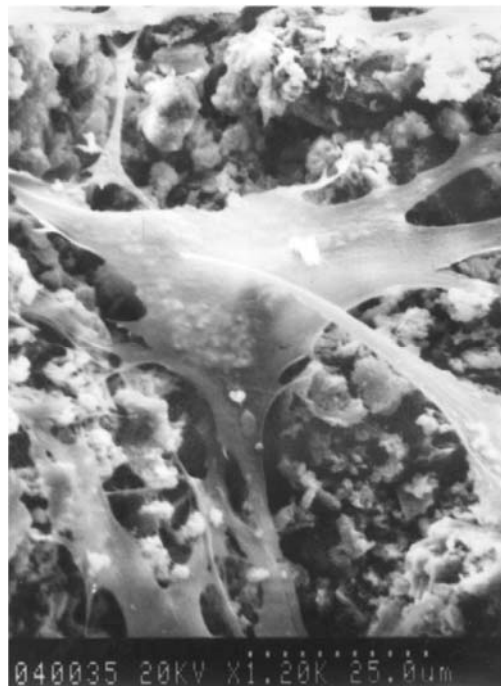
คือ ความยาวเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 150 และ 300 ไมโครเมตร สำหรับผลของรูพรุนต่อความแข็งแรงของวัสดุ มีรายงานจากงานวิจัยของ Le Huec และคณะ (1995) ซึ่งได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับอิทธิพลของรูพรุนกับความแข็งแรงเชิงกลของวัสดุเซรามิกไฮดรอกซีอะพาไทต์ บ่งชี้ว่าไม่เพียงแต่จำนวนรูพรุนทั้งหมดของวัสดุเท่านั้น แต่ขนาดของรูพรุนนั้นก็สามารถมีอิทธิพลต่อการความทนทานต่อแรงอัด แรงกดต่างๆ ดังนั้นจึงเป็นการสนับสนุนต่อรายงานของ Sopyan และคณะ ซึ่งรายงานว่ารูพรุนที่มีขนาดใหญ่จะทำให้ความทนทาน ความแข็งแรงของวัสดุทดแทนลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นโดยทั่วไปวัสดุทดแทนจากสารประกอบไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่มีรูพรุนจึงไม่สามารถที่จะรองรับน้ำหนักที่มากได้ และได้ถูกนำมาใช้เพียงแค่รักษากระดูกเพียงเฉพาะรอยแตก รอยร้าวเล็กๆ เท่านั้น



รูปที่ 7 แสดงวัสดุสารประกอบวัสดุโครงสร้างไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่มีโครงสร้างแบบสามมิติ (ที่มา: [http://www.engr.iupui.edu/~tgchu/myweb/images/all\\_2.jpg](http://www.engr.iupui.edu/~tgchu/myweb/images/all_2.jpg))

คุณสมบัติทางชีววิทยาของวัสดุสารประกอบเซรามิกไฮดรอกซีอะพาไทต์ได้ถูกนำมาทดสอบในหลายงานวิจัยในแง่ของการยึดเกาะ (ดังแสดงในรูปที่ 8) และการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยในปี 2003 ได้มีงานวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาการรวมกันของสารประกอบนาโนไฮดรอกซีอะพาไทต์ (nano-hydroxyapatite) กับสารประกอบโพลีเมอร์กรดโพลีแลคติกแอซิด (poly(L-lactic acid)) เพื่อสร้างเป็นโครงสร้าง 3 มิติ พบว่า สามารถทำให้เซลล์เกาะและสามารถที่จะเคลื่อนที่ภายในวัสดุได้ (Wei and Ma, 2004) นอกจากนี้ Tieliewuhan และคณะ ได้

ทำการศึกษาเกี่ยวกับการเจริญเติบโต การแผ่ของเซลล์สร้างกระดูก และการสร้างกระดูกขึ้นมาใหม่ ทั้งบนพื้นผิวและข้างในวัสดุคาร์บอนอะพาไทต์-ฟองน้ำคอลลาเจน (carbonate apatite-collagen sponge) ซึ่งเป็นวัสดุโครงสร้างที่มีรูพรุน จากผลการศึกษาพบว่าวัสดุคาร์บอนอะพาไทต์-ฟองน้ำคอลลาเจน มีความเหมาะสมในการเป็นวัสดุโครงร่างทดแทนของเนื้อเยื่อกระดูก และเมื่อในปี 2006 Smith และคณะได้ทำการศึกษาและพบว่า เซลล์สร้างกระดูก MC3T3-E1 สามารถยึดเกาะและเจริญเติบโตได้บนวัสดุสารประกอบไฮดรอกซีอะพาไทต์แบบมีรูพรุนที่สร้างจากผงของสารประกอบที่มีขนาดนาโนเมตร (nano hydroxyapatite scaffold) ได้ดีกว่าวัสดุโครงร่างทดแทนไมโครไฮดรอกซีอะพาไทต์ (micro hydroxyapatite scaffold) หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน



รูปที่ 8 แสดงเซลล์สร้างกระดูกเกาะอยู่บนวัสดุโครงร่างสารประกอบแคลเซียมฟอสเฟต (calcium phosphate scaffold) ถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) (ที่มา: [http://www.emeraldinsight.com/content\\_images/fig/1560110507009.png](http://www.emeraldinsight.com/content_images/fig/1560110507009.png))

ในการศึกษากระบวนการของวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก นอกจากจะศึกษาเกี่ยวกับการยึดเกาะและการแผ่ของเซลล์รวมทั้งการเจริญเติบโตของเซลล์แล้ว การศึกษาการแปรสภาพของเซลล์สร้างกระดูกเป็นอีกวิธีหนึ่ง ซึ่งใช้ในการประเมินถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของวัสดุโครงร่างต่อเซลล์สร้างกระดูก โดยใช้การศึกษาการสร้างเอนไซม์หรือโปรตีนต่าง ๆ ที่เป็นองค์ประกอบในเมทริกซ์ของกระดูกโดยเซลล์สร้างกระดูก เช่น การวัดการทำงานของ

เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้การเกิดการแปรสภาพของเซลล์สร้างกระดูกในระยะแรก (early differentiation marker) โดยจากการศึกษาที่ผ่านมาจะพบการแสดงออกของยีนอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสมาก หลังจากที่มีการเพาะเลี้ยงเซลล์ในระดับห้องปฏิบัติการไปประมาณ 10 วัน (Lian *et al.*, 1998) นอกจากนี้อาจใช้วิธีการวิเคราะห์การแสดงออกของออสติโอแคลซิน (osteocalcin) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ในระยะที่เซลล์สร้างกระดูกมีการแปรสภาพในระยะหลัง (late differentiation marker) และเกี่ยวข้องกับการเกิดการสะสมแร่ธาตุของเซลล์สร้างกระดูก

นอกจากการใช้วัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เพียงอย่างเดียวหรือใช้ร่วมกับโพลีเมอร์ต่าง ๆ ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาองค์ประกอบใหม่ ๆ เพื่อนำมาใช้พัฒนาปรับปรุงคุณสมบัติของวัสดุโครงสร้างไฮดรอกซีอะพาไทต์ให้ดีขึ้น ตัวอย่างเช่น การใช้สารประกอบซิลิกาหรือซิลิกอนไดออกไซด์ ( $\text{SiO}_2$ ) ซึ่งเป็นสารประกอบที่สามารถพบเห็นได้ทั่วไปตามธรรมชาติ ได้แก่ หินทราย ทราย หรือหินเขี้ยวหนุมาน (quartzite) โดยได้มีการนำสารประกอบซิลิกามาเป็นวัตถุดิบเริ่มต้นสำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์ประเภทแก้วและเซรามิกต่างๆ นอกจากนี้สารประกอบซิลิกายังมีบทบาทที่สำคัญในขบวนการสะสมแร่ธาตุในสิ่งมีชีวิต (biomineralization) เช่น ปะการัง และพวงสาหร่ายไดอะตอม เป็นต้น (Borum and Wilson Jr., 2003) สำหรับคุณสมบัติของสารประกอบซิลิกา จากงานวิจัยของ Hench และคณะ (1973) ได้แสดงให้เห็นถึงการมีบทบาทร่วมของสารประกอบซิลิกาในการชักนำให้เกิดคุณสมบัติสนับสนุนกิจกรรมทางชีวภาพ และคุณสมบัติการชักนำการเจริญเติบโตของเซลล์กระดูกของวัสดุแก้วชีวภาพ อีกทั้งวัสดุสารประกอบเซรามิกซิลิกา (silica ceramics) ยังมีคุณสมบัติที่ดีเยี่ยมหลายประการเกี่ยวกับการใช้อุณหภูมิที่สูงในการผลิต เช่น ความทนทาน (resistance ability) ในด้านของความทนทานต่อการกัดกร่อน (corrosion-resistance ability), ความทนทานต่อการเพิ่มอุณหภูมิสูงในระยะเวลานั้นๆ (heating shock-resistance ability) และความสามารถในการลอดผ่านของคลื่นรังสีไมโครเวฟได้ (microwave penetrability) ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้จำเป็นต้องมีอยู่ในวัสดุที่ต้องอยู่ในสภาวะที่มีความร้อนสูงหรือมีคลื่นรังสีไมโครเวฟ นอกจากนี้รายงานการวิจัยของ Jia และ Guo (2007) ได้กล่าวถึงคุณสมบัติของวัสดุโครงสร้างสามมิติของสารประกอบซิลิกาว่า วัสดุจะมีความแข็งแรงดัดขวาง (flexural strength) เพิ่มขึ้นเมื่อมีปริมาณเส้นใยซิลิกาเพิ่มขึ้น โดยเมื่อวัสดุมีปริมาณของเส้นใยซิลิกา 50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และผ่านกระบวนการทางความร้อน 700 องศาเซลเซียส จะทำให้วัสดุมีความแข็งแรงดัดขวางสูงสุดถึง 78 เมกะปาสคาล นอกจากนี้การเพิ่มสารลดแรงตึงผิวไซโคลเฮกซาโนน (cyclohexanone) ยังสามารถปรับปรุงคุณสมบัติการไหลซึมของสารประกอบและส่งผลให้ความหนาแน่นของวัสดุสารประกอบซิลิกาที่ได้มากขึ้นถึง 1.65 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร

จากคุณสมบัติเชิงกลที่ดีของสารประกอบซิลิกา ได้มีงานวิจัยจำนวนมากที่มีความสนใจศึกษาเกี่ยวกับการนำสารประกอบซิลิกามารวมเป็นองค์ประกอบเดียวกับวัสดุสารประกอบไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่มีรูพรุน เพื่อที่จะพัฒนาปรับปรุงคุณสมบัติด้านความแข็งแรงให้มากขึ้น ซึ่งรายงานวิจัยของ Porter และคณะ ในปี 2003 ได้ทำการเปรียบเทียบกระบวนการปรับปรุงวัสดุสารประกอบไฮดรอกซีอะพาไทต์ โดยใช้สารประกอบที่มีซิลิคอนผสมรวมเข้ากับสารประกอบเซรามิกไฮดรอกซีอะพาไทต์ในปริมาณ 0.8 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร พบว่าไอออนของซิลิกอนที่เพิ่มขึ้นมีความเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติการสนับสนุนกิจกรรมทางชีวภาพในระดับสัตว์ทดลองของวัสดุสารประกอบไฮดรอกซีอะพาไทต์ นอกจากนี้ในการศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพและคุณสมบัติการสนับสนุนกิจกรรมทางชีวภาพของวัสดุสารประกอบผสมระหว่างสารประกอบไฮดรอกซีอะพาไทต์กับสารประกอบซิลิกา (Hydroxyapatite/SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) ในเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์ พบว่า เมื่อมีปริมาณของสารประกอบซิลิกาประมาณ 5.0-20.0 เปอร์เซ็นต์ในโครงสร้างรูพรุนของวัสดุและบนผิวหน้าของวัสดุ วัสดุสารประกอบผสมที่มีสารประกอบซิลิกานี้จะมีคุณสมบัติทางสนับสนุนกิจกรรมทางชีวภาพต่าง ๆ ที่ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับวัสดุสารประกอบไฮดรอกซีอะพาไทต์ หรือวัสดุสารประกอบซิลิกาเพียงอย่างเดียว โดยพบว่าเซลล์สร้างกระดูกสามารถเกาะอยู่บนวัสดุได้อย่างดี สามารถแผ่ได้ดี และมีการเจริญเติบโต แบ่งตัวได้ดี นอกจากนี้ยังไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์

นอกจากการปรับปรุงคุณสมบัติของวัสดุโครงสร้างไฮดรอกซีอะพาไทต์ให้ดีขึ้น โดยการเจือสารประกอบชนิดอื่นแล้ว การปรับปรุงเกี่ยวกับลักษณะขนาด จำนวน หรือความหนาแน่นของรูพรุนเป็นอีกปัจจัยสำคัญในการพัฒนาวัสดุโครงสร้างที่เกี่ยวกับการรักษากระดูก โดยมีรายงานการศึกษาตั้งแต่ปี 1988 ซึ่งทำการทดสอบการฝังวัสดุโครงสร้างไฮดรอกซีอะพาไทต์และไตรแคลเซียมฟอสเฟตในเนื้อเยื่อกระดูกของส่วนที่เป็นกระดูกต้นขาและกระดูกเชิงของกระต่าย โดยวัสดุโครงสร้างเหล่านี้มีความพรุนประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์เหมือนกัน แต่มีขนาดรูพรุน 50-100 ไมครอน และ 200-400 ไมครอน พบว่าวัสดุโครงสร้างไตรแคลเซียมฟอสเฟตที่มีรูพรุนขนาด 50-100 ไมครอน มีการแทรกซึมของเซลล์กระดูกและเซลล์ไขกระดูกหลังจากฝังวัสดุไปแล้ว 4 เดือน (Egglı *et al.*, 1988) ต่อมา มีงานวิจัยที่ทำในสัตว์ทดลองโดยการนำเอาวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่มีรูพรุนขนาด 90 ไมครอน และมีความพรุน 70 เปอร์เซ็นต์ฝังลงในส่วนลามินา (Lamina) ของสุนัข พบว่าเมื่อระยะเวลาผ่านไป 6 เดือนพบว่ากระดูกสามารถสร้างขึ้นมาได้ใหม่ (Nagashima *et al.*, 1995) นอกจากนี้งานวิจัยของ Cerroni และคณะ (2002) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการเจริญเติบโตของเซลล์สร้างกระดูกที่เลี้ยงอยู่บนวัสดุสารประกอบเซรามิกไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่มีรูพรุนในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่า วัสดุสารประกอบไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่มีความพรุนทั้งหมดประมาณ 30-40 เปอร์เซ็นต์ และ 50-60 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ไม่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาที่

เป็นพิษต่อเซลล์ (Cerroni *et al.*, 2002) มีการศึกษาของผลกระทบบเซลล์สร้างกระดูกกับวัสดุรูพรุนไฮดรอกซีอะพาไทต์ผ่านกระบวนการอัดขึ้นรูป และตีให้เป็นแผ่นของสารประกอบไฮดรอกซีอะพาไทต์กับเส้นใยคาร์บอนที่มีความพรุน 48 ถึง 73 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดรูพรุนประมาณ 450 ไมครอน พบว่าเซลล์สามารถเจริญเติบโต และสังเคราะห์เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสได้เพิ่มมากขึ้น (Bae *et al.*, 2006) ต่อมางานวิจัยของ Yang และคณะ (2009) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการควบคุมขนาด และจำนวนรูพรุนของวัสดุสังเคราะห์เจลาตินอัลจิเนต (Gelatin-alginate) ด้วยกระบวนการ microwave vacuum drying และผลทางชีวภาพต่อเซลล์ไขกระดูก ซึ่งพบว่าเซลล์ไขกระดูกสามารถเจริญเติบโตได้ดีเมื่อเลี้ยงอยู่บนวัสดุเจลาตินอัลจิเนตทั้งนอกกายและในร่างกาย นอกจากนี้ในปี 2010 ยังมีการศึกษาถึงผลของขนาดของรูพรุน จำนวนรูพรุน และการเชื่อมต่อระหว่างรูพรุนต่อคุณสมบัติทางกายภาพและชีวภาพของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่เคลือบด้วยคอลลาเจน ซึ่งพบว่า รูปแบบของรูพรุนที่เหมาะสมที่สุดคือ ใน 1 รูพรุนมีเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 1000 ไมครอนและมีความพรุนประมาณ 27 เปอร์เซ็นต์ (Chan *et al.*, 2010)

จากการทบทวนวรรณกรรมข้างต้น แสดงให้เห็นว่า การนำวัสดุสารประกอบซิลิกาไปใช้ร่วมกับการสร้างวัสดุเซรามิกไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่มีรูพรุน เป็นแนวทางเลือกหนึ่งของกระบวนการวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกเพื่อนำไปใช้ในการรักษาซ่อมแซมกระดูก อย่างไรก็ตาม เนื่องจากยังไม่มีรายงานถึงปริมาณที่เหมาะสมของสารประกอบซิลิกาในวัสดุโครงสร้างสามมิติของสารประกอบไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกา รวมทั้งความหนาแน่นของรูพรุนที่เหมาะสม ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในการพัฒนาวัสดุสารประกอบไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาที่มีคุณสมบัติเชิงกลและมีคุณสมบัติทางชีวภาพที่ดี เพื่อให้สามารถนำไปประยุกต์ในการรักษาและเพิ่มความสำเร็จของการรักษาซ่อมแซมกระดูกต่อไปในอนาคต

### 1.3 วัตถุประสงค์

การศึกษานี้เป็นการศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพของวัสดุโครงร่างสารประกอบไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาที่มีโครงสร้างแบบเซรามิกชีวภาพต่อเซลล์สร้างกระดูกของมนุษย์ โดยมีวัตถุประสงค์ดังต่อไปนี้

1. ศึกษาผลของปริมาณสารประกอบซิลิกาต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยา การอยู่รอดของเซลล์ และการแปรสภาพของเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์ที่เลี้ยงอยู่บนวัสดุโครงร่างไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาในปริมาณต่างๆ
2. ศึกษาผลของความหนาแน่นของรูพรุนที่แตกต่างกันต่อการอยู่รอดของเซลล์ และการแปรสภาพของเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์ที่เลี้ยงอยู่บนวัสดุโครงร่างไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาในปริมาณต่างๆ

## บทที่ 2

### วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

#### 1. วัสดุ และอุปกรณ์

##### 1.1. สารเคมี

สารเคมี	บริษัทที่ผลิต
-Alpha-Modified Eagle's Medium	Life Technologies Corporation, IL, USA
-Fungizone (Amphotericin)	Life Technologies Corporation, IL, USA
-Penicillin-Streptomycin	Life Technologies Corporation, IL, USA
-Fetal bovine serum	Biochrom AG., Berlin, Germany
-Trypsin-EDTA	Life Technologies Corporation, IL, USA
-Crystal violet blue	Sigma-Aldrich Corporation, MO, USA
-CellTiter 96® AQueous MTS	Promega Corporation, WI, USA
-Magnesium chloride (MgCl <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt, Germany
-2-amino-2-methy-1-propanol (AMP)	Sigma-Aldrich Corporation, MO, USA
-4-nitrophenylphosphate (4NPP)	Sigma-Aldrich Corporation, MO, USA
-Sodium hydroxide (NaOH)	Finechem, Australia
-BCA protein assay	Thermo Fisher Scientific, IL, USA

## 1.2. อุปกรณ์และเครื่องมือ

ตู้ปลอดเชื้อระดับ 2	: Microflow Advanced Bio Safety Cabinet Class II, USA
ตู้เลี้ยงเซลล์ (Incubator)	: Heraeus รุ่น HERAcell 240, Germany
ตู้แช่เย็น 4 องศาเซลเซียส	: SHARP รุ่น SJ-D53M, Japan
ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส	: Domestic รุ่น UF 756, USA
ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส	: Puffer Hubbard, USA
เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)	: Savant รุ่น HSC 15R, USA
เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบปรับอุณหภูมิ	: Hettich zentrifugen รุ่น Mikro 22R, Germany
เครื่องเขย่าสาร (vortex)	: Vortex-Genie 2, USA
เครื่องอ่านจานหลุมแบบ 96 หลุม (microplate reader)	: Titertek Multiskan, Germany
จานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม	: Costar, Sigma-Aldrich Corporation, USA
จานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม	: Nunc, Thermo Fisher Scientific, USA
ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 ตารางเซนติเมตร	: Costar, Sigma-Aldrich Corporation, USA



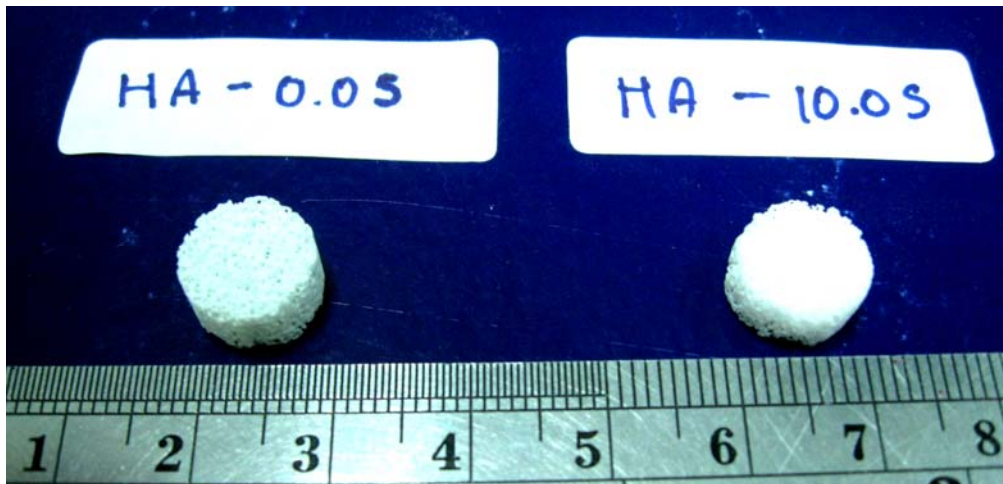
### 1.3. ชั้นตัวอย่างวัสดุเซรามิกชีวภาพ

วัสดุที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกา ซึ่งเป็นวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่มีสารประกอบซิลิกาในปริมาณต่างๆ กัน มีทั้งหมด 6 กลุ่ม คือ 0, 0.5, 1.0, 3.0, 5.0 และ 10.0—เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยวัสดุในแต่ละกลุ่มจะมีความหนาแน่นของรูพรุนในโครงร่างของวัสดุ 3 กลุ่ม คือ 45, 60 และ 75 ppi

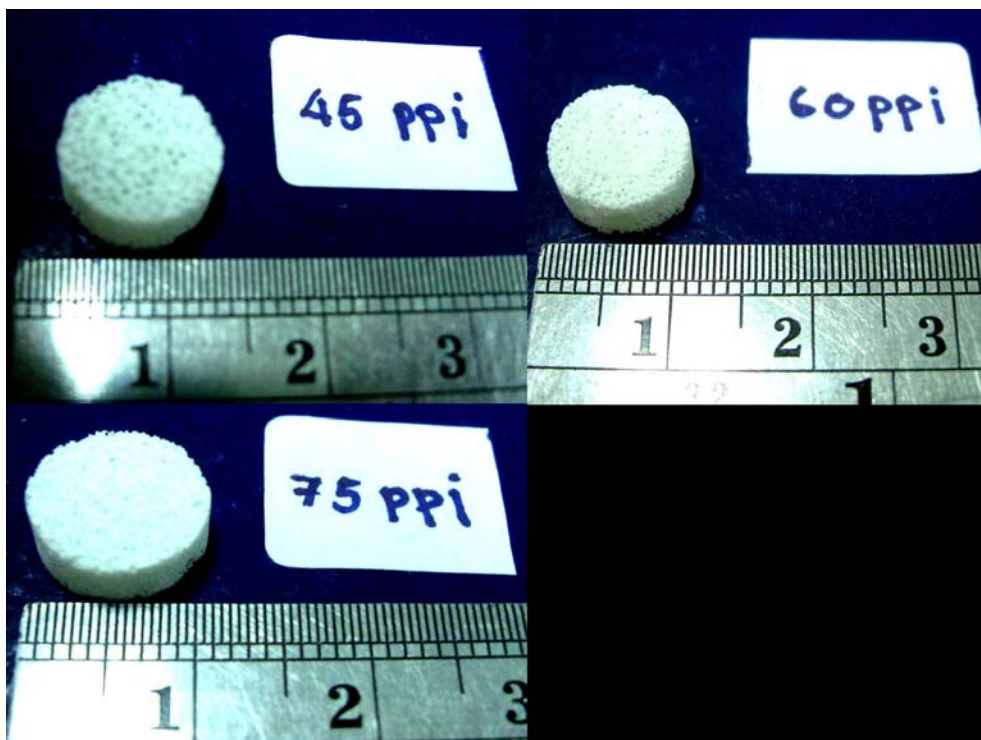
สำหรับลักษณะของชั้นตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษามีลักษณะเป็นแผ่นทรงกลมที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 มิลลิเมตร และมีความหนา 5 มิลลิเมตร มีรูพรุนทั้งพื้นผิวภายนอกและภายใน ในการสร้างชั้นตัวอย่าง ใช้การขึ้นรูปด้วยวิธีการลอกแบบ (replication method) โดยกระบวนการ Polymeric Foam ซึ่งมีโครงร่างต้นแบบ (Template) ของวัสดุ เป็น Polyurethane (PU) Foam ที่มีความแตกต่างของรูพรุน 3 แบบ คือ 45, 60 และ 75 ppi สำหรับการสร้างรูพรุนขนาดต่าง ๆ กัน เพื่อให้เกิดการเจริญเติบโตของเซลล์ภายในโครงร่างของวัสดุ จากนั้นเตรียมละลายผงสารประกอบไฮดรอกซีอะพาไทต์ และสารประกอบซิลิกอนไดออกไซด์ ( $\text{SiO}_2$ ) ในปริมาณ 0.5, 1.0, 3.0, 5.0 และ 10.0 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ให้ไหลเคลือบพื้นผิวทั่วตัววัสดุโครงร่างต้นแบบ ต่อจากนั้นทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในตู้อบความร้อนไฟฟ้าแบบแห้ง (Electric Oven) จากนั้นนำชั้นวัสดุเข้าไปเผาด้วยตู้เตาหลอมไฟฟ้า (Electric Furnace) ที่อุณหภูมิ 1,300 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำไปทำให้เย็น สำหรับการสร้างชั้นตัวอย่างเพื่อใช้ในการศึกษานี้ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์เทคโนโลยีโลหะ และวัสดุแห่งชาติ สำนักงานวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ดังแสดงในรูปที่ 9 และ 10

ตารางที่ 1 แสดงสัญลักษณ์แทนปริมาณเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของสารประกอบซิลิกาที่ผสมอยู่ในวัสดุชั้นตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

สัญลักษณ์	ปริมาณเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ของสารประกอบซิลิกา
HA-0.0s	0.0
HA-0.5s	0.5
HA-1.0s	1.0
HA-3.0s	3.0
HA-5.0s	5.0
HA-10.0s	10.0



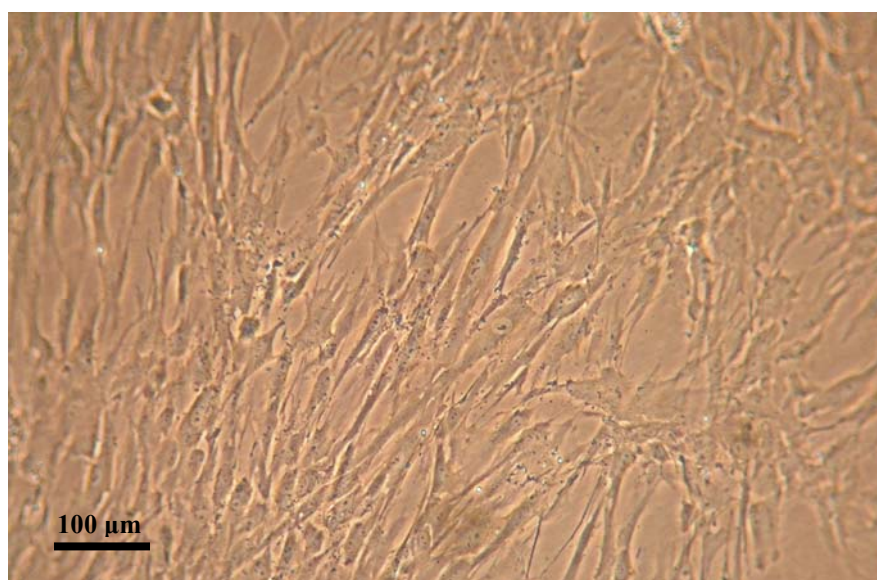
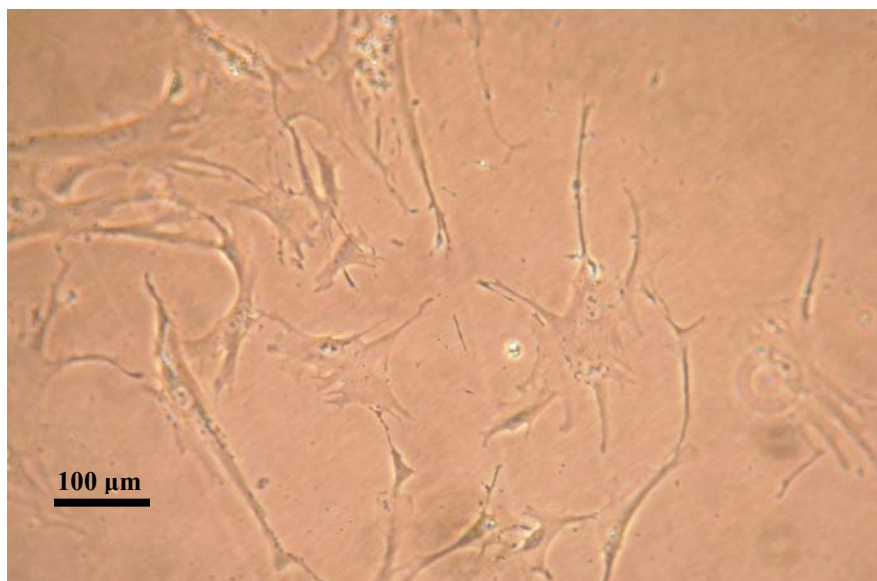
รูปที่ 9 แสดงภาพของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ไม่เจือด้วยซิลิกา (HA-0.05) เปรียบเทียบกับวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่เจือด้วยซิลิกาในปริมาณสูง (HA-10.05)



รูปที่ 10 แสดงภาพของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาที่มีความหนาแน่นของรูพรุนที่แตกต่างกัน (45 ppi, 60 ppi, และ 75 ppi)

#### 1.4. เซลล์ที่ใช้ในการศึกษา

เซลล์ที่ใช้ในการศึกษาเป็นเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์ (Normal human osteoblast หรือ NHOst) จากบริษัท Lonza Group Ltd., Switzerland โดยเป็นเซลล์ที่นำมาจากส่วนกระดูกแข้ง (tibia) ซึ่งมีลักษณะรูปร่างของเซลล์ ดังแสดงในรูปที่ 11



รูปที่ 11 แสดงเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์ หรือ NHOst ที่เพาะเลี้ยงในงานเพาะเลี้ยงเซลล์จากการถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบเฟสคอนทราสต์ (Phase contrast microscope) ที่กำลังขยาย 40 และ 100 เท่า (แถบมาตราส่วน (scale bar) เท่ากับ 100 ไมโครเมตร)

## 2. วิธีการทำการทดลอง

### 2.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 75 ตารางมิลลิเมตร ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Alpha-Modified Eagle's Medium ( $\alpha$ -MEM), Fetal Bovine Serum 20 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร, ยาปฏิชีวนะเพนนิซิลลิน (Penicillin) 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร, สเตรปโตมัยซิน (Streptomycin) 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และยาต้านเชื้อรา (Fungizone) 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้บ่มเพาะเลี้ยงที่มีความชื้นในบรรยากาศและมีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ( $\text{CO}_2$ ) 5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ ทุก 2-3 วัน จนกระทั่งมีปริมาณของเซลล์ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ จากนั้นทำการแยกเซลล์โดยใช้เอนไซม์ทริปซิน-อีดีทีเอ (Trypsin-EDTA) ที่มีความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และทำการเพาะเลี้ยงเซลล์รุ่นถัดไปในขวดเพาะเลี้ยงใหม่ เพื่อเพิ่มปริมาณของเซลล์ โดยในการศึกษานี้จะใช้เซลล์ในรุ่นที่ (Passage) 3-7 ในการเพาะเลี้ยงในชิ้นตัวอย่างเพื่อศึกษาต่อไป

### 2.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์บนวัสดุสารประกอบไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกา

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์ด้วยการนำชิ้นตัวอย่างไปแช่ในจานหลุมเพาะเลี้ยงที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกและปล่อยให้แห้งประมาณ 5 นาที ทำการแยกเซลล์ที่เลี้ยงไว้ในขวดเพาะเลี้ยงด้วยเอนไซม์ทริปซิน-อีดีทีเอ ที่มีความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร หลังจากนั้นนำไปปั่นหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายออกและเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ ทำการนับจำนวนเซลล์โดยใช้ฮีโมไซโตมิเตอร์ (hemocytometer) จากนั้นหว่านเซลล์จำนวน 10,000 เซลล์ ลงไปบนชิ้นตัวอย่าง ที่แห้งประมาณ 5 นาที ก่อนเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงในหลุมเลี้ยงเซลล์ซึ่งอยู่ในจานหลุมเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้บ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีความชื้นและมีปริมาณ คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ในบรรยากาศ

### 2.3. การศึกษารูปร่างและลักษณะของเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์ที่เกาะอยู่บนวัสดุสารประกอบไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกา

#### 2.3.1 การศึกษารูปร่างและลักษณะของเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (Stereomicroscopy)

หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเซลล์บนชิ้นตัวอย่างเป็นระยะเวลา 4 วัน ทำการคงสภาพเซลล์โดย ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก จากนั้นนำมาล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน (phosphate buffer saline solution) 2-3 ครั้ง ทำการเติมสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) ที่มีความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่มีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ 16-18 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลายออก แล้วล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer solution) และแช่ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที ก่อนทำการดูดออก ทำการล้างซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นนำมาย้อมด้วยสีคริสตัลไวโอเลตบลู (crystal violet blue) ที่มีความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ทิ้งไว้ประมาณ 20 นาที หลังจากนั้นทำการล้างสีย้อมออกด้วยน้ำกลั่น ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาประมาณ 30 นาที จากนั้นนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ ที่กำลังขยาย 40 และ 100 เท่า

#### 2.3.2 การศึกษารูปร่าง และลักษณะของเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscopy)

ทำการศึกษารูปร่างและลักษณะของเซลล์ในลักษณะแบบส่องกราดไปบนพื้นผิว โดยนำชิ้นตัวอย่างที่ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 4 วัน มาทำการล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน 2-3 ครั้ง จากนั้นนำมาคงสภาพด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่มีความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่มีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ 16-18 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลายออก แล้วล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และแช่ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที ก่อนทำการดูดออก ทำการล้างซ้ำ 3 ครั้ง ทำการกำจัดน้ำออก (dehydration) ด้วยสารละลายเอธานอล โดยเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที ทำซ้ำทั้งหมด 2 ครั้ง จากนั้นเพิ่มความเข้มข้นเป็น 60, 70, 80, 90 และ 100 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยในแต่ละขั้นตอนใช้เวลา 10 นาที และทำซ้ำทั้งหมด 2 ครั้ง ต่อจากนั้นนำชิ้นตัวอย่างมาแช่ในสารละลายเฮกซะเมธิลไดไซลาเซน (hexamethyldisilazane) ที่มีความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลาประมาณ 10 นาที ทิ้งไว้ในตู้ดูดควันที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำมาติดกับ

แท่นวางตัวอย่าง (stub) เพื่อนำไปเคลือบด้วยทองคำและนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบบส่องกราด ที่กำลังขยาย 300 – 1500 เท่า

## 2.4 การวัดความเป็นพิษต่อเซลล์ (cell cytotoxicity) ด้วยวิธีเอ็มทีเอส (MTS assay)

ทำการวัดการอยู่รอดของเซลล์ และความเป็นพิษของวัสดุที่ทำการทดสอบต่อเซลล์ โดยการวัดการทำงานของเอนไซม์ไมโทคอนเดรียดีไฮโดรจีเนส (mitochondrial dehydrogenase) ซึ่งสามารถเปลี่ยนสารละลายเมทิลเตตระซอลซัลเฟต (Methyl Tetrazol Sulfate หรือ MTS) ซึ่งมีสูตรสารเคมี คือ (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl-2H) -tetrazolium) ให้เป็นสารละลายฟอร์มาซาน (formazan) ซึ่งสามารถบ่งชี้ถึงปริมาณของเซลล์ที่มีชีวิต โดยหลังจากทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 4 วัน ทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก จากนั้นทำการล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ซาไลน์ 3 ครั้ง เตรียมสารละลายที่ประกอบด้วยเมทิลเตตระซอลซัลเฟต ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และฟีนาซีนเมธอสัลเฟต (Phenazine Methosulfate) ความเข้มข้น 0.92 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากชุดตรวจสำเร็จรูป CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous MTS kit จากนั้นใส่สารละลายที่ได้ลงในชิ้นตัวอย่างที่มีเซลล์อยู่ และนำเข้าไปบ่มในตู้บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะบรรยากาศที่มีความชื้นและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านจานหลุมแบบ 96 หลุม และนำไปคำนวณแสดงเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์ข้อมูลด้วยกระบวนการคำนวณทางสถิติ

## 2.5 การวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส

ทำการวัดการแปรสภาพของเซลล์โดยทำการวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส โดยทำการศึกษาเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนชิ้นตัวอย่างในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนผสมของกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร เป็นเวลา 14 วัน เมื่อครบกำหนดทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก จากนั้นล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ 2 ครั้ง ทำการบดชิ้นตัวอย่างเป็นชิ้นขนาดเล็กและเติมไลซิสบัฟเฟอร์ (lysis buffer) ลงไป เพื่อให้เซลล์แตก นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที และเขย่าเป็นระยะ จากนั้นดูดสารละลายใส่ในหลอดสำหรับปั่นเหวี่ยง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 10-15 วินาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นทำการแบ่งสารละลายที่ได้ เพื่อนำไปวัด

ปริมาณโปรตีนและวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ซึ่งในการวิเคราะห์โปรตีนใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป BCA protein assay เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในแต่ละตัวอย่าง สำหรับการวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ทำโดยเตรียมสารละลายที่ประกอบด้วย เอเอ็มพี (AMP หรือ 2-Amino-2-Methyl-1-Propanol) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่มีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 10.5 และแมกนีเซียมคลอไรด์ ( $MgCl_2$ ) ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ทำการใส่สารละลายตัวอย่างลงในจานหลุมแบบ 96 หลุม เติมสารละลายเอเอ็มพี/แมกนีเซียมคลอไรด์ (AMP/ $MgCl_2$ ) และสารละลายไนโตรฟีนิลฟอสเฟต (4-nitrophenyl phosphate หรือ 4NPP) ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปรมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 30 นาที ก่อนทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จากนั้นนำไปอ่านด้วยเครื่องเครื่องอ่านจานหลุมแบบ 96 หลุมที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร และนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของเซลล์สร้างกระดูก หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์ข้อมูลด้วยกระบวนการคำนวณทางสถิติ

## 2.6 การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยกระบวนการคำนวณทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้จากการวัดความเป็นพิษที่มีต่อเซลล์และการวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส มาทำการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรมทางสถิติสำเร็จรูป โดยทำการคำนวณการกระจายของข้อมูล (Normality test) ด้วยวิธีการคำนวณแบบแชพฟีโรวิลค์ (Shapiro-Wilk test) จากนั้นทำการเปรียบเทียบความแตกต่างเชิงปริมาณระหว่างกลุ่มโดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติแบบการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางแบบสองทาง (Two-way ANOVA) หรือแบบสามทาง (Three-way ANOVA) และการทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบจับคู่พหุคูณ (multiple comparison) แบบทูกีย์ (Tukey's) และเชฟเฟ (Scheffe) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในแต่ละกลุ่มเท่ากับ 4-5 และการทดลองมีการทำซ้ำ)



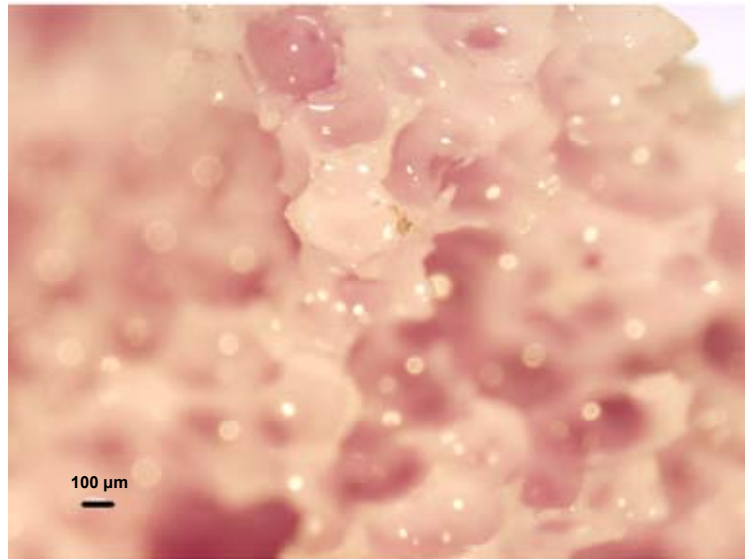
### บทที่ 3

#### ผลการทดลอง

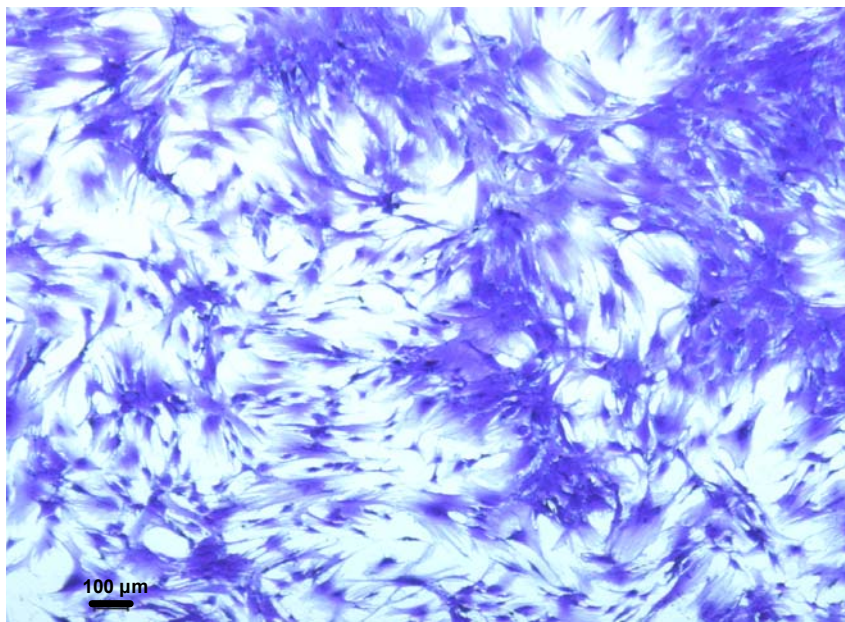
#### 1. รูปร่างและลักษณะของเซลล์สร้างกระดูก เมื่ออยู่ภายในวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์ เจือด้วยซิลิกา

##### 1.1 รูปร่างและลักษณะของเซลล์สร้างกระดูกที่เกาะอยู่ภายในโครงร่างมิติของ วัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกา จากการย้อมด้วยสียคริสตัลไวโอเลตบลู

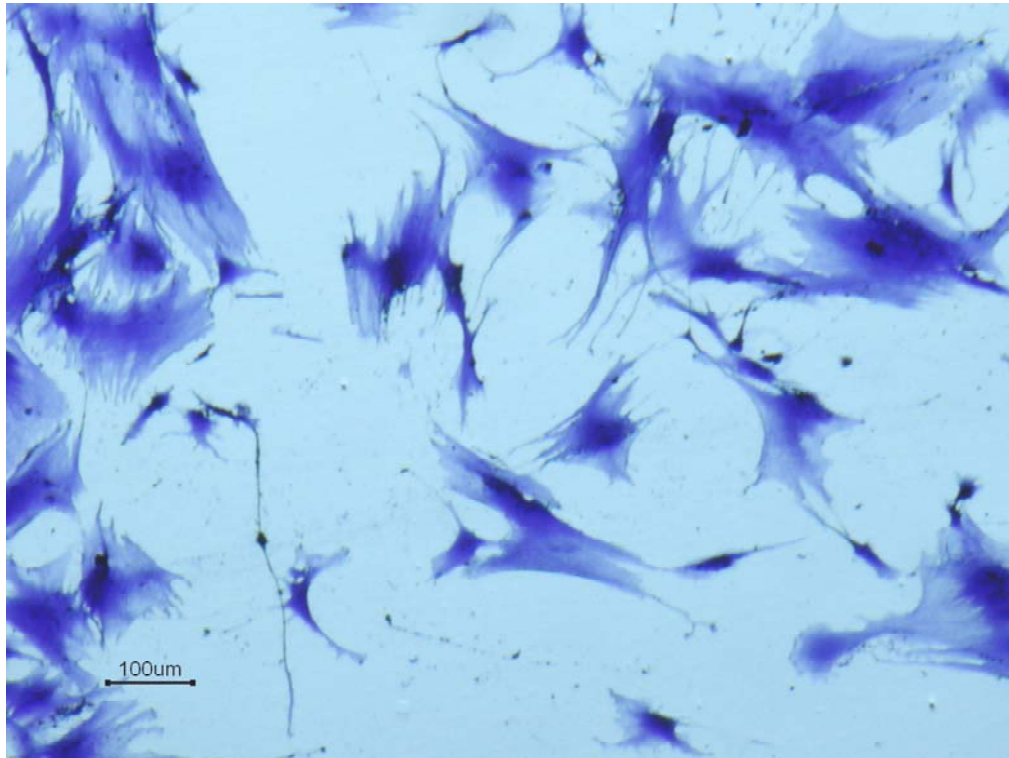
หลังจากที่เลี้ยงเซลล์สร้างกระดูกในวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาใน ปริมาณต่างๆ กัน เป็นเวลาทั้งหมด 4 วัน นำมาทำการคงสภาพเซลล์ และย้อมสีด้วยสียคริสตัลไว โอเลตบลู จากนั้นทำการศึกษารูปร่างและลักษณะของเซลล์สร้างกระดูกด้วยกล้องจุลทรรศน์ แบบสเตอริโอ โดยเซลล์จะเกิดจากการติดสีน้ำเงินบริเวณที่เป็นเยื่อหุ้มเซลล์ส่วนที่เป็นโปรตีน ทำให้สามารถมองเห็นรูปร่างและลักษณะของเซลล์บนวัสดุได้อย่างชัดเจน โดยวัสดุโครงร่างที่ ไม่ได้มีการเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูก จะมีลักษณะรูพรุนอย่างชัดเจน ดังที่แสดงในรูปที่ 12 สำหรับ เซลล์สร้างกระดูกที่เลี้ยงในจานเพาะเลี้ยง เซลล์มีลักษณะรูปร่างแบน มีรูปทรงที่ไม่แน่นอน มี ส่วนที่ยื่นยาวออกแผ่ออกตามทิศทางต่างๆ บนพื้นผิวของจานเพาะเลี้ยงเซลล์ นอกจากนี้ยังพบ การซ้อนทับกัน ดังที่แสดงในรูปที่ 13 และ 14



รูปที่ 12 ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอที่กำลังขยาย 40 เท่า แสดงลักษณะของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาที่ไม่มีการเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูก (แถบมาตราส่วน (scale bar) เท่ากับ 100 ไมโครเมตร)

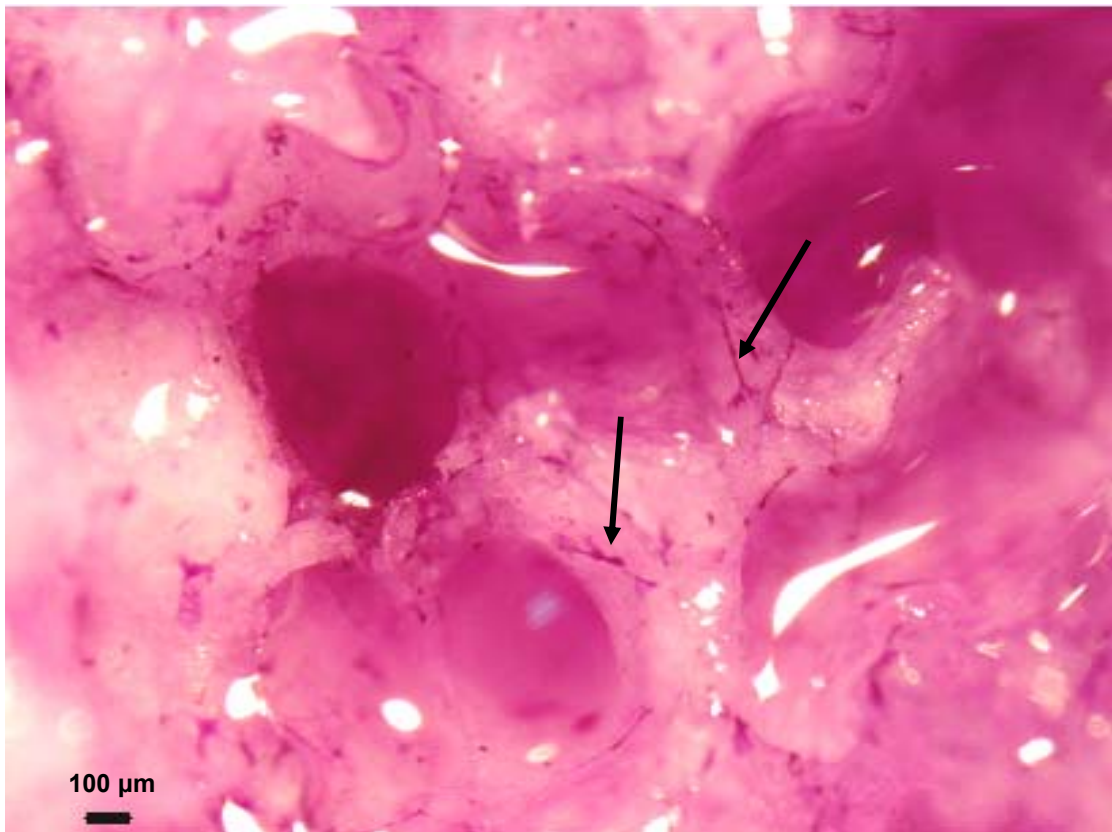


รูปที่ 13 ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอที่กำลังขยาย 40 เท่า แสดงรูปร่างและลักษณะเซลล์สร้างกระดูกที่เลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ หลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 วัน และย้อมด้วยสียคริสตัลไวโอเลตบลู (แถบมาตราส่วน เท่ากับ 100 ไมโครเมตร)

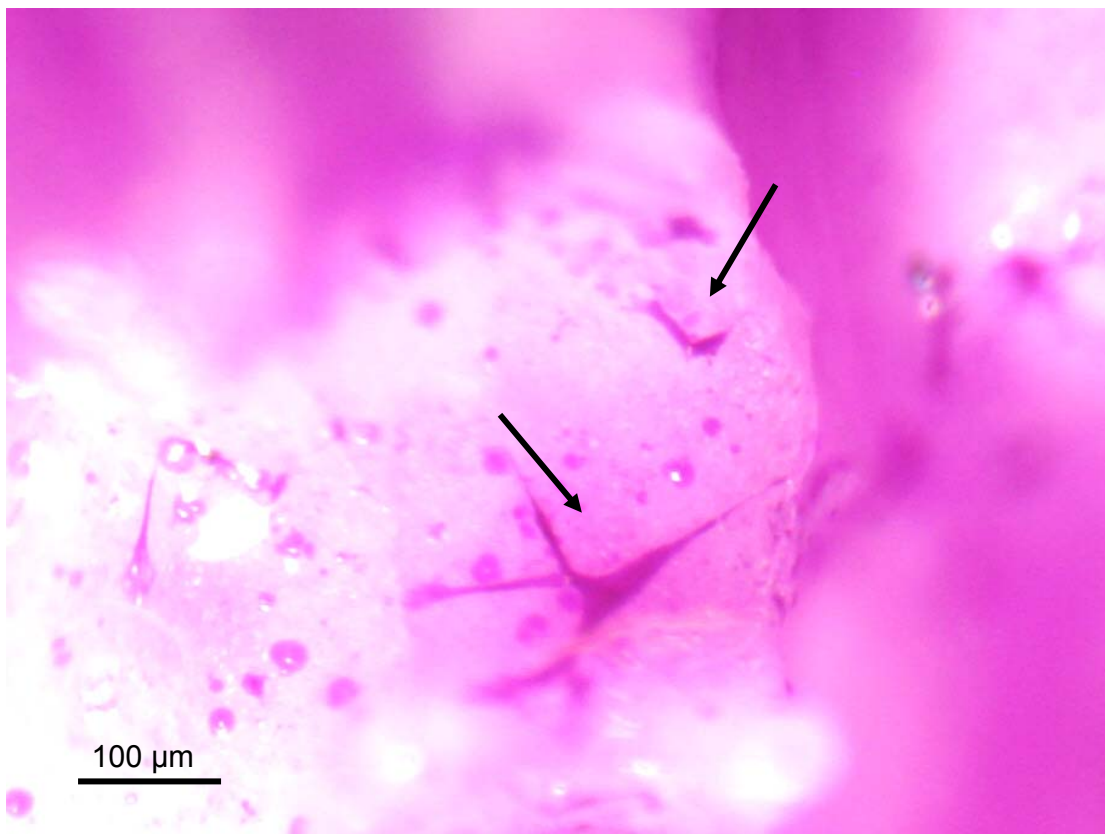


รูปที่ 14 ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอที่กำลังขยาย 100 เท่า แสดงรูปร่างและลักษณะเซลล์สร้างกระดูกที่เลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ หลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 วัน และย้อมด้วยสียคริสตัลไวโอเลตบลู (แถบมาตราส่วน เท่ากับ 100 ไมโครเมตร)

หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูกเป็นเวลา 4 วันในวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกา และศึกษารูปร่างและลักษณะของเซลล์สร้างกระดูกที่เกาะอยู่บนวัสดุด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ ที่กำลังขยาย 40 เท่า พบว่า เซลล์มีลักษณะกระจายตัวเป็นเส้นๆ เป็นสีม่วงแดงที่อยู่บนวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกา โดยสามารถสังเกตเห็นบริเวณที่เซลล์สร้างกระดูกสามารถเกาะได้ ทั้งในบริเวณรอบพื้นที่รูพรุนและตามพื้นผิวภายในของรูพรุน ดังที่แสดงในรูปที่ 15 และเมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ ที่กำลังขยาย 100 เท่า พบลักษณะของเซลล์สร้างกระดูกที่เกาะอยู่บนวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกา มีรูปร่างและลักษณะที่คล้ายคลึงกับเซลล์สร้างกระดูกที่เลี้ยงอยู่บนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ ดังที่แสดงในรูปที่

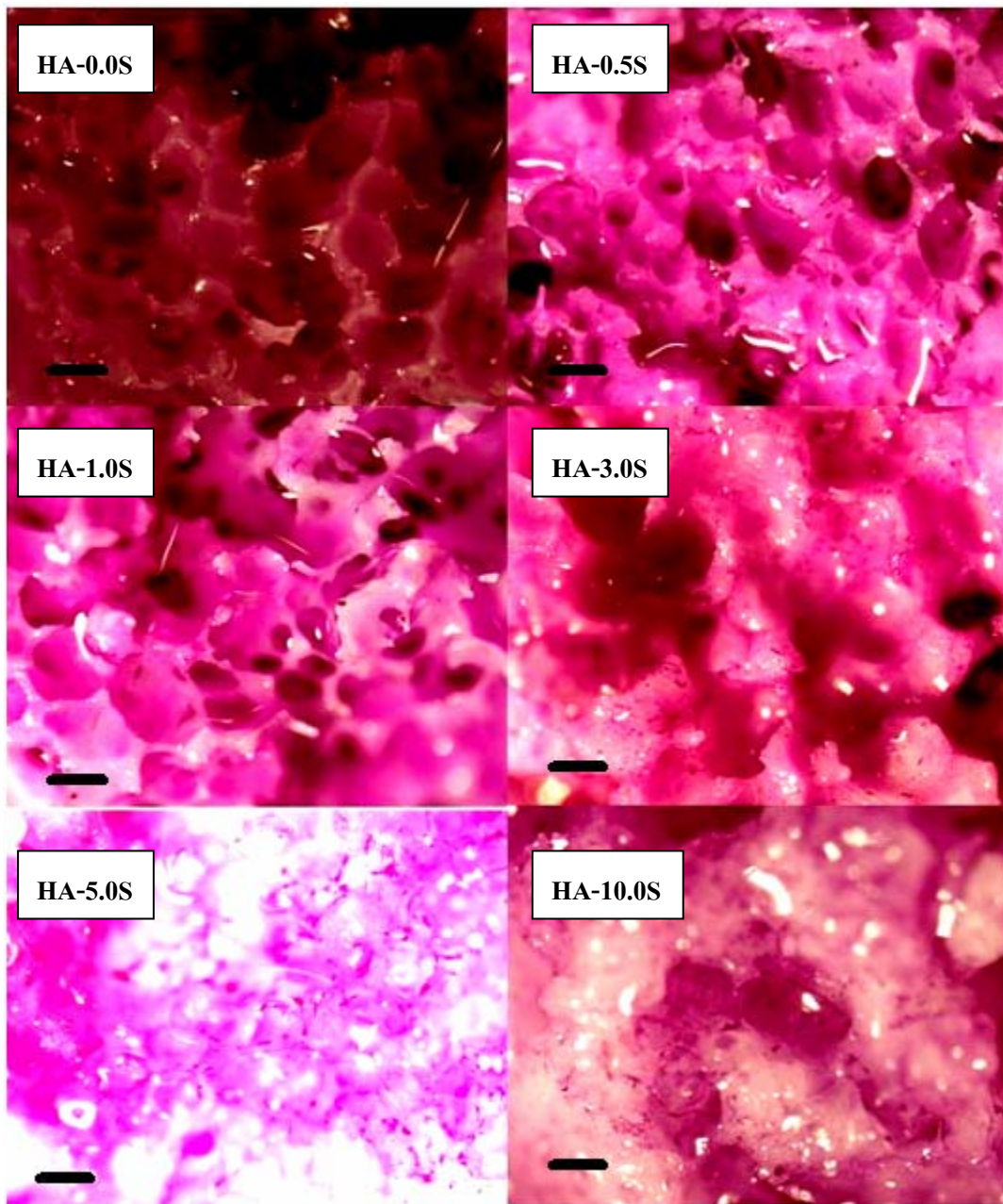


รูปที่ 15 ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอที่กำลังขยาย 40 เท่า แสดงรูปร่างและลักษณะเซลล์สร้างกระดูกที่เลี้ยงลงในวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักและมีความหนาแน่นของรูพรุนเท่ากับ 45 ppi หลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วันและย้อมด้วยสีคริสตัลไวโอเลตบลู (แถบมาตราส่วน เท่ากับ 100 ไมโครเมตร ส่วนลูกศรสีดำ แสดงเซลล์ที่เกาะบริเวณรอบพื้นที่รูพรุน)



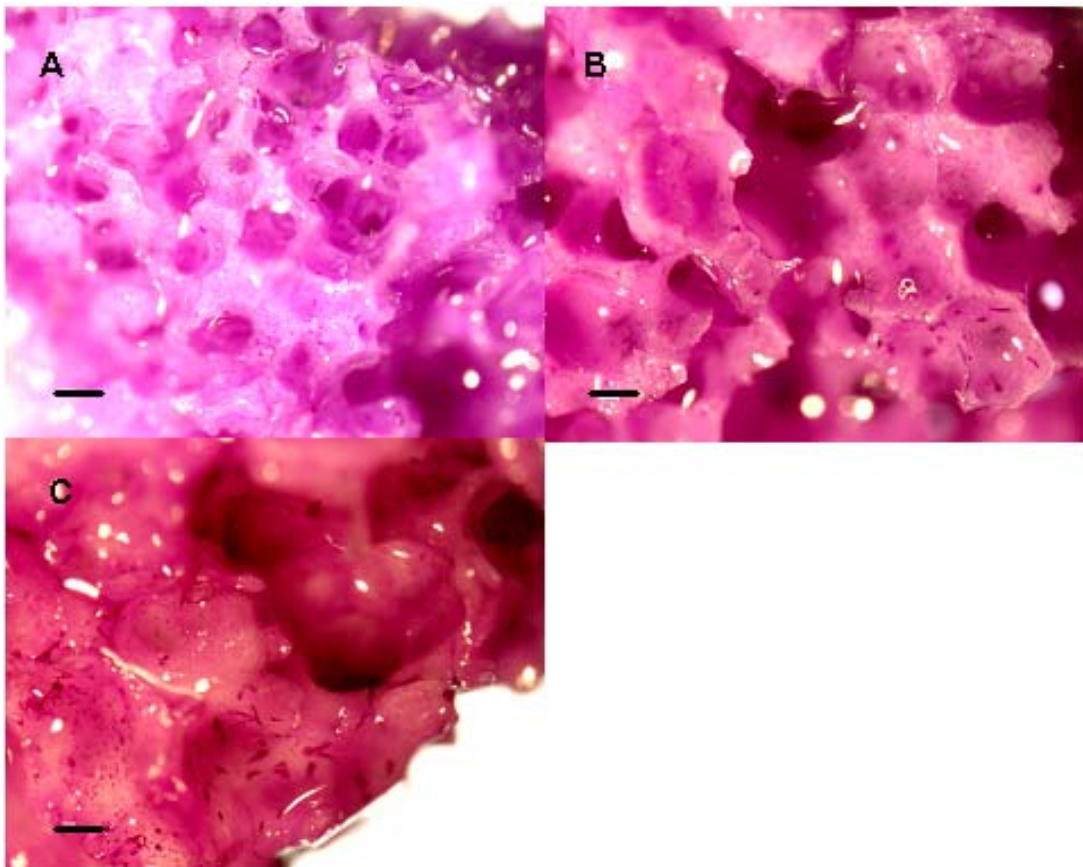
รูปที่ 16 ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอที่กำลังขยาย 100 เท่า แสดงรูปร่างและลักษณะเซลล์สร้างกระดูกที่เลี้ยงลงในวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่เจือด้วยซิลิกาปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และมีความหนาแน่นของรูพรุนเท่ากับ 60 ppi หลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วันและย้อมด้วยสียคริสตัลไวโอเลตบลู (แถบมาตราส่วน เท่ากับ 100 ไมโครเมตร ส่วนลูกศรสีดำ แสดงเซลล์ที่เกาะบริเวณรอบพื้นที่รูพรุน)

หลังจากที่เลี้ยงเซลล์สร้างกระดูกในวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาที่มีปริมาณของสารประกอบซิลิกาและไฮดรอกซีอะพาไทต์ในปริมาณสัดส่วนเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 4 วัน และนำมาย้อมด้วยสียคริสตัลไวโอเลตบลู เพื่อศึกษารูปร่างและลักษณะของเซลล์สร้างกระดูก และดูความหนาแน่นของปริมาณเซลล์ ดังแสดงในรูปที่ 17 จะสามารถสังเกตเห็นถึงความหนาแน่นของเซลล์สร้างกระดูกที่แตกต่างกันในวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาที่มีปริมาณสารประกอบซิลิกาต่างกัน โดยในวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่มีปริมาณสารประกอบซิลิกา 3, 5, และ 10 เปอร์เซ็นต์จะมีความหนาแน่นของเซลล์สร้างกระดูกที่มากกว่าวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่มีปริมาณสารประกอบซิลิกา 0, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 17 ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอที่กำลังขยาย 40 เท่า แสดงความหนาแน่นของเซลล์สร้างกระดูกที่เลี้ยงอยู่ในวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาในปริมาณต่าง ๆ กัน และมีความหนาแน่นของรูพรุนเท่ากับ 75 ppi หลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน และย้อมด้วยสียครีستัลไวโอเลตบลู (แถบมาตราส่วน เท่ากับ 200 ไมโครเมตร)

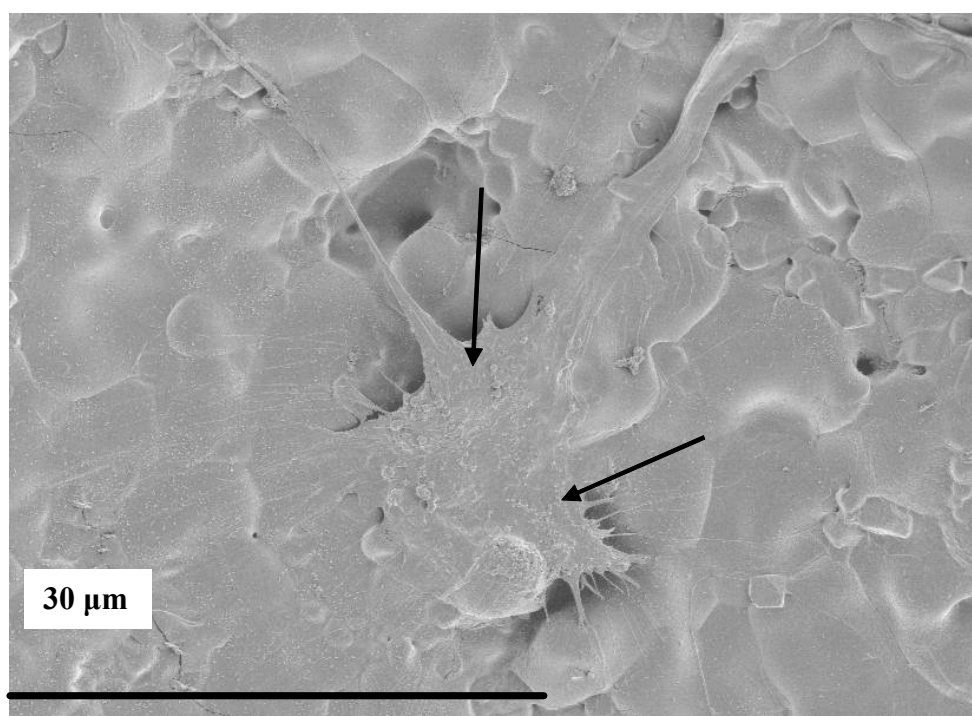
จากการศึกษารูปร่างและลักษณะของเซลล์สร้างกระดูก ปริมาณความหนาแน่นของจำนวนเซลล์สร้างกระดูกที่เลี้ยงในวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาที่มีปริมาณของสารประกอบซิลิกาและไฮดรอกซีอะพาไทต์ในปริมาณสัดส่วนเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักที่เท่ากันแต่มีความหนาแน่นของรูพรุนแตกต่างกัน จะสามารถสังเกตเห็นถึงความหนาแน่นของเซลล์สร้างกระดูกที่แตกต่างกันในวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาที่มีปริมาณสารประกอบซิลิกาปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก โดยในวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาที่มีความหนาแน่นของรูพรุน 45 ppi จะมีความหนาแน่นของเซลล์สร้างกระดูกที่มากกว่าวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่มีความหนาแน่นของรูพรุน 60 ppi และ 75 ppi และวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาที่มีความหนาแน่นของรูพรุน 60 ppi จะมีความหนาแน่นของเซลล์สร้างกระดูกที่มากกว่าวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่มีความหนาแน่นของรูพรุน 70 ppi ดังแสดงในรูปที่ 18



รูปที่ 18 ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอที่กำลังขยาย 40 เท่า แสดงความหนาแน่นของเซลล์สร้างกระดูกที่เลี้ยงอยู่ในวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาในปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และมีความหนาแน่นของรูพรุนแตกต่างกัน (A= 75 ppi, B= 60 ppi, C= 45 ppi) หลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน และย้อมด้วยสีคริสตัลไวโอเลตบลู (แถบมาตราส่วน เท่ากับ 200 ไมโครเมตร)

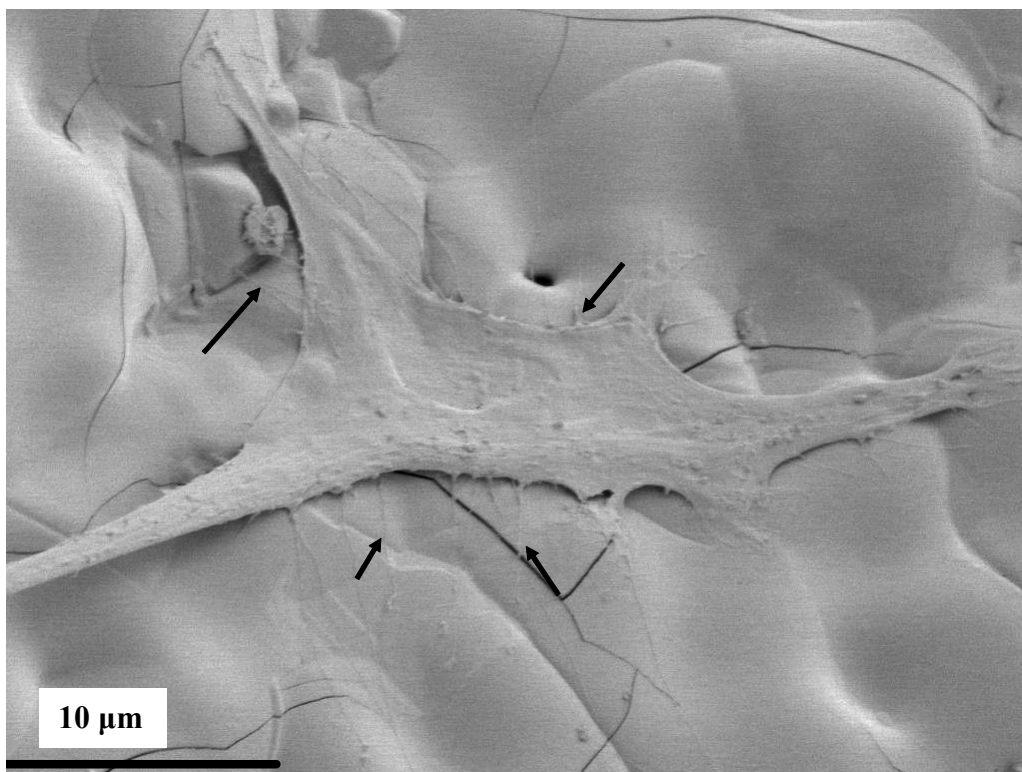
## 1.2 รูปร่างและลักษณะของเซลล์สร้างกระดูกที่เกาะอยู่ภายในโครงร่างสามมิติ ของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกา จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscopy หรือ SEM)

หลังจากทำการเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูกในวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกา เป็นเวลา 4 วันแล้ว นำมาทำการคงสภาพตัวเซลล์ ดึงน้ำออกจากตัวเซลล์ เคลือบด้วยทองคำ และนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่า ลักษณะของเซลล์สร้างกระดูกที่เกาะติดอยู่กับพื้นผิวของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกามีลักษณะแบน (flattting) มีการแผ่ขยายของเซลล์ออกไปในทุกทิศทางรอบๆ ตัวเซลล์ นอกจากนี้ยังสามารถสังเกตเห็นส่วนยื่นของเซลล์ที่เรียกว่า ลามेलลิโพเดีย (lamellipodia) และฟีโลโพเดีย (filopodia) ที่ยื่นยาวออกไป ดังแสดงในรูปที่ 19 และ 20



รูปที่ 19 ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงลักษณะของเซลล์สร้างกระดูกที่อยู่บนพื้นผิวของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกา 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และมีความหนาแน่นของรูพรุนเท่ากับ 60 ppi หลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน (แถบมาตราส่วน เท่ากับ 30 ไมโครเมตร ส่วนลูกศรสีดำ แสดงส่วนที่เป็นส่วนยื่นของเซลล์ที่เรียกว่า ลามेलลิโพเดีย)

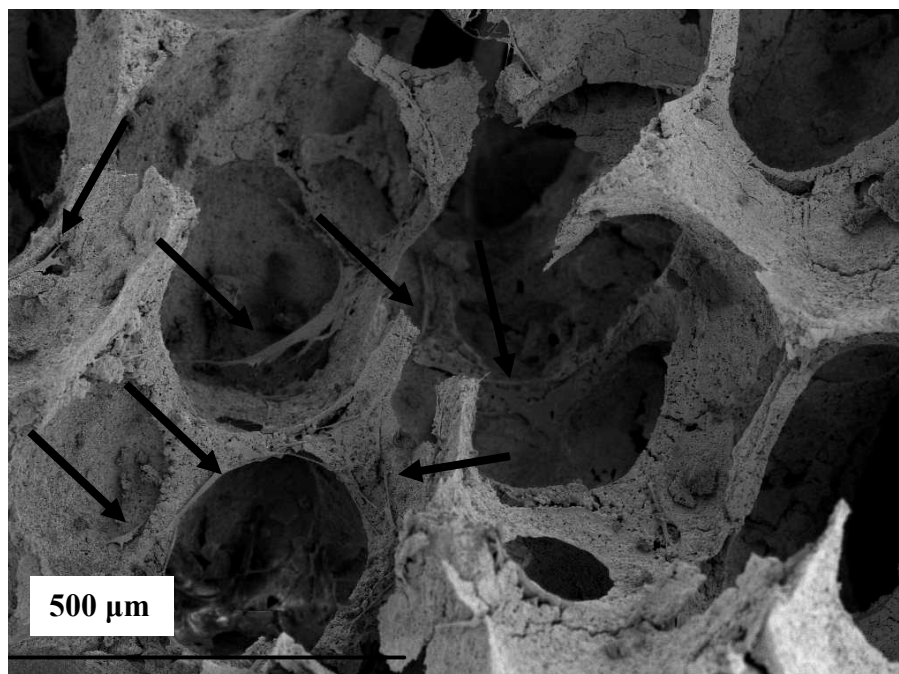
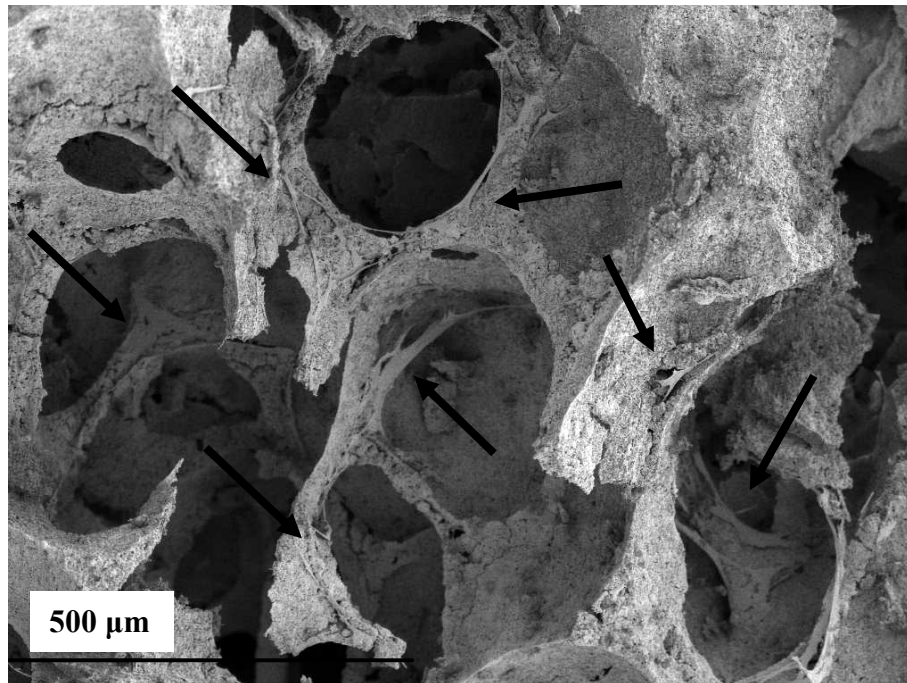




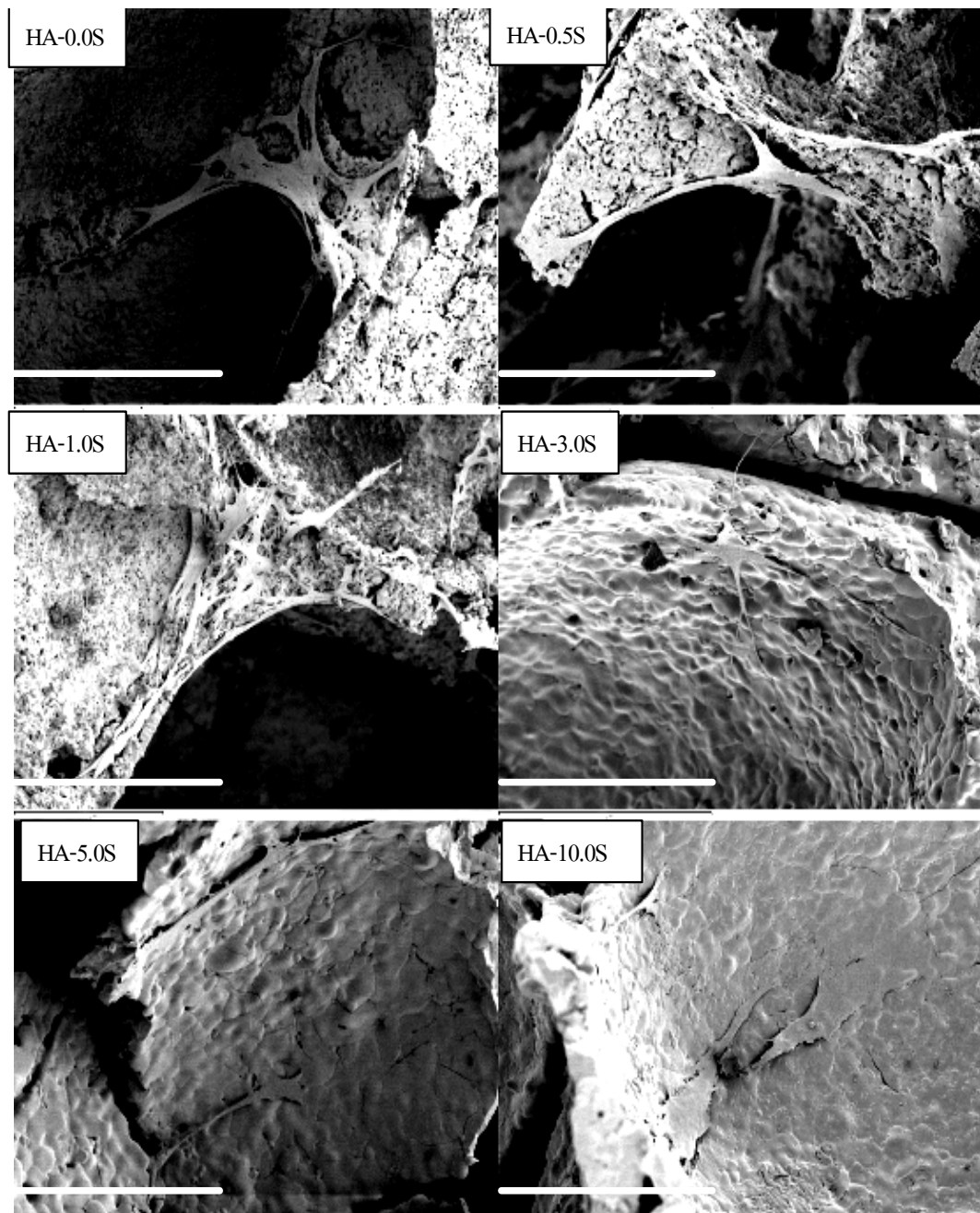
รูปที่ 20 ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงลักษณะของเซลล์สร้างกระดูกที่อยู่บนพื้นผิวของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกา 5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และมีความหนาแน่นของรูพรุนเท่ากับ 75 ppi หลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน (แถบมาตราส่วน เท่ากับ 10 ไมโครเมตร ส่วนลูกศรสีดำ แสดงส่วนที่เป็นส่วนยื่นของเซลล์ที่เรียกว่า ฟิโลโพเดียม)

จากการศึกษาลักษณะของเซลล์สร้างกระดูกภายในรูพรุนของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่า มีเซลล์สร้างกระดูกเกาะอยู่ทั่วภายในรูพรุนของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกา ดังแสดงในรูปที่ 21 โดยพบเซลล์สร้างกระดูกเกาะอยู่ตามผนังด้านข้างภายในรูพรุน บริเวณพื้นที่รูพรุน หรือพื้นผิวด้านล่างของรูพรุน นอกจากนี้ยังพบว่า พื้นผิวของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาที่เซลล์สร้างกระดูกยึดเกาะนั้น มีความแตกต่างกันในแต่ละกลุ่มการทดลอง โดยในกลุ่มของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาที่มีส่วนผสมของสารประกอบซิลิกาในปริมาณเปอร์เซ็นต์ที่สูง (3, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์) จะมีลักษณะพื้นผิวที่หยาบกว่า มีรอยคลื่นที่ไม่สม่ำเสมอเกิดขึ้นมากกว่า โดยรอยหยาบที่เกิดขึ้นจะใหญ่ และขรุขระกว่าในกลุ่มของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิ

ภาพที่มีส่วนผสมของสารประกอบซิลิกาในปริมาณเปอร์เซ็นต์ที่น้อยกว่า (0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์) หรือไม่มีเลย ดังแสดงในรูปที่ 22

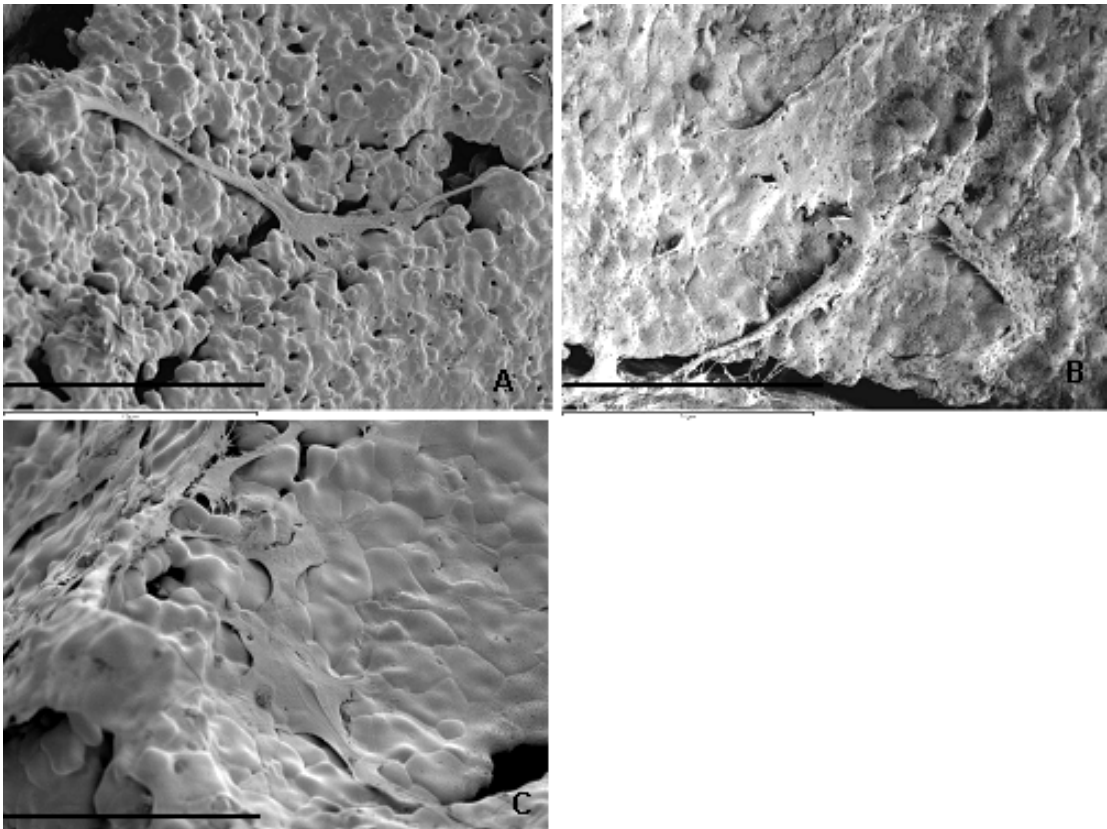


รูปที่ 21 ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงลักษณะของเซลล์สร้างกระดูกที่อยู่ภายในรูพรุนของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกา หลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน (แถบมาตราส่วน เท่ากับ 500 ไมโครเมตร)



รูปที่ 22 ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงลักษณะพื้นผิวของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาที่มีปริมาณสารประกอบซิลิกาต่างๆ กัน และลักษณะของเซลล์สร้างกระดูกที่อยู่ภายในรูพรุนของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาในกลุ่มต่าง ๆ หลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน (แถบมาตราส่วน เท่ากับ 100 ไมโครเมตร)

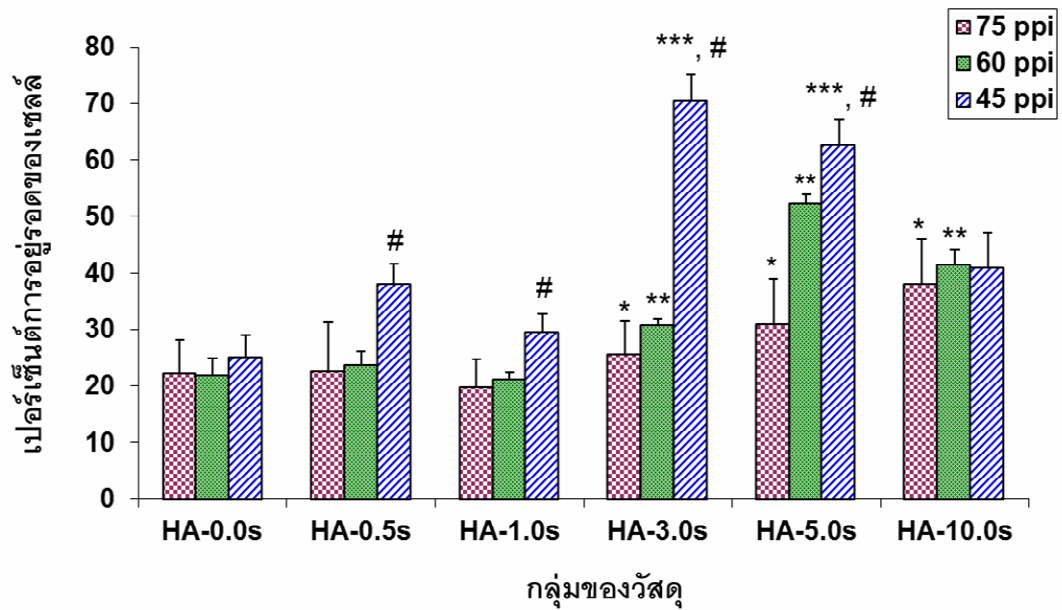
และเมื่อเปรียบเทียบลักษณะของเซลล์สร้างกระดูกที่เกาะติดอยู่กับพื้นผิวของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาที่มีความหนาแน่นของรูพรุนแตกต่างกัน พบว่า ลักษณะของเซลล์สร้างกระดูกที่เกาะติดอยู่กับพื้นผิวของวัสดุ มีลักษณะแบน มีการแผ่ขยายของเซลล์ออกไปในทุกทิศทางรอบๆ ตัวเซลล์ และยังสามารถสังเกตเห็นส่วนลามัลลิโพเดียและฟีโลโพเดียที่ยื่นยาวออกไป เหมือนกันในทุกกลุ่มของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาที่มีความหนาแน่นของรูพรุนแตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 23



รูปที่ 23 ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงลักษณะของเซลล์สร้างกระดูกที่อยู่ภายในรูพรุนของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาในกลุ่มต่าง ๆ ที่มีความหนาแน่นของรูพรุนแตกต่างกัน (A= 75, ppi, B= 60 ppi, C= 45 ppi) หลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน (แถบมาตราส่วน เท่ากับ 70 ไมโครเมตร)

## 2. ความเป็นพิษของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาที่มีต่อเซลล์สร้างกระดูกจากการวิธีเอ็มทีเอส

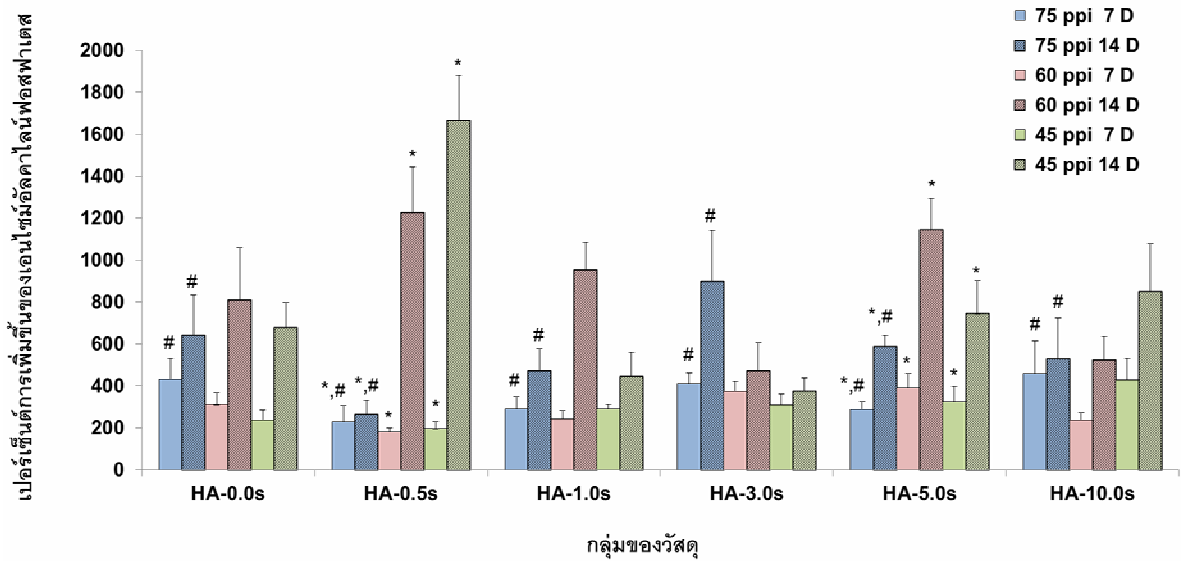
จากการวิเคราะห์ความเป็นพิษของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาที่มีต่อเซลล์สร้างกระดูกด้วยวิธีการวิเคราะห์แบบเอ็มทีเอส เมื่อวิเคราะห์ด้วยกระบวนการทางสถิติด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบสองทาง เพื่อดูผลของปริมาณสารประกอบซิลิกาและความหนาแน่นของรูพรุนที่แตกต่างกันต่อค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์สร้างกระดูกที่เลี้ยงในวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกา (ภาคผนวก ข้อ 1) จากนั้นทำการทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบจับคู่พหุคูณแบบทูกีและเชฟเฟที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ได้ผลทดสอบเหมือนกันว่า ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์สร้างกระดูกที่เลี้ยงในวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาในปริมาณ 3, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์มีปริมาณสูงกว่าในกลุ่มที่มีปริมาณสารประกอบซิลิกา 0, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) นอกจากนี้ยังพบว่าการอยู่รอดของเซลล์สร้างกระดูกที่เลี้ยงในวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาในปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ มีค่าสูงกว่าในกลุ่มที่มีปริมาณสารประกอบซิลิกา 3 และ 10 เปอร์เซ็นต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ดังแสดงอยู่ในรูปที่ 24 สำหรับในส่วนของความแตกต่างของความหนาแน่นของรูพรุน พบว่า เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีทางสถิติ ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์สร้างกระดูกที่เลี้ยงในวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาที่มีความหนาแน่นของรูพรุน 45 ppi มีค่าสูงกว่าในกลุ่มที่มีความหนาแน่นของรูพรุน 60 ppi และ 75 ppi อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) และค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์สร้างกระดูกที่เลี้ยงในวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาที่มีความหนาแน่นของรูพรุน 60 ppi สูงกว่าในกลุ่มที่มีความหนาแน่นของรูพรุนจำนวน 75 ppi อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) นอกจากนี้ยังพบว่าค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์สร้างกระดูกที่เลี้ยงในวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาที่มีปริมาณสารประกอบซิลิกา 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักและความหนาแน่นของรูพรุน 45 ppi มีค่าสูงที่สุด



รูปที่ 24 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์สร้างกระดูก เปรียบเทียบกันในแต่ละกลุ่มของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาที่มีความหนาแน่นของรูพรุนแตกต่างกัน หลังทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 4 วัน และทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีเอ็มทีเอส (\*, \*\*, \*\*\*  $p < 0.05$  แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มที่มีปริมาณสารประกอบซิลิกาต่างกันและ #  $p < 0.05$  แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มที่มีความหนาแน่นของรูพรุนต่างกัน)

### 3. ผลของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาต่อการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส

จากการวิเคราะห์ค่าเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของเซลล์สร้างกระดูก (ภาคผนวก ข้อ 2) เปรียบเทียบกันในแต่ละกลุ่มของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกา และวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบสามทาง เพื่อดูผลของปริมาณสารประกอบซิลิกา, ความหนาแน่นของรูพรุน, และเวลาที่แตกต่างกันต่อค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของเซลล์สร้างกระดูกที่เลี้ยงในวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกา และทำการทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบจับคู่พหุคูณแบบทูกีย์และเชฟเฟที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์พบว่า ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของเซลล์สร้างกระดูกที่เลี้ยงในวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาในปริมาณ 0.5 และ 5 เปอร์เซ็นต์มีปริมาณมากกว่าในกลุ่มที่มีปริมาณสารประกอบซิลิกา 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) นอกจากนี้ยังพบว่าค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของเซลล์สร้างกระดูกที่เลี้ยงในวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาที่มีความหนาแน่นของรูพรุน 75 ppi มีค่าต่ำกว่าในกลุ่มที่มีความหนาแน่นของรูพรุน 60 ppi และ 45 ppi อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของเซลล์สร้างกระดูกที่เลี้ยงในวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาในระยะเวลา 7 วัน และ 14 วัน พบว่าค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของเซลล์สร้างกระดูกที่เลี้ยงในวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาในกลุ่มระยะเวลา 14 วัน มีค่ามากกว่าในกลุ่มระยะเวลา 7 วัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) นอกจากนี้ยังพบว่าวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาปริมาณ 0.5 เปอร์เซ็นต์ที่มีความหนาแน่นของรูพรุน 45 ppi ที่เลี้ยงไว้ระยะเวลา 14 วันมีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของเซลล์สร้างกระดูกสูงที่สุด ดังแสดงอยู่ในรูปที่ 25



รูปที่ 25 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของเซลล์สร้างกระดูก เปรียบเทียบกันในแต่ละกลุ่มของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาที่มีความหนาแน่นของรูพรุนแตกต่างกัน หลังทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7 และ 14 วัน (\*  $p < 0.05$  แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มที่มีปริมาณสารประกอบซิลิกาต่างกันและ #  $p < 0.05$  แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มที่มีความหนาแน่นของรูพรุนต่างกัน)

จากผลการวิเคราะห์ทางสถิติโดยพิจารณาทั้งปัจจัยเกี่ยวกับปริมาณสารประกอบซิลิกาและปริมาณของรูพรุนต่อการอยู่รอดของเซลล์และการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของเซลล์สร้างกระดูก พบว่าวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาที่มีปริมาณสารประกอบซิลิกา 5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักและความหนาแน่นของรูพรุน 45 ppi ให้ผลทางชีวภาพที่ดีที่สุดต่อเซลล์สร้างกระดูก ( $p < 0.05$ )



## บทที่ 4

### บทวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาวัสดุสารประกอบที่มีการผสมรวมของสารประกอบซิลิกาและสารประกอบไฮดรอกซีอะพาไทต์ มีจุดมุ่งหมายเพื่อปรับปรุงคุณสมบัติด้านชีวภาพ และคุณสมบัติเชิงกลของวัสดุ สำหรับเป็นแนวทางเลือกหนึ่งในการรักษาด้วยกระบวนการวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้ทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวภาพของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกา ซึ่งผ่านกระบวนการสร้างโครงร่างด้วยกรรมวิธีแบบ polymeric sponge เพื่อหาสัดส่วนที่เหมาะสมระหว่างสารประกอบซิลิกาและสารประกอบไฮดรอกซีอะพาไทต์ รวมทั้งศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพ การเจริญเติบโต แบ่งตัว และการแปรสภาพ ของเซลล์สร้างกระดูกของมนุษย์ ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาได้มีการพัฒนาปรับปรุงวัสดุสารประกอบไฮดรอกซีอะพาไทต์ด้วยการใช้สารประกอบอื่นๆ ผสม เพื่อดัดแปลงคุณสมบัติเชิงกล คุณสมบัติด้านสนับสนุนกิจกรรมทางชีวภาพ และคุณสมบัติด้านความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Guo *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2009) ซึ่งวิธีการปรับปรุงวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์อาจทำได้โดยกระบวนการการเคลือบด้วยวัสดุสารประกอบประเภทโพลีเมอร์, สารประกอบแคลเซียม หรือสารประกอบคอนดรอยติน (chondroitin) บนวัสดุ (Zhao *et al.*, 2009) สำหรับการศึกษาเลือกใช้การเจือสารประกอบซิลิกาในวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์ เนื่องจากสารประกอบซิลิกามีคุณสมบัติเชิงกลที่ดี สามารถเพิ่มความแข็งแรงให้แก่วัสดุได้ และยังมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์กระดูก นอกจากนี้ได้มีการศึกษาการเจือซิลิกาในวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์ พบว่า ทำให้วัสดุสารประกอบชีวภาพไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่สามารถสนับสนุนการเจริญเติบโตของเซลล์สร้างกระดูกได้ดี (Lin and Khor, 2007)

จากการทดสอบคุณสมบัติด้านความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์สร้างกระดูก โดยสังเกตลักษณะรูปร่างของเซลล์ที่เกาะอยู่บนผิวของวัสดุว่ามีโครงสร้างลักษณะที่เปลี่ยนจากเดิมหรือไม่ พบว่า จากการศึกษาเซลล์สร้างกระดูกด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอและย้อมสีคริสตัลไวโอเลต สังเกตเห็นเซลล์สร้างกระดูกสามารถเกาะและเจริญเติบโตอยู่บนพื้นผิวของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกา โดยพบเซลล์ปรากฏอยู่ทั่วบริเวณของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกา ทั้งในบริเวณรอบพื้นที่รูพรุนและตามพื้นผิวภายในของรูพรุน ซึ่งเมื่อสังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอที่กำลังขยายสูงขึ้นพบว่า ลักษณะของเซลล์สร้างกระดูก มีลักษณะที่คล้ายคลึงกับเซลล์สร้างกระดูกที่เลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ ซึ่งจากผลการศึกษาของ Cerroni และคณะ ในปี 2002 ได้รายงานการสังเกตลักษณะรูปร่างของเซลล์สร้าง

กระดูกที่เกาะอยู่บนพื้นผิววัสดุเซรามิกไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่มีรูพรุนด้วยกล้องจุลทรรศน์ ภายหลังการย้อมสีเซลล์ด้วยโทลูอิดีน (toluidine) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นลักษณะของเซลล์และความหนาแน่นของเซลล์บนวัสดุเซรามิกไฮดรอกซีอะพาไทต์ นอกจากนี้จากการศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์ได้จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ซึ่งแสดงให้เห็นลักษณะรูปร่างของเซลล์สร้างกระดูกที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาที่มีรูพรุนในกำลังขยายที่สูง พบการเกาะอย่างสมบูรณ์ของเซลล์สร้างกระดูก และเซลล์สามารถแผ่ได้อย่างดี โดยสามารถสังเกตพบการเกาะของเซลล์สร้างกระดูกทั้งในบริเวณรอบพื้นที่รูพรุน และภายในรูพรุน นอกจากนี้เซลล์ยังแสดงลักษณะของส่วนยื่นของเซลล์คือ ลามेलลิโพเดียมและฟีโลโพเดียม ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวกับการเกาะติดอยู่กับพื้นผิว และการเคลื่อนที่ของเซลล์ โดยลามेलลิโพเดียมและฟีโลโพเดียมจะมีโมเลกุลของโปรตีนชนิดต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการยึดเกาะของเซลล์กับพื้นผิวของวัสดุ ซึ่งรูปร่างของฟีโลโพเดียมนั้น จะมีลักษณะคล้ายนิ้วมือ มีโครงสร้างที่ประกอบด้วยโปรตีนเส้นใยแอกติน (Actin filament) ในส่วนของลามेलลิโพเดียมจะเป็นพังพืดที่ประกอบด้วยโปรตีนแอกตินที่หนาแน่นอยู่ระหว่างฟีโลโพเดียม ซึ่งจะแผ่ราบไปกับพื้นผิววัสดุ (Mattila and Lappalainen, 2008; Yang and Svitkina, 2011) การสังเกตเห็นลามेलลิโพเดียม และฟีโลโพเดียมของเซลล์ แสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติที่ดีของพื้นผิวของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาในการส่งเสริมการยึดเกาะของเซลล์ (cell adhesion) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์สร้างกระดูก (Brown *et al.*, 2008) นอกจากนี้ลักษณะของเซลล์ที่เกาะและมีความสามารถในการแผ่กระจายได้ดียังสามารถที่จะบ่งชี้ถึงการสร้างโปรตีนคอลลาเจนได้มากอีกด้วย

นอกจากนี้ยังพบว่าลักษณะพื้นผิวที่เซลล์สร้างกระดูกเกาะในวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาในแต่ละกลุ่มมีลักษณะแตกต่างกัน โดยในกลุ่มของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาที่มีปริมาณสารประกอบซิลิกาสูง (ปริมาณสารประกอบซิลิกาเท่ากับ 3, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์) นั้นจะมีลักษณะของพื้นผิวที่ขรุขระน้อยกว่าในกลุ่มที่มีปริมาณสารประกอบซิลิกาน้อย (ปริมาณสารประกอบซิลิกา เท่ากับ 0, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์) แต่จะมีลักษณะพื้นผิวที่เป็นก้อนนูนออกมาสูงกว่า ในปี 2005 มีรายงานการศึกษาวัสดุนาโนซิลิกอนไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่พื้นผิวมีความขรุขระสูงเฉลี่ย 60 ถึง 80 นาโนเมตรพบว่า เซลล์สร้างกระดูกมนุษย์สามารถเกาะและเจริญเติบโตได้ดี (Huang *et al.*, 2005) ต่อมามีการศึกษาลักษณะอิทธิพลของขนาดผลึกขนาดนาโนของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่มีผลต่อการดูดซับโปรตีนไฟโบรเนกติน (Fibronectin) โปรตีนออสติโอเนกติน (Osteonectin) และการเกาะของเซลล์สร้างกระดูก MC3T3-E1 พบว่าลักษณะโครงสร้างของพื้นผิว และความขรุขระจะมีอิทธิพลต่อการเกาะของเซลล์กระดูก และกระบวนการเมตาบอลิซึมต่างๆ ได้มากกว่าการดูดซับของโปรตีน (Ribeiro *et al.*, 2010) นอกจากนี้จากการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์สร้างกระดูกที่มีความขรุขระของ

พื้นผิวของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์ในระดับไมครอน และต่ำกว่าไมครอนพบว่า วัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่มีความขรุขระของพื้นผิวระดับไมครอน สนับสนุนการเจริญเติบโต การเกาะ และการผลิตโปรตีนคอลลาเจนชนิดที่ 1 ของเซลล์สร้างกระดูกได้ดีกว่าวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่มีความขรุขระของพื้นผิวระดับต่ำกว่าไมครอน (Holthaus *et al.*, 2010) จากรายงานการศึกษาข้างต้น จึงอาจกล่าวได้ว่า ลักษณะของพื้นผิวที่เซลล์เกาะ (ขนาดของผลึก ลักษณะโครงสร้างของพื้นผิว และความขรุขระ) มีอิทธิพลต่อการดูดซับของโปรตีน และเกาะของเซลล์เพื่อการเจริญเติบโต และการสร้างกระดูกขึ้นมาใหม่ ซึ่งในการศึกษานี้นอกจากจะพบการเกาะของเซลล์สร้างกระดูกที่ติดบนวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาแล้วยังพบว่า ความหนาแน่นของเซลล์สร้างกระดูกในวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาที่มีปริมาณสารประกอบซิลิกาสูง 3 ถึง 10 เปอร์เซ็นต์จะมีความหนาแน่นของเซลล์สร้างกระดูกที่มากกว่ากลุ่มอื่น ซึ่งบ่งบอกถึงผลดีของการมีสารประกอบซิลิกาในวัสดุต่อยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์สร้างกระดูกบนวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกา ดังนั้นจากผลของการสังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบแสงและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด อาจกล่าวได้ว่า วัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกามีคุณสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์สร้างกระดูกและการเชื่อมประสานซิลิกาส่งเสริมการยึดเกาะของเซลล์สร้างกระดูกบนผิววัสดุได้

นอกจากการศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพและการยึดเกาะของเซลล์สร้างกระดูกแล้ว ในการศึกษาที่ยังวิเคราะห์ปริมาณการอยู่รอดของเซลล์ที่เกาะอยู่บนวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกา ซึ่งอาจบ่งบอกถึงการเจริญเติบโตของเซลล์สร้างกระดูกบนวัสดุเนื่องจากความสามารถในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างกระดูกใหม่ด้วย โดยพบว่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์สร้างกระดูกที่เลี้ยงอยู่ในวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาที่มีปริมาณของสารประกอบซิลิกาที่สูง 3 ถึง 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก มีปริมาณเซลล์ที่สูงกว่าในกลุ่มที่มีปริมาณของสารประกอบซิลิกาที่ต่ำ 0.5 ถึง 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักหรือไม่มีสารประกอบซิลิกาเลย นอกจากนี้วัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาในปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักยังมีปริมาณของเซลล์สูงที่สุดด้วย โดยผลที่ได้ี้มีความคล้ายคลึงกับการศึกษาก่อนหน้านี้เกี่ยวกับการนำสารประกอบซิลิกาไปใช้ในกระบวนการวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก ซึ่งพบว่า นอกจากสารประกอบซิลิกาจะไม่เป็นพิษต่อเซลล์สร้างกระดูกแล้ว ในบางครั้งอาจจะช่วยส่งเสริมในการเจริญเติบโตของเซลล์สร้างกระดูกด้วยเช่นกัน (Padilla *et al.*, 2006; Hing *et al.*, 2006) นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับการศึกษาคุณสมบัติในทางด้านสนับสนุนกิจกรรมทางด้านชีวภาพของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาด้วยกระบวนการสร้างโครงสร้างแบบ spark plasma sintering พบว่า เซลล์สร้างกระดูกที่เลี้ยงอยู่บนวัสดุสารประกอบชีวภาพไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่มีองค์ประกอบของสารประกอบซิลิกาอยู่ใน

ปริมาณ 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ มีการเจริญเติบโตมากกว่าบนวัสดุที่มีสารประกอบไฮดรอกซีอะพาไทต์เพียงอย่างเดียว (Lin *et al.*, 2008)

ในการศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพของวัสดุ ถึงแม้ว่าการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์และการเจริญเติบโตของเซลล์จะเป็นการทดสอบคุณสมบัติขั้นแรกเพื่อพัฒนาวัสดุต่าง ๆ การศึกษาในส่วนของคุณสมบัติของวัสดุในการสนับสนุนการแปรสภาพของเซลล์สร้างกระดูกเป็นอีกวิธีการหนึ่งในการประเมินความสามารถของวัสดุในการกระตุ้นการสร้างกระดูกขึ้นมาใหม่ (Wang *et al.*, 2007) ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการวิเคราะห์การแปรสภาพของเซลล์สร้างกระดูกโดยทำการเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูกในวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกา เป็นเวลา 7 และ 14 วัน ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่เซลล์สร้างกระดูกมีการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในปริมาณที่สูง และเซลล์สร้างกระดูกเข้าสู่กระบวนการหลังสารเมทริกซ์ที่จำเป็นต่อการสร้างกระดูกออกมา (Lian *et al.*, 1998) พบว่า วัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาที่มีปริมาณสารประกอบซิลิกา 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในระดับที่สูงที่สุด รองลงมาคือวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาที่มีปริมาณสารประกอบซิลิกา 5 เปอร์เซ็นต์และพบอีกว่าเซลล์สร้างกระดูกที่เลี้ยงอยู่บนทุกวัสดุที่ทดสอบให้ผลการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสมากกว่าเซลล์ที่เลี้ยงอยู่บนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ซิลิกอนนั้นมีบทบาทอย่างยิ่งในขบวนการผลิตโปรตีนคอลลาเจนในช่วงระยะเวลาที่เกิดการสะสมแร่ธาตุเพื่อพัฒนาแปรสภาพเป็นกระดูก (Carlisle, 1980) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่า กรดออร์โธซิลิกอิก (Orthosilicic acid;  $H_4SiO_4$ ) ซึ่งมีองค์ประกอบของซิลิกอนจะช่วยกระตุ้นการสร้างโปรตีนคอลลาเจนชนิดที่ 1 และช่วยให้เกิดการแปรสภาพของเซลล์สร้างกระดูกเกิดเพิ่มขึ้น (Reffitt *et al.*, 2003) และจากการศึกษาผลของวัสดุเซรามิกชีวภาพไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่มีส่วนผสมของซิลิกอน พบว่าสามารถเพิ่มการเจริญเติบโตและการสร้างเมทริกซ์ของเซลล์สร้างกระดูก รวมทั้งกระตุ้นการสะสมแร่ธาตุ (Thain *et al.*, 2006) ต่อมาในปี 2008 งานวิจัยของ Lin และคณะ (2008) พบว่าวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่มีส่วนผสมของสารประกอบซิลิกา 5 เปอร์เซ็นต์ด้วยกระบวนการสร้างโครงร่างแบบ spark plasma sintering ช่วยทำให้เซลล์สร้างกระดูกผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสมากกว่าวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เพียงอย่างเดียว นอกจากนี้จากการศึกษาที่ผ่านมายังพบอีกว่า การปลดปล่อยแคลเซียมไอออนและซิลิกาไอออนมีผลต่อการเจริญเติบโต และการแปรสภาพของเซลล์เช่นกัน ซึ่งในการทดลองครั้งนี้จากการสังเกตลักษณะของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาพบว่า เมื่อนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นเวลานานมากขึ้น วัสดุจะมีความแข็งแรงน้อยลง ซึ่งอาจบ่งชี้ถึงความสามารถในการละลายขององค์ประกอบบางอย่างออกมาจากวัสดุโครงร่าง อาจจะเป็นผลทำให้แคลเซียมไอออน และซิลิกาไอออนถูกปลดปล่อยออกมาจากวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกา ควรจะมีวิธีการวัดการปลดปล่อยของไอออนของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาต่อไปใน

อนาคต ซึ่งในงานวิจัยของ [1] และคณะ (2008) ได้รายงานว่ พบการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง บางส่วนของไฮดรอกซีอะพาไทต์เป็นเบต้าไตรแคลเซียมฟอสเฟต (Beta-Tricalcium Phosphate,  $\beta$ -TCP) ในวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาซึ่งผ่านกระบวนการขึ้นโครงสร้างของวัสดุด้วยวิธี spark plasma sintering ซึ่งอาจมีผลทำให้ความเสถียรของวัสดุต่ำลงและเกิดการปลดปล่อยไอออนต่าง ๆ ได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับไฮดรอกซีอะพาไทต์ ดังนั้นจึงควรมี การทดสอบต่อไปเพื่อวิเคราะห์ว่าวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาซึ่งสร้างโดยวิธี Polymeric sponge ที่ใช้ในศึกษาครั้งนี้มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเป็นเบต้าไตรแคลเซียม ฟอสเฟตหรือไม่ และมีผลต่อความเสถียรของวัสดุอย่างไร

นอกจากการศึกษาถึงผลของการเจือสารประกอบซิลิกาจะมีผลต่อการยึดเกาะ การเจริญเติบโตและการแปรสภาพของเซลล์สร้างกระดูกแล้ว การศึกษานี้ยังได้วิเคราะห์ถึง ปัจจัยเกี่ยวกับขนาดและความหนาแน่นของรูพรุน ซึ่งพบว่าเซลล์สร้างกระดูกจะมีเปอร์เซ็นต์การ รอดชีวิตสูงในวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาที่มีความหนาแน่นของรูพรุนน้อย (45 ppi) เมื่อเปรียบเทียบกับในกลุ่มที่มีความหนาแน่นของรูพรุนมาก (60 ppi และ 75 ppi) ทั้งนี้ เนื่องมาจากความหนาแน่นของรูพรุนจะแปรผกผันกับขนาดของรูพรุน จึงทำให้วัสดุไฮดรอกซีอะ พาไทต์เจือด้วยซิลิกาที่มีความหนาแน่นของรูพรุน 45 ppi มีขนาดของรูพรุนใหญ่ที่สุด ซึ่งจาก การวัดขนาดอย่างหยาบด้วยภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดพบว่า มี ขนาดเฉลี่ยประมาณ 300-500 ไมครอน ทำให้เซลล์สร้างกระดูกเข้าไปอยู่ในรูพรุนได้ง่ายกว่า วัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาที่มีความหนาแน่นของรูพรุน 60 และ 75 ppi ซึ่งมีขนาด ของรูพรุนเล็กกว่า และจากการศึกษาการแปรสภาพของเซลล์สร้างกระดูกที่เลี้ยงอยู่บนวัสดุไฮ ดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาที่มีความหนาแน่นของรูพรุน 45 ppi, 60 ppi และ 75 ppi โดยใช้ ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในการเปรียบเทียบ พบว่า ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของเซลล์สร้างกระดูกที่ เลี้ยงในวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาที่มีความหนาแน่นของรูพรุน 60 ppi และ 45 ppi มีค่าสูงกว่าในกลุ่มที่มีความหนาแน่นของรูพรุน 75 ppi และค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้น ของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของเซลล์สร้างกระดูกที่เลี้ยงในวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือ ด้วยซิลิกาในระยะเวลา 14 วัน มากกว่าระยะเวลา 7 วัน ซึ่งที่ผ่านมาได้มีการศึกษาเกี่ยวกับ ขนาดของรูพรุน และความหนาแน่นของรูพรุนของวัสดุโครงสร้างทั้งในด้านคุณสมบัติด้าน กายภาพ และชีวภาพจำนวนมาก เช่น งานวิจัยของ Bae และคณะ ในปี 2006 ได้ศึกษาถึง อิทธิพลของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่มีขนาดของรูพรุนประมาณ 450 ไมครอน และมีความ พรุณระหว่าง 48 ถึง 73 เปอร์เซ็นต์ต่อเซลล์สร้างกระดูก พบว่าเซลล์สร้างกระดูกมีอัตราการ เจริญเติบโต แบ่งตัว และผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเพิ่มมากขึ้น ต่อมาในปี 2007 มี การศึกษาวัสดุนาโนซิลิกาแคลเซียมฟอสเฟตที่มีความพรุนประมาณ 32 ถึง 56 เปอร์เซ็นต์และมี

ขนาดของรูพรุนภายในประมาณ 3 นาโนเมตร ถึง 650 ไมครอน พบว่าสามารถเพิ่มการแสดงออกของยีนโปรตีนออสติโอแคลซินของเซลล์สร้างกระดูกได้เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์สร้างกระดูกเลี้ยงบนวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เพียงอย่างเดียว (Gupta *et al.*, 2007) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยเกี่ยวกับปัจจัยของขนาดรูพรุนภายในวัสดุโพลีแคปโพรแลคโตน (Polycaprolactone) พบว่ารูพรุนขนาด 380 ถึง 405 ไมครอน เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเซลล์สร้างกระดูก และเซลล์กระดูกอ่อน ในขณะที่รูพรุนขนาด 186 ถึง 200 ไมครอนเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Oh *et al.*, 2007) ต่อมาได้มีงานวิจัยของ Pamula และคณะ (2008) ซึ่งทำการศึกษาวัสดุโพลี(แอลแลต)โกลโคไลด์ ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางของรูพรุนขนาด 600 ไมครอน พบว่าทำให้เกิดการเจริญเติบโตของเซลล์สร้างกระดูกได้ดีที่สุด และเมื่อไม่นานมานี้ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับผลของวัสดุที่มีรูพรุนขนาดและโครงสร้างเหมือนกันกับวัสดุที่มีลักษณะรูพรุนที่ไม่เท่ากันและโครงสร้างต่างกัน พบว่าวัสดุที่มีรูพรุนขนาดเท่ากันและโครงสร้างเหมือนกันจะทำให้เซลล์มีการแปรสภาพที่ดีกว่าและสามารถกระตุ้นการหลั่งสารเมทริกซ์ออกมามากกว่าเซลล์ นอกจากนี้ยังพบอีกว่าลักษณะโครงสร้างรูพรุนมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มากกว่าขนาดของชั้นวัสดุ (Choi *et al.*, 2010) ดังนั้นจากงานวิจัยข้างต้นที่ผ่านมาและผลจากการศึกษานี้อาจจะบ่งชี้ได้ว่าขนาดและความหนาแน่นของรูพรุนเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโต และแปรสภาพของเซลล์สร้างกระดูก

ดังนั้นผลจากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า วัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาที่มีปริมาณสารประกอบซิลิกา 5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักและความหนาแน่นของรูพรุน 45 ppi มีคุณสมบัติที่ดีในการสนับสนุนการเจริญเติบโตของเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์ สำหรับในส่วนของผลการแปรสภาพของเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์ กลุ่มที่ให้ผลดีที่สุด คือ วัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาที่มีปริมาณสารประกอบซิลิกา 0.5 เปอร์เซ็นต์ที่มีความหนาแน่นของรูพรุน 45 ppi อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาทั้งปัจจัยในส่วนของปริมาณสารประกอบซิลิกาและปริมาณของรูพรุนร่วมกัน พบว่า วัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาที่มีปริมาณสารประกอบซิลิกา 5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักและความหนาแน่นของรูพรุน 45 ppi ให้ผลทางชีวภาพที่ดีที่สุดต่อเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์ อย่างไรก็ตามการศึกษานี้เป็นเพียงการศึกษานอกกายและศึกษาเพียงบางปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์เท่านั้น จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาปัจจัยอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง รวมทั้งทำการศึกษาในสัตว์ทดลอง เพื่อพัฒนาวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการรักษาอวัยวะของกระดูกต่อไป

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลอง

วัสดุโครงร่างสามมิติไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาแบบมีรูพรุนที่เชื่อมต่อกัน มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์และสามารถทำให้เกิดการยึดเกาะของเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์ โดยพบว่าวัสดุสารประกอบไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาที่ให้ผลที่ดีที่สุดในแง่ของการตอบสนองของเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์ คือ วัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่มีปริมาณของสารประกอบซิลิกา 5.0 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักและมีความหนาแน่นของรูพรุน 45 ppi เนื่องจากสามารถทำให้เซลล์สร้างกระดูกมนุษย์มีการอยู่รอดสูง และสามารถกระตุ้นการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์ได้ ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกา 5.0 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักและมีความหนาแน่นของรูพรุน 45 ppi น่าจะมีคุณสมบัติทางชีวภาพที่ดีและเหมาะสมในการใช้พัฒนาเป็นวัสดุโครงร่างสามมิติไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาต่อไป

### ข้อเสนอแนะเพิ่มเติม

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาคูณสมบัติทางชีวภาพของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาที่มีต่อเซลล์สร้างกระดูกในห้องปฏิบัติการ ซึ่งเป็นการทดสอบคุณสมบัติในเบื้องต้นของวัสดุเท่านั้น อย่างไรก็ตามการพัฒนาวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกาให้มีความสามารถนำไปใช้ในการรักษาทางการแพทย์ได้จริง ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงการแสดงออกของยีนของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการชักนำการสร้างกระดูกของวัสดุ รวมทั้งมีการทดสอบในระดับสัตว์ทดลอง เพื่อแสดงถึงคุณสมบัติเชิงกลและคุณสมบัติทางชีวภาพต่าง ๆ รวมทั้งการเกิดการสร้างกระดูกใหม่เมื่อวัสดุอยู่ในร่างกาย ก่อนที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในมนุษย์ต่อไป

## เอกสารอ้างอิง

- Allgrove, J. 2007. Metabolic bone disease. *Paediatrics and Child Health* 17: 7.
- Bae, C.J., Kim, H.W., Koh, Y.H. and Kim, H.E. 2006. Hydroxyapatite (HA) bone scaffolds with controlled macrochannel pores. *Journal of Materials Science* 17: 517-521.
- Borum, L. and Wilson, Jr. O.C. 2003. Surface modification of hydroxyapatite. Part II. Silica. *Biomaterials* 24: 3681–3688.
- Brown, R.F., Day, D.E., Day, T.E., Jung, S., Rahaman, M.N. and Fu, Q. 2008. Growth and differentiation of osteoblastic cells on 13-93 bioactive glass fibers and scaffolds. *Acta Biomaterialia* 4: 387-396.
- Bruder, S.P., Kurth, A.A., Shea, M., Hayes, W.C. and Jaiswal, N. 1998. Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research* 16: 155–162.
- Cancedda, R., Giannoni, P. and Mastrogiacomo, M. 2007. A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical practice. *Biomaterials* 28: 240-250.
- Carlisle, E.M. 1980. A silicon requirement for normal skull formation in chicks. *Journal of Nutrition* 110: 352-359.
- Carson, J.S. and Bostrom, M.P.G. 2007. Synthetic bone scaffolds and fracture repair. *Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care* 38: 33-37
- Cerroni, L., Filocamo, R., Fabbri, M., Piconi, C., Caropreso, S. and Condo, S.C. 2002. Growth of osteoblast-like cells on porous hydroxyapatite ceramics: an in vitro study. *Biomolecular Engineering* 19: 119-124



- Chan, K.S., Liang, W., Francis, W.L. and Nicoletta, D.P. 2010. A multiscale modeling approach to scaffold design and property prediction. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 3: 58-593.
- Choi, S.W., Zhang, Y. and Xia, Y. 2010. Three-dimensional scaffolds for tissue engineering: the importance of uniformity in pore size and structure. *Langmuir* 26: 19001-19006.
- Cook, S.D. and Rueger, D.C. 1996. Osteogenic protein-1: biology and applications. *Clinical Orthopaedics and Related Research*: 29-38.
- De With, G., Vandijk, H.J.A., Hattu, N. and Prijs, K. 1981. Preparation, microstructure and mechanical properties of dense polycrystalline hydroxylapatite. *Biomaterials* 16: 1592-1598.
- Eggl, P.S., Muller, W. and Schenk, R.K. 1988. Porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate cylinders with two different pore size ranges implanted in the cancellous bone of rabbits. A comparative histomorphometric and histologic study of bony ingrowth and implant substitution. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 232: 127-138.
- Friedenstein, A.J., Chailakhyan, R.K. and Gerasimov, U.V. 1987. Bone marrow osteogenic stem cells: In vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell & Tissue Kinetics* 20: 263-272.
- Gogolewski, S. and Mainil-Varlet, P. 1997. Effect of thermal treatment on sterility, molecular and mechanical properties of various polylactides. 2. Poly(L/D-lactide) and poly(L/DL-lactide). *Biomaterials* 18: 251-255.
- Guo, H., Wei, J., Yuan, Y. and Liu, C. 2007. Development of calcium silicate/calcium phosphate cement for bone regeneration. *Biomedical materials* [Bristol, England] 2: S153-159.

- Gupta, G., El-Ghannam, A., Kirakodu, S., Khraisheh, M. and Zbib, H. 2007. Enhancement of osteoblast gene expression by mechanically compatible porous Si-rich nanocomposite. *Journal of Biomedical Materials Research Part B* 81: 387-396.
- Habraken, W.J.E.M., Wolke, J.G.C. and Jansen, J.A. 2007. Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59: 231-238.
- Hench, L.L. and Paschall, H.A. 1973. Direct chemical bond of bioactive glass-ceramic materials to bone and muscle. *Journal of Biomedical Materials Research* 7: 25-32.
- Hing, K.A., Revell, P.A., Smith, N. and Buckland, T. 2006. Effect of silicon level on rate, quality and progression of bone healing within silicate-substituted porous hydroxyapatite scaffolds. *Biomaterials* 27: 501-5026.
- Holthaus, M.G., Treccani, L. and Rezwan, K. 2010. Osteoblast viability on hydroxyapatite with well-adjusted submicron and micron surface roughness as monitored by the proliferation reagent WST-1. *Journal of Biomaterials Applications*. [Epub ahead of print].
- Huang, J., Jayasinghe, S.N., Best, S.M., Edirisinghe, M.J., Brooks, R.A., Rushton, N. and Bonfield, W. 2005. Novel deposition of nano-sized silicon substituted hydroxyapatite by electrostatic spraying. *Journal of Materials Science* 16: 1137-1142.
- Huang, J., Best, S.M., Bonfield, W. and Buckland, T. 2009. Development and characterization of titanium-containing hydroxyapatite for medical applications. *Acta Biomaterialia* 6: 21-29.

- Ingber, D.E., Mow, V.C., Butler, D., Niklason, L., Huard, J., Mao, J., Yannas, I., Kaplan, D. and Vunjak-Novakovic, G. 2006. Tissue Engineering and Developmental Biology: Going Biomimetic. *Tissue Engineering* 12: 3265-3283.
- Jia, G. and Guo, Z. 2007. Property of three-dimensional silica composites. *Journal of University of Science and Technology Beijing* 17: 85.
- Kobayashi, S., Kawai, W. and Wakayama, S. 2006. The effect of pressure during sintering on the strength and the fracture toughness of hydroxyapatite ceramics. *Journal of Materials Science Materials in Medicine* 17: 1089-1093.
- Komaki, H., Tanaka, T., Chazono, M. and Kikuchi, T. 2006. Repair of segmental bone defects in rabbit tibiae using a complex of beta-tricalcium phosphate, type I collagen, and fibroblast growth factor-2. *Biomaterials* 29: 5118-5126.
- Kon, E., Muraglia, A., Corsi, A., Bianco, P. and Marcacci, M. 2000. Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. *Journal of Biomedical Materials Research* 49: 328–337.
- Kruyt, M.C., Dhert, W.J., Yuan, H., Wilson, C.E. and van Blitterswijk, C.A. 2000. Bone tissue engineering in a critical size defect compared to ectopic implantations in the goat. *Journal of Orthopaedic Research* 22: 544–551.
- Le Geros, R.Z. 2002. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 395: 81–98.
- Le Huec, J.C., Schaefferbeke, T., Clement, D., Faber, J. and Le Rebeller, A. 1995. Influence of porosity on the mechanical resistance of hydroxyapatite ceramics under compressive stress. *Biomaterials* 16: 113-118.
- Lian, J.B., Stein, G.S., Stein, J.L. and van Wijnen, A.J. 1998. Transcriptional control of osteoblast differentiation. *Biochemical Society transactions* 26: 121.

- Liu, D.M. 1997. Fabrication of hydroxyapatite ceramic with controlled porosity. *Journal Material Science: Materials in Medicine* 8: 227-232.
- Liu, X., Morra, M., Carpi, A. and Li, B. 2008. Bioactive calcium silicate ceramics and coatings. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 62: 526-529.
- Lopez-Alvarez, M., Solla, E.L., Gonzalez, P., Serra, J., Leon, B., Marques, A.P. and Reis, R.L. 2009. Silicon-hydroxyapatite bioactive coatings [Si-HA] from diatomaceous earth and silica. Study of adhesion and proliferation of osteoblast-like cells. *Journal Material Science: Materials in Medicine* 20: 1131-1136.
- Mackey, D.C., Lui, L.Y., Cawthon, P.M., Bauer, D.C., Nevitt, M.C., Cauley, J.A., Hillier, T.A., Lewis, C.E., Barrett-Connor, E. and Cummings, S.R. 2007. High-trauma fractures and low bone mineral density in older women and men. *Journal of the American Medical Association* 298: 2381-2388.
- Mankin, H.J., Hornicek, F.J. and Raskin, K.A. 2005. Infection in massive bone allografts. *Clinical Orthopaedics and Related Research* [32: 210-216.
- Mastrogiacomo, M., Muraglia, A., Komlev, V., Peyrin, F., Rustichelli, F., Crovace, A. and Cancedda, R. 2005. Tissue engineering of bone: search for a better scaffold. *Orthodontics & Craniofacial Research* 8: 277-28 [
- Mattila, P.K. and Lappalainen, P. 2008. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9: [16-5 [
- Meijer, G., Bruijn, J., Koole, R. and van Blitterswijk, C. 2007. Cell-Based Bone Tissue Engineering. *PLoS Medicine* [260-26 [
- Moed, B.R., Wilson Carr, S.E. and Craig, J.G. 2003. Calcium sulfate used as bone graft substitute in acetabular fracture fixation. *Clinical Orthopaedics and Related Research* [10: 303-309.

- Morejón, L., Mendizábal, A. E., García-Menocal, J. A. D., Ginebra, M. P., Aparicio, C., Mur, F. J. G., Marsal, M., Davidenko, N., Ballesteros, M. E. and Planell, J. A. 200 □ Static mechanical properties of hydroxyapatite □HA□ powder-filled acrylic bone cements: Effect of type of HA powder. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 72: 3 □5-352.
- Nagashima, T., Ohshima, Y. and Takeuchi, H. 1995. [Osteoconduction in porous hydroxyapatite ceramics grafted into the defect of the lamina in experimental expansive open-door laminoplasty in the spinal canal]. *Nihon Seikeigeka Gakkai Zasshi* 69: 222-230.
- Nishikawa, M., Myoui, A., Ohgushi, H., Ikeuchi, M., Tamai, N., and Yoshikawa, H. 200 □ Bone tissue engineering using novel interconnected porous hydroxyapatite ceramics combined with marrow mesenchymal cells: quantitative and three-dimensional image analysis. *Cell Transplantation* 13: 367-376.
- Oh, S.H., Park, I.K., Kim, J.M. and Lee, J.H. 2007. In vitro and in vivo characteristics of PCL scaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method. *Biomaterials* 28: 166 □1671.
- Ohgushi, H., Goldberg, V.M. and Caplan, A.I. 1989 .Repair of bone defects with marrow cells and porous ceramic. Experiments in rats. *Acta Orthopaedica Scandinavica* 60: 33 □339.
- Padilla, S., Roman, J., Sanchez-Salcedo, S. and Vallet-Reg, M. 2006. Hydroxyapatite/SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> glass materials: In vitro bioactivity and biocompatibility. *Acta Biomaterialia* 2: 331-3 □2.
- Pamula, E., Bacakova, L., Filova, E., Buczynska, J., Dobrzynski, P., Noskova, L. and Grausova, L. 2008. The influence of pore size on colonization of poly □lactide-glycolide □scaffolds with human osteoblast-like MG 63 cells in vitro. *Journal of Materials Science* 19: □25- □35.

- Peter, S.J., Miller, M.J., Yasko, A.W., Yaszemski, M.J. and Mikos, A.G. 1998. Polymer concepts in tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research* 3: 22-27.
- Peter, S.J., Suggs, L.J., Yaszemski, M.J., Engel, P.S. and Mikos, A.G. 1999. Synthesis of polypropylene fumarate by acylation of propylene glycol in the presence of a proton scavenger. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition* 10: 363-373.
- Porter, A.E., Patel, N., Skepper, J.N., Best, S.M. and Bonfield, W. 2003. Comparison of in vivo dissolution processes in hydroxyapatite and silicon-substituted hydroxyapatite bioceramics. *Biomaterials* 24: 609-620.
- Porter, J.R., Ruckh, T.T. and Popat K.C. 2009. Bone Tissue Engineering: A Review in Bone Biomimetics and Drug Delivery Strategies. *Biotechnology Progress* 25: 1539-1560.
- Reffitt, D.M., Ogston, N., Jugdaohsingh, R., Cheung, H.F., Evans, B.A., Thompson, R.P., Powell, J.J. and Hampson, G.N. 2003. Orthosilicic acid stimulates collagen type 1 synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells in vitro. *Bone* 32: 127-135.
- Ribeiro, N., Sousa, S.R. and Monteiro, F.J. 2010. Influence of crystallite size of nanophased hydroxyapatite on fibronectin and osteonectin adsorption and on MC3T3-E1 osteoblast adhesion and morphology. *Journal of Colloid and Interface Science* 351: 398-406.
- Rimondini, L., Nicoli-Aldini, N., Fini, M., Guzzardella, G., Tschon, M. and Giardino, R. 2005. In vivo experimental study on bone regeneration in critical bone defects using an injectable biodegradable PLA/PGA copolymer. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics* 99:18-15
- Rosen, V. and Wozney, J.M. 2002. Bone morphogenetic proteins. In: *Principles of Bone Biology*. New York: Academic Press: p.919-928.

- Shang, Q., Wang, Z., Liu, W., Shi, Y. and Cui, L. 2001. Tissue-engineered bone repair of sheep cranial defects with autologous bone marrow stromal cells. *Journal of Craniofacial Surgery* 12: 586–593.
- Schliephake, H., Knebel, J.W., Aufderheide, M. and Tauscher, M. 2001. Use of cultivated osteoprogenitor cells to increase bone formation in segmental mandibular defects: An experimental pilot study in sheep. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 30: 531–537.
- Smith, I.O., Baumann, M.J. and McCabe, L.R. 2006. MC3T3-E1 osteoblast attachment and proliferation on porous hydroxyapatite scaffolds fabricated with nanophase powder. *International Journal of Nanomedicine* 1: 189-19□
- Sopyan, I., Mel, M., Ramesh, S. and Khalid, K.A. 2007. Porous hydroxyapatite for artificial bone applications. *Science and Technology of Advanced Materials* 8: 116-123.
- Tieliewuhan, Y., Hirata, I., Sasaki, A., Minagi, H. and Okazaki, M. 200□ Osteoblast proliferation behavior and bone formation on and in CO<sub>3</sub>apatite-collagen sponges with a porous hydroxyapatite frame. *Dental Materials Journal* 23: 258-26□
- Thian, E.S., Huang, J., Best, S.M., Barber, Z.H., Brooks, R.A., Rushton, N. and Bonfield, W. 2006. The response of osteoblasts to nanocrystalline silicon-substituted hydroxyapatite thin films. *Biomaterials* 27: 2692-2698.
- Toshitane, N. and Kuniomi, I. 1999. Biomechanical behavior of hydroxyapatite as bone substitute material in a loaded implant model. On the surface strain measurement and the maximum compression strength determination of material crash. *Bio-Medical Materials and Engineering* 9: 319-32□

- Trenholm, A., Landry, S. and McLaughlin, K. 2005. Comparative fixation of tibial plateau fractures using alpha-BSM, a calcium phosphate cement, versus cancellous bone graft. *Journal of Orthopaedic Trauma* 19: 698-702.
- Urist, M.R., Wallace, T.H. and Adams, T. 1965. The function of fibrocartilaginous fracture callus. *Journal of Bone and Joint Surgery* 7: 303-318.
- Wang, H., Lia, Y., Zuo, Y., Li, J., Mab, S. and Cheng, L. 2007. Biocompatibility and osteogenesis of biomimetic nano-hydroxyapatite/polyamide composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 28: 3338-3348.
- Wei, G. and Ma, P. X. 2004. Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 25: 749-757.
- Welch, R.D., Zhang, H. and Bronson, D.G. 2003. Experimental tibial plateau fractures augmented with calcium phosphate cement or autologous bone graft. *Journal of Bone Surgery* 85: 222-231.
- Woo, K.M., Seo, J., Zhang, R. and Ma, P.X. 2007. Suppression of apoptosis by enhanced protein on polymer/hydroxyapatite composite scaffolds. *Biomaterials* 28: 2622-2630.
- Woodard, J.R., Hilldore, A.J., Lan, S.K., Park, C.J., Morgan, A.W., Eurell, J.A.C., Clark, C.G., Wheeler, M.B., Jamison, R.D. and Johnson, A.J.W. 2007. The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity. *Biomaterials* 28: 554-564.
- Xu, J.L. and Khor, K.A. 2007. Chemical analysis of silica doped hydroxyapatite biomaterials consolidated by a spark plasma sintering method. *Journal of Inorganic Biochemistry* 101: 187-195.



- Xu, J.L., Khor, K.A., Lu, Y.W., Chen, W.N. and Kumar, R. 2008. Osteoblast interactions with various hydroxyapatite based biomaterials consolidated using a spark plasma sintering technique. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 81: 221-230.
- Yamamuro, T. 1991. Bone Bonding Behavior and Clinical use of A-W Glass-Ceramic. In: Urist MR, O'Connor BT, Burwell RG (eds), *Bone Grafts, Derivatives and Substitutes*. Oxford: Butterworth-Heinemann Ltd: p.215-259.
- Yang, C., Frei, H., Rossi, F.M. and Burt, H.M. 2009. The differential in vitro and in vivo responses of bone marrow stromal cells on novel porous gelatin-alginate scaffolds. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 3: 601-611.
- Yang, C. and Svitkina, T. 2011. Visualizing branched actin filaments in lamellipodia by electron tomography. *Nature Cell Biology* 13: 1012-1013.
- Zhao, J., Lu, X., Duan, K., Guo, L.Y., Zhou, S.B. and Weng, J. 2009. Improving mechanical and biological properties of macroporous HA scaffolds through composite coatings. *Colloids and Surfaces* 71: 659-666.

## ภาคผนวก

### 1. การวิเคราะห์การยู่รอดของเซลล์

#### 1.1 การคำนวณเปอร์เซ็นต์การยู่รอดของเซลล์

นำค่าการดูดกลืนแสงจากตัวอย่างจำนวน 5 ซึ้นในแต่ละกลุ่มของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกา มาทำการคำนวณเป็นค่าเปอร์เซ็นต์การยู่รอดของเซลล์เปรียบเทียบกับเซลล์สร้างกระดูกที่เลี้ยงอยู่ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ (ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์สร้างกระดูกที่เลี้ยงในวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกา/ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์สร้างกระดูกที่เลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์  $\times 100$ ) จากนั้นนำเปอร์เซ็นต์การยู่รอดของเซลล์สร้างกระดูก มาคำนวณค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ดังแสดงในตารางที่ 2 และนำไปวิเคราะห์ทางสถิติต่อไป

ตารางที่ 2 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเปอร์เซ็นต์การรอดของเซลล์สร้างกระดูกที่เลี้ยงอยู่ในวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกา ในกลุ่มต่างๆ หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน

เปอร์เซ็นต์ซิลิกา	ความหนาแน่นรูพรุน	ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
HA-0.0s	75 ppi	22.11834	6.061559
	60 ppi	21.78656	3.160869
	45 ppi	24.99861	3.944940
	Total	22.96784	4.475250
HA-0.5s	75 ppi	22.50173	8.838344
	60 ppi	23.55731	2.581000
	45 ppi	38.05262	3.521381
	Total	28.03722	9.038844
HA-1.0s	75 ppi	19.65689	5.097500
	60 ppi	21.05929	1.281510
	45 ppi	29.51020	3.217490
	Total	23.40879	5.580812
HA-3.0s	75 ppi	25.61965	5.942001
	60 ppi	30.67194	1.102949
	45 ppi	70.41030	4.610305
	Total	43.05982	21.670215
HA-5.0s	75 ppi	30.92365	8.011458
	60 ppi	52.25296	1.719860
	45 ppi	62.53351	4.738302
	Total	48.30698	15.039865
HA-10.0s	75 ppi	38.07112	7.921567
	60 ppi	41.45455	2.618021
	45 ppi	40.86312	6.334040
	Total	40.12959	5.803667

## 1.2 ตารางค่าการวิเคราะห์ทางสถิติเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์

### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: % Cell survivor

Source	Type III Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	18182.707 <sup>a</sup>	17	1069.571	41.273	.000
Intercept	102569.777	1	102569.777	3957.983	.000
Gr	8482.800	5	1696.560	65.467	.000
Ps	5064.254	2	2532.127	97.710	.000
gr * ps	4513.013	10	451.301	17.415	.000
Error	1814.026	70	25.915		
Total	122084.556	88			
Corrected Total	19996.733	87			

a. R Squared = .909 (Adjusted R Squared = .887)

## Post Hoc Tests: Pore density

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: % Cell survivor

	(I) pore density	(J) pore density	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	75 ppi	60 ppi	-4.62482*	1.337664	.003	-7.82794	-1.42170
		40 ppi	-17.91283*	1.314399	.000	-21.06024	-14.76542
	60 ppi	75 ppi	4.62482*	1.337664	.003	1.42170	7.82794
		40 ppi	-13.28801*	1.337664	.000	-16.49113	-10.08489
	40 ppi	75 ppi	17.91283*	1.314399	.000	14.76542	21.06024
		60 ppi	13.28801*	1.337664	.000	10.08489	16.49113
Scheffe	75 ppi	60 ppi	-4.62482*	1.337664	.004	-7.97041	-1.27923
		40 ppi	-17.91283*	1.314399	.000	-21.20023	-14.62543
	60 ppi	75 ppi	4.62482*	1.337664	.004	1.27923	7.97041
		40 ppi	-13.28801*	1.337664	.000	-16.63360	-9.94242
	40 ppi	75 ppi	17.91283*	1.314399	.000	14.62543	21.20023
		60 ppi	13.28801*	1.337664	.000	9.94242	16.63360

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 25.915.

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

## Homogeneous Subsets

% Cell survivor

pore density	N	Subset		
		1	2	3
Tukey HSD <sup>a</sup> 75 ppi	30	26.48190		
60 ppi	28		31.10672	
40 ppi	30			44.39473
Sig.		1.000	1.000	1.000
Scheffe <sup>a</sup> 75 ppi	30	26.48190		
60 ppi	28		31.10672	
40 ppi	30			44.39473
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 25.915.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 29.302.

## Post Hoc Tests: % silica

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: % Cell survivor

	(I) % silica	(J) % silica	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	HA-0.0s	HA-0.5s	-5.06938	1.858841	.083	-10.51604	.37727
		HA-1.0s	-.44095	1.858841	1.000	-5.88761	5.00570
		HA-3.0s	-20.09198	1.891743	.000	-25.63504	-14.54892
		HA-5.0s	-25.33914	1.891743	.000	-30.88220	-19.79608
		HA-10.0s	-17.16175	1.858841	.000	-22.60841	-11.71510
	HA-0.5s	HA-0.0s	5.06938	1.858841	.083	-.37727	10.51604
		HA-1.0s	4.62843	1.858841	.141	-.81822	10.07508
		HA-3.0s	-15.02260	1.891743	.000	-20.56566	-9.47954
		HA-5.0s	-20.26976	1.891743	.000	-25.81282	-14.72670
		HA-10.0s	-12.09237	1.858841	.000	-17.53902	-6.64572
	HA-1.0s	HA-0.0s	.44095	1.858841	1.000	-5.00570	5.88761
		HA-0.5s	-4.62843	1.858841	.141	-10.07508	.81822
		HA-3.0s	-19.65103	1.891743	.000	-25.19409	-14.10797
		HA-5.0s	-24.89819	1.891743	.000	-30.44125	-19.35513
		HA-10.0s	-16.72080	1.858841	.000	-22.16745	-11.27415
	HA-3.0s	HA-0.0s	20.09198	1.891743	.000	14.54892	25.63504
		HA-0.5s	15.02260	1.891743	.000	9.47954	20.56566
		HA-1.0s	19.65103	1.891743	.000	14.10797	25.19409
		HA-5.0s	-5.24716	1.924083	.083	-10.88498	.39066
		HA-10.0s	2.93023	1.891743	.634	-2.61283	8.47329
HA-5.0s	HA-0.0s	25.33914	1.891743	.000	19.79608	30.88220	
	HA-0.5s	20.26976	1.891743	.000	14.72670	25.81282	
	HA-1.0s	24.89819	1.891743	.000	19.35513	30.44125	
	HA-3.0s	5.24716	1.924083	.083	-.39066	10.88498	
	HA-10.0s	8.17739	1.891743	.001	2.63432	13.72045	
HA-10.0s	HA-0.0s	17.16175	1.858841	.000	11.71510	22.60841	
	HA-0.5s	12.09237	1.858841	.000	6.64572	17.53902	
	HA-1.0s	16.72080	1.858841	.000	11.27415	22.16745	
	HA-3.0s	-2.93023	1.891743	.634	-8.47329	2.61283	
	HA-5.0s	-8.17739	1.891743	.001	-13.72045	-2.63432	

	(I) % silica	(J) % silica	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Scheffe	HA-0.0s	HA-0.5s	-5.06938	1.858841	.205	-11.43518	1.29642
		HA-1.0s	-.44095	1.858841	1.000	-6.80675	5.92484
		HA-3.0s	-20.09198*	1.891743	.000	-26.57046	-13.61351
		HA-5.0s	-25.33914*	1.891743	.000	-31.81762	-18.86066
		HA-10.0s	-17.16175*	1.858841	.000	-23.52755	-10.79596
	HA-0.5s	HA-0.0s	5.06938	1.858841	.205	-1.29642	11.43518
		HA-1.0s	4.62843	1.858841	.300	-1.73737	10.99423
		HA-3.0s	-15.02260*	1.891743	.000	-21.50108	-8.54412
		HA-5.0s	-20.26976*	1.891743	.000	-26.74823	-13.79128
		HA-10.0s	-12.09237*	1.858841	.000	-18.45817	-5.72657
	HA-1.0s	HA-0.0s	.44095	1.858841	1.000	-5.92484	6.80675
		HA-0.5s	-4.62843	1.858841	.300	-10.99423	1.73737
		HA-3.0s	-19.65103*	1.891743	.000	-26.12951	-13.17255
		HA-5.0s	-24.89819*	1.891743	.000	-31.37666	-18.41971
		HA-10.0s	-16.72080*	1.858841	.000	-23.08660	-10.35500
	HA-3.0s	HA-0.0s	20.09198*	1.891743	.000	13.61351	26.57046
		HA-0.5s	15.02260*	1.891743	.000	8.54412	21.50108
		HA-1.0s	19.65103*	1.891743	.000	13.17255	26.12951
		HA-5.0s	-5.24716	1.924083	.205	-11.83638	1.34207
		HA-10.0s	2.93023	1.891743	.790	-3.54825	9.40870
HA-5.0s	HA-0.0s	25.33914*	1.891743	.000	18.86066	31.81762	
	HA-0.5s	20.26976*	1.891743	.000	13.79128	26.74823	
	HA-1.0s	24.89819*	1.891743	.000	18.41971	31.37666	
	HA-3.0s	5.24716	1.924083	.205	-1.34207	11.83638	
	HA-10.0s	8.17739*	1.891743	.005	1.69891	14.65586	
HA-10.0s	HA-0.0s	17.16175*	1.858841	.000	10.79596	23.52755	
	HA-0.5s	12.09237*	1.858841	.000	5.72657	18.45817	
	HA-1.0s	16.72080*	1.858841	.000	10.35500	23.08660	
	HA-3.0s	-2.93023	1.891743	.790	-9.40870	3.54825	
	HA-5.0s	-8.17739*	1.891743	.005	-14.65586	-1.69891	

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 25.915.

\*. The mean difference is significant at the .05 level.



## Homogeneous Subsets

% Cell survivor

% silica	N	Subset			
		1	2	3	
Tukey HSD <sup>a</sup>	HA-0.0s	15	22.96784		
	HA-1.0s	15	23.40879		
	HA-0.5s	15	28.03722		
	HA-10.0s	15		40.12959	
	HA-3.0s	14		43.05982	43.05982
	HA-5.0s	14			48.30698
	Sig.		.089	.628	.071
Scheffe <sup>a</sup>	HA-0.0s	15	22.96784		
	HA-1.0s	15	23.40879		
	HA-0.5s	15	28.03722		
	HA-10.0s	15		40.12959	
	HA-3.0s	14		43.05982	43.05982
	HA-5.0s	14			48.30698
	Sig.		.216	.786	.184

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 25.915.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 14.651.

## 2. การวิเคราะห์การเพิ่มขึ้นของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส

### 2.1 การคำนวณเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของเซลล์สร้างกระดูก

นำค่าการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและค่าปริมาณโปรตีนจากตัวอย่างจำนวน 5 ซึ้นในแต่ละกลุ่มของวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกา มาคำนวณหาค่าการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเป็นยูนิตต่อกรัมโปรตีน จากนั้นคำนวณเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส เปรียบเทียบกับค่าการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของเซลล์สร้างกระดูกที่เลี้ยงอยู่ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ (ค่าการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของเซลล์สร้างกระดูกที่เลี้ยงในวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกา/ค่าการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของเซลล์สร้างกระดูกที่เลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์  $\times 100$ ) จากนั้นนำเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของเซลล์สร้างกระดูก มาคำนวณค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ดังแสดงในตารางที่ 3 และนำไปวิเคราะห์ทางสถิติต่อไป

ตารางที่ 3 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของเซลล์สร้างกระดูกที่เลี้ยงอยู่ในวัสดุไฮดรอกซีอะพาไทต์เจือด้วยซิลิกา ในกลุ่มต่างๆ หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 และ 14 วัน

เปอร์เซ็นต์ซิลิกา	ความหนาแน่นรูพรุน	วัน	ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
HA-0.0S	75 ppi	7 วัน	430.40	102.366
		14 วัน	643.00	190.175
		Total	536.70	182.446
	60 ppi	7 วัน	311.20	56.703
		14 วัน	809.80	249.971
		Total	560.50	313.459
	45 ppi	7 วัน	236.60	47.147
		14 วัน	680.00	116.377
		Total	458.30	248.232
	Total	7 วัน	326.07	106.644
		14 วัน	710.93	193.744
		Total	518.50	248.835
HA-0.5S	75 ppi	7 วัน	230.20	74.211
		14 วัน	264.60	65.194
		Total	247.40	68.304
	60 ppi	7 วัน	182.20	17.210
		14 วัน	1227.80	214.988
		Total	705.00	569.528
	45 ppi	7 วัน	194.80	35.989
		14 วัน	1667.00	214.333
		Total	930.90	789.329
	Total	7 วัน	202.40	49.705
		14 วัน	1053.13	628.562
		Total	627.77	615.712

เปอร์เซ็นต์ซิลิกา	ความหนาแน่นรูปพรุน	วัน	ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	
HA-1.0S	75 ppi	7 วัน	290.60	57.400	
		14 วัน	471.80	107.255	
		Total	381.20	125.290	
	60 ppi	7 วัน	242.40	37.984	
		14 วัน	953.60	131.196	
		Total	598.00	385.737	
	45 ppi	7 วัน	291.20	20.401	
		14 วัน	443.80	115.770	
		Total	367.50	112.295	
	Total	7 วัน	274.73	45.085	
		14 วัน	623.07	265.898	
		Total	448.90	257.863	
	HA-3.0S	75 ppi	7 วัน	408.60	52.657
			14 วัน	899.80	242.029
			Total	654.20	307.065
60 ppi		7 วัน	373.00	49.985	
		14 วัน	471.00	133.581	
		Total	422.00	108.208	
45 ppi		7 วัน	309.40	52.823	
		14 วัน	373.00	65.158	
		Total	341.20	65.197	
Total		7 วัน	363.67	64.088	
		14 วัน	581.27	281.280	
		Total	472.47	228.962	

เปอร์เซ็นต์ซิลิกา	ความหนาแน่นรูปพรุน	วัน	ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
HA-5.0S	75 ppi	7 วัน	289.20	36.065
		14 วัน	588.20	53.570
		Total	438.70	163.362
	60 ppi	7 วัน	392.60	66.116
		14 วัน	1146.40	147.612
		Total	769.50	411.660
	45 ppi	7 วัน	325.40	71.315
		14 วัน	744.80	155.871
		Total	535.10	248.834
	Total	7 วัน	335.73	70.993
		14 วัน	826.47	270.556
		Total	581.10	316.310
HA-10.0S	75 ppi	7 วัน	458.20	155.453
		14 วัน	529.60	193.049
		Total	493.90	169.469
	60 ppi	7 วัน	235.40	37.407
		14 วัน	523.00	111.043
		Total	379.20	170.523
	45 ppi	7 วัน	428.20	103.432
		14 วัน	849.60	227.933
		Total	638.90	277.799
	Total	7 วัน	373.93	144.232
		14 วัน	634.07	232.183
		Total	504.00	231.449

## 2.2 ตารางค่าการวิเคราะห์ทางสถิติเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ของเซลล์สร้างกระดูก

### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: % ALP

Source	Type III Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1.911E7	35	546137.996	34.789	.000
Intercept	4.970E7	1	4.970E7	3165.806	.000
Silica	682234.911	5	136446.982	8.692	.000
Pore	423218.744	2	211609.372	13.480	.000
Day	8143432.200	1	8143432.200	518.737	.000
silica * pore	3839392.789	10	383939.279	24.457	.000
silica * day	1974397.667	5	394879.533	25.154	.000
pore * day	1033485.233	2	516742.617	32.917	.000
silica * pore * day	3018668.300	10	301866.830	19.229	.000
Error	2260594.800	144	15698.575		
Total	7.107E7	180			
Corrected Total	2.138E7	179			

a. R Squared = .894 (Adjusted R Squared = .869)

## Post Hoc Tests: Pore density

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: % ALP

	(I) pore density	(J) pore density	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	75 ppi	60 ppi	-113.68*	22.875	.000	-167.86	-59.51
		45 ppi	-86.63*	22.875	.001	-140.81	-32.46
	60 ppi	75 ppi	113.68*	22.875	.000	59.51	167.86
		45 ppi	27.05	22.875	.466	-27.12	81.22
	45 ppi	75 ppi	86.63*	22.875	.001	32.46	140.81
		60 ppi	-27.05	22.875	.466	-81.22	27.12
Scheffe	75 ppi	60 ppi	-113.68*	22.875	.000	-170.26	-57.10
		45 ppi	-86.63*	22.875	.001	-143.21	-30.05
	60 ppi	75 ppi	113.68*	22.875	.000	57.10	170.26
		45 ppi	27.05	22.875	.499	-29.53	83.63
	45 ppi	75 ppi	86.63*	22.875	.001	30.05	143.21
		60 ppi	-27.05	22.875	.499	-83.63	29.53

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 15698.575.

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

## Homogeneous Subsets

% ALP

	Pore density	N	Subset	
			1	2
Tukey HSD <sup>a</sup>	75 ppi	60	458.68	
	45 ppi	60		545.32
	60 ppi	60		572.37
	Sig.		1.000	.466
Scheffe <sup>a</sup>	75 ppi	60	458.68	
	45 ppi	60		545.32
	60 ppi	60		572.37
	Sig.		1.000	.499

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 15698.575.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 60.000.



## Post Hoc Tests: % silica

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: % ALP

	(I) % silica	(J) % silica	Mean Difference		Sig.	95% Confidence Interval	
			(I-J)	Std. Error		Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	HA-0.0S	HA-0.5S	-109.27 <sup>*</sup>	32.351	.012	-202.71	-15.82
		HA-1.0S	69.60	32.351	.267	-23.84	163.04
		HA-3.0S	46.03	32.351	.713	-47.41	139.48
		HA-5.0S	-62.60	32.351	.385	-156.04	30.84
		HA-10.0S	14.50	32.351	.998	-78.94	107.94
	HA-0.5S	HA-0.0S	109.27 <sup>*</sup>	32.351	.012	15.82	202.71
		HA-1.0S	178.87 <sup>*</sup>	32.351	.000	85.42	272.31
		HA-3.0S	155.30 <sup>*</sup>	32.351	.000	61.86	248.74
		HA-5.0S	46.67	32.351	.701	-46.78	140.11
		HA-10.0S	123.77 <sup>*</sup>	32.351	.003	30.32	217.21
	HA-1.0S	HA-0.0S	-69.60	32.351	.267	-163.04	23.84
		HA-0.5S	-178.87 <sup>*</sup>	32.351	.000	-272.31	-85.42
		HA-3.0S	-23.57	32.351	.978	-117.01	69.88
		HA-5.0S	-132.20 <sup>*</sup>	32.351	.001	-225.64	-38.76
		HA-10.0S	-55.10	32.351	.532	-148.54	38.34
	HA-3.0S	HA-0.0S	-46.03	32.351	.713	-139.48	47.41
		HA-0.5S	-155.30 <sup>*</sup>	32.351	.000	-248.74	-61.86
		HA-1.0S	23.57	32.351	.978	-69.88	117.01
		HA-5.0S	-108.63 <sup>*</sup>	32.351	.013	-202.08	-15.19
		HA-10.0S	-31.53	32.351	.925	-124.98	61.91
HA-5.0S	HA-0.0S	62.60	32.351	.385	-30.84	156.04	
	HA-0.5S	-46.67	32.351	.701	-140.11	46.78	
	HA-1.0S	132.20	32.351	.001	38.76	225.64	
	HA-3.0S	108.63 <sup>*</sup>	32.351	.013	15.19	202.08	
	HA-10.0S	77.10	32.351	.169	-16.34	170.54	
HA-10.0S	HA-0.0S	-14.50	32.351	.998	-107.94	78.94	
	HA-0.5S	-123.77 <sup>*</sup>	32.351	.003	-217.21	-30.32	
	HA-1.0S	55.10	32.351	.532	-38.34	148.54	
	HA-3.0S	31.53	32.351	.925	-61.91	124.98	
	HA-5.0S	-77.10	32.351	.169	-170.54	16.34	

	(I) % silica	(J) % silica	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Scheffe	HA-0.0S	HA-0.5S	-109.27*	32.351	.050	-218.42	-.11
		HA-1.0S	69.60	32.351	.466	-39.56	178.76
		HA-3.0S	46.03	32.351	.845	-63.12	155.19
		HA-5.0S	-62.60	32.351	.588	-171.76	46.56
		HA-10.0S	14.50	32.351	.999	-94.66	123.66
	HA-0.5S	HA-0.0S	109.27*	32.351	.050	.11	218.42
		HA-1.0S	178.87*	32.351	.000	69.71	288.02
		HA-3.0S	155.30*	32.351	.001	46.14	264.46
		HA-5.0S	46.67	32.351	.837	-62.49	155.82
		HA-10.0S	123.77*	32.351	.015	14.61	232.92
	HA-1.0S	HA-0.0S	-69.60	32.351	.466	-178.76	39.56
		HA-0.5S	-178.87*	32.351	.000	-288.02	-69.71
		HA-3.0S	-23.57	32.351	.991	-132.72	85.59
		HA-5.0S	-132.20*	32.351	.007	-241.36	-23.04
		HA-10.0S	-55.10	32.351	.715	-164.26	54.06
	HA-3.0S	HA-0.0S	-46.03	32.351	.845	-155.19	63.12
		HA-0.5S	-155.30*	32.351	.001	-264.46	-46.14
		HA-1.0S	23.57	32.351	.991	-85.59	132.72
		HA-5.0S	-108.63	32.351	.052	-217.79	.52
		HA-10.0S	-31.53	32.351	.966	-140.69	77.62
	HA-5.0S	HA-0.0S	62.60	32.351	.588	-46.56	171.76
		HA-0.5S	-46.67	32.351	.837	-155.82	62.49
		HA-1.0S	132.20*	32.351	.007	23.04	241.36
		HA-3.0S	108.63	32.351	.052	-.52	217.79
		HA-10.0S	77.10	32.351	.344	-32.06	186.26
	HA-10.0S	HA-0.0S	-14.50	32.351	.999	-123.66	94.66
		HA-0.5S	-123.77*	32.351	.015	-232.92	-14.61
		HA-1.0S	55.10	32.351	.715	-54.06	164.26
		HA-3.0S	31.53	32.351	.966	-77.62	140.69
		HA-5.0S	-77.10	32.351	.344	-186.26	32.06

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 15698.575.

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

## Homogeneous Subsets

		% ALP			
% silica	N	Subset			
		1	2	3	
Tukey HSD <sup>a</sup>	HA-1.0S	30	448.90		
	HA-3.0S	30	472.47		
	HA-10.0S	30	504.00	504.00	
	HA-0.0S	30	518.50	518.50	
	HA-5.0S	30		581.10	581.10
	HA-0.5S	30			627.77
	Sig.		.267	.169	.701
Scheffe <sup>a</sup>	HA-1.0S	30	448.90		
	HA-3.0S	30	472.47	472.47	
	HA-10.0S	30	504.00	504.00	
	HA-0.0S	30	518.50	518.50	
	HA-5.0S	30		581.10	581.10
	HA-0.5S	30			627.77
	Sig.		.466	.052	.837

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 15698.575.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นายจาร์ นิคม  
รหัสประจำตัวนักศึกษา 5010220025

## วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2550

## ทุนการศึกษา

โครงการทุนสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (TGIST) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์ (TG-33-18-50-043 M)  
ทุนสนับสนุนการวิจัยจากบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

## การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

**Jaru Nikom**, Kanokwan Panyayong , Angkhana Joenworoluck, Nudthakarn Kosachan, Ureporn Legget, Ron Stevens, Nudthakan Kosachan and Angkhana Jaroenworoluck. Effect of SiO<sub>2</sub> content and macropore size on human osteoblast cell viability (in preparation)

**Jaru Nikom** , Kanokwan Panyayong , Angkhana Joenworoluck, Nudthakarn Kosachan and Ureporn Legget. 2008. Cell Cytotoxicity of Silica doped hydroxyapatite bioceramics to bone cell. Proceeding of The 34<sup>th</sup> Congress on Science and Technology Thailand (STT 34). Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand, 31 October – 2 November 2008, pp.135.

Phongpaichit, S., **Nikom, J.**, Rungjindamai, N., Sakayaroj, J., Hutadilok-Towatana, N., Rukachaisirikul, V., and Kirtikara, K. 2007. Biological activities of extracts from endophytic fungi isolated from Garcinia plants. FEMS Immunol Med Microbiol 51: 517-525.